

ESTELA MARIA NOVAK

Isolamento e Caracterização dos Simbiontes do
Tripanosomatídeo *Crithidia deanei*:
1 - Caracterização da Síntese de Proteínas e
Ácido Nucléico; 2 - Clonagem Molecular
de Genes.

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Pa-
raná para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica.

CURITIBA

1988

- A PARTE EXPERIMENTAL DO TRABALHO DE TESE FOI REALIZADA NA DISCIPLINA DE PARASITOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE MICRO, IMUNO E PARASITOLOGIA DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA, SOB A ORIENTAÇÃO DO Dr. JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA.

- COLABORAM COM RECURSOS PARA
A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

.CONSELHO NACIONAL DE DESENVOL-
VIMENTO CIENTÍFICO E TECNO-
LÓGICO (CNPq).

.FINEP/PADCT.

.FAPESP.

AOS MEUS PAIS

AGRADECIMENTOS

Aos professores, colegas e funcionários da Disciplina de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus agradecimentos.

Gostaria também de agradecer de maneira especial :

- ao Dr. JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO, mestre e amigo, por sua compreensão e dedicada orientação, cujo convívio em seu laboratório possibilitou-me conhecer o seu excepcional caráter humano.
- ao Dr. LUIS A.S. DA VEIGA e ao Dr. MARCELO IACOMINI pela compreensão permitindo a realização da parte experimental desta tese na Escola Paulista de Medicina .
- à Dra. NOBUKO YOSHIDA por sua amizade, pelos incentivos recebidos e por sua constante colaboração durante este trabalho.

- à Dra. EDNA F. HAAPALAINEN por sua colaboração nas execuções das microscópias eletrônicas.
- ao Dr. RENATO A. MORTARA e Dr. LUIS C. LOPES pelas valorosas críticas à elaboração desta tese.
- ao PAULO C. COTRIM e GLAUCIA S. PARANHOS pelo companherismo e amizade, e por suas sugestões durante a execução deste trabalho.
- à LEDA M. CUMMINGS, M. RITA TABA, MARCIA ARAGUTH e SANDRA BLANCO pela amizade demonstrada em todos os momentos.
- ao HENRIQUE B.M. GOMES, MARICILDA P. DE MELLO e SOLANGE S. HERNANDES pela colaboração específicas em determinada fase desta tese.
- a MARIA SAMPAIO, LUÍS E. BARBOSA e CONCEIÇÃO A. BOAVENTURA pela cooperação dada durante a execução deste trabalho.

ABREVIATURAS

A	absorbância
amp ^r	ampicilina resistente
ATP	adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albumina de soro bovino
Bis acríla-	N-N'- metileno-bis acrílamida
mida	
C ₁	Curie: 2.2×10^{12} desintegrações por minutos
cpm	contagens por minuto
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
D.O	densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
IPTG	isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
um	micrometros
nm	nanometros
ng	nanograma

NP-40	Nonidet-P 40
PMSF	Fluoreto de parametilsulfonila
POPOP	1,4-bis-2(4 metil-5-fenil-oxazolil)benzeno
PPO	2,5 difenil-oxazol
RNAr	ácido ribonucleíco ribossomal
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N',-tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade enzimática
UV	luz ultra-violeta
XGAL	5-bromo 4-cloro 3-indolil B D-galactosí- deo

INDICE

1.0.-INTRODUÇÃO	
1.1.- <i>Crithidia deanei</i> e seu endosimbionte -----	1
1.2.-Requerimentos nutricionais de <i>Crithidia deanei</i> e o papel do endosimbionte -----	6
1.3.-Organização do genoma e do aparato de síntese proteica do simbiote -----	7
1.4.-A hipótese da origem endosimbiótica de mitocôndrias e plastídeos -----	9
1.5.-Objetivos -----	12
2.0.-MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1.-Reagentes -----	14
2.2.-Organismos utilizados: Tripanosomatídeos e Bactérias -	15
2.3.-Condições de manutenção e cultivo de tripanosomatídeos e bactérias -----	16
2.3.1.-Manutenção e cultivo de tripanosomatídeos -----	16
2.3.2.-Manutenção e cultivo de bactérias -----	18
2.4.-Isolamento do endosimbionte de <i>Crithidia deanei</i> -----	19
2.5.-Microscopia eletrônica -----	21
2.6.-Determinação da concentração de proteínas -----	21
2.7.-Determinação da atividade específica da ornitina carbamiltransferase (E.C. 2.1.3.3.) -----	22
2.8.-Incorporação de precursores radiativos em simbiotes -	23

2.9.-Preparação de polipeptídeos radiativos de simbioses e de flagelados para a análise em gel de poliacrilamida-SDS -----	24
2.10.-Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) -	25
2.11.-Secagem e autoradiografia do gel de poliacrilamida ---	28
2.12.-Imunização de coelhos com simbioses isolados. -----	28
2.13.-Preparo da resina de afinidade Sepharose CNBr 4B acoplada às proteínas de <u>Crithidia deanei</u> .-----	29
2.14.-Imunoprecipitação de proteínas de simbioses e de <u>Crithidia deanei</u> -----	30
2.15.-Tratamento das células de <u>Staphylococcus aureus</u> -----	31
2.16.-Extração de DNA de <u>Crithidia deanei</u> aposimbótica e de simbiote isolado -----	32
2.17.-Determinação da concentração de DNA -----	32
2.18.-Digestão do DNA de simbiote com endonucleases de restrição -----	33
2.19.-Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose ---	33
2.20.-Preparação dos fragmentos de DNA do endosimbote para a clonagem em pUC 13 -----	34
2.21.-Cálculo da representatividade do banco genômico -----	35
2.22.-Clonagem do DNA genômico de simbiote em pUC 13 -----	36
2.23.-Preparação de células bacterianas competentes para transformação -----	37
2.24.-Transformação bacteriana -----	38

2.25.-Isolamento e caracterização dos clones recombinantes	39
2.25.1.-Isolamento de clones recombinantes por hibridização de colônias recombinantes	39
2.25.1.1.-Preparação de filtros de nitrocelulose contendo co- lônias recombinantes	39
2.25.1.2.-Preparo de sondas radiativas	41
2.25.1.3.-Hibridização das bactérias recombinantes com sondas radiativas	42
2.26.- Hibridização diferencial	43
3.0.-RESULTADOS	
3.1.-Isolamento do endosimbionte de <u>Crithidia deanei</u>	45
3.2.-Incorporação de aminoácidos radiativos em simbionte iso- lados	52
3.3.-Efeitos de antibióticos na incorporação de aminoácidos radiativos em simbiontes isolados	55
3.4.-Caracterização dos polipeptídeos dos simbiontes através de eletroforese em gel de poliacrilamida	58
3.5.-Análise dos polipeptídeos sintetizados pelos simbiontes com anticorpos policlonais	64
3.6.-Incorporação de metil(H ³)timidina em simbiontes	68
3.7.-Isolamento e Caracterização do DNA do simbionte isola- dos	70
3.8.-Construção de biblioteca genômica de simbionte em plas- mídeo pUC 13	74

3.9.-Análise de clones recombinantes em pUC 13 através de hibridização "in situ " -----	80
4.0.-DISCUSSÃO -----	85
5.0.-RESUMO -----	99
6.0.-SUMMARY -----	102
7.0.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	104

1.0.-INTRODUÇÃO

1.1.-CRITHIDIA DEANEI E SEU ENDOSIMBIONTE

Existem várias espécies de tripanosomatídeos que albergam no seu citoplasma estruturas semelhantes a bactérias denominadas de endosimbiontes ou simbiontes. O gênero *Crithidia* apresenta três espécies portadoras de simbiontes que podem ser mantidas em laboratório : *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia oncolpelti* e *Crithidia deanei* (NOVY e cols., 1907; NEWTON e HORNE 1957; MUNDIN e cols., 1974).

O protozoário flagelado *Crithidia deanei*, objeto de estudo deste trabalho, apresenta a seguinte posição sistemática:

Ordem :Kinetoplastida

Família :Trypanosomatidae

Gênero :*Crithidia*

Espécie: *Crithidia deanei*

A família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901) compreende flagelados possuidores de uma única mitocôndria, na qual se localiza uma estrutura composta por fibras circulares de DNA que recebe o nome de cinetoplasto (HONIGBERG e cols.,1964).

O gênero *Crithidia* é constituído por parasitas monogenéticos de insetos, os quais tem sido isolados do tubo digestivo de dípteros, hemípteros e himenópteros. No ciclo evolutivo do gênero *Crithidia*, encontramos apenas a forma coanomastigota.

A espécie *Crithidia deanei* foi isolada por CARVALHO em 1973 a partir do intestino de *Zelus leucogrammus*. Este predador se infecta quando se alimenta de dípteros contaminados por parasitas desta espécie. Posteriormente MUNDIN e cols., 1974 caracterizaram nesta espécie a presença de um corpúsculo citoplasmático que foi demonstrado como sendo um endosimbionte. Esta cepa foi depositada na American Type Culture Collection (ATCC) por HUNTER em 1974 sob o número 30255 .

Sob o aspecto morfológico, esta espécie (Fig.1) apresenta formas ligeiramente arredondadas, coanomastigotas, contendo um único flagelo emergindo de uma bolsa flagelar em forma de funil, com o cinetoplasto situado anteriormente ao núcleo. Caracteriza-se também pela ausência de microtubúlos subpeliculares, típicos de tripanosomatídeos (FREYMULLER e CAMARGO ,1981)

O endosimbionte (Fig.1) possui uma estrutura semelhante a uma bactéria Gram-negativa, sendo que o seu número pode variar de 1 a 3 por célula, dependendo do estágio de crescimento da célula hospedeira. O simbiote é revestido por duas membranas semelhantes à membrana plasmática : a membrana interna e

3

a externa. Segundo alguns autores, esta última teria sido fornecida pela célula hospedeira (McGHEE e CROSGROVE, 1980; CHANG, 1974).

O simbiote mede cerca de 1.5-2.0 um de comprimento apresentando uma zona eletrônica-translúcida contendo fibrilas sugestivas da presença de DNA (CHANG, 1974; FREYMULLER e CAMARGO, 1981).

É interessante observar a presença na célula de *Crithidia deanei* de três genomas diferentes, compartimentalizados como DNA nuclear, DNA do cinetoplasto ou K-DNA e DNA do simbiote ou procarioto. Cada compartimento possui um sistema próprio de biosíntese de proteínas e apresenta mecanismos de regulação gênica específicos (CORREA, 1976).

Em condições naturais, *Crithidia deanei*, *Crithidia oncolpelti* e *Blastocrithidia culicis* apresentam endosimbiontes em seu citoplasma. Em condição de laboratório, o endosimbionte pode ser eliminado cultivando-se os flagelados em meio contendo o antibiótico cloranfenicol (CHANG, 1974; ROITMAN e CAMARGO, 1985). A eliminação do simbiote por este procedimento origina cepas denominadas aposimbióticas ou "curadas".

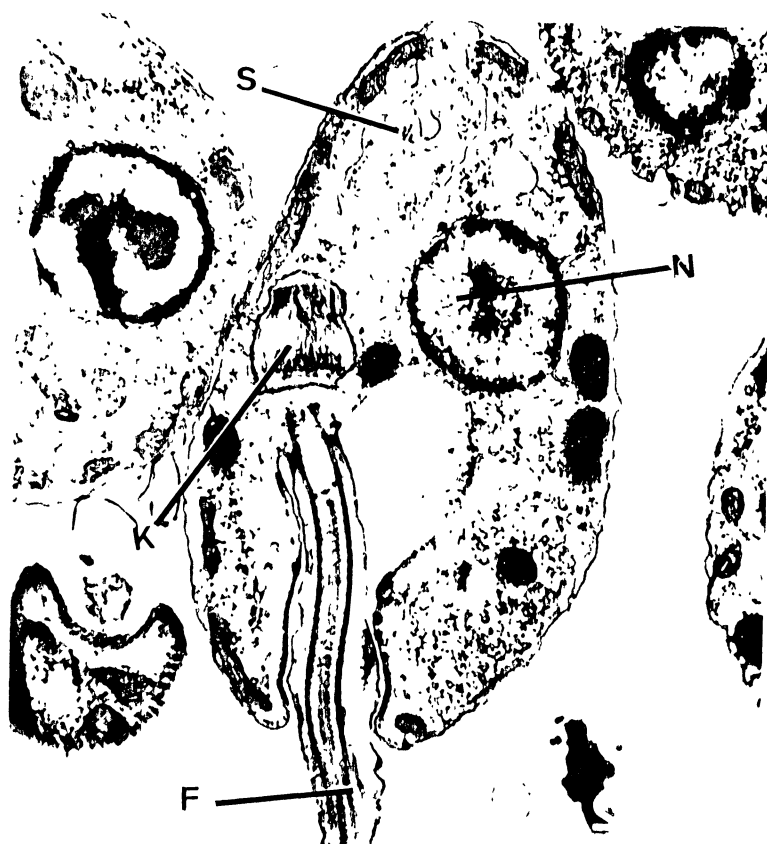


Fig 1.-Análise ao microscópio eletrônico do tripanosoma-
tídeo *Crithidia deanei*.

N-núcleo, K-cinetoplasto, F-flagelo

S-simbionte.Aumento de 20.000 x (cortesia da Dra.
Edna F.Haapalainen).

6

1.2- REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS DE CRITHIDIA DEANEI E O
PAPEL DO ENDOSIMBIONTE.

A Crithidia deanei apresenta um perfil de requerimento nutricional bastante simples quando comparado com o de Crithidia deanei aposimbiótica ou de outras espécies de Crithidia não portadora de simbiote. Por exemplo, Crithidia deanei cresce em meio definido contendo metionina e um ácido aminado aromático (tirosina, fenilalanina ou triptofano) e mais 4 vitaminas (ácido fólico, tiamina, nicotinamida e biotina) (CAMARGO, 1979; ROITMAN, e CAMARGO, 1985). As cepas aposimbióticas necessitam para crescer, além dos aminoácidos e vitaminas citados acima, uma série adicional de outros aminoácidos, vitaminas e heme derivados (CAMARGO, 1979). Essas diferenças nutricionais sugerem que o endosimbionte é capaz de suprir a célula hospedeira.

A presença de endosimbionte confere algumas propriedades nutricionais peculiares às espécies Crithidia deanei, Crithidia oncolpelti e Blastocrithidia culicis. Assim Crithidia deanei e Crithidia oncolpelti podem crescer em meios de culturas contendo apenas ácido glutâmico (sem ornitina, citrulina ou arginina) (CAMARGO, 1979). Estas cepas são capazes de sintetizar ornitina a partir de ácido glutâmico e arginina a partir de ornitina. A Crithidia possui as enzimas citoplasmáticas arginino-succinato sintetase, liase e arginase. As enzimas ornitina acetiltransferase e ornitina-carbamiltransferase, que faltam à

célula hospedeira (*Crithidia*), são supridas pelo endosimbionte (GALINARI e CAMARGO, 1977 ; CAMARGO e FREYMULLER, 1977; FIGUEIREDO e cols., 1978 ; CAMARGO, 1979 ; ALFIERI e CAMARGO, 1982)

Quanto à síntese de isoleucina pela *Crithidia deanei*, demonstrou-se também a participação da treonina deaminase do simbionte nesta via metabólica (ALFIERI e CAMARGO, 1982). Esta enzima não é detectada em *Crithidia deanei* aposimbótica .

Os simbiontes participam de maneira decisiva na síntese do grupo heme. Foi demonstrado que a enzima uroporfirino-gênio I sintetase está localizada em uma fração subcelular rica em simbiontes. Esta fração é obtida por centrifugação diferencial de homogenatos celulares (CHANG e cols., 1974).

Os dados apresentados neste ítem mostram que os simbiontes estão integrados na fisiologia do tripanosomatídeo contribuindo de maneira decisiva para o funcionamento de várias vias metabólicas da célula hospedeira .

1.3- ORGANIZAÇÃO DO GENOMA E DO APARATO DE SÍNTESE PROTEICA DO ENDOSIMBIONTE

O DNA do endosimbionte apresenta propriedades físicas semelhantes ao DNA da bactéria *E. coli* (SPENCER e CROSS 1975 ; TUAN e CHANG ,1975). A densidade do DNA de *Crithidia oncolpelti* em gradiente de CsCl é da ordem de 1.695 g/ml e a proporção de guanina /citosina é de 35,7% (MARMUR e cols., 1963

TUAN e CHANG, 1975 ; SPENCER e CROSS , 1975). Estes valores são muito próximos daqueles obtidos com DNA de E. coli (SPENCER e CROSS,1975 ; TUAN e CHANG,1975).

Estudos de cinética de renaturação do DNA de endosimbionte mostraram que ele apresenta complexidade da ordem de $2.7-6.7 \times 10^9$ daltons. A complexidade do DNA simbiótica é semelhante aos valores apresentados pelo DNA de E. coli (SPENCER e CROSS,1975 ; TUAN e CHANG ,1975).

Deve-se salientar que não existe na literatura nenhum dado sobre o comportamento do DNA do endosimbionte em gel de agarose e nem sobre o seu comportamento frente a diferentes enzimas de restrição .

O simbiote de Crithidia oncolpelti contém rRNAs e ribossomos com propriedades muito parecidas aos de bactérias. Foram encontradas em simbioses desta espécie, ribossomos com coeficiente de sedimentação da ordem de 67 S, 49S e 31 S, os quais parecem ser análogos aos ribossomos 68 S, 51S e 31 S encontrados em E.coli (SPENCER e CROSS, 1975). Os RNAs ribossomais de Crithidia deanei comigram com os RNAs ribossomais de E.coli em gel de poliacrilamida, apresentando mobilidade semelhante aos rRNAs 16 S e 23 S de procariotos (SPENCER e CROSS, 1975 ; CORREA, 1976).

Como foi discutido acima ,o cultivo de tripanosomatídeos em meio contendo cloranfenicol ocasiona a perda

do simbiote (CHANG, 1974 ; ROITMAN e CAMARGO , 1985). Esse dado sugere que o simbiote possui ribossomos sensíveis à ação do cloranfenicol tal como ocorre com os ribossomos bacterianos e de mitocôndrias (PRATT e FEKETY, 1986)

Não há nenhum dado na literatura sobre os efeitos de antibióticos na síntese proteica de simbiote isolado de tripanosomatídeos. Também não se conhece nenhum trabalho sobre a caracterização dos polipeptídeos sintetizados pelos simbioses. Talvez, a ausência destes dados se deva ao fato dos métodos de isolamento de simbioses, disponíveis na literatura apresentarem muitas etapas, as quais dificultam o processo de isolamento e os simbioses obtidos por esses métodos, nem sempre apresentam atividade metabólica .

1.4-A HIPÓTESE DA ORIGEM ENDOSIMBIÓTICA DE MITOCÔNDRIAS E PLASTÍDEOS

A hipótese endosimbiótica propõe que mitocôndrias e plastídeos tenham evoluído a partir de bactérias que colonizaram o citoplasma da célula eucariótica (MARGULIS, 1975 ; GRAY e DOOLITTLE, 1982 ; CAVALIER-SMITH e LEE, 1985). Esta hipótese baseia-se nas semelhanças existentes entre a organização do genoma e do aparato de síntese proteica destas organelas com aqueles de bactérias. Esta hipótese supõe que os cloro-

plastos teriam evoluído a partir de um ancestral comum, que teria sido uma cianobactéria ou uma outra bactéria fotossintética. Com relação às mitocôndrias, o ancestral comum teria sido uma eubactéria que utilizava oxigênio no seu metabolismo (MARGULIS 1975 ; CAVALIER-SMITH, 1985). O ancestral procariótico destas organelas teria como envelope celular duas membranas lipídicas tal como ocorre nas bactérias gram-negativas, isto é , uma bicamada lipídica interna (membrana interna) e uma outra bicamada lipídica externa (membrana externa). Esse organismo procariótico (eubactéria) teria sido fagocitado pela célula eucariótica primitiva e, de alguma maneira, ele teria evitado o sistema lisossomal ou o equivalente deste da célula eucariótica primitivo. Isto teria permitido a permanência e evolução deste organismo procariótico na célula hospedeira (CAVALIER-SMITH e LEE, 1985).

Como foi dito anteriormente, a hipótese endosimbiótica baseia-se nas similaridades existentes entre as eubactérias e os cloroplastos e mitocôndrias. Como se sabe, o aparato de síntese proteica destas organelas tem várias características procarióticas. Os ribossomos destas organelas apresentam coeficiente de sedimentação da ordem de 70 S e são sensíveis ao cloranfenicol , tal como ocorre nas bactérias . A síntese de proteínas destas organelas inicia-se pela adição do resíduo de N-formilmetionina (GRAY e DOOLITTLE , 1982), nos simbiontes este mecanismo é desconhecido até o momento.

Com relação à transcrição, sabe-se que mitocôndrias e cloroplastos são sensíveis à rifampicina sugerindo a existência de RNAs polimerases de natureza procariótica nestas organelas (GRAY e DOOLITTLE, 1982).

A organização e transcrição dos genes ribossomais do cloroplasto são muito semelhantes às de eubactérias. O gene que codifica o RNA ribossomal 16 S do cloroplasto de milho apresenta cerca de 74 % de homologia com o 16 S da bactéria *E.coli* (BROSIUS e cols., 1978; GRAY e DOOLITTLE, 1982). Com relação à mitocôndria, as semelhanças com eubactérias não são tão estreitas como no caso dos cloroplastos. Por exemplo : o coeficiente de sedimentação dos ribossomos mitocondriais varia de 55 a 80 S, segundo a espécie estudada (GRAY e DOOLITTLE , 1982). A organização e transcrição dos genes ribossomais mitocondriais variam de acordo com a espécie estudada e diferem em vários aspectos dos genes ribossomais de eubactérias (GRAY e DOOLITTLE ,1982).

Apesar destas diferenças, os defensores da hipótese endosimbiótica acreditam que as semelhanças existentes são suficientes como argumento para as suas afirmações e suposições.

Existem outras hipóteses sobre a origem das organelas citadas acima. RAFF e MAHLER, 1972, propuseram que as mitocôndrias teriam se originado a partir de membranas contendo pigmentos respiratórios existentes no citoplasma de uma

célula precursora da célula eucariótica .

Os dados existentes na literatura não nos permite tomar uma posição favorável em relação à hipótese endosimbiótica em detrimento da hipótese de RAFF e MAHLER, 1972.

A simbiose em tripanosomatídeos apresenta um aspecto bastante peculiar que é a dependência do simbiote em relação à célula hospedeira. O simbiote é incapaz de multiplicar-se fora da célula hospedeira (ROITMAN e CAMARGO, 1985) sugerindo que o simbiote funciona como uma verdadeira organela celular embora tenha seus próprios aparatos de replicação, transcrição e tradução.

O estudo da relação endosimbionte-Crithidia deanei, talvez possa trazer novas informações sobre a evolução de organelas celulares como mitocôndrias e cloroplastos.

1.5 -OBJETIVOS

Como foi discutido nos itens anteriores, o endosimbionte encontrado no tripanosomatídeo é uma estrutura procariótica perfeitamente integrada na fisiologia da célula eucariótica. O genoma simbiótico é de natureza procariótica embora seja mais complexo que os genomas das mitocôndria e do cinetoplasto. Desta maneira, tem-se uma situação em que 3 genomas diferentes (núcleo ,cinetoplasto e do simbiote) convivem no citoplasma de uma mesma célula ,ou seja, da Crithida .

O estudo dos endosimbiontes talvez possa trazer

novas informações sobre a origem e evolução de organelas presentes nas células eucarióticas bem como em mitocôndrias e cloroplastos e sobre suas interações no interior da mesma célula.

Os objetivos deste trabalho são :

- 1) Estabelecimento de um método de isolamento de endosimbionte de Crithidia deanei, em quantidades suficientes para que se possa efetuar estudos bioquímicos e , com obtenção de simbiontes metabolicamente ativos .
- 2) Analisar a síntese proteica do simbionte isolado através da incorporação de precursores radioativos. Analisar os efeitos de antibióticos na síntese proteica dos simbiontes .
- 3) Caracterizar os polipeptídeos sintetizados pelo simbionte isolado. Comparar o padrão de síntese proteica do simbionte isolado com o da célula hospedeira .
- 4) Isolar e caracterizar o DNA do simbionte com enzimas de restrição. Construção de banco genômico de DNA de endosimbionte de Crithidia deanei e isolamento de clones recombinantes por hibridização "in situ " .

2.0.-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.-REAGENTES

As drogas SDS,BSA(fração V), 2-mercaptoetanol,DTT, Trizma base, TEMED, glicina, agarose, EDTA, brometo de etídio, ácido fólico,cloranfenicol, PPO,POPOP, cicloheximida, ampicilina rifampicina foram adquiridas da Sigma Chemical Corp.. Os demais reagentes como fenol,tolueno, polietileno glicol 6000, sacarose glicerol, úreia, foram obtidos da Merck Darmstadt. Percoll, Ficoll 400, Sepharose CNBr 4B, marcadores peso molecular não radioativos foram adquiridos da Pharmacia Fine Chemicals. Marcadores de peso molecular radioativos foram adquiridos da BRL (Bethesda Research Laboratories). O reativo FOLIN-CIOCALTEAU foi comprado da Laborclin.

As enzimas de restrição foram fornecidas pela Bethesda Research Laboratories.As enzimas DNase I e DNA polimerase I pertencem à Boehring Mannheim.Os meios de cultura foram adquiridos da Difco Laboratories. O meio mínimo essencial de EAGLE e o meio RPMI foram adquiridos da Flow Laboratories.

A bactéria Staphylococcus aureus linhagem COWAN 1 foi gentilmente cedida pela Dra. Nobuko Yoshida, da Disciplina de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina. Os radioisótopos L-³⁵(S) metionina (1255 Ci/mmol), metil (H)³timidina (6.7 Ci/mmol), L-[4,5-³H]leucina (135 Ci/mmol), foram adquiridos da Amersham International e New England Nuclear. De-³²soxiadenosina 5' (α P) trifosfato foi cedido pelo Dr J.C.C.Maia Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As soluções para a manipulação de ácidos nucléicos foram preparadas em água deionizada , bidestilada e autoclavadas. Toda a vidraria foi tratada a 180 °C por 3 horas para inativar nucleases. O uso de luvas foi constante durante o manuseio das soluções e materiais.

2.2.-ORGANISMOS UTILIZADOS : TRIPANOSOMATÍDEOS E BACTERIAS

Foram empregados os seguintes tripanosomatídeos para a realização deste trabalho : Crithidia deanei (ATCC 30255) e Crithidia deanei aposimbiótica da Disciplina de Parasitologia da Escola Paulista de Medicina. As células foram coletadas no final da fase logarítmica de crescimento e o seu número estimado em câmara de Neubauer.

A amostra bacteriana utilizada é uma linhagem de E.coli com as seguintes características : JM 103 - end A , hs dR, sup E, sbc B, thi-I, str A, (lac-pro), / F' trad D 36, pro AB+, lac I, Zm 15 (MESSING e cols., 1981).

A linhagem JM 103 foi usada como hospedeira para o vetor plasmídico pUC 13 (Pharmacia PL Biochemicals) o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. Sergio Schenkman.

2.3-CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DE TRIPANOSOMATÍDEOS E BACTÉRIAS

2.3.1.-Manutenção e cultivo de tripanosomatídeos

Crithidia deanei foi mantida a 28°C em meio FYTS , desenvolvido por ROITMAN e cols 1972 (Tabela 1)

Crithidia deanei aposimbiótica foi mantida a 28°C em meio LIT idealizado por YAEGER e descrito por CAMARGO, 1964 (Tabela 2).

Os repiques de manutenção foram realizados em intervalos de uma semana ,inoculando-se 0.5 ml de uma cultura em fase estacionária (4.0×10^7 células/ml) em 5 ml de meio FYTS ou LIT. Após o cultivo de 24 horas a 28 °C, as amostras eram estocadas a 4°C, condição na qual as células mantêm-se integras por 2 semanas.

Para a obtenção de células em larga escala,os inóculos (5 ml) foram semeados em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 500 ml,contendo 100 ml de cultura e cultivados a 28 C durante 48 horas. A seguir, as culturas eram transferidas para frascos do tipo Fernbach contendo 1000 ml de meio FYTS ou LIT e cultivadas por 48 horas a 28 °C. Nestas condições, obtém-se flagelados intactos e viáveis a uma concentração aproximada de 1.0×10^7 células /ml.

TABELA 1- MEIO FYTS

Composição	Quantidade p/1 litro
Acido fólico	20.0 mg
Extrato de levedura	5.0 g
Triptona	5.0 g
Sacarose	20.0 g
Hemina **	10.0 mg

* - O meio foi esterilizado por autoclavagem a 120 °C por 20 minutos, após ajuste do pH para pH 7.0 com NaOH 1N.

** - Previamente dissolvida em trietanolamina.

TABELA 2-MEIO LIT

Componentes	Quantidade p/ 1 litro
Infusão de fígado	5.0 g
Triptose	5.0 g
NaCl	4.0 g
Na HPO ₂ 4	8.0 g
KCl	0.4 g
Glicose **	2.0 g
Hemina ***	10.0 mg
Soro bovino	100.0 ml

* - O meio foi esterilizado por filtração em filtro Seitz, após ajuste do pH para 7.2 com HCl 2 N

** - A hemina foi dissolvida previamente em trietanolamina .

***- Soro bovino foi previamente inativado a 68 °C por 45 minutos.

2.3.2- Manutenção e cultivo bacteriano

Uma alíquota de 1 ml de cultura bacteriana na fase estacionária foi adicionada a 1 ml de glicerol 80% e armazenada a -20 C. Os inóculos usados na transformação foram cultivados em meio LB (Tabela 3) a 37 C durante 12 horas. Os meios de cultura foram preparados pela dissolução dos solutos em água bidestilada e autoclavados a 122 C com 1 atmosfera de pressão durante 15 minutos.

*
TABELA 3- MEIO LB (Luria-Bertani)

Componentes	Quantidades p/ 1 litro	**
Bacto-triptona	10g	
Extrato de levedura	5g	
Cloreto de sódio	10g	

* - O pH era ajustado em 7.5 com 1N de hidróxido de sódio antes de autoclavagem. Para obter-se o meio sólido foi adicionado 1.2% de Bacto-agar ao meio LB e a preparação autoclavada como descrito acima. Os meios contendo ampicilina (80 ug/ml) foram preparados adicionando-se previamente ao meio autoclavado alíquotas deste antibiótico a partir de solução estoque estéril (5mg/ml).

** - A quantidade p/ 1 litro está na relação expressa em peso/volume.

2.4 - ISOLAMENTO DE ENDOSIMBIONTE DE CRITHIDIA DEANEI

A cultura de Crithidia deanei, contendo ¹⁰ 1×10 células totais, foi centrifugada a 4000 rpm em rotor GSA por 10 minutos a 4°C. As células eram lavadas com PBS (Tabela 4) por 2 vezes e centrifugadas a 6000 rpm em rotor SS34 a 4°C. O precipitado foi então ressuspensão em água bidestilada gelada e, mantido no gelo por 30 minutos. A seguir, o material foi centrifugado a 8000 rpm em rotor SS34 durante 10 minutos a 4°C e ressuspensão em 10 ml de "tampão A" (sacarose 0.25 M, KCl 0.025 M, Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5, MgCl₂ 0.01 M, DTT 1mM). As células foram então rompidas por sonicação (Sonicator-Thornton Inpec Eletrônica S/A) através de 6 pulsos de 15 segundos cada um com intervalos de 1 minuto a uma frequência de 20 KHZ e potência de 40 Watts. A preparação foi observada ao microscópio óptico com contraste de fase para controle de sonicação, ou seja, para a verificação da existência ou não de células do flagelado íntegras na preparação.

Alíquotas de 2 ml do homogenato sônico foram então adicionadas a um gradiente descontínuo de sacarose que continha de baixo para cima 2.5 ml de sacarose 0.8 M e 5ml de sacarose 0.4 M e centrifugadas a 2000 rpm em rotor HB-4 durante 20 minutos a 4°C. O material contido na camada superior do gradiente, assim como a interface foram removidos, e precipitados a 8000 rpm em rotor SS34 por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi então ressuspensão em 2 ml de "tampão A" (descrito acima) e adicionado ao topo de um gradiente descontínuo de Percoll. A solução de Percoll com concentração crescentes de 40 a 80 % eram preparadas a partir de

uma solução estoque (Tabela 6). O gradiente foi preparado em tubo do tipo Corex de 15 ml, adicionando-se em sequência 2 ml de soluções de Percoll nas seguintes concentrações: 40 %, 50%, 60%, 70% e 80 %. O gradiente com amostra foi centrifugado durante uma hora a 8000 rpm em rotor HB-4 a 4 C e a fração contendo o simbiote retirada com pipeta Pasteur e diluída em 10 ml de PBS. A suspensão coletada foi, então, centrifugada a 8000 rpm em rotor SS-34 por 20 minutos a 4 C. Esta operação foi repetida por mais duas vezes a fim de se eliminar as partículas de Percoll.

TABELA 5-SALINA FOSFATADA TAMPONADA (PBS) *

Componentes	Quantidades p/ 1 litro
Cloreto de sódio 0.85 %	900 ml
Tampão fosfato de sódio 0.1 M pH 7.2	100 ml

* - A preparação foi alíquotada e autoclavada.

TABELA 6- COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE PERCOLL *

Componentes	Quantidades
Ficoll 400	1g
Poliétileno glicol 6000	5g
Soro Albumina bovino	1g
Sacarose	8.6 g
Percoll	100 ml

* - A solução foi armazenada a 4 C em frasco estéril .

2.5.-MICROSCOPIA ELETRONICA

As frações subcelulares obtidas em gradiente descontínuo de Percoll e as amostras de Crithidia deanei foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM- 9 ,segundo o método de REYNOLDS, 1963 .

As células e frações subcelulares, após lavagem em PBS, foram fixadas durante 30 minutos a 4°C em glutaraldeído 2,5 % (v/v) preparado em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.4. As amostras foram fragmentadas em peças de cerca de 1 mm e pós-fixadas por 30 minutos a 4°C em ácido ósmico 1% (m/v) preparado em tampão cacodilato 0.1 M .A seguir, as peças foram coradas com acetato de uranila 0.5% durante 2 horas à temperatura ambiente. A desidratação do material foi realizada através de passagens em concentrações crescentes de álcool etílico seguida por 3 passagens em óxido de propileno, com 10 minutos para cada passagem . Os blocos foram incluídos em resina Epon e os cortes ultrafinos obtidos eram corados em acetato de uranila por 5 minutos e nitrato de chumbo durante 10 minutos à temperatura ambiente.

2.6-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação da concentração de proteína foi realizada segundo método de LOWRY e cols .,1951 .

A curva padrão foi preparada usando-se BSA (1 mg/ml) e a concentração de proteína após a reação foi estimada através de leitura em espectrofotômetro (Spectronic 700 Bausch

& Lomb) em comprimento de onda de 660 nm.

2.7.-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ORNITINA CARBAMIL TRANSFERASE (E.C.2.1.3.3.)

Para detectar a presença de ornitina carbamil transferase nas amostras do extrato bruto e das frações obtidas no gradiente descontínuo de Percoll, foi utilizado o método de NAKAMURA e JONES, 1970.

As amostras (0.1 mg de proteína) foram incubadas em solução contendo 16.6 mM de ornitina , 16.6 mM de carbamil fosfato e 50 mM de tampão Tris HCl pH 8.5 em volume final de 300 ul. Após incubação de 30 minutos a 37 C, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 5 % (m/v) e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. A presença de citrulina no sobrenadante foi determinada através da adição de 2,5 ml de solução contendo (ácido sulfúrico 1,6 N, ácido ortofosfrico 2,9N , tiosemicarbazida 5 mg % , úreia 0.026 mg %). A seguir, foi adicionado 0,25 ml de solução de diacetilmonoxima 2% (m/v) e fervido por 10 minutos. A intensidade de cor desenvolvida foi quantificada a 490 nm .As amostras tiveram suas concentrações de proteínas previamente determinadas pelo método de LOWRY e cols .,1951, como descrito acima.

1 unidade enzimática da OCT : corresponde a quantidade de enzima que cataliza a formação de 1 μ mol de citrulina por minuto a 37 C.

2.8-INCORPORAÇÃO DE PRECURSORES RADIOATIVOS EM SIMBIOTES

Os simbiotes foram ressuspensos em meio mínimo essencial Eagle (sem metionina ou leucina) para as experiências de incorporações com L-(³⁵S) metionina e L-[4,5-³H]leucina e em meio RPMI na incorporação com metil-(³H) timidina. Estes meios foram suplementados com BSA 1 mg/ml. As suspensões de simbiotes foram incubadas a 28°C por 30 minutos. Após essa pré-incubação, 1 a 2 mg/ml de proteína de simbiote por tubo foram incubados na presença de 100-500 µCi/ml de L-[4,5-³H]leucina ou 250 µCi/ml de L-(³⁵S) metionina ou 100 µCi/ml de metil (³H) timidina a 28°C sob agitação. Os tempos de incubação estão indicados nas legendas das figuras. A reação foi interrompida pela adição de TCA 10% contendo 0.01 mg/ml de BSA, 0.2% de sarkosyl, 20 mM de EDTA e 2mM de metionina.

As amostras em TCA foram incubadas por 30 minutos a 4°C e os precipitados coletados por filtração em filtro de lã de vidro (GF/F Whatman). Os filtros foram lavados extensivamente com TCA 10% e etanol gelado, e secos a 50°C, após o que foram colocados em frascos contendo líquido de cintilação a base tolueno (4g de PPO, 0.2g de POPOP em 1 litro de tolueno). A radioatividade incorporada foi medida em aparelho de cintilação líquida Beckman, modelo LS 100. A eficiência deste aparelho para ³H é de 58% e para ³⁵S é superior a 98.0%.

Com a finalidade de analisar os efeitos dos antibióticos, na incorporação de precursores radioativos, os

simbiontes foram pré-incubados por 30 minutos a 28 °C com agitação, na presença cloranfenicol ou rifampicina. Após esse período, adicionava-se L-[4,5-³H] leucina e as amostras eram incubadas por mais 90 minutos a 28 °C sob agitação. As concentrações de antibióticos e de L-[4,5-³H] leucina estão indicadas nas legendas das figuras.

2.9.-PREPARAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS RADIOATIVOS DE SIMBIONTES E DE FLAGELADOS PARA ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Alíquotas contendo 1×10^{10} células de *Crithidia deanei* foram centrifugadas a 4000 rpm em rotor SS34 e o precipitado foi ressuspenso em meio mínimo essencial de EAGLE sem metionina. Após 30 minutos de incubação a 28 °C, com agitação, adicionava-se L-(³⁵S) metionina 250 µCi/ml e, incubava-se a amostra durante 120 minutos a 28 °C. Exatamente o mesmo procedimento foi utilizado para a incorporação de L-(³⁵S) metionina em simbiontes isolados.

Após a incubação com precursores radioativos, ambas as preparações foram centrifugadas a 4000 rpm em rotor SS34 por 10 minutos a 4 °C e os precipitados tratados com tampão de lise contendo NP-40 1%, EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, PMSF 1mM antipaina 250 µg/ml, leupeptina 25 µg/ml e 2 unidades de inibidor de tripsina e aprotinina. A seguir os parasitas foram homogenizados em Vortex e centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram mantidos a - 20 °C. As dosagens das proteínas foram realizadas como no item 2.6 pelo método de LOWRY e cols., 1951.

A radioatividade incorporada foi estimada como descrito no item 2.8. Alíquotas de 5 μ l dos sobrenadantes acima eram incubados durante 30 minutos a 4 C na presença de 80 μ l de sarkosyl 0.2 % e EDTA 20 mM , 15 μ l de BSA (1 mg/ml) e 2 ml de TCA 10 % . Os precipitados eram coletados em filtros de lã de vidro como descrito anteriormente (tem 2.8, Materiais e Métodos)

2.10.- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA -SDS (SDS-PAGE)

As proteínas foram submetidas à eletroforese em geis de poliacrilamida contendo SDS ,segundo LAEMMLI, 1970.

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de separação a 10% e de gel de empilhamento a 3% (TABELA 6). O gel foi preparado em placas de vidro de 16 x 15 cm e espaçadores de 1 mm de espessura.O gel foi corrido em cuba vertical.

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (TABELA 7) ,fervidas por 3 minutos , centrifugadas e os sobrenadantes aplicados no gel. As corridas eletroforéticas foram feitas à 125 V utilizando-se tampão de corrida contendo Trizma base 0.025M , glicina 0.19 M e SDS 0.1 % .O término da corrida foi indicado pela saída do corante de azul de bromofenol presente no tampão de amostra (TABELA 7).

Como padrão de peso molecular foi utilizado uma mistura de polipeptídeos contendo fosforilase b(94 Kda),soro albumina bovina(67Kda), ovoalbumina (43 Kda), anidrase carbônica (30 kda),inibidor de tripsina (20 Kda) e lactoalbumina (14.4 Kda).Para o gel com amostras marcadas isotópicamente, foram utilizados os seguintes padrões moleculares marcados com [¹⁴C]-

Carbono : miosina [cadeia pesada] (200 kDa), fosforilase B (97.4 kDa), soro albumina bovino (68 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimotripsinogênio (25,7 kDa), lactoglobulina (18.4 kDa), citocromo C (14.3 kDa).

Para as amostras não marcadas radioativamente , os géis foram corados durante 3 horas com 0.05% do corante Coomassie brilliant blue G em 50% de metanol e 10% de ácido acético, sendo descolorido à temperatura ambiente, sob agitação durante duas horas, em solução contendo 30 % de metanol e 7 % de ácido acético.

No caso de amostras marcadas com L-(S) metionina, os géis foram transferidos para solução fixadora [50% metanol (v/v) e 10% de ácido acético glacial (v/v)] e incubados à temperatura ambiente, sob agitação, durante uma hora
3
A seguir foram incubados em ENHANCE (New England Nuclear) por uma hora. Após a fluorografia, os géis eram lavados em água bidestilada e glicerol 1 % (v/v) por duas vezes (30 minutos cada lavagem) e então, desidratados em secador de gel como descrito no ítem 2. 11.

TABELA 6=COMPOSIÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA=SDS

Componentes	Gel 10 % (ml)	Gel 3% (ml)
Acrilamida 30%*	5.7	1.0
Tris-HCl 1M pH 8.8	6.3	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	1.25
SDS 10% em água bi-destilada	0.15	0.10
Glicerol conc.	1.0	-
Água bidestilada	3.77	7.10
Persulfato de amônio 10%**	0.075	0.05
TEMED	0.015	0.01

* - Esta solução contém Acrilamida 30 % e Bisacrilamida 0.8% em água bidestilada

** - Persulfato de amônio 10% foi preparado no momento do uso.

TABELA 7=TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE DE POLIPEPTÍDEOS

Componentes	Quantidades
SDS conc.	1 g
2-Mercaptoetanol conc.	1 ml
Tris-HCl 1M pH 6.8	1.7 ml
Azul de bromofenol (solução saturada)	0.2 ml
Glicerol	0.4 ml
Água bidestilada	6.7 ml

A solução foi filtrada em filtro de nitrocelulose (Millipore) aliquotada e guardada à -20 C

2.11-SECAGEM E AUTORADIOGRAFIA DO GEL DE POLIACRILAMIDA

Os géis foram colocados sobre um papel de filtro 3MM, cobertos com plástico tipo "Vita film" e desidratados em secador de gel (LBK modelo 2003) durante uma hora, sob aquecimento, e 30 minutos à temperatura ambiente. Os géis foram expostos em filmes de raio X (Kodak XS-1) durante 3 a 7 dias a 70 C. Os filmes foram revelados usando-se revelador e fixador de raio X da Kodak.

2.12-IMUNIZAÇÃO DE COELHOS COM SIMBIOTES ISOLADOS

Os coelhos foram imunizados com simbiotes isolados segundo o ítem 2.4. Os simbiotes isolados foram ressuspensos em 0.5 ml de PBS e imediatamente inoculados por via intravenosa na orelha do coelho. Foram feitas 3 aplicações usando-se o equivalente a 1.0 mg de proteína de simbiote a cada inoculação. O intervalo entre as inoculações foi de 15 dias.

Após 2 semanas da última inoculação, o soro foi coletado e a presença de anticorpos específicos medida por imunoprecipitação usando-se extrato de simbiote marcado com L-(³⁵S) metionina.

Os soros foram adsorvidos através de cromatografia de afinidade com proteínas de *Crithidia deanei* aposimbiótica acopladas em Sepharose CNBr 4B. A preparação e o acoplamento de proteínas de *Crithidia deanei* a esta resina estão descritos no ítem 2.13.

2.13.-PREPARO DA RESINA DE AFINIDADE COM PROTEÍNAS DE CRITHIDIA DEANEI APOSIMBIÓTICA ACOPLADA EM SEPHAROSE CNBr-4B

Células de Crithidia deanei aposimbiótica (1×10^{10} células totais) foram centrifugadas a 4000 rpm em rotor SS-34 a 4°C durante 10 minutos. O precipitado era ressuspensão em PBS e sonificado com três pulsos de 3 segundos cada um, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso, a uma frequência de 20 KHZ e 40 Watts. A seguir, o extrato celular foi centrifugado em rotor SS-34 durante 20 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método LOWRY e cols 1951 (item 2.6.)

A resina Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio foi ressuspensa em tampão ácido contendo NaCl 0.5M e acetato de sódio 0.1M pH 4.0, e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente . A seguir, filtrada a vácuo em funil de placa porosa com 0.1 mm de diâmetro e lavada com tampão de acoplamento composto de NaCl 0.5 M e NaHCO₃ 0.1 M, pH 8.3. Após a filtração, a resina foi ressuspensa em tampão de acoplamento e incubada na presença de aproximadamente 10 mg de proteínas de Crithidia deanei aposimbiótica . O acoplamento foi feito a 4°C durante 12 horas sob agitação lenta. O complexo foi lavado com tampão de acoplamento e uma alíquota foi retirada para a verificação da quantidade de material acoplado na resina , através de densidade óptica a 280 nm. A seguir, a resina foi tratada com 1 M de etanolamina, pH 9.0, por duas horas, à temperatura ambiente, e

então, novamente filtrada e lavada alternadamente por três vezes com tampão de acoplamento e tampão ácido. Finalmente, a resina era equilibrada em PBS a pH 7.2.

2.14.-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SIMBIONTE E DE CRITHIDIA DEANEI

Os extratos de Crithidia deanei e simbiote, preparados como no ítem 2.9, foram incubados durante 12 horas a 4 C com 10 µl de soro imune pré-adsorvido (tem 2.12) Após a incubação acima, adicionava-se 100 µl de suspensão de Staphylococcus aureus 10 %, linhagem COWAN 1, preparada segundo o método de KESSLER, 1975. A solução de Staphylococcus aureus utilizada foi previamente tratada, segundo o ítem 2.15

Após 30 minutos de incubação a 37°C com Staphylococcus aureus, os imuno-complexos foram coletados por centrifugação em tubos tipo Eppendorf. Os precipitados foram submetidos a uma lavagem com NET (Tabela 8) contendo NP-40 0.05% e BSA 1 mg/ml e duas lavagens com tampão NET contendo NP-40 0.05%, SDS 0.1% e BSA 2 mg/ml. Os precipitados foram então ressuspensos em 50 µl de tampão de amostra (Tabela 7) e aquecidos por 3 minutos a 100°C.

As suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%-SDS, como visto no ítem 2.10.

Para o controle da reação de imunoprecipitação o extrato radioativo era incubado com 10 ul de soro de coelho pré imune, isto é, o soro obtido antes da inoculação das proteínas do simbiote.

2.15.-TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

A suspensão de Staphylococcus aureus a 10 % foi tratada segundo o protocolo estabelecido por ZINGALES e COLLI 1984. Assim 1 ml de suspensão 10% foi centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm em rotor SS34 a 4 °C .

O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de NP-40 0.05 % em tampão NET (Tabela 8) e incubado por 15 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm em rotor SS-34 a 4 °C .O precipitado foi lavado por 2 vezes com 1ml de NP-40 0.05 % em tampão NET e BSA 1 mg/ml .

Após essas lavagens ,o precipitado foi ressuspensão em 1 ml de solução contendo tampão NET mais NP-40 0.05 % e 1 mg/ml de BSA, aliquotado e estocado a - 20 °C .

TABELA 8-TAMPÃO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO-NET*

Componentes	Concentrações
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	5 mM
NaCl	150 mM
Azida sódica	0.0 2 %

* Tampão conservado a 4 °C

2.16.-EXTRAÇÃO DE DNA DE CRITHIDIA DEANEI APOSIMBIÓTICA E SIMBIONTE ISOLADO.

Um litro de cultura de Crithidia deanei aposimbiótica contendo 10^7 células /ml foi centrifugado a 4000 rpm em rotor SS-34, durante 10 minutos, a 4°C .

O precipitado foi ressuspensão em tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, sarkosyl 1%, SDS 1%, EDTA 10 mM e pronase 1 mg/ml) e incubado durante 30 minutos a 37°C .

A seguir , a mistura foi extraída uma vez com um volume de fenol saturado em Tris HCl pH 7.5, e centrifugada em rotor SS-34 a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C . A fase aquosa foi reextraída duas vezes com fenol-clorofórmio (1:1 v/v) e três vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24 : 1 v/v) . O DNA foi recuperado por precipitação após incubação com dois volumes de etanol na presença de 0.3 M de acetato de sódio, pH 5.5 durante 18 horas à temperatura de - 20°C .

O simbiote isolado contendo o equivalente a 1 mg de proteína foi centrifugado e ressuspensão em 1 ml do tampão de lise citado acima. As extrações fenólicas e a precipitação do DNA foram feitas conforme descrito para C.deanei aposimbiótica.

2.17.-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA

As concentrações dos DNAs de Crithidia deanei aposimbiótica e de simbioses isolados (item 2.4) foram estimadas espectrofotometricamente a 260 nm (MANIATIS e cols., 1982).

Também foram efetuadas leituras a 280 nm para se

estimar a pureza do DNA através da relação 260 /280 , considerando se satisfatório o DNA que apresentava a relação maior ou igual a 1.8 (MANIATIS e cols. ,1982) .

2.18-DIGESTÃO DO DNA DE ENDOSIMBIONTE COM ENDONUCLEASES- RESTRIÇÃO

O DNA do simbiote foi digerido com as enzimas de restrição Mbo I, EcoRI e Bam HI. As digestões foram realizadas na presença do tampão de reação adequado para cada enzima (Tabela 9) em volume de 100 μ l. Um micrograma de DNA de simbiote foi incubada na presença de uma unidade de endonuclease de restrição do tipo III (Tabela 9) a 37 °C em períodos que variavam de 30 minutos a 4 horas . A reação foi interrompida pela adição de 5mM de EDTA e incubação a 68 °C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de agarose na presença dos seguintes componentes: glicerol 30 % , azul de bromofenol 0.025 % e xileno-cianol 0.025% (concentrações finais).

2.19-ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A agarose foi dissolvida pelo calor em tampão de corrida TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 0.089mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.5), resfriada a 50 °C e depositada em placa de vidro 12x11 cm na posição horizontal. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas no gel e este submetido à tensão de 50 a 70 volts ,durante 3 horas, em tampão de corrida TBE .

Após a corrida, o gel foi incubado durante 15 minutos em solução contendo 0.5 μ g/ml de brometo de etídio

O gel foi iluminado com luz ultra-violeta (Transiluminador Ultra-Violet Products, Inc.) e fotografado, utilizando-se filme Polaroid, tipo 667 (Polaroid) e filtro alaranjado Wratten, número 21. O tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado por comparação com as mobilidades dos fragmentos resultantes do fago lambda selvagem digerido pela enzima Hind III.

2.20.-PREPARAÇÃO DO FRAGMENTO DE DNA DO ENDOSIMBIONTE PARA CLONAGEM EM pUC 13

O DNA do simbiote foi extraído conforme descrito no item 2.16. A digestão foi feita utilizando-se 5µg de DNA e 1U de endonuclease Mbo I em tampão respectivo (Tabela 9) a 37°C. Foram realizadas digestões de 15, 30, 60, 120 minutos. A reação foi interrompida pelo aquecimento das amostras a 68°C, seguindo-se de resfriamento em gelo e centrifugação em centrífuga Eppendorff. Os fragmentos de DNA foram extraídos uma vez com fenol saturado em Tris-HCl pH 7.5, duas vezes em fenol:cloroformio 1:1v/v), e três vezes em cloroformio:álcool isoamílico (24:1 v/v)

Os fragmentos de DNA foram precipitados pela adição de dois volumes de etanol absoluto em 0.3 M de acetato de sódio, pH 5.5, -20 °C durante 18 horas. O precipitado foi coletado por centrifugação a 10000 rpm em rotor SS34 por 40 minutos, a 0 °C e ressuspensão em 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 e EDTA 1mM. Uma alíquota contendo aproximadamente 1 µg de DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0.7 % como descrito no item 2.19.

TABELA 9-**ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO**

Enzima	Sequência reconhecida	Tampão de reação	Temperatura de reação	Microorganismos
Mbo I	GATC	*	37 °C	<u>M.bovis</u>
Eco RI	G AATTC	**	37 °C	<u>E.coliRY13</u>
Bam HI	G GATCC	*	37 °C	<u>B.amyloliquefaciensH</u>

* Tris-HCl 6mM, pH 7.5 ; MgCl₂ 6mM ; NaCl 50 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM ; BSA 100 µg/ml.

** Tris-HCl 100 mM , pH 7.5 ; MgCl 10 mM ; NaCl 50 mM ; 2-mercaptoetanol 6mM ; BSA 100 µg/ml.

2.21.-**CÁLCULO DA REPRESENTATIVIDADE DO BANCO GENÔMICO**

Segundo Clarke e Carbon ,1976 ; a probabilidade (p) de uma determinada sequência única estar presente em uma coleção de "N clones" é dada por :

$$p: 1-(1-f)^N$$

onde "f" é a fração média do genoma representada por um clone .

A probabilidade de uma dada sequência ser encontrada em um banco genômico a uma frequência > 99 % é dada pela seguinte fórmula :

$$N : \frac{\ln (1- p)}{\ln (1- f)}$$

Essas fórmulas foram usadas para calcular a representatividade dos bancos genômicos obtidos. Foi utilizado como referencial para os cálculos acima, o genoma de *E.coli* que possui $4,2 \times 10^6$ pb . O fragmento de DNA de endosimbionte a ser clonado possui 2 Kb.

2.22-CLONAGEM EM pUC 13

O DNA de pUC 13 linearizado pela digestão com Bam HI e defosforilado com fosfatase alcalina foi utilizado como vetor para clonagem dos fragmentos obtidos da digestão do DNA do endosimbionte com Mbo I (ítem 2.20)

A ligação entre o plasmídeo e os fragmentos do simbionte foi catalisada pela T4 DNA Ligase.A reação de ligação continha os seguintes componentes : 200 ng do DNA simbionte digerido com Mbo I (fragmentos de 1 a 2.3 Kb), 1 unidades de T4 DNA Ligase, MgCl 3.3 mM, Tris-HCl 16.6 mM, pH 7.5; ATP 0.3 mM, DTT 6.6 mM e BSA 16.6 ² ug/ml em um volume final de reação de 5ul (WEISS e cols., 1967). A ligação foi feita a 12 °C durante 16 horas. Completando se a reação, a ligase era inativada por incubação a 68 C durante 15 minutos. Alíquotas da mistura de ligação eram usadas para transformar *E. coli* competentes conforme descrito nos ítems 2.23 e 2.24.

2.23.-PREPARAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES PARA A TRANSFORMAÇÃO

A preparação das células bacterianas para a transformação foram preparadas segundo MANIATIS e cols., 1982.

Uma colônia isolada da linhagem E.coli JM 103 foi inoculada em meio LB e cultivada por 12 horas a 37°C. Uma alíquota desta cultura era inoculada em meio LB de maneira a se obter uma diluição de 1/100. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação até se atingir densidade óptica de 0.5 a 600 nm.

Nesta etapa, 3 ml de cultura foram coletados e centrifugados a 3000 rpm em rotor SS-34 a 4°C durante 10 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de CaCl₂ 10 mM em Tris-HCl pH 8.0, previamente resfriado a 4°C. A suspensão foi mantida por 15 minutos no gelo e centrifugada por 10 minutos a 3000rpm em rotor SS-34 a 4°C. As células foram ressuspensas em 0.2 ml de CaCl₂ 40 mM em Tris-HCl 10 mM pH 8.0 a 4°C e mantidas no gelo por 30 minutos. Após esta última incubação, alíquotas de 0.1 ml eram usadas para transformação.

2.24.-TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (MANIATIS e cols.,1982.)

As células de E.coli competentes, em alíquotas de 100 µl, foram transformadas com 2.5 µl de solução contendo 20 ng de pUC 13 recombinante. A suspensão foi mantida no gelo por 30 minutos e a seguir, submetidas a choque térmico a 42°C por 2 minutos; as células foram deixadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, incubadas com 1 ml de meio LB a 37°C, por 1 hora, sem agitação. A seleção dos transformantes foi realizada da seguinte maneira: alíquotas da suspensão de bactérias JM 103 foram plaqueadas em meio LB contendo 80 µg /ml de ampicilina , 40 µg /ml de X Gal e 1 mM de IPTG e incubadas a 37 °C durante 18 horas .

A eficiência de transformação foi estimada pelo número de transformantes (lac⁻, amp^r) obtidos por µg DNA de plasmídeo. A presença do inserto normalmente interrompe a fase de leitura do gene β-Galactosidase, resultando em colônias incolores (lac⁻), enquanto que clones (lac⁺) apresentam colônias azuis evidenciando a ausência de inserto.

Paralelamente foram realizados controle de transformação, utilizando-se 20 ng de vetor intacto .

As colônias (lac⁻) foram obtidas por ocasião do plaqueamento do banco genômico foram coletadas com palitos de dente estéreis e transferidas para placas contendo meio LB ampicilina, IPTG e XGal. A transferência foi feita de modo que cada colônia recêbia um número de código permitindo sua identificação nas etapas posteriores. Este procedimento permite a identificação das colônias (lac⁻), assim como retesta a sensibilidade à ampicilina e o fenótipo (lac⁻).

2.25.-ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

2.25.1-ISOLAMENTO DE CLONES RECOMBINANTES POR HIBRIDIZAÇÃO DE COLÔNIAS "in situ".

2.25.1.1-Preparação de filtros de nitrocelulose contendo colônias bacterianas recombinantes.

Foram utilizados os métodos propostos por GRUNSTEIN e HOGNESS, 1975, com algumas modificações. Para tanto foram plaqueadas inicialmente 500 colônias recombinantes distribuídas de tal forma que cada placa de Petri continha aproximadamente 50 colônias. Cada placa de Petri continha uma réplica a qual foi usada para conservação das colônias recombinantes. Sobre o ágar nutritivo (LB ampicilina) da placa de Petri a ser usada na hibridização, foi colocado um filtro de nitrocelulose (Millipore, HATF 0085) e, a seguir, foram inoculadas as colônias recombinantes usando-se palitos de dente estéreis. Nas placas de Petri usadas para conservação das bactérias recombinantes, as bactérias foram inoculadas diretamente sobre o ágar. As placas foram mantidas por 12-18 horas a 37°C.

Após essa incubação, os filtros de nitrocelulose foram retirados e as colônias bacterianas que cresceram lisadas a fim de denaturar e fixar o DNA sobre o suporte de nitrocelulose.

Os filtros foram incubados com solução contendo: 1.5 mg/ml de lisozima, 25 % de sacarose e Tris-HCl 50mM, pH 8.0 durante 5 minutos, a 4°C. A seguir, os filtros foram incubados

com solução contendo Triton X-100 e NaOH 0.5N por 3 minutos à temperatura ambiente, em seguida incubados durante 3 minutos com solução de NaOH 0.5 N.A neutralização foi feita com Tris-HCl 1M pH 7.5, por 3 minutos e, posteriormente, com NaCl 0.15 M e Tris-HCl pH 7.5 , por 3 minutos .

Os filtros foram secos a temperatura ambiente e em seguida incubados por 2 horas à 80 °C. Os filtros foram estocados em placas de vidro sob vácuo até o momento da pré-hibridização .

2.25.1.2-PREPARO DE SONDAS RADIATIVAS

Os DNAs de simbiontes isolados e de Crithidia deanei aposimbiótica foram marcados com (α -³²P) d ATP pela técnica de " nick -translation " (RIGBY e cols.,1977) com algumas modificações.

Para 20 μ l de reação adicionava-se Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 ; MgCl 10mM; DTT 1 mM ; dCTP 0.1 mM ; dGTP 0.1 mM ; dTTP 0.1 mM ; (α -³²P) d ATP 50 μ Ci ; DNase I 10 μ g/ml ; DNA polimerase I 5U e 200 ng do DNA a ser marcado . A mistura foi incubada a 12 C por 2 horas, terminando-se a reação pela adição de SDS 0.1 % e EDTA 5 mM finais. A seguir, adicionava se 30 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8.0, e retirava se uma alíquota de 1 μ l para a determinação da radioatividade incorporada. O DNA contido nos 49 μ l restantes foi precipitado pela adição de 1/2 volume de acetato de amônia, pH 7.5, 50 μ g de DNA de timo de bezerro sonicado e 2 volumes de etanol gelado .

A radioatividade incorporada foi determinada após precipitação com TCA 5% gelado. A alíquota de 1 μ l citada acima foram adicionado 100 μ l de solução contendo sarkosyl 0.1 %, EDTA 5mM e 100 μ l/ml de DNA de timo de bezerro sonicado. Após agitação em Vortex, adicionava-se 2 ml de TCA 5 % gelado e incubava-se por 30 minutos a 4 C. Os precipitados foram coletados por filtração em filtro de lã de vidro (Millipore). Os filtros foram secos e adicionados a 5 ml de líquido de cintilação (4g PPO, 0.2 g metil POPOP em 1 litro de tolueno). A radiatividade incorporada foi estimada em aparelho de cintilação líquida (Liquid Sistem Scintillation Beckman LS-100).

2.25.1.3.-Hibridização das bactérias recombinantes com sondas radiativas

Para o processo de pré-hibridização e hibridização dos filtros seguiu-se o protocolo estabelecido por GRUNSTEIN e HOGNESS,1975.,com algumas modificações. Os filtros foram colocados em Becker e pré-hibridizados sob agitação ,inicialmente com tampão contendo 5 x Denhart's e 5 x SSC. (Tabela 10 e Tabela 11),durante 3 horas a 65 °C e em seguida, incubados a 65 C com tampão contendo 5x Denhart's, 5 x SSC, 100 µg /ml de DNA de Timo de bezerro sonicado (10 mg/ml) e SDS 0.1% durante 1 hora. Foram utilizado 10 ml de solução de pré-hibridização para cada filtro de nitrocelulose.

Para a hibridização os filtros foram colocados em sacos plásticos,contendo a seguinte solução:5x Denhart's 5xSSC , 100 µg/ml de DNA de timo de bezerro sonicado, 0.1 % SDS e 1×10^6 cpm/ml da sonda de DNA correspondente (item 2.25 .1.2) A sonda era previamente aquecida por 5 minutos em banho-maria à 90 C.Foram utilizados 5 ml de solução de hibridização para cada filtro de nitrocelulose. O período de tempo para a hibridização foi de 20 horas a 65 °C,sob agitação constante,após o que os filtros foram lavados durante 6 horas a 65°C, com 1 hora para cada lavagem (10 ml de solução /filtro).A primeira lavagem foi realizada com a seguinte solução: Denhart's 5 x, SSC 5x, SDS 0.1% e 100 µg/ml de DNA de Timo de bezerro.A segunda e terceira lavagens foram feitas com a solução contendo: SSC 2x, EDTA 10 mM ,SDS 0.2 M . Na quarta e quinta lavagens foi utilizada solução com SSC 1 x ,EDTA 10mM, SDS 0.2% . Na sexta lavagem foi usada a solução

contendo apenas SSC 1x .

Os filtros foram secos a temperatura ambiente e expostos em filmes de raio X (KodaK XS-1) a - 70 °C por períodos que variaram entre 24 a 72 horas. Para a revelação dos filmes foram usados revelador e fixador de filme de raio X (Kodak).

TABELA 10-SOLUÇÃO ESTOQUE DENHART'S 100 x *

2% Soro albumina bovina
 2% Ficoll
 2% Polivilpirrolidona
 Água bidestilada qsp 100 ml

* Esta solução foi filtrada em filtro Millipore e estocada a - 20 °C .

TABELA 11-SOLUÇÃO ESTOQUE SSC 20 x *

175.32 g NaCl
 88.23 g citrato de sódio
 Água bidestilada qsp 1 litro

* Esta solução foi mantida a - 20 °C

2.26.-Hibridização diferencial

Os clones que reagiram positivamente com a sonda de (³²P) DNA simbiote foram replaqueados em três placas: uma "master " e as outras duas com filtros de nitrocelulose, como descrito no item 2.25.1.1. Um filtro foi hibridizado com sonda de (³²P) DNA de Crithidia deanei apo-simbiótica e o outro filtro com a sonda de (³²P) DNA simbiote .

Os clones que reagiram positivamente com as duas sondas foram eliminados e os que reagiram sómente com sonda de DNA de simbiote foram selecionados e estocados como clones específicos, isto é, clones que contém sequências de DNA do simbiote .

3.0.-RESULTADOS

3.1-ISOLAMENTO DO ENDOSIMBIONTE DE CRITHIDIA DEANEI

Os simbioses de Crithidia deanei foram isolados em gradiente de Percoll após ruptura dos flagelados com ultrassom.

Após lavagens em PBS, os flagelados foram ressuspensos em água e mantidos a 4 C durante 30 minutos. Nestas condições, as células tornam-se túrgidas mas não rompem. Este tratamento facilita o posterior rompimento da membrana celular do flagelado com ultrassom, evitando dessa maneira a necessidade de um grande número de pulsos com o disruptor de células. O número adequado de pulsos de ultrassom foi estabelecido como sendo de 6 pulsos de 15 segundos cada. Após esse tratamento, a análise do homogenato celular ao microscópio de fase mostrava a presença de simbioses, restos celulares e poucas células intactas.

Nas condições de sonicação padronizadas (item 2.4 de Material e Métodos), cerca de 5 % das células permanecem intactas após o tratamento com ultrassom.

Um número maior de pulsos (acima de 6 pulsos), diminui o número de células intactas na preparação, porém afeta a integridade do simbiote. O mesmo acontece, adicionando-se ao meio de sonicação detergentes como saponina ou Nonidet-40.

As etapas seguintes tiveram como objetivo concentrar os simbioses e separá-los das células intactas remanescentes

O extrato celular obtido após sonicação foi centrifugado em gradiente descontínuo de sacarose contendo duas camadas de sacarose (concentrações de 0.4 M e 0.8M). As células intactas sedimentam no fundo do tubo, ao passo que os simbioses ficam na fase superior e na interface da fase superior com a camada de 0.4 M de sacarose . Esta centrifugação prévia em gradiente de sacarose é crucial para a separação dos simbioses das células intactas remanescentes.

A separação dos simbioses dos outros componentes celulares foi feita através de centrifugação da fração 4 enriquecida em simbioses (obtida acima no gradiente de sacarose) em gradiente de Percoll .

A fig.2A mostra a aparência do gradiente de Percoll após centrifugação a 8000rpm em rotor HB-4 por 60 minutos. Pode-se visualizar a presença de 4 bandas majoritárias localizadas nas interfaces de 0/40 %, 40% /50 %, 50 % /60 % e 60% /70% .Em algumas experiências notou-se uma quinta banda minoritária na interface 70% /80%.

A inspeção do material contido nestas bandas ao microscópio de fase mostrou que os simbioses estão concentrados na banda 4. Este resultado foi confirmado através da análise destas frações ao microscópio eletrônico. As bandas 1 e 3 contêm corpos vesiculares, fragmentos de membranas, restos de mitocôndrias e cinetoplastos (Fig.2 B-C). O aspecto morfológico da banda 2 foi muito semelhante àquele apresentado pela banda 1 (dado não mostrado). A banda 4 é constituída de endosimbioses íntegros a se julgar pela presença de duas membranas celulares (in

terna e externa) e de citoplasma homogêneo e regular (Fig 2D e 3). A estrutura do simbiote isolado ao microscópio eletrônico é semelhante àquela obtida com o simbiote no interior da célula hospedeira. A banda 4 apresenta pequena contaminação por restos de cinetoplastos e membranas (Fig 2D). Não foi detectado na banda 4 a presença de células intactas, nem por microscopia eletrônica ou por microscopia óptica de fase.

A enzima ornitina carbamil transferase (OCT) tem sido usada como um marcador bioquímico confiável de simbioses . De fato, foi demonstrado por vários métodos (citoquímico e fracionamento celular) que a OCT está localizada nos simbioses (CAMARGO e FREYMULLER, 1977; ALFIERI e CAMARGO 1982) . A Tabela 12 mostra que a atividade específica da OCT presente na fração 4 do gradiente de Percoll é 3 vezes superior àquela encontrada no homogenato celular total. Este resultado mostra um nítido enriquecimento da atividade de OCT na fração de simbioses.

O rendimento do nosso método de isolamento foi estimado levando-se em conta a recuperação de proteínas totais na fração de simbioses. Estimou-se que os simbioses representam de 5 a 10 % das proteínas totais da Critidia deanei (ALFIERI e CAMARGO, 1982). Desde que 2 % das proteínas presentes no homogenato foram recuperadas na fração de simbioses (Tabela 12), nós calculamos que 20 a 40 % dos simbioses presentes no homogenato total foram recuperados na fração 4 do gradiente de Percoll.

TABELA 12.- ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ORNITINA CARBAMIL TRANS-
FERASE EM SIMBIOTES ISOLADOS.

Fração	Proteína Total (mg)	Atividade Específi- ca da OCT (a)
Extrato bruto	50.8	226.2
Fração com Sim- bionte (b)	1.0	682.5

a)- Atividade específica expressa em nmole de
produto/mg proteínas /min.

b)- Simbiontes obtidos na fração 4 do gradiente

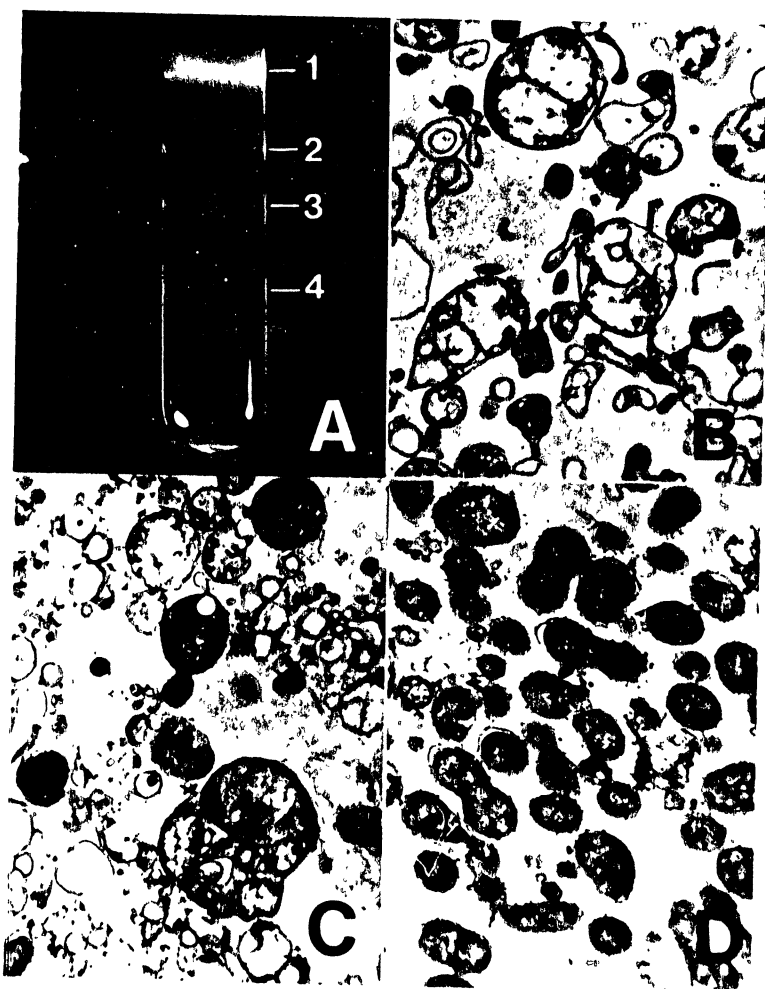


Fig 2.-Purificação dos simbiontes de Crithidia deanei

Os flagelados foram submetidos a choque hipotônico e, a seguir, rompidos por ultrasonicação conforme descrito no ítem 2.4 de Materiais e Métodos. Alíquotas do homogenato celular, após passagem em gradiente de sacarose, foram centrifugadas em gradiente de Percoll. (ítem 2.4 de Materiais e Métodos)

Após a centrifugação, as bandas foram coletadas e analisadas ao microscópio eletrônico (ítem 2.5 de Materiais e Métodos)

A)-Aparência do gradiente de Percoll, após a centrifugação. Os números indicam as bandas formadas pelas frações subcelulares e pelos simbiosites .

B)-Banda 1, aumento 14.500 x

C)-Banda 3, aumento 14.500 x

D)-Banda 4, aumento 14.500 x

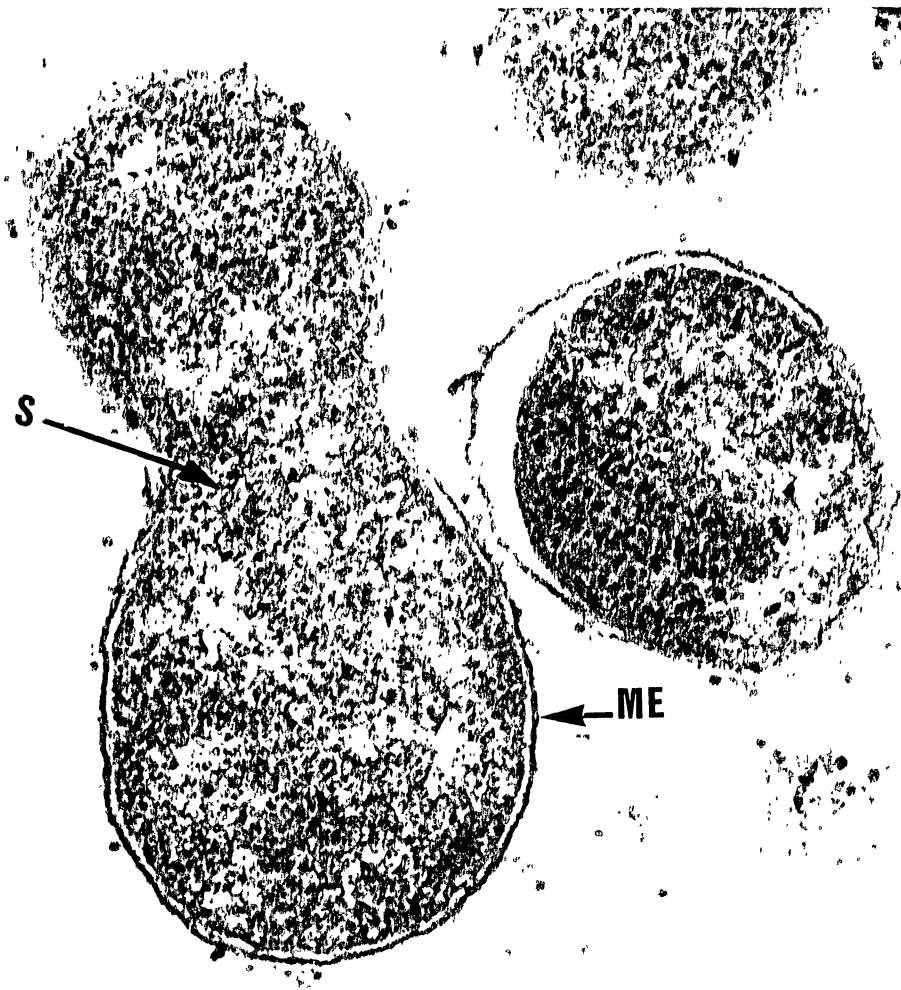


Fig.3-Microscopia eletrônica do simbiote de Crithidia deanei isolado por gradiente de Percoll.

Simbiontes isolados em gradiente de Percoll (Banda 4) foram analisados ao microscópio eletrônico, conforme descrito nos itens 2.4 e 2.5 de Materiais e Métodos. S- simbiote em divisão (aumento de 30.000 x) ;ME-membrana celular externa do simbiote .

3.2-INCORPORAÇÃO DE AMINOÁCIDOS RADIATIVOS EM SIMBIONTES ISOLADOS

Os simbiotes isolados em gradiente de Percoll foram incubados em meio Eagle (sem metionina ou leucina) durante 30 minutos a 28 C com agitação suave (ítem 2.8, Materiais e Métodos). A seguir, adicionava-se L-(4-5- ³H) leucina ou L-(³⁵S) metionina , incubando-se a preparação em diferentes intervalos de tempo como descrito nas legendas das figuras .

As figuras 4 A e 4 B mostram, respectivamente, a incorporação de L-(³⁵S) metionina e de L-(4-5- ³H) leucina em simbiotes isolados. A reação é linear até 45 minutos atingindo-se " plateau " por volta dos 120 minutos de incubação. Estes resultados mostram que os simbiotes isolados pelo método do gradiente de Percoll são metabolicamente ativos. Como será discutido no ítem 3.6 , os simbiotes isolados também incorporam ativamente metil-(³H) timidina .

Após 3 horas de incubação na presença de L-(³⁵S) metionina registrou-se uma queda na incorporação deste aminoácido a níveis semelhantes aqueles obtidos após 30 minutos de incubação.

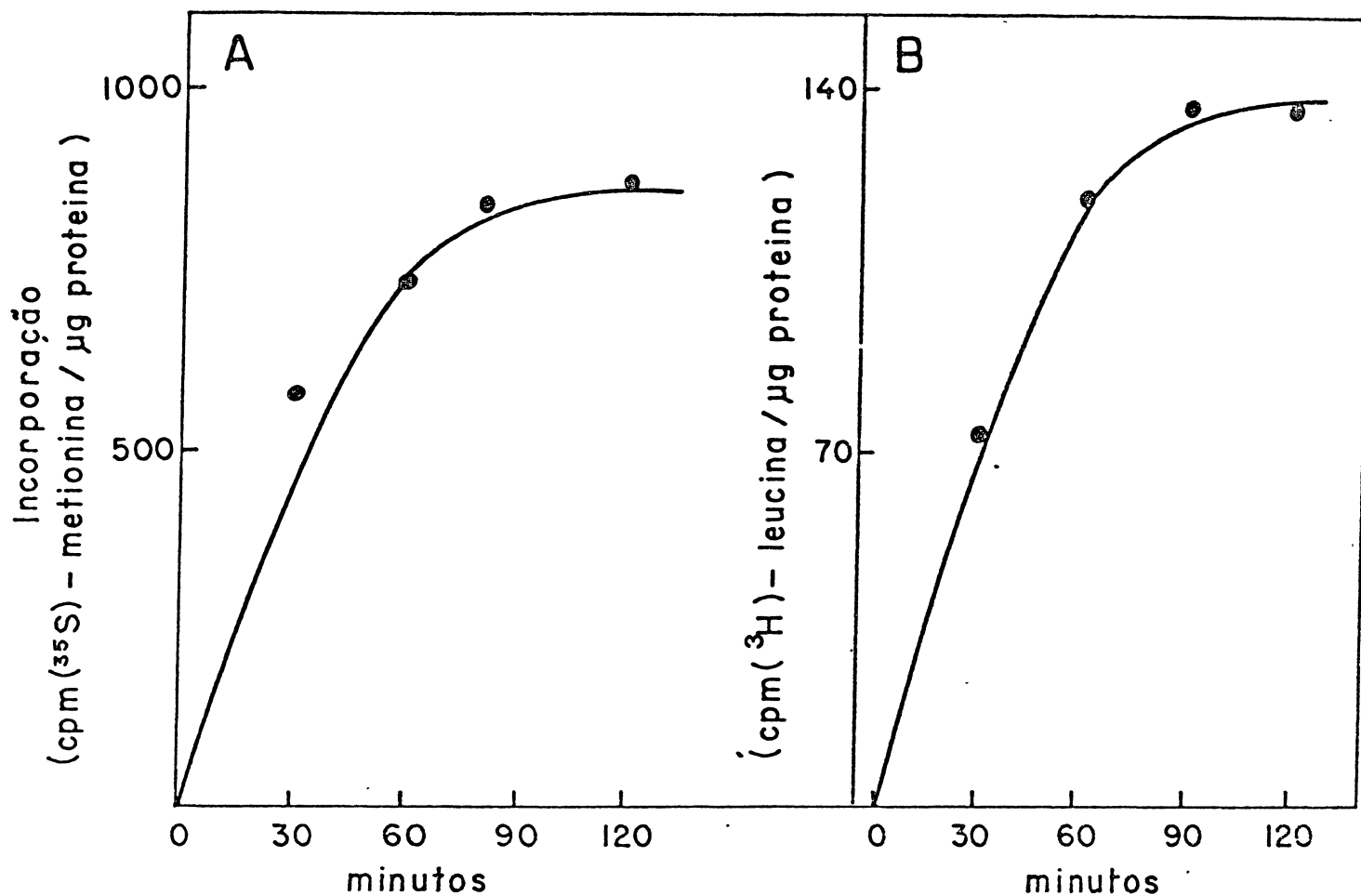


Fig.4-Incorporação de aminoácidos radiativos em simbioses isolados

Os simbioses isolados em gradientes de Percoll foram ressuspensos em meio Eagle e incubados a 28 °C durante 30 minutos com agitação. A seguir, o aminoácido radiativo era adicionado e a preparação incubada a 28 °C por diferentes intervalos de tempo (ítem 2.8 de Materiais e Métodos). A radiatividade incorporada na fração ácido-insolúvel do simbiote foi determinada segundo o ítem de 2.8 de Materiais e Métodos. Cada ponto experimental representa a média de 2 determinações.

A)-Simbiontes (1mg/ml de proteína) foram incubadas na presença de meio Eagle (sem metionina), contendo 250 μ Ci/ml de ³⁵L-(S)metionina e 1 mg/ml de albumina sérica bovina.

B)-Simbiontes (1mg/ml de proteína) foram incubados na presença de meio de Eagle (sem leucina), contendo 100 μ Ci/ml de L-(³4-5-H) leucina e 1 mg/ml de albumina sérica bovina .

3.3-EFEITO DE ANTIBIÓTICOS NA INCORPORAÇÃO DE AMINOÁCIDOS RADIATIVOS PELOS SIMBIONTES ISOLADOS

Uma vez estabelecidas as condições ótimas de incorporação de precursores radiativos em simbioses, foram realizados uma série de experimentos visando estudar os efeitos de antibióticos na síntese proteica destas estruturas. Os simbioses isolados foram incubados em meio Eagle durante 30 minutos a 28°C com agitação suave (item 2.8., Materiais e Métodos). A seguir adicionava-se L-(4-5³ H) leucina e incubava-se a preparação por mais 90 minutos nas condições citadas acima. As concentrações de antibióticos utilizadas estão indicadas na fig.5.

Cloranfenicol e rifampicina a 20 µg/ml diminuem a incorporação de L-(4-5³ H) leucina em cerca de 70 a 50 % respectivamente (Fig. 5). Estes mesmos antibióticos a 50 µg/ml inibem quase que totalmente a incorporação de leucina nos simbioses isolados .

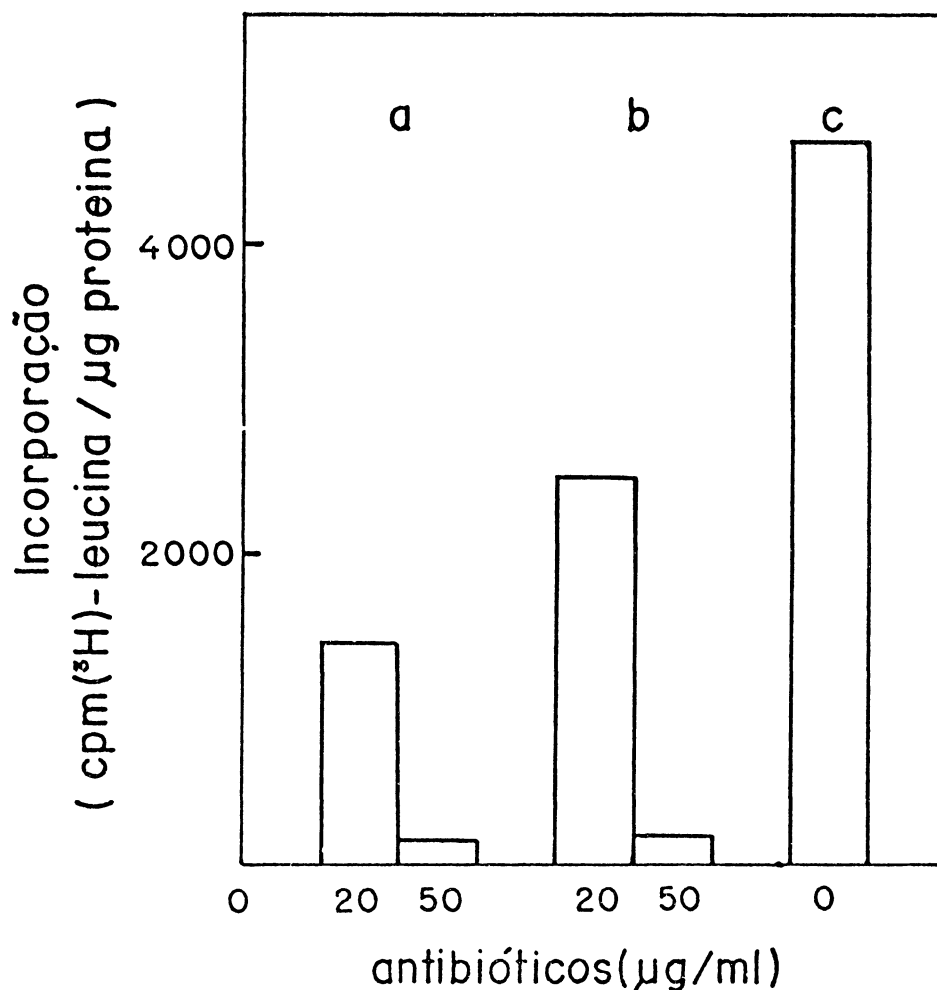


Fig.5.-Efeitos de antibióticos na incorporação de aminoácidos radiativos em simbioses isolados

Os simbioses isolados em gradiente de Percoll foram ressuspensos em meio Eagle (sem leucina) e incubados durante 30 minutos a 28 °C na presença de cloranfenicol ou rifampicina. As concentrações de antibióticos utilizadas estão discriminadas na figura acima. Após esta pré-incubação adicionava-se L-(4-5-³H)leucina (700 µg/ml) e incubavam-se as amostras por 90 minutos a 28 °C com agitação. A radiatividade

incorporada foi determinada segundo o ítem 2.8 de Materiais e Métodos. Cada ponto experimental representa a média de duas determinações em uma preparação. O controle foi feito incubando-se os simbioses isolados na ausência de antibióticos .

- A) Incubação na presença de cloranfenicol .
- B) Incubação na presença de rifampicina .
- C) Incubação na ausência de antibióticos

3.4.-CARACTERIZAÇÃO DOS POLIPEPTÍDEOS DOS SIMBIONTES ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

Os polipeptídeos presentes nos simbiotes isolados e nos flagelados intactos foram analisados através de eletroforese em gel unidimensional de poliacrilamida contendo SDS (item 2.10 Materiais e Métodos). Após a separação, o gel era corado em solução contendo ácido acético /metanol e Coomassie Blue R (Fig 6).

A figura 6 mostra que os polipeptídeos do simbiote distribuem-se em uma faixa de peso molecular que varia de 14 000 a 200 000. Os polipeptídeos majoritários, em termos de coloração com Coomassie Blue R, são aqueles de peso molecular aparente de 64 000, 58000, 45 000, 36 000, 32 000 e 24 000 .

O padrão de polipeptídeos do simbiote isolado difere qualitativamente e quantitativamente do padrão apresentado pelos flagelados intactos. Vários polipeptídeos presentes no simbiotes isolados estão ausentes ou fracamente representados nos flagelado intacto, como por exemplo : polipeptídeos de peso molecular aparente 45 000, 36 000, 24 000 e 22 000 .

Por outro lado, existem muitos polipeptídeos que são comuns a ambas preparações. Estes polipeptídeos são de um modo geral minoritários, com exceção do polipeptídeo 64 kDa que é um polipeptídeo fortemente corado pelo Coomassie Blue R (Fig.6). Ele está igualmente representado nas duas preparações (Figura 6).

A análise dos polipeptídeos dos simbiotes marcados metabolicamente com L-(S)metionina aparecem na Fig. 7

Nesta experiência também foi observado que vários polipeptídeos detectados nos simbioses isolados não são encontrados em *C. deanei* simbiótica sendo que os polipeptídeos mais intensamente marcados são aqueles de peso molecular aparente de 90 000, 88 000, 78 000, 60 000 e 58 000. É interessante notar que abaixo da região de peso molecular 25 000 existe um polipeptídeo marcado com metionina :

Estes resultados mostram que os simbioses isolados são capazes de sintetizar suas próprias proteínas. Estes resultados confirmam os dados morfológicos e bioquímicos mostrados anteriormente com relação à integridade do simbiote isolado pelo método de Percoll.

A figura 7 mostra também a comparação do padrão de síntese proteica de simbioses isolados de flagelados crescidos em diferentes meios (LIT e FYTS). O padrão de polipeptídeos dos simbioses isolados de flagelados crescidos em diferentes meios são indistinguíveis por esse método de análise (Fig 7, linhas 1e2) .

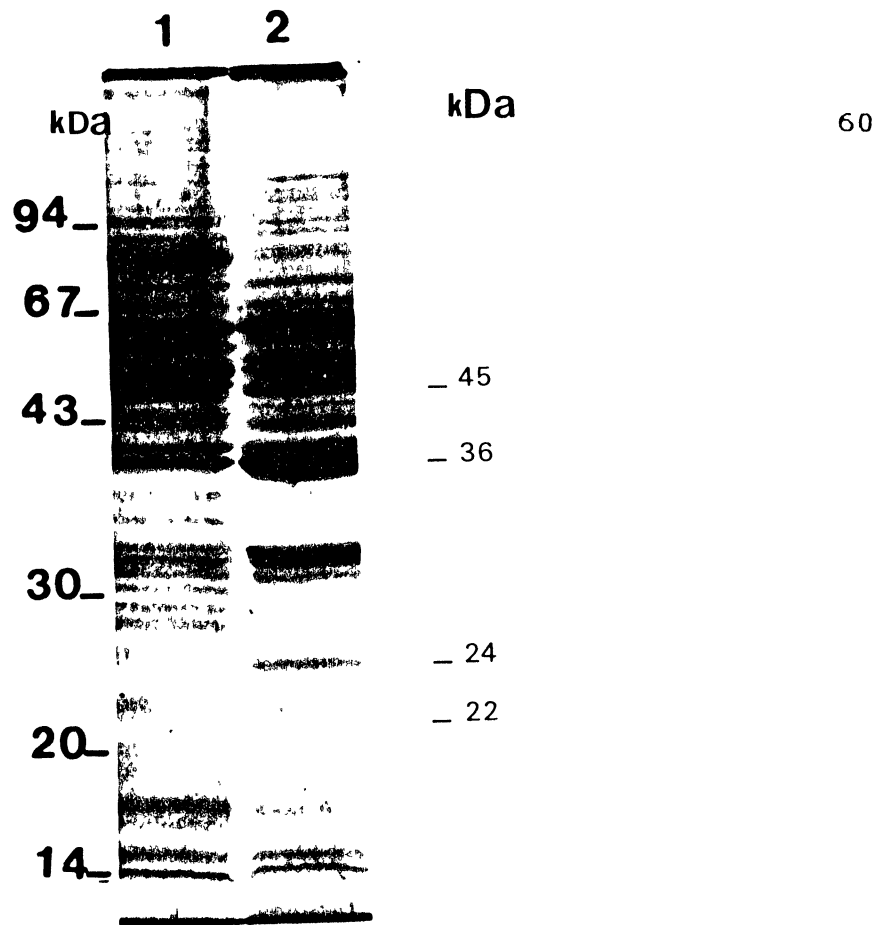


Fig 6-Análise dos polipeptídeos de simbiontes através de gel de poliacrilamida-SDS 10 %

Os simbiontes isolados e células de *Crithidia deanei* (cepa simbiótica) foram ressuspensos em tampão contendo SDS e 2-mercaptoetanol (Laemmli, 1970), incubados 5 minutos em água fervente e centrifugados. Alíquotas dos sobrenadantes contendo o equivalente a 20 µg de proteínas foram aplicados em gel de poliacrilamida a 10 %. Após a eletroforese o gel era corado em solução contendo Coomassie Blue R, metanol e ácido acético (item 2.10 de Materiais e Métodos). As posições dos polipeptídeos de referência (Pharmacia) em quilodaltons (kDa) estão indicado à esquerda da figura.

1)-Polipeptídeos de flagelados Crithidia deanei
(cepa simbiótica)

2)-Polipeptídeos de simbioses aislados.

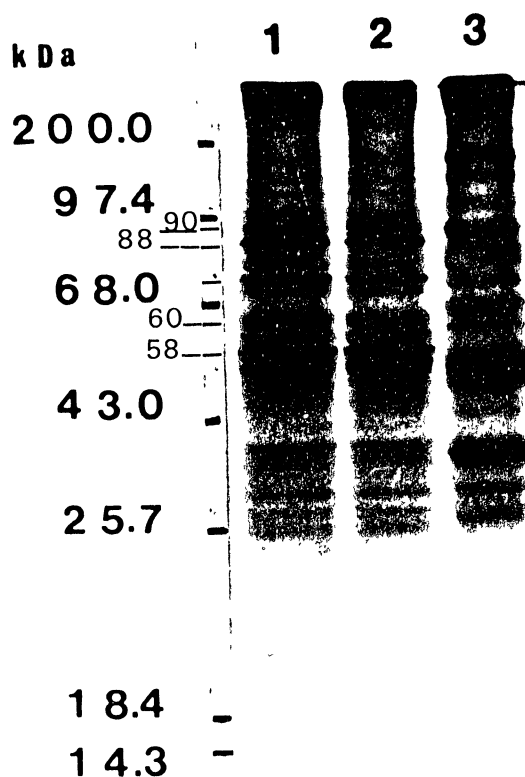


Fig.7-Análise eletroforética de polipeptídeos de simbiontes
35
marcados com L-(³⁵S)metionina

Os simbiontes e células de *Crithidia deanei* (cepa simbiótica) foram incubados na presença de 250 uCi/ml metionina e os polipeptídeos marcados radiativamente foram processados conforme descrito no ítem 2.8 de Materiais e Métodos). Alíquotas contendo o equivalente a 20 ug/ml de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10 % contendo SDS. Após a eletroforese, o gel era fixado e submetido à fluorografia, seco e exposto sob filme de raio X (itens 2.10 e 2.11 de Materiais e Métodos). As posições dos polipeptídeos radiativos de referência (BRL)

em quilodaltons (kDa), estão indicados à esquerda da figura

1)-Polipetídeos marcados de simbiote isolado a partir de flagelados crescidos em meio FYTS (ROITMAN e cols.,1972)

2)-Polipetídeos marcados de simbiontes isolados a partir de flagelados crescidos em meio LIT (CAMARGO,1964)

3)-Polipeptídeos marcados de células a partir de células de Crithida deanei (espécie simbiótica), crescidos em meio FYTS .

3.5. ANÁLISE DOS POLIPEPTÍDEOS SINTETIZADOS PELOS ENDOSIMBIONTES COM ANTICORPOS POLICLONAIS

Os simbiotes isolados foram ressuspensos em PBS e inoculados em coelhos por via intravenosa. O antisoro preparado desta maneira contém anticorpos dirigidos contra proteínas do simbiote e certas proteínas dos hospedeiros, as quais normalmente contaminam as preparações de simbiotes (vide Fig.6)

A fim de se eliminar os anticorpos dirigidos contra proteínas do hospedeiro, extratos de Crithidia deanei aposimbiótica foram preparados e as proteínas nele presentes foram ligadas à Sepharose CNBr 4B. O antisoro foi cromatografado nesta resina e a fração não ligada na coluna de afinidade foi usada na reação de imunoprecipitação.

Esta adsorção com o extrato de Crithidia deanei aposimbiótica elimina muito dos anticorpos dirigidos contra as proteínas da célula hospedeira. Após a adsorção, não foi possível detectar reação do antisoro com polipeptídeos marcados de Crithidia deanei aposimbiótica (dado não mostrado).

A Fig. 8 mostra a imunoprecipitação de antígenos presentes nos extratos de simbiotes isolados após marcação metabólica com L- (³⁵S) metionina. Vários polipeptídeos foram precipitados pelo antisoro: aqueles de massa molecular aparentes de 88 000, 78 000, 64 000, 60 000, 58 000, 42 000 e 41 000 daltons (Fig.8, linha 2) que compreende aos polipeptídeos específicos do simbiote detectados no extrato total (Fig.7)

É interessante notar que a imunoprecipitação dos antígenos presentes no flagelado intacto (isto é, Crithidia deanei contendo simbiote) revelou a presença de apenas um antígeno majoritário de peso molecular 78 000, fortemente marcado pela metionina (Fig. 8 ,linha 1).

Os controles das reações de imunoprecipitação foram realizados utilizando-se soro de coelho pré-imune, ou seja, antes da inoculação dos simbioses isolados . O soro de coelhos pré-imune não precipita nenhum dos polipeptídeos mostrados na Fig.8

Os resultados acima mostram que os simbioses isolados são capazes de induzir anticorpos capazes de imuprecipitar polipeptídeos antigênicos sintetizados pelo simbiote isolado.

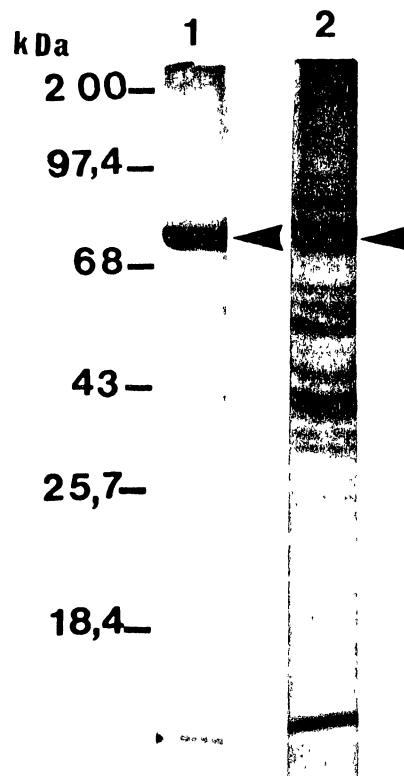


Fig.8-Imunoprecipitação dos polipeptídeos de simbiontes com anticorpos policlonais preparados contra os simbiontes isolados.

Simbiontes isolados e células de Crithidia deanei³⁵ (cepa simbiótica) foram incubados na presença de L-(S) metionina, conforme descrito no item 2.8 de Materiais e Métodos. Após a incubação, as suspensões de células e simbiontes foram lavadas em RPMI e lisadas pela adição de tampão contendo NP-40 e inibidores de protease (item 2.14 Aliquotas dos lisados em detergente NP-40, contendo o equivalente a 20 µg de proteínas, foram incubados na presença de antisoros anti-simbionte , previamente adsorvidos com extrato de Crithidia deanei aposimbiótica (ítens 2.13 e 2.14 de Materiais e Métodos).Após a incubação com antisoro, os imunocomplexos foram

precipitados pela adição de S. aureus A, eluidos com tampão contendo SDS e 2-mercaptoetanol e analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS (itens 2.10 e 2.14 de Materiais e Métodos). Após a eletroforese o gel era submetido a fluorografia, desidratado e exposto sob filme de raio X (item 2.11).

Linha 1) Imunoprecipitação dos polipeptídeos sintetizados pela Crithidia deanei (cepa simbiótica)

Linha 2) Imunoprecipitação dos polipeptídeos sintetizados pelos 'simbiontes isolados

As posições dos polipeptídeos radiativos de referência (BRL) em kDA estão indicados à esquerda da figura

3
3.6.-INCORPORAÇÃO DE METIL-(H) TIMIDINA EM SIMBIONTES
ISOLADOS

Os simbiotes foram incubados na presença de metil-(³H) timidina por diferentes intervalos de tempo .A Fig.9 mostra que a incorporação deste nucleotídeo é linear durante os primeiros 45 minutos de incubação

Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos no ítem 3.2 dos Resultados, que mostram que os simbiotes isolados apresentam intensa atividade metabólica sendo capazes de incorporar vários precursores em suas macromoléculas.

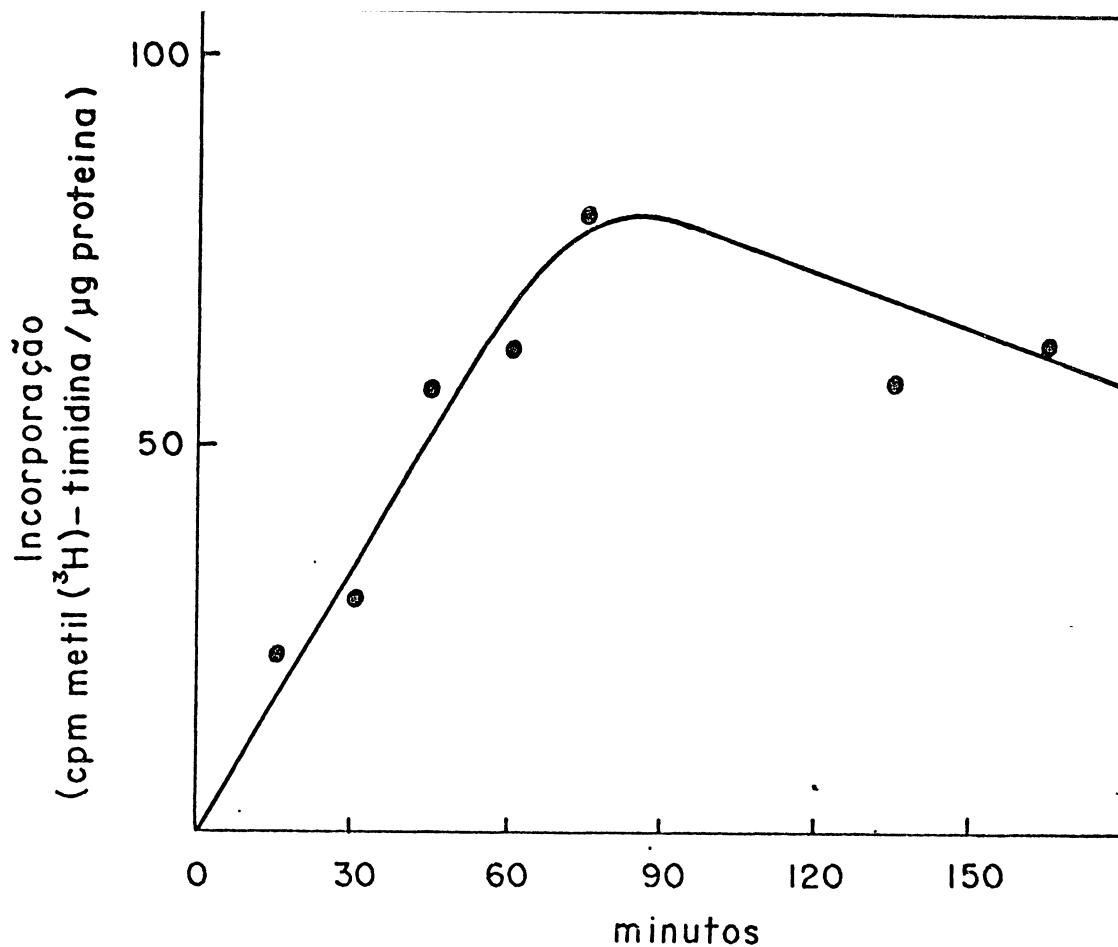


Fig.9-Incorporação de metil-(³H) timidina na fração ácido insolúvel do simbiote isolado.

O simbiote isolado em gradiente de Percoll foram ressuspensos em RPMI e incubados a 28°C durante 30 minutos com agitação. A seguir, a preparação contendo o equivalente a 1 mg/ml de proteína era incubada na presença de 100 µCi/ml de metil-(³H) timidina e 1 mg/ml de BSA durante diferentes intervalos de tempo a 28°C (ítem 2.8 de Materiais e Métodos). A radiatividade incorporada na fração ácida insolúvel do simbiote foi determinada segundo o ítem 2.8 de Materiais e Métodos .Cada ponto experimental representa a média de 2 determinações.

3.7. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO DNA DO SIMBIONTE ISOLADO

Um dos objetivos da presente tese é a caracterização do DNA do endosimbionte e a sua clonagem em plasmídios. O DNA do simbionte isolado pode ser obtido através de lise com detergentes (sarkosyl e SDS), digestão com pronase e extração com fenol /clorofórmio .

A análise do DNA de simbionte foi feita através de eletroforese em gel de agarose (Fig 10).Ele migra como única banda cuja a mobilidade é superior ao fragmento de 23 Kb do fago lambda digerido com Hind III.

O DNA do simbionte pode ser digerido com várias enzimas de restrição (Mbo I , Eco RI , Sau 3A). A enzima de restrição Mbo I foi escolhida para obtenção de fragmentos de 1a2 Kb que serão clonados no plasmídio pUC 13(vide Resultados, ítem 3.8). O DNA de simbionte isolado (5 µg) foi digerido parcialmente com 1 unidade de endonuclease de restrição Mbo I, de modo a gerar fragmentos da ordem de 1.0- 2.3 Kb . Esta reação foi monitorada retirando-se alíquotas em intervalos de 15 , 30 , 60 e 120 minutos e, analisando-se através de eletroforese em gel de agarose 0.7 % (Fig. 11). Desta forma, pode-se obter os fragmentos desejados para a clonagem no tempo de 60 minutos, não sendo necessário utilizar-se o método de eletroeluição do DNA em gel, normalmente indicado para se obter apenas o fragmento desejado.

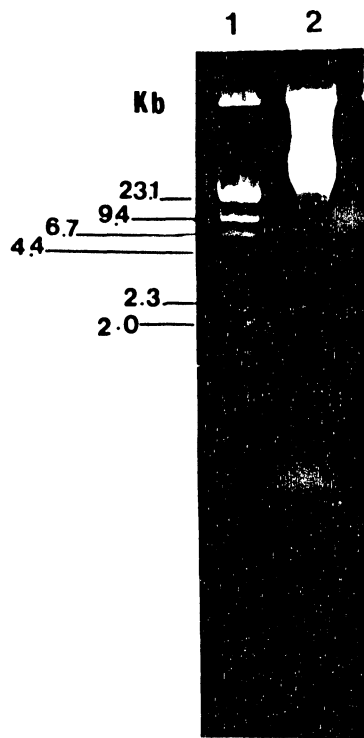


Fig.10-Análise do DNA simbiote através de eletroforese em gel de agarose

Os simbiotes isolados em gradiente de Percoll foram lisados na presença de tampão contendo: Tris-HCl 10 mM , pH 7.5 ; sarkosyl 1% ; SDS 1% ; EDTA 1mM e pronase 1mg/ml) (item 2.16 de Materiais e Métodos). Após várias extrações com fenol/clorofórmio, o DNA era precipitado pela adição de etanol e acetato de sódio (item 2.16 de Materiais e Métodos). O equivalente a 2,5 μ g de DNA de simbiote foram aplicados no gel de agarose (0.7 %) e submetido à eletroforese (item 2.19 de Materiais e Métodos). Após a eletroforese, o gel era corado com brometo de etídio (0.5 μ g/ml) e fotografado sobre luz ultravioleta em aparelho Polaroid. Linha 1: Marcadores de peso molecular, λ Hind III. Os tamanhos dos fragmentos em Kb, estão indicados à esquerda da figura. Linha 2: DNA do simbiote isolado em gradiente de Percoll.

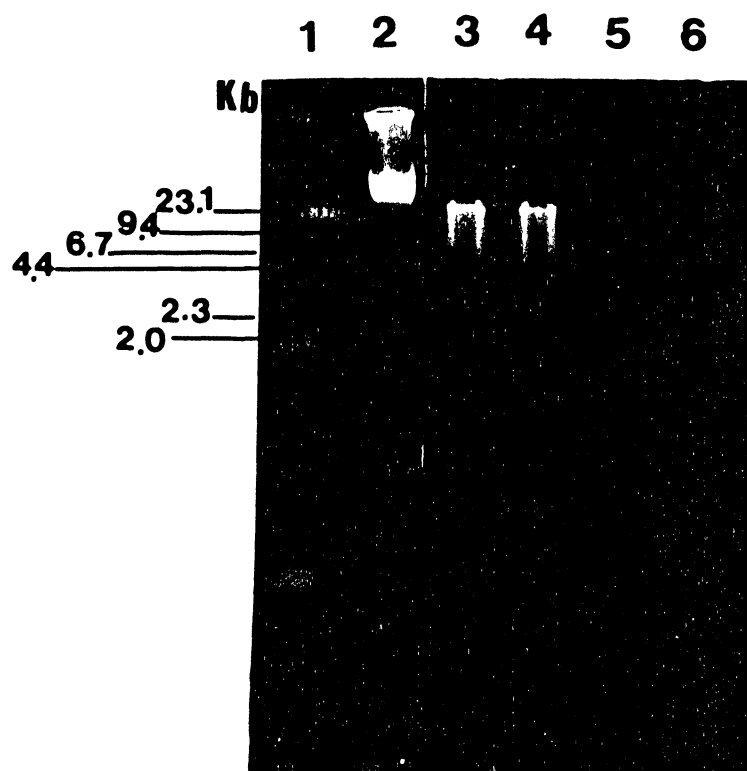


Fig 11.-Digestão de DNA de simbiote com enzima de restrição MboI

O DNA de simbiote isolado em gradiente de Percoll foi extraído, conforme descrito no item 2.16 de Materiais e Métodos. Cêrca de 5 μ g de DNA de simbiote foram incubados na presença de 1 U de Mbo I por diferentes intervalos de tempo. Alíquotas de DNA de simbiote contendo o equivalente a 1 μ g foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (0.7 %) e corados com brometo de etídio (0.5 μ g/ml) conforme descrito em Materiais e Métodos nos ítems 2.19 e 2.20). Linha 1 :

marcadores de peso moleculares, A Hind III .Os tamanhos dos fragmentos em Kb, estão indicados à esquerda. Linha 2: DNA intacto de simbiote. Linha 3 : DNA de simbiote digerido por 15 minutos com Mbo I. Linha 4 : DNA de simbiote digerido por 30 minutos com Mbo I. Linha 5 : DNA simbiote digerido 60 minutos com Mbo I. Linha 6 : DNA simbiote digerido por 120 minutos com Mbo I .

3.8.-CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA DE SIMBIONTE EM PLASMÍDIO pUC 13

O DNA dos simbiosomas de tripanosomatídeos apresentam complexidade semelhante ao DNA de E.coli (SPENCER e CROSS, 1975 ; TUAN e CHANG , 1975). Desta maneira, bibliotecas genômicas representativas podem ser obtidas clonando-se fragmentos de aproximadamente 2 Kb em um vetor apropriado como o plasmídeo pUC 13 (Fig. 12).Esse vetor apresenta sítios de clonagem dentro do gene da B-Galactosidase, de maneira que, os recombinantes tem como característica fenotípica a ausência de atividade de B-Galactosidase.(VIEIRA e MESSING,1982).

A figura 12 mostra o mapa genético do plasmídeo pUC 13 e seus sítios de clonagem. Fragmentos de 1.0 -2.3 Kb obtidos pela digestão do DNA do simbiote com a enzima Mbo I (Fig. 11 , linha 5)foram extraídos com CHCl₃ / fenol ,precipitados com etanol e ressuspensos em Tris-HCl 10 mM,pH 7.5, e EDTA 1 mM .

Alíquotas contendo 200 ng de DNA de simbiote digerido com Mbo I foram incubados com 40 ng de vetor pUC 13 (digerido com Bam HI e defosforilado)na presença de T4 Ligase durante 16 horas a 12°C.Após a ligação, a mistura de reação era inativada durante 10 minutos a 65°C , a fim de se reduzir o número de moléculas de plasmídeo não recombinantes.

A transformação era feita utilizando-se alíquotas de 20 ng de DNA recombinante obtido na ligação acima e 100 ul de bactérias JM 103 competentes.Nos controles positivos de transformação eram adicionados 20 ng de DNA de plasmídeo não

recombinante (pUC 8 e pBR322).Nos controles negativos as bactérias eram incubadas na ausência total de DNA de plasmídio . Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 13.

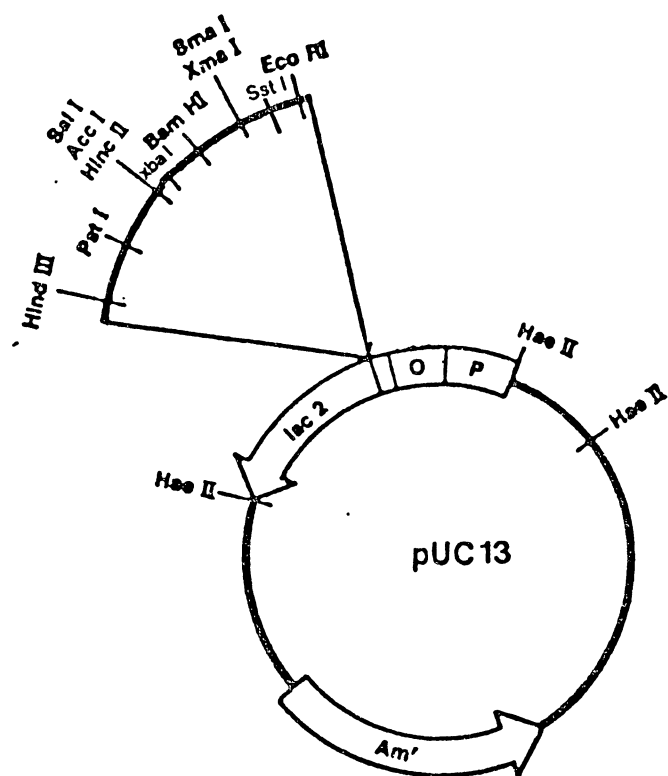


Fig.12- Mapa genético do plasmídeo pUC 13 mostrando os seus sítios de clonagem .

Os fragmentos de DNA de endosimbionte digeridos com a enzima de restrição Mbo I, foram clonados no sítio Bam HI do vetor pUC 13 (VIEIRA e MESSING, 1982), como descrito no ítem 2.22 de Materiais e Métodos.

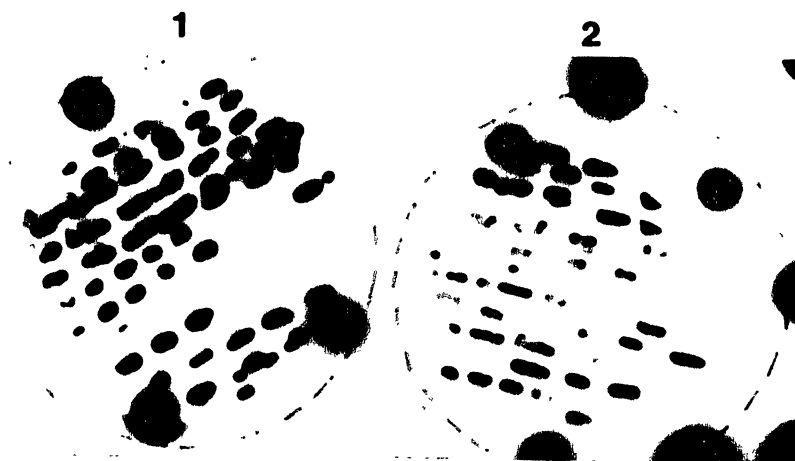


Fig.13-Hibridização dos clones recombinantes obtidos em
³²
 pUC 13 com o (P)DNA de simbioses.

As colônias (lac-) obtidas por transformação de E.coli JM 103 com plasmídeo recombinantes foram crescidas em filtros de nitrocelulose (Filtro 1 com 70 colônias e Filtro 2 com 50 colônias)e tratadas com lisozima ,Triton X -100 e NaOH , (ítem 2.25.1.1).A seguir os filtros eram incubados na presença de DNA de sim-
⁸
 bioses marcados radiativamente (10 cpm/ ug DNA)

conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.25.1.3). As hibridizações foram feitas na presença de SSC 5 x e Denhart's a 65 °C durante 16 horas com agitação. A sonda radiativa (DNA de simbiote marcado) foi adicionada na concentração de 10^6 cpm /filtro após a pré-hibridização (item 2.25.1.1. de Materiais e Métodos). Após a hibridização, os filtros foram lavados, secos e expostos sob filme de raio X conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.25.3.1.). O tempo de exposição do autoradiograma desta figura foi de 24 horas .

TABELA 13-CONSTRUÇÃO DE BANCOS GENÔMICOS DE DNA DE
SIMBIONTE DE CRITHIDIA DEANEI EM pUC 13.

VETOR UTILIZADO	DNA VETOR (ng)	DNA SIMBIONTE (ng)	NÚMERO TOTAL TRANSFORMANTES	NÚMERO TRANSFORMANTES/ μ G DNA PLASMÍDIO
pUC8 INTACTO	20	0	25600 (a)	$1,28 \cdot 10^6$
pBR322 INTACTO	20	0	51000 (b)	$2,55 \cdot 10^6$
pUC 13	40	200	10000 (c)	$2,5 \cdot 10^5$
NENHUM	0	0	0	0

As condições de ligação do vetor com o DNA de simbiote estão descritos nos ítem 2.22 de Materiais e Métodos e no ítem 3.8 de Resultados. A transformação de células competentes JM 103 de E.coli foi feita segundo descrito no ítem 2.23 de Materiais e Métodos e no item 3.8 de Resultados .

(a) transformantes = Amp^r (resistência Ampicilina) e lac⁺ (colônias azuis , capazes de metabolizar lactose)
 (b) transformantes = Amp^r
 (c) transformantes = Amp^r , lac⁻ (colônias claras , incapazes de metabolizar lactose)

A Tabela 13 mostra que foram obtidos 10 000 transformantes (Amp^r, lac⁻) com o plasmídeo recombinante (40 ng pUC 13 + 200 ng de DNA de simbionte). A eficiência de transformação usando-se o plasmídeo intacto foi da ordem de 1.2 a 2.5 x 10⁶ transformantes /ug de DNA de plasmídeo. A eficiência obtida com o plasmídeo recombinante é cerca de 5 a 10 vezes menor do que aquela obtida com o plasmídeo intacto. Este resultado está dentro do esperado, pois, normalmente a eficiência de transformação com plasmídeo intacto é cerca de 10-100 vezes maior do que aquela obtida com o plasmídeo intacto. Desta maneira podemos concluir que o DNA obtido de simbiontes isolados em gradiente de Percoll pode ser usado na construção de biblioteca genômica.

3.9-ANÁLISE DE CLONES RECOMBINANTES OBTIDOS EM pUC 13 ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO " IN SITU "

Com a finalidade de se verificar a presença de DNA de simbionte nos plasmídios recombinantes, as colônias obtidas na transformação citada acima, foram crescidas em filtros de nitrocelulose e hibridizadas com o DNA de simbionte marcado radiativamente. O DNA de simbionte foi marcado com (³²P) dATP através da técnica de " nick-translation " .

A Fig.13 mostra que a maioria dos transformantes obtidos reagiram com DNA de simbionte marcado com (³²P). De 120 colônias testadas, 109 reagiram positivamente com a sonda radiativa. Algumas colônias hibridizaram menos intensamente com

a sonda. Este fato, talvez seja devido ao menor crescimento destes recombinantes nas condições utilizadas. 81

Os dados obtidos na hibridização com (³²P)DNA de simbiote mostram que a maioria dos transformantes (lac-) obtidos contém sequências que reagem com a sonda utilizada.

Os simbiotes isolados em gradientes de Percoll apresentam pequena contaminação por cinetoplasto (ítem 3.1 de Resultados). Como se sabe, os cinetoplastos são estruturas que apresentam na sua constituição um grande número de moléculas circulares de DNA (HONIGBERG e cols ,1964). Deste modo, as preparações de DNA de simbiotes isolados em gradientes de Percoll devem conter como contaminantes fragmentos de DNA do cinetoplasto (kDNA). Embora esse contaminante esteja em pequena proporção, ele pode estar representado nas bibliotecas genômicas construídas em pUC 13.

Com a finalidade de verificar a existência de fragmentos de kDNA nas bibliotecas genômicas, uma série de 100 clones recombinantes que reagiram positivamente com o (³²P)DNA de simbiote foram hibridizados com o DNA de cepas aposimbióticas de Crithidia deanei marcado radioativamente. Dos 100 clones testados 28 clones reagiram positivamente com o (³²P)DNA da cepa aposimbiótica de Crithidia deanei. Este resultado indica que cerca de 72% dos clones recombinantes presentes na biblioteca genômica construídas em pUC 13 são específicos do simbiote .

A fim de comprovar os fenótipos dos 72 % dos clones selecionados acima (simbiote específicos), foi feita uma experiência na qual filtros contendo estes clones foram hibridizados com

DNA do simbiote e com o DNA da cepa aposimbiótica .

Na figura 14 os filtros 1A-B, 2A-B e 3A-B, contém respectivamente, 41, 16 e 15 clones recombinantes. Após o crescimento dos recombinantes, os filtros eram processados conforme descrito em Materiais e Métodos (ítem 2.26). Os filtros da "série A " foram hibridizados com o (³²P)DNA de simbiote e os da "série B" (réplicas) com o (³²P)DNA da cepa aposimbiótica de *Crithidia deanei*. Todos os clones testados reagiram com o DNA de simbiote (série A) mas não com o DNA de *Crithidia deanei* aposimbiótica (série B). Estes resultados mostram que a hibridização diferencial pode ser usada para selecionar os clones que contém sequências específicas de simbiontes .

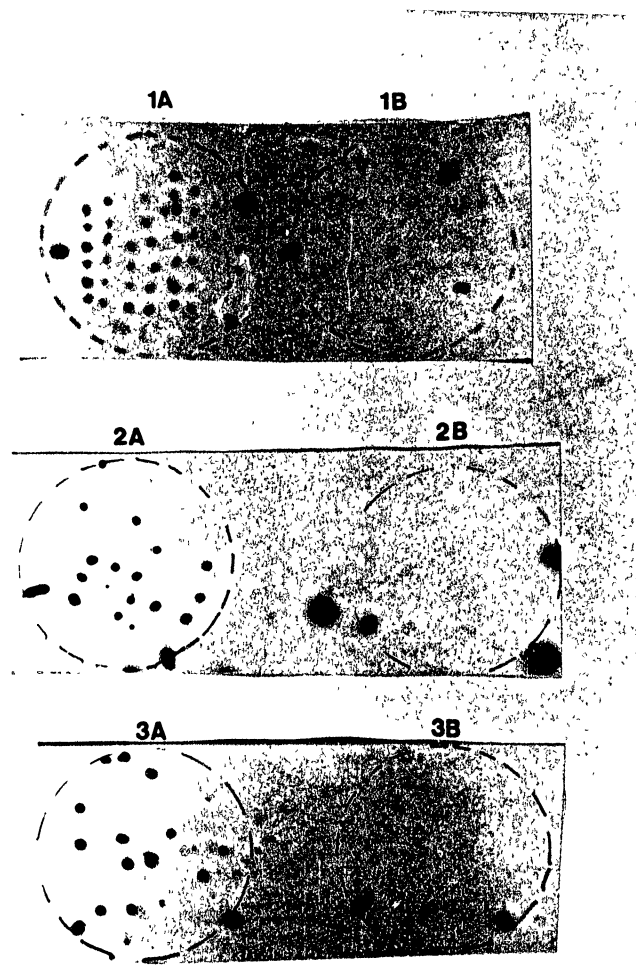


Fig.14-Hibridização diferencial dos clones recombinantes.

Os clones recombinantes (total de 72 clones) que contém sequência de simbioses tiveram seus fenótipos retestados

através de hibridização com sondas de DNA radiativo preparados a partir de DNA do simbionte isolado e do DNA de Crithidia deanei aposimbiótica . As condições de hibridização estão descritos em Materiais e Métodos (ítem 2.27) e na legenda da figura 13. O tempo de exposição dos autoramas foi de 24 horas . Os filtros da " série A " foram hibridizados com (³²P)-DNA de simbionte e os da "série B" com (³²P)-DNA de Crithidia deanei aposimbiótica.Os filtros da " série B" são réplicas dos filtros da"série A."

4.0.-DISCUSSÃO

O método de isolamento de endosimbiontes apresentado neste trabalho diferencia-se dos métodos de isolamento de simbiontes publicados para Crithidia deanei (ALFIERI e CAMARGO 1982) e Crithidia oncolpelti (TUAN e CHANG, 1975) por ser mais simples, rápido e reprodutível.

Este método pode ser considerado simples pelo fato de que, ao contrário dos métodos descritos acima, não necessita submeter o endosimbionte a várias centrifugações em gradientes de sacarose (ALFIERI e CAMARGO, 1982) e nem envolve o uso de anticorpos específicos contra a membrana celular da célula hospedeira (TUAN e CHANG, 1975).

Observações ao microscópio eletrônico das frações obtidas no gradiente descontínuo de Percoll demonstram que a fração 4 onde se concentram os simbiontes, apresenta células simbióticas com aspecto semelhante às encontradas no interior da célula hospedeira. Os simbiontes presentes nesta fração caracterizam-se pela presença de membrana dupla (Fig.1) e citoplasma homogêneo. Desta maneira podemos concluir que o método descrito neste trabalho não causa nenhum dano aparente à morfologia do simbionte isolado.

Deve-se ressaltar a ausência de células hospedeiras íntegras na fração 4 do gradiente de Percoll. Observa-se nesta fração a presença de alguns fragmentos de cinetoplasto e de

membranas. Esta observação é importante pois mostra que toda a radiatividade incorporada nesta fração é resultante da incorporação dos precursores radiativos pelos simbiosites. Como pode se verificar, as concentrações estabelecidas para o gradiente de Percoll foram adequadas para a purificação do simbiote impedindo a migração de células contaminantes junto com a fração rica em simbiosites.

Para se fazer uma avaliação mais detalhada do grau de pureza obtido por este método, determinou-se a atividade específica de ornitina carbamiltransferase no extrato celular bruto e na fração obtida na banda 4 do gradiente de Percoll. Esta enzima, expressa pelos endosimbiosites do gênero *Crithidia* (CAMARGO e FREYMULLER, 1977 ; FIGUEIREDO, e cols., 1978 ; ALFIERI e CAMARGO, 1982), cataliza a síntese de citrulina a partir de ornitina e carbamilfosfato. Devido a sua localização específica no simbiote, ela pode ser utilizada como um marcador bioquímico confiável desta estrutura.

A atividade específica da ornitina carbamiltransferase encontrada na banda 4 do gradiente de Percoll é cerca de 3 vezes maior do que aquela observada no extrato celular bruto (Tabela 12), demonstrando desta maneira que o método desenvolvido é eficiente na purificação do simbiote.

Estima-se que cerca de 5 a 10 % da proteína total encontrada na célula de *Crithidia deanei*, pertence ao simbiote.

(ALFIERI e CAMARGO 1982).Os nossos resultados mostram que 2 % das proteínas do extrato celular bruto são recuperadas na fração do gradiente de Percoll (Tabela 12). Desta forma ,podemos concluir que 20 a 40 % dos 5-10% das proteínas totais que se encontravam no extrato bruto foram recuperados na fração 4.Este rendimento é semelhante aqueles obtidos por outros métodos de isolamento simbiotes (ALFIERI e CAMARGO,1982;TUAN e CHANG , 1975) .

Cabe ressaltar, como já foi assinalado anteriormente que o método de isolamento de simbiote através do gradiente de Percoll apresenta algumas vantagens sobre os demais métodos citados, como por exemplo :

- a)- Este método é mais simples e reprodutível que os demais métodos, citados na literatura. Não há necessidade de antisoros específicos para a ruptura das células e liberação dos simbiotes, como descrito no método de TUAN e CHANG, 1975.
- b)- Ele evita sucessivas centrifugações em gradientes de sacarose as quais podem causar danos a integridade do simbiote . Centrifugações sucessivas em gradiente de sacarose são utilizados no método descrito por ALFIERI e CAMARGO, 1982.
- c)- O simbiote obtido pelo método do Percoll apresenta intensa atividade metabólica, como será demonstrado a seguir. Os simbiotes obtidos pelo método de ALFIERI e CAMARGO, 1982. não apresentaram bons níveis de incorporação de precursores de proteínas e ácidos nucleicos.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os simbioses isolados pelo método de Percoll incorporam ativamente precursores radiativos em suas macromoléculas (ácidos nucléicos e proteínas).

Os simbioses isolados incorporam ativamente L-(4-5³H)leucina e L-(S³⁵)metionina em suas proteínas(Fig.4 e 7) . A incorporação destes aminoácidos é linear até 45 minutos atingindo-se o " plateau " por volta de 120 minutos de incubação .

É interessante notar que após 3 horas de incubação os níveis de incorporação são semelhantes àqueles obtidos no tempo de 30 minutos. Estes resultados sugerem que após 3 horas no meio extracelular o simbiote isolado começa a perder sua capacidade biossintética. Resultado semelhante foi obtido analisando-se a incorporação de metil-(H³)timidina no simbiote isolado (Fig.9). Desta maneira, podemos concluir que os simbioses, quando isolados de células hospedeiras, são capazes de sintetizar macromoléculas a partir de precursores presentes no meio extracelular. Porém, essa capacidade biossintética é limitada a um intervalo de tempo de aproximadamente 3 horas após o que a atividade metabólica começa a decair. Tal como ocorre com outras organelas celulares isoladas (por exemplo, mitocôndrias), os simbioses não sobrevivem por longos períodos de tempo fora da célula hospedeira. Apesar de possuírem mecanismos de replicação, transcrição e tradução próprios, os simbioses dependem da célula hospedeira para a sua manutenção.

Há evidências indiretas de que o aparato de síntese proteica do simbiote é de natureza procariótica. Foi descrito por alguns autores que os rRNAs e os ribossomos dos simbioses apresentam propriedades físicas semelhantes aos de *E. coli* (SPENCER e CROSS,1975; CORREA ,1976). Por outro lado, sabe-se que cepas de tripanosomatídeos livres de simbioses podem ser obtidos cultivando-se os flagelados por várias gerações em meio contendo cloranfenicol (CHANG,1974; MUNDIN e ROITMAN,1977).

Com o intuito de melhor caracterizar a maquinaria de síntese proteica presente nos simbioses, nós analisamos os efeitos de antibióticos (cloranfenicol e rifampicina) sobre estas estruturas isoladas. Os mecanismos de ação destes antibióticos e seus efeitos sobre o simbiote serão discutidos a seguir.

O cloranfenicol age ao nível da tradução .As células procarióticas possuem ribossomos 70 S que contém duas subunidades (30 e 50 S). Quando estas células são incubadas com cloranfenicol, este antibiótico liga-se a um sítio de alta afinidade na subunidade 50 S, impedindo que a enzima peptidil transferase se ligue a esta subunidade (PRATT E FEKETY,1986).

Outro antibiótico que atua na síntese proteica de células procarióticas é a rifampicina.

Simbioses isolados são sensíveis ao cloranfenicol

(Fig. 5). Concentrações de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diminuem a incorporação de L-(4-5-³H) leucina em cerca de 70 % em relação ao controle. Já concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inibem quase completamente a incorporação deste aminoácido.

A inibição por cloranfenicol da síntese proteica do simbionte isolado está de acordo com os resultados obtidos por outros autores, ou seja, a presença de ribossomos procarióticos nos simbiontes (SPENCER e CROSS, 1975). Os nossos resultados constituem uma evidência direta da existência de uma maquinaria de síntese proteica procariótica no endosimbionte.

A sensibilidade dos simbiontes de Crithidia deanei ao cloranfenicol é muito semelhante àquela observada com os simbiontes de afídeos (ISHIKAWA, 1982). Por outro lado, os simbiontes parecem ser menos sensíveis ao cloranfenicol que as bactérias. A concentração de cloranfenicol necessária para se inibir, acima ou igual a 90 %, a incorporação de aminoácidos em bactérias é de 10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (HAHN, 1967), ou seja, 2,5 a 5,0 vezes menor do que a concentração necessária para inibição da síntese proteica no simbionte (Fig. 5).

Os efeitos do cloranfenicol sobre a síntese proteica dos simbiontes são comparáveis aos obtidos com mitocôndrias isolados de fígado de rato, Neurospora e levedura (BEATTIE, 1968; KUNTZEL, 1969; POYTON e GROOT, 1975). Estes resultados sugerem que, a nível funcional, os ribossomos simbióticos se assemelham mais aos ribossomos mitocondriais do que aos bacterianos.

A rifampicina em concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inibe

quase completamente a incorporação de aminoácidos radioativos no simbiote isolado. Comparando-se a sensibilidade do simbiote em relação à rifampicina, observa-se uma situação muito parecida à descrita para cloranfenicol. A sensibilidade à rifampicina apresentada pelo simbiote é muito próxima àquela descrita para os simbioses de afídeos e mitocôndrias isoladas (BUSS e KUN, 1978 ; ISHIKAWA, 1982). Estes dados reforçam a sugestão feita acima de que, a nível funcional, a maquinaria de síntese proteica do simbiote é muito semelhante à de mitocôndrias. Além disso, a inibição por rifampicina é uma indicação muito forte de que as RNA polimerases presentes nos simbioses também são de natureza procariótica .

A análise dos polipeptídeos sintetizados pelos simbioses, feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, e coloração do gel revela um padrão bastante complexo podendo-se distinguir pelo menos 30 polipeptídeos diferentes distribuídos numa faixa de peso molecular que varia de 14.000 e 200.000 (Fig.6).

O perfil das proteínas do simbiote difere qualitativamente e quantitativamente daquele apresentado pelo flagelado intacto, isto é, da cepa simbiótica de *Crithidia deanei*. Vários polipeptídeos presentes nos simbioses isolados estão ausentes ou fracamente representados no flagelado intacto , como por exemplo : os polipeptídeos de peso molecular aparente 45 000, 36 000, 24 000 e 22 000. O enriquecimento destes polipeptídeos na fração de simbioses sugere que eles sejam especificamente sintetizados pelos simbioses .

Existem vários polipeptídeos que estão igualmente representados nas células intactas e no simbiote isolado. Não se sabe quais são expressos pelos simbioses. É possível que esses polipeptídeos sejam sintetizados pela célula hospedeira e durante o processo de purificação fiquem aderidos especificamente ou inespecificamente aos simbioses. Por outro lado, poderíamos supor que alguns deles sejam sintetizados pela célula hospedeira e transferidos para o simbiote, tal como ocorre em simbioses de afídeos (ISHIKAWA, 1982 b).

Como foi discutido anteriormente os simbioses isolados são capazes de incorporar L-(S)³⁵ metionina presente no meio de incubação.

O perfil de polipeptídeos marcados com L-(S)³⁵ metionina analisado por PAGE-SDS, é bastante complexo distinguindo-se pelo menos 20 polipeptídeos diferentes distribuídos na faixa de peso molecular de 200.000 a 20.000. Estes resultados confirmam os resultados anteriores mostrando que os simbioses isolados são metabolicamente ativos e que eles são capazes de sintetizar suas proteínas independentemente da célula hospedeira.

Os dados sobre biossíntese de polipeptídeos pelo simbiote mostrado na Figura 7 permitem-nos concluir que o simbiote comporta no seu genoma genes em quantidades suficientes para codificar um número significativo de polipeptídeos. Este resultado está de acordo com observações anteriores de que os simbioses de tripanosomatídeos apresentam um genoma cuja complexi-

dade é semelhante ao de E.coli (SPENCER e CROSS,1975 ; TUAN e CHANG,1975).

Um outro aspecto analisado neste trabalho foi a influência da composição do meio de cultura na síntese proteica do simbionte. Os flagelados foram cultivados em 2 meios diferentes : o meio FYTS, meio contendo tripticase, extrato de levedura e sacarose e o meio LIT ,que é complexo e contém infuso de fígado, triptona e soro de vitelo.

Os perfis de síntese proteica dos flagelados cultivados nestes meios são idênticos(dado não mostrado). Com relação aos simbiontes isolados, verificou-se que o perfil de polipeptídeos sintetizados pelos simbiontes isolados independe do meio no qual foi cultivado o flagelado (Fig.7 ,linha 1 e 2).

Existe uma nítida diferença entre o perfil proteico do simbionte isolado e aquele observado no flagelado intacto, devendo-se ressaltar que alguns polipeptídeos com massa aparente 88, 78,58 e 35 kDa, presentes no simbionte, estão ausentes ou fracamente representados no flagelado intacto, levando-nos a supor a existência de uma interação entre a célula hospedeira e o simbionte ao nível de síntese proteica. Esta relação também foi observada em simbiontes isolados a partir de afídeos (ISHIKAWA,1982).

Analisadas em conjunto, as informações obtidas neste trabalho sugerem que a síntese proteica dos simbiontes é regulada por fatores presentes na célula hospedeira. Assim os genes que codificam para determinados polipeptídeos dos simbiontes como por

exemplo 88, 78, 58, e 35 kDa, estariam reprimidos na célula hospedeira. Porém quando os simbiosites encontram-se isolados da célula hospedeira, esta repressão desaparece ocorrendo a síntese destas proteínas.

Uma das tentativas que fizemos para determinar quais seriam as proteínas específicas do simbiote foi a preparação de anticorpos contra o simbiote. Para isso coelhos foram imunizados com simbiosites isolados em gradiente de Percoll, que se mostraram bastante imunogênicos, induzindo a produção de anticorpos logo após a terceira inoculação do antígeno. Os soros obtidos após imunização continham anticorpos contra proteínas do simbiote e algumas proteínas da célula hospedeira, como esperado, pois as preparações de simbiosites são contaminadas por restos celulares da célula hospedeira (Fig. 2 e 8), problema o qual procuramos amenizar adsorvendo os soros imunes com extrato de Crithidia deanei aposimbiótica.

As experiências de imunoprecipitação com antisoro contra o simbiote vieram reforçar os dados sobre as proteínas específicas dos simbiosites. Verificamos assim que os antígenos majoritários do simbiote reconhecidos pelos antisoros adsorvidos são aqueles de massa molecular aparente 88, 78, 60, 58, 42, e 41 kDa (Fig. 8). É importante notar que os antígenos de massa molecular 64, 60, 42 e 41 kDa foram enriquecidos por imunoprecipitação. Estes antígenos estão fracamente representados no extrato total

de simbioses (Fig .7 ,linha 1 e 2),ao passo que, os antígenos 88, 78 e 58 kDa constituem-se em polipeptídeos majoritários no extrato de simbioses isolados (Fig.7 ,linha 1 e 2).

Um fato interessante é que apenas um polipeptídeo (78 kDa) é imunoprecipitado com os anticorpos anti-simbionte nas preparações de flagelados intactos.Este resultado sugere que muitos dos polipeptídeos presentes nos simbioses estão ausentes no flagelado intacto.Uma outra hipótese que pode ser cogitada seria que estes polipeptídeos, embora presentes no flagelado intacto,não sejam imunogênicos. Levando-se em conta os dados obtidos na Fig.7,somos inclinados a favorecer a primeira hipótese.

Os anticorpos preparados contra os simbioses serão utilizados futuramente em nosso laboratório para isolamento de genes que codificam para proteína das bibliotecas de expressão construída em pUC 13 e fago lambda gtl1.

O flagelado Crithidia deanei pode servir de modelo para um estudo mais amplo a respeito das interações entre os genomas de células eucarióticas e procarióticas.Assim é importante que o simbiote isolado de Crithidia deanei tenha o seu material genético analisado sob vários aspectos.

Os dados obtidos por nós demonstram que o simbiote de Crithidia deanei apresenta uma via de síntese de DNA específica e dependente de timidina quinase. Esta enzima é encontrada em estruturas procarióticas como mitocôndrias, cloroplastos e em

simbiontes isolados de afídeos (ISHIKAWA,1982) sendo que até o momento não foi detectado em células eucarióticas. Isto nos permite sugerir que a síntese de DNA do simbiote de Crithidia deanei ocorre através de um mecanismo próprio, do qual possivelmente não participa a célula hospedeira .

O DNA de simbiote isolado em gradiente de Percoll foi extraído por métodos usuais (lise com detergente e extração com fenol/clorofórmio) e analisado através de eletroforese em gel de agarose .Ele migra com uma única banda acima do marcador de massa molecular 23 Kb. Isto mostra mais uma vez que os simbiontes isolados pelo método de Percoll são íntegros tanto do ponto de vista estrutural como bioquímico.Além disso,esse resultado está de acôrdo com as observações anteriores os quais mostram que o DNA do simbiote de tripanosomatídeos é semelhante ao de E.coli (SPENCER e CROSS,1975 ; TUAN e CHANG 1975).

Um avanço no estudo da organização genômica dos simbiontes pode ser conseguido através da construção de um banco de DNA genômico de simbiote e do isolamento de sequências gênicas específica. Desta maneira, após confirmarmos que era possível obter-se DNA de alto peso molecular de endosimbiote, nós iniciamos a construção de biblioteca genômica em pUC 13.

O DNA de simbiote foi digerido com diferentes enzimas de restrição mas para a construção do banco genômico foi usada a endonuclease Mbo I. O DNA do simbiote possui um grande

número de sítios de clivagem para essa enzima . Desta maneira, controlando-se o tempo de digestão e a concentração de enzima pudemos obter fragmentos de DNA do tamanho adequado para a clonagem em pUC 13 .Este procedimento evita processos indesejados como por exemplo, eletroeluição de géis de agarose ou ainda centrifugação em gradiente de sacarose.O tempo de digestão adequado para se obter fragmentos Mbo I de 1.0-2.3 Kb foi de 60 minutos, utilizando-se 5 ug de DNA de simbiote e 1 U de Mbo I. Estes fragmentos foram clonados no sítio Bam HI do pUC 13 e foram obtidos 10000 clones transformantes (lac- Amp^r).

Como foi citado anteriormente, as preparações de simbioses obtidos em gradiente de Percoll são contaminadas por restos de cinetoplastos. Desta maneira, é de se esperar a presença nas nossas bibliotecas, de clones que contenham sequências de DNA do cinetoplasto. Nós verificamos que esses clones podem ser facilmente detectados através de hibridização diferencial utilizando-se como sondas o DNA do simbiote isolado e o DNA da Crithidia deanei aposimbiótica. Os clones que contém sequência específicas não reagem com a sonda preparada a partir de DNA de Crithidia deanei aposimbiotica (Fig.13).

A complexidade do DNA do simbiote dos tripanosomatídeos, como já foi citado anteriormente, é semelhante àquela encontrada em E.coli (CROSS e SPENCER ,1975 :TUAN e CHANG ,1975). Baseando-se nesta informação, podemos considerar que o banco construído em pUC 13 com o DNA do simbiote de Crithidia deanei é

representativo, uma vez que foram obtidos 10 000 clones dos quais 70 % testados por hibridização diferencial, foram positivos com a sonda de (P) DNA simbiote e negativos com sonda (P) DNA aposimbiote. O número de recombinantes obtidos é suficientemente grande para conter as sequências gênicas presentes no genoma do endosimbiote .

A partir deste banco gênomico será possível isolar o gene ribossomal 16S, cuja estrutura encontra-se em uma das regiões mais conservadas do genoma dos procariotos (WOESE e cols 1975), fornecendo desta forma informações suficientes para que se possa responder a pergunta feita pelos evolucionistas quanto à origem dos simbiotes .

Também é do nosso interesse isolar genes a partir do banco genômico em pUC 13 que codificam para as proteínas de simbiote que foram caracterizadas neste trabalho .

5.0-RESUMO

Neste trabalho nós descrevemos um método de isolamento de simbiote de Crithidia deanei em gradiente de Percoll. Este método permite o isolamento de simbioses intactos em quantidade suficiente para se efetuar estudos bioquímicos. O flagelado Crithidia deanei foi rompido por sonicação e os simbioses liberados foram separados por gradiente descontínuo de Percoll dos restos celulares e de células de Crithidia deanei que não se romperam pelo processo de ultrassom.

Os simbioses isolados pelo método citado acima conservam as suas características morfológicas e apresentam ainda uma atividade metabólica intensa.

A enzima ornitina carbamil transferase (OCT), foi utilizada como marcador bioquímico dos simbioses. Esta enzima encontra-se com atividade enzimática três vezes maior na fração do gradiente de Percoll aonde encontram-se os simbioses isolados do que no extrato bruto, e aproximadamente 6 % da atividade total da OCT do extrato bruto foi recuperada na fração rica em simbioses do gradiente de Percoll. Nós estimamos que 20 % dos simbioses presentes no homogenato foram recuperados nesta fração.

Os simbioses isolados pelo gradiente de Percoll incorporaram $L-(4-5-H)_3$ leucina e $L-(S)_{35}$ metionina ativamente nos primeiros 45 e 60 minutos respectivamente.

O mecanismo de síntese proteica do simbiote foi analisada através do efeito dos antibióticos cloranfenicol e rifampicina na incorporação com L-(4-³5-H)leucina nas suas proteínas

Os antibióticos cloranfenicol e rifampicina em concentração de 20 µg/ml diminuem a incorporação entorno de 50 % e 70%, respectivamente. Estes antibióticos em concentração de 50 µg/ml inibem a incorporação quase completamente. A inibição da síntese proteica pelos antibióticos cloranfenicol e rifampicina produzem evidências diretas da existência de um mecanismo de síntese proteica procariótica .

Os polipeptídeos sintetizados pelo simbiotes foram marcados com L-(³⁵S) metionina e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Os polipeptídeos fortemente marcados apresentaram pesos moleculares aparentes de 90, 88, 78, 60 e 58 x 10³ .O perfil dos polipeptídeos sintetizados pelo simbiote difere daqueles polipeptídeos encontrados na cepa de Crithidia deanei com simbiote. Vários polipeptídeos estão ausentes ou fracamente marcados no flagelado, por exemplo 88,78,60 e 58 kDa .Este resultado sugere que a síntese destes polipeptídeos está inibida no flagelado intacto.

A incorporação de metil (H³)-timidina na fração ácido insolúvel dos simbiotes foi linear até 45 minutos, demonstrando que o simbiote isolado sintetiza DNA. Este resultado sugere a presença de uma via alternativa de síntese de DNA e a dependência de timidina quinase nesta via .

A integridade do DNA do simbiote isolado foi analisada em eletroforese de gel de agarose. Este comigra com o DNA de E.coli em uma simples banda, cujo o peso molecular está acima do marcador de massa molecular 23 Kb. O DNA do simbiote foi digerido com enzimas de restrição Mbo I, obtendo-se fragmentos de 2,3-1 Kb que foram clonados em plasmídeo pUC 13 .

O banco construído em pUC 13 com DNA do simbiote de *Crithidia deanei* é representativo. Os Clones contendo sequências específicas de endosimbiontes foram isolados por hibridização diferencial.

6.0-SUMMARY

The method described here allows the isolation intact symbionts in sufficient amounts for biochemical studies. The flagellates are disrupted by sonication and the symbionts separated from unbroken cells and cellular debris by centrifugation through a discontinuous Percoll gradient. The isolated symbionts retain their characteristic morphological features and were reasonably free of subcellular debris.

Ornithine carbaomoyltransferase (OCT) a symbiont enzymatic marker is present in the symbiont fraction with a specific activity 3 fold higher than in crude homogenates. We estimate that about 20 % of symbionts present in the homogenate are recovered in this fraction.

The isolated symbionts actively incorporate L-³(4-5-H)-leucine and L-³⁵(S)methionine into acid-insoluble material for the first 45 and 60min, respectively. In order to characterize the protein-synthesis machinery operanting in the symbionts, have studied the effects of chloramphenicol and rifampicin on the incorporation of leucine into proteins. Chloramphenicol and rifampicin at 20 ug/ml reduce the incorporation by about 70 and 50 %, respectively. Both antibiotics at 50 μ g/ml almost completely inhibited the incorporation L-³(4-5-H) leucine. The inhibition of protein synthesis by chloramphenicol and rifampicin provides

direct evidence for the existence of a prokaryotic protein-synthesizing system in this unusual subcellular structure.

The labeled polypeptides synthesized by the isolated endosymbionts range between 200,000-18,000, as determined by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. The most heavily-labeled polypeptides are those with apparent molecular weight of 90, 88, 78, 60 and 58 x 10³. The profile of symbiont labeled polypeptides differs from that obtained with the symbiont strain C. deanei. Several symbiont polypeptides are absent or poorly represented in the flagellate, for example, the 88, 78, 60, and 58 kDa polypeptides, suggesting that synthesis of these polypeptides is inhibited in the intact flagellate.

The incorporation methyl-(³H)thymidine into acid insoluble symbiont fraction was linear up to 45min showing that isolated symbionts can synthesize DNA. This result suggests the presence in the symbionts of a thymidine kinase dependent salvage pathway for DNA synthesis.

The integrity of the DNA extracted from isolated symbiont was analysed by agarose gel electrophoresis. It comigrates with intact E. coli DNA as a single heavy band. The symbiont DNA has been purified and fragmented with restriction endonuclease Mbo I. The fragments (2,3-1,0 Kb) have been incorporated in vitro into pUC 13 to make libraries which most of the endosymbiont DNA is represented. Specific endosymbiont sequences can be isolated in this library by differential screening.

7.0.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALFIERI,S.and CAMARGO,E.P. Trypanosomatidae :isoleucine require-
ment and threonine deaminase in species with and without endosym-
bionts. Exptl.Parasitol. 53: 371-380, 1982 .

BEATTIE,D.S. Studies on the biogenesis of mitochondrial protein
component in rat liver slices. J.Biol.Chem. 243:4027-4033, 1968

BROSIUS,J.M.;PALMER,M.L.;KENNEDY,P.J. and NOLLER,H.F. Complete
nucleotide sequence of a 16 S ribossomal RNA gene Escherichia
coli. Proc. Natl. Acad. Sci..U.S.A. 75: 4801-4805, 1978 .

BUSS,W.C.and KUN,E. Effects of rifampicin on RNA and protein
synthesis in isolated rat liver mitochondria. Biochem.Pharmac.
27: 2139-2145, 1978 .

CAMARGO,E.P. Growth and differation in trypanosoma cruzi
I.Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst.
Med. Trop. São Paulo. 6 : 93-100, 1964 .

CAMARGO, E.P. and FREYMULLER, E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbomoyltransferase in trypanosomatid. Nature (London) 270: 52-53, 1977.

CAMARGO, E.P. Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos : significado fisiológico e valor taxonômico. São Paulo 1979. p.158 . Tese de Livre Docência , Universidade de São Paulo.

CARVALHO, A.L.M. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em Zelus leucogrammus (Perty, 1934) (Hemiptera, Reduviidae) Rev. Patol. Trop. 2: 223-274, 1973 .

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryotes with no mitochondria. Nature (London). 326: 332-333. 1987

CAVALIER-SMITH, T. and LEE, J.J. Protozoa as hosts for endosymbioses and the conversion of symbionts into organelles. J. Protozool. 32 (3): 367-379, 1985

CHANG, K.P. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated Blastocrithidia culicis and Crithidia oncolpelti. J. Protozool. 21:699-707, 1974.

CHANG, K.P.; CHANG, J.C.; TUAN, R.S. and SASSA, S. Ultrastructure and heme biosynthesis of symbiotic bacteria in two species of haemoflagellates. Proc. Int. Cong. Parasit. 1 : 26-27, 1974.

CHANG, K.P. Reduced growth of Blastocrithidia culicis and Crithidia oncolpelti freed of intracellular symbiont by chloramphenicol. J. Protozool. 22 : 271-276, 1975 .

CLARKE, L. and CARBON, J. A colony bank containing synthetic Col E 1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell. 9 : 91-99, 1976.

CORREA, L.H.S. Isolamento e caracterização de ácido ribonucléico total de tripanosomatídeos. Brasília. 1976. p 80. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília.

DOFLEIN, F. Die protozoen als parasiten und Krankheitserreger nach biologischen Gesichtspunkten dargestellt. G. Fisher, Jena. In : Levine et al (1980). 1901

FIGUEIREDO, E.N.; YOSHIDA, N.; ROITMAN, C. and CAMARGO, E.P. Enzyme of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus Crithidia. J. Protozool. 25 : 546-549, 1978 .

FREYMULLER, E. and CAMARGO, E.P. Ultrastructural difference between species of trypanosomatids with and endosymbiotes. J. Protozool 25 : 175-182, 1981.

GALINARI, S. and CAMARGO, E.P. Trypanosomatid Protozoa : survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. Exptl. Parasitol. 46 : 277-282, 1978.

GALINARI, S. and CAMARGO, E.P. Urea cycle enzymes in wild and aposymbiotic strains of Blastocrithidia culicis. J. Parasitol. 65-88, 1979..

GRAY, M.W. and DOOLITTLE, W.F. Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microb. Rev. 46 (1): 1-42, 1982.

GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 72 : 3961, 1975.

HANH, F.E. Chloramphenicol, in Gottlieb, D. and Shaw, P.D. eds., N.Y. 1308-1330, 1967.

HONIGBERG, B.M.; BALAMUTH, W.; BOUEE, E. C.; CORLISS, J. O.; GOJDICS, M.; HALL, R.P.; KUDO, R.R.; LEVINE, N.D.; LOEBLICH, A.R. JR.; WEISER, J. and

WENRICH, D. H.. A revised classification of the phylum protozoa
J. Protozool. 11 :7-20, 1964 .

ISHIKAWA, H. DNA, RNA and protein synthesis in the isolated
symbionts from pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Insect Biochem.
Physiol. 12 (6): 605-612, 1982.

ISHIKAWA, H. Isolation of the intracellular symbionts and partial
characterizations of their RNA species the elder Aphid
Comp. Biochem .Physiol. 72 (B): 239-247, 1982

KESSLER, S.W. Rapid isolation of antigens from cells with
Staphylococcal protein A antibody absorbent: parameters of
the interaction of antibody antigen complex with protein A.
J. Immunol. 115: 1617-1624, 1975 .

KUNTZEL, H. Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes
from *Neurospora crassa*. Nature (London). 222: 142-146, 1969.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head bacteriophage T4. Nature(London). 227:680-685, . 1970 .

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein
measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-
275, 1951.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J. Molecular cloning - a laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 468, 1982 .

MARGULIS, L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelle : criteria for proof. Symp .Soc .Exptl .Biol. 29: 21-38, 1975

MARMUR, J. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. J.Mol.Biol. 3: 208-218, 1961 .

MARMUR, J.; SCHILDKRAUT, C. L.; MANDEL, M.; LEVISOHN, S.; SMITH-SONNERBORN J. E.; MARMUR, J. Desoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of some protozoa. Nature (London). 24: 795-796, 1962

MARMUR, J. ; CAHOON, N. M. E. ; SHIMURA , Y. and VOGEL, H. J. Endosymbiont in the protozoan Crithidia (Strigomonas oncolpelti). Nature (London). 197: 1228-1229, 1963 .

MESSING, J., CREA, R. and SPEBURG, P. H. A system for shotgun DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 9 : 309, 1981.

MUNDIN, M. H.; ROITMAN, I.; HERMANS, M. A. and KITAJIMA, E. W. Simple nutrition of Crithidia deanei a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. J. Protozool. 21: 518-521, 1974.

MUNDIN, M.H. and ROITMAN, I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic Crithidia deanei, J. Protozool. 24: 329-331, 1977

McGHEE, R.B. and COSGROVE, W.B. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. Microb. Rev. 44: 140-173, 1980.

NAKAMURA, M. and JONES, M.E. Ornithine carbamoyltransferase (Streptococcus faecalis). In Methods in Enzymology. 17 (A): 286-294, 1970 .

NEWTON, B.A. and HORNE, R.W. Intracellular structure in Strigomonas oncolpelti .1. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein. Experimental Cell Research. 13 : 563-574, 1957 .

NOVY, F.G; McNEAL, W.J. and TORREY, H.H. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. J. Journal of Infectious Diseases . 233-276, 1901 .

RAAF, R.A. and MALHER, R.H. The nonsymbiotic origin of mitochondria. Science. 177 : 575-582, 1972.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212, 1963.

RIGBY, P.W.J.; DIEKMANN, M.; RHODES, C. and BERG, P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J.Mol. Biol. 113: 237, 1977.

ROITMAN, C.; ROITMAN, I. and AZEVEDO, H.P. Growth of an insect trypanosomatid at 37 C in a defined medium. J. Protozool. 19: 346-349, 1972 .

ROITMAN, I. and CAMARGO, E.P. Endosymbionts of trypanosomatidae. Parasitology Today. 1: 143-144, 1985 .

SPENCER, R. and CROSS, G.A.M. Purification and properties of nucleic acids from an unusual cytoplasmic organelle in the flagellate protozoa Crithidia oncolpelti. Biochim. Biophys. Acta. 390: 141-154, 1975 .

YUAN, R.S. and CHANG, K.P. Isolation of intracellular symbionts by immune lysis of flagellate protozoa and characterization of their DNA. J. Cell Biol. 65:309-323, 1975.

VIEIRA, J. and MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 19:259-268, 1982.

WOESE, C.R. ; FOX, G.E. ; ZABLEN, L. ; UCHIDA, T. ; BONEN, L. ; PECHMAN, K. LEWIS, B.J. ; STAHL, D. Conservation of primary structure in 16 S ribosomal RNA. Nature (London). 254 :83-85, 1975.

WEISS, B. and RICHARDSON, C.C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. III. An enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. J.Biol.Chem. 242:427, 1967.

ZINGALES, B. and COLLI, W. Identification of trypanosomatid surface antigens with a protein A-bearing Staphylococcus aureus as an immunoadsorbent. In Genes and antigens of parasites - a laboratory manual (Morel, C.M., ed.). Fundação Oswaldo Cruz. 347-355, 1984.