

Estudo da função do gene Dimp de *Schistosoma mansonii* através da técnica de Complementação fenotípica em levedura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof.^a Élide Mara Leita Rabelo

Co-orientador: Prof. Carlos Renato Machado

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui, e por me capacitar a cada dia, para cada experiência, agradável ou não.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, e a todos os professores, por tudo o que me ensinaram e por toda a ajuda durante este período.

À professora Élide, por todo o apoio, dedicação, ensinamento, incentivo e principalmente pela paciência que tem dedicado a mim em todos esses anos, muito obrigada.

Ao professor Carlos Renato, por me co-orientar e me ensinar tanto.

Aos funcionários do departamento de Parasitologia, especialmente a Sumara Aparecida Ferreira, por sua dedicação, atenção, e carinho, que foram tão importantes para mim.

À minha família, pelo apoio, especialmente ao meu marido Roberto, por sempre ter paciência e carinho pra me ouvir e pelos abraços de consolo, sempre que eles foram necessários.

À minha mãe, que sempre foi tão necessária para a minha vida, por sempre me fazer sentir importante, mesmo nas coisas mais simples, por sempre estar presente dentro do meu coração, mesmo depois de ter ido embora. Se ela estivesse aqui, estaria muito orgulhosa.

Ao meu tio Robson (Ti Binho). Apesar de não sermos mais amigos, ele sempre foi uma pessoa importante na minha vida, que me incentivou, inclusive financeiramente. Sei que sem o apoio dele, eu jamais teria chegado à Universidade. Obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia molecular, Ana Flávia, Camila, Carina, Denílson, Erlison, Emanuelle, Helen, Júlia, Karina e Sílvia, pelo apoio, pela ajuda sempre que ela foi necessária e pela companhia.

À Carina que me ajudou muito neste projeto, especialmente nas análises “in silico”.

Aos colegas da turma de mestrado, que tornaram os dias mais felizes: Carlos, Denílson, Diana, Diogo, Eduardo, Helen, Jaílza, Luciana, Paula e Rízia.
Aos colegas de departamento, por fazer as horas de almoço mais agradáveis.

À minha turma de graduação, onde tudo começou, em especial ao Erick, Carolina, Guilherme, Ana, e Ericson, sem eles eu provavelmente teria desistido no início, e à Érika, Cristina, Tatiana e Henry, que fizeram do curso uma festa.

Ao Laboratório de Genética Bioquímica do ICB/UFMG, especialmente à Neuza, Camila e ao João Pedro, por toda a ajuda.

Ao Joãozinho, pela ajuda e pelas palavras amigas.

Ao professor Carlos Rosa por me ajudar a identificar esporos de levedura, e pela atenção sempre que eu precisei de ajuda.

Ao professor José Miguel Ortega, por abrir as portas de seu laboratório e pela atenção quando foram necessários.

“Todo dia o sol levanta

E a gente canta

ao sol de todo dia.

Fim da tarde a terra cora

E a gente chora

porque finda a tarde

Quando a noite a lua mansa

E a gente dança

venerando a noite.”

Autor desconhecido

RESUMO

Palavras-chave: Schistosoma mansoni, levedura, SmDimp, Dib1, complementação fenotípica, nocaute.

A esquistossomose é uma doença que afeta 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos esforços para controlar esta doença através do desenvolvimento de novos medicamentos ou vacinas, até o momento o número de pessoas afetadas permanece quase inalterado. A fim de melhorar o conhecimento sobre a biologia e aspectos relacionados com o desenvolvimento do parasito, ciclo de vida e de reprodução, o que poderia conduzir à concepção de novas drogas e / ou vacinas, projetos genoma têm sido desenvolvidos para este parasito. Um grande número de genes têm sido descobertos e na era pós-genômica, alguns genes têm sido escolhidos para ser melhor caracterizado. Um gene de *S. mansoni* envolvido no ciclo celular e apresentando homologia com genes de outras espécies, incluindo seres humanos, foi selecionado para ser melhor caracterizado. Este gene em *Saccharomyces cerevisiae* está envolvido no processo de interação com o complexo do spliceosoma. A técnica de complementação fenotípica foi escolhida para determinar se o gene de *S. mansoni* apresenta a mesma função que o gene de *S. cerevisiae*. Já foi demonstrado que a supressão deste gene é letal na levedura, por isso, decidiu-se utilizar leveduras diplóides neste trabalho. A supressão do gene nas leveduras foi realizada pela ruptura de um dos alelos através de um evento de recombinação homóloga do gene Dib1, utilizando gene marcador autoxotópico HIS3. Os mutantes foram selecionados em placas contendo os nutrientes necessários exceto histidina. Para identificar o nocaute, os clones obtidos foram analisados por PCR de colônia usando iniciadores específicos. Leveduras nocauteadas para o Dib1 e transfectadas com os plasmídeos contendo o gene Dib1 da levedura (controles positivos), e o Dimp do *S. mansoni*, foram utilizados para ensaios de esporulação, para verificar se o gene de *S. mansoni* complementa a

função gênica do seu ortólogo em *S. cerevisiae*. Após experimento de nocaute, 111 clones de leveduras foram obtidas, 45 destas colônias foram testadas por PCR, e destas 6 foram identificados como nocauteadas. Uma destas colônias, então, foi usada para ser transfectada com os plasmídeos construídos. Nenhuma esporulação foi observada em qualquer um dos plasmídeos recombinantes (Dib1 de levedura e Dimp de *S. mansoni*), sugerindo que a super expressão dos genes bloqueou a esporulação da levedura. O fato das levedura não esporularem quando se utiliza ambos os genes, SmDimp e Dib1 da levedura, pode indicar que eles exerçam função semelhante, nos respectivos organismos. No entanto, novos experimentos precisam ser realizados para esclarecer definitivamente esta questão. Assim, os genes devem ser clonados em plasmídeos com promotores de expressão basal. Desta forma, Espera-se que a esporulação ocorra em níveis basais tornando possível confirmar se o gene SmDimp de *S. mansoni* pode complementar a função de seu ortólogo na levedura.

ABSTRACT

Keywords: Schistosoma mansoni, yeast, SmDimp, Dib1, phenotypic complementation, knockout

The Schistosomiasis is a disease that affects 200 million people in the world. Despite efforts aiming in controlling this disease, by developing new drugs or vaccines, until the moment the number of affected people remains almost unchanged. In order to improve the knowledge about the biology and aspects related with the parasite development, life cycle and reproduction, which could lead to the design of new drugs and/or vaccines, genome projects have been developed to this parasite. A great number of genes have been discovered in this way and in the post-genome era some genes have been chosen to be better characterized. A *S. mansoni* gene involved in cell cycle and presenting homology to genes from others species, including humans, was selected to be best characterized. This gene in *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the splicing process interacting with the spliceosome complex. The phenotypic complementation technique was chosen to establish whether the *S. mansoni* gene presents the same function as the one in *S. cerevisiae*. It has been previously shown that deletion of this gene is lethal in *S. cerevisiae*, therefore, it was decided to use diploids yeast cells in this work. Gene deletion in yeast was performed by disruption of one of the *Dib1* gene copies through a homologous recombination event, using the *HIS3* auxotrophic marker gene cloned into *pDIS* plasmid. Disrupted mutants were selected on plates containing the required nutrients except histidine. To identify the knock outs the obtained clones were analyzed by PCR colony using specific primers. Plasmids with galactose promoter were used to clone the yeast *Dib1* and the *S. mansoni* *Dimp* genes and used to transfect the knock out yeast. Transfected cells were plated in medium without uracil, as it is the marker present on the plasmid. Yeast knock out to *Dib1* transfected with plasmids

containing yeast Dib1 (positive controls), and *S. mansoni* Dimp, were used to sporulation assays, to verify if the *S. mansoni* gene complement the orthologue gene function in *S. cerevisiae*. After the knock out experiment, 111 yeast clones were obtained, 45 of them were tested by colony PCR, and 6 knock outs were identified. One of them was used to be transfected with the plasmids constructions.

No sporulation was observed to any of the constructs (yeast Dib1 and *S. mansoni* Dimp), suggesting that the genes over expression blocked the yeast sporulation. The fact that the yeast cells failed to sporulate, when using both genes, the SmDimp and the yeast Dib1, can indicates the similarity in function to both genes. However, further experiments need to be done to definitely clarify this issue. Therefore, both genes need to be cloned in plasmids with basal expression promoters. It is expected that sporulation will occur with a weaker promoter, making it possible to confirm if the *S. mansoni* SmDimp gene can phenotypic complement the function of its orthologous in yeast.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	17
Figura 2: Esquema da recombinação heteróloga	29
Figura 3: Seleção de esporos complementados	30
Figura 4: Prováveis produtos da digestão do plasmídeo pYEDP contendo os genes SmDib e Dib1 com a enzima BamHI	46
Figura 5: Mapa do vetor pUC18 contendo os sítios para enzimas de restrição	47
Figura 6: Mapa do vetor pYEDP	48
Figura 7: Mapa esquemático do vetor pGEM-T Easy	51
Figura 8: Mapa esquemático do vetor pYEPLAC195	53
Figura 9: proteína obtida a partir da tradução do gene SmDimp	60
Figura 10: Modelagem da proteína SmDimp	61
Figura 11: Alinhamento do SmDimp com a estrutura cristalizada do complexo binário snRNP	61
Figura 12: Árvore filogenética	63
Figura 13: Amplificação do DNA genômico com os iniciadores para o gene SmDimp	64
Figura 14: Amplificação do gene His3	65
Figura 15: PCR de colônia das leveduras nocauteadas	66
Figura 16: PCR de colônia usando os iniciadores Dib-ext direto + histidina reverse	66
Figura 17 A: Confirmação de nocaute por PCR usando DNAs genômicos	68
Figura 17 B: Resultados esperados a partir da amplificação do DNA extraído das leveduras nocaute, para cada par de iniciadores utilizado.....	69
Figura 18: Clonagem dos genes em pUC18	71
Figura 19: Digestão do pYEDP por SmaI	71
Figura 20: Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em pYEDP	72
Figura 21: Digestão do pYEDP por BamHI para verificação da orientação correta	72
Figura 22: Mini-preps de SmDimp e Dib1 clonados em pGEM-T Easy	73
Figura 23: Esporos obtidos em leveduras transformadas por plasmídeos vazios	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas ampliações	33
Tabela 2: Enzimas utilizadas neste trabalho	35
Tabela 3: Dosagem do DNA em nanodrop	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Linhagens de leveduras haplóides	31
Quadro 2: Alinhamento do SmDimp com a proteína Dim1 de <i>S. japonicum</i> obtido por Blast-x	59
Quadro3: Alinhamento entre as proteínas Dib1 e SmDimp	59
Quadro 4: ORF da proteína Dim1 de <i>S.mansoni</i>	60

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Ciclo Biológico	15
1.2. O genoma do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
1.3. O gene SmDimp	19
1.4. Estudo de nocaute em levedura.....	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
4. METODOLOGIA	25
4.1. Caracterização molecular do gene SmDimp e da proteína que ele codifica através de análises “in silico”.....	25
4.1.1. Amplificação e sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1.....	25
4.1.2. Modelagem computacional da proteína SmDimp	26
4.1.3. Análises de homologia e construção de árvore filogenética	27
4.2. Complementação fenotípica	28
4.2.1. Delineamento experimental	28
4.2.2. A levedura	31
4.2.3. Amplificações de genes utilizando iniciadores específicos	31
4.2.4. Digestão com enzimas de restrição	34
4.2.5. Amplificação do gene His3	35
4.2.6. Manipulação genética da levedura	36
4.2.7. Preparação das placas para crescimento das leveduras transformadas	37
4.2.8. PCR para confirmação de nocaute	37
4.2.9. Extração do DNA total de levedura	38
4.2.10. Amplificação dos genes SmDimp de <i>S. mansoni</i> e Dib1 de <i>S. Cerevisiae</i>	40
4.2.11. Clonagens	41
4.2.12. Clonagem do gene Dib1 em vetor pUC 18	42
4.2.13. Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em vetor pYEDP	44
4.2.14. Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em vetor pGEM-T Easy (Promega)	49
4.2.15. Clonagem do gene SmDimp no vetor pYTS	52
4.2.16. Mini preparação de plasmídeos (Mini-prep)	54
4.2.17. Sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1	54
4.2.18. Transformação da levedura nocaute com os plasmídeos recombinantes para os genes Dib1 e SmDimp e vazios	55
4.2.19. Indução à esporulação das leveduras nocautes transformadas com os plasmídeos recombinantes e vazios	56

5. RESULTADOS	58
5.1 - Modelagem computacional da proteína SmDimp.....	58
5.2 – Análises de homologia e construção da árvore filogenética	62
5.3 - Amplificação do cDNA e DNA genômico de <i>S. mansoni</i> usando os iniciadores DimpU/L	63
5.4 - Amplificação do gene His3 e manipulação genética da levedura	64
5.5 – PCR de colônia.....	65
5.6 – Extração de DNA da levedura	67
5.7 – Amplificação dos genes SmDimp e Dib1 e clonagem nos vetores	69
5.8 - Sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1	73
5.9 - Transformação da levedura nocauteadas com o plasmídeo pYEDP recombinante para os genes Dib1 e SmDimp e vazios	74
5.10 - Transformação da levedura nocauteadas com o plasmídeo pYTS recombinante para os genes SmDimp e vazios	74
5.11 - Indução à esporulação das leveduras nocauteadas e transformadas com os Plasmídeos recombinantes e vazios	75
6. DISCUSSÃO	78
6.1 – Estudos computacionais sobre a proteína SmDimp	78
6.2. Complementação fenotípica em leveduras	80
7. CONCLUSÃO	87
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	88
9. BIBLIOGRAFIA	89
10. ANEXOS	96

1 - INTRODUÇÃO

As esquistossomoses são doenças causadas por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, que para o homem, têm como principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (Rey, 2001). Outras espécies também são capazes de infectar o homem, sendo elas: *Schistosoma mekongi*, e *Schistosoma Intercalatum*. A infecção causada por *S. haematobium* é associada à fibrose e calcificação do trato urinário (McManus & Loukas, 2008).. Enquanto as outras espécies estão associadas a quadros patológicos de hepatite crônica e fibrose intestinal, além de outras complicações decorrentes desses sintomas. A esquistossomose mansoni é causada pelo parasito *S. mansoni* e decorre basicamente da resposta inflamatória granulomatosa em torno dos ovos vivos do parasito (Neves et al., 2002).

O parasito foi descrito por Bilhartz em 1852. A denominação atual da espécie *Schistosoma mansoni* foi dada por Sambon em 1907 e o ciclo de vida do parasito foi descrito por Lutz, no Brasil e por Leiper, no Egito (Neves et al., 2002). Essa mesma espécie teve sua presença confirmada no Brasil através da descrição de quatro casos, sendo que o primeiro deles foi registrado por Pirajá da Silva na Bahia, em 1908 (Coura & Amaral, 2004).

As espécies do gênero *Schistosoma* foram introduzidas nas Américas durante o tráfico de escravos e com imigrantes orientais. Entre estes foram detectados indivíduos parasitados pelo *S. japonicum* e *S. hematobium*. Apenas o *S. mansoni* fixou-se no continente, graças ao encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais favoráveis (Després et al., 1993).

Depois da malária, a esquistossomose é a segunda doença tropical mais importante na área de saúde pública, causando 14 mil mortes anuais. Apesar do progresso no controle, a doença permanece endêmica em 74 países em desenvolvimento estando presente em áreas rurais e urbanas. Estima-se que a população em risco de infecção seja entre 500-600 milhões em todo o mundo. O número de pessoas infectadas é de 200 milhões, sendo que destas, 120 milhões

são sintomáticas e 20 milhões sofrem as conseqüências graves da doença. Cerca de 80% de todas as pessoas infectadas com esquistossomose vivem em áreas de subdesenvolvimento na África (<http://www.who.int/tdr/dw/schisto2004.htm>).

O Brasil se constitui em um dos maiores países endêmicos para a esquistossomose mansoni em todo o globo. Essa endemia é determinada principalmente pela distribuição do hospedeiro intermediário, caramujos aquáticos pulmonados do gênero *Biomphalaria*. Novos focos da doença surgem principalmente em locais onde foram realizados projetos manejo de água, seguido de um aumento na concentração de pessoas nestas áreas (Stelma et al., 1993).

No Brasil, a estratégia de controle da doença atualmente tem sido o tratamento dos grupos de alto risco, buscando reduzir a prevalência da forma hepato-esplênica da esquistossomose intestinal (Barbosa e Coimbra,1992; Magnussen,2003). O tratamento individual ou em massa da população mostra-se eficiente na redução da morbidade, mas não reduziu a prevalência devido aos casos de re-infecção (Coura & Amaral, 2004).

O controle ideal seria aquele que visa interromper o ciclo evolutivo do parasito, o que não é suficiente apenas com o tratamento das populações infectadas (Katz,1999). A rápida reinfecção após a cura através de quimioterapia tem atenuado a efetividade dos programas de controle baseados no tratamento com Praziquantel. Esta, em conjunção com uma alta taxa residual da prevalência e morbidade, tem impulsionado o desenvolvimento de uma vacina eficaz para as esquistossomoses (Solomon et al., 2004). Acredita-se atualmente que o caminho para o controle da esquistossomose seria a associação de medidas de quimioterapia e vacina (Oliveira et al., 2008), Além de projeto de saneamento básico e distribuição de água tratada à população em áreas endêmicas.

Estudos realizados por diferentes grupos levaram à escolha de alguns antígenos considerados pela organização mundial da saúde como os mais promissores quando a meta é a obtenção da vacina (Katz,1999). No entanto, há discordância nos dados observados em diferentes experimentos feitos pelos mesmos autores, (Katz, 1999), demonstrando a necessidade de se encontrar novos

antígenos candidatos a vacinas, e novos alvos para drogas que apresentem respostas mais eficazes.

1.1 - Ciclo Biológico

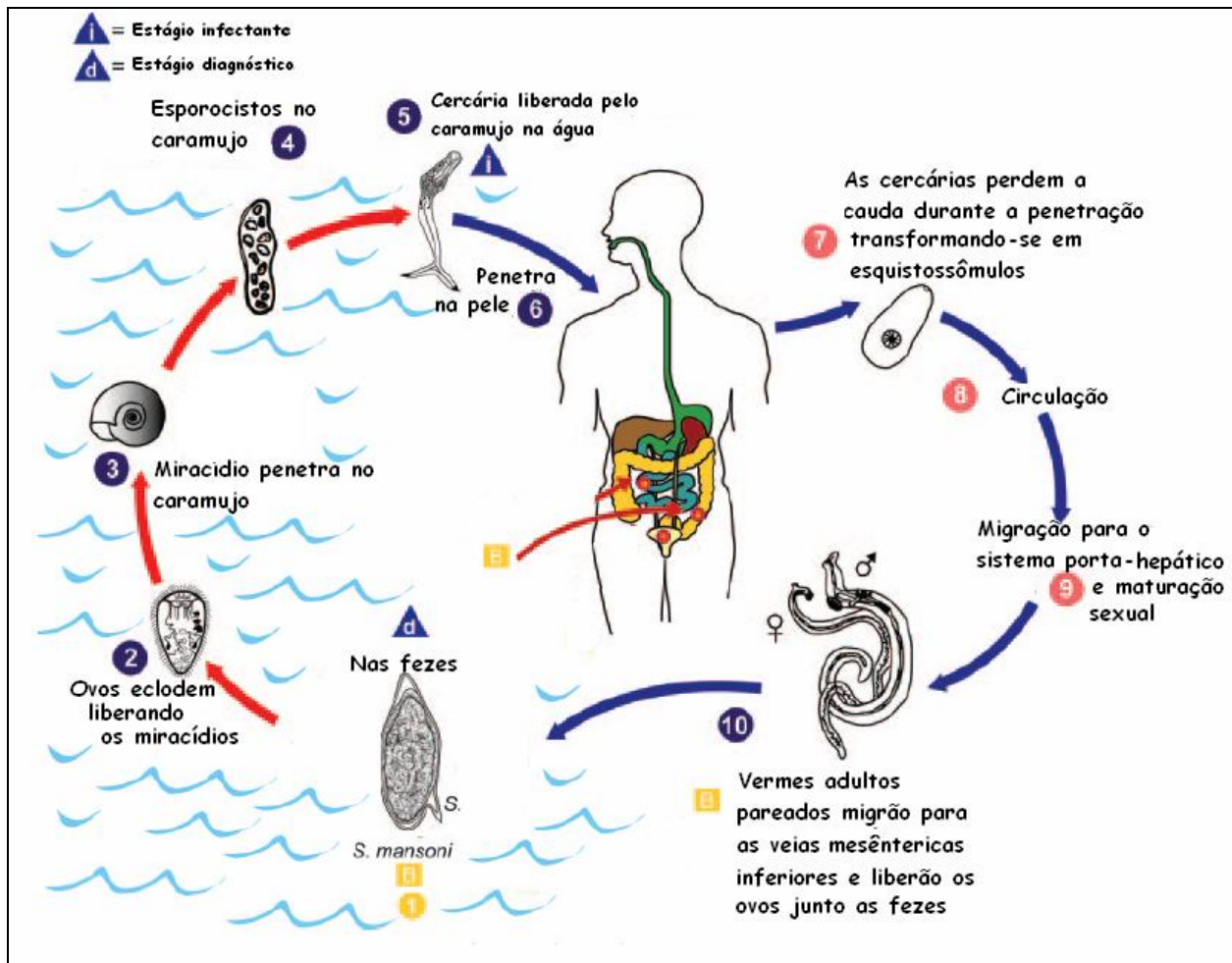
O ciclo do *Schistosoma mansoni* é complexo, uma vez que enfrenta tipos de ambientes radicalmente diferentes, necessitando de adaptações específicas para cada um destes ambientes. O ciclo de vida do *S. mansoni* (Figura 1) caracteriza-se pela presença de alternância de fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem, e fase assexuada no hospedeiro invertebrado. Os vermes adultos são dióicos, apresentam corpo cilíndrico medindo de 7 a 20 mm em comprimento possuem ventosas ou sugadores ventral e oral, além de um complexo tegumento com um intestino sem saída e órgãos reprodutores (Neves et al., 2002)

Os adultos vivem no sistema porta e veias mesentéricas do hospedeiro definitivo, como parte de um ciclo migratório que se inicia com a penetração das cercárias através da pele ou mucosas. As cercárias são liberadas pelos caramujos em meio aquático, penetram no hospedeiro através da pele utilizando um conjunto de enzimas proteolíticas que são produzidas na região da cabeça, perdem a cauda em seguida e tornam-se equistossômulos, que migram através do sistema sanguíneo atingindo o pulmão, e posteriormente o sistema porta-hepático, onde se alimentam e atingem a maturidade sexual, o que ocorre no espaço de quatro a seis semanas (Warren et al., 1967). Os vermes adultos vivem acasalados no plexo venoso mesentérico e portal e migram até as veias mesentéricas inferiores para oviposição. O tempo de vida dos parasitos pode ser de mais de 15 anos no hospedeiro.

O homem é o principal hospedeiro natural, embora haja relatos de infecção natural em pequenos mamíferos, mas sem importância para a manutenção do ciclo biológico do parasito (Kawazoe et al., 1978). Schwetz, em 1952, propôs que a infecção esquistossomótica em roedores seria anterior à humana, uma vez que a

infecção crônica nestes animais apresenta baixa patogenicidade (Bastos et al., 1978). Bovinos também podem ser infectados experimentalmente, eliminando ovos viáveis nas fezes, podendo ser potencialmente importantes na manutenção do ciclo do *S. mansoni* (Modena et al., 1993).

Os exemplares de *S. mansoni* adultos acasalam-se e migram em direção aos ramos das veias mesentéricas, onde, em torno do 35^o dia, as fêmeas iniciam a postura de cerca de 300 ou mais ovos a cada dia (Warren & Boros, 1975). Parte dos ovos fica retida no tecido do hospedeiro, levando à patologia da doença, que se deve principalmente à resposta do organismo aos antígenos dos ovos, que são isolados do corpo através de reações imuno-teciduals, formando os chamados granulomas (Warren et al., 1967). A outra parte dos ovos é liberada para o meio exterior junto com as fezes, e em presença de luz os miracídios são liberados e infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Durante o processo de penetração no caramujo, os miracídios descarregam o conteúdo das glândulas de penetração e liberam enzimas proteolíticas para penetrarem no caramujo, onde se estabelecem no tecido subcutâneo. Após a penetração no caramujo o miracídio passa por várias transformações, tornando-se esporocisto primário, secundário e terciário, e finalmente em cercárias, que abandonam o esporocisto II pelo poro de nascimento. Essas migram através dos espaços intercelulares do caramujo, sendo liberadas para o meio externo pela formação de vesículas no epitélio do manto e pseudobrânquias, fechando o ciclo. Os esporocistos terciários são formados a partir de células embrionárias presentes nos esporocistos secundários e seriam os responsáveis pela eliminação prolongada de cercárias pelos caramujos infectados (Neves, et al. 2002).



<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Schistosomiasis.htm>

Figura. 1 -Ciclo biológico do S. mansoni: 1 – penetração das cercárias; 2 – migração do esquistossômulo;; 3 – casal adulto acasalados nas veias mesentéricas e sistema porta hepático; 4 – início da postura. Ovos eliminados com as fezes do hospedeiro alcançam a água; 5 – eclosão dos miracídeos; 6 – penetração dos miracídeos no caramujo; 7 – esporocistos primários e secundários. Formação das cercárias. 8 – liberação das cercárias na água.

1.2. Genoma do *S. mansoni*.

O *Schistosoma mansoni* possui um genoma haplóide de 270 Mb apresentando 34% de conteúdo G+C. Estima-se que o genoma do *S. mansoni* contenha entre 15000 e 25000 genes (Franco et.al., 2000; Loverde et al., 2004), distribuídos em 8 pares de cromossomos. A fêmea é heterogamética, possuindo o par de cromossomos ZW, e o macho possui o par ZZ. O *S. mansoni* encontra-se entre os primeiros animais que desenvolveram dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heterogaméticos (Verjovski-Almeida et al., 2003).

Nas últimas décadas, muitos organismos tiveram o seu genoma completamente seqüenciado, graças à emergência e aos avanços nos projetos genoma (Franco et al., 2000). Os projetos iniciais de seqüenciamento do *Schistosoma* foram parcialmente financiado pela organização mundial da saúde a fim de se encontrar novos alvos para o desenvolvimento de drogas, vacinas e diagnóstico de esquistossomose a partir da descoberta de genes adequados pelo seqüenciamento genômico e por análises funcionais deste genoma (Loverde et al, 2004). No início deste projeto genoma do *Schistosoma*, existiam pouco mais de 200 seqüências de DNA de todas as espécies de *Schistosoma* depositadas nos bancos de dados (Franco et al., 1995). Através dos projetos genômicos realizados desde então, este número aumentou, e atualmente mais de 205.000 seqüências de etiquetas transcritas (ESTs) encontram-se disponíveis para consulta (Gentile & Oliveira, 2008; Verjovski-Almeida et al., 2003). A motivação original para o estudo de diferentes transcriptomas usando a técnica de EST (Expressed Sequence Tag) foi a possibilidade do descobrimento de novos genes e a geração de informação que apontaria a presença de um gene em determinada espécie sem a necessidade de se obter a seqüência genômica completa. (Adams et al., 1991). Assim, após análise das seqüências de ESTs obtidas até o momento para o *S. mansoni*, foi possível classificar algumas delas tanto molecularmente quanto funcionalmente. Alguns aspectos interessantes foram observados, como a presença de transportadores de glicose, proteínas envolvidas na captura de aminoácidos e lipídios e proteínas

envolvidas na estocagem de lipídios. A identificação das vias metabólicas nas quais os genes estão envolvidos irá auxiliar no entendimento do seu processo metabólico, além de contribuir na identificação de possíveis alvos para drogas (Fairlamb, 2002; Oliveira, 2007). Vários estudos pós-genômicos, que visam esse objetivo já determinaram a estrutura de genes de *S. mansoni*. Eles contêm poucos ou nenhum íntron, com tamanhos que variam entre 30 nucleotídeos até vários Kilobases. Elementos promotores (TATA box, CAAT box etc.), sítios doadores e aceptores de “splicing” e sinais de poliadenilação também estão presentes nos genes já estudados. Já foram identificados vários genes sexo específico (LoVerde, 2002; Waisberg *et al.*, 2008; Waisberg *et al.*, 2007) além de genes envolvidos na diferenciação sexual como os genes Fox-1, mog-1, tra-2 e fem-1 (Verjovski-Almeida *et al.*, 2003).

1.3 – O gene SmDimp

No contexto do projeto de descoberta gênica em *Schistosoma mansoni*, vários genes novos, mas apresentando homologia com outros organismos, foram clonados (Franco *et al.*, 1995, Meira *et al.*, 1998; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003). Entre estes, está o gene SmDimp, o qual foi isolado a partir de uma biblioteca de verme adulto de *Schistosoma mansoni* e originalmente denominado SMV0452. Através de pesquisa em bancos de dados, foi demonstrado que este gene apresenta alta homologia com o gene Dib1 de *Saccharomyces cerevisiae*, e com o gene humano hDim1.

O gene SmDimp faz parte da família Dim1, uma família de genes evolutivamente bem conservada, apresentando identidade maior que 65% entre 18 espécies, entre elas o homem, o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, o trematódeo *S. mansoni* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 1999). As proteínas da família Dim1 representam um ramo da superfamília tioredoxina. As

proteínas desta superfamília contribuem para o controle do ciclo celular (Zhang et al, 1999)

Este gene foi inicialmente isolado em *Schizosaccharomyces pombe*, e sua função foi relacionada à transição G2/M e progressão da mitose, uma vez que a mutação no gene leva a fenótipos como defeitos na separação das cromátides-irmãs, suscetibilidade a agentes desestabilizantes de microtúbulos além da perda de viabilidade na mitose (Berry & Gould, 1997).

Estudos posteriores identificaram proteínas Dib1p de *S. cerevisiae* como componentes do tri-snRNP U4/U6-U5, sugerindo que a função do gene está relacionada ao sistema de “splicing” do pré-mRNA, e sua importância para a progressão do ciclo celular seria indireta. Sabe-se que a deleção do gene Dib1 leva a levedura a um fenótipo de letalidade (Zhang et al, 2000).

Estudos de RNA de interferência em *C.elegans* mostraram que a perda do gene homólogo ao SmDimp neste organismo, leva à morte do embrião durante a gastrulação, acompanhada de defeito na expressão inicial dos transcritos zigóticos, indicando a importância deste gene na produção de mRNA em metazoários (Zhang et al, 2000).

1.4– Estudo de nocaute em levedura.

O sistema de complementação heteróloga é utilizado para verificar se proteínas de outros organismos estão envolvidas no mesmo processo biológico que as proteínas da levedura, determinando assim se elas possuem a mesma função. Para isto é necessário fazer a interrupção do gene alvo da levedura, transformar esta levedura com o cDNA codificador da proteína homóloga de interesse clonado em um vetor de expressão e, posteriormente verificar a reativação da função defectiva (Santos, 2004)

O caminho mais fácil para inativar um gene específico é fazer sua interrupção com um segmento de DNA exógeno. Um método para a deleção total de um gene

de interesse é através do método de disrupção mediada por PCR (Baudin et al., 1993). Neste método, uma PCR é realizada utilizando-se iniciadores contendo uma região idêntica à seqüência do gene de interesse e outra que amplifica o gene de prototrofia que funcionará como marcador (Brachmann et al, 1998). Assim, a substituição do gene por outro que servirá de marcador para as leveduras nocaute, permite sua seleção.

Em leveduras, uma região de homologia extensa não é essencial para a recombinação. O processo pode ser iniciado entre duas moléculas de DNA com uma seqüência comum pequena. Esta é chamada recombinação sítio-específica (Brown, 1999). Uma linhagem de levedura contendo um gene inativado pode ter seu fenótipo examinado para definir a função de um determinado gene em estudo. Uma vez identificada a função gênica associada a algum fenótipo específico, linhagens de leveduras nocaute podem ser utilizadas em trabalhos de complementariedade funcional. Se um determinado organismo possui um gene homólogo ao da levedura, ele pode ser introduzido na levedura nocaute para a verificação da complementação. Se a levedura reverter ao fenótipo selvagem, pode-se dizer que as duas proteínas apresentam a mesma função biológica (Santos, 2004).

Estudos de complementação fenotípica já foram realizados para genes de *Schistosoma*. Um exemplo é a caracterização do gene SmRhol, homólogo ao gene Rhol de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentou complementação positiva em um experimento de nocaute do gene da levedura. Este gene faz parte de uma família cujas atividades gênicas estão relacionadas ao controle de diversas atividades celulares, como reorganização de citoesqueleto, transporte nucleocitoplasmático e organização de microtúbulos (Santos et al., 2002). Outro gene de *S. mansoni* onde a complementação em leveduras ocorre, é o SmRbx, homólogo ao HRT1 da levedura e membro do complexo SCF(Skp1–Cul1–F-box), envolvido no processo de ubiquitinação, uma importante forma de modificação covalente de proteínas que regula vários processos biológicos (Santos et al., 2007).

Trabalhos usando complementação fenotípica também foram utilizados para caracterizar genes em outros parasitos. Metacaspase de *Leishmania major* (LmjMCA) apresentou complementação em *S. cerevisiae* mutante para o gene YCA

na indução de morte celular programada induzida por estresse oxidativo (Gonzales et al., 2007). Dois grupos de antígenos de proliferação do núcleo celular de taquizoíto de *Toxoplasma gondii*, tgPCNA1 e tgPCNA2, importantes para o metabolismo do DNA, mas expressos de maneira diferente dependendo do ciclo do parasito, foram utilizados em estudos de complementação fenotípica em levedura. O antígeno tgPCNA1 complementou a função, enquanto o tgPCNA2 não complementou a função do gene homólogo na levedura (Guerine et. Al, 2005). Através de complementação fenotípica, a função do gene pfmdr1 de *Plasmodium falciparum* foi melhor caracterizada. Este gene complementou a função do gene ste6 de levedura, o qual codifica uma proteína de membrana com papel de transporte, indicando que o gene do parasito também codifica uma proteína transportadora (Volkman et al., 1995).

2. JUSTIFICATIVA

O *Schistosoma mansoni* é responsável por uma das parasitoses humanas mais difundidas no mundo, atingindo principalmente os países tropicais, sendo o Brasil a maior área endêmica para a esquistossomose mansoni no mundo.

Este parasito tem o ciclo de vida bastante conhecido e cada fase evolutiva bem descrita. Diferentes genes estão envolvidos nos mecanismos de adaptação aos diferentes ambientes do ciclo de vida do parasito, incluindo mudanças fisiológicas e morfológicas que ocorrem em relação a estas adaptações.

Através do projeto genoma do *S. mansoni*, vários genes foram descritos, inclusive o Dimp, que tem homologia com o gene Dib1 de *Saccharomyces cerevisiae* e com genes de outros organismos, envolvidos do mecanismo de “Splicing”. O conhecimento da função de um gene em um determinado organismo pode ajudar a inferir sobre a possível função do gene homólogo em outra espécie. A similaridade entre os genes SmDimp e Dib1 da levedura é alta, mas não é perfeita não sendo possível assumir que a função dos genes seja a mesma, sendo necessários estudos que determinem esta função. Sendo assim, o gene SmDimp se apresenta como um candidato ideal para ser usado em estudos de complementação e recuperação de fenótipos, os quais indicarão a função do mesmo em *S. mansoni*, utilizando *S. cerevisiae* como modelo, através do nocaute do gene na levedura. Estudos de complementação fenotípica em leveduras se tornam uma ótima ferramenta para se inferir a função de um gene, uma vez que devido ao complexo ciclo de vida do *S. mansoni*, estudos de RNA interferente são difíceis de serem realizados.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Caracterizar molecularmente o gene SmDimp de *Schistosoma mansoni*, e inferir sua função através de complementação da função do seu homólogo na levedura *Saccharomyces* por verificação da complementação fenotípica.

3.2. Específicos

- Obter a seqüência completa para o gene SmDimo, e caracterizá-lo nos servidores disponíveis na internet (análise em silico);
 - Determinar a estrutura conformacional da proteína codificada pelo gene SmDimp através de modelagem estrutural comparativa;
 - Obter leveduras mutantes para o gene Dib1 através da substituição gênica usando o gene HIS3 como marcador.
 - Verificar se o gene SmDimp de *S.mansoni* complementa a função do seu homólogo na levedura, através da transformação das mesmas nocauteadas, com o gene SmDimp ou com o gene Dib1 da levedura como controle da complementação e observando os fenótipos obtidos nas leveduras haplóides, após a esporulação das diplóides.
 - Analisar a complementação fenotípica através do crescimento dos esporos de levedura em meio de cultura seletivo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Caracterização molecular do gene SmDimp e da proteína que ele codifica através de análises “in silico”

4.1.1 - Amplificação e sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1.

O cDNA de SmDimp foi identificado inicialmente através do sequenciamento aleatório de uma biblioteca de cDNA de verme adulto, clonada em vetor λ Zap e excisado para o vetor pBlueScript (Stratagene), para produção de etiquetas de seqüências transcritas ESTs. Durante o primeiro sequenciamento foram identificados aproximadamente 350 pb na região 5' do gene. Foi realizado o sequenciamento da fita complementar com o iniciador M13F obtendo se mais 186 nucleotídeos. Para o sequenciamento completo do cDNA de SmDimp, foram construídos pares de iniciadores específicos, um para a extremidade 5' do gene começando no ATG contendo sítio para a enzima de restrição EcoRI e um para a extremidade 3' do gene contendo sítio para a enzima Hind III (Tab.1). O cDNA foi amplificado com estes iniciadores, através da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) Para esta reação foram utilizados 0,2 μ M de cada iniciador (Tab.1), 200 μ M de cada dNTP, 2,5U de Taq DNA polimerase, tampão de reação (Tris-HCL 10mM pH 8,4, KCL 50mM, 0,1% Triton X-100, MgCl₂ 1,5mM).

O DNA genômico de *S. mansoni* e o cDNA clonado no vetor pBlueScript foram utilizados independentemente em experimentos de amplificação usando o par de iniciadores DimpL1/U1. O produto da amplificação do DNA genômico, foi corrido em gel de agarose 0.8% em paralelo com o produto de PCR do cDNA, para se observar a presença ou não de seqüências intrônicas.

Os iniciadores para o gene Dib1 foram desenhados tendo como base a sequência do gene de *S. cerevisiae* presente no banco de dados do NCBI (número de acesso AY558054) (Tab 1). Esses iniciadores deveriam amplificar um fragmento de 432 pares de bases. O gene da levedura foi amplificado através da reação de PCR para colônias da levedura conforme descrito no tópico 4.2.3.

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho encontram-se no tópico anexo.

4.1.2 - Modelagem computacional da proteína SmDimp.

A modelagem computacional da proteína SmDimp foi realizada utilizando-se o programa SwissModel, que faz a modelagem 3D automática de proteínas que possuem homologia com outras proteínas cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas e estejam depositadas no PDB (protein data bank) (www.expasy.ch/SwissModel.html). Vários outros programas para busca de homologia, domínios conservados e caracterização foram utilizados para auxiliar a modelagem molecular da proteína SmDimp. Estes programas estão listados abaixo.

- BLAST-N e BLAST-X, buscam homologias entre sequências de ácidos nucléicos e de aminoácidos, respectivamente (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).
- InterPro, programa que integra a busca nos programas PROSITE, Pfam, PRINTS e outros bancos de dados que procuram domínios e famílias protéicas.
- Motif Scan in a Protein Sequence, este programa encontra todos os motivos conhecidos que ocorrem em uma sequência protéica (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>).
- MULTALIN, alinhamento de várias sequências submetidas, indicando regiões conservadas e não conservadas (www.protein.toulouse.inra.fr/multalin.html).

- ORF, pesquisa de possíveis janelas abertas de leitura (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html).
- Pfam, pesquisa da presença de domínios protéicos conservados (<http://www.sanger.ac.uk/software/Pfam>)
- Psort, pesquisa de sinais de localização nuclear (www.psort.nbb.ac.jp).
- SMART análise da arquitetura de domínios conservados (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

4.1.3 – Análises de homologia e construção de árvore filogenética.

As análises de homologia entre o SmDimp e genes de outras 10 espécies foram feitas através do programa BLAST-P (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

A homologia entre as proteínas Dib1 de *S. cerevisiae* e SmDimp de *S. mansoni* foram analisadas através do programa BLAST.

A árvore filogenética foi construída entre as sequências que apresentaram homologia, através do programa MEGA 4.

4.2 – Complementação fenotípica.

4.2.1 - Delineamento experimental:

O experimento realizado para determinar se o SmDimp é capaz de complementar a função do gene homólogo em levedura, e assim inferir sobre a possível função deste gene em *S. mansoni*, foi a realização do nocaute do gene homólogo da levedura, com posterior transformação das mesmas utilizando o gene de *S. mansoni* e em um experimento paralelo (controle positivo do experimento), com o próprio gene da *S. cerevisiae*. Para isso, as seguintes etapas foram cumpridas:

1 - O nocaute do gene da levedura foi realizado pela introdução de um gene que codifica uma proteína da via de síntese do aminoácido histidina no lugar do gene Dib1. Para isso, foram desenhados iniciadores que amplificam o gene His3. Esses iniciadores foram desenhados para conter um fragmento de 40 bases em suas extremidades 5' correspondentes ao gene Dib1 de levedura, além de 20 nucleotídeos para a amplificação do gene His3. Esses iniciadores foram utilizados para amplificarem o gene His, que se encontrava clonado no vetor pDIS. O produto obtido foi o gene His3 contendo em suas extremidades seqüências do gene Dib1 da levedura. Esse fragmento foi usado para transformar leveduras, e foi possivelmente incorporado por recombinação homóloga em qualquer local do genoma da mesma. A seleção das leveduras que apresentavam esse fragmento incorporado se deu pelo crescimento das mesmas em meio deficiente em histidina. A verificação de que a inserção ocorreu no local esperado, deletando o gene Dib1 na levedura, foi realizada por reação de PCR, utilizando um dos iniciadores com homologia à região externa ao gene Dib1 e um iniciador homólogo à parte do gene His3. Só apresentaram produtos de amplificação, as colônias de leveduras que tiveram o fragmento de histidina incorporado no local do gene Dib1 (Fig.2).

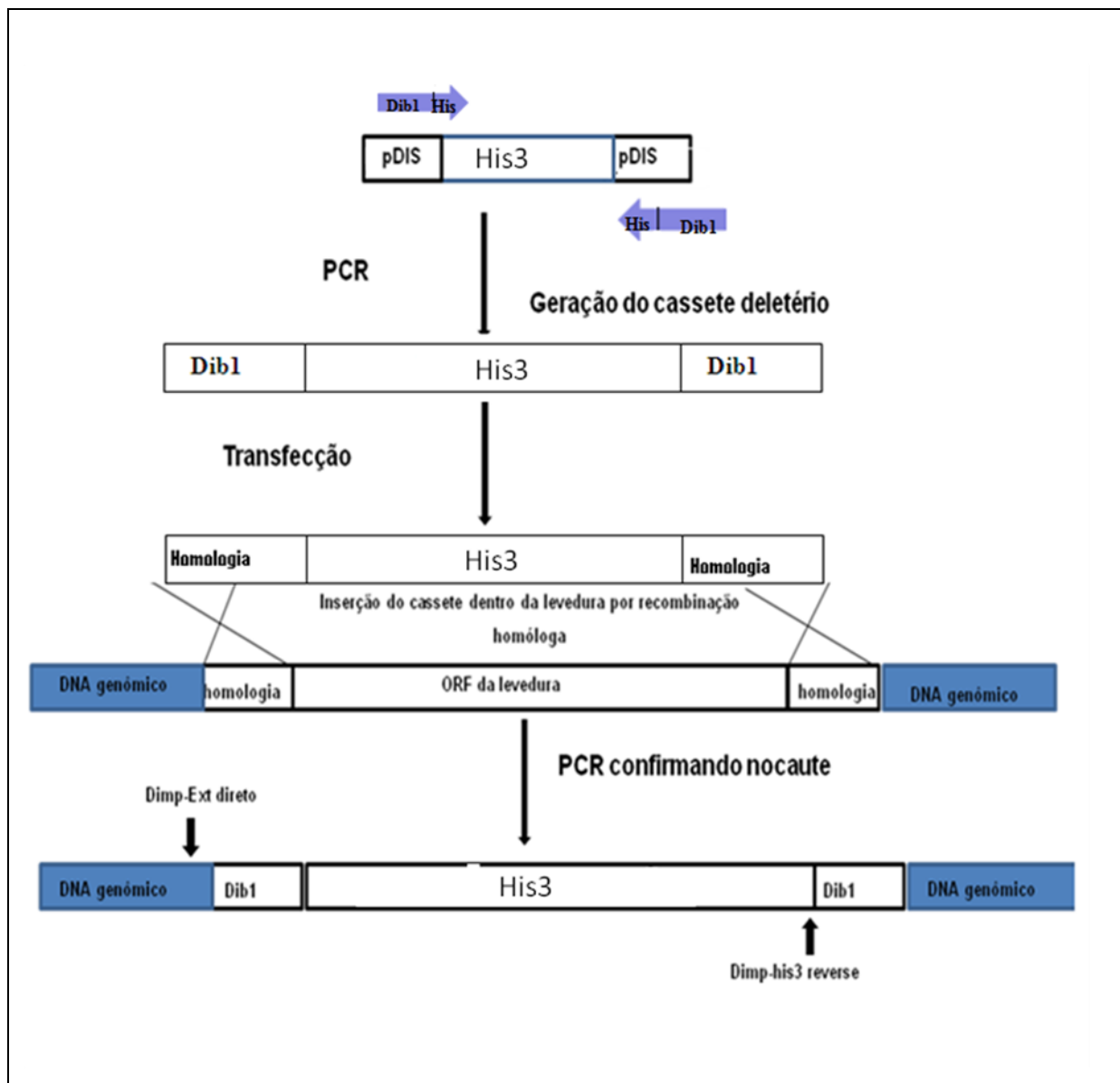


Figura 2 – Esquema da recombinação heteróloga em levedura e PCR para confirmação de nocaute.

2 - Uma vez confirmada a deleção do gene, as leveduras foram transformadas com o gene SmDimp e em paralelo com o gene DIB1, que foram clonados em vetores próprios de expressão em leveduras. Os vetores sem qualquer

gene clonado também foram usados para transformar as leveduras nocauteadas, como controle negativo. Esses vetores contêm marcadores de aminoácidos que permitem a seleção de leveduras em meios específicos. Normalmente os vetores utilizados para essas clonagens e transformações possuem um promotor próprio para a expressão do gene.

3- Uma vez confirmada a transformação das leveduras nocauteadas com os vetores contendo os genes em estudo, essas leveduras foram estimuladas a formarem esporos. Essa etapa é necessária, pois essa linhagem de levedura utilizada é diplóide e a observação da complementação só é possível em haplóides. Vetores vazios, ou seja, sem qualquer gene clonado, também foram utilizados para transformar leveduras, como controle negativo do experimento. A seleção seria realizada conforme esquema demonstrado na fig.3. As Metodologias e o material utilizado, descritos a seguir foram utilizadas para o cumprimento do delineamento experimental.

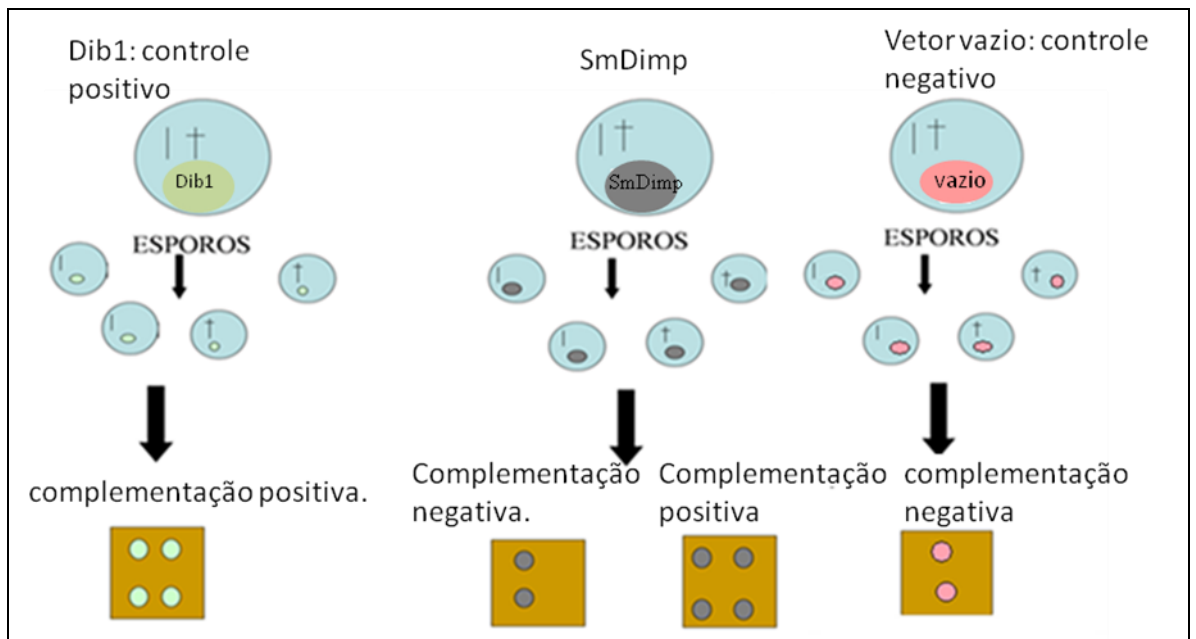


Figura 3 - Seleção de esporos complementados. Esporos obtidos após micromanipulação de tétrades. ▮ Dib+ alelo selvagem; ▮ Dib- alelo nocaute; ○ plasmídeos pYTS ou pYEDP contendo o gene Dib1 de levedura ou o gene de *S. mansoni* ou o plasmídeo vazio.

4.2.2 – A levedura

Sabendo-se que a deleção do gene *Dib1*, homólogo ao gene *SmDimp* de *Schistosoma mansoni* na levedura é letal à mesma, optou-se pela utilização de leveduras diplóides para os experimentos de nocaute.

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem de leveduras diplóide BY4727/36, que foi obtida através de cruzamento das linhagens haplóides BY4727 com a BY4736 (Santos et al., 2002), e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As linhagens citadas estão listadas no Quadro 1. As leveduras diplóides foram plaqueadas em meio de cultura ágar SD complementado t elementos essenciais, como histidina, metionina, triptofano, uracila, glicose e fontes de nitrogênio e enxofre.

Quadro 1- linhagens de leveduras haplóides e diplóide

Linhagem	genótipo
BY4727	MAT α his3 Δ 200 Leu2 Δ 0 Lys2 Δ 0 met 15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3 Δ 0
BY4736	MAT α ade2 Δ hisG his3 Δ 200 met15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3 Δ 0
BY4727/36	MAT α / MAT α his3 Δ 200 met15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3 Δ 0

(adaptado de Santos et al.,2002)

4.2.3 – Amplificações de genes utilizando iniciadores específicos.

Durante a execução do projeto, os genes *SmDimp*, *Dib1* e *HIS3* foram amplificados através de PCR utilizando iniciadores específicos listados na Tabela1.

Estes produtos foram utilizados para clonagem em vetor (SmDimp e Dib1) e para o nocaute do gene Dib1 em leveduras (HIS3). Também foram utilizadas PCRs para confirmação de nocaute do gene Dib1 e confirmação da presença dos genes em vetores.

Todas estas reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100, 200 μ M de cada dNTP, 0,6 μ M de cada iniciador, 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (PHONEUTRIA, MG, Brasil). As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um termociclador (Mastercycler®-EPPENDORF) com uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguindo-se de ciclos com as seguintes características:

- Anelamento – 1 minuto em temperatura específica dos iniciadores; e
- Extensão – 72 °C por 2 minutos;
- Desnaturação – 94°C por 1 minuto.

Esses passos foram repetidos por 29 vezes, com o último ciclo de extensão a 72°C, por 10 min.

Para amplificações utilizando colônias de células, foram coletadas pequenas amostras de cada colônia da levedura com o auxílio de um palito estéril. Estas colônias foram colocadas em 3 μ L de NaOH 0,02M e levadas ao banho de 99°C por 10 minutos para que ocorresse o rompimento da parede celular da levedura. Estas amostras foram usadas como molde para a reação de amplificação, seguindo o protocolo acima.

Todas as reações de amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado por brometo de etídio (0.5 μ g/mL).

Tabela 1 - iniciadores utilizados nas amplificações.

Iniciador	seqüência
DimpU 1	5' CCG {GAATTC} ATGTCTTATATGCTTTCTCA 3'
DimpL 1	5' CCC /AAG CTT/GGGGCGGATTACAAATATTTTATT 3'
DibU 1	5' ATGGCTAGTGTTTTGTTGC 3'
DibL 1	5' TTATGAAACACGCTTATGAT 3'
DimpU	5' TGCT [CTAGA] ATGTCTTATATGCTTTCTCA 3'
DimpL	5' CCG {GAATTC} GCGGATTACAAATATTTTATT 3'
DibU	5' TGCT [CTAGA] ATGGCTAGTGTTTTGTTGC 3'
DibL	5' CCG {GAATTC} TTATGAAACACGCTTATGAT 3'
Dib -HIS3F	5'ATGGCTAGTGTTTTGTTGCCTCAATTGCGTACGGGATGGC(CTTTCATTCAACGTTTCCCAT) 3'
Dib-HIS3R	5'TTATGAAACACGCTTATGATTATAATCGTATGGAGAGACC(AGTATACATACTGTTTCGTATA) 3'
Dib-ext direto	5' AACAGAACTTACATACCAA 3'

Legenda: () iniciadores para o gene His3

[] sítio para a enzima XbaI

{ } sítio para a enzima EcoRI

// sítio para a enzima HindIII

4.2.4 - Digestão com enzimas de restrição.

Durante as etapas de clonagem e construção de plasmídeos, estes foram tratados por enzimas de restrição para linearização dos mesmos e inserção dos genes, ou para recuperação de insertos que foram posteriormente subclonados.

Foram utilizadas as enzimas de restrição listadas na Tabela 2 em diferentes etapas, seguindo-se as instruções do fabricante em relação ao tampão, temperatura e tempo de digestão adequados. Todas as enzimas utilizadas foram obtidas da empresa Promega.

As digestões foram feitas utilizando-se 10% do volume total da reação correspondente às enzimas, variando a quantidade de DNA em cada reação. As reações foram feitas em duas etapas, utilizando uma das enzimas com seu tampão apropriado de cada vez. Na primeira, o material foi digerido com uma das enzimas, de acordo com as especificações do fabricante (Promega). Uma alíquota de cada material de digestão foi analisada em gel de agarose para confirmar a ação da enzima. Uma vez confirmada a digestão, os produtos da mesma foram purificados com o kit GFX (GE Healthcare) segundo o protocolo do fabricante, e ressuspensos em 50 μ l de H₂O mili-Q. Na segunda etapa, o material recuperado foi digerido independentemente com a outra enzima. Todo o produto da digestão foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos de interesse foram recuperados do gel e purificados utilizando o kit GFX (GE health care).

Tabela 2- enzimas utilizadas neste trabalho.

Enzima	Tampão	temperatura / tempo
EcoRI (12U/ μ l)	H, multicore	37° C / 2 horas
XbaI (10U/ μ l)	D, multicore	37° C / 2 horas
SmaI	J, multicore	25° C / 2 horas
BamHI	E	37° C / 2 horas

4.2.5 – Amplificação do gene His3.

O marcador gênico HIS3 da levedura, clonado no vetor pDIS, foi amplificado usando-se um par de iniciadores contendo 60 nucleotídeos cada. O produto desta PCR continha, nas duas extremidades, 40 pares de bases da seqüência do gene Dib1 e 21 pares de base da seqüência do gene His3.

A reação de amplificação foi feita em uma mistura de 50 μ l e o plasmídeo pDIS como molde para a reação. Neste plasmídeo estava clonado o gene His3. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada como descrito em 4.2.3. Este produto foi dosado e utilizado para a deleção do gene Dib1 da levedura, deficientes para a síntese de histidina. O produto restante foi purificado usando-se o kit Magic PCR prep (Promega).

4.2.6 - Manipulação genética da levedura

Um micrograma do DNA linear purificado foi usado para transformar a levedura diplóide BY4727/36 pelo processo acetato de lítio/ DNA de esperma de salmão/PEG (Santos et al., 2007).

As leveduras foram colocadas para crescer por 24 horas em tubo Falcon contendo 7,5ml de meio YPD líquido, acrescido de 1% de glicose. Com o auxílio de palitos de madeira estéreis, amostras de levedura eram inoculadas neste meio de cultura e incubadas à 30°C sob agitação constante (250rpm). Após este período, 2 ml da cultura de leveduras, era adicionada a 10 ml de meio acrescido de 0,5% de glicose e incubadas à 30°C por aproximadamente 2 horas, ou até que contando-se as células, fosse obtido um número ideal de, 2×10^3 células/ml. Três mililitros desta cultura eram colocadas em tubo e centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm. Depois, o sobrenadante era descartado, e 3 ml de água mili-Q era adicionada à colônia sedimentada, centrifugando-se em seguida por 10 minutos a 3000rpm.

Após esta etapa de lavagem, iniciava-se o tratamento das células para a transformação. O sobrenadante era retirado, adicionando-se em seguida, 600µl de acetato de lítio 0,1M, ressuspendendo-se em seguida. As células eram, então, transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugadas por 30 segundos a 14000 g. O acetato de lítio era retirado e em seguida 400µl de acetato de lítio 0,1M era adicionado às células, que eram, então, ressuspendidas e centrifugadas. Com o auxílio de pipeta, o acetato de lítio era retirado colocando-se, então, nesta ordem: 240 µl PEG 3500, 36 µl de acetato de lítio 1 M, 25µl de DNA de esperma de salmão 2mg/ml fervido durante 5 minutos e levado em seguida ao gelo. A mistura era vortexada por 2 minutos e centrifugada por 30 segundos a 14000 g, descartando o sobrenadante. Eram adicionados 300 µl de água mili-Q e 1 µg de DNA transformante, vortexando-se em seguida e incubando à 30°C por 30 minutos e à 42°C por mais 30 minutos. Em seguida, a solução era plaqueada em meio de cultura adequado.

4.2.7 – Preparação das placas para crescimento das leveduras transformadas.

As leveduras transformadas foram plaqueadas em meio SD suplementado com 1% de solução de aminoácidos e 2% de glicose. Os aminoácidos essenciais que suplementaram o meio de cultura eram a metionina e o triptofano, além de uracila.

As leveduras receberam o gene para a His3 que foi o marcador da transformação. Assim, as leveduras cuja transformação ocorreu, cresceram em meio de cultura não suplementada por este aminoácido. Foram preparadas placas seletivas e placas que serviram como controle para a transformação. Uma destas, foi suplementada com todos os aminoácidos e uracila (controle positivo). Nesta placa, o crescimento de células era esperado. Outras 3 placas continham a histidina, mas foi retirado um dos outros aminoácidos essenciais (controle negativo), e o crescimento de células em alguma destas placas indicaria contaminação com outra levedura e o experimento seria descartado. A placa seletiva continha os 3 aminoácidos essenciais, e não continha a histidina. Duas de cada placa foram preparadas, sendo as leveduras transformadas com o gene His3 plaqueadas nas mesmas. Na placa sem histidina, foi colocada a levedura sem transformação (controle negativo). As leveduras foram espalhadas nas placas de Petri com o auxílio de miniesferas ou alças de vidro estéreis. As placas foram, em seguida, levadas à estufa a 30° C por aproximadamente 3 dias para o crescimento das colônias.

4.2.8 – PCR para confirmação de nocaute.

O crescimento de colônias na placa sem histidina indica que as leveduras transformadas receberam o gene para a histidina. No entanto, não necessariamente o nocaute tenha ocorrido.

Para confirmação do nocaute, foi feita PCR das colônias presentes na placa teste, utilizando o iniciador Dib-ext. Este iniciador foi desenhado com base no conhecimento do genoma da levedura, uma vez que se anela em uma região anterior ao início do gene Dib1. Este iniciador foi usado junto com Dib-HIS3 R, amplificando um produto de aproximadamente 1300 pares de bases, que foi visualizado em gel de agarose 0,8%.

Para esta PCR de colônia, cada tubo continha 50µl de mix. As colônias cujo PCR eram positivo apresentavam genótipo heterozigoto (Dib1+/Dib1-). Amostras destas colônias foram inoculadas em meio de cultura YPD líquido suplementado com glicose. A uma parte desta cultura foi adicionado 15% de glicerol, totalizando 500 µl em cada tubo. Estes tubos foram devidamente identificados e mantidos em freezer à -70°C para serem usadas posteriormente.

Uma das colônias nocaute foi inoculada em 7,5 ml de meio YPD líquido suplementado com 10% de glicose por 24 horas sendo, em seguida transformadas com o vetor contendo os genes SmDimp de *S. mansoni* e Dib1 de *S. cerevisiae*.

4.2.9 - Extração do DNA total de levedura.

Para a confirmação de que o nocaute havia ocorrido no sítio específico, duas colônias de levedura nocaute (2 e 34) foram submetidas à reações de PCR específicas. Para isso o DNA de ambas foi extraído utilizando diferentes protocolos de extração. Devido à presença da parede celular nestes organismos, a técnica utilizada para extração de seu DNA precisa conter um passo de rompimento desta parede. Assim, quatro protocolos de extração foram testados (A, B, C e D), todos eles utilizando macerações mecânicas com bastões de vidro em presença de nitrogênio líquido em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.

As leveduras foram crescidas em 3 ml de meio YPD por aproximadamente 20 h à 30° C sob agitação de 250rpm. Em seguida, esta cultura foi centrifugada para concentração das células.

Para os protocolos A e D, foi utilizado um tampão de lise baseado em um protocolo padrão do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos (50 mM de EDTA, 100mM de tris-HCl pH7,4, 100mM de NaCl e 1% de SDS). A única diferença foi que no protocolo A as células foram primeiramente ressuspensas no tampão de lise para então serem congeladas em nitrogênio líquido (N₂) antes de serem maceradas, e no protocolo D o sedimento de células foi diretamente congelado em N₂ e o tampão adicionado após a maceração mecânica utilizando pistilos de vidro em tubos eppendorf. As células foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lise e após a maceração foram adicionados a cada tubo 100µg/ml de proteinase K (Sigma) e a digestão realizada por 30 min a 65°C. Após a digestão, foram adicionados 400 µl de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, seguido de centrifugação a 12000 g, por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e submetida à digestão com 100 µg/ml de RNase (Invitrogen) a 37°C por 30 min. Foram adicionados mais 400 µl de clorofórmio e álcool isoamílico, seguido de centrifugação, conforme parâmetros mencionados anteriormente, para a eliminação da RNase. A fase superior foi mais uma vez transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e 400 µl de isopropanol adicionados ao tubo para precipitação do DNA. Os tubos foram incubados a -20° C por aproximadamente 16 h seguido de uma centrifugação a 14000 g por 10 min, o sedimento lavado com etanol 70% e dissolvido em 20 µl de água mili-Q.

No protocolo B, foram utilizados 400 µl da solução de lise de núcleo contendo EDTA do Kit de extração de DNA genômico Wizard™ Genomic DNA Purification Kit antes da maceração mecânica. No protocolo C, foram utilizados 400 µl do tampão de lise do kit Wizard™ Mini prep (Promega). Para ambos, seguiu-se o protocolo do fabricante do kit mini-prep modificado, sendo adicionados após a maceração, 10 µl de protease alcalina e após incubação de 5 min em temperatura ambiente, adicionou-se 290 µl de tampão de neutralização, seguindo-se o protocolo do Kit normalmente.

Todas as amostras obtidas foram quantificadas em nanodrop e submetidas à eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do DNA genômico obtido

em cada protocolo. Estas amostras de DNA foram utilizados em reações de PCR com várias combinações de iniciadores, para confirmar se tratavam das colônias diplóides nocauteadas. As combinações entre iniciadores usados, e os resultados esperados são os seguintes:

- Histidina forward + Histidina reverse – positivo para todos os transformantes (aproximadamente 1200 pb);
- Histidina forward + Dib reverse – positivo para todos os transformantes (aproximadamente o mesmo tamanho que o par HF+HR);
- Histidina reverse + Dib forward – positivo para todos os transformantes (aproximadamente o mesmo tamanho que o par HF+DR);
- Dib forward + Dib reverse – positivo para todas as colônias diplóides (aproximadamente 430 pb);
- Dib-externo direto + Histidina reverse – positivo para todos os nocautes ocorridos no local esperado (aproximadamente 1400 pb);
- Dib-externo direto + Dib reverse – positivo para todas as colônias diplóides (aproximadamente 500 pb).

4.2.10 - Amplificação dos genes SmDimp de *S. mansoni* e Dib1 de *S. cerevisiae*.

O gene SmDimp de *S. mansoni* que encontrava-se clonado do vetor pBlueScript, foi reamplificado a partir deste vetor, utilizando o par de iniciadores DimpU1 e DimpL1, conforme descrito em 4.2.3.

O gene Dib1 da levedura foi amplificado a partir de colônias de levedura, utilizando o par de iniciadores DibU1 e DibL1, sendo clonado em seguida no vetor pUC18, para posterior seqüenciamento e reamplificação.

Outros iniciadores foram desenhados contendo os sítios para as enzimas EcoRI e XbaI conforme descrito no tópico 4.2.3. Todos os iniciadores foram

sintetizados pela companhia INVITROGEN™, diluídos em água deionizada e estocados em alíquotas na concentração de 100µM. Estes iniciadores estão listados na Tabela1.

As reações de amplificação dos genes SmDimp e Dib1, foram realizadas em um volume final de 25µL, conforme descrito no item 4.2.3. Os produtos amplificados desta PCR foram purificados usando-se o kit GFX™ PCR (GE Healthcare) para eliminar restos de primers e reagentes. Estes produtos purificados tiveram a concentração estimada por comparação com padrões de concentração de DNA em gel de agarose 1% e foram utilizados para a clonagem em vetores apropriados.

4.2.11 - Clonagens.

Os produtos de amplificação foram clonados aos vetores, utilizando a razão molar fragmento/vetor de 2:1, utilizando 6 unidades da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (250mM tris-HCL (pH7,6), 50mM MgCL₂, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% (p/v) polietilenoglicol 8000) (Invitrogen) 1x, em volume final de 10µl, a 4°C por 20horas.

Vários passos de clonagem foram realizados com diferentes propósitos. Esses passos estão descritos nos tópicos a seguir. A justificativa para cada clonagem foi a seguinte:

- **Clonagem do gene Dib1 em vetor pUC18:**

Essa clonagem foi realizada para que o gene fosse sequenciado e posteriormente clonado no vetor de expressão em leveduras pYEDP, já que esse vetor não continha sítios para iniciadores que permitissem o sequenciamento. Na época da realização da clonagem não dispúnhamos do vetor pGEM-T Easy.

- **Clonagens no vetor pYEDP:**

Vetor de expressão em leveduras, escolhido para a realização dos experimentos de complementação com os genes SmDimp e Dib.

- **Clonagem no vetor pGEM-T Easy:**

os genes foram clonados nesse vetor por ser um vetor de fácil clonagem para produtos de PCR, que possibilitaria a retirada dos insertos para sub-clonagem no vetor pYTS.

- **Clonagem no vetor pYTS:**

Durante os experimentos de esporulação após a transformação da levedura nocaute com os plasmídeos pYEDP, não foi possível a observação de esporos. Uma possível explicação seria a forte expressão do promotor do plasmídeo que poderia causar uma superexpressão. Portanto, se tentou outro plasmídeo que possuísse um promotor que já havia sido demonstrado efetivo em outros trabalhos utilizando complementação fenotípica em levedura.

4.2.12 - Clonagem do gene Dib1 em vetor pUC 18.

A – O vetor pUC18:

O vetor pUC18 (2686 pb) (Fermentas Life Sciences) possui um replicon pMB1, responsável pela replicação do plasmídeo. Possui o gene *bla* de resistência a ampicilina e um promotor P_{lac} , responsável pela produção da enzima beta galactosidase, cuja síntese pode ser induzida pelo IPTG, gerando colônias azuis em meio com X-gal. O gene Lac-Z localiza-se no sítio múltiplo de clonagem, sendo inativado pela clonagem do DNA de interesse nessa região, gerando colônias brancas. O mapa desse vetor está esquematizado na Figura 5.

B – A clonagem:

O vetor pUC18 foi digerido com a enzima SmaI, e desfosforilado em seguida, para evitar que as extremidades se religassem. Para a desfosforilação, 50 µl do vetor digerido com enzima Sma I foram adicionadas à 0,5 µl de CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) NEW ENGLAND BIOLABS™ e 10 µl de tampão CIP e água o suficiente para completar 100 µl. Esta solução foi levada ao banho à 37° C por 1 hora. Após esse período, adicionou-se o mesmo volume de fenol/ HCCl₃ (1:1), vortexando-se em seguida durante 1 minuto, e centrifugando-se a 12000rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi colocado em um novo tubo e o mesmo volume de clorofórmio álcool isoamil (24:1) foi adicionado a ele. Após vortexar por 1 minuto e centrifugar por mais 2 minutos a 12000rpm, o sobrenadante foi colocado em outro tubo com 10% do volume de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol 100%. Essa solução permaneceu à 20° C durante aproximadamente 16 horas, sendo centrifugado em seguida durante 6 minutos a 12000rpm e ressuspenso em 15 µl de água destilada.

O gene Dib1 foi então, clonado neste vetor, para posterior seqüenciamento. Os produtos da clonagem foram transformados em bactérias eletrocompetentes. Dois microlitros do produto de ligação transformados em bactéria foram submetidos à eletrotransformação em 40µL de bactérias *E. coli* DH5α (10⁻⁶/10⁻⁷ células). As amostras foram transformadas em cubetas previamente limpas, irradiadas com luz UV por 20 minutos e submetidas a eletrochoque em um eletroporador Micropulser (BIORAD). As células bacterianas recombinantes foram incubadas por 45 minutos a 37°C em 200µL de meio líquido 2XYT acrescido de ampicilina (100µg/mL), com posterior plaqueamento de diferentes alíquotas destas células em meio sólido seletivo contendo 20mL de ágar Luria Broth (LB), ampicilina (100µg/mL), IPTG (100mM), X-GAL (500ug/mL) e incubados a 37°C por 16 horas.

A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma reação de PCR utilizando diretamente uma pequena

amostra de algumas colônias brancas repicadas com o auxílio de um palito de madeira estéril e transferida para o tubo de reação. Os Iniciadores usados nesta reação foram o par DibU1/ DibL1 para as colônias transformadas com o gene Dib1.

4.2.13 – Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em vetor pYEDP 60-2.

A – O vetor:

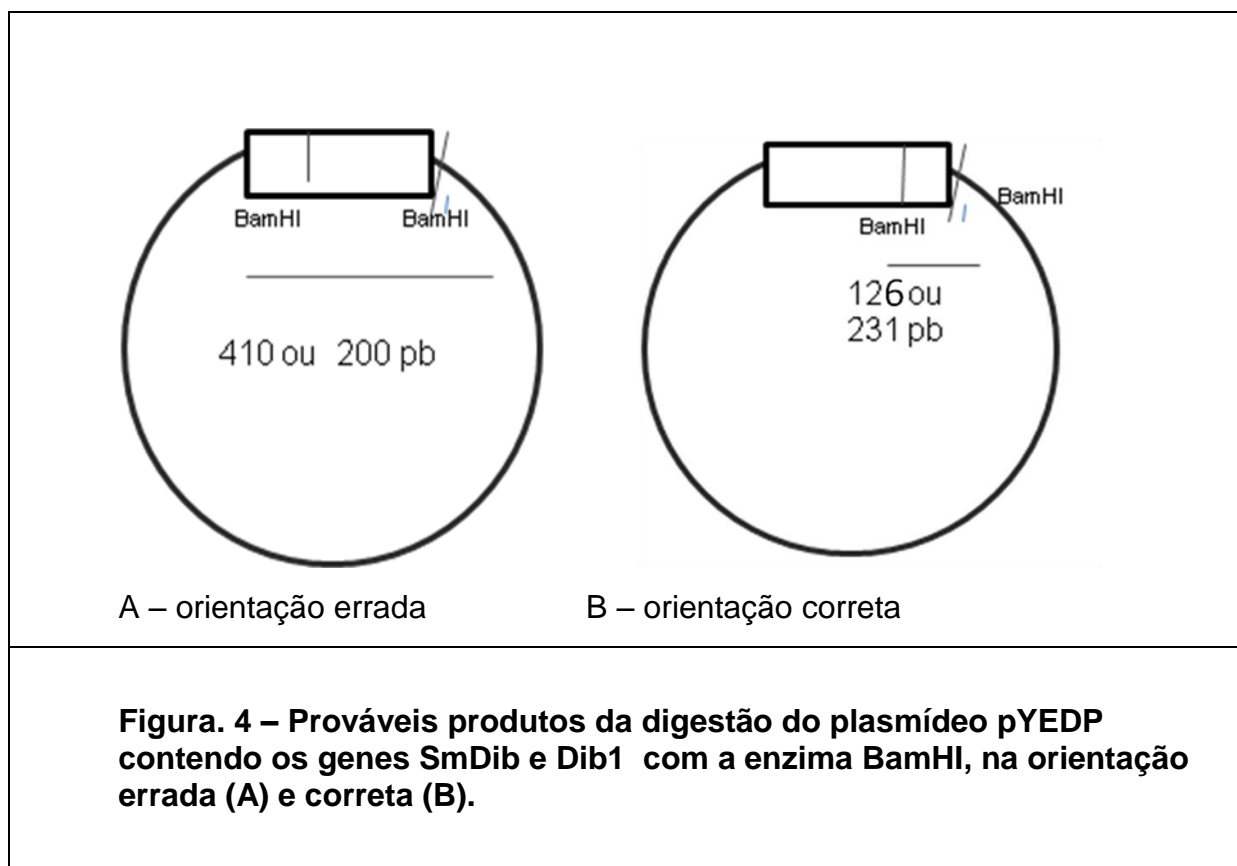
O vetor pYEDP 60-2 (9257pb), possui sítio múltiplo de clonagem posicionado na região 3' de um promotor que é ativado na presença de galactose, o GAL10/CYC1. O DNA codificador da proteína de interesse deve ser ligado no sítio múltiplo de clonagem e na orientação correta do promotor. O vetor pYEDP 60-2 é capaz de se replicar em *E. coli* e *S. cerevisiae*. Ele possui o gene *bla* de resistência a ampicilina e os marcadores URA3 que permite que as leveduras auxotróficas carregando o vetor cresçam em meio sem uracila e o ADE2, que permite que leveduras auxotróficas carregando pYEDP 60-2 cresçam em meio faltando adenina. O mapa desse vetor está esquematizado na Figura 6.

B – A clonagem:

O gene SmDimp que encontrava-se clonado no vetor pBlueScript, foi reamplificado a partir deste vetor, utilizando o par de iniciadores DimpU1 e DimpL1. Uma alíquota do produto da reação foi analisada em gel de agarose 0,8% para ter sua concentração estimada. O produto restante foi purificado usando o kit Magic PCR prep (Promega) para ser posteriormente subclonado no pYEDP.

O gene Dib1 foi reamplificado a partir do vetor pUC 18, utilizando os iniciadores DibU1 e DibL1. A concentração deste produto também foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% purificado através do kit Magic PCR prep (Promega) para subclonagem em pYEDP.

O plasmídeo pYEDP foi tratado com a enzima SmaI e desfosforilado conforme protocolo citado em 4.14, para evitar que as duas extremidades fossem religadas. Os genes SmDimp e Dib1 foram então, clonados independentemente neste vetor. O produto da clonagem foi transformado em bactéria eletrocompetente, e as colônias positivas selecionadas por PCR usando os iniciadores que amplificam os genes SmDimp e Dib1. Os vetores contendo os genes clonados foram obtidos através das mini-preps das colônias bacterianas. Assim como a clonagem em pUC18, esta também foi feita em sítio único podendo resultar em insertos na orientação contrária. Para selecionar aquelas que continham os insertos na orientação correta, uma digestão com a enzima BamH1 foi feita com os plasmídeos recuperados, submetendo-os em seguida à eletroporação em gel de agarose. Como o gene SmDimp e o Dib1 contêm sítio de restrição para esta enzima na posição 126 para o SmDimp e 231 para o Dib1, os produtos digeridos que se encontram na orientação errada, apresentam o tamanho igual a 410 pares de bases (SmDimp) ou 200 pares de bases (Dib1) (O mapa de enzima de restrição para os dois genes se encontra no tópico Anexos). Os que estiverem na posição correta apresentam tamanhos próximos à 126 para SmDimp e 231 para Dib1.



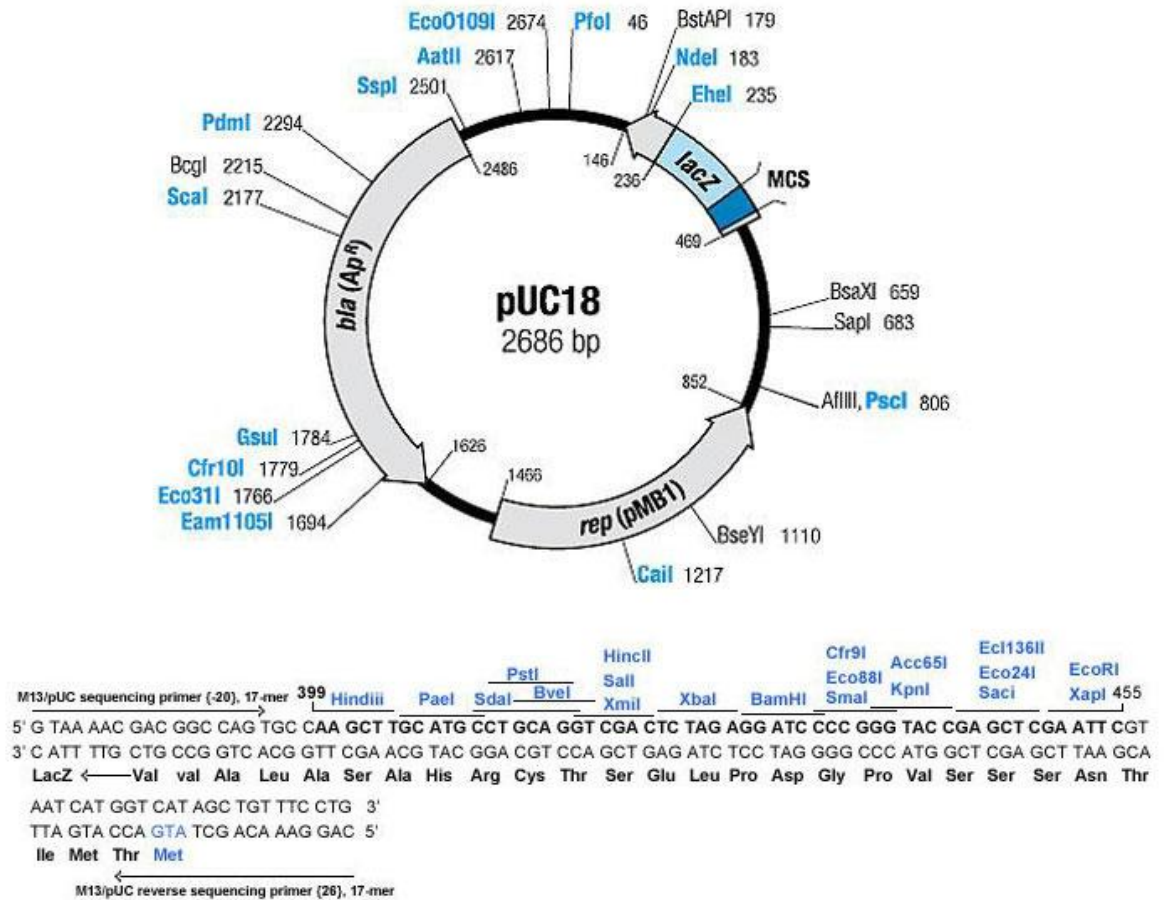


Figura 5 - Mapa esquemático do vetor pUC18 contendo os sítios para enzimas de restrição.

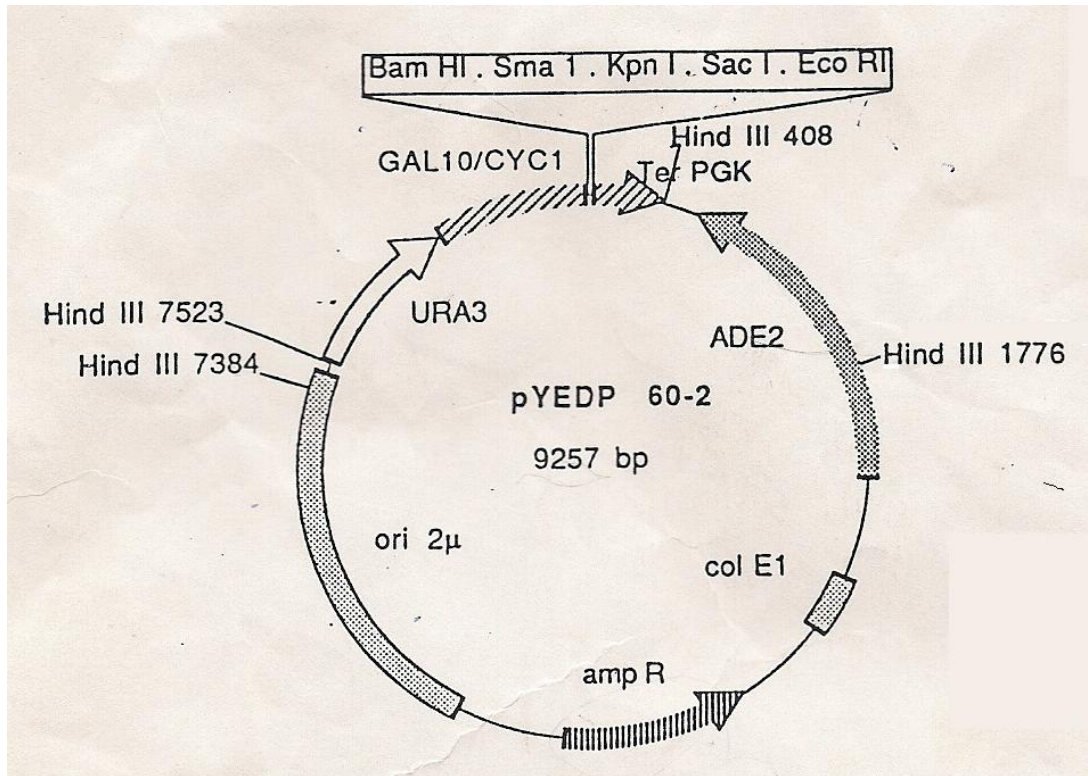


Figura 6 - Mapa esquemático do vetor pYEDP

4.2.14 - Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em vetor pGEM-T Easy (Promega).

A – O vetor:

O vetor pGEM-T Easy (3015 pb) (Promega) possui os promotores T7 e SP6 flanqueando o sítio múltiplo de clonagem, onde está o alfa peptídeo responsável pela produção da enzima beta galactosidase, sendo que a clonagem do DNA de interesse inativa este peptídeo. Assim, bactérias recombinantes podem ser selecionadas pela cor das colônias. O mapa desse vetor está esquematizado na Figura 7.

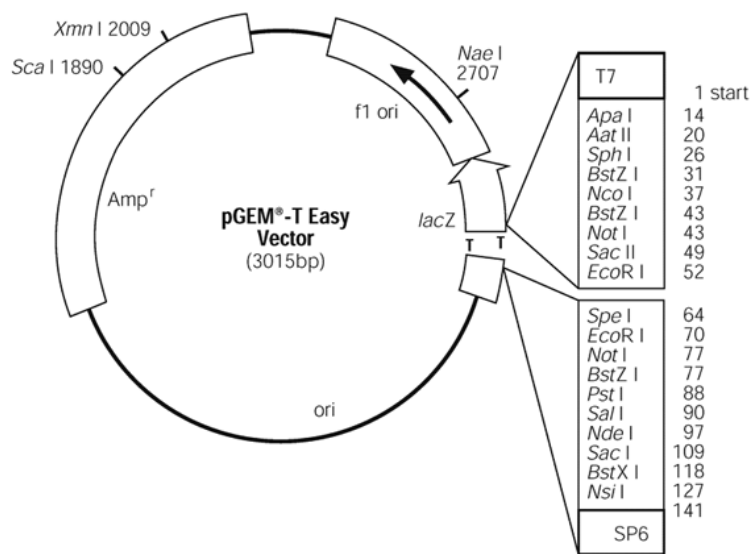
B – A clonagem:

Os genes previamente clonados no vetor pYEDP foram reamplificados utilizando-se os iniciadores DimpU/DimpL e DibU/DibL, contendo sítios para as enzimas EcoRI e XbaI. Os produtos obtidos desta reamplificação foram purificados usando o kit GFXTM PCR (GE Healthcare) para eliminar restos de reagentes e sua concentração foi estimada por comparação com padrões de concentração de DNA em gel de agarose 1% .

Os produtos amplificados foram clonados em vetor do kit pGEM-T Easy utilizando-se 5µl de tampão de ligação da T4, 1µl de vetor do kit (50 ng), 1µl de enzima T4 ligase (3unidades/µl), e 50 ng de produto da PCR. A esta solução foi adicionado água mili-Q até o volume de 10 µL incubado-se em seguida a 4°C por 20 horas. Os produtos da clonagem foram transformados em bactérias eletrocompetentes. Dois microlitros do produto de ligação transformados em bactéria foram submetidos à eletrotransformação em 40µL de bactérias *E. coli* DH5α

($10^{-6}/10^{-7}$ células). As amostras foram transformadas em cubetas previamente limpas, irradiadas com luz UV por 20 minutos e submetidas a eletrochoque em um eletroporador Micropulser (BIORAD). As células bacterianas recombinantes foram incubadas por 45 minutos a 37°C em 200µL de meio líquido 2xYT acrescido de ampicilina (100µg/mL), com posterior plaqueamento de diferentes alíquotas destas células em meio sólido seletivo contendo 20mL de ágar Luria Broth (LB), ampicilina (100µg/mL), IPTG (100mM), X-GAL (500ug/mL) e incubados a 37°C por 16 horas.

A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma reação de PCR utilizando diretamente uma pequena amostra de algumas colônias brancas retirada com o auxílio de um palito de madeira estéril e transferida para o tubo de reação. Os Iniciadores usados nesta reação foram o DimpU/DimpL para as colônias transformadas com o gene SmDimp, e DibU/DibL para as colônias transformadas com o gene Dib1.



pGEM®-T Easy Vector

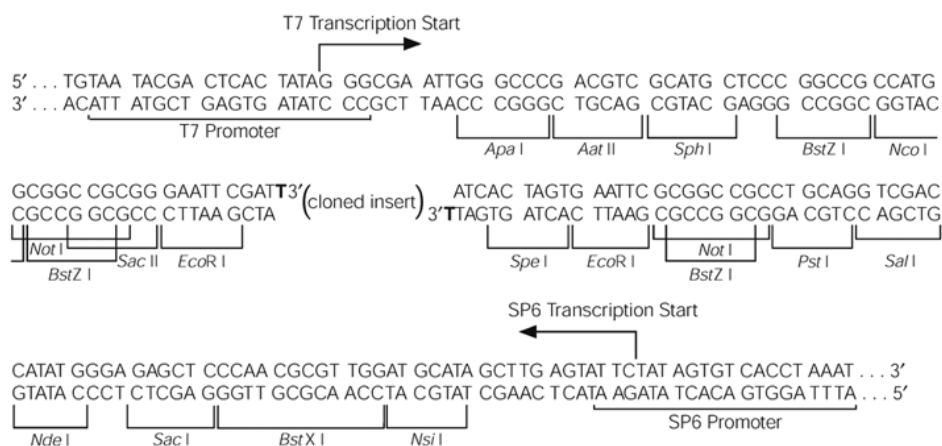


Figura 7 – Mapa esquemático do vetor pGEM-T Easy.

4.2.15 - Clonagem do gene SmDimp no vetor pYTS.

A - O vetor:

O plasmídeo pYEPLAC 195 é derivado do plasmídeo pUC19 contendo os mesmos sítios de restrição que este (Gietz et al., 1988).

O plasmídeo pYTS foi construído a partir da introdução do promotor do gene Rho1 de *S. mansoni* no sítio HindIII/PstI do pYEPLAC (Santos et al., 2002), e foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas UFMG. O mapa do vetor pYEPLAC 195 está esquematizado na Figura 8.

B – A clonagem

Os genes SmDimp e Dib1 clonados no vetor pGEM-T Easy, foram retirados deste vetor a partir da digestão com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI. O plasmídeo pYTS foi tratado com as mesmas enzimas. Os genes foram então clonados no sítio EcoRI/XbaI do vetor, independentemente. O produto da clonagem foi transformado em bactéria eletrocompetente, e as colônias positivas selecionadas por PCR usando os primers .

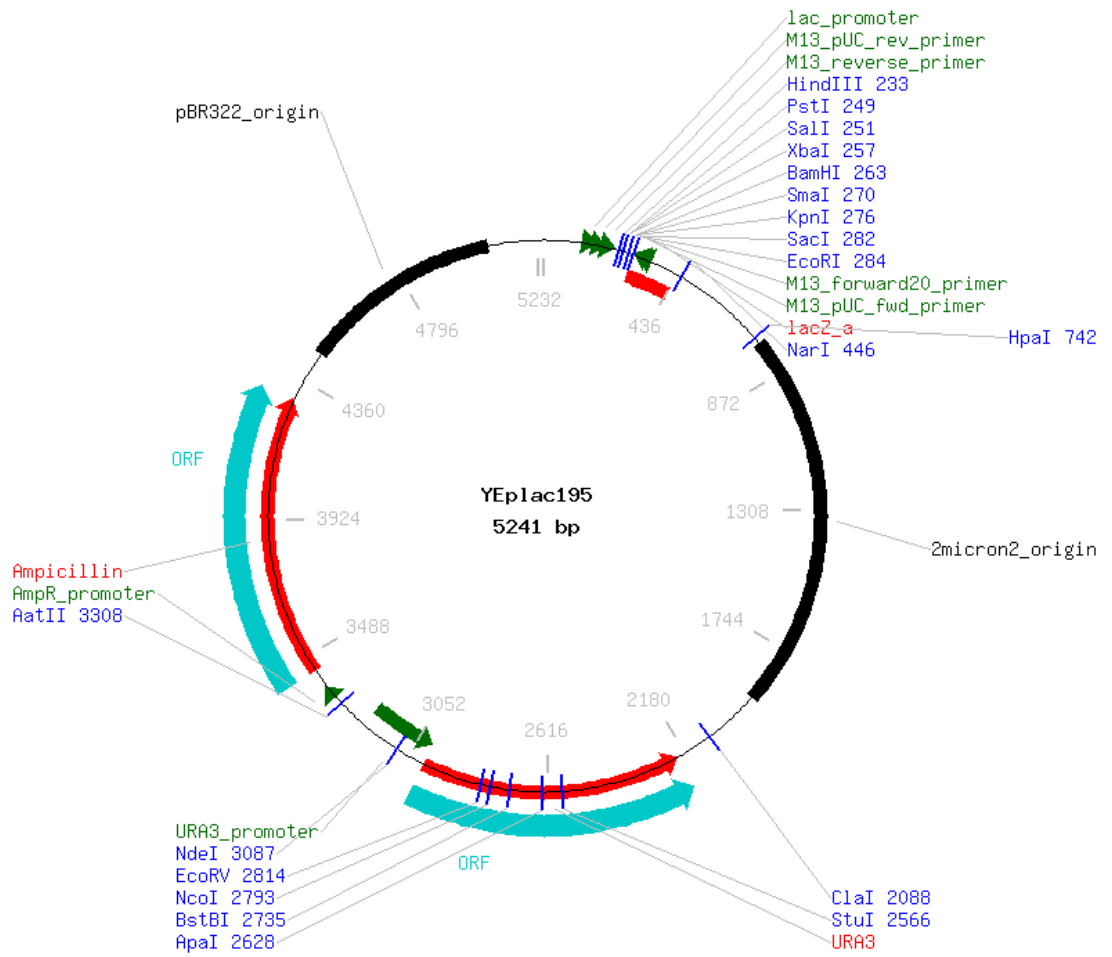


Figura 8 – mapa esquemático do vetor pYEPLAC195

4.2.16 - Mini preparação de plasmídeos (Mini-prep).

Após a confirmação dos insertos recombinantes esperados pela PCR de colônia, o DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído utilizando o kit Wizard™ Mini prep (promega), segundo protocolo do fabricante.

4.2.17 - Sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1.

Os genes SmDimp clonado em pBlueScript e Dib1 clonado em pUC18, foram seqüenciados em duplicata, utilizando os iniciadores M13 direto e reverso. As reações de sequenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por SANGER e colaboradores (1977), utilizando-se o *DYEnamic™ET dye terminator kit MegaBACE™* (AMERSHAN BIOSCIENCES), em tubos de microcentrifuga de 0,5 ml ou em placas de sequenciamento (96 poços) com um volume final de 10 µl contendo 0,5µM do iniciador M13 direto -40 ($5'$ CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC $3'$) ou reverso ($5'$ TCACACAGGAAACAGCTATGAC $3'$), 200 ng de DNA plasmidial, 4 µl de ETkit (pré-mix para sequenciamento) e água pura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador com 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram retirados, adicionando-se 1 µl de acetato de amônio (7,5 M) e 25 µl de etanol 95%, após incubação a 25°C por 15 minutos, seguido de centrifugação a 4000rpm por 45 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 150 µl de etanol 70% adicionado às amostras seguindo-se uma centrifugação a 4000rpm por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento redissolvido por agitação em vortex com 10 µl do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1 mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no sequenciador automático capilar *MegaBACE 1000™* com uma injeção de 2 kV por 100 segundos e corrida de 6 kV por 240 minutos.

4.2.18 – Transformação da levedura nocaute com os plasmídeos recombinantes para os genes *Dib1* e *SmDimp* e vazios.

A transformação foi feita seguindo o método acetato de lítio / DNA esperma de salmão/PEG, mas seguindo um protocolo distinto.

As leveduras foram colocadas para crescer por 24 horas em tubo Falcon contendo 7,5ml de meio YPD líquido acrescido de 1% de glicose. Com o auxílio de palitos de madeira estéreis, amostras de levedura foram inoculadas neste meio de cultura e incubadas à 30° C sob agitação constante (250rpm). Após este período, a cultura de leveduras foi adicionada a 50 ml de meio acrescido de 0,5% de glicose e incubadas à 30° C por aproximadamente 2 horas, ou até que se contando as células tenham-se um número ideal de, no máximo 2×10^3 células ou DO_{600nm} de 0,5-0,8 a qual é a fase logarítima indicada para se iniciar o processo de tratamento das células. Estas células foram centrifugadas por 5 minutos a 3400 g, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, as células foram ressuspensas em 2,5 ml de mix acetato de lítio e centrifugadas em seguida por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 0,5 ml de mix acetato de lítio e incubadas durante 1 hora a 30° C sob agitação.

Em seguida, o processo de transformação das células tratadas foi iniciado adicionando-se em tubo de microcentrífuga 100 μ l de célula tratada a 2,5 μ l de DNA de esperma de salmão 20mg/ml (fervido durante 5 minutos e levado em seguida ao gelo) e 1 μ g do vetor. Foi preparada uma mix para cada vetor transformado. Cada mistura foi incubada a 30° C por 30 minutos. Em seguida as células foram gentilmente ressuspensas sendo adicionadas 0,7 ml de mix PEG em cada tubo,

incubando em seguida a 30° C por 45 minutos, seguindo-se o choque térmico de 42°C por 5 minutos. As células foram então, centrifugadas rapidamente (cerca de 5 segundos) removendo-se o sobrenadante em seguida. As células de cada tubo foram ressuspensas em 200 µl de YPD. Cem microlitros de cada levedura nocaute transformada foram plaqueadas em meio de cultura SD ágar suplementada por glicose, triptofano e metionina, já que o vetor possui o gene URA3 para a uracila.

4.2.19- Indução à esporulação das leveduras nocautes transformadas com os plasmídeos recombinantes e vazios.

Após os experimentos de nocaute e transformação, os possíveis genótipos encontrados nas leveduras diplóides selecionadas nas placas são os seguintes

Dib1+/Dib1-_pYTS, Dib1+/Dib1-_pYTSschisto; Dib1+/Dib1-_pYEDPyeast, Dib1+/Dib1-_ pYEDPschisto e Dib1+/Dib1-_pYEDP, onde Dib1+ corresponde ao alelo selvagem e Dib1- corresponde ao alelo nocaute.

A observação dos fenótipos induzidos pelo genótipo selvagem (Dib1) e pela transformação (Dib1_plasmídeo) deve ser feita através da observação nas leveduras haplóides, após a esporulação das diplóides.

Sabendo-se que a esporulação é um recurso utilizado por leveduras quando as condições ambientais não lhe estão favoráveis, principalmente quando as ofertas de nitrogênio e carbono são baixas, a esporulação foi induzida através do replaqueamento das leveduras nocauteadas e transformadas em meios de cultura pobres em nutrientes.

As leveduras foram inoculadas em meio de cultura pré-esporulação (PE) líquido e incubadas à 30° C sob agitação constante (250rpm) por 24 horas. Após este período, uma alíquota da cultura de células foi plaqueada em meio Kac acrescido de 0,5% de aminoácidos (Metionina e triptofano). As placas foram incubadas à 30° C durante 5 a 7 dias. Após este período, as células foram

analisadas em busca de esporos. Para tanto, um inóculo das células era espalhada sobre ágar 1,7% em uma lâmina coberta por lamínula e observado ao microscópio, no aumento de 100 vezes em busca de células tétrades.

5 - RESULTADOS:

5.1 - Modelagem computacional da proteína SmDimp

A sequência completa do gene SmDimp foi de 536 nucleotídeos. A tradução do gene SmDimp através de programa de ORF finder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) resultou em uma proteína de 142 aminoácidos, com uma janela aberta de leitura iniciada em ATG, desde a primeira base nitrogenada do gene (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>), conforme a Figura 9. Esta proteína possui alta probabilidade de localizar-se no citoplasma, quando analisada pelo programa Psort (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>). A probabilidade de a localização ser citoplasmática, nuclear, citoesquelética, mitocondrial ou reticular, foi de 52.2%, 21.7%, 17.4%, 4.3% e 4.3%, respectivamente.

O gene SmDimp de *S. mansoni* apresentou homologias com diversas proteínas da família Dimp, após pesquisa de homologia utilizando programa BLASTX (quadro 2, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Dentre essas homologias se destacam a homologia com a proteína Dim1 de *Schistosoma japonicum* (identidade de 96%, “score” = 293), e a homologia com a proteína Dib1 de *S. cerevisiae* (identidade de 62%, “score”= 128).

Com base nos dados Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>), que utiliza o programa estatístico HMM que analisou a proteína Dim1 *S. mansoni* desde o aminoácido 1 ao 143, apresenta sequência iniciando no aminoácido 4 e terminando no 136, tratando-se da proteína Dim1 envolvida em mitose. De acordo com o gene ontology, essa proteína é descrita como componente do spliceossoma, envolvida indiretamente nos processos de mitose.

Foi feita uma modelagem molecular automática, com refinamento através do servidor swissmodel. A Figura 10 mostra o resultado da modelagem por homologia, mostrando sete folhas beta e três alfa-hélices. Foi usado para essa modelagem, a estrutura cristalizada de uma proteína binária do complexo U5snRN humana, que apresentou identidade com o SmDimp de aproximadamente 85%.

Quadro 2 – Alinhamento do SmDimp com a proteína Dim1 de *S. japonicum* obtido por Blastx.

```

Score = 293 bits (749), Expect = 5e-78 Identities = 137/142 (96%), Positives = 140/142
(98%), Gaps = 0/142 (0%) Frame = +1

Query1      MSYMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVVIRFGHDWDPSCMVMDLTKIAERVKNFAITYL 180
            MSYMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVV+IRFGHDWDPSCMVMDLTKIAERVKNFA+TYL
Sbjct 1     MSYMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVVIRFGHDWDPSCMVMDLTKIAERVKNFAVITYL 60

Query 181   VDITQVPDFNKMVELYDPCVTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNNKINWPIADGQEFIDIVETVY 360
            VDIT+VPDFNKMVELYDPCVTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNNKINWPI D QEFIDIVETVY
Sbjct 61   VDITEVPDFNKMVELYDPCVTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNNKINWPIEDAQEFIDIVETVY 120

Query 361   RGARKGRGLVVSPKDYSTKYRY 426
            RGARKGRGLVVSPKDYSTKYRY
Sbjct 121  RGARKGRGLVVSPKDYSTKYRY 142
    
```

Quadro 3 – Alinhamento entre as proteínas Dib1 e SmDimp.

```

gb|EDN61209.1| dim1 [Saccharomyces cerevisiae YJM789]
gb|EDV11280.1| 17 kDa U4/U6.U5 associated protein [Saccharomyces cerevisiae
RM11-1a]
Length=143

Score = 128 bits (321), Expect = 2e-30
Identities = 83/132 (62%), Positives = 103/132 (78%), Gaps = 0/132 (0%)
Frame = +1

Query 28    SYMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVVIRFGHDWDPSCMVMDLTKIAERVKNFAITYLV 207
            S+L L GW VDQAI++E R+V+IRFG D CM+MDE L IAERV+NFA+ YL
Sbjct 3     SVLLPQLRTGWHVDQAIVTETKRLVVIRFGRKNDRQCMIMDELLSSIAERVNFVAVIYLC 62

Query 208   DITQVPDFNKMVELYDPCVTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNNKINWPIADGQEFIDIVETVYR 387
            DI +V DF++MYEL DP TVMFFY+NKH+M D GTGNNNK+N+ + D QE IDI+ET++R
Sbjct 63   DIDEVSDFDEMYELTDPMTVMFFYQNKHMMCDFGTGNNNKLNFI VDDKQEMIDILETIFR 122

Query 388   GARKGRGLVVSP 423
            GARK +GLVVSP
Sbjct 123  GARKNKGLVVSP 134
    
```

Quadro 4 – sequência do SmDimp mostrando o início da tradução da proteína correspondente.

```
ATGTCTTATATGCTTTCTCACCTAACAAATGGCTGGCAAGTAGACCAGGCTATACTGTCTGAAG  
AAGACAGAGTTGTCATCATACTCGCTTCGGTCACGACTGGGATCCGTCGTGCATGGTCATGGATGA  
AACTCTTTTTAAAATCGCCGAGAGAGTGAAGAACTTCGCAATCACGTACTTAGTTGATATAACT  
CAAGTTCCAGATTTCAACAAGATGTACGAGTTGTACGATCCCTGCACTGTTATGTTCTTTTACC  
GTAATAAACACATTATGATTGACTTGGGGACAGGTAACAACAATAAAATCAACTGGCCCATAGC  
CGACGGACAGGAATTTATAGATATTGTTGAAACGGTGTATAGGGGTGCAAGAAAAGGTCGGGGT  
TTGGTTGTTTCTCCAAAAGACTATTCGACTAAGTATCGGTATTGAGTTATGTACTATTTCTTCG  
TCTTGTTATGTATTTTTTCAGTTCTTATCCTGCATTTCTGTGTTAATAAAATATTTGTAATCCG
```

```
MSYMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVVIIRFGHDWDPSCMVMDETLFKIAERVKNFAIT  
YLVDITQVPDFNKMYELYDPCTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNNKINWPIADGQEFIDIVETVY  
RGARKGRGLVVSPKDYSTKYRY
```

Figura 9 – Proteína obtida a partir da tradução do gene SmDimp.

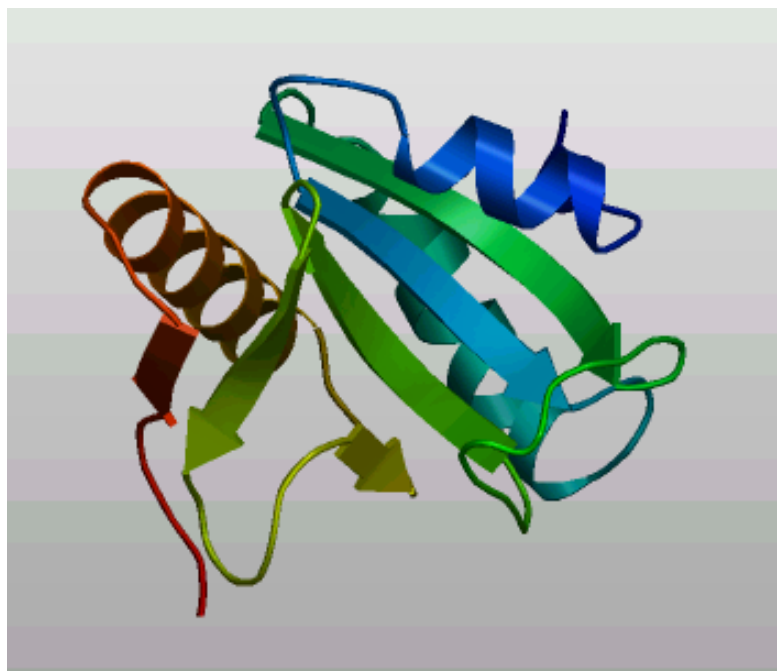


Figura 10 – Modelagem da proteína SmDimp por homologia com a estrutura cristalizada.

```
>[Template]|lsyxÅ|2.345|The crystal structure of a binary U5 snRNP
  complex
  Length = 135

Score = 249 bits (635), Expect = 3e-67
Identities = 115/135 (85%), Positives = 125/135 (92%)

Query: 3  YMLSHLTNGWQVDQAILSEEDRVVVIIRFGHDWDPSCMVMDETLFKIAERVKNFAITYLVD 62
        YML HL NGWQVDQAILSEEDRVV+IRFGHDWDP+CM MDE L+ IAE+VKNFA+ YLVD
Sbjct: 1  YMLPHLHNGWQVDQAILSEEDRVVVIIRFGHDWDP+TCMKMDEVLYSIAEKVKNFAVIYLVLD 60

Query: 63  ITQVPDFNKMVELYDPCTVMFFYRNKHIMIDLGTGNNMKINWPIADGQEFIDIVETVYRG 122
        IT+VPDFNKMVELYDPCTVMFF+RNKHIMIDLGTGNNMKINW + D QE +DI+ETVYRG
Sbjct: 61  ITEVPDFNKMVELYDPCTVMFFFRNKHIMIDLGTGNNMKINWAMEDKQEMVDIIETVYRG 120

Query: 123 ARKGRGLVVSPKDYS 137
        ARKGRGLVVSPKDYS
Sbjct: 121 ARKGRGLVVSPKDYS 135
```

Figura 11 – Alinhamento do SmDimp com a estrutura cristalizada do complexo binário snRNP , com 135 aminoácidos.

5. 2 – Análises de homologia e construção da árvore filogenética.

Através do programa BLAST-P, sequências gênicas de 10 espécies diferentes, entre elas trematódeos (*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*), nematódeos (*Caenorhabditis briggsae*, *Brugia malayi*), artrópodes (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Drosophila*), peixe (*Danio rerio*), mamífero (*Bos taurus*) e fungo (*Sclerotinia sclerotiorum*) foram analisadas. Todas elas apresentaram homologia com o gene SmDimp. A maior homologia foi observada para o gene de *S. japonicum*, o que já era esperado.

A história evolutiva desses genes foi inferida usando-se o método UPGMA (Sneath & Sokal 1973). A melhor árvore com a soma dos comprimentos totais dos ramos iguais a 2.72623583 é mostrada na Figura 12. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxons associados colocados juntos no teste de bootstrap são mostrados próximos aos ramos (500 repetições) (Felsenstein 1985). As distâncias evolutivas foram computadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965) e estão expressas em unidades de substituições de aminoácidos por sítio. Todas as posições em que faltam dados foram eliminadas do conjunto de dados (opção de completa deleção). Assim, um total de 141 posições foi obtido e as análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

O alinhamento entre as proteínas Dib1 e SmDimp mostrou que a identidade entre elas é de 62% (Quadro 3).

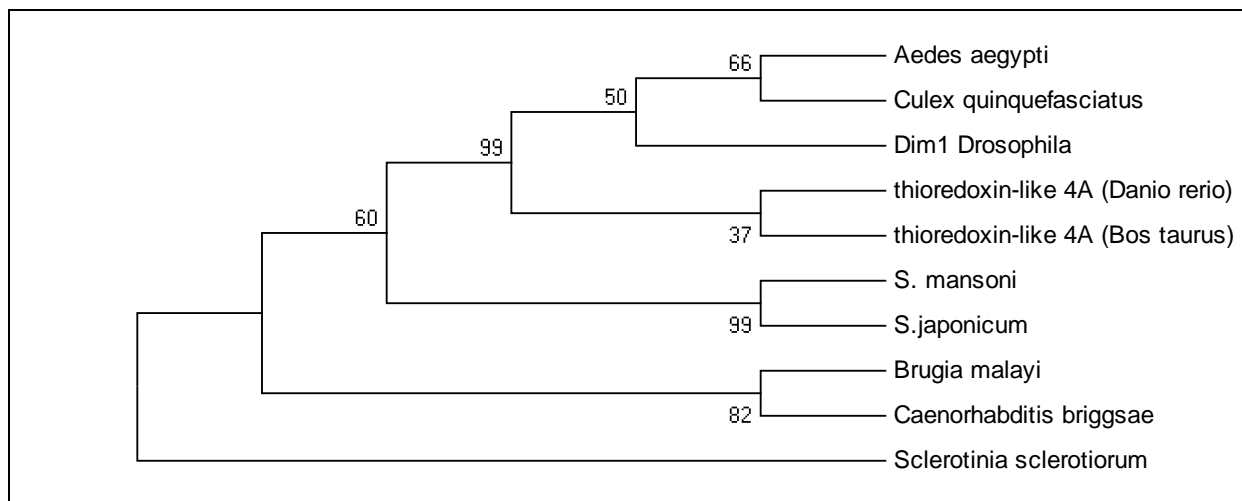


Figura 12: Análise filogenética de 10 seqüências homólogas a SmDimp de *S. mansoni* Foram analisadas 10 sequências provenientes de 10 espécies diferentes. Os números de entrada são gi|56753429| *S. japonicum*, gi|157113361| mitosis protein dim1 [*Aedes aegypti*], gi|170586758|Chain A, Human Spliceosomal Protein U5-15kd. [*Brugia malayi*], gi|157759467| Hypothetical protein CBG13531 [*Caenorhabditis briggsae* AF16], gi|170041711| mitosis protein dim1 [*Culex quinquefasciatus*], gi|28574029| Dim1 [*Drosophila melanogaster*], gi|54400404| thioredoxin-like 4A [*Danio rerio*], gi|115497060| thioredoxin-like 4A [*Bos taurus*], gi|156049005|conserved hypothetical protein [*Sclerotinia sclerotiorum* 1980].

5.3 - Amplificação do cDNA e DNA genômico de *S. mansoni* usando o par de iniciadores DimpU1/L1:

O resultado da amplificação do DNA genômico, quando comparado com a amplificação do cDNA em gel de agarose, sugeriu que este gene não apresenta seqüências de íntrons (Fig. 13)

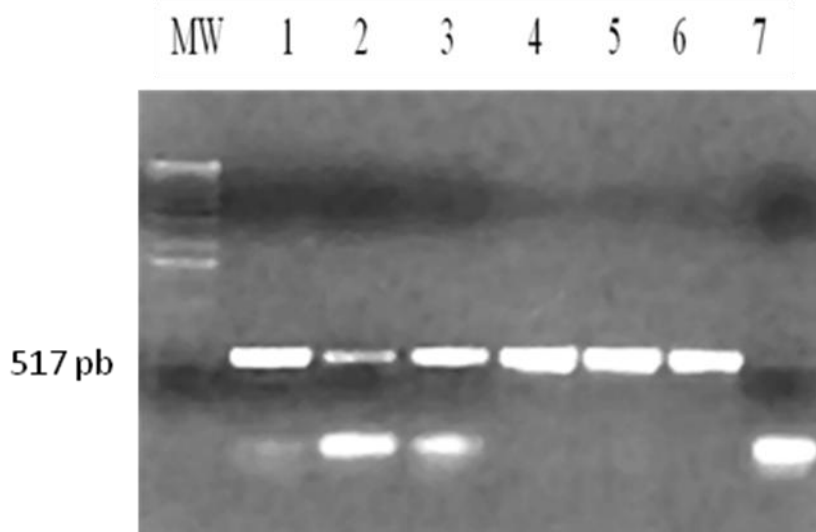
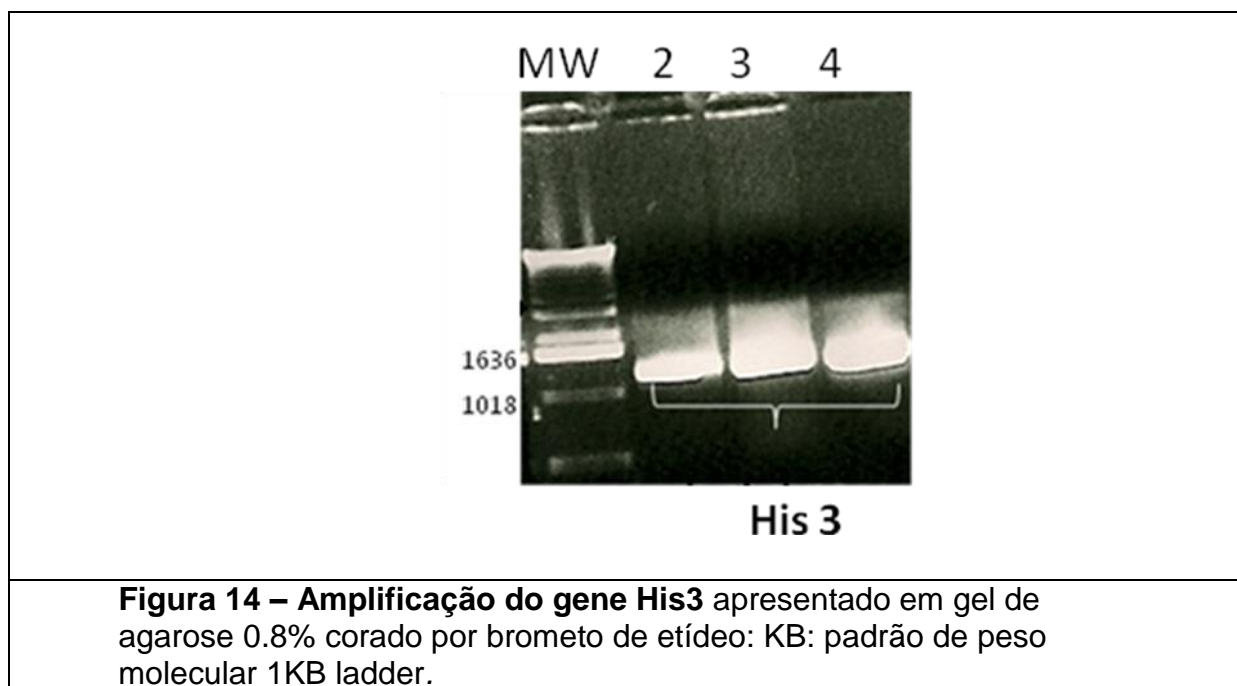


Figura 13: Gel de agarose 1% amplificando DNA genômico e cDNA para a observação da presença de íntrons. As amostras foram amplificadas usando os iniciadores Dimp1L e Dimp1U . Canaletas 1-2 DNA genômico, 4-6 cDNA; 7- branco da reação.

5.4 - Amplificação do gene His3 e manipulação genética da levedura.

O produto amplificado a partir do pDIS e contendo aproximadamente 1200 pares de bases (fig. 14) foi utilizado para a transformação das leveduras diplóides. As células resultantes desta transformação foram plaqueadas em meio seletivo. As 111 colônias obtidas neste meio foram colocadas individualmente com o auxílio de palitos de madeira em outra placa e posteriormente foram submetidas à PCR para a confirmação do nocaute.

Não houve crescimento nas placas quando algum dos aminoácidos não foi adicionado, confirmando a seleção dos aminoácidos marcadores.

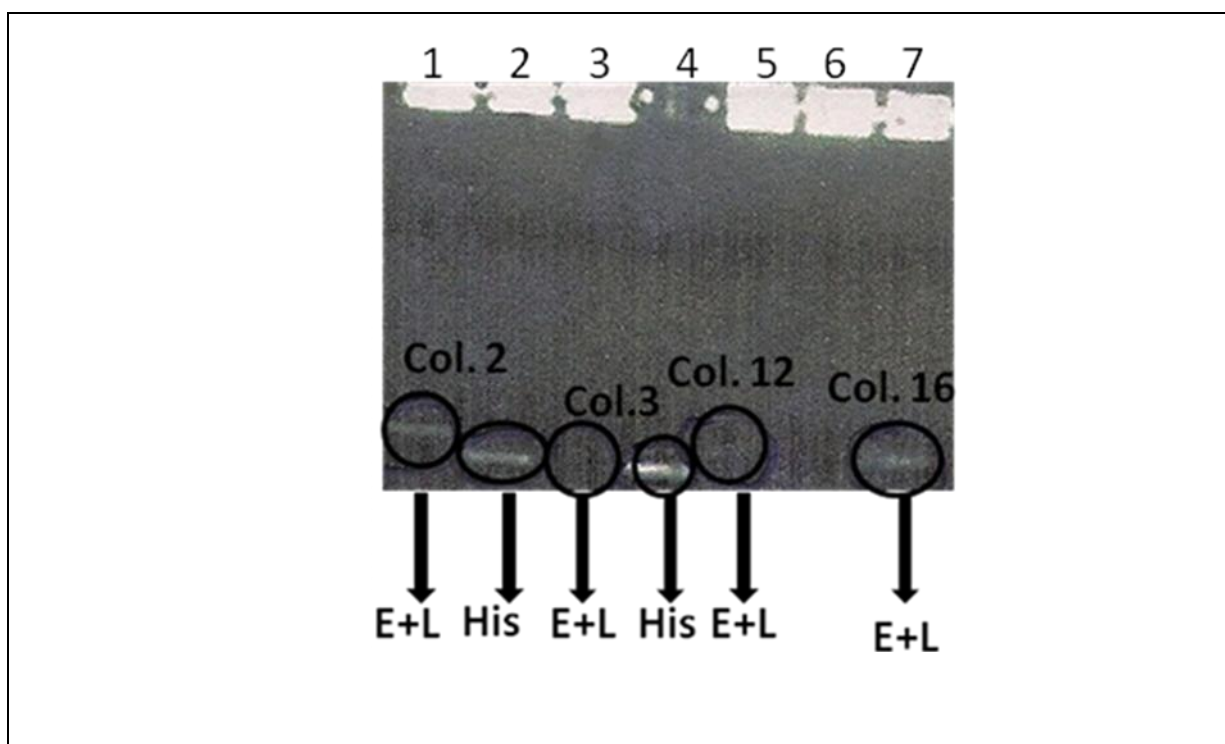
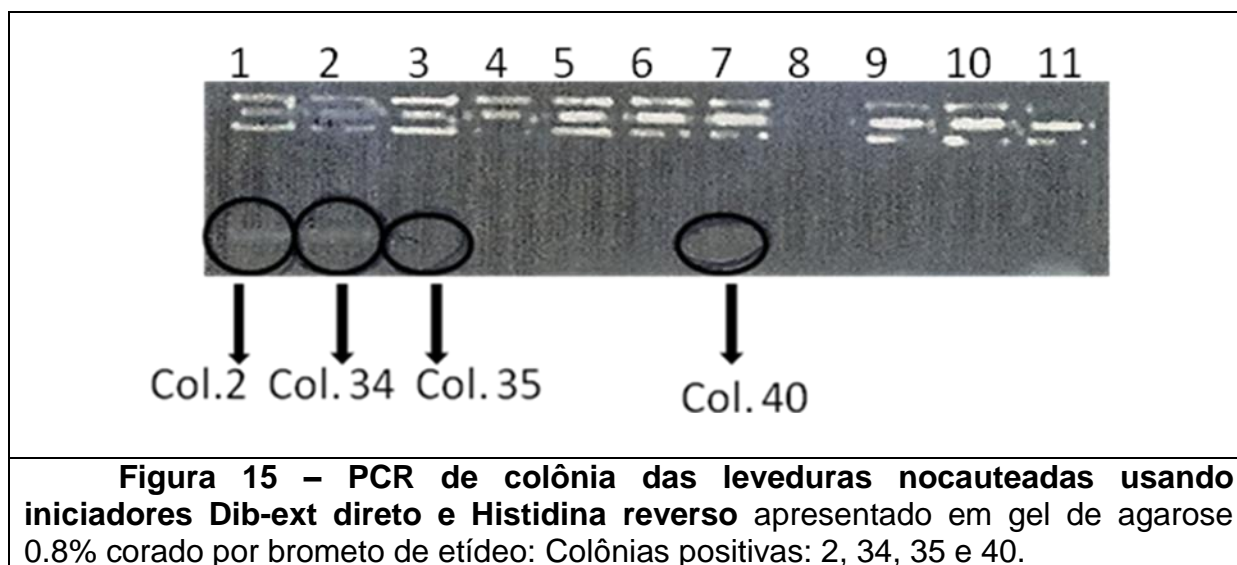


5.5 – PCR de colônia.

Das 111 colônias selecionadas nas placas sem histidina, 45 foram submetidas à reação em cadeia da polimerase, utilizando os primers Dib-ext direto e Dib-HIS3 reverse. Com esta combinação de iniciadores, só haveria produto amplificado a partir das colônias nocauteadas, ou seja, aquelas onde o gene His3 encontra-se no lugar do gene Dib1.

Das colônias testadas, 6 apresentaram PCR positiva, mostrando o produto esperado de aproximadamente 1300 pares de bases (Fig. 15 e 16). Estas colônias identificadas por números (col.2, col.12, col.16, col.34, col.35, col. 40), após crescimento por aproximadamente 20 horas em meio YPD líquido, foram congeladas em triplicatas à -70° C em 15% de glicerol.

Uma amostra da colônia 2 foi utilizada nos experimentos posteriores.



5.6 – Extração de DNA da levedura e PCR do DNA extraído.

Apesar de ter sido possível a identificação das colônias nocautes por PCR de colônia, houve dificuldades para a reprodutibilidade desses resultados e, portanto, foi decidido fazer extração de DNA genômico para a realização da PCR incluindo todos os controles necessários. Essa PCR foi realizada em diferentes tempos do projeto para se certificar da não contaminação da colônia utilizada ao longo dos experimentos. Quatro protocolos de extração de DNA total de levedura foram testados. As colônias 2 e 34 foram utilizadas neste experimento. A extração de DNA genômico foi executada de forma satisfatória com todos os protocolos testados.

As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e não apresentaram sinais de degradação. As amostras também foram analisadas no nanodrop para a dosagem deste DNA. O resultado está apresentado na Tabela 3. Esta análise confirmou aquela da eletroforese, mostrando que os protocolos D e C foram os que apresentaram melhores resultados.

O DNA das duas colônias de levedura foi utilizado, então, em reações de PCR com várias combinações de iniciadores, que confirmaram tratar-se de colônias diplóides e nocauteadas (Fig. 17A). Os resultados esperados para estas reações com as diferentes combinações de iniciadores encontram-se esquematizados na figura 17B.

Tabela 3 – Dosagem do DNA em Nanodrop.

Absorbância	260	280	A1/A2	[]ng/μl
34A	0,37	0,23	1,59	18,7
34B	1,44	0,82	1,76	72,4
34C	2,48	1,23	2,01	124,3
34D	3,36	1,70	1,97	168,2
2 A	1,38	0,88	1,56	69,4
2 B	0,96	0,60	1,60	48,4
2 C	6,46	3,16	2,04	323,2
2 D	0,96	0,50	1,90	48,2

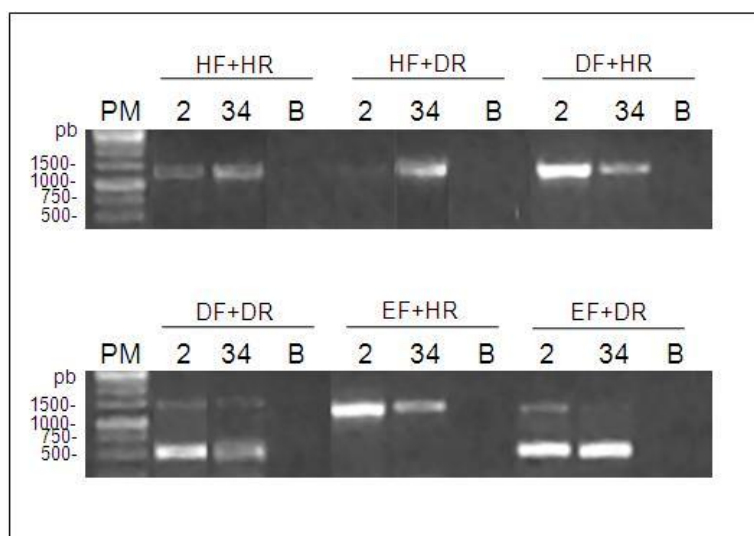


Figura 17 – Confirmação de nocaute por PCR usando DNAs genômicos extraídos das colônias 2 e 34, apresentado em gel de agarose 0.8% corado por brometo de etídeo: HF e HR iniciadores para o gene His3 (aproximadamente 1200 pb); HF+DR (aproximadamente 1200 pb); DF+HR (aproximadamente 1400 pb); DF e DR, iniciadores para o gene Dib1(aproximadamente 430 pb); EF+HR (aproximadamente 1400 pb); EF+DR (aproximadamente 500 pb). PM Padrão de peso molecular 1KB ladder; B Branco da reação.

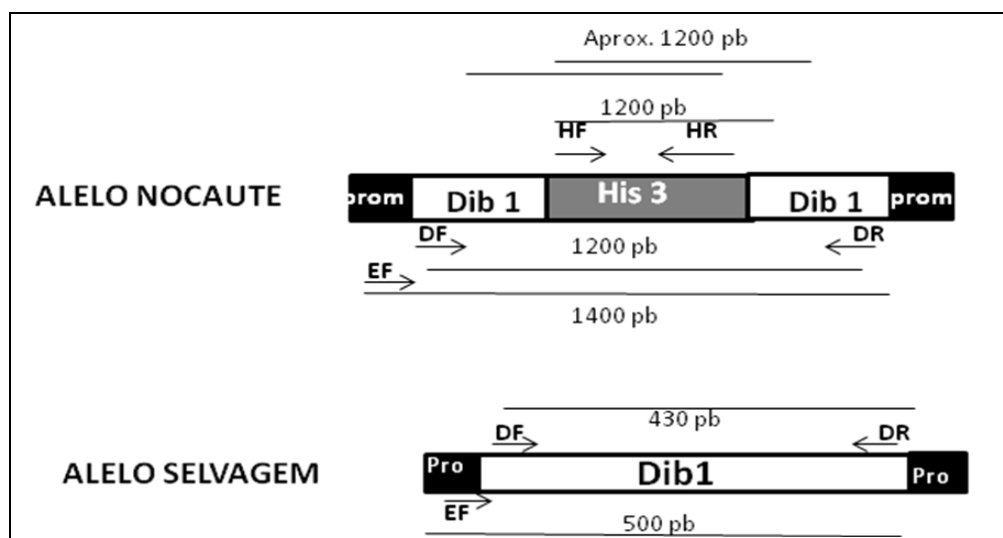


Figura 17B – Resultados esperados a partir da amplificação do DNA extraído das leveduras nocaute, para cada par de iniciadores utilizado.

5.7 – Amplificação dos genes SmDimp e Dib1 e clonagem nos vetores.

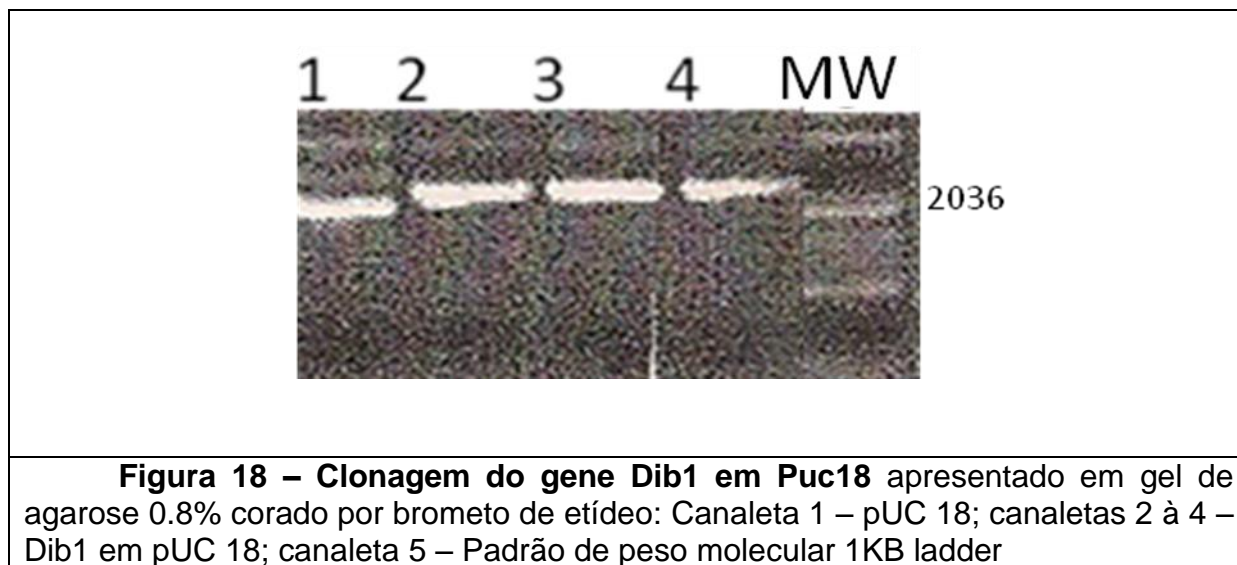
O gene SmDimp que encontrava-se clonado do vetor pBlueScript, foi reamplificado a partir deste vetor, utilizando o par de iniciadores DimpU1 e DimpL1. cinco microlitros do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, mostrando uma banda com aproximadamente 530 pares de bases, referente ao gene SmDimp.

O gene Dib1 foi amplificado a partir do DNA total de levedura utilizando-se o par de iniciadores DibU1 e DibL1. Cinco microlitros deste produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose apresentando uma banda com 430 pares de bases, referente ao gene Dib1. Estes genes foram clonados no vetor pUC18 (fig. 18) para sequenciamento. Em seguida, o gene foram reamplificado deste vetor utilizando-se o mesmo par de iniciadores, e seu produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O gene SmDimp foi seqüenciado diretamente do pBlueScript. A sequência deste gene, bem como a do Dib1, encontra-se no anexo.

Como o gene Dib1 foi amplificado a partir de um iniciador sem sítio para enzima de restrição, a clonagem deste gene, e também do SmDimp em vetor de expressão foi feita em sítio SmaI do vetor pYEDP (fig.20). O tratamento do vetor com esta enzima permite a clonagem de qualquer inserto sem sítio específico, por gerar extremidades cegas. Após a digestão deste vetor com a enzima e do processo de desfosforilação do mesmo, os genes foram clonados, independentemente neste vetor. Após clonagem, foi realizada mini-prep das colônias positivas (brancas). Como a clonagem em sítio único no vetor poderia resultar em insertos na orientação contrária, foi necessário selecionar os clones cujos insertos se encontravam na orientação correta. Com este objetivo, os vetores recombinantes foram submetidos à digestão pela enzima BamHI. O vetor apresenta sítio para esta enzima, e os insertos também (posição 126 do SmDimp e 231 do Dib1). Assim, baseado no tamanho de 126 pb (SmDimp) ou 231(Dib1) dos produtos resultantes, foram selecionados os clones que apresentavam os insertos na orientação correta (Figs 21 A e B).

SmDimp e Dib1 foram clonados também no vetor comercial pGEM-T Easy, após serem reamplificados a partir do pYEDP utilizando iniciadores contendo sítios para as enzimas EcoRI e XbaI. O vetor apresenta dois sítios para EcoRI, onde os genes foram clonados individualmente. Estes plasmídeos recombinantes foram transformados em bactérias eletrocompetentes, que cresceram em placas seletivas, contendo ampicilina. As colônias brancas foram submetidas à PCR com os pares de iniciadores DibU/L para aquelas transformadas com o gene Dib1 e DimpU/L para aquelas com o gene SmDimp. O plasmídeo daquelas que apresentaram PCR positiva, foram recuperadas através de minipreparação de plasmídeo (fig. 22). Os insertos clonados nestes plasmídeos foram recuperados após a digestão inicialmente com a enzima XbaI, e em seguida com a enzima EcoRI e subclonados no vetor pYTS, previamente tratado com as mesmas enzimas. Apenas o SmDimp foi clonado com sucesso no vetor pYTS. Como não conseguimos clonar o Dib1 neste vetor, apenas o primeiro foi utilizado na transformação das leveduras.



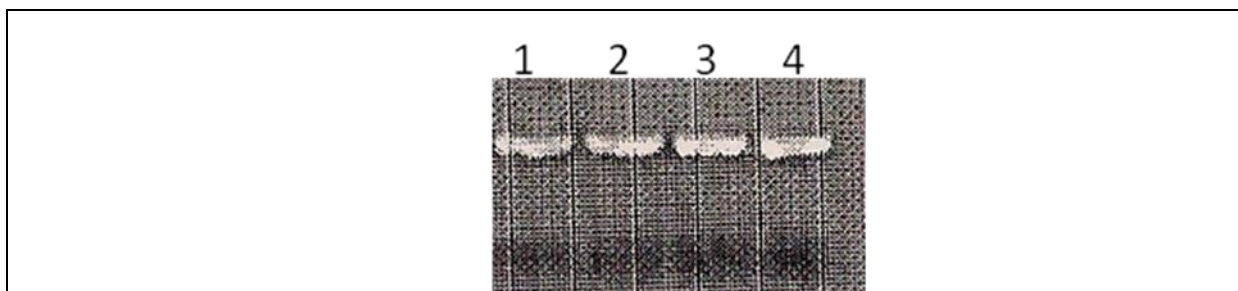
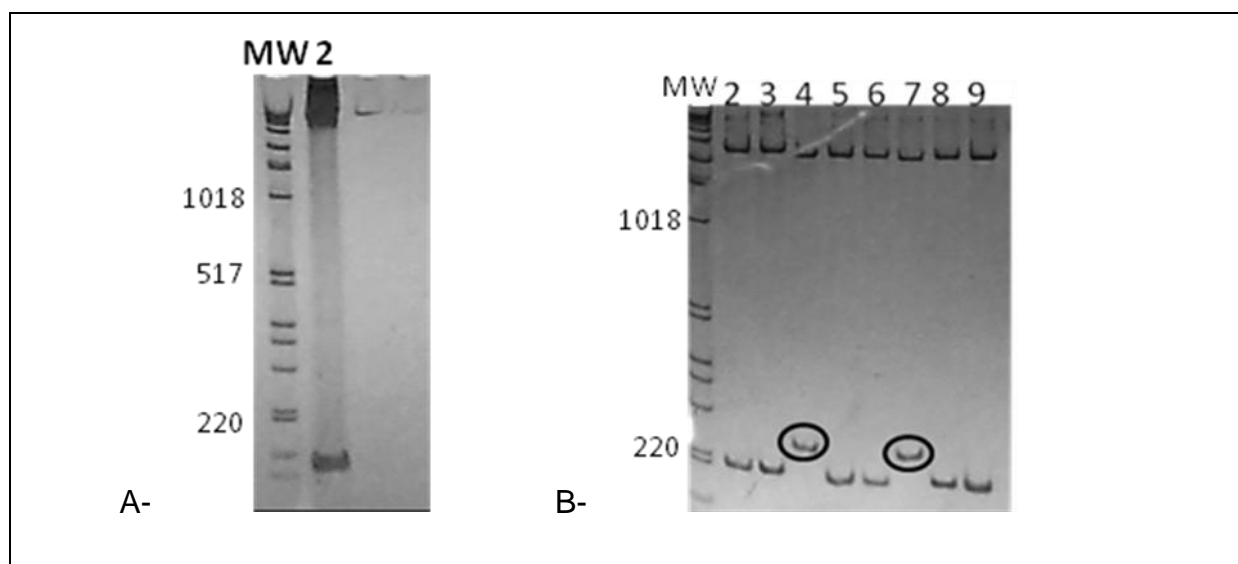
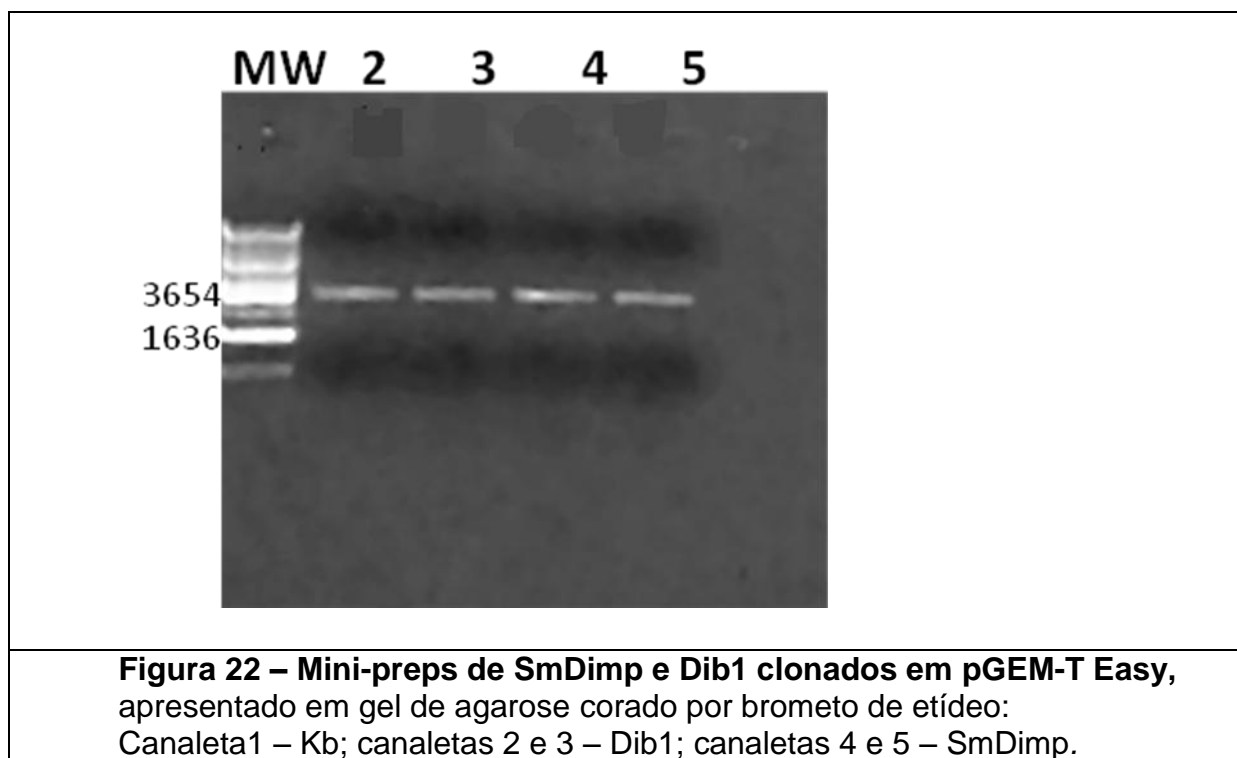


Figura 20 – Clonagem dos genes SmDimp e Dib1 em pYEDP apresentado em gel de agarose 0.8% corado por brometo de etídeo : canaletas 1 e 2 – Dib1 em pYEDP; canaletas 3 e 4 – SmDimp em pYEDP.



21 A e B - Digestão do pYEDP por BamHI para verificação da orientação correta, apresentado em gel de poliácridamida 6% corado por prata:
A - SmDimp digerido por BamHI;
B - Dib1 digeridos por BamHI. Orientação correta – clones 3 (can.4) e 6 (can.7).



5.8 - Sequenciamento dos genes SmDimp e Dib1.

Os vetores pBlueScript e pUC18 recombinantes foram utilizados para a reação de seqüenciamento utilizando os iniciadores M13 direto e reverso, segundo método de Sanger (Sanger, 1997). Os sequenciamentos resultaram em um contig de 536 pares de bases e outro de 432 pares de bases. As seqüências foram alinhadas (www.ncbi.nlm.nih.gov) e apresentaram homologia com genes SmDimp de *Schistosoma* e Dib1 *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente, confirmando tratar-se das seqüências corretas.

As seqüências e contigs obtidos estão mostradas no anexo.

5.9 - Transformação da levedura nocauteadas com o plasmídeo pYEDP recombinante para os genes Dib1 e SmDimp e vazios.

Uma amostra da colônia 2 nocauteada para o gene Dib1 foi transformadas com os vetores pYEDP recombinantes para os genes SmDimp e Dib1(controle) e vazio com o objetivo de determinar se o gene do *S. mansoni* seria capaz de complementar a função do gene na levedura.

Após a transformação pelo método acetato de lítio/ DNA de esperma de salmão/PEG, as leveduras tratadas foram plaqueadas em meio SD suplementado por glicose e aminoácidos. Neste caso, a seleção das leveduras que receberam os vetores ocorre em meio com triptofano e metionina. Como os vetores possuem o gene URA3 para uracila, somente leveduras contendo os vetores são capazes de crescer neste meio. Após aproximadamente 3 dias de incubação a 30° C, as colônias encontradas nas placas foram transferidas para uma nova placa com as mesmas condições, incubadas a 30° C por mais 3 dias. Após este período, algumas colônias foram selecionadas e colocadas individualmente em meio pré-esporulação, e transferidas após crescimento das células para o meio Kac, afim de induzir a esporulação.

5.10 - Transformação da levedura nocauteadas com o plasmídeo pYTS recombinante para os gene SmDimp e vazios.

As leveduras nocauteadas e transformadas pelos plasmídeos pYEDP recombinantes não apresentaram esporos, após a indução dos mesmos em meios de cultura adequados. Uma possibilidade para este fenótipo é a forte expressão do promotor do plasmídeo, que é induzida por galactose, o que poderia causar uma superexpressão. Assim, outro plasmídeo possuindo um promotor de expressão basal e que já havia sido demonstrado efetivo em outros experimentos de complementação, o pYTS, foi utilizado para tentar obter-se esporos. Apenas a

clonagem do SmDimp foi bem sucedida neste vetor, após ter sido retirado do pGEM-T Easy e, portanto, apenas este vetor foi utilizado para o experimento de transformação, além do plasmídeo vazio.

A transformação foi realizada através do mesmo método utilizado para a transformação do pYEDP, e as leveduras tratadas foram plaqueadas em meio SD suplementado por glicose e aminoácidos. Neste caso, a seleção das leveduras também se faz pelos mesmos aminoácidos após aproximadamente 3 dias de incubação a 30°C. As colônias encontradas nas placas foram transferidas para uma nova placa com as mesmas condições, incubadas a 30° C por mais 3 dias.

5.11 - Indução à esporulação das leveduras nocauteadas e transformadas com os plasmídeos recombinantes e vazios.

A observação dos fenótipos induzidos pelo genótipo selvagem (Dib1) e pela transformação (Dib1_plasmídeo) deve ser feita através da observação nas leveduras haplóides. Como neste estudo utilizamos linhagem de leveduras diplóides, fez-se necessário a obtenção de células haplóides através da esporulação. Para tanto, as leveduras nocauteadas e transformadas com os vetores já citados, foram replaqueadas em meio de cultura Kac acrescido de galactose e aminoácidos essenciais (metionina e triptofano). Estas leveduras foram incubadas a 30° C. O desenvolvimento das células era acompanhado a cada 48 horas a procura dos esporos. As leveduras nocauteadas mas sem transformação por plasmídeos, também forma induzidas a esporular, bem como leveduras diplóides com genótipo selvagem.

Após 48 horas, as células ainda encontravam-se em crescimento, com muitas leveduras pequenas e muitas outras em reprodução por brotamento, além da presença de muitos vacúolos nestas células. Após 72 horas, as leveduras selvagens esporularam.

A partir de 96 horas, era possível observar granulações no citoplasma das células, que estavam maiores, e poucas em brotamento, mas nenhuma das transformantes apresentava esporos.

Após 7 dias de incubação foram encontrados esporos apenas nas leveduras transformadas com o vetor pYEDP vazio e nas leveduras nocauteadas sem plasmídeos. As células esporuladas eram maiores que as não esporuladas, mas eram escassas. Poucos esporos foram visualizados (Fig.23).

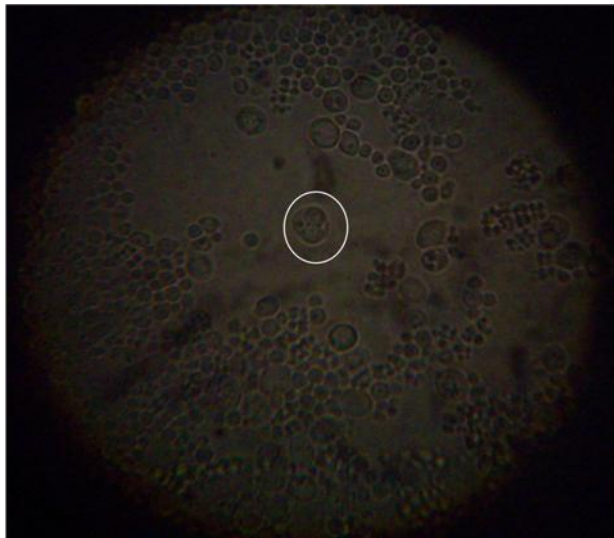
As leveduras transformadas com pYEDP transformantes, embora fossem incubadas nas mesmas condições, não apresentavam esporos. Este fenótipo ocorreu tanto naquelas transformadas pelo plasmídeo contendo o gene *Dib1* quanto naquelas contendo o gene *SmDimp*.

Como o vetor pYEDP possui promotor ativado por galactose, este fenótipo pode ter sido gerado graças à superexpressão do gene *Dib1* da levedura, com fenótipo semelhante para a transformação com o gene *SmDimp* também em pYEDP. A indução à esporulação de leveduras transformadas com o vetor pYTS, cujo promotor apresenta expressão basal, vazio e recombinante, com o gene *SmDimp*, mostrou o mesmo resultado anterior, com ausência de esporos para o recombinante e poucos esporos para o vazio.

Tanto nas leveduras transformadas pelo pYEDP, quanto para aquelas com o pYTS, os ascos obtidos nas leveduras que receberam o plasmídeo vazio, não apresentaram 4 esporos.



A



B

Figura 23 – Esporos obtidos em leveduras transformadas por plasmídeos vazios.

A- pYEDP

B - pYTS

6 – DISCUSSÃO

6.1 – Estudos computacionais sobre a proteína SmDimp.

Através da tradução do gene SmDimp, a sequência da proteína foi obtida, apresentando 142 aminoácidos, com uma janela aberta de leitura iniciada na primeira base nitrogenada. Esta sequência de aminoácidos mostrou características de uma proteína solúvel, com média de hidrofobicidade igual a -0.278873 e com maior probabilidade de localizar-se no citoplasma, o que não estaria de acordo com a função da proteína, que atua no mecanismo de “splicing” do pré-mRNA conforme já descrito para o homólogo em levedura. Embora a maior probabilidade seja a de que a proteína encontre-se no citoplasma, a localização nuclear é a segunda maior probabilidade. Neste caso, a função da proteína seria confirmada pela localização da mesma. O ponto isoelétrico teórico da proteína é de 5.56, apresentando afinidade por pH básico.

Análise no Pfam mostrou tratar-se de uma proteína que faz parte da família de genes Dim1. Esta família pertence a um ramo da superfamília Tioredoxina. Tioredoxinas são pequenas proteínas redox que têm sido encontradas em todos os reinos de organismos vivos. Tioredoxinas são de um modo geral, proteínas citoplasmáticas e servem como proteínas dissulfeto redutase. Elas interagem com uma ampla gama de proteínas redox por um mecanismo baseado na oxidação reversível de 2 grupos cisteína-tiol para um dissulfeto, acompanhados da transferência de 2 elétrons e 2 prótons. O resultado é a interconversão covalente de um dissulfeto e um ditiol (Holmgren, 1985; Holmgren, 1989; Holmgren, 1995; Martin 1995).

Comparado à tioredoxina humana, proteínas específicas U5-15 KD do U5 snRNP contém 37 resíduos adicionais que podem causar mudanças estruturais que provavelmente formam sítios de ligação para outras proteínas do spliceossoma ou

RNA. Embora a U5-15kD aparentemente necessite da atividade dissulfato isomerase, ela é estritamente necessária para o “Splicing” do pré-mRNA (Reuter et al., 1999) .

Dim1p é extraordinariamente bem conservada entre os eucariotos e é presente em várias espécies, incluindo mamíferos, plantas, leveduras e nematódeos com 79% de identidade entre as sequências ao longo de todos os 142 aminoácidos (Zhang et al., 1999). No alinhamento da proteína SmDimp com a estrutura cristalizada de uma proteína binária do complexo U5snRN, a identidade foi de aproximadamente 85% entre as duas. A modelagem da proteína SmDimp mostrou que esta possui estrutura terciária, com 7 folhas beta, sendo 3 delas paralelas e duas antiparalelas. A proteína hDim1 mostra um par de paralelas e um par de antiparalelas. Além disso, esta proteína apresenta um motivo Asp-x-x-Cys (aminoácidos 35-38) em substituição ao motivo Cys-x-x-Cys, que é uma ponte dissulfeto funcional típica da família Tiorredoxina, mas que não se mostra conservada na família Dimp (Simeoni & Divita, 2007). A proteína SmDimp apresentou, assim como a proteína hDim1p, Asp-x-x-Cys, na mesma posição, mostrando identidade com a mesma.

A árvore filogenética construída a partir da análise em banco de dados de 10 sequências provenientes de 10 espécies, onde todas elas apresentaram homologia com o gene SmDimp de *Schistosoma mansoni*, confirmam a alta identidade entre os genes homólogos e suas proteína, corroborando com a possibilidade de todos esses genes, inclusive o SmDimp estarem envolvidos no mesmo processo, neste caso, a participação no “splicing” do pré-mRNA.

6.2. Complementação fenotípica em leveduras.

Saccharomyces cerevisiae tem sido o organismo eucarioto de escolha para muitos estudos em genética molecular (Strathern et al., 1982). A capacidade de reproduzir-se sexuadamente, gerando indivíduos diplóides heterotáticos que podem apresentar dois tipos sexuais, a e α , ou uma classe homotática, gerada por fusão de células derivadas de um único esporo, bem como de reproduzir-se assexuadamente gerando indivíduos haplóides através da esporulação de indivíduos diplóides, é um dos motivos de sua ampla utilização nesses trabalhos de genética molecular. Através de análises das tétrades formadas na esporulação, pode-se observar a segregação de marcadores heterozigóticos, bem como a ligação entre dois genes ou entre seus centrômeros. Aberrações cromossômicas também podem ser analisadas através da letalidade de esporos obtidos em uma amostra de tétrades (Perkins & Berry, 1977).

Estudos de recombinação gênica são feitos utilizando-se organismos capazes de produzir tétrades (Fogel et al., 1979). Os mecanismos de recombinação mitótica podem ser estimulados para observação de certas mutações cancerígenas em mamíferos e em estudos de recombinação gênica em leveduras (Zimmermann et al., 1966). A recombinação mitótica pode ser estimulada através de vários mecanismos, como a exposição à luz ultravioleta, radiação ionizante ou tratamentos químicos.

Culturas de leveduras esporuladas apresentam tipicamente, ascus com dois, três ou quatro esporos. Normalmente apenas ascus contendo 4 esporos são dissecados por micromanipulação, para observação de fenômenos de recombinação gênica (Strathern et al., 1982).

Neste trabalho, utilizamos tratamento químico para estimular a recombinação gênica nas leveduras diplóides, conforme outros autores (Santos, 2004, Santos et al., 2007). O objetivo neste caso era observar se o gene *SmDimp* complementa a deleção do gene na levedura.

A interrupção do gene foi bem sucedida e confirmada por seleção no meio de cultura daquelas leveduras que receberam o gene *His3* e que, portanto, cresceram

em meio deficiente para este aminoácido. Como em leveduras não é essencial uma região de homologia extensa para a recombinação acontecer, foi necessário selecionar aquelas cuja recombinação tenha ocorrido entre o gene *Dib1* e o DNA exógeno através de reação de PCR. Para tanto, 45 dos 111 clones foram submetidos à reação, utilizando iniciador que se anela a região anterior ao gene *Dib1* juntamente com o iniciador que se anela ao gene *His3*. Dessas 45 colônias, seis apresentaram produtos de reação. Isto significa que nestas 6 colônias, a disrupção ocorreu conforme esperado, já que somente nessa situação (*His3* no lugar do *Dib1*), haveria amplificação. As colônias escolhidas para continuar esse trabalho foram testadas outras vezes durante o desenvolvimento do trabalho para termos certeza que o fenótipo tinha sido mantido. Tanto os testes com aminoácidos marcadores quanto a reação de PCR feita a partir do DNA genômico extraído dessas leveduras, comprovaram tratar-se das nocauteadas e que não havia contaminação das colônias.

A complementação fenotípica seria testada através da transformação das leveduras nocauteadas com o gene *SmDimp* clonado em plasmídeos, e com o gene *Dib1* clonado nos mesmos plasmídeos como controle deste experimento. Vários experimentos semelhantes já foram realizados para estudos de complementação fenotípica em leveduras. Genes de Protozoários como *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei*. Proteínas de *Arabidopsis thaliana* também foram estudadas através de complementação fenotípica em levedura (Gonzales et al., 2007; Guerine et al., 2005; Volkman et al., 1995; Hernandez et al., 2009, Beaudoin et al., 2009).

Estudos de complementação fenotípica para genes de *S. mansoni* homólogos à genes de *S. cerevisiae* também já foram realizados para determinar a função destes genes no Trematódeo. Santos et al., em 2002, realizou estudos de complementação fenotípica em levedura para caracterização do gene *SMRhol*, que faz parte de uma família cujas atividades gênicas estão relacionadas ao controle de diversas atividades celulares, apresentando complementação positiva em um experimento de nocaute do gene da levedura. O gene homólogo ao *HRT1* da levedura e envolvido em processos de modificação covalente de proteínas que

regula vários processos biológicos, também apresentou complementação fenotípica em leveduras (Santos et al., 2007). Nestes dois estudos, o nocaute foi feito em leveduras diplóides e os genes do *S. mansoni* foram clonados no vetor pYEDP, e transformados nestas leveduras nocauteadas. Assim, a verificação dos fenótipos obtidos e, conseqüente resultado da complementação positiva nestes casos, foram possíveis após a obtenção dos esporos destas colônias e crescimento das colônias haplóides derivadas destes esporos, após o isolamento dos mesmos em meios de cultura seletivos.

Para o estudo de complementação do gene SmDimp de *S. mansoni* em levedura, metodologia semelhante aos dois trabalhos citados acima foi utilizada, inclusive com a clonagem do gene SmDimp no vetor de expressão pYEDP. Os fenótipos obtidos aqui, também seriam avaliados após obtenção dos esporos e micromanipulação para separação e crescimento dos mesmos nos meios seletivos adequados. Para este fim, as leveduras nocauteadas e transformadas foram colocadas em meio de cultura adequado, para estimular esta esporulação. Entretanto, a obtenção de esporos por essas colônias não ocorreu. Presumindo-se que a esporulação possa não ter ocorrido devido a super expressão dos genes clonados no plasmídeo pYEDP, outro plasmídeo contendo um promotor para o gene Rho1 de *S. mansoni* foi também utilizado para a clonagem do gene SmDimp. Novamente, não foram obtidos esporos da leveduras transformadas com esse plasmídeo.

Sabe-se que o processo de esporulação em leveduras é dependente de fatores fisiológicos. A ausência de fontes de nitrogênio é essencial para o processo de esporulação. A adição de amônia no meio de cultura impede a esporulação. Esta inibição se deve tanto à presença da própria amônia, quanto de metabólitos gerados a partir dela (Strathern et al., 1982). Aparentemente, a amônia adicionada ao meio de cultura bloqueia o aumento de proteases B e C e a atividade da 1,4-amilglucosidase, normalmente vistos durante a esporulação (Opheim, 1979). Alguns aminoácidos adicionados ao meio parecem apresentar efeito inibitório semelhante à amônia, como a metionina por exemplo. Esta inibição, no entanto, não parece estar relacionada à utilização desses aminoácidos como fonte de nitrogênio, já que uréia e

glutamato, que podem atuar como fonte de nitrogênio, têm baixo efeito inibitório sobre a esporulação (Strathern et al., 1982).

Outro fator fisiológico importante para a esporulação é a presença de carbono não fermentável, como o do acetato, que participa da síntese de macromoléculas durante a esporulação. Sob condições limitadas de acetato, o número de esporos por asco diminui. A glicose, também é um importante inibidor da esporulação, uma vez que gera a inibição de enzimas gliconeogênicas, que atuam na utilização de carboidratos de reserva, necessária durante a esporulação (Strathern et al., 1982). Assim, além de aumentar os níveis de açúcar, a glicose aumenta a quantidade de CO₂, limitando a esporulação.

Assim, os meios de cultura comumente usados para a esporulação contêm 1% de acetato de potássio, suplementado por aminoácidos essenciais, e pH próximo ao neutro. Pode-se adicionar 0,1% de glicose e 0,25% de extrato de levedura, para permitir a ocorrência de mitoses antes da esporulação, já que normalmente, quando as leveduras são transferidas do meio de pré-esporulação para o meio de esporulação, esta divisão mitótica cessa. (Esposito & Esposito, 1969).

O processo de esporulação raramente é 100% eficiente, mesmo quando as condições do meio são favoráveis. Entre 15 e 25% das leveduras não esporulam em condições ótimas de incubação, e nem todas as células terminam o processo. A formação de ascos com 4 esporos depende de fatores fisiológicos e do genótipo celular. Também não há sincronismo na produção dos esporos (Strathern et al., 1982).

Além dos fatores fisiológicos, fatores genéticos também são importantes na formação de esporos. Vários genes influenciam nos processos de divisão celular. Muitos deles são indispensáveis para o processo de esporulação mas não são essenciais para a mitose. Os genes cujos produtos funcionam apenas na esporulação independem das respostas celulares às condições do meio. Os metabolismos do RNA e das proteínas encontram-se alterados durante a esporulação. Ocorre um aumento na síntese de RNA logo após a indução à esporulação, sendo máximo após aproximadamente 6 horas, e declinando após 10 horas, aproximadamente. Este declínio varia entre 50% e total, próximo à formação

dos esporos (Strathern et al., 1982). A síntese de RNA é acompanhada de intensa degradação do RNA pré-existente (50-70%). Pelo menos parte desta degradação é esporulação-específica (Hopper et al., 1974). Populações específicas de mRNA são vistas durante a esporulação. Essas, correspondem a cerca de 7% do total de mRNA produzido e é um aspecto da regulação gênica durante a meiose e desenvolvimento dos esporos, que acontece ao nível da transcrição (Mills, 1980). A síntese de RNA ribossomal diminui, mas a síntese protéica aumenta, sendo necessária até o último estágio de esporulação, embora haja declínio de proteínas pré-existentes. Na ausência de fontes de nitrogênio, a síntese de proteínas depende da concentração interna de aminoácidos, e o suplemento de nitrogênio vem da degradação de proteínas produzidas na fase vegetativa das leveduras. Estas concentrações internas diminuem em cerca de 30% em relação à célula vegetativa (Ramirez & Miller, 1964). Assim, a degradação de proteínas vegetativas aumenta proporcionalmente ao aumento da síntese protéica na esporulação, sendo algumas dessas proteínas específicas desta fase.

Neste trabalho, as leveduras transformadas com o gene SmDimp não foram capazes de produzir esporos. Também não houve qualquer esporo naquelas transformadas com o gene Dib1 na própria levedura. As leveduras diplóides nocauteadas usadas nesta transformação eram da mesma linhagem daquelas utilizadas anteriormente por Santos e colaboradores em 2002 e por Santos e colaboradores em 2007. Em ambos os trabalhos, houve esporulação, embora, conforme a autora do último trabalho citado, o número de esporos gerados pelas leveduras nocauteadas contendo o gene SmRbx foi inferior se comparado aos controles usados naquele trabalho, leveduras diplóides selvagens e leveduras nocaute sem SmRbx. Nas leveduras usadas nos trabalhos acima, como neste, o aminoácido metionina era adicionado ao meio de cultura já que é um dos aminoácidos essenciais à levedura. Este aminoácido é, conhecidamente um inibidor da esporulação o que pode explicar a baixa eficiência na esporulação em todos estes trabalhos. A inibição por outros fatores fisiológicos relacionados ao meio de cultura neste trabalho pode ter ocorrido, porque houve baixa esporulação nos

controles utilizados: leveduras diplóides selvagens, diplóides nocauteadas sem SmDimp ou Dib1, e também nas nocauteadas e transformadas pelos vetores vazios.

Desta forma, fatores genéticos podem ser os responsáveis por esta ausência de esporulação. O gene Dib1, utilizado neste trabalho, está envolvido em processos de regulação gênica, fazendo parte de uma família de genes que interferem no ciclo celular. Em *S. cerevisiae*, a função deste gene está relacionada ao sistema de “splicing” do pré-mRNA, interferindo indiretamente no ciclo celular. Sabe-se que a deleção do gene leva a levedura a um fenótipo de letalidade, mas não há informações sobre o fenótipo gerado por super expressão do gene. Mutações no gene humano hDim1, homólogo ao Dib1, quando tem uma extensão carboxi-terminal de aproximadamente 14 aminoácidos removida, gera uma forma negativa dominante da proteína hDim1, cuja super produção induz uma continuidade do ciclo celular em G2, provavelmente porque este resíduo atua mediando a interação da proteína Dim1 com moléculas ou substratos associados (Zhang et al., 1999).

A super expressão do gene Dib1 neste caso, pode ser responsável pela ausência de esporulação das leveduras. Esta super expressão deve interferir na regulação de genes importantes na esporulação e pode resultar em baixa degradação do RNA pré-existente, aumento de síntese de RNA ribossomal, ou não há suficiente degradação de proteínas pré-existentes. Outra possibilidade é a de que a inibição devido à presença de metionina no meio de cultura, que não impediu a esporulação no caso das leveduras nocauteadas e transformadas apenas com plasmídeo vazio, poderia ser reforçada pela super expressão do Dib1, inibindo a esporulação. Além disso, como já citado, durante a esporulação não ocorre divisão meiótica das células, e aquelas que já tinham iniciado este processo não continuam. Ainda que a interferência do gene na mitose seja indireta, a super expressão pode gerar continuidade da divisão mitótica, impedindo a esporulação das leveduras transformadas.

Embora a complementação fenotípica do gene Dib1 pelo SmDimp não pôde ser comprovada através do fenótipo das colônias haplóides, o mesmo efeito da super expressão do Dib1 ocorreu no caso das leveduras transformadas pelo gene

do *S. mansoni*. Assim, pode-se inferir que as proteínas produzidas pelos dois genes têm o mesmo efeito de super expressão, indicando assim, que o SmDimp complementaria a função no seu homólogo Dib1.

7- CONCLUSÃO

- O gene Dib1 de levedura gera um fenótipo de letalidade quando ausente. Neste trabalho, os resultados obtidos indicam que a super expressão deste gene poderia inibir a esporulação das leveduras, provavelmente por interferir na expressão de genes importantes para este processo, mas possivelmente em associação com fatores fisiológicos, como a adição de metionina, conhecidamente inibidor de esporulação.
- O fenótipo gerado pela super expressão do gene Dib1, foi o mesmo obtido naquelas leveduras transformadas com o gene SmDimp, de *S. mansoni*, ou seja, inibição da esporulação.
- Análises de homologia entre SmDimp e outros genes homólogos, bem como a modelagem da proteína, as características por ela apresentadas e a construção da árvore filogenética, mostram que há extrema relação entre SmDimp e os genes homólogos em outras espécies, e que esta proteína é bem conservada dentro dos grupos.
- Embora não tenha sido possível a verificação da expressão do fenótipo conferido às leveduras nocauteadas quando estas foram transformadas pelo gene SmDimp homólogo ao Dib1 após a disrupção deste gene, uma vez que houve a inibição da esporulação, podemos inferir que a função do gene SmDimp complementa a função do seu homólogo na levedura, não só pelas características da proteína, mas pelo fenótipo de super expressão que ocorreu tanto nos controles, transformados pelo próprio Dib1, quanto por aquelas transfectadas pelo SmDimp.

8 – PERSPECTIVAS

- Como o vetor pYEDP apresenta um promotor forte, ativado pela galactose, este pode ser um fator gerador de super expressão dos genes nele clonado. Embora o vetor pYTS usado neste trabalho, apresente expressão mais basal, é possível que um nível de expressão acima do fisiológico tenha ainda ocorrido com esse plasmídeo. Portanto, se faz necessário que os ensaios de complementação sejam realizados com outro plasmídeo contendo como o próprio promotor do gene Dib em para o controle da expressão. Este plasmídeo, de expressão menos intensa será construído a partir da introdução do promotor do Dib1 e posterior clonagem dos genes Dib1 como controle e SmDimp no plasmídeo pYEPLAC. Os iniciadores que amplificam esta região foram desenhados e utilizados para amplificar o promotor do Dib1 a partir de colônias de leveduras.

- Embora a complementação fenotípica venha a ocorrer e seja confirmada por fenótipo dos esporos, outros trabalhos serão necessários para confirmar se este gene realmente tem relevância no ciclo celular do *S. mansoni*. Assim, trabalhos de nocaute do gene do trematódeo (através de RNA de interferência, por exemplo), serão importantes para confirmar esta relevância.

9 – BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D. DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F. and ET AL. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, p. 1651-1656, 1991.

BARBOSA, F. S. and COIMBRA C. E. A. Alternative approaches in Schistosomiasis control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 87,supl. IV, p. 215-220, 1992.

BASTOS, O. C.; GUARALDO, A. M. A. and MAGALHÃES, L. A. Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, variante albina, oriunda de Belo Horizonte, MG, à infecção por *Schistosoma mansoni*, parasita em condições naturais, de roedores silvestres do Vale do Rio Paraíba do Sul, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, v.12, n. 2, p. 179-183 1978.

BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; LACROUTE, F. and CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3329-3330. 1993.

BEAUDOIN, F.; WU, X.; LI, F.; HASLAM, R. P. MARHAM, J. E.; ZHENG, H.; NAPIER, J. A. and KUNST, L. Functional Characterization of the *Arabidopsis thaliana* {beta}-Ketoacyl-CoA Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. **Plant Physiol**, DOI:10.1104/pp.109.137497 13 maio 2009.

BERRY, L. D. and GOULD, K. L. Fission Yeast *dim1⁺* encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. **J. Cell. Biol**, v. 137, p. 1337–1354. 1997.

BRACHMANN, C. B.; DAVIES, A.; COST G. J.; CAPUTO, E.; LI, J.; PHIETER, P. and BOEKE, J. D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, p. 115-132. 1998.

BROWN, T. A. **Genomes**. USA: Bios Scientific Publishers Ltd.. 1999.

COURA, J. R. and AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, supl. I p. 13-19, 2004. DESPRÉS, L.; IMBERT-ESTABLET, D. and MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.60, p. 221-230. 1993.

ESPOSITO, M. S. and ESPOSITO, R. E. The genetic control of sporulation in *Saccharomyces*. The isolation of temperature sensitive sporulation deficient mutants. **Genetics**, v 61, p. 79 -89, 1969.

FAIRLAMB, A. H. Metabolic pathway analysis in trypanosomes and malaria parasites. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, p. 101-107. 2002

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791. 1985

FOGEL, S.; MORTIMER, R. K.; LUSNAK, K and TAVARES, F. Meiotic gene conversion: A signal of the basic recombinant event in yeast. **Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol**, v. 43, p.1325 - 1341, 1979.

FRANCO, G. R.; ADAMS, M. D.; SOARES, M. B.; SIMPSON, A. J. V.; VENTER, J. C. and PENA, S. D. P. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, v. 152, p. 141–147. 1995.

FRANCO, G. R.; VALADÃO, A. F.; AZEVEDO, V. and RABELO. E. M. L. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **Int. J. Parasitol.**, v. 10, p. 453-463. 2000.

GENTILE, R. and OLIVEIRA, G. Brazilian studies on the genetics of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, v.108, p.175-178, 2008.

GIETZ, R. D. and SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Genes**, v. 74, p. 527- 534. 1988.

GONZALES, I. J.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; MOTTRAM, J. C. and FASEL, N. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int. J. Parasitol.** v. 37, p. 161–172, 2007.

GUERINE, M. N.; BEHNKE, M. S. and WHITE, M. W. Biochemical and genetic analysis of the distinct proliferating cell nuclear antigens of *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 142, p. 56–65, 2005.

HERNÁNDEZ, A.; JIANG, X.; CUBERO, B.; NIETO, P. M. ; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. and PARDO, J. M. Mutants of the Arabidopsis thaliana Cation/H⁺ Antiporter AtNHX1 Conferring Increased Salt Tolerance in Yeast: The endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. **J Biol Chem.**, v. 284, p. 14276-14285, 2009.

HOLMGREN A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 237-271, 1985.

HOLMGREN A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J Biol Chem**, v. 264, p. 13963-13966, 1989.

HOLMGREN A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. **Structure**, v. 3, p. 239-243. 1995.

HOPPER, A. K., MAGEE, P. T., WELSH, S. K., FRIEDMAN, M. and HALL, B. D. Macromolecule synthesis and breakdown in relation to sporulation and meiosis in yeast. **J. bacterial**, v. 119, p. 619-628, 1974.

KATZ, N. Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 705–711, 1999.

KAWAZOE, U.; DIAS, L. C. S. and PIZA J. T. Infecção natural de pequenos mamíferos por *Schistosoma mansoni*, na represa de Americana (São Paulo, Brasil). **Rev. Saúde Pública**, v.12, p. 200–208, 1978.

LOVERDE, P. T. Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications. **J Parasitol**, v. 88, p. 3-13, 2002.

LOVERDE, P. T.; HIRAI, H.; MERRICK, J. M.; LEE, N. H. and EL-SAVED, N. Schistosoma mansoni genome project: an update. **Parasitol. Int.** v. 53, p. 183–192. 2004.

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years experience. **Acta Tropica**, v. 86, p. 243-254, 2003.

MARTIN, J. L. Thioredoxin--a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, p. 245-250, 1995.

MCMANUS, D. P. and LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 21, p. 225-242, 2008.

MEIRA, W. S.; FRANCO, G. R.; RABELO, E. M. and PENA, S. D. Characterization of an abundant Schistosoma mansoni transcript with no homologs in the databases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 211-213. 1998.

MILLS, D. Quantitative and qualitative analyses of polyadenilated RNA sequences during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. INTERNACIONAL CONFERENCE ON YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, 10, 1980, Louvain-la-Neuve, Belgium. **Anais...** P.55.

MODENA, C. M.; COELHO, P. M. Z; BARBOSA, F. S. and LIMA, W. S. Transmissão do *Schistosoma mansoni* em condições experimentais, usando o modelo bovino - *Biomphalaria glabrata* – bovino. **Rev. Inst. Med. trop.**, v.35, p. 11-16, 1993.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10^a ed. Belo Horizonte: Atheneu. 2002.

OLIVEIRA, G. The Schistosoma mansoni transcriptome: na update. **Exp Parasitol.**, v. 117, p. 229-235, 2007.

OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; FARIAS, L. P. and LEITE, L. C. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil. **Acta Trop.**, v. 108, p.256-262, 2008.

OPHEIM, D. J. Effects of ammonium ions on activity of hydrolytic enzymes during sporulation of yeast. **J. bacteriol.**, v. 138, p. 1022-1025, 1979.

PERKINS, D. D. and BARRY, E. G. The cytogenetics of *Neurospora*. **Adv. Genet.**, v. 19, p. 134-285, 1977.

RAMIREZ, C. and MILLER, J. J. The metabolism of yeast sporulation. VI. Changes in aminoacid content during sporogenesis. **Can. J. Microbiol.**, v. 10, p. 623-631, 1964.

REUTER, K.; NOTTROT, S.; FABRIZIO, P.; LUHRMANN, R. and FICNER, R. Identification, characterization and crystal structure analysis of the ABhuman spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. **J Mol Biol.**, v. 294, p. 515-525, 1999.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

SANTOS, T. M.; MACHADO, C. R.; FRANCO, G. R.; and PENA, S. D. J. Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 125, p. 103-112, 2002.

SANTOS, D. N. Participação da proteína SmRbx de *S. Mansoni* na formação do complexo de ubiquitinação de proteínas. **Tese de mestrado**, Dep. Bioq .imunol. ICB. UFMG, 2004.

SANTOS, D. N.; AGUIAR, P. H. N.; LOBO, F. P.; MOURÃO, M. M.; TAMBOR, J. H. M.; VALADÃO, A. F.; VILAS-BOAS, A.; NOBREGA, F. G.; LOVERDE, P. T.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; MACHADO, S. D. P. and FRANCO, G. R. *Schistosoma mansoni*: Heterologous complementation of a yeast null mutant by SmRbx, a protein similar to a RING Box protein involved in ubiquitination. **Exp. Parasitol.**, v.116, p. 440–449, 2007.

SIMEONI F. and DIVITA G. The Dim protein family: from structure to splicing. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 2079–2089, 2007.

SNEATH P. H. A. and SOKAL R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

SOLOMON, J. S.; NIXON, C. P.; MCGARVEY, S. T.; ACOSTA, L. A. P.; MANALO, D. and KURTIS, J. D. Expression, purification, and human antibody response to a 67

kDa vaccine candidate for Schistosomiasis japonica. **Protein. Expr. Purif.**, v. 36, p. 226-231, 2004.

STELMA, F. F.; TALLA, I.; POLMAN, K.; NIANG, M.; STURROCK, R. F.; DEELDER, A. M. and GRYSEELS, B. Epidemiology of *Shistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in northern Senegal. **Am. J. Trop. med. Hyg.**, v.49, p. 701-706, 1993.

STRATHERN, J. N.; JONES, W. E. and BROACH, R. J. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance**. Cold Spring Harbor Laboratory, Estados Unidos da América, 1982.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. and KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y. J. R.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P. H. O. P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A. S. A, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C. and DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat Genet.**, v. 35, p. 148-157, 2003.

VOLKMAN, S. K.; COWMAN, A. F.; WIRTH, D. F. Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 12, p. 8921–8925, 1995.

WAISBERG, M.; LOBO, F. P.; CERQUEIRA, G. C.; PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S.; FRANCO, G. R. and EL-SAYED, N. M. Microarray analysis of gene expression induced by sexual contact in *Schistosoma mansoni*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 181, 2007.

WAISBERG, M.; LOBO, F. P.; CERQUEIRA, G. C.; PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S.; EL-SAYED, N. M. and FRANCO, G. R. *Schistosoma mansoni*: Microarray

analysis of gene expression induced by host sex. **Exp Parasitol**, v. 120, p. 357-363, 2008.

WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O. and COWAN, R. B. Granuloma formation around schistosome eggs as manifestation of delayed hypersensitivity. **Am. J. Pathol.**, v. 5, p. 735-756, 1967.

WARREN, K. S. and BOROS, D. L. The Schistosome egg granuloma a form of cell-mediated immunity. **Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology**. Van furth R. E. eds., Blackwell Scient. Publ., Oxford, p. 1015-1028. 1975.

ZHANG, Y. Z.; GOULD, K. L.; DUNBRACK, R. L. J.; CHENG, H.; RODER, H.; GOLEMIS, E. A. The evolutionarily conserved Dim1 protein defines a novel branch of the thioredoxin fold superfamily. **Physiol. Genomics.**, v.11, p.109–118, 1999.

ZHANG, Y. Z.; LIMDBLOM, T.; CHANG, A.; SUDOL, M.; SLUDER, A. E.; GOLEMIS, E. A. Evidence that Dim1 associates with proteins involved in pre-mRNA splicing, and delineation of residues essential for Dim1 interactions with hnRNP F and Npw38/PQBP-1. **Gene**, v. 257, p. 33–43, 2000.

ZIMMERMANN, F. K.; SCHWAIER, R. and LAER, U. V. Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethyl sulfate, and carcinogenic alkylating nitrosamids. *Z. Vererbungsl.*, v. 98, p. 230-246, 1966.

ZUCKERKANDL, E. and PAULING, L. **Evolutionary divergence and convergence in proteins**. *Evolving Genes and Proteins*. V. Bryson and H. J. Vogel. New York: Academic Press. 1965.

ANEXOS

Soluções e géis

Acetato de lítio 1M

Acetato de lítio.....10,2g

Água destilada.....100 ml

Manter em temperatura ambiente.

Gel de agarose

TAE 0,5%.....40ml

Agarose..... 0,8%

Brometo de etídio..... 1 μ l

Gel de poliacrilamia 6% corado por prata

Acrilamida 30:0,8..... 8 ml

TBE (Tris borato, EDTA) 5X..... 8 ml

TEMED..... 30 μ l

Persulfato de amônio a 10%..... 500 μ l

Água destilada..... completar para 40 ml

- Preparar a base para vedação das placas com gel de agarose a 2%.

- **Coloração pela prata:**

Meio 2 XYT.

Extrato de levedura.....1%

Peptona.....1,6%

NaCl 0,5%

pH do meio deve ser ajustado para 7,0.

Meio Kac.

extrato de levedura..... 0,5%

acetato de potássio..... 1%

dextrose.....0,05%

Agar..... 2%

pH deve ser ajustado para 7,0.

Meio LB.

Extrato de levedura.....0,5%

Triptona.....1%

NaCl..... 1%

NaOH 5N.....0,08%

Meio PE.

extrato de levedura	0,8%
peptona.....	0,3%
glicose.....	10%

pH deve ser ajustado para 5,8.

Meio de cultura SD

YNB (yeast nitrogen base).....	0,17%
sulfato de amônia.....	5%
Agar.....	1,5%

pH do meio deve ser ajustado para 5,8.

Meio YPD.

Peptona.....	2%
extrato de levedura.....	1%
glicose.....	2%

pH deve ser ajustado para 5,8.

Mix acetato de lítio.

Acetato de lítio 1 M.....	10 ml
TE 10X pH 7,4.....	10 ml
Água destilada.....	80 ml

Mix PEG

PEG 50%.....	8 ml
TE 10X pH 7,4.....	1ml
Acetato de lítio 1 M.....	1ml

PEG 50%.

Dissolver 50 g em um volume mínimo de água.

Ajustar o volume para 100 ml.

Armazenar por no máximo um mês.

TE 10 X, pH 7,4.

Tris 1 M pH7,4.....	10 ml
EDTA 0,5 M.....	2 ml
Água destilada	88 ml.

Sequências dos genes SmDimp e Dib1.

>dimpsonsoni

```
GAGGGTTTTTTTTTTGTTGGAAACATGTCTTATATGCTTTCTCACCTAACAAATGGCTG
GCAAGTAGACCAGGCTATACTGTCTGAAGAAGACAGAGTTGTCATCATACGCTTCGGTC
ACGACTGGGATCCGTCGTGCATGGTCATGGATGAAACTCTTTTTAAAATCGCCGAGAGA
GTGAAGAACTTCGCAATCACGTAAGTTGATATAACTCAAGTTCCAGATTTCAACAA
GATGTACGAGTTGTACGATCCCTGCACTGTTATGTTCTTTTACCGTAATAAACACATTA
TGATTGACTTGGGGACAGGTAACAACAATAAAATCAACTGGCCCATAGCCGACGGACAG
GAATTTATAGATATTGTTGAAACGGTGTATAGGGGTGCAAGAAAAGGTCGGGGTTTGGT
TGTTTCTCCAAAAGACTATTCGACTAAGTATCGGTATTGAGTTATGTACTATTTCTTCG
TCTTGTTATGTATTTTTCAGTTCTTATCCTGCATTTCTGTGTTAATAAAAATATTTGTAA
TCCGC
```

>S.cerevisae Dib1

```
ATGGCTAGTGTGTTTGTGCCTCAATTGCGTACGGGATGGCATGTGGATCAGGCTATTGTT
ACCGAGACTAAACGACTTGTTGTCATTCGTTTTGGTCGCAAAAATGATAGACAATGTATG
ATCATGGACGAGTTGTTATCTTCGATTGCTGAAAGAGTAAGGAACCTTTCAGTTATTTAT
TTATGTGATATAGATGAAGTTTCAGATTTTGATGAGATGTACGAGCTGACGGATCCCATG
ACAGTAATGTTTTTCTACCACAATAAGCACATGATGTGTGATTTTGGTACAGGGAACAAC
AACAAGTTGAACTTTATTGTAGACGACAAACAAGAAATGATTGACATATTAGAACTATA
TTCAGAGGTGCCAGGAAGAACAAGGGCTGGTGGTCTCTCCATACGATTATAATCATAAG
CGTGTTCATAA
```

Sequência Dib1 com região flanqueando +100 pb, mostrando região de anelamento dos iniciadores Dib-ext e DibU/L1:

CCAATGACCGCTTCGCAAAGTGGAAAA**ACAGAACTTACATACCAA**ATTCGATCATCGGATAGAAATA
GTACGTAGAGAAAGAGTAAGAAGTCAAGTTTTG**ATGGCTAGTGT**TTTGGCTCAATTGCGTACGG
GATGGCATGTGGATCAGGCTATTGTTACCGAGACTAAACGACTTGTTGTCATTCGTTTTGGTCGCAA
AATGATAGACAATGTATGATCATGGACGAGTTGTTATCTTCGATTGCTGAAAGAGTAAGGAACTTTG
CAGTATTTATTTATGTGATATAGATGAAGTTTCAGATTTTGATGAGATGTACGAGCTGACGGATCCC
ATGACAGTAATGTTTTCTACCACAATAAGCACATGATGTGTGATTTTGGTACAGGGAACAACAACA
GTTGAACTTTATTGTAGACGACAAACAAGAAATGATTGACATATTAGAACTATATTCAGAGGTGCC
AGGAAGAACAAGGGCTGGTGGTCTCTCCATACGATTATA**ATCATAAGCGT**TTTCATAATTCATAAT
AACTATGTAGGCTAGGCGCACGATGTCTTAACAATTCAGTGAGTAAGTAATGAATAACCTTGACAGA
ATATAAAAGGTCGAAGCATATTGAT

Mapa de enzima de restrição Para SmDimp

Pos Corte	Enzime	Sequene reconhecida
2 *	AciI	C [^] CG_C
2 *	BstUI	CG CG
6	Tsp509I	[^] AATT_
6	ApoI	R [^] AATT_Y
6 *	EcoRI	G [^] AATT_C
10	TaqI	T [^] CG_A
19	XbaI	T [^] CTAG_A
20	Hpy188III	TC [^] NN_GA
20	BfaI	C [^] TA_G
34	HphI	GGTGA(N) ₇ N [^]
56	CviKI-1	RG CY
58	Cac8I	GCN NGC
65	AccI	GT [^] MK_AC
66	Hpy166II	GTN NAC
68 #	PspGI	[^] CCWGG_
68 #	BssKI	[^] CCNGG_
68 #	StyD4I	[^] CCNGG_
70 #	ScrFI	CC [^] N_GG
70	BstNI	CC [^] W_GG
73	CviKI-1	RG CY
80	HpyCH4III	AC_N [^] GT
84	Hpy188I	TC_N [^] GA

95	BbsI	GAAGACNN^NNNN_
97	MboII	GAAGA (N) ₇ _N^
97	DrdI	GACNN_NN^NNGTC
100	MboII	GAAGA (N) ₇ _N^
104	AcuI	CTGAAG (N) ₁₄ _NN^
115	Tsp45I	^GTSAC_
118 *	Hpy188III	TC^NN_GA
121 #	AlwI	GGATCNNNN^N_
126	BfuCI	^GATC_
126 #	MboI	^GATC_
126	Sau3AI	^GATC_
126 #	DpnII	^GATC_
126	BstYI	R^GATC_Y
126	BamHI	G^GATC_C
127	BsrI	ACTG_GN^
128 *	NlaIV	GGN NCC
128	DpnI	GA TC
132	BmrI	ACTGGGNNNN_N^
134 #	AlwI	GGATCNNNN^N_
135 *	Hpy99I	_CGWCG^
137	FatI	^CATG_
137	HpyCH4V	TG CA
138	CviAII	C^AT_G
141	NlaIII	_CATG^
142	MslI	CAYNN NNRTG

143	FatI	^CATG_
144	CviAII	C^AT_G
147	NlaIII	_CATG^
153	BtsCI	GGATG_NN^
160	FokI	GGATG(N) ₉ ^NNNN_
161	MseI	T^TA_A
162	DraI	TTT AAA
184	XmnI	GAANN NNTTC
192	MboII	GAAGA(N) ₇ _N^
195	NmeAIII	GCCGAG(N) ₁₉ _NN^
196 *	HpyCH4IV	A^CG_T
197 *	BsaAI	YAC GTR
198 *	CviQI	G^TA_C
199 *	RsaI	GT AC
200	BpuEI	CTTGAG(N) ₁₄ _NN^
201	DdeI	C^TNA_G
215	SmlI	C^TYRA_G
223	Hpy188III	TC^NN_GA
240 *	CviQI	G^TA_C
241 *	RsaI	GT AC
243 #	BsgI	GTGCAG(N) ₁₄ _NN^
247 #	AlwI	GGATCNNNN^N_
249 *	CviQI	G^TA_C
250 *	RsaI	GT AC
252 #	DpnII	^GATC_

252	*	BfuCI	^GATC_
252	*	Sau3AI	^GATC_
252	*#	MboI	^GATC_
254	*	DpnI	GA TC
260	#	HpyCH4V	TG CA
264		HpyCH4III	AC_N^GT
265	#	MslI	CAYNN NNRTG
267		TspRI	_NNCASTGNN^
280		HpyCH4III	AC_N^GT
321		BsmFI	GGGAC(N) ₁₀ ^NNNN_
335		Sau96I	G^GNC_C
336		CviKI-1	RG CY
336		PhoI	GG CC
336		HaeIII	GG CC
337		BsrI	ACTG_GN^
343		CviKI-1	RG CY
349	*	Hpy99I	_CGWCG^
355		Tsp509I	^AATT_
355		ApoI	R^AATT_Y
378		HpyCH4III	AC_N^GT
391		HpyCH4V	TG CA
433		TaqI	T^CG_A
437		DdeI	C^TNA_G
459		CviQI	G^TA_C
459	*	MboII	GAAGA(N) ₇ _N^

460	RsaI	GT AC
503	HpyCH4V	TG CA
508	MslI	CAYNN NNRTG
514	MseI	T^TA_A
523	SspI	AAT ATT
533 *	AciI	C^CG_C
535 *	BstUI	CG CG
537	ApoI	R^AATT_Y
537 *	EcoRI	G^AATT_C
537	Tsp509I	^AATT_
541 *	BspEI	T^CCGG_A
541	BsaWI	W^CCGG_W
542	MspI	C^CG_G
542	Hpy188III	TC^NN_GA
542 *	HpaII	C^CG_G
545	TfiI	G^AWT_C
545	HinfI	G^ANT_C
550	SpeI	A^CTAG_T
551	BfaI	C^TA_G
556	ApoI	R^AATT_Y
556 *	EcoRI	G^AATT_C
556	Tsp509I	^AATT_

Mapa de enzima de restrição Para *S. cerevisiae* Dib1

Pos Corte	Enzime	Sequene reconhecida
4	CviKI-1	RG CY
5	BfaI	C^TA_G
22	Tsp509I	^AATT_
22	MfeI	C^AATT_G
24	MwoI	GCNN_NNN^NNGC
28 *	BsiWI	C^GTAC_G
29	CviQI	G^TA_C
29	MnlI	CCTC(N) ₆ _N^
29	BccI	CCATCNNNN^N_
30 *	RsaI	GT AC
39	FatI	^CATG_
40	CviAII	C^AT_G
40	BtsCI	GGATG_NN^
43	NspI	R_CATG^Y
43	NlaIII	_CATG^
45	BfuCI	^GATC_
45 #	MboI	^GATC_
45 #	DpnII	^GATC_
45	Sau3AI	^GATC_
47	FokI	GGATG(N) ₉ ^NNNN_
47	DpnI	GA TC
52	CviKI-1	RG CY

53	#	AlwI	GGATCNNNN^N_
58	*	BsmAI	GTCTCN^NNNN_
79		AhdI	GACNN_N^NNGTC
119		BfuCI	^GATC_
119		Sau3AI	^GATC_
119	#	MboI	^GATC_
119	#	DpnII	^GATC_
119	#	BclI	T^GATC_A
121		DpnI	GA TC
122		FatI	^CATG_
123		CviAII	C^AT_G
126		NlaIII	_CATG^
131	*	MboII	GAAGA(N) ₇ _N^
142		TaqI	T^CG_A
169		HpyCH4V	TG CA
204		Hpy188I	TC_N^GA
219	*	CviQI	G^TA_C
220	*	RsaI	GT AC
225		AluI	AG CT
225		CviKI-1	RG CY
226	#	AlwI	GGATCNNNN^N_
231		BfuCI	^GATC_
231	#	DpnII	^GATC_
231	#	MboI	^GATC_
231		Sau3AI	^GATC_

231	BstYI	R^GATC_Y
231	BamHI	G^GATC_C
233 *	NlaIV	GGN NCC
233	DpnI	GA TC
236	FatI	^CATG_
237	CviAII	C^AT_G
239 #	AlwI	GGATCNNNN^N_
240	NlaIII	_CATG^
243	HpyCH4III	AC_N^GT
269	FatI	^CATG_
270	CviAII	C^AT_G
273	NlaIII	_CATG^
287	CviQI	G^TA_C
288	RsaI	GT AC
320 *	AccI	GT^MK_AC
321 *	Hpy166II	GTN NAC
358	MnII	CCTC(N) ₆ _N^
364	Hpy188I	TC_N^GA
367 #	BanI	G^GYRC_C
369 #	NlaIV	GGN NCC
370 #	PspGI	^CCWGG_
370 #	BssKI	^CCNGG_
370 #	StyD4I	^CCNGG_
372	BstNI	CC^W_GG
372 #	ScrFI	CC^N_GG

387	CviKI-1	RG CY
387	MboII	GAAGA (N) ₇ N^
399	BsaI	GGTCTCN^NNNN_
399	BsmAI	GTCTCN^NNNN_
410 *	BsaBI	GATNN NNATC
410	PsiI	TTA TAA
419	MslI	CAYNN NNRTG

