



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Laboratório de Genética Bioquímica



Caracterização funcional da proteína SmRbx: uma proteína  
de *Schistosoma mansoni* similar à proteína RING box  
envolvida no processo de ubiquitinação

**Débora Naves Santos**

Belo Horizonte

Março/ 2007

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Laboratório de Genética Bioquímica

## **TESE DE DOUTORADO**

Caracterização funcional da proteína SmRbx: uma proteína  
de *Schistosoma mansoni* similar à proteína RING box  
envolvida no processo de ubiquitinação

**Débora Naves Santos**

Orientadora: Glória Regina Franco

Co-orientador: Carlos Renato Machado

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais para a  
obtenção da titulação de Doutora em  
Bioquímica.

Belo Horizonte / 2007

## **Agradecimentos**

À Glória, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela minha formação científica.

Ao Professor Carlos Renato pela orientação nos trabalhos com leveduras.

Aos Professores Sérgio Pena e Andréa Macedo pelas críticas e sugestões nas reuniões de laboratório.

Ao Professor Francisco Nóbrega e ao seu aluno José Humberto Machado Tambor pela grande ajuda nos experimentos de esporulação e micromanipulação de leveduras.

Aos professores Carlos Rosa, Elida Rabelo e Carlos Salas pelo enriquecimento do trabalho no processo de Qualificação.

Ao Professor Carlos Rosa também pela ajuda nas várias tentativas de esporulação de leveduras.

Ao Professor Marcelo Bemquerer e Jamil pelo sequenciamento da proteína produzida.

Ao aluno de Doutorado Mário Giusta pela fundamental contribuição na manipulação dos camundongos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica: cada um sabe o quanto foi fundamental no desenvolvimento do trabalho, mas agradeço especialmente pelo carinho, pelas conversas, pelo apoio moral, pelos almoços em boa companhia, enfim, por todos os momentos que tornaram estes anos de LGB muito prazerosos. Adoro vocês!

À Neuza, à Kátia, à Miriam e à Rúbia por fornecerem boas condições de trabalho e apoio técnico.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, companheiros de trabalho e lazer.

Aos Amigos de Bases por compartilharem os conhecimentos teóricos e estarem sempre disponíveis para ajudar na prática.

Aos eternos e insubstituíveis amigos da PUC: Simone, Maciel, Leomil e Raul.

Ao Pedro, inicialmente meu aluno de Iniciação Científica, que contribuiu enormemente no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todo o apoio, pela ajuda a qualquer momento, pelo carinho, mas principalmente por ter me tornado uma pessoa melhor.

À minha família, especialmente minha mãe, meu pai e meu irmão, por tudo.

Obrigada a todos!!!

---

## ÍNDICE

---

Lista de figuras	08
Lista de abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	14
<b>1. Introdução</b>	<b>16</b>
1.1. A esquistossomose	16
1.2. O ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	18
1.3. Genoma do parasito	21
1.4. Projetos Genoma e Transcriptoma de <i>S. mansoni</i>	23
1.5. Estudos pós-genômicos em <i>S. mansoni</i>	25
1.6. O sistema de complementação funcional de leveduras nocaute	27
1.7. O sistema de duplo-híbrido	28
1.8. A ubiquitinação de proteínas	30
1.9. Enzimas E3 ubiquitina ligases	36
1.10. Domínios RING	40
1.11. A proteína SmRbx	43
<b>2. Objetivos</b>	<b>45</b>
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>46</b>
3.1. O vetor pYEDP 60-2	46
3.2. O vetor pYTS	46
3.3. O vetor pAS2.1	47
3.4. O vetor pGAD424	47
3.5. O vetor pMAL-c2G	48
3.6. Sequenciamento do cDNA de SmRbx e caracterização gênica e protéica <i>in silico</i>	49
3.7. Disrupção do alelo do gene <i>HRT1</i> de levedura por recombinação homóloga	52
3.8. Clonagem do cDNA de SmRbx no vetor pYEDP 60-2	55
3.9. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> HRT1+/- com pYEDP?SmRbx	59

(cepa DHY)	
3.10. Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> DHY em meio mínimo contendo galactose	59
3.11. Esporulação de <i>S. cerevisiae</i> DHY	59
3.12. Obtenção de leveduras haplóides $\Delta HRT1$ complementadas por SmRbx (cepa NHY)	60
3.13. Análise morfológica das leveduras complementadas	61
3.14. Sensibilidade às variações de temperatura das leveduras complementadas	61
3.15. Curva de crescimento de leveduras NHY	64
3.16. Mapeamento das regiões essenciais para a função de SmRbx	64
3.17. Interação <i>in vivo</i> entre SmRbx e $\gamma$ Cul1 utilizando o sistema de duplo-híbrido em leveduras	67
3.18. Expressão e purificação da proteína SmRbx	71
3.19. Digestão da proteína de fusão MBP-SmRbx com enzima Genenase I	75
3.20. Produção de anticorpos policlonais anti-SmRbx	75
3.21. Western blot	76
<b>4. Resultados</b>	78
4.1. Caracterização <i>in silico</i> da proteína SmRbx	78
4.2. Obtenção da cepa de <i>S. cerevisiae</i> HRT1+/- contendo o plasmídio recombinante SmRbx/pYEDP (cepa DHY)	84
4.3. Superexpressão de SmRbx em leveduras DHY	88
4.4. Obtenção de leveduras haplóides deletadas para HRT1 e complementadas por SmRbx (cepa NHY)	88
4.5. Caracterização da cepa NHY	90
4.6. Identificação de regiões essenciais para a função de SmRbx por complementação funcional da cepa NHY	100
4.7. Verificação da interação de SmRbx e Cul1 pelo sistema do duplo híbrido de leveduras	102
4.8. Expressão, purificação e digestão da proteína de fusão MBP-SmRbx	105
4.9. Produção de anticorpos policlonais anti-SmRbx	110

<b>5. Discussão</b>	111
<b>6. Conclusão</b>	120
<b>7. Perspectivas</b>	122
<b>8. Referências bibliográficas</b>	123
<b>Anexos</b>	135

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Casal de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	17
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Schistosoma</i>	19
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático dos cromossomos de <i>S. mansoni</i>	22
<b>Figura 4:</b> Esquema da via de ubiquitinação	33
<b>Figura 5:</b> Estrutura 3D obtida a partir do cristal do complexo SCF de humanos	39
<b>Figura 6:</b> Regulação da atividade ligase do complexo SCF através de CAND1/NEDD8	41
<b>Figura 7:</b> Sequência nucleotídica do gene SmRbx com sua seqüência de aminoácidos deduzida	80
<b>Figura 8:</b> Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas SmRbx, Rbx1 e HRT1	82
<b>Figura 9:</b> Modelo estrutural da proteína SmRbx	83
<b>Figura 10:</b> Estratégia para confirmação da deleção de um alelo de HRT1 de levedura pela inserção do cassete de <i>His3</i>	86
<b>Figura 11:</b> Verificação da toxicidade de pYEDP/SmRbx para a levedura DHY	89
<b>Figura 12:</b> Crescimento dos esporos após micromanipulação das tétrades obtidas por esporulação da cepa DHY: obtenção da cepa NHY	91
<b>Figura 13:</b> PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo glicose, utilizando iniciadores para o gene <i>HRT1</i>	92
<b>Figura 14:</b> PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene <i>HRT1</i>	93
<b>Figura 15:</b> PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene <i>HRT1</i> com a inserção do cassete de <i>HIS3</i>	94
<b>Figura 16:</b> PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene <i>SmRbx</i>	95



<b>Figura 17:</b> Análise morfológica de leveduras NHY	96
<b>Figura 18:</b> Análise da sensibilidade da cepa NHY às variações de temperatura	98
<b>Figura 19:</b> Curva de crescimento de leveduras NHY e leveduras selvagens	99
<b>Figura 20:</b> Efeitos da deleção de SmRbx na complementação funcional de leveduras NHY	101
<b>Figura 21:</b> Interação de SmRbx com yCul1 pelo ensaio de duplo-híbrido	103
<b>Figura 22:</b> Ensaio da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase	104
<b>Figura 23:</b> Expressão da proteína SmRbx em fusão com MBP (seta) em grande escala com o sistema de expressão pMAL-c2G	106
<b>Figura 24:</b> Purificação da proteína MBP-SmRbx por cromatografia de afinidade	107
<b>Figura 25:</b> Digestão da proteína MBP-SmRbx com enzima Genenase I	109

#### **Lista de Tabela**

<b>Tabela 1:</b> Iniciadores usados para amplificação por PCR	50
---	----

## Lista de abreviaturas

**3 AT:** 3-amino-1,2,4-triazole

**APC:** *anaphase-promoting complex*

**ATP:** adenosine trifosfato

**BCIP:** *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CAND1:** *cullin-associated e neddylation-dissociated-1*

**CDK:** cinases dependentes de ciclinas

**cDNA:** Seqüência de DNA complementar

**dbEST:** banco de dados de ESTs

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**dNTP:** Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

**DTT:** *dithiothreitol*

**DUB:** proteína desubiquitinadora

**E1:** enzima ativadora da ubiquitina

**E2:** enzima conjugadora de ubiquitina

**E3:** enzima ubiquitina ligase

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético (**E**thylene**D**iamine**T**etr**A**cetic acid)

**EST:** Etiquetas de Seqüências Transcritas (*Expressed Sequence Tags*)

**GAL4:** Ativador transcricional da levedura *S. cerevisiae* requerido para a expressão de genes que codificam enzimas utilizadas para o catabolismo da galactose

**HECT:** *Homologous to E6-AP COOH Terminal*

**HRT1:** Proteína de *S. cerevisiae* homóloga à SmRbx

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**MBP:** Proteína que se liga à maltose

**NBT:** *nitro blue tetrazolium chloride*

**NEED8:** *neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated protein-8*

**OD:** Densidade óptica

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**ONSA:** Organisation for Nucleotide Sequencing and Analysis

**ORESTES:** *Open Reading Frame ESTs*

**ORF:** Janela aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PEG:** Polietilenoglicol

**PVDF:** Polifluoreto de vinilideno

**Rbx1:** Proteína humana homóloga à SmRbx

**RING:** *Really Interesting New Gene*

**RNAi:** RNA interferência

**RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

**SCF:** *Skp1-Cullin-F-box protein*

**SD:** Synthetic Dropout

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio

**SUMO:** *small ubiquitin-like modifier*

**TIGR:** The Institute for Genomic Research

**UAS:** promotor *Upstream Activation Sequence*

**UBL:** polipeptídeo análogo à ubiquitina (*ubiquitin like*)

**VCB:** *pVHL, elongin B/C*

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

A ubiquitinação é parte do processo que leva à proteólise, onde a proteína poliubiquitinada é direcionada para a degradação pelo proteassomo 26S. A transferência da ubiquitina para a proteína alvo é feita por uma enzima ligase E3. Um dos membros da classe E3 é o complexo SCF. Este complexo é composto pelas proteínas Cul1, Skp1, um membro da família F-box e um membro da família RING box. Em humanos, esta última é denominada Rbx1 e seu homólogo em leveduras HRT1. Foi verificado que a proteína humana é capaz de complementar a letalidade de HRT1 em leveduras nocaute para este gene, desempenhando ambas a mesma função bioquímica. Isolamos em nosso laboratório o cDNA codificador da proteína SmRbx, o homólogo de *Schistosoma mansoni* a Rbx1 e HRT1. Estudos *in silico*, demonstraram que *SmRbx* está presente como única cópia no genoma de *S. mansoni*, possui três íntrons e o transcrito está presente em estágios do ciclo de vida do parasito em ambos os hospedeiros. Para verificar se SmRbx está envolvida no processo de ubiquitinação, foi feito um estudo de complementação funcional heteróloga em leveduras. Para a obtenção de uma linhagem de levedura nocaute para o gene codificador da proteína HRT1, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diplóides foram utilizadas para a disrupção de um dos alelos do gene de interesse. A necessidade do uso de leveduras diplóides é devido ao fato do nocaute haplóide de *HRT1* ser letal. A disrupção do gene *HRT1* de leveduras diplóides foi feita por recombinação homóloga, introduzindo-se o gene *HIS3* no interior da região ativadora de *HRT1*. Leveduras diplóides nocaute para um alelo de *HRT1* e contendo o cDNA de SmRbx, clonado em plasmídeo, foram esporuladas. Através de micromanipulação foram obtidas leveduras haplóides. A complementação funcional foi confirmada pela restituição do crescimento de leveduras haplóides nocaute para *HRT1*, contendo o cDNA de SmRbx. Foi verificado que leveduras nocaute contendo o gene de *S. mansoni* apresentam uma morfologia alongada e não foram capazes de crescer nas temperaturas de 23°C e 37°C, mas possuíam um crescimento normal a 30°C, quando comparadas com a levedura selvagem. Estes resultados indicam que a complementação com o gene do parasito não é perfeita. Para identificar regiões da proteína SmRbx essenciais para sua função, mutantes do gene

foram produzidos por várias deleções nas regiões codificadoras das porções N-terminal e C-terminal da proteína por PCR. Regiões envolvidas na interação com culina são essenciais para a função da proteína, pois mutantes perdendo os primeiros 24 resíduos de aminoácidos da região N-terminal e outro sem 18 resíduos da região C-terminal não eram mais capazes de complementar a cepa de levedura deletada em *HRT1*. A interação de SmRbx e culina de leveduras foi testada pelo sistema do duplo-híbrido. Para esse ensaio, foi utilizada a porção da proteína Cul1 de *S. cerevisiae* que interage com Rbx1 humana e SmRbx completa ou SmRbx $\Delta$ 24 (deletada de 24 resíduos N-terminal). Leveduras onde foi detectada a ativação dos genes repórteres *HIS3* e  $\beta$ -galactosidase demonstraram que SmRbx, mas não SmRbx $\Delta$ 24, é capaz de interagir com Cul1. Estes resultados sugerem que a proteína SmRbx provavelmente está envolvida no processo de ubiquitinação, assim como suas ortólogas em humanos e leveduras. A proteína recombinante foi produzida em sistema bacteriano e utilizada para imunizar camundongos BALB/c, mas após a quinta imunização, o soro dos camundongos não apresentou anticorpos policlonais anti-SmRbx, indicando que a alta similaridade entre a proteína de *S. mansoni* e sua contraparte murina provavelmente impossibilitou a produção de anticorpos.

## ABSTRACT

Ubiquitination is part of the process that leads to proteolysis, in which the polyubiquitinated protein is directed to degradation by 26S proteasome. Ubiquitin is transferred to a target protein by an E3 ligase enzyme. One of the members of E3 class is the SCF complex. This complex consists of the proteins Cul1, Skp1, an F-box family member and a RING box family member. The latter is denominated Rbx1 in humans, and its yeast homolog is HRT1. The human protein was reported to complement and to revert the lethality of *HRT1* deletion in yeast, suggesting that both have the same biochemical function. We isolated in our laboratory the cDNA coding for the SmRbx protein, the *Schistosoma mansoni* ortholog of Rbx1 and HRT1. *In silico* studies demonstrated that SmRbx is a single copy gene in *S. mansoni* genome, presenting three introns and that the transcript is present in stages of the parasite life cycle in both hosts. In order to investigate SmRbx involvement in the ubiquitination process, a heterologous functional complementation study in yeast was conducted. To obtain a *HRT1 null* mutant yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* diploid cells were used to disrupt one of the gene alleles. It is essential to use diploid yeast cells due to the fact that the haploid *HRT1 null* mutant is lethal. The disruption of *HRT1* gene from diploid yeast cells was done by homologous recombination, introducing the *HIS3* gene into the *HRT1* coding region. Diploid yeast cells knockout for one allele of *HRT1* and containing the SmRbx cDNA cloned into a plasmid were sporulated. Haploid yeast cells were obtained by micromanipulation. Functional complementation was confirmed by the growth reestablishment of the haploid yeast cells deleted for *HRT1* and containing the SmRbx cDNA. It was verified that the knockout yeast cells containing the *S. mansoni* gene presented an elongated morphology and were not able to grow at 23°C and 37°C, but showed normal growth at 30°C, in comparison with wild type yeast cells. These results indicate that the complementation with the parasite gene is not perfect. In order to identify SmRbx protein regions essential for its function, gene mutants were produced by various deletions in the protein N-terminal and C-terminal coding regions by PCR. Regions involved in the interaction with cullin are essential for protein function, because mutants lacking the first 24 residues in the N-terminal region and mutants lacking 18 residues in

the C-terminal region were no longer capable to complement the yeast *HRT1* null mutant. The interaction between SmRbx and yeast cullin was tested by two-hybrid system. For this assay, it was used the *S. cerevisiae* Cul1 protein portion that interacts with the human Rbx1, and SmRbx or SmRbx $\Delta$ 24 (lacking 24 N-terminal residues). Yeast cells that activated the reporter genes *HIS3* and  $\beta$ -*galactosidase* demonstrated that SmRbx, but not SmRbx $\Delta$ 24, is capable of interacting with Cul1. These results suggest that the SmRbx protein is probably involved in the ubiquitination process, as its human and yeast orthologues. The recombinant protein was produced in a bacterial system and used to immunize BALB/c mice. After the fifth immunization, mouse serum did not present anti-SmRbx polyclonal antibodies, indicating that the high similarity between the *S. mansoni* protein and its murine counterpart probably prevented antibody production.

## 1. Introdução

### 1.1. A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* da família *Schistosomatidae*, que compreende espécies que vivem como parasitas no homem e em outros vertebrados. A sintomatologia desencadeada pela doença depende do parasito infectante: *Schistosoma haematobium* é o causador da esquistossomose urinária, *S. mansoni* (Figura 1), *S. japonicum*, *S. intercalarium* e *S. mekongi* são os responsáveis pela esquistossomose intestinal e hepatoesplênica (Neves, 1995).

A esquistossomose endêmica é determinada principalmente pela distribuição do hospedeiro intermediário: caramujos aquáticos pulmonados do gênero *Biomphalaria*. Novos focos da doença surgem principalmente em locais onde foram realizadas a construção de barragens, seguido de um aumento da concentração de pessoas nestas áreas (Stelma *et al*, 1993).

Nos últimos 50 anos, a distribuição global da esquistossomose mudou significativamente. O controle foi bem sucedido na Ásia, América e norte da África, diminuindo o número de pessoas infectadas e o risco de infecções. No entanto, a doença permanece endêmica em 76 países, onde mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que, destas, 120 milhões apresentam sintomas. Apesar da mortalidade da doença ser relativamente baixa (20.000 mortes por ano), ela representa uma ameaça aos países em desenvolvimento, pois apresenta caráter debilitante e incapacitante (Engels *et al*, 2002).





**Figura 1: Casal de vermes adultos de *S. mansoni***

Fonte: [http://biology.unm.edu/biology/esloker/resources/copulating\\_schistosomes.gif](http://biology.unm.edu/biology/esloker/resources/copulating_schistosomes.gif)

Na América Latina, a esquistossomose é causada pela espécie *S. mansoni*, originária da África, trazida pelo tráfico de escravos. A maior prevalência da doença é principalmente no Brasil, Suriname, Venezuela e Ilhas do Caribe. Porém, houve uma redução nas prevalências de infecção desde o início da década de 50 no Brasil, sendo que nas décadas de 80 e 90 houve uma redução significativa na mortalidade causada por esquistossomose (Savioli *et al*, 1997).

## **1.2. O ciclo de vida do *S. mansoni***

O ciclo de vida do *S. mansoni* caracteriza-se pela presença de alternância de fase sexuada no hospedeiro vertebrado, principalmente o homem, e fase assexuada no hospedeiro invertebrado, *Biomphalaria*, como mostra a Figura 2.

O ovo maduro, eliminado junto com as fezes, eclode ao entrar em contato com a água, liberando uma larva livre natante denominada miracídio. No ambiente aquático, a larva nada ativamente até encontrar o hospedeiro, no qual penetra e se aloja. No Brasil, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são as três espécies de caramujos susceptíveis ao *S. mansoni* (Paraense, 2001).

Logo após a penetração, o miracídio se torna séssil e começa a se dividir sucessivamente por mitose, formando esporocistos que posteriormente migram para as glândulas digestivas e para o hepatopâncreas do molusco. Então, cada esporocisto se divide novamente, dando origem a cercarias.



Sob influência da luz e temperatura nas horas mais quentes do dia, centenas de cercarias deixam o corpo do molusco, nadando ativamente até encontrar o hospedeiro vertebrado (no caso, o homem). Para isso, as cercarias apresentam alguns comportamentos típicos, tais como fototropismo positivo (de modo a se posicionar próximo à lâmina d'água) e a capacidade de se orientar positivamente em um gradiente de temperatura (McKerrow & Salter, 2002). Ambos os processos maximizam a chance de encontro com o hospedeiro vertebrado. Uma vez tendo se aproximado o suficiente, as cercarias são estimuladas por ácidos graxos de cadeia média livres (como o ácido linoléico) presentes na pele. Nessa etapa, a cercaria secreta o conteúdo da glândula acetabular que permite tanto a adesão da cercaria, através de uma substância glicoprotéica mucosa, quanto a posterior invasão da pele, através de uma protease homóloga à elastase (McKerrow & Salter, 2002).

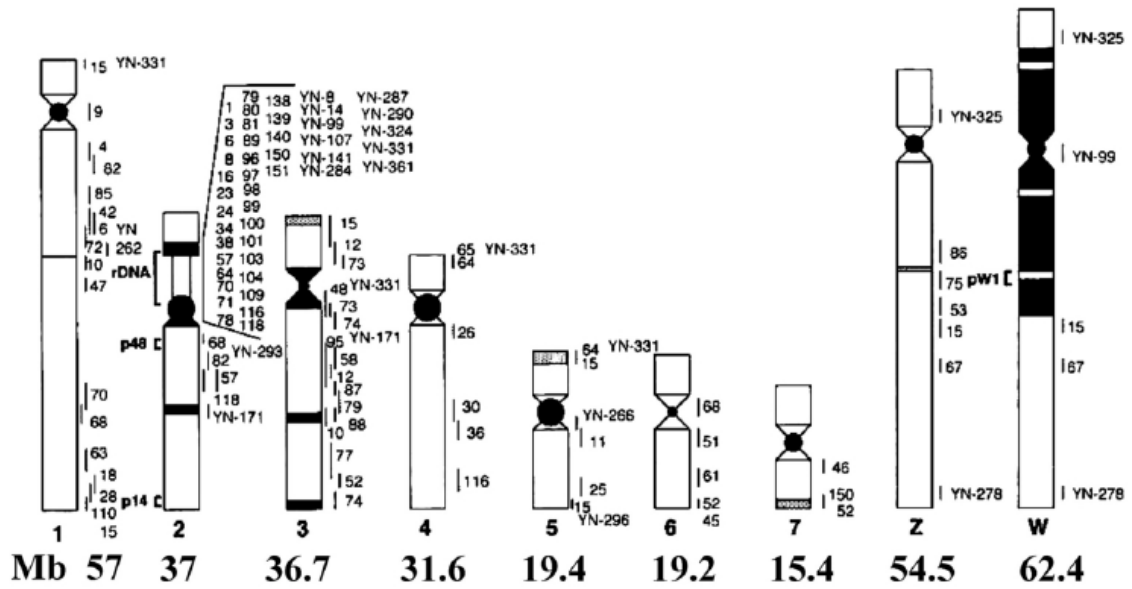
Após penetrar na pele do hospedeiro, a cercária perde a sua cauda e sofre uma série de alterações (tais como perda do glicocálix, atrofia das glândulas acetabulares, mudança de um metabolismo aeróbio para anaeróbio dentre outras) (Wilson *et al*, 1978). A partir desse ponto, a cercária passa a ser chamada de esquistossômulo. O parasito parece se orientar para alcançar os vasos sanguíneos, provavelmente através de um gradiente de L-arginina produzido pelo hospedeiro (Haas *et al*, 2002).

Entre 20 e 70 horas após a infecção, os esquistossômulos já se encontram no pulmão, chegando através do sistema vascular. Do pulmão, os esquistossômulos são conduzidos pela circulação até o sistema porta-hepático, onde atingem a maturidade sexual. Os parasitos adultos vivem acasalados, localizando-se no plexo venoso mesentérico portal e migram para as veias

mesentéricas posteriores para a postura dos ovos, que variam de 200 a 2000 por dia. Parte dos ovos do parasito atravessa a parede intestinal e são eliminados junto com as fezes, completando-se assim o seu ciclo de vida. Alguns ovos ficam alojados na mucosa intestinal ou nos capilares do sistema porta, sendo circundados por células características de resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro (revisado por Neves, 1995).

### **1.3. Genoma do parasito**

A informação genética do *S. mansoni* está contida em 8 pares de cromossomos (Figura 3), sendo 7 pares de cromossomos autossomos e um par de cromossomos sexuais. A fêmea é heterogamética, possuindo um par de cromossomos ZW, em contraste com o macho homogamético que possui um par ZZ (Short, 1983). Os cromossomos apresentam entre 15 e 64 Mb e podem ser distinguidos por diferenças no tamanho e quantidade de heterocromatina (Short, 1983; Hirai & LoVerde, 1995). O seu genoma haplóide apresenta 270 Mb e estima-se que aproximadamente 40% das seqüências sejam repetitivas e 60% representem genes de cópia única ou famílias de genes pequenos (Simpson *et al*, 1982). O genoma possui um elevado conteúdo de A+T: 60% na região codificadora e 70% na região não codificadora, refletindo um conteúdo médio de A+T de 66% (Hillyer, 1974). Baseado no tamanho do seu genoma e posição evolutiva estima-se que o *S. mansoni* possua de 15.000 a 20.000 genes expressos (Ali *et al*, 1991).



**Figura 3: Desenho esquemático dos cromossomos de *S. mansoni*.** Abaixo de cada cromossomo está indicado o número de megabases de DNA contidas no mesmo.

Fonte: LoVerde *et al.*, 2004.

#### 1.4. Projetos Genoma e Transcriptoma de *S. mansoni*

O entendimento da biologia do organismo e os mecanismos de resistência a drogas e variação antigênica que determina a fuga do sistema imune do hospedeiro são as principais razões para o estudo do genoma de parasitos. Sendo assim, projetos de descoberta gênica de *S. mansoni* contribuíram com a descoberta de milhares de novos genes do mesmo.

O projeto de descoberta gênica de *S. mansoni* foi iniciado em 1992 e envolveu o sequenciamento de genes expressos do parasito, ou seja, o conhecimento do transcriptoma do organismo. Esta foi a primeira iniciativa de um projeto deste tipo no Brasil. Menos de 100 genes do parasito tinham sido completamente ou parcialmente seqüenciados e depositados em bancos de dados quando este programa teve início. Sendo assim, para que fosse possível seqüenciar a porção expressa do genoma de *S. mansoni*, foi necessário adotar uma técnica eficiente e rápida baseada na produção de Etiquetas de Seqüências Transcritas (*Expressed Sequence Tags- ESTs*) (Franco *et al*, 1995). Essa estratégia envolve o sequenciamento em um único passo de clones de cDNA selecionados aleatoriamente de bibliotecas, para a obtenção das ESTs, que são seqüências pequenas (~400 nt) das extremidades desse cDNA (Adams *et al*, 1991). As ESTs representam uma metodologia extremamente simples, de custo moderado, sendo portanto acessível a pequenos laboratórios. Essa abordagem tem como vantagem permitir trabalhar apenas com seqüências expressas além de identificar rapidamente uma grande quantidade delas por meio de comparações feitas com seqüências depositadas em bancos de dados via Internet. As ESTs também podem ser

aplicadas na construção de mapas físicos, assim como na caracterização de grandes seqüências genômicas (Zweiger & Scott, 1997).

O trabalho de sequenciamento do genoma expresso de *S. mansoni* que começou em 1992 foi uma iniciativa do Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), e do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ). Em 1994, este projeto se tornou um consórcio internacional, incluindo laboratórios na Europa, Ásia, África, Austrália, América do Sul e América do Norte, sendo parcialmente financiado pela Organização Mundial de Saúde OMS/UNDP/*World Bank Special Program for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR) (Franco *et al*, 2000). Em 1995, esse programa gerou a primeira publicação com 607 ESTs (Franco *et al*, 1995).

Outras iniciativas de sequenciamento de transcritos do parasito surgiram tanto em Minas Gerais, quanto em São Paulo. Em 2001 foi criada a Rede Genoma de Minas Gerais financiada pela FAPEMIG/CNPq para montagem de uma rede regional de sequenciamento, tendo como primeira aplicação o sequenciamento do transcriptoma do *S. mansoni* (<http://www.cpqrr.fiocruz.br>). Os objetivos deste projeto foram: gerar bibliotecas de cDNA de cinco estágios do desenvolvimento: miracídio, ovo, cercária, fase pulmonar e vermes adultos por metodologia convencional; produzir 100.000 sequencias parciais de cDNA a partir das bibliotecas convencionais; identificar os transcritos por homologia com genes depositados em bases de dados não redundantes e criar agrupamentos das seqüências derivadas de um único gene. Este projeto foi finalizado e envolveu as instituições: Universidade Federal de Minas Gerais;



Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ; Universidade Federal de Ouro Preto; Universidade Federal de Viçosa; Universidade Federal de Lavras; Universidade Federal de Uberlândia; EMBRAPA Milho e Sorgo.

O projeto de São Paulo é parte de uma rede de pesquisas envolvendo vários laboratórios, com financiamento da FAPESP, denominado projeto ONSA (*Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis*). Em Outubro de 2003 o grupo publicou aproximadamente 163.000 seqüências parciais de transcritos geradas pela técnica ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*), através de amplificação por RT-PCR de baixo rigor do RNA mensageiro de seis estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* (Verjovski-Almeida *et al*, 2003). Essas seqüências foram agrupadas em 30.980 *contigs* e estima-se que representem 92% do transcriptoma do parasito.

Já o projeto de sequenciamento do genoma do parasito propriamente dito está sendo desenvolvido nos EUA e na Inglaterra, em colaboração com a Rede do Projeto Genoma de *S. mansoni* da Organização Mundial de Saúde/UNDP/World Bank. O projeto é realizado pelo *The Institute for Genome Research* (TIGR; <http://www.tigr.org>) em Maryland, EUA, e pelo Sanger Institute em Cambridge, Inglaterra. Este projeto já está em fase final de montagem do genoma e espera-se sua primeira versão para breve.

### **1.5- Estudos pós-genômicos em *S. mansoni***

Os projetos genoma geraram uma imensa quantidade de informação potencial, tornando necessários estudos funcionais que possibilitem a descoberta do papel biológico de proteínas codificadas por estes genes novos.

Enquanto dados de seqüência de DNA fornecem a informação necessária para o conhecimento dos genes de um organismo, eles são, na maioria dos casos, insuficientes para o entendimento da função biológica de proteínas codificadas por estes genes, ou para o entendimento da relação dessas proteínas com outras moléculas na célula (Tucker *et al*, 2001). Um completo entendimento do funcionamento de uma proteína requer informação em vários níveis: sua estrutura, modificações pós-traducionais, atividade bioquímica, interações com outras proteínas, sua localização no organismo e seu papel celular.

A determinação da função gênica é um dos maiores interesses dos grupos envolvidos na pesquisa genômica. A existência de uma ORF nos dados genômicos não implica necessariamente a existência de um gene funcional (Pandey & Mann, 2000). Para a caracterização funcional dos genes do parasito, várias metodologias estão sendo aplicadas, com destaque para: (i) a técnica de interferência por RNA (RNAi) que pode silenciar a expressão gênica em *S. mansoni* possibilitando a determinação da função do transcrito cuja presença foi reduzida, ou mesmo, abolida na célula, tecido ou organismo (Skelly *et al*, 2003; Boyle *et al*, 2003; Correnti *et al*, 2005; Dinguirard & Yoshino, 2006); (ii) a técnicas de *microarray* de cDNAs que permite investigar o perfil da expressão gênica diferencial em *Schistosoma* (Fitzpatrick *et al*, 2005; Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Dillon *et al*, 2006); (iii) e a identificação e caracterização das proteínas codificadas por genes de *Schistosoma* em extratos de células ou tecidos através de géis bi-dimensionais e espectrometria de massa (Curwen *et al*, 2004; Wilson *et al*, 2004; Wilson *et al*, 2006). Além destas modernas tecnologias aplicadas ao estudo da função gênica, projetos pós-genoma têm também como uma de suas áreas a síntese de proteínas de

interesse em sistema heterólogo para análise funcional *in vitro* e *in vivo*, permitindo esclarecer o papel biológico e molecular dessas proteínas.

Acredita-se que o estudo funcional de proteínas de *S. mansoni* levará a um melhor entendimento da biologia do parasito, acarretando em novas possibilidades na pesquisa para o controle e tratamento da esquistossomose. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade e importância da análise dos possíveis papéis biológicos de proteínas do verme.

### **1.6- O sistema de complementação funcional de leveduras nocaute**

O sistema de complementação funcional heteróloga de leveduras é utilizado para verificar se proteínas de outros organismos estão envolvidas no mesmo processo biológico que a proteína de levedura, possuindo supostamente a mesma função. Para isto, é necessário fazer a disrupção do gene alvo na levedura, transformar estas leveduras com o cDNA codificador da proteína ortóloga de interesse e, posteriormente verificar a reativação da função defectiva.

O caminho mais fácil para inativar um gene específico é fazer sua disrupção com um segmento de DNA exógeno. Isto pode ser obtido através de recombinação homóloga entre a cópia cromossômica do gene e um segmento de DNA que contenha alguma seqüência idêntica com o gene alvo. Se duas moléculas de DNA possuem seqüências similares, a recombinação pode resultar em segmentos trocados das moléculas. Em levedura, não é essencial uma região de identidade extensa 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). A interrupção de um gene pode ser feita inserindo em seu lugar o cassete de um gene repórter. Dessa forma obtém-se uma marcação para leveduras nocaute, permitindo sua seleção.

Uma linhagem de levedura contendo um gene inativado pode ter seu fenótipo examinado para assinalar uma função para o gene. Uma vez identificada a função gênica associada a algum fenótipo específico, linhagens de levedura nocaute podem ser utilizadas em trabalhos de complementariedade funcional. Se um determinado organismo possui um gene ortólogo ao da levedura, este pode ser introduzido na levedura nocaute para verificação da complementação. Se a levedura reverter ao fenótipo selvagem, pode-se dizer que as duas proteínas apresentam a mesma função biológica.

Os efeitos de algumas inativações gênicas são muito sutis e podem não ser reconhecidos quando o fenótipo é examinado. Talvez este gene seja dispensável. Seu produto gênico pode estar envolvido em alguma função que não seja essencial, ou ter uma função que é duplicada por um segundo gene (Brown, 1999). Por outras vezes, a inativação gênica é muito drástica, podendo ser letal.

### **1.7 - O sistema de duplo-híbrido**

O ensaio de duplo-híbrido, desenvolvido por Fields e Song em 1989, é um sistema genético para estudar interações entre proteínas, utilizando propriedades da proteína GAL4 da levedura *S. cerevisiae*. Essa proteína é um ativador transcricional requerido para a expressão de genes que codificam

enzimas utilizadas para o catabolismo da galactose. A GAL4 consiste de dois domínios distintos e funcionalmente essenciais: um domínio N-terminal que se liga a sequências específicas de DNA (promotor *Upstream Activation Sequence- UAS*) e um domínio C-terminal contendo regiões ácidas que são necessárias para ativar a transcrição. O sistema se baseia em duas proteínas híbridas contendo partes de GAL4: o domínio de ligação ao DNA de GAL4 (vetor pGBT9 ou pAS2.1) fusionado a uma proteína “X” e o domínio de ativação de GAL4 (vetor pGAD424 ou pAD) fusionado a uma proteína “Y”. No interior da levedura, se X e Y formarem um complexo proteína-proteína, ou seja, um dímero, será reconstituída a proximidade dos domínios de GAL4 e ocorrerá a transcrição de um gene repórter.

Desde sua descrição, o sistema de duplo-híbrido em leveduras tem sido extensivamente usado para identificar interações proteína-proteína. Com a intenção inicial de detectar interações entre duas proteínas conhecidas, rapidamente foi aprimorado para funcionar como um mecanismo de triagem para encontrar proteínas que interagissem com a proteína de interesse (Legrain *et al*, 2000). Dessa forma, uma proteína X de interesse pode ser utilizada como isca para buscar em uma biblioteca de cDNA clonada no vetor pAD sua presa, ou seja, seu parceiro biológico. Estas triagens facilitam o entendimento da função biológica de um produto gênico de várias maneiras. Primeiro, elas dão uma pista sobre o papel funcional de genes previamente desconhecidos pela ligação de seu produto a proteínas já caracterizadas. Segundo, elas ajudam a assinalar novas funções para proteínas já caracterizadas. Terceiro, elas fornecem novas interações entre proteínas que

são conhecidas por estar envolvidas em um processo biológico comum (Auerbach *et al*, 2002).

### **1.8 - A ubiquitinação de proteínas**

O Prêmio Nobel de 2004 em Química pela descoberta da ubiquitinação de proteínas levou ao reconhecimento da proteólise celular como uma área central de pesquisa. Durante os primeiros estudos no campo da degradação de proteínas, pesquisadores estavam intrigados pela necessidade de ATP neste processo, pois é sabido que a hidrólise da ligação peptídica não requer energia metabólica. A estratégia usada por Hershko e colaboradores em 1979 envolveu o fracionamento de reticulócitos (hemácias diferenciadas sem lisossomos), purificação, identificação de componentes e reconstituição *in vitro* da degradação protéica citossólica dependente de ATP. Esses estudos foram confirmados por estudos genéticos e dados de outros grupos sobre a função da degradação protéica citossólica *in vivo* em diferentes processos biológicos (Nandi, 2006).

A ubiquitinação de proteínas é uma importante forma de modificação covalente que regula vários processos biológicos. Além da função de degradação de proteínas via proteassomo 26S, a ubiquitina apresenta outras funções. Dependendo do tipo de ubiquitinação, surgem funções não tradicionais como: regulação do reparo de DNA (Huang & D'Andrea, 2006); regulação transcricional (Sigismund *et al*, 2004); ativação de proteínas cinases (Sun & Chen, 2004); função ribossomal (Spence *et al*, 2000); início da resposta inflamatória (Deng, 2000); tráfico de membranas (Aguilar & Wendland, 2003;

Staub & Rotin, 2006); controle do ciclo celular (Reed, 2003); sinalização celular (Haglund & Dikic, 2005) e ainda processamento de antígenos (Ciechanover & Iwai, 2004; Varshavsky, 2005).

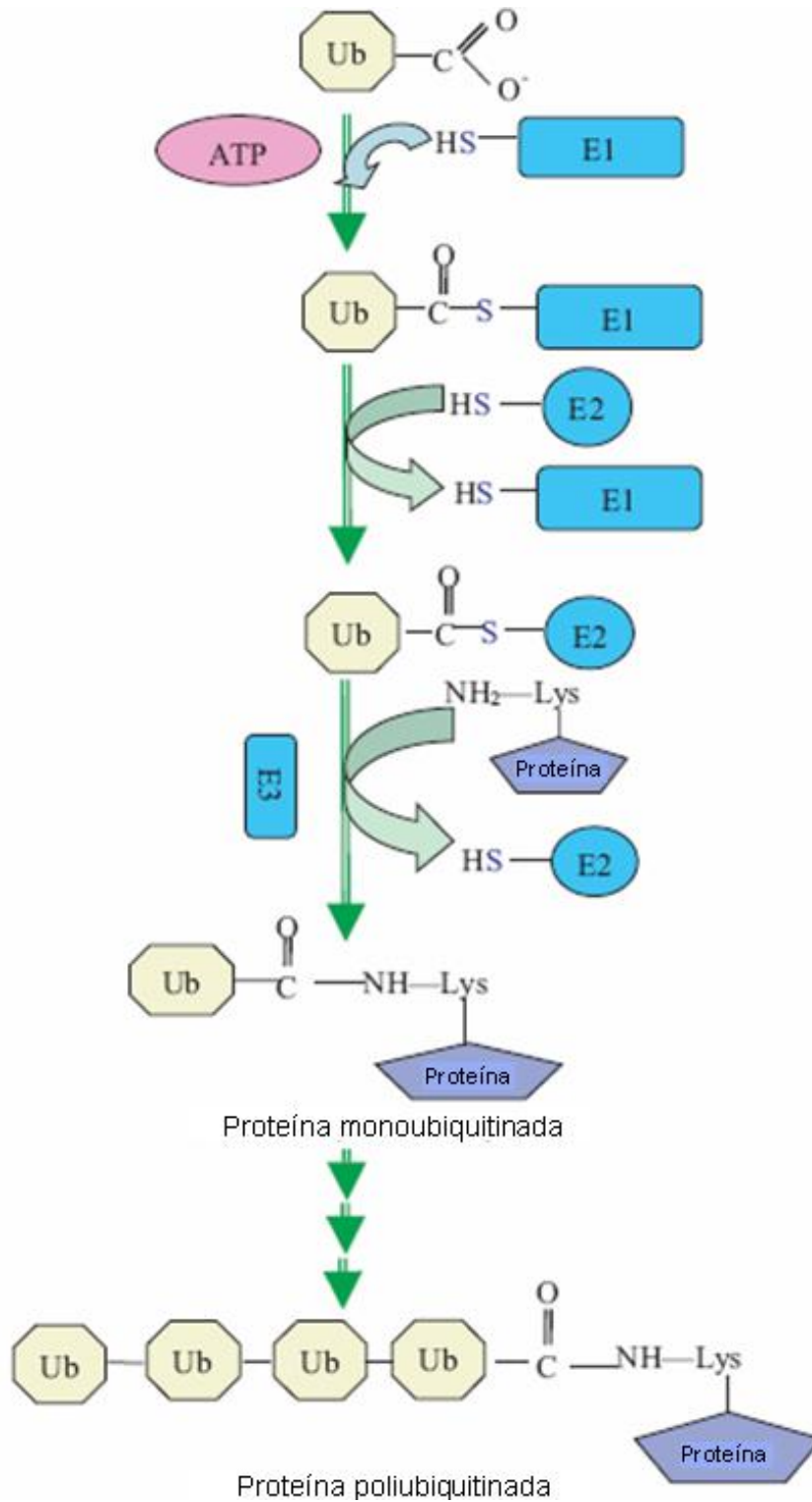
O processo de ubiquitinação consiste na marcação de proteínas no citosol de células eucarióticas com uma proteína pequena de 76 aa denominada ubiquitina para posterior degradação pelo proteassomo 26S das proteínas poliubiquitinadas (Hershko *et al*, 1980). O processo de ubiquitinação é composto por uma cascata de três enzimas, envolvendo as enzimas ativadoras da ubiquitina (E1), as enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2), e as enzimas E3 ubiquitina ligases. As enzimas E1 e E2 são responsáveis por ativar e conjugar as moléculas de ubiquitina, respectivamente, enquanto as enzimas E3 são importantes para transferir as moléculas de ubiquitina da enzima E2 para o substrato reconhecido para degradação (Pickart, 2001; Petroski & Deshaies, 2005). Uma nova classe de enzimas tem sido sugerida para estar envolvida no processo de poliubiquitinação: a enzima E4 (Ufd2 em *S. cerevisiae*), contendo um motivo U-box (Koepl *et al*, 1999; Hoppe, 2005). Interessantemente, leveduras *S. cerevisiae* nocaute em Ufd2 falham na proteólise de substratos (Koepl *et al*, 1999).

A ubiquitina é ativada para ser transferida ao substrato através da formação de uma ligação tioéster dependente de ATP entre a glicina C-terminal da ubiquitina e a enzima ativadora da ubiquitina, E1. A ubiquitina é transferida subsequentemente para um membro de uma família de enzimas conjugadoras da ubiquitina, E2. Finalmente, E2 se liga à enzima ligase E3 e a ubiquitina esterificada é transferida de E2 para o grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo de lisina da proteína alvo também ligada à E3 (Figura 4) (Hershko *et al*, 1983). Ligação

similar é formada entre a região C-terminal da ubiquitina com o grupo  $\epsilon$ -amino da lisina de outra molécula de ubiquitina para formar uma cadeia poliubiquitinada (Pickart, 2001; Weissman, 2001; Ciechanover & Iwai, 2004). Em algumas proteínas, por exemplo, que não contenham lisina, a poliubiquitinação deve ocorrer no resíduo N-terminal (Ciechanover & Ben-Saadon, 2004). O resíduo de lisina no qual a poliubiquitinação ocorre é importante. Por exemplo, formação de cadeia de poliubiquitina por ligação em Lys-48 e Lys-29 da ubiquitina deve funcionar como um sinal para degradação mediada pelo proteassomo, enquanto ubiquitinação em outros resíduos de lisina (Lys-63) deve funcionar como sinal para reparo de DNA, ativação de fatores de transcrição, etc. (Weissman, 2001). Por outro lado, mono-ubiquitinação de proteínas tem outras funções como endocitose, regulação de histonas, etc. (Hicke, 2001). Também foi demonstrado recentemente que o resíduo N-terminal da proteína alvo serve como um motivo de reconhecimento e ligação para a ubiquitina, entretanto, ubiquitinação subsequente ocorre no resíduo de lisina interno (Ciechanover & Ben-Saadon, 2004).

Enzimas E3 ligam substratos diretamente, sugerindo que elas forneçam especificidade nas reações de ubiquitinação (Seol *et al*, 1999). O reconhecimento de substratos para a ubiquitinação é determinado pela presença e acessibilidade de motivos na seqüência primária do substrato, conhecidos como sinais de ubiquitinação, que são reconhecidos pela ligase E3 (Wang *et al*, 2006).





**Figura 4: Esquema da via de ubiquitinação.** Ubiquitina é ativada por E1, processo dependente de ATP, transferida para E2 e finalmente ligada ao substrato pela E3. Poliubiquitinação é requerida para marcação da proteína para degradação. Fonte: Adaptado de Nandi, 2006

São conhecidas poucas enzimas E1 envolvidas na ubiquitinação em células de mamíferos (10 em humanos) (Hicke *et al*, 2005). Entretanto, pelo menos três outras enzimas E1 estão envolvidas na conjugação de proteínas análogas à ubiquitina (Schwartz & Hochstrasser, 2003; Staub, 2004). Existem 11 enzimas E2 em leveduras e, pelo menos, 100 em humanos. Enzimas E3 possuem uma variabilidade ainda maior: 54 em leveduras e cerca de 1.000 em humanos (Hicke *et al*, 2005). Isto indica que a ubiquitinação apresenta um importante papel na regulação celular, assim como a fosforilação. Através da especificidade mediada por E2 e E3, a ubiquitinação regula e elimina proteínas específicas enquanto deixa outras intactas. Essa regulação específica da degradação protéica permite as células regularem “decisões” celulares de forma dinâmica (Varshavsky, 2005).

A regulação da ubiquitinação conta também com proteínas desubiquitinadoras (DUBs) que revertem a ubiquitinação. Enzimas DUBs têm um papel negativo na regulação do nível de proteínas ubiquitinadas dentro da célula. Não se sabe se todos os substratos podem ser alvos destas enzimas. É mais provável que funções não proteolíticas de ubiquitinação sejam reversíveis requerendo a função de DUBs (Kim, 2003; Amerik & Hochstrasser, 2004).

Mudanças no sistema de ubiquitinação relacionadas à idade afetam vários tecidos diferentes. Muitos tecidos são objetos de intensas investigações sobre a atividade e sobre componentes do sistema de ubiquitinação (Grillari *et al*, 2006).

Existem ainda pequenos polipeptídeos análogos à ubiquitina (UBLs) como SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) e NED8 (*neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated protein-8*), que utilizam cascatas

muito similares à cascata de ubiquitinação, incluindo enzimas E1, E2, E3 e desubiquitinadoras (Schwartz & Hochstrasser, 2003; Staub, 2004). A conjugação de UBLs às proteínas alvo está envolvida em várias atividades celulares, a saber reparo de DNA, controle do ciclo celular, transporte nuclear e resposta a infecções virais (Gill, 2004). NED8 (Rub1 em *S. cerevisiae*) não é um sinal direto para a degradação, mas na regulação de ligases E3 da via de ubiquitinação (Welchman *et al*, 2005).

Uma reviravolta no conceito do processo de degradação protéica surgiu durante um estudo sobre a degradação do supressor tumoral p53. Foi visto que p53 também está propenso à degradação independente de ubiquitina pelo proteassomo 20S, sugerindo que algumas proteínas apresentam instabilidade inerente. Além disso, foi relatado que este processo de degradação é mediado pelo proteassomo 20S e inibido pela NADH ubiquinona oxidorreductase 1 (enzima mitocondrial da cadeia de transporte de elétrons). Essas descobertas recentes e outras observações de degradação independente de ubiquitina sugerem a existência de mecanismos não relacionados à ubiquitina para a degradação de proteínas via proteassomo nas células (Asher & Shaul, 2006).

### **1.8.1 - A ubiquitinação de proteínas em *S. mansoni***

O parasito *S. mansoni* durante o seu ciclo de vida sofre várias transformações morfológicas e adaptações a diferentes ambientes como a água, os hospedeiros invertebrado e vertebrado. Essas adaptações requerem diversas modificações celulares e moleculares, direcionadas pela expressão gênica diferencial. Assim, uma série de proteínas distintas são sintetizadas e degradadas durante as modificações morfológicas.

Processos como a síntese e degradação protéica, modificações pós-traducionais e processamento de proteínas, bem conhecidas em organismos eucarióticos, provavelmente ocorrem da mesma maneira nesse parasito. No entanto, a investigação de semelhanças e diferenças nesses processos é crucial para o possível desenvolvimento de drogas mais eficientes para o controle da esquistossomose.

Com relação ao processo de ubiquitinação e degradação protéica, alguns avanços foram feitos para o *S. mansoni*, como relatado a seguir. Um clone de cDNA de *S. mansoni* codificando para uma proteína homóloga a proteína ligante de multiubiquitina S5a foi caracterizado (Harrop *et al*, 1999). Outro gene, SmSINA, sugerido como sendo um regulador da ubiquitinação e degradação de receptores nucleares induzida por ubiquitina em *S. mansoni* também foi caracterizado (Fantappie *et al*, 2003). Recentemente, a presença do proteassomo 26S em *S. mansoni* foi inferida baseada na existência de um sistema proteolítico cuja atividade é estimulada por ATP e ubiquitina e reduzida por inibidores de proteassomo altamente específicos (Guerra-Sa *et al*, 2005).

### **1.9- Enzimas E3 ubiquitina ligases**

Enzimas E3 são determinantes centrais de especificidade na ubiquitinação, pois reconhecem sinais nas proteínas alvo (Wang *et al*, 2006). A habilidade das E3 catalisarem poliubiquitinações processivas dos seus substratos é importante para o direcionamento ao proteassomo. Se E3 libera o substrato com poucas ubiquitinas, o substrato pode perder suas ubiquitinas

antes de alcançar o proteassomo, devido à ação das enzimas deubiquitinadoras (Pickart, 2000).

Existem duas classes principais de ligases E3: RING e HECT. Nas ligases E3 que possuem domínio RING (*Really Interesting New Gene*) a ligase liga-se ao substrato e interage com E2 promovendo a transferência direta da ubiquitina para a proteína alvo (Ho *et al*, 2006). Ligases HECT (*Homologous to E6-AP COOH Terminal*) também interagem com enzimas E2, entretanto, a ubiquitina é primeiramente transferida para uma cisteína conservada no domínio HECT e então a enzima E3 ubiquitina a proteína alvo (Huibregtse, 1995).

Três tipos de multisubunidades E3 são conhecidos, nas quais uma pequena proteína RING é um componente essencial: SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein*), APC (*anaphase-promoting complex*) e VCB (*pVHL, elongin B/C*). Os complexos SCF e VCB possuem uma proteína RING conhecida como Rbx1 (ou Hrt1/Roc1) que interage fortemente com uma proteína da família culina (Cul1/Cdc53 em SCF E3s e Cul2 em VCB) (Ohta *et al*, 1999). Rbx1 tem um papel importante no recrutamento da enzima E2 (Tan *et al*, 1999; Seol *et al*, 1999). O complexo APC também tem uma proteína RING, a Apc11 (Page & Hieter, 1999).

No nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a inativação de Rbx1 por RNAi causou defeitos na primeira divisão meiótica, provocando fenótipos pleiotrópicos como defeitos na condensação e segregação de cromossomos na mitose, núcleos gigantes, células multinucleadas e defeitos na proliferação celular (Sasagawa *et al*, 2003). A proteína HRT1 de *S. cerevisiae* é ortóloga da proteína humana Rbx1, apresentando 64% de similaridade. A proteína de

leveduras também é parte de um complexo protéico envolvido no processo de ubiquitinação (Kamura *et al*, 1999; Seol *et al*, 1999; Skowyra *et al*, 1999).

A subunidade de VCB que reconhece o substrato é pVHL, o produto do gene supressor de tumor Von Hippel-Lindau (Maxwell *et al*, 1999). pVHL é recrutado para o complexo através de interações com o adaptador heterodimérico elonguina B/C.

O complexo SCF é assim denominado pela presença das proteínas **Skp1** (163 aminoácidos), **Cul1** (776 aminoácidos), um membro da família **F-box** (~430 a > 1000 aminoácidos) e **Rbx1** (108 aminoácidos). Rbx1 e Cul1 formam o centro catalítico do complexo que recruta uma E2. A subunidade variável do complexo, a proteína F-box, liga o substrato. Skp1 funciona como um adaptador que liga a proteína F-box à Cul1 (Zheng *et al*, 2002). A estrutura tridimensional determinada a partir do cristal do complexo pode ser observada na Figura 5.

Células humanas expressam 7 diferentes culinas (Cul1, 2, 3, 4A, 4B, 5 e 7) cada uma compondo uma multisubunidade de ubiquitina ligase. O complexo SCF é formado pela Cul1, mas outros complexos possuem subunidades distintas (Petroski & Deshaies, 2005).

O componente F-box é responsável pelo reconhecimento de diferentes substratos para ubiquitinação, sendo esta subunidade a mais diversa do complexo SCF. Assim, é possível que existam centenas de diferentes ubiquitinas ligases SCF em células eucarióticas, desenvolvendo um papel de regulação pós-traducional (Ho *et al*, 2006).

NEDD8 pode ligar covalentemente a todos os membros da família culina (Hori *et al*, 1999). NEDD8 pode regular positivamente atividade do complexo

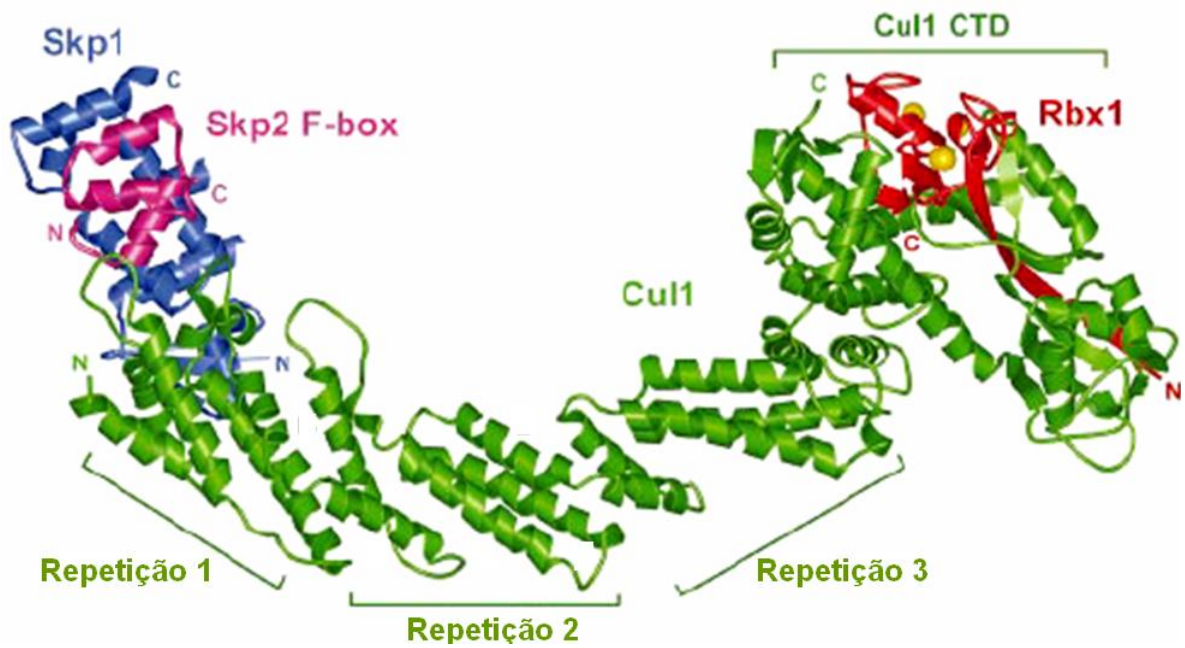


Figura 5: Estrutura 3D obtida a partir do cristal do complexo SCF de humanos.

Fonte: Adaptado de Zheng *et al.*, 2002.

SCF através de sua ligação à Cul1, evitando a associação de Cul1 com um inibidor da atividade de SCF, conhecido como CAND1 (*cullin-associated neddylation-dissociated-1*) (Cope & Deshaies, 2003; Liu *et al*, 2002). A regulação das E3 ligases formadas por culina e proteína RING está esquematizada na Figura 6.

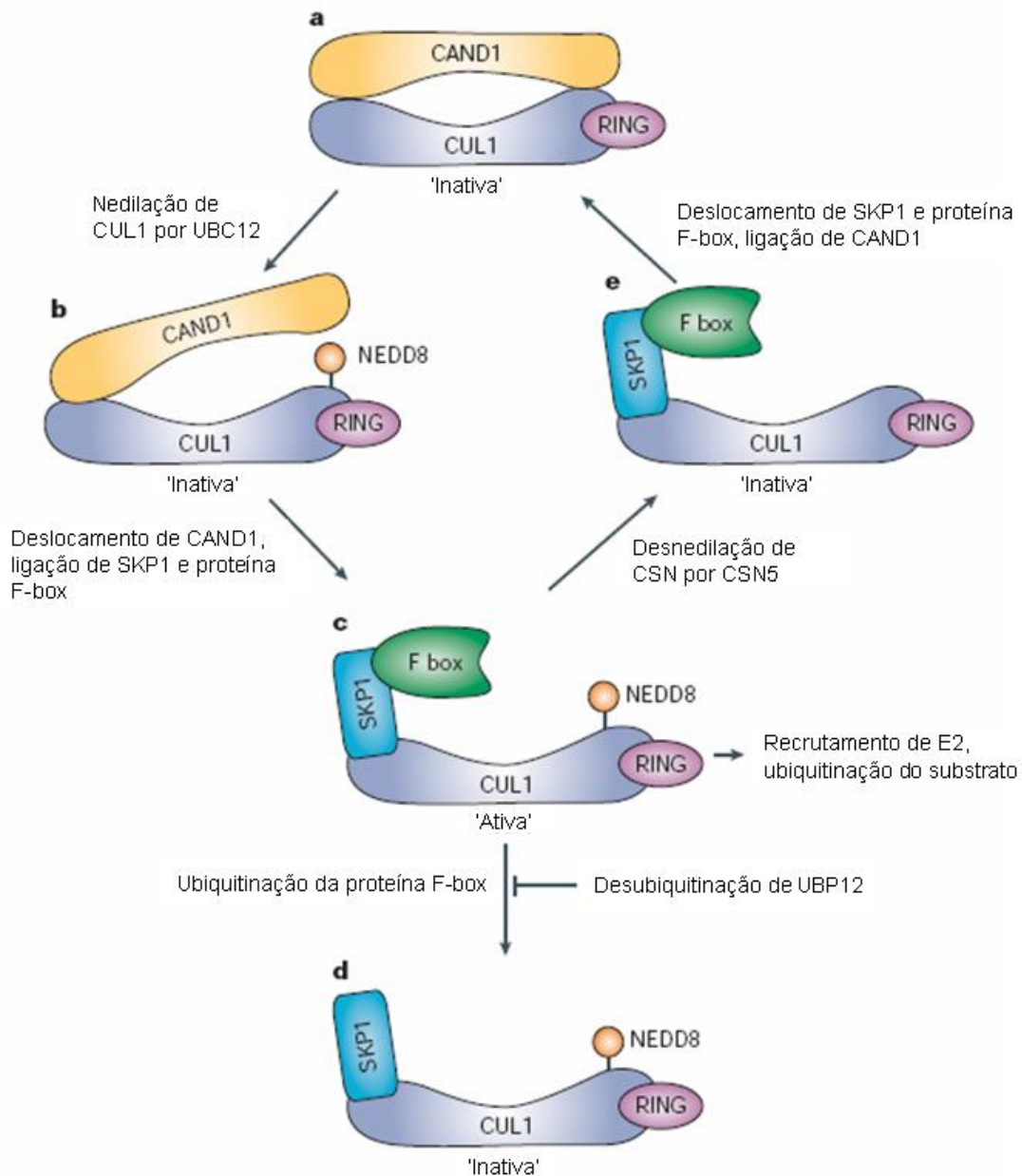
O complexo SCF é responsável pela ubiquitinação de uma vasta gama de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, transdução de sinal e transcrição (Zheng *et al*, 2002). O complexo é requerido para a transição G1/S do ciclo celular (Tyers & Jorgensen, 2000) porque inibidores da transição do ciclo celular, ciclinas e CDK são substratos do complexo SCF (Feldman *et al*, 1997). Desregulação do sistema proteolítico deve resultar em proliferação descontrolada, instabilidade genômica e câncer. Por esse motivo, mutações em proteínas do complexo SCF estão relacionadas com várias manifestações de neoplasias (Minella & Clurman, 2005; Nakayama & Nakayama, 2006).

Kus e colaboradores, 2004, reconstituíram e purificaram 12 novos complexos SCF e exploraram a capacidade destes complexos de se ligarem a 5 diferentes enzimas E2: Ubc1, Cdc34, Ubc4, Ubc8 e Ubc11. Foi observado que cada enzima E2 tem especificidade por um tipo de E3. A interação entre SCF e componentes E2 da maquinaria de ubiquitinação pode permitir uma maior diversificação do papel de SCF *in vivo*.

### **1.10- Domínios RING**

Domínios RING (*Really Interesting New Gene*) são caracterizados por apresentar um padrão de resíduos conservados de cisteínas e histidinas que





**Figura 6: Regulação da atividade ligase do complexo SCF através de CAND1/NEDD8.**

Ciclos de ligação e remoção de NEDD8 podem ser importantes na regulação da atividade de enzimas Culina-RING-ligasas (CRL). (a) Quando o cerne enzimático de SCF está acoplado a CAND1, este fica retido no estado inativo. (b) O fator de conjugação NEDD8, que possivelmente atua em conjunto com fatores desconhecidos, resulta na dissociação de CAND1. (c) Isso pode, por sua vez, causar a montagem de um módulo de reconhecimento de substrato SKP1–F-box no cerne enzimático de SCF. O complexo ativo resultante pode ubiquitinar substratos ligados. (d) A interrelação entre a enzima desubiquitinadora UBP12 ligada a CSN e a maquinaria de ubiquitinação pode modular a abundância de substrato regulando a estabilidade da proteína F-box. Assim que uma proteína F-box é ubiquitinada e degradada, uma nova proteína F-box pode se re-associar com SCF. (e) Alternativamente, NEDD8 pode ser destacada da culina-1 (CUL1) através da atividade isopeptidase da subunidade CSN5 de CSN, que por sua vez, pode levar à dissociação de SKP1 e seqüestro de CUL1 por CAND1.

Fonte: Adaptado de Petroski & Deshaies, 2005.

se ligam a dois átomos de zinco usando um arranjo cruzado único. A ligação ao zinco é necessária para o enovelamento do domínio e, conseqüentemente para sua ação biológica (Borden, 2000).

Não há características comuns aparentes entre membros da família RING em termos de funções, distribuição subcelular ou organismos nos quais estas proteínas são encontradas (Borden, 1998). Estas proteínas são encontradas mediando diversos processos celulares. Dentre eles pode-se citar: progressão do ciclo celular, oncogênese, apoptose, desenvolvimento e infecção viral, repressão da transcrição e ubiquitinação. Várias proteínas RING estão associadas a doenças humanas. Em geral, mutações que alteram a integridade de RING resultam na disrupção dos complexos macromoleculares formados por RING e conseqüentemente, os processos nos quais estes complexos estão envolvidos. Frequentemente estas disrupções têm efeitos desastrosos no destino da célula (Borden, 2000). A família de proteínas RING é definida pela presença da seqüência padrão C1-x<sub>2</sub>-C2-x<sub>(9-39)</sub>-C3-x<sub>(1-3)</sub>-H1-x<sub>(2-3)</sub>-C4-x<sub>2</sub>-C5-x<sub>(4-48)</sub>-C6-x<sub>2</sub>-C7 onde x pode ser qualquer aminoácido, embora análises de seqüências indiquem que há preferência por certos resíduos (Freemont, 1993).

Algumas proteínas RING contêm, além do domínio RING, um ou mais domínios que se ligam a zinco conhecidos por B-box seguido por um domínio *coiled coil* de leucina (BCC). Este subconjunto de RINGs é conhecido como RING B-box *coiled coil* (RBCC) ou simplesmente RING box. O domínio B-box contém um único motivo de ligação a zinco, definido pela seqüência consenso C1-x<sub>2</sub>-H1-x<sub>7</sub>-C2-x<sub>7</sub>-C3-x<sub>2</sub>-C4-x<sub>5</sub>-H2-x<sub>2</sub>-H3. Embora existam sete resíduos ligantes conservados, apenas um átomo de zinco é ligado por B-box. A

proteína RING box pode conter um ou dois domínios B-box adjacentes. A separação entre os motivos de ligação a zinco entre 2 domínios B-box é altamente conservada entre membros da família, sugerindo que as posições destes motivos possuem uma importância funcional. O espaçamento entre RING e o primeiro B-box varia entre 38 e 40 aminoácidos. A conservação da distância entre os domínios RING e B-box sugere que estes possam interagir, formando um enovelamento integrado (Borden, 1998).

### **1.11- A proteína SmRbx**

Através da triagem de uma biblioteca de cDNA de vermes adultos pelo sistema do duplo-híbrido em leveduras, utilizando o fator de transcrição SMYB1 como isca, foi isolado um cDNA que apresentava homologia com uma proteína RING box de vários organismos. Posteriormente, foi demonstrado que este se tratava de um resultado de interação falso-positivo (Valadão *et al*, 2002). Apesar disso, houve interesse em estudar esta proteína, tentando caracterizá-la funcionalmente.

A proteína de *S. mansoni*, SmRbx, é codificada por um cDNA que possui uma janela aberta de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) de 324 pb. Ao compararmos a proteína SmRbx com seu ortólogo humano (Rbx1) verificamos que a semelhança entre as duas proteínas é muito grande, sendo que elas apresentam 89% de identidade. Esta grande similaridade pode sugerir então que essas proteínas apresentam um papel biológico relacionado.

SmRbx também possui um ortólogo em *Saccharomyces cerevisiae*, *HRT1*, com 64% de identidade. *HRT1*, assim como Rbx1 humana, faz parte do

complexo (SCF), envolvido na ubiquitinação de proteínas (Kamura *et al*, 1999; Seol *et al*, 1999; Skowyra *et al*, 1999). A deleção do gene codificador de HRT1 em leveduras é letal (Lucau-Danila *et al*, 2000). A proteína humana é capaz de complementar a letalidade de HRT1 em leveduras, desempenhando ambas a mesma função bioquímica (Seol *et al*, 1999).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral

Estudar funcionalmente a proteína SmRbx utilizando o sistema de complementação funcional em leveduras e o sistema de duplo-híbrido em leveduras.

### 2.2- Objetivos específicos

- Caracterizar *in silico* o gene e a proteína SmRbx.
- Construir uma linhagem de levedura nocaute para *HRT1* complementada por SmRbx.
- Caracterizar leveduras nocaute para *HRT1* complementadas com SmRbx, analisando sua morfologia, sensibilidade a variações de temperatura e curva de crescimento.
- Verificar regiões da proteína SmRbx essenciais para sua função por complementação funcional da levedura *HRT1* nocaute.
- Verificar se SmRbx é capaz de interagir com Cul1 através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.
- Identificar genes de *S. mansoni* similares àqueles codificadores das proteínas do complexo SCF (Cul1 e Skp1) nos *contigs* genômicos de *S. mansoni*.
- Expressar e purificar a proteína SmRbx.
- Produzir anticorpos policlonais anti-SmRbx em camundongos.

## 3- MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1- O vetor pYEDP 60-2

O vetor pYEDP 60-2 (9.257 pb), gentilmente cedido pelo Dr. Francisco Nóbrega, UNIVAP, São Paulo, possui um sítio múltiplo de clonagem posicionado na região 3' de um promotor que é ativado pela presença de galactose, o GAL10/CYC1. O DNA codificador da proteína de interesse deve ser ligado no sítio múltiplo de clonagem na orientação correta do promotor. O vetor pYEDP 60-2 é capaz de se replicar em *Escherichia coli* e *S. cerevisiae*. Ele possui o gene *bla* de resistência a ampicilina e os marcadores *URA3* que permite que leveduras auxotróficas carregando pYEDP 60-2 cresçam em meio faltando uracila e *ADE2* que permite que leveduras auxotróficas carregando pYEDP 60-2 cresçam em meio faltando adenina. O mapa do vetor pYEDP 60-2 está esquematizado no Anexo 1.

### 3.2- O vetor pYTS

O vetor pYTS foi construído pelo Dr. Túlio Marcos Santos introduzindo a região promotora do gene *Rho1* de *S. mansoni* nos sítios de *HindIII* e *PstI* do plasmídeo pYEplac112, gentilmente cedido pelo Professor Dr. José Miguel Ortega (Santos *et al*, 2002). O mapa do vetor pYTS está esquematizado no Anexo 2.

### **3.3- O vetor pAS2.1**

O vetor pAS2.1 (8.393 pb) (Clontech) possui a seqüência de DNA codificadora do domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 (aminoácidos 1-147). Este vetor possui um sítio múltiplo de clonagem (nucleotídeos 5.970-6.015) posicionado na região 3' da seqüência do domínio de ligação de GAL4. Para a construção de uma proteína híbrida, o cDNA codificador da proteína de interesse é ligado no sítio múltiplo de clonagem na orientação e janela de leitura corretas. A proteína híbrida é expressa em altos níveis na levedura hospedeira e direcionada ao núcleo devido à seqüência de localização nuclear adicionada ao domínio de ativação. O vetor pAS2.1 é capaz de se replicar em *E. coli* e em *S. cerevisiae*. Este vetor possui o gene *bla* (nucleotídeos 7.403-8.263) de resistência à ampicilina em *E. coli* e o marcador *TRP1* (nucleotídeos 1.884-2.258) que permite que leveduras auxotróficas carregando pAS2.1 cresçam em meio faltando triptofano. O mapa do vetor pAS2.1 está esquematizado no Anexo 3.

### **3.4- O vetor pGAD424**

O vetor pGAD424 (6.659 pb) (Clontech) possui a seqüência de DNA codificadora do domínio de ativação da transcrição da proteína GAL4 (aminoácidos 768-881). Este vetor possui um sítio múltiplo de clonagem (nucleotídeos 834-866) posicionado na região 3' da seqüência do domínio de ativação de GAL4. Para a construção de uma proteína híbrida, o cDNA codificador da proteína de interesse (ou uma coleção de cDNAs) é ligado no

sítio múltiplo de clonagem na orientação e janela de leitura corretas. A proteína híbrida é expressa em altos níveis na levedura hospedeira e direcionada ao núcleo devido à seqüência de localização nuclear de fonte heteróloga adicionada ao domínio de ativação de GAL4. O vetor pGAD424 é capaz de se replicar em *E. coli* e *S. cerevisiae*. Este vetor possui o gene *bla* (nucleotídeos 5.108-4.248) de resistência a ampicilina em *E. coli* e o marcador *LEU2* (nucleotídeos 2.640-1.546) que permite que leveduras auxotróficas carregando pGAD424 cresçam em meio faltando leucina. O mapa do vetor pGAD424 está esquematizado no Anexo 4.

### **3.5- O vetor pMAL-c2G**

O vetor pMAL-c2G apresenta forte expressão induzida pelo promotor *tac* na presença de IPTG e a proteína de interesse é produzida em fusão com uma proteína que se liga a maltose (MBP), o que proporciona fácil purificação por cromatografia de afinidade em coluna de resina de amilose. Além disso, a proteína de interesse purificada pode ser separada da MBP pela clivagem proteolítica com a enzima Genenase I, que age em um sítio de clivagem específico (His-Tyr-Glu e His-Tyr-Asp) ([http://www.neb.com/neb/frame\\_tech.html](http://www.neb.com/neb/frame_tech.html)). O mapa do vetor pMAL-c2G está esquematizado no Anexo 5.



### 3.6- Sequenciamento do cDNA de SmRbx e caracterização gênica e protéica *in silico*.

O cDNA de SmRbx foi obtido pela então aluna de Doutorado Analina Furtado Valadão através de uma triagem de bibliotecas de cDNAs de vermes adultos (Valadão, 2002). Este cDNA estava clonado no vetor pAD e foi seqüenciado usando os iniciadores ADFwd e ADRev (Tabela 1) em aparelho de sequenciamento automático de DNA MegaBACE 1000 (GE HealthCare), segundo o método descrito por Sanger e colaboradores em 1977. Na reação de sequenciamento foram utilizados 200 ng de DNA, 10 pmol de iniciador e 4 µL do kit DYEnamic™ ET dye terminator MegaBACE™ (GE HealthCare).

A procura de ORF no cDNA foi feita utilizando o programa ORF Finder (<http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>). A tradução do cDNA em proteína foi feita através do programa Translate (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Para a análise da estrutura gênica de SmRbx, de Cul1 e Skp1 foi feito um BLASTN (Altschul *et al*, 1990), utilizando as seqüências de cDNAs destes genes como pergunta contra e os *contigs* gerados pelo Projeto Genoma de *S. mansoni* do Wellcome Trust Sanger Institute (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Schistosoma/mansoni/genome/Assembly-v3.1>), com um *e-value cutoff* de -10. O *contig* que apresentou melhor resultado de BLAST foi alinhado com o cDNA de SmRbx na região de similaridade através do programa Multalin (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988).

**Tabela 1 – Iniciadores usados para amplificação por PCR.**

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
ADFwd	5' CAGGGATGTTTAATACCACATC 3'
ADRev	5' GCACAGTTGAAGTGAACCTGC 3'
RboxF	5' GAC <b>GAAATC</b> ATGGAAGTTGATGATACA 3'
RboxR	5' GAG <b>CTGCAG</b> AATCACCAGGTCCACT 3'
yHRT1F	5' GAC <b>GGATCC</b> ATGAGCAACGAAGTTGAC 3'
yHRT1R	5' GAG <b>GGTACC</b> TTTTCACCTACCGCATCT 3'
yCulF	5' GAG <b>GAAATC</b> TCGAAGACTTCCGAGATGCTA 3'
yCulR	5' GAG <b>CTGCAG</b> TTAAGCAAGGTAAGCATACGA 3'
HRT1F	5' <b>TAGTTCAACATGAGCAACGAAGTTGACAGGATGGATGTTCTTCATTCAA</b> CGTTTCCCAT 3'
HRT1R	5' <b>TCACCTACCGCATCTTGCTAACTGCCAAGGTTGGTTATCTAGTATCATA</b> CTGTTCGTATA 3'
HRT1Fe	5' GCAGAGAACTTTAAAGAG 3'
HRT1Re	5' TTTACGGGCAATTCATTT 3'
HIS311	5' AACCCATACCTGTGTGGA 3'
SmboxF1	5'GAC <b>GGATCC</b> ATGTCAGAAATGGAAGTT 3'
SmboxF2	5' GAC <b>GGATCC</b> AATAAGAAACGTTCCGAG 3'
SmboxF3	5' GAC <b>GGATCC</b> ATAAAAAAGTGGTATGCG 3'
SmboxF4	5' GAC <b>GGATCC</b> GTTGCTTTATGGGCCTGG 3'
SmboxF5	5' GAC <b>GGATCC</b> GTTGTTGATAATTGTGCT 3'
SmboxR1	5' GAG <b>GGTACC</b> CACTCAGTGGCCATATTT 3'
SmboxR2	5' GAG <b>GGTACC</b> GTTGTCTAGAGGGCAAAC 3'

Para analisar a expressão gênica em diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, foi feito um BLASTN usando a seqüência do cDNA de SmRbx contra as ESTs de *S. mansoni* do dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para a análise teórica do peso molecular e ponto isoeletrico da proteína SmRbx, foi utilizado o programa ProtParam (<http://expasy.cbr.nrc.ca/cgi-bin/protparam>). A presença do domínio RING foi observada por pesquisas em três bancos de dados distintos para a análise de domínios protéicos e assinaturas em proteínas: SMART (<http://www.smart.ebml-heidelberg.de>), PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) e Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Para identificação de possíveis sítios de modificações pós-traducionais foi utilizado o programa PROSITE. Para identificar sinais na seqüência primária da proteína capazes de determinar sua localização celular, foi utilizado o programa Psort (<http://psort.nibb.ac.jp>).

Com o objetivo de comparar a estrutura tridimensional de SmRbx com seu correspondente humano, foi feita uma modelagem computacional por homologia, utilizando o programa SwissModel (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Esta modelagem foi baseada na estrutura cristalizada de Rbx1 humana. A visualização da estrutura tridimensional gerada foi feita pelo programa RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index.html>).

### 3.7- Disrupção do alelo do gene *HRT1* de levedura por recombinação homóloga

#### 3.7.1- Amplificação do DNA codificador da proteína *HIS3*

Na disrupção de um dos alelos *HRT1*, primeiramente, foi amplificado o DNA do marcador auxotrófico *HIS3* clonado no plasmídio pDIS, gentilmente cedido pelo Professor Dr. Francisco Nóbrega (UNIVAP, São José dos Campos, SP). Os iniciadores utilizados nesta amplificação (*HRT1F* e *HRT1R*) continham em suas extremidades 40 nucleotídeos da seqüência de *HRT1* de *S. cerevisiae* (em azul – Tabela 1) e 20 nucleotídeos da seqüência de *HIS3* (em preto – Tabela 1).

Nessa reação foram utilizados 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria) (Tris-HCl 10mM pH 8,4, KCl 50mM, 0,1% Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) e 10 ng do vetor pDIS contendo o DNA de *HIS3*, em um volume final de 50  $\mu$ L. Para a reação de PCR foi utilizado o seguinte programa:

- desnaturação a 96°C por 5 minutos
- 25 ciclos de: desnaturação a 95°C por 1 minuto
  - anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto
  - extensão a 72°C por 1 minuto
- extensão a 72°C por 1 minuto

A amplificação de um produto de 1163 pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto amplificado foi purificado utilizando o Kit Wizard<sup>TM</sup> PCR prep (Promega), conforme

especificação do fabricante, e dosado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### **3.7.2- Transformação e recombinação homóloga em *S. cerevisiae* diplóide**

Na disrupção de um dos alelos *HRT1* foi utilizada a cepa de *S. cerevisiae* diplóide construída a partir das linhagens haplóides BY4727 (MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 200 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 trp1 $\Delta$ 63 ura3 $\Delta$ 0) e BY4736 (MATa ade2 $\Delta$ ::hisG his3 $\Delta$ 200 met15 $\Delta$ 0 trp1 $\Delta$ 63 ura3 $\Delta$ 0) (Brachmann *et al*, 1998) produzindo uma linhagem BY4727/36 (MATa/MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 200 met15 $\Delta$ 0 trp1 $\Delta$ 63 ura3 $\Delta$ 0). Leveduras BY4727/36 foram crescidas por 16 horas a 30°C em meio YPD (peptona 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2%, pH 7,0) sob agitação. Foi feita uma diluição das células em meio YPD e o crescimento das leveduras foi acompanhado até atingirem DO<sub>600</sub> de 1,0. As leveduras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm em centrífuga Hitachi, lavadas com H<sub>2</sub>O e centrifugadas novamente por 2 minutos a 5.000 rpm. As células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Foram transferidos 50 $\mu$ L para um tubo Eppendorf. As células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos e descartado o sobrenadante. Foram adicionados lentamente 240 $\mu$ L de Polietilenoglicol 50% (PEG 4000), 36 $\mu$ L de acetato de lítio 1,0M, 25 $\mu$ L de DNA de esperma de salmão (3  $\mu$ g/mL) previamente desnaturado e 50 $\mu$ L do produto da amplificação de *HIS3* (1,0 $\mu$ g). Esta mistura foi agitada e incubada em estufa a 30°C por 30 minutos. Posteriormente foi feita uma incubação a 42°C por 22 minutos. Após incubação, as células foram centrifugadas por 15 segundos a 14.000 rpm em centrífuga Eppendorf e o sobrenadante foi retirado. A

ressuspensão das células foi feita em 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Dentro da levedura ocorre um processo de recombinação gênica entre o produto da PCR contendo o gene de *HIS3* e um dos alelos do gene *HRT1* da levedura. Dessa forma é feita a disrupção de um dos alelos de *HRT1* e a inserção do gene repórter *HIS3*, interrompendo a fase de leitura deste gene. As leveduras transformadas foram crescidas em meio SD +Met +Ura +Trp + Gli. Os clones obtidos foram submetidos à PCR de colônia de levedura para confirmar a inserção do cassete de *HIS3*. Para isso, foram feitas duas amplificações: na primeira foram utilizados iniciadores externos à região codificadora do cDNA de *HRT1* (HRT1Fextn e HRT1Rextn – Tabela 1). Na segunda amplificação, foi utilizado um iniciador externo à região codificadora do cDNA de *HRT1* (HRT1Fextn) e um iniciador que se anela em uma região específica do gene *HIS3* (HIS311 – Tabela 1).

Nas reações de PCR foram utilizados 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria), em um volume final de 25 µL. Nas reações de PCR utilizou-se o programa descrito na seção 3.7.1. A amplificação de um fragmento de 416 pb na primeira reação de PCR e de um fragmento de 602 pb na segunda reação de PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### **3.8- Clonagem do cDNA de SmRbx no vetor pYEDP 60-2**

#### **3.8.1- Amplificação do cDNA de SmRbx**

O cDNA de SmRbx foi amplificado do vetor pAD, onde havia sido previamente clonado, utilizando os iniciadores RboxF e RboxR (Tabela I). Estes iniciadores contêm em suas extremidades 5' sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, respectivamente, e amplificam toda a região codificadora do cDNA.

Nessa reação foram utilizados 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria) e 10 ng do vetor pAD contendo o cDNA de SmRbx, em um volume final de 10 µL. Na reação de PCR foi utilizado o mesmo programa citado na seção 3.7.1. A amplificação de um produto de 351 pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto amplificado foi purificado utilizando o Kit Wizard<sup>TM</sup> PCR prep (Promega), conforme especificação do fabricante, e dosado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### **3.8.2- Clonagem de SmRbx no vetor pCR2.1-TOPO**

O produto de amplificação de SmRbx, utilizando os iniciadores RboxF e RboxR, foi ligado ao vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Este é um T-vector, ou seja, é linearizado com uma enzima que corta o DNA em extremidades cegas e, posteriormente, é adicionado um nucleotídeo de timina nas extremidades 3' deste vetor linearizado. Desta forma, é possível ligar produtos de PCR, pois estes possuem em suas extremidades 3' um nucleotídeo de adenina,

naturalmente adicionado pela Taq DNA polimerase. A ligação foi feita com 2  $\mu$ L do produto de PCR, utilizando o kit de clonagem TOPO TA Cloning (Invitrogen).

### **3.8.3- Transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ eletrocompetentes com o plasmídeo pCR2.1-TOPO/SmRbx, seleção, obtenção e sequenciamento dos plasmídios recombinantes**

O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes. Estas bactérias (50  $\mu$ L) foram incubadas com 3  $\mu$ L de cada produto de ligação por 5 minutos, em gelo. Como controle positivo da transformação, foi feita uma incubação com 10 ng do vetor pUC18 intacto. Como controle negativo da transformação, as células DH5 $\alpha$  foram incubadas sem plasmídios. Após a incubação, as bactérias foram submetidas a uma descarga elétrica de 3.400 volts por 2,5 milisegundos em eletroporador Micro Pulser™ (BIORAD). Após o choque elétrico, foram adicionados 250  $\mu$ L de meio de cultura 2xYT (extrato de levedura 1%, peptona 1,6%, NaCl 0,5%, pH 7,0) às bactérias, que foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio 2xYT ágar 1,5% contendo ampicilina (50 mg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas. Foi feita uma PCR de colônia com os clones obtidos para confirmar a presença do cDNA codificador da proteína SmRbx. Nessa reação, foram utilizados 0,2  $\mu$ M do par de iniciadores RbxFwd e RbxRev, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoentria), tampão de reação 1B (Phoentria), em um volume total de 10  $\mu$ L. Os clones escolhidos foram isolados com palito esterilizado e inoculados em tubos Eppendorf contendo a mistura citada acima. Na reação de PCR foi utilizado o programa descrito na seção 3.7.1. A amplificação de um produto de



351 pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os clones positivos foram crescidos em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. O DNA plasmidial dos clones selecionados foi extraído utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciado em aparelho de sequenciamento automático de DNA MegaBACE 1000 (GE HealthCare), segundo o método descrito por Sanger e colaboradores em 1977. Na reação de seqüenciamento foram utilizados 200 ng de DNA, 10 pmol de iniciador e 4 µL do kit DYEnamic<sup>TM</sup> ET dye terminator MegaBACE<sup>TM</sup> (GE HealthCare). Os iniciadores utilizados foram RboxF e RboxR.

#### **3.8.4- Construção do plasmídio recombinante pYEDP/SmRbx**

O inserto correspondente a SmRbx foi retirado do vetor pCR2.1-TOPO por digestão com a enzima de restrição *EcoR1*. Nesta reação, 3 µg de DNA plasmidial foram digeridos com a enzima *EcoR1* (Invitrogen) em tampão React3 (Invitrogen). O vetor de clonagem pYEDP foi digerido com a mesma enzima para permitir posterior ligação ao inserto. Para as digestões foram feitas incubação por 2 horas a 37°C e, posteriormente, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna Ultrafree-DA (Millipore). A ligação do cDNA codificador da proteína SmRbx ao vetor pYEDP foi feita seguindo-se uma 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 MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilenoglicol 8000) (Invitrogen) em um volume final de 10 µL, a 22°C por 4 horas.

### **3.8.5- Transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ eletrocompetentes com o plasmídio pYEDP/ SmRbx, seleção, obtenção e sequenciamento dos plasmídios recombinantes**

O produto de ligação (3  $\mu$ L) foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). Para confirmar a presença do cDNA de interesse nos clones de bactérias obtidos foi feita uma PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos de SmRbx. As bactérias contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega). Como foi utilizada apenas uma enzima de restrição no processo de clonagem de SmRbx ao pYEDP, foi necessário confirmar o sentido da ligação do inserto ao vetor. Para isto, inicialmente foram utilizadas enzimas de restrição para análise do perfil de digestão. Foi feita uma primeira digestão com 3 $\mu$ g de DNA utilizando 10 unidades da enzima *Sma*I (Promega) em tampão J (10 mM Tris-HCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1mM DTT, pH 7,5) (Promega) em volume final de 20  $\mu$ L. Esta digestão foi feita a 25°C por 2 horas. Após este período, foram adicionadas 10 unidades da enzima *Xba*I (Stratagene) e tampão Buffer3 (500mM NaCl, 250 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM  $\beta$ -mercapetanol, 100  $\mu$ g/mL BSA, pH 7,7) (Stratagene), aumentando-se o volume para 40  $\mu$ L. Esta segunda digestão foi incubada a 37°C por 2 horas. O perfil de digestão foi observado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os clones contendo o inserto clonado na direção correta apresentavam um fragmento de 280 pb após digestão e estes foram seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### **3.9- Transformação de *S. cerevisiae* HRT1+/- com pYEDP/SmRbx (cepa DHY)**

Plasmídios recombinantes pYEDP contendo o cDNA de SmRbx foram utilizados na transformação de leveduras *S. cerevisiae* com um alelo de *HRT1* deletado. Nesta transformação, foram utilizados 2 µg de plasmídios, seguindo metodologia já descrita (seção 3.7.2). As leveduras transformadas foram crescidas em meio seletivo SD +Met +Trp +Gli por 5 dias a 30°C. A presença do cDNA codificador da proteína de *S. mansoni* foi confirmada por PCR de colônia de levedura, segundo procedimento já descrito (seção 3.7.2). A cepa obtida foi denominada DHY.

### **3.10- Crescimento de *S. cerevisiae* DHY em meio mínimo contendo galactose ou glicose**

As leveduras DHY foram transferidas para placas contendo meio SD +Met +Trp +Gal, pois a expressão de SmRbx é induzida por galactose, e incubadas a 30°C por 4 dias. Estas leveduras também foram transferidas para placas contendo meio SD +Met +Trp +Gli para comparação do crescimento nas duas condições.

### **3.11- Esporulação de *S. cerevisiae* DHY**

Para a obtenção de esporos, células DHY foram inoculadas em 3 mL de meio PE (extrato de levedura 0,8%, peptona 0,3%, glicose 10%, pH5,8) e

incubadas a 30°C sob agitação por 20 horas. Após incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm em centrífuga Eppendorf, lavadas em 3 mL de H<sub>2</sub>O, re-centrifugadas por 5 minutos e plaqueadas em meio KAc (extrato de levedura 0,5%, acetato de potássio 1%, dextrose 0,05% ágar 2%, pH 5,8). As células foram observadas ao microscópio após 4 dias para verificar a formação das tétrades.

### **3.12- Obtenção de leveduras haplóides $\Delta HRT1$ complementadas por SmRbx (cepa NHY)**

#### **3.12.1- Micromanipulação dos esporos**

Para a obtenção de leveduras haplóides, foi feita a dissecação das tétrades através de micromanipulação. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Genomas da UNIVAP, São José dos Campos, sob orientação do Professor Dr. Francisco Nóbrega e seu aluno de Doutorado José Humberto Machado Tambor. Para digestão dos ascos, leveduras crescidas em meio KAc foram inoculadas em 200  $\mu$ L de uma solução de  $\beta$ -glucuronidase, homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 20 minutos a 30°C. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de água deionizada para inativar a enzima e foi inoculado 20  $\mu$ L em uma placa com meio YPD contendo glicose e 20  $\mu$ L em uma placa com meio YPD contendo galactose para micromanipulação. Foram dissecadas 10 tétrades em cada placa através de um micromanipulador manual Singer MSM e estas foram incubadas a 30°C por 3 dias para crescimento das leveduras haplóides.

### **3.12.2- Genotipagem das leveduras haplóides por PCR**

A determinação de quais leveduras haplóides eram nocaute complementadas por SmRbx foi feita por PCR de colônia. Esta cepa foi denominada NHY. A presença de SmRbx foi confirmada utilizando os iniciadores RboxF e RboxR. A presença de *HIS3* ou *HRT1* foi verificada utilizando 2 pares de iniciadores: HRT1Fext/ HRT1Rext e HRT1Fext/ HIS311. Nessa reação foram utilizados 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria), em um volume final de 25  $\mu$ L. Nas reações de PCR utilizou-se programa descrito na seção 3.7.1. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### **3.13- Análise morfológica das leveduras complementadas**

Para observação de alterações morfológicas, leveduras NHY foram crescidas em meio YPD contendo galactose a 30°C por 16 horas. Após crescimento, as leveduras foram colocadas em lâminas de vidro e observadas em microscópio ótico Olympus CH20, em aumento de 100 vezes.

### **3.14- Sensibilidade às variações de temperatura das leveduras complementadas**

#### **3.14.1- Amplificação do DNA de HRT1**

O DNA do gene *HRT1* de leveduras foi amplificado por PCR de colônia a partir de DNA genômico de levedura utilizando os iniciadores HRT1F e HRT1R

(Tabela 1). Estes iniciadores contêm em suas extremidades 5' sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l, respectivamente, e amplificam toda a região codificadora do DNA.

Nessa reação foram utilizados 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria), em um volume final de 25 µL. Na reação de PCR foi utilizado o mesmo programa citado na seção 3.7.1. A amplificação de um produto de 369 pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto amplificado foi dosado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### **3.14.2- Construção e obtenção do plasmídeo recombinante yHRT1/pYTS**

O produto de amplificação de *HRT1*, utilizando os iniciadores HRT1F e HRT1R, foi ligado ao vetor PCR2.1-TOPO. A ligação foi feita com 2 µL do produto de PCR, utilizando o kit de clonagem TOPO TA Cloning (Invitrogen). O inserto correspondente a *HRT1* foi retirado do vetor pCR2.1-TOPO por digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l. Nesta reação, 3 µg de DNA plasmidial foram digeridos com 10 unidades da enzima *Bam*HI (Invitrogen) e 10 unidades da enzima *Kpn*l (Promega) em tampão React3 (Invitrogen). O vetor de clonagem pYTS foi digerido com as mesmas enzimas para permitir posterior ligação ao inserto. Foi feita incubação por 3 horas a 37°C e, posteriormente, a digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna

Ultrafree-DA (Millipore). A ligação do DNA codificador da proteína HRT1 ao vetor pYTS foi feita seguindo-se uma 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 MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilenoglicol 8000) (Invitrogen) em um volume final de 10 µL, a 22°C por 4 horas. O produto de ligação (3 µL) foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). Para confirmar a presença do cDNA de interesse nos clones de bactérias obtidos foi feita uma PCR de colônia utilizando os iniciadores HRT1F e HRT1R. As bactérias contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### **3.14.3- Transformação de *S. cerevisiae* NHY com HRT1/pYTS**

Plasmídios recombinantes pYTS contendo o DNA de *HRT1* foram utilizados na transformação de leveduras *S. cerevisiae* com *HRT1* deletado complementadas por SmRbx. Nesta transformação, foram utilizados 2 µg de plasmídios, seguindo metodologia já descrita (seção 3.7.2). As leveduras transformadas foram crescidas em meio seletivo SD +Met +Trp +Gli por 5 dias a 30°C. A presença do DNA codificador da proteína de *S. cerevisiae* foi confirmada por PCR de colônia de levedura, segundo procedimento já descrito (seção 3.7.2).

#### **3.14.4- Crescimento em meio YPD a 23°C, 30°C e 37°C**

Leveduras NHY foram crescidas em meio YPD contendo galactose a 30°C por 16 horas. Após crescimento, as leveduras foram contadas em câmara hematocitométrica em microscópio ótico e cerca de  $10^5$  células foram crescidas em placa contendo meio YPD/galactose por 3 dias em temperaturas de 23°C, 30°C e 37°C. Como controle foram utilizadas leveduras NHY + HRT1/pYTS crescidas em meio YPD contendo glicose. Nestas condições, SmRbx não é expresso e o crescimento das leveduras se deve à expressão de *HRT1*.

#### **3.15- Curva de crescimento de leveduras NHY**

Leveduras NHY e leveduras selvagens BY4736 (Brachmann et al, 1998) foram crescidas em meio YPD galactose por 16 horas a 30°C. Após crescimento, as leveduras foram contadas em câmara citométrica e diluídas a  $2,4 \times 10^6$  células/mL em YPD-galactose. As células foram incubadas a 30°C sob agitação e contadas a cada hora por 14 horas. Os dados obtidos foram utilizados na construção de um gráfico para comparação do crescimento das duas linhagens.

#### **3.16- Mapeamento das regiões essenciais para a função de SmRbx**

##### **3.16.1- Amplificação de porções do cDNA de SmRbx**

Os cDNAs de SmRbx contendo deleções foram obtidos a partir da amplificação do cDNA de SmRbx inteiro utilizando pares de iniciadores que deletavam nucleotídeos codificadores das regiões N-terminal ou C-terminal. Os iniciadores



diretos contêm em suas extremidades 5' sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e os iniciadores reversos contêm em suas extremidades 5' sítios para as enzimas de restrição *Kpn*I. Foram feitas amplificações utilizando as combinações de iniciadores: SmboxF1/SmboxR1, SmboxF2/SmboxR1, SmboxF3/SmboxR1, SmboxF4/SmboxR1, SmboxF5/SmboxR1, SmboxF1/SmboxR2 (Tabela 1).

Nas reações foram utilizados 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria), em um volume final de 25 µL e o mesmo programa citado na seção 3.7.1. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os produtos amplificados foram dosados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### **3.16.2- Construção dos plasmídios pYTS-SmRbx, pYTS-SmRbxΔ18N, pYTS-SmRbxΔ24N, pYTS-SmRbxΔ29N, pYTS-SmRbxΔ38N, pYTS-SmRbxΔ11C**

Os produtos de amplificação dos cDNAs de SmRbx truncados foram ligados ao vetor PCR2.1-TOPO (Invitrogen). A ligação foi feita com 2 µL do produto de PCR, utilizando o kit de clonagem TOPO TA Cloning (Invitrogen). Os insertos correspondentes aos cDNAs de SmRbx truncados foram retirados do vetor PCR2.1-TOPO por digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI (Invitrogen) e *Kpn*I (Promega), segundo protocolo descrito na seção 3.13.3. O vetor de clonagem pYTS foi digerido com as mesmas enzimas para permitir posterior ligação ao inserto. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna Ultrafree-DA

(Millipore). As ligações dos cDNAs codificadores das proteínas de SmRbx contendo regiões deletadas ao vetor pYTS foram feitas seguindo-se uma razão molar fragmento/vetor de 2:1 utilizando 6 unidades da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (Invitrogen) em um volume final de 10  $\mu$ L, a 22°C por 4 horas, obtendo-se as seguintes construções:

pYTS-SmRbx (contendo os nucleotídeos 1-324),

pYTS-SmRbx $\Delta$ 18N (contendo os nucleotídeos 46-324),

pYTS-SmRbx $\Delta$ 24N (contendo os nucleotídeos 72-324),

pYTS-SmRbx $\Delta$ 29N (contendo os nucleotídeos 81-324),

pYTS-SmRbx $\Delta$ 38N (contendo os nucleotídeos 114-324),

pYTS-SmRbx $\Delta$ 11C (contendo os nucleotídeos 1-291).

Os produtos de ligação (3  $\mu$ L) foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). Para confirmar a presença dos fragmentos de interesse nos clones de bactérias obtidos foram feitas PCR de colônia utilizando os mesmos iniciadores com que foram feitas as amplificações dos cDNAs. As bactérias contendo os plasmídios de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### **3.16.3- Transformação de *S. cerevisiae* NHY com SmRbxT/pYTS**

Plasmídios recombinantes pYTS contendo os cDNAs truncados de SmRbx foram utilizados na transformação de leveduras *S. cerevisiae* NHY. Nestas transformações, foram utilizados 2  $\mu$ g de plasmídios, seguindo

metodologia já descrita (seção 3.7.2). As leveduras transformadas foram crescidas em meio seletivo SD +Met +Trp +Gli a 30°C por 5 dias. A presença dos cDNAs de interesse foi confirmada por PCR de colônia de levedura, segundo procedimento já descrito (seção 3.7.2).

### **3.17- Interação *in vivo* entre SmRbx e yCul1 utilizando o sistema de duplo-híbrido em leveduras**

#### **3.17.1- Amplificação da região de ligação à Rbx1 do gene Cul1 de levedura**

A proteína Cul1 de levedura é formada por 815 aminoácidos, sendo que os 433 aminoácidos da região amino-terminal fazem parte do domínio de ligação à Skp1 e os 382 aminoácidos da região C-terminal fazem parte do domínio de ligação à Rbx1. O DNA do domínio de ligação à Rbx1 de Cul1 de leveduras foi amplificado a partir de uma PCR de colônia de leveduras utilizando os iniciadores Ycul1F e YculR (Tabela 1). Estes iniciadores contêm em suas extremidades 5' sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*.

Nessa reação foram utilizados 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), tampão de reação 1B (Phoneutria), em um volume final de 25 µL. Na reação de PCR foi utilizado o mesmo programa citado na seção 3.7.1. A amplificação de um produto de 1152 pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto amplificado foi dosado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### 3.17.2- Construção e obtenção do plasmídio recombinante yCul1/pGAD424

O produto de amplificação do DNA de yCul1 foi ligado ao vetor PCR2.1-TOPO. A ligação foi feita com 2  $\mu$ L do produto de PCR, utilizando o kit de clonagem TOPO TA Cloning (Invitrogen). O inserto correspondente ao DNA de yCul1 foi retirado do vetor PCR2.1-TOPO por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e *PstI* (Promega), utilizando tampão React3 (Invitrogen), segundo protocolo descrito na seção 3.14.3. O vetor de clonagem pGAD424 foi digerido com as mesmas enzimas para permitir posterior ligação ao inserto. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna Ultrafree-DA (Millipore). A ligação do DNA codificador da proteína yCul1 no vetor pGAD424 foi feita posterior à seqüência codificadora do domínio de ativação da transcrição da proteína GAL4. Esta ligação foi realizada com uma razão molar fragmento/vetor de 2:1 utilizando 6 unidades da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (Invitrogen) em um volume final de 10  $\mu$ L, a 22°C por 4 horas.

O produto de ligação (3  $\mu$ L) foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). Para confirmar a presença do cDNA de interesse nos clones de bactérias obtidos foi feita uma PCR de colônia utilizando os iniciadores Cul1F e Cul1R. As bactérias contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### 3.17.3- Construção e obtenção do plasmídio recombinante

#### SmRbx/pAS2.1

O inserto correspondente ao cDNA de SmRbx foi retirado do vetor pCR2.1-TOPO por digestão com as enzimas de restrição EcoRI (Invitrogen) e PstI (Promega), segundo protocolo descrito na seção 3.8.4. O vetor de clonagem pAS2.1 foi digerido com as mesmas enzimas para permitir posterior ligação ao inserto. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna Ultrafree-DA (Millipore). A ligação do cDNA codificador da proteína SmRbx no vetor pAS2.1 foi feita posterior à seqüência codificadora do domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4. Esta ligação foi realizada com uma razão molar fragmento/vetor de 2:1 utilizando 6 unidades da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (Invitrogen) em um volume final de 10  $\mu$ L, a 22°C por 4 horas.

O produto de ligação (3  $\mu$ L) foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). A presença do cDNA de SmRbx clonada no vetor pAS2.1 também foi confirmada por PCR de colônia utilizando os iniciadores RboxF e RboxR. As bactérias contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### 3.17.4- Co-transformação da levedura *S. cerevisiae* Y190

Leveduras *S. cerevisiae* haplóides Y190 (MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4 $\Delta$  gal80 $\Delta$  cyh<sup>r</sup>2 LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-

HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ) foram co-transformadas com 1 µg da construção SmRbx/pAS2.1 e 1 µg da construção yCul1/pGAD424, segundo protocolo descrito na seção 3.7.2. Como controle negativo, foi feita uma co-transformação com 1 µg de uma construção de SmRbx contendo uma deleção dos nucleotídeos correspondente aos 24 aminoácidos N-terminal (SmRbx $\Delta$ 24) clonado no vetor pAS2.1 e 1 µg da construção yCul1/pGAD424.

As leveduras transformadas foram plaqueadas em meio seletivo SD – Leu –Trp (YNB sem aminoácidos 0,17%, sulfato de amônio 0,5%, glicose 2%, solução de aminoácidos –Leu –Trp, pH 5,8) para confirmar a entrada dos dois plasmídios e em meio SD –Leu –Trp –His +25 mM de 3 aminotriazol (3AT) para verificar ativação do gene repórter *HIS3*.

#### **3.17.5- Ensaio da atividade da enzima $\beta$ -galactosidase**

Os clones obtidos no meio seletivo SD –Leu –Trp –His +25 mM de 3AT foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Para lisar as leveduras, essa membrana foi mergulhada por 1 minuto em nitrogênio líquido. Após a lise, a membrana foi colocada em uma placa de Petri sobre um papel de filtro contendo uma solução de 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-gal) 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol e Z buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,6%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,55%, KCl 0,075%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,025%, pH 7,0). Esta placa foi incubada em estufa a 30°C por, no máximo, 6 horas e então foi verificada a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase pela coloração azul dos clones.

### 3.18- Expressão e purificação da proteína SmRbx

#### 3.18.1- Construção e obtenção do plasmídio recombinante SmRbx/pMAL-c2G

O inserto correspondente ao cDNA de SmRbx foi retirado do vetor pCR2.1-TOPO por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e *PstI* (Promega), segundo protocolo descrito na seção 3.8.4. O vetor de clonagem pMAL-c2G foi digerido com as mesmas enzimas para permitir posterior ligação ao inserto. Os produtos digeridos foram extraídos do gel de agarose e purificados por centrifugação em uma coluna Ultrafree-DA (Millipore). A ligação do cDNA codificador da proteína SmRbx no vetor pMAL-c2G foi realizada com uma razão molar fragmento/vetor de 2:1 utilizando 6 unidades da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão de ligação (Invitrogen) em um volume final de 10  $\mu$ L, a 22°C por 4 horas. O produto de ligação (3  $\mu$ L) foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* BL21 (B F- *dcm ompT hsdS*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*) eletrocompetentes seguindo metodologia já descrita (seção 3.8.3). A presença do cDNA de SmRbx clonada no vetor pMAL-c2G foi confirmada por PCR de colônia utilizando os iniciadores RboxF e RboxR. As bactérias contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 3 mL de meio 2xYT suplementado com ampicilina. Os plasmídios recombinantes foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Mini prep (Promega) e seqüenciados no aparelho MegaBACE 1000 (GE HealthCare) (seção 3.8.3).

### 3.18.2- Expressão da proteína de fusão MBP-SmRbx em pequena escala

Um experimento piloto foi realizado para determinar se o plasmídeo construído anteriormente era capaz de expressar a proteína SmRbx. Assim, os clones identificados no item anterior foram inoculados em 3 mL de meio 2xYT acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 30°C sob agitação a 180 rpm por 16 horas. Dessas culturas, 300 µL foram inoculados em 15 mL de meio 2xYT acrescido com 100 µg/mL de ampicilina e incubados a 30°C sob agitação (180 rpm), com boa aeração para as células. No momento em que as culturas atingiram a  $DO_{600nm}$  de 0,5 ( $2 \times 10^8$  células/mL) foi retirada uma amostra de 1 mL de cada cultura para ser usada como controle (células não induzidas ou  $T_0$ ). No restante da cultura, a expressão protéica foi induzida adicionando-se IPTG (para uma concentração final de 0,6 mM) e incubou-se novamente as células. Após 3 horas da indução com IPTG retirou-se 1 mL de cada cultura (células induzidas ou  $T_3$ ). As amostras  $T_0$  e  $T_3$  de cada cultura foram centrifugadas a 14.000 rpm por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 25 µL de água deionizada e 25 µL tampão de amostra para gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 2X (100 mM Tris-HCl pH6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol).

As amostras foram fervidas por 5 minutos e em seguida submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10% (Acrilamida 10%, Tris HCl pH 8,8 0,25 M, SDS 0,1%) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%). A eletroforese foi realizada a 80 volts por 2 horas. O gel foi corado por incubação com coomassie blue (Coomassie blue R 250 0,25%, metanol 50%, ácido acético 10%) em temperatura ambiente e lavado várias vezes com



solução descorante (metanol 30%, ácido acético 10%) até atingir o contraste desejado. Uma vez confirmada a expressão da proteína MBP-SmRbx por comparação com padrão de peso molecular de proteína (GE Healthcare, Invitrogen e Sigma) procedeu-se para a expressão em larga escala.

### **3.18.3- Expressão da proteína de fusão MBP-SmRbx em larga escala**

Foi selecionado um clone recombinante, em que foi verificada a expressão da proteína de fusão no experimento piloto, e este foi inoculado em 10 mL de meio 2xYT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 30°C sob agitação por 16 horas. Essa cultura foi inoculada em 1 litro de meio 2xYT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubada 30°C sob agitação e com boa aeração. O crescimento das células foi controlado até atingir  $DO_{600nm}$  0,5 ( $2 \times 10^8$  células/mL). Neste momento, retirou-se 1 mL da cultura para ser utilizado como controle (células não induzidas). A expressão da proteína de fusão foi induzida após a adição de IPTG na concentração final de 0,6 mM. Após 3 horas de indução, coletou-se uma amostra de 1 mL da cultura (células induzidas) o restante das células foram coletadas por centrifugação a 9.000 rpm (centrífuga Himac CR 21-R14 A) por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 50 mL de tampão de coluna (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) e submetidas a 3 ciclos de congelamento em freezer a -80°C e descongelamento a 37°C. Em seguida, as células foram sonicadas com 5 pulsos de 15 segundos, potência de 30% em sonicador (Fisher Scientific) para liberação total das proteínas citoplasmáticas. Dessa suspensão, retirou-se uma amostra de 1 mL para submeter à eletroforese em SDS-PAGE.

As suspensões foram centrifugadas a 9.000 rpm (centrífuga Himac CR 21-R20 A2) por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante, contendo o extrato bruto foi diluído em 4 volumes de tampão de coluna. As amostras coletadas durante a expressão foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, ressuspendidas em tampão de amostra SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito anteriormente (seção 3.18.2), para confirmar a expressão da proteína de fusão.

#### **3.18.4- Purificação da proteína de fusão MBP-SmRbx**

O sobrenadante, contendo a proteína de fusão, foi aplicado em uma coluna contendo 2 mL de resina de amilose (New England Biolabs) num fluxo de 1 mL/min. O eluato, contendo as proteínas que não se ligaram na resina, foi coletado e mantido a -20°C. A resina foi lavada com 36 mL de tampão de coluna e este material também foi conservado a -20°C. As proteínas de fusão foram eluídas com aproximadamente 30 mL de tampão de eluição (tampão de coluna suplementado com 10 mM de maltose). Foram coletadas 10 alíquotas de 1 mL após a passagem de aproximadamente 3 mL de tampão de eluição. A purificação da proteína de fusão foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida, onde foram aplicadas amostras do eluato das proteínas que não se ligaram na resina, das proteínas que saíram da coluna durante a lavagem e as alíquotas coletadas durante a eluição. A preparação das amostras e a eletroforese foram realizadas segundo protocolo descrito na seção 3.18.2. A dosagem das alíquotas coletadas durante a purificação foi realizada segundo Bradford (1976).

### **3.19. Digestão da proteína de fusão MBP-SmRbx com enzima Genenase I**

Após a purificação da proteína em coluna de amilose, procedeu-se a digestão da mesma com a enzima Genenase I (New England Biolabs). Para isso, a enzima foi adicionada a uma proporção (p/p) de 1% da proteína. A reação foi realizada a 4°C por 12 horas. A digestão foi verificada por eletroforese em SDS-PAGE. Para confirmar qual das frações obtidas seria a proteína de interesse, uma amostra de proteína digerida foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE e transferida para membrana de PVDF e, em seguida, puncionou-se as frações a serem investigadas. Essas proteínas foram submetidas ao sequenciamento da região N-terminal por degradação de Edman (Hunkapiller *et al*, 1983) em seqüenciador SHIMADZU PPSQ-21A e as seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência de aminoácidos da proteína SmRbx.

### **3.20. Produção de anticorpos policlonais anti-SmRbx**

Para a produção de anticorpos anti-SmRbx, a proteína em questão foi puncionada do gel SDS-PAGE em que foi submetida após a digestão. Esse fragmento de gel obtido foi congelado com Nitrogênio líquido e macerado imediatamente. Em seguida, foi adicionado ao gel macerado volume igual de adjuvante completo de Freund (Invitrogen) e esta solução foi homogeneizada com seringa de vidro. Três camundongos BALB/c fêmeas com

aproximadamente 18 g a 22 g foram imunizadas via subcutânea. Após 10 dias, foi realizada a segunda imunização seguindo o mesmo protocolo, porém foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (Invitrogen). Repetiu-se a imunização mais duas vezes com intervalo de dez dias entre cada imunização. Na quinta semana, retirou-se pequena quantidade de sangue de cada camundongo e o soro foi separado para verificar a atividade dos anticorpos mediante ensaio de Western blot. Foi realizada ainda mais uma imunização e, dez dias depois, o soro dos camundongos foi testado novamente por western blot.

### **3.21. Western blot**

Amostras da proteína de fusão MBP-SmRbx purificada foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE seguindo mesmo protocolo descrito anteriormente (seção 3.18.2). Em seguida, a proteína foi transferida para membrana de Nitrocelulose a 300 mA durante 3 horas, utilizando-se tampão de transferência (Glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). A transferência foi confirmada pela coloração das proteínas na membrana com corante Ponceau. Após a transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (PBS, Tween 0,05%, leite desnatado 5%) por 2 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com o soro obtido no item anterior diluído 100 vezes em solução de bloqueio a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com solução PBS Tween, incubada por dez minutos com tampão AP (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) sob agitação, e incubada por uma hora à temperatura ambiente com imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo, conjugada à enzima

fosfatase alcalina, diluída em tampão AP. Finalmente, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos sob agitação e incubada com o substrato para a enzima fosfatase alcalina (NBT 66%, BCIP 33%) ao abrigo da luz. A reação foi paralisada ao atingir o contraste desejado lavando-se a membrana em água destilada.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Caracterização *in silico* do gene e da proteína SmRbx

O cDNA de SmRbx foi isolado através da triagem de uma biblioteca de cDNA de vermes adultos de *S. mansoni* com a proteína SMYB1 (Valadão *et al*, 2002) como isca, utilizando o sistema do duplo-híbrido de leveduras. O sequenciamento de ambas as fitas do cDNA resultou em uma seqüência de 436pb. Nesta seqüência foi identificada uma ORF de 327pb codificando uma proteína de 108 aminoácidos, que foi denominada SmRbx por apresentar similaridade com proteínas Rbx de outros organismos. Proteínas ortólogas a SmRbx são bastante conservadas em diversos organismos.

Na análise da estrutura primária da proteína SmRbx, se verificou que a proteína possui um peso molecular teórico de 12.570 daltons e um ponto isoelétrico teórico de 5,81, portanto, uma proteína ácida. A proteína possui 15 resíduos carregados negativamente (Asp e Glu) e 11 resíduos carregados positivamente (Arg e Lys).

A presença do domínio RING foi observada por pesquisas em três bancos de dados distintos para a análise de domínios protéicos e assinaturas em proteínas. O SMART (<http://www.smart.ebml-heidelberg.de>) reconhece o domínio formado pelos aminoácidos 42 ao 97. Pelo PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) e Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>), o domínio é formado pelos aminoácidos 53 ao 98. A pesquisa no PROSITE também localizou possíveis sítios de fosforilação na proteína: três sítios de fosforilação por caseína cinase II (aminoácidos 2 ao 5; 14 ao 17; 64 ao 67) e

um sítio de fosforilação por tirosina cinase (aminoácidos 99 ao 106) (Figura 7). A presença destes sítios sugere que a função da proteína possa ser modulada por fosforilações.

Através da análise de sinais na seqüência primária da proteína foi possível determinar sua provável localização celular. As porcentagens obtidas foram de 56,5% para localização citoplasmática, 17,4% para citoesqueleto, 17,4% para nuclear, 4,3% para mitocondrial e 4,3% para peroxissomo, indicando que SmRbx é possivelmente uma proteína residente no citoplasma. Não foram identificadas seqüências de peptídeo sinal no início da proteína que poderiam sugerir que esta seria exportada. Também não foram identificadas possíveis regiões transmembrana em SmRbx.

O BLASTN utilizando o cDNA de SmRbx e os *contigs* genômicos de *S. mansoni* do *Wellcome Trust Sanger Institute* retornou apenas um *contig* (*Supercontig* 0000644) correspondente à seqüência genômica de SmRbx, indicando que o gene é cópia única. As seqüências do cDNA e genômica foram alinhadas (Figura 7) e não foram observadas diferenças entre os exons da seqüência genômica e o cDNA seqüenciado. Pelo alinhamento, a estrutura genômica de exons e íntrons revelou três pequenos íntrons possuindo 40, 37 e 38 nucleotídeos, respectivamente. Os sítios doadores e aceptores de *splicing* são conservados em todas as junções exon-íntron.

Também foi realizado o BLASTN do cDNA de Skp1 de humanos (acesso NM\_170679) contra os *contigs* genômicos de *S. mansoni* do *Wellcome Trust Sanger Institute* que retornou apenas um *contig* (*Supercontig* 0000168) correspondente à uma única seqüência genômica de Skp1, indicando que o gene é cópia única no parasito. Já o BLASTN do cDNA de Cul1 de humanos

Genomic	GAAAGGTCTTCAGCGCGCGATGTCAGAAAATGGAAGTTGATGATACAGGGC	50
cDNA	GAAAGGTCTTCAGCGCGCGATGTCAGAAAATGGAAGTTGATGATACAGGGC	
Protein	M <u>S E M E</u> V D D T G P	11
Genomic	CAGTGGCATCCCTCAGTGAGAATAAGAAACGTTTCGAGATAAAAAAGTGG	100
cDNA	CAGTGGCATCCCTCAGTGAGAATAAGAAACGTTTCGAGATAAAAAAGTGG	
Protein	V A <u>S L S E</u> N K K R F E I K K W	27
Genomic	TATGCGGTTGCTTTATGGGCCTGGGATATCGTTGTTGATAAATTGTGCTAT	150
cDNA	TATGCGGTTGCTTTATGGGCCTGGGATATCGTTGTTGATAAATTGTGCTAT	
Protein	Y A V A L W A W D I V V D N C A I	44
Genomic	CTGCCGGAATCACATAATGGACTTATgtttgcttgggttattctctgctc	200
cDNA	CTGCCGGAATCACATAATGGACTTAT.....	
Protein	C R N H I M D L <u>C</u> .....	53
Genomic	atattatacataatagGTATTGAATGTCAAGCTAACCACGCCTCTGCTAC	250
cDNA	.....GTATTGAATGTCAAGCTAACCACGCCTCTGCTAC	
Protein	..... <u>I E C Q A N H A S A T</u>	64
Genomic	AAGTGAAGAGTGCACCTGTTGCTTGGGGTGTGGTAATgtgagttgaattt	300
cDNA	AAGTGAAGAGTGCACCTGTTGCTTGGGGTGTGGTAAT.....	
Protein	<u>S E E</u> C T V A W G V C N .....	76
Genomic	tgcagtatattaatcctccacaaagCATGCTTTTCATTTTCACTGTATATC	350
cDNA	.....CATGCTTTTCATTTTCACTGTATATC	
Protein	..... <u>H A F H F H C I S</u>	85
Genomic	CCGATGGTTGAAAACAAGACAGGTTTGCCCTCTAGACAACCGTGAATGGG	400
cDNA	CCGATGGTTGAAAACAAGACAGGTTTGCCCTCTAGACAACCGTGAATGGG	
Protein	<u>R W L K T R Q V C P L D N R E W E</u>	102
Genomic	AACTGCAAAAgtgaagtgatagcttcgtctgtactatgtttcatttttagAT	450
cDNA	AACTGCAAAA.....AT	
Protein	<u>L Q K</u> .....	106
Genomic	ATGGCCACTGAGTGGACCTGGTGATTATTTTTTACTTGTTCAGTTACGGT	500
cDNA	ATGGCCACTGAGTGGACCTGGTGATTATTTTTTACTTGTTCAGTTACGGT	
Protein	G H *	108
Genomic	TGTACCTGTT CAGATAATAA AATCATTAGA CAC	533
cDNA	TGTACCTGTT CAGATAATAA AATCATTAGA CAC	
Protein		

**Figura 7- Sequência nucleotídica do gene SmRbx com sua seqüência de aminoácidos deduzida.** Os quatro possíveis sítios de fosforilação estão destacados em caixas escuras e os aminoácidos que formam o domínio RING estão sublinhados na seqüência protéica. Os exons são representados pelos nucleotídeos em letras maiúsculas e os íntrons por nucleotídeos em letras minúsculas. As regiões 5'UTR e 3'UTR estão em itálico na seqüência do cDNA. A seqüência genômica (Supercontig\_0000644 - nt 231596 a nt 232124) foi obtida por BLASTN no banco de contigs genômicos de *S. mansoni* do *Wellcome Sanger Institute* utilizando o cDNA de SmRbx como seqüência pergunta.



(acesso NM\_003592) contra os *contigs* genômicos de *S. mansoni* do *Wellcome Trust Sanger Institute* retornou vários *contigs* (*Supercontig* 0000083, *Supercontig* 0015849, *Supercontig* 0000165, *Supercontig* 0000345, *Supercontig* 0001166, *Supercontig* 0000375, *Supercontig* 0000734, *Supercontig* 0000111) correspondente à seqüência genômica de *Cul1*, indicando que o gene é parte de uma família gênica no parasito.

Análise de expressão gênica por pesquisa de BLASTN nas ESTs de *S. mansoni* presentes no dbEST (um total de 158.841 seqüências deste organismo depositadas no banco de dados em 6 de outubro de 2006) utilizando *SmRbx* como seqüência pergunta resultou em seis *high score hits* com ESTs dos estágios adulto (gi|86552336), esquistossômulo (gi|34718028), miracídio (gi|34685179, gi|34695948 e gi|34695982) e ovo (gi|34669226), indicando que o transcrito está presente em estágios do ciclo de vida do parasito em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado.

A grande conservação na seqüência de aminoácidos desta proteína pode ser observada pelo alinhamento entre as proteínas de *S. mansoni*, *S. cerevisiae* (n° de acesso NP\_014508) e humanos (n° de acesso NP\_055063) (Figura 8). *SmRbx* apresenta 89% de similaridade com a proteína humana *Rbx1* e 75% de similaridade com a proteína de leveduras *HRT1*. Esta grande similaridade entre as proteínas de *S. mansoni*, humanos e leveduras pode sugerir um papel biológico relacionado para elas.

Com o objetivo de comparar a estrutura tridimensional de *SmRbx* com seu correspondente humano, foi feita uma modelagem computacional por homologia. Esta modelagem foi baseada na estrutura cristalizada de *Rbx1* humana (n° acesso no PDB: 1LDJ). Como pode ser observado na Figura 9, a

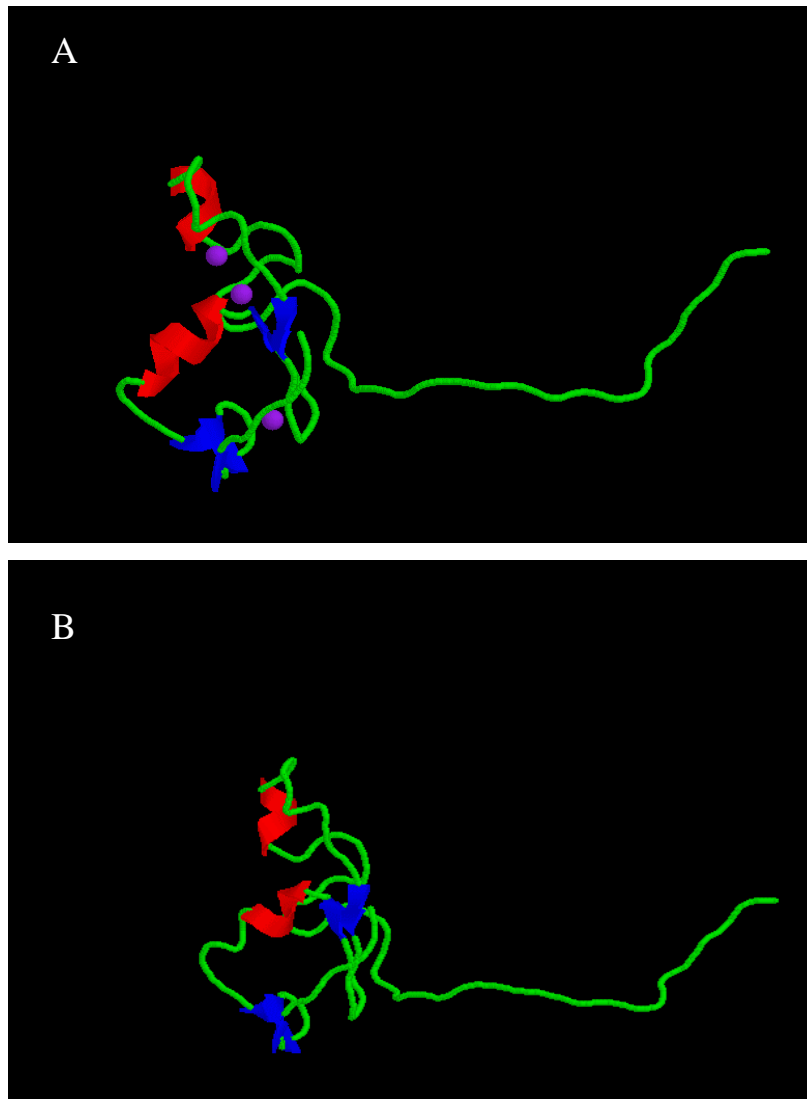
```

SmRbx  -----MSEMEVDDTGPVASLSENKKRFEIKKWYAVLWAWDIVVDNCAICRN
Rbx1    -----MAAAMDVDTPSGTNSGAGKKRFEVKKWNAVALWAWDIVVDNCAICRN
HRT1    MSNEVDRMDVDEDESQNI AQSSNQ SAPVETKKKRFEIKKWTAVAFWSWDIAVDNCAICRN
          :      .:      :      *****:*** ***:*:***.*****

SmRbx  HIMDLCIECQANHASATSEECTVAVGVCNHAFFHFCISRWLKTRQVCPLDNREWELQKYGH
Rbx1    HIMDLCIECQANQASATSEECTVAVGVCNHAFFHFCISRWLKTRQVCPLDNREWEFQKYGH
HRT1    HIMEPCIECQPKAMIDTDNECVAAWGVCNHAFFLHCINKWIKTRDACPLDNQPWQLARCGR
          ***: *****.: : *.:**..*****:***.:*:***.:*****: *.: : *.:

```

Figura 8: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas SmRbx, Rbx1 (n° de acesso NP\_055063) e HRT1 (n° de acesso NP\_014508) através do programa MultAlin.



**Figura 9: Modelo estrutural da proteína SmRbx. A-** Estrutura tridimensional da proteína Rbx1 humana cristalizada. **B-** Estrutura tridimensional da proteína SmRbx obtida por modelagem computacional por homologia baseada na estrutura de Rbx1 (n° de acesso PDB 1LDJ), utilizando o programa SwissModel.

semelhança entre as duas proteínas é muito grande. Ambas as proteínas apresentam 2 regiões de  $\alpha$ -hélice e 3 fitas- $\beta$  e uma longa cauda C-terminal sem estrutura 3D típica.

#### **4.2- Obtenção da cepa de *S. cerevisiae* HRT1+/- contendo o plasmídeo recombinante SmRbx/pYEDP (cepa DHY)**

*HRT1* foi primeiramente identificado como um gene cuja expressão em altos níveis reduzia a transposição pelo retrotransposon Ty3 (*Saccharomyces* Genome Database – <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). *HRT1*, assim como Rbx1 humana, faz parte do complexo SCF, envolvido no processo de ubiquitinação de proteínas (Seol *et al*, 1999; Skowyra *et al*, 1999). A deleção do gene codificador de *HRT1* em leveduras é letal (Lucau-Danila *et al*, 2000).

*HRT1* contém ortólogos em vários organismos. As proteínas *Rbx1* humana e *HRT1* de leveduras são 62,5% idênticas, possuindo 79% de similaridade. A proteína humana é capaz de complementar a falta de *HRT1* em leveduras. Então, sugere-se que *HRT1* humana e de levedura desempenham a mesma função bioquímica (Seol *et al*, 1999).

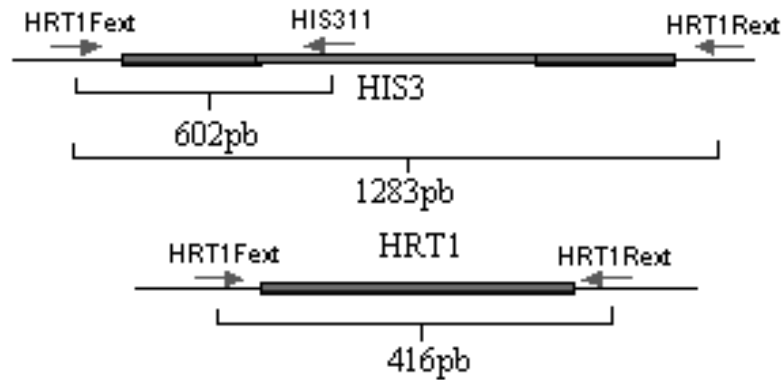
As proteínas *HRT1* e SmRbx possuem 64% de identidade. Para verificar se as duas proteínas estão envolvidas no mesmo processo biológico, possuindo a mesma função, sugerimos um estudo de complementação funcional heteróloga. Para isto, é necessário fazer a interrupção do gene *HRT1* de leveduras, transformar estas leveduras nocaute com o cDNA codificador da proteína de *S. mansoni* e, posteriormente verificar a complementação funcional.

Para a obtenção de uma linhagem de levedura nocaute para o gene codificador da proteína *HRT1*, leveduras *S. cerevisiae* diplóides foram utilizadas para a disrupção de um dos alelos do gene de interesse. A necessidade do uso de leveduras diplóides é devido ao fato do nocaute haplóide de *HRT1* ser letal. Para isso, leveduras *S. cerevisiae* diplóides foram transformadas com o produto da amplificação do gene de *HIS3* contendo em suas extremidades 40 nucleotídeos da seqüência de *HRT1* de levedura. As leveduras transformadas foram crescidas em meio SD +Met +Trp +Gli e foram obtidos 2 clones. Estes foram submetidos a duas amplificações por PCR para confirmar a inserção correta do gene *HIS3* no genoma da levedura. O desenho esquemático dos produtos esperados destas amplificações e o gel de agarose contendo os produtos das amplificações podem ser observados na Figura 10.

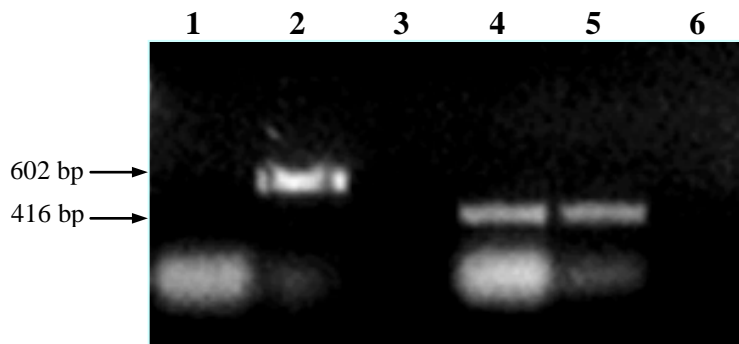
O fragmento de 1283pb, correspondendo à inserção do cassete de *HIS3*, inteiro não foi observado no gel de agarose. Somente os produtos de 602 pb e 416 pb foram observados. Isto pode ter acontecido devida à dificuldade de amplificar fragmentos tão grandes a partir de PCR de colônia de leveduras. Além disso, há uma competição pelos iniciadores nas amplificações de 416pb e 1283pb e provavelmente a amplificação do fragmento menor é favorecida.

Com estes resultados, podemos afirmar que o DNA codificador da enzima *HIS3* amplificado com iniciadores contendo em suas extremidades 40 nucleotídeos da seqüência de *HRT1* de *S. cerevisiae*, foi corretamente inserido no genoma da levedura gerando um clone, por recombinação sítio-específica, com a disrupção de um dos alelos *HRT1*.

A



B



**Figura 10: Estratégia para confirmação da deleção de um alelo de HRT1 de levedura pela inserção do cassete de *His3*.** **A-** Desenho esquemático da localização dos iniciadores em ambos os alelos de HRT1 após recombinação homóloga e tamanho esperado para os produtos de amplificação utilizando os iniciadores HRT1Fext e HRT1Rext, e HRT1Fext e HIS311. **B-** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando os produtos de amplificação de dois prováveis clones de levedura após a inserção do cassete de *His3*. Canaletas 1 e 2 contêm produtos de amplificação com os iniciadores HRT1Fext e HIS311; canaletas 4 e 5 contêm produtos de amplificação com os iniciadores HRT1Fext e HRT1Rext; canaletas 3 e 6 contêm os controles negativos das reações.

Para a obtenção da construção pYEDP/SmRbx, o cDNA de SmRbx foi primeiramente clonado no vetor TOPO, devido à ausência no vetor pYEDP 60-2 do sítio para a enzima de restrição *Pst*I, presente no iniciador RboxR. O cDNA codificador da proteína SmRbx clonado no vetor TOPO foi liberado deste utilizando a enzima de restrição *Eco*RI. Este produto foi ligado no vetor pYEDP 60-2 previamente digerido com a mesma enzima, obtendo, assim, 4 clones de interesse. A presença do cDNA nestes clones foi confirmada por PCR de colônia utilizando iniciadores para SmRbx. Os plasmídios recombinantes foram obtidos após extração de DNA de bactérias e, para verificar o sentido da ligação do inserto no vetor, foi feita uma digestão utilizando as enzimas de restrição *Sma*I e *Xba*I. A presença de uma banda de 280 pb indicou o sentido correto da ligação. Dos quatro clones analisados, três produziram o fragmento de 280 pb após digestão, confirmando a clonagem correta. Os três clones obtidos no sentido correto foram seqüenciados para confirmar a seqüência perfeita de SmRbx.

Um clone de SmRbx ligado no vetor pYEDP 60-2 foi utilizado na transformação de *S. cerevisiae* nocaute para um alelo de *HRT1*. A confirmação da transformação foi verificada pela PCR de colônia das leveduras utilizando iniciadores específicos de SmRbx. Desta forma obtivemos clones de leveduras nocaute para *HRT1*, contendo o cDNA codificador da proteína homóloga de *S. mansoni*, SmRbx. Esta cepa foi denominada DHY.

### **4.3- Superexpressão de SmRbx em leveduras DHY**

Para verificar se a superexpressão de SmRbx apresenta toxicidade para a levedura, foi feito um crescimento das leveduras nocaute contendo o cDNA de SmRbx em meio mínimo contendo galactose, pois o promotor Gal10/CYC1 presente no vetor pYEDP 60-2 é indutível por galactose. O crescimento em meio mínimo contendo glicose foi feito como controle. As leveduras cresceram igualmente, tanto em meio contendo glicose, quanto em meio contendo galactose (Figura 11). A superexpressão de SmRbx não é tóxica para leveduras, possibilitando, assim, os experimentos de complementação funcional.

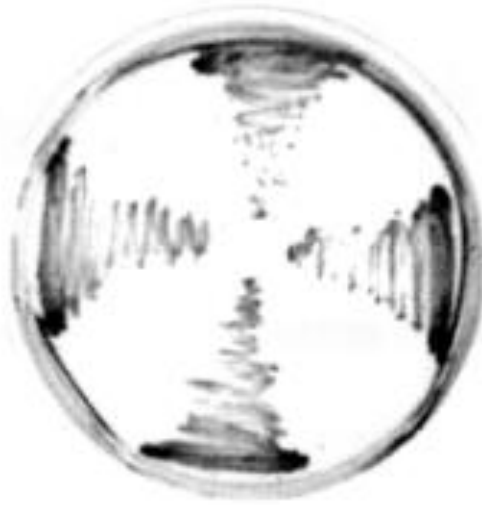
### **4.4- Obtenção de leveduras haplóides deletadas para HRT1 e complementadas por SmRbx (cepa NHY)**

Leveduras DHY foram crescidas em meio pobre (PE) para indução de esporulação. Para obtenção de leveduras haplóides, foi feita micromanipulação das tétrades produzidas, após esporulação, separando os quatro esporos e gerando leveduras haplóides.

Os esporos obtidos foram crescidos em meio contendo galactose, onde SmRbx é expresso e em meio contendo glicose, para controle da complementação. No meio contendo glicose, houve crescimento de apenas dois esporos de cada tétrade e em meio contendo galactose, na maioria dos casos, os quatro esporos cresceram. Das 10 tétrades dissecadas e crescidas em meio contendo galactose, três apresentaram crescimento de apenas dois



**A-**



**B-**

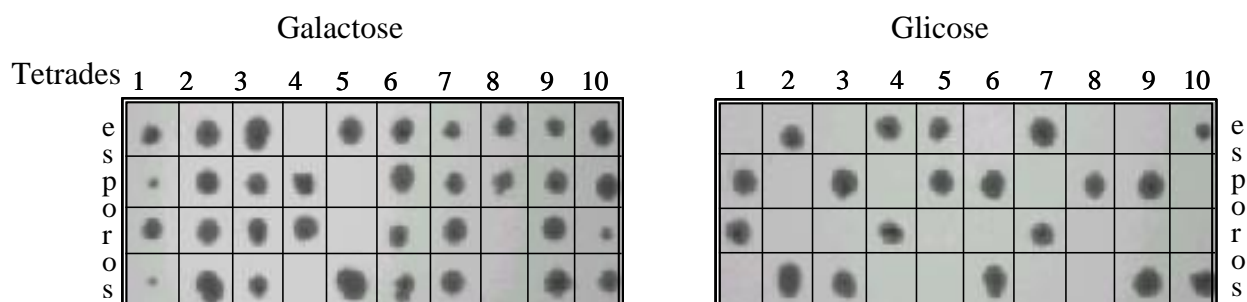


**Figura 11: Verificação da toxicidade de pYEDP/SmRbx para a levedura DHY.** Crescimento das leveduras nocaute para um alelo do gene *HRT1* contendo o cDNA de SmRbx em meio YPD contendo glicose (A) e galactose (B).

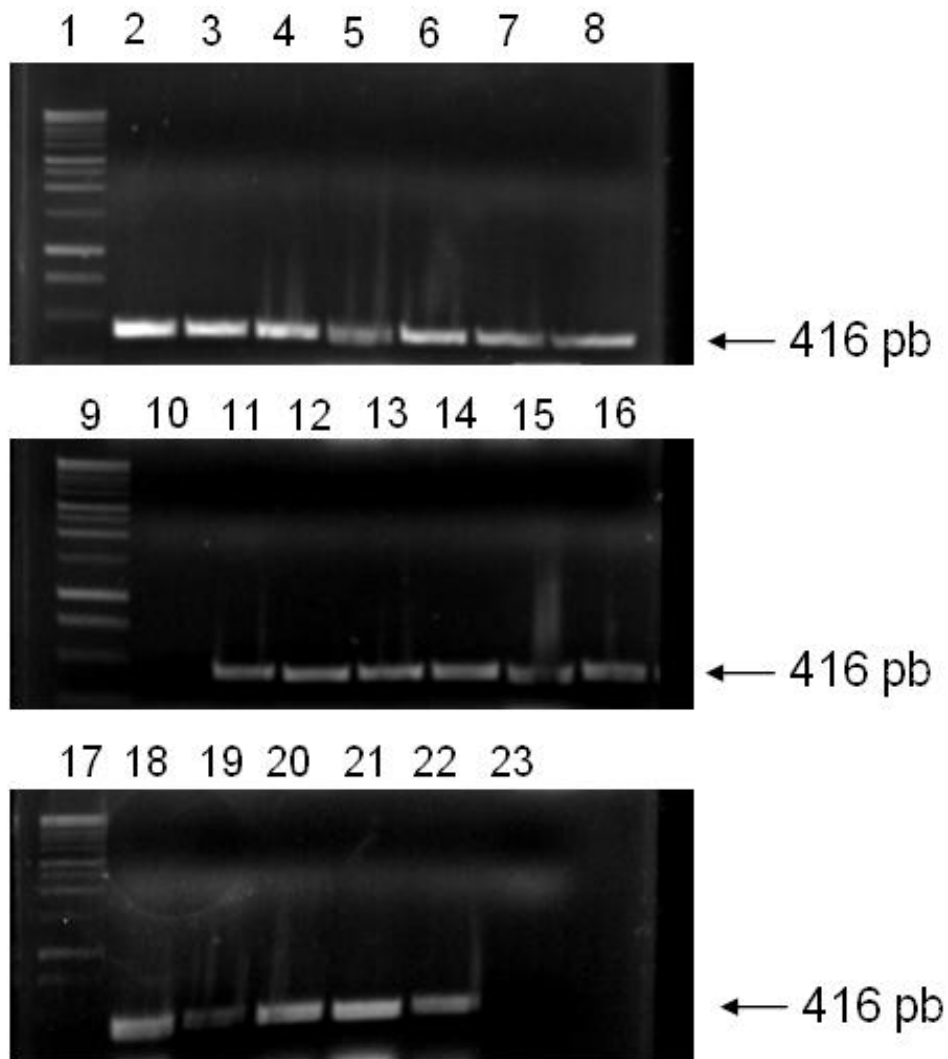
esporos, provavelmente por não possuírem o plasmídeo recombinante pYEDP/SmRbx (Figura 12). Cada levedura haplóide foi submetida à PCR para análise de seu genótipo. As leveduras crescidas em meio contendo glicose possuíam o gene selvagem *HRT1* (Figura 13). Em meio contendo galactose, das quatro leveduras haplóides produzidas por uma tétrade, duas apresentavam os genes *HRT1* selvagem (Figura 14) e *SmRbx* (Figura 16), e duas apresentavam os genes *HRT1* com inserção de *HIS3* (Figuras 14 e 15) e *SmRbx* (Figura 14). As 3 tétrades que apresentaram crescimento de apenas dois esporos produziram leveduras haplóides contendo o gene *HRT1* selvagem (Figura 14- canaletas 32 a 37). A restituição do crescimento de leveduras haplóides nocaute para *HRT1*, contendo o cDNA de SmRbx, confirmam a complementação funcional heteróloga.

#### **4.5- Caracterização da cepa NHY**

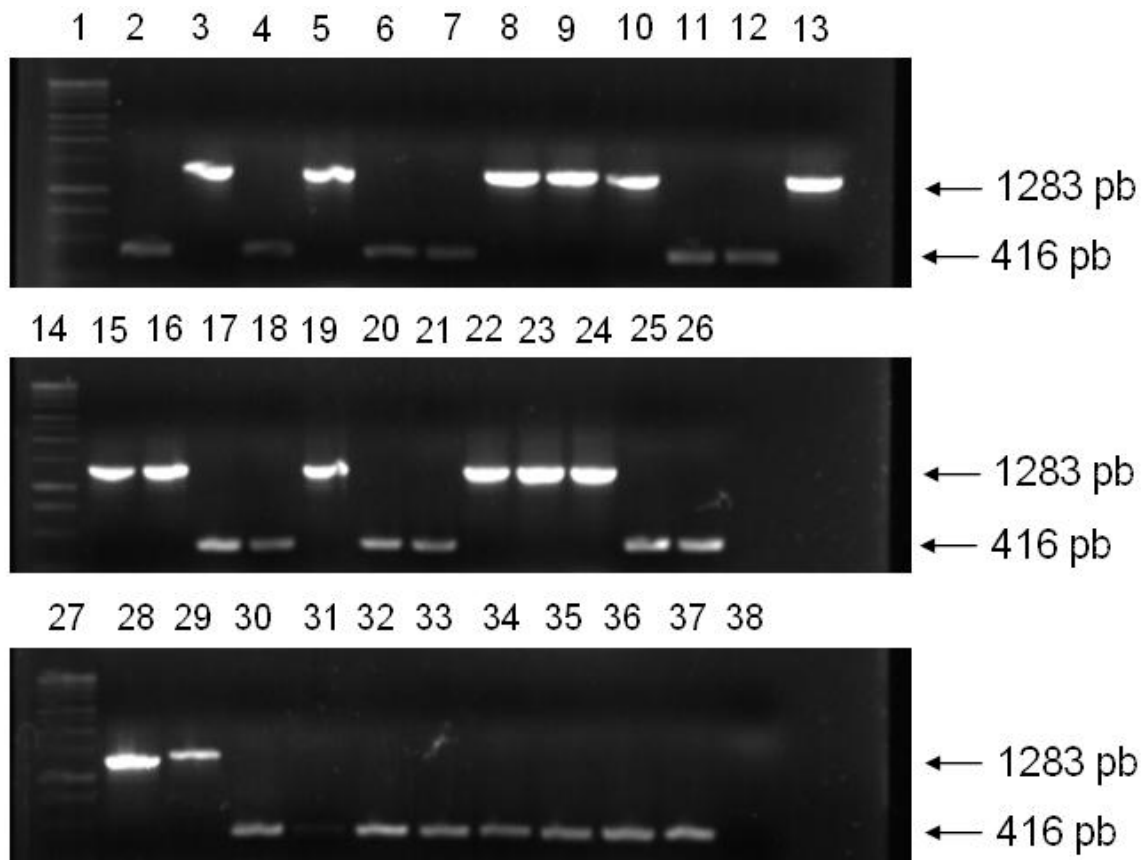
Após confirmação da complementação funcional, um clone de levedura haplóide nocaute para *HRT1* e complementada por SmRbx (cepa NHY) foi utilizada em alguns ensaios para sua caracterização. Primeiramente foram verificadas alterações morfológicas nas células complementadas quando comparadas com leveduras selvagens BY4727. Como pode ser observado na Figura 17, leveduras complementadas com o gene de *S. mansoni* apresentam uma morfologia alongada e a formação de brotos é atípica. Este tipo de morfologia é comum em leveduras nocaute para genes envolvidos na progressão do ciclo celular.



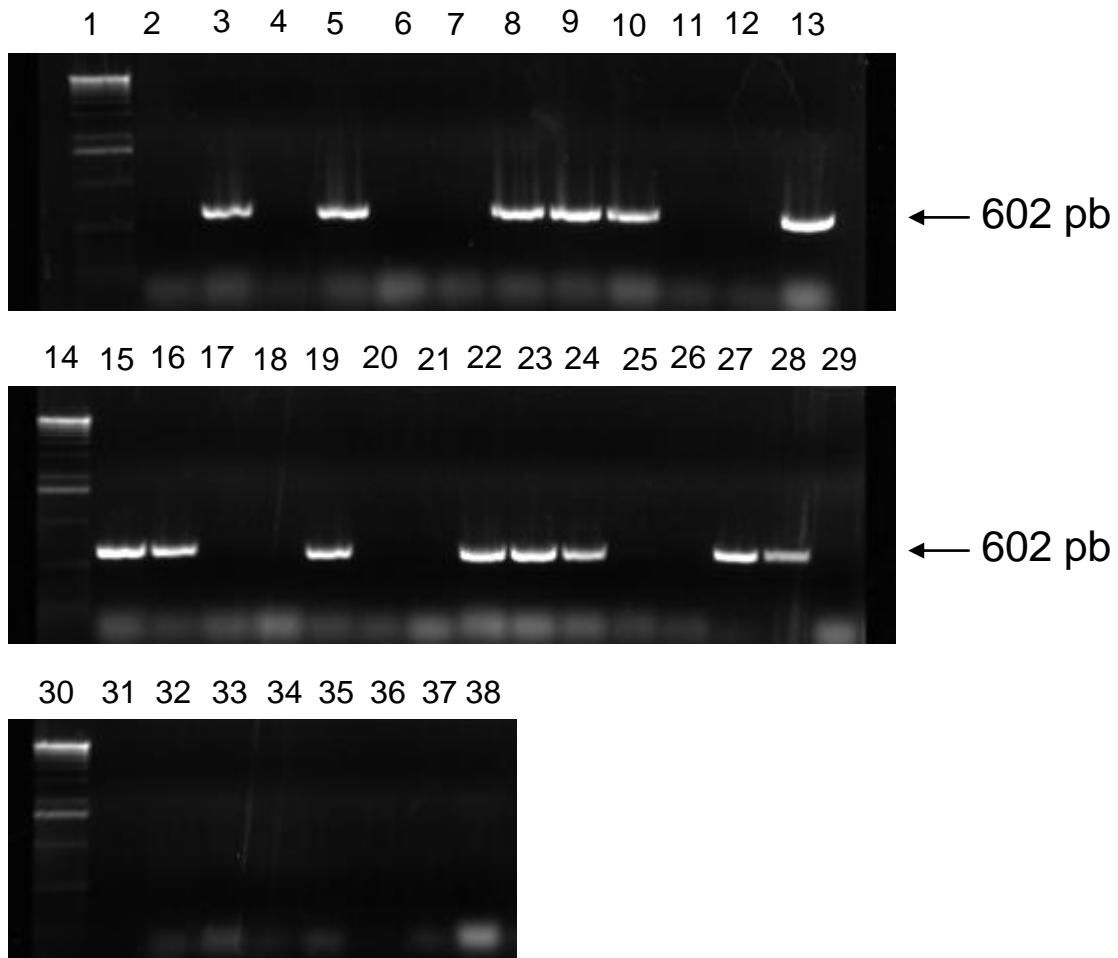
**Figura 12: Crescimento dos esporos após micromanipulação das tétrades obtidas por esporulação da cepa DHY: obtenção da cepa NHY.** A- Vinte tétrades de leveduras diplóides DHY foram isoladas, microdissecadas e dez delas foram crescidas em meio YPD-galactose (painel à esquerda) e dez foram crescidas em meio YPD-glicose (painel à direita).



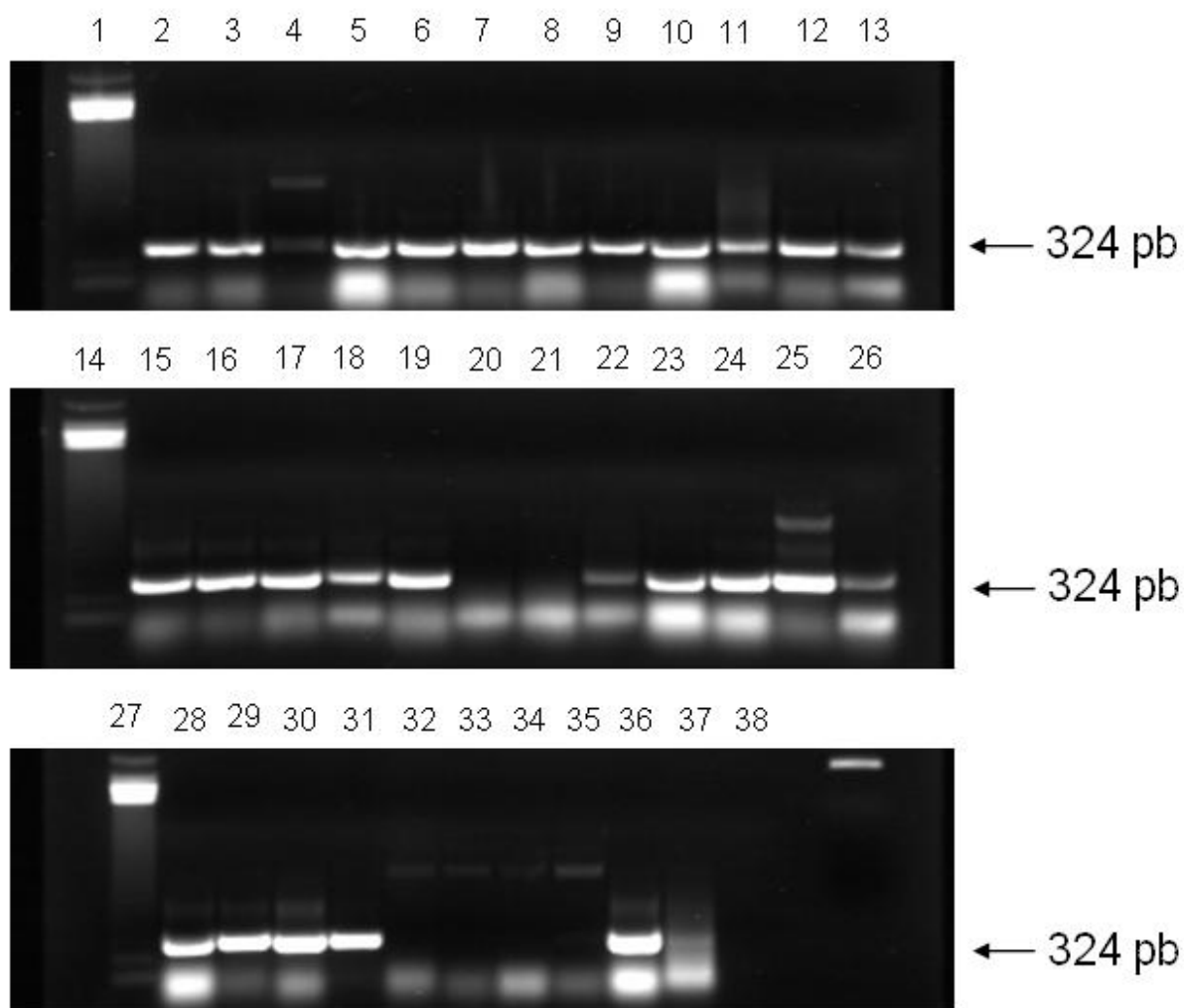
**Figura 13: PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo glicose, utilizando iniciadores para o gene *HRT1*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do produto da amplificação de colônias de leveduras utilizando iniciadores HRT1F e HRT1R. As canaletas 1,9 e 17 contém o padrão de tamanho 100 pb ladder (Invitrogen), a canaleta 23 contém o controle negativo da reação; as canaletas 2 a 8, 10 a 16 e 18 a 22 contém produto de amplificação de 416 pb de HRT1 a partir das 19 leveduras haplóides obtidas pelo crescimento dos esporos em meio contendo glicose (painel à direita da Figura 12).



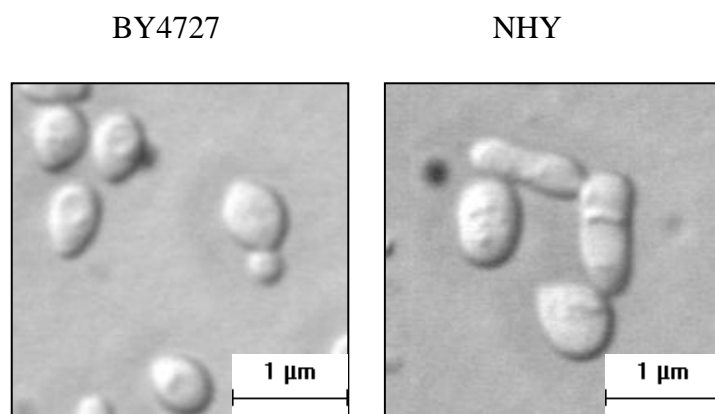
**Figura 14: PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene *HRT1*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do produto da amplificação de colônias de leveduras utilizando iniciadores *HRT1F* e *HRT1R*. As canaletas 1,14 e 27 contém o padrão de tamanho 100 pb ladder (Invitrogen), a canaleta 38 contém o controle negativo da reação; as canaletas 2 a 5, 6 a 9, 10 a 13, 15 a 18, 19 a 22, 23 a 26, 28 a 31, 32 e 33, 34 e 35, 36 e 37 contém o produto de amplificação do DNA de leveduras haplóides geradas a partir de uma tétrade (painel à esquerda da Figura 12). O produto de amplificação de 416 pb corresponde ao alelo *HRT1* e o produto de amplificação de 1283pb corresponde ao alelo *HRT1* com a inserção do cassette de *HIS3*.



**Figura 15: PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene HRT1 com a inserção do cassete de *HIS3*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do produto da amplificação de colônias de leveduras utilizando iniciadores HRT1F e HIS311. As canaletas 1,14 e 27 contém o padrão de tamanho 100 pb ladder (Invitrogen), a canaleta 38 contém o controle negativo da reação; as canaletas 2 a 5; 6 a 9; 10 a 13; 15 a 18; 19 a 22; 23 a 26; 27, 28, 29 e 31; 32 e 33, 34 e 35, 36 e 37 contém o produto de amplificação do DNA de leveduras haplóides geradas a partir de uma tétrade (painel à esquerda da Figura 12). O produto de amplificação de 602 pb corresponde à parte do gene HRT1 inserido com o cassete de *HIS3*.



**Figura 16: PCR de colônias de leveduras haplóides, obtidas após crescimento dos esporos em meio contendo galactose, utilizando iniciadores para o gene *SmRbx*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do produto da amplificação de colônias de leveduras utilizando iniciadores RboxF e RboxR. As canaletas 1,14 e 27 contém o padrão de tamanho 100 pb ladder (Invitrogen), a canaleta 38 contém o controle negativo da reação; as canaletas 2 a 5, 6 a 9, 10 a 13, 15 a 18, 19 a 22, 23 a 26, 28 a 31, 32 e 33, 34 e 35, 36 e 37 contém o produto da amplificação do DNA de leveduras haplóides geradas a partir de uma tétrade. O produto de amplificação de 324 pb corresponde ao cDNA de *SmRbx* presente no plasmídeo pYEDP60-2 usado na complementação da cepa.

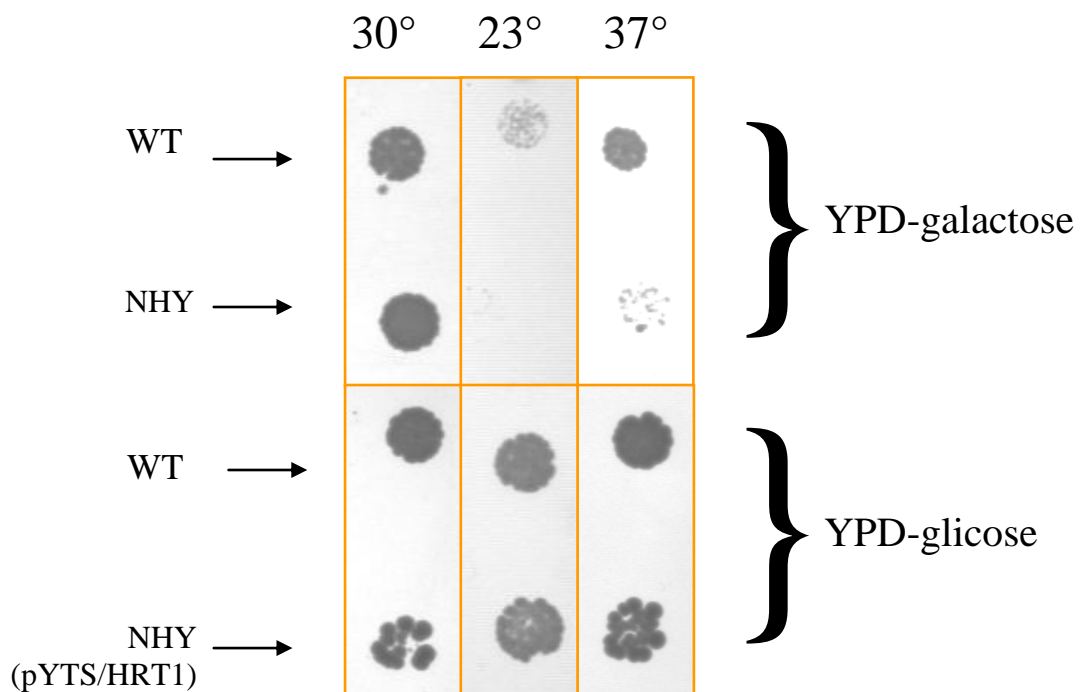


**Figura 17: Análise morfológica de leveduras NHY.** Leveduras haplóides selvagens BY4727 (painel à esquerda) e leveduras NHY (painel à direita).

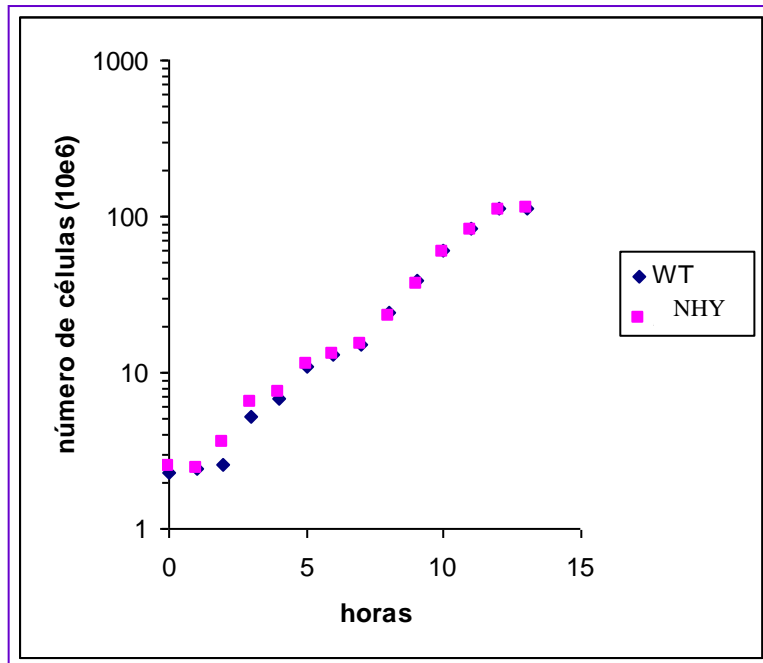


Foi demonstrado que células contendo proteínas *HRT1* em fusão com o epítipo myc são sensíveis a variações de temperaturas e falham para iniciar a replicação de DNA em temperaturas não permissivas (Seol *et al*, 1999). Para verificar se leveduras NHY também eram sensíveis a alguma variação de temperatura, estas foram crescidas a temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C em meio contendo galactose, onde SmRbx é expresso. Como controle foram utilizadas leveduras NHY transformadas com a construção pYTS/*HRT1*. Estas foram crescidas nas mesmas temperaturas, porém em meio contendo glicose. Nesta condição, SmRbx não é expresso e o crescimento ocorre devido à presença do gene *HRT1*, pois o vetor pYTS promove uma expressão constitutiva de *HRT1*. Leveduras utilizadas como controle cresceram nas três temperaturas, mas as leveduras complementadas por SmRbx não foram capazes de crescer em temperaturas inferiores (23°C) ou superiores (37°), mostrando uma sensibilidade a variações de temperatura (Figura 18).

Como foi observada uma morfologia alterada e um brotamento atípico em leveduras NHY, foi feita uma curva de crescimento a 30°C destas leveduras e de leveduras selvagens BY4727 para comparações. O gráfico da Figura 19 mostra que o crescimento das duas linhagens foi muito parecido, demonstrando que a formação de brotos atípica não interfere na multiplicação das leveduras nocaute para *HRT1* complementadas por SmRbx.



**Figura 18: Análise da sensibilidade da cepa NHY à variações de temperatura.** Leveduras NHY e leveduras selvagens BY4727 foram crescidas por 3 dias em meio YPD-galactose nas temperaturas de 30°C, 23°C e 37°C. Como controle, leveduras NHY + HRT1/pYTS foram crescidas em meio YPD-glicose nas temperaturas de 30°C, 23°C e 37°C.



**Figura 19: Curva de crescimento de leveduras NHY e leveduras selvagens.**

Leveduras NHY e leveduras selvagens BY4727 foram crescidas em meio YPD galactose por 16 horas a 30°C. Após crescimento, as leveduras foram contadas em câmara citométrica e diluídas a  $2,4 \times 10^6$  células/mL em YPD-galactose. As células foram incubadas a 30°C sob agitação e contadas a cada hora por 14 horas.

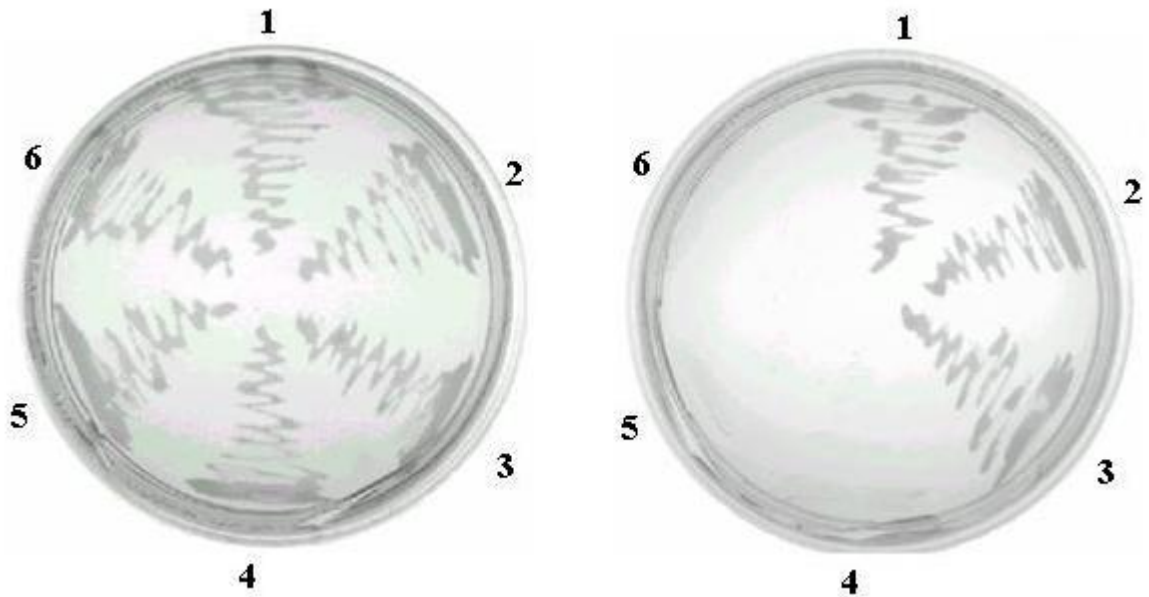
#### **4.6- Identificação de regiões essenciais para a função de SmRbx por complementação funcional da cepa NHY**

Para verificar quais regiões da proteína SmRbx seriam essenciais para sua função, foram construídos vários mutantes de SmRbx por deleções de nucleotídeos codificadores das regiões N-terminal e C-terminal da proteína. Sabe-se que a proteína homóloga de humanos, Rbx1, está envolvida na formação da ligase E3 do tipo SCF da via de ubiquitinação. Rbx1 é capaz de se ligar à proteína Cul1 através dos aminoácidos sublinhados na figura 20A. Os mutantes produzidos apresentavam deleções de regiões correspondentes aos sítios de ligação à Cul1. Os cDNAs correspondentes foram clonados no vetor pYTS e leveduras NHY foram transformadas com estas construções. O crescimento das leveduras transformadas foi feito em meio contendo glicose, não havendo, portanto, a expressão de SmRbx. Nestas condições, o crescimento das leveduras seria possível devido à presença dos mutantes. Como pode ser observado na figura 20B, leveduras transformadas com construções que perdiam uma região do possível sítio de ligação à Culina não apresentavam crescimento, demonstrando uma perda de função. Este resultado indica que SmRbx realmente se liga à Cul1 fazendo então parte do complexo SCF de ubiquitinação.

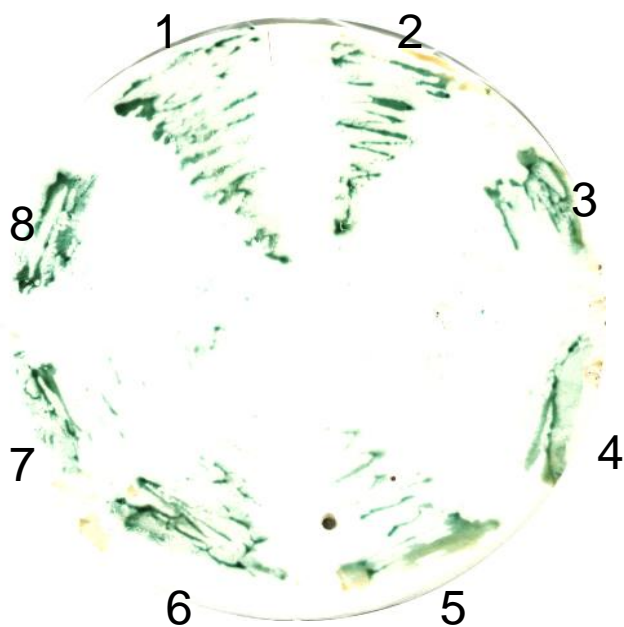


#### **4.7- Verificação da interação de SmRbx e Cul1 pelo sistema do duplo híbrido de leveduras**

Para verificar se a proteína SmRbx é capaz de interagir com a proteína Cul1 de leveduras (yCul1) foi utilizada a estratégia de duplo-híbrido em leveduras. Para isso, leveduras foram co-transformadas com as construções pAS2.1/SmRbx e pGAD424/yCUL1. Como controle negativo, foi feita uma co-transformação uma construção de SmRbx contendo uma deleção dos nucleotídeos correspondente aos 24 aminoácidos N-terminal, perdendo parte do sítio de ligação à Cul1 (SmRbx $\Delta$ 24) clonado no vetor pAS2.1 e da construção pGAD424/ yCul1. Leveduras co-transformadas foram crescidas em meio SD –Leu –Trp para confirmar a presença dos dois plasmídios e em meio SD –Leu –Trp –His +3AT 25mM para confirmar a ativação do gene repórter *His3* (Figura 21). Leveduras contendo a construção truncada de SmRbx que perde o sítio de ligação à culina não são capazes de crescer, mostrando que a interação entre SmRbx e Cul1 deve ocorrer nesta região. Para testar um segundo gene repórter, confirmando a interação, leveduras co-transformadas foram submetidas ao ensaio de  $\beta$ -galactosidase (Figura 22). A coloração azul das leveduras indica a ativação do gene repórter LacZ, demonstrando que SmRbx é realmente capaz de se ligar à Cul1 de leveduras, estando também envolvido na formação do complexo SCF de ubiquitinação.



**Figura 21: Interação de SmRbx com yCul1 pelo ensaio de duplo-híbrido. Esquerda-** Crescimento de clones de leveduras em meio YNB –Leu –Trp. **Direita-** Crescimento de clones de leveduras em meio YNB –Leu –Trp –His +25 mM 3AT. 1- controle positivo (plasmídios pAS2.1/p53 e pACT/SV40 T-antígeno); 2 e 3- transformantes contendo plasmídios pAS2.1/SmRbx e pGAD424/yCul1; 4 a 6- transformantes contendo plasmídios pAS2.1/SmRbx $\Delta$ 24 e pGAD424/yCul1.

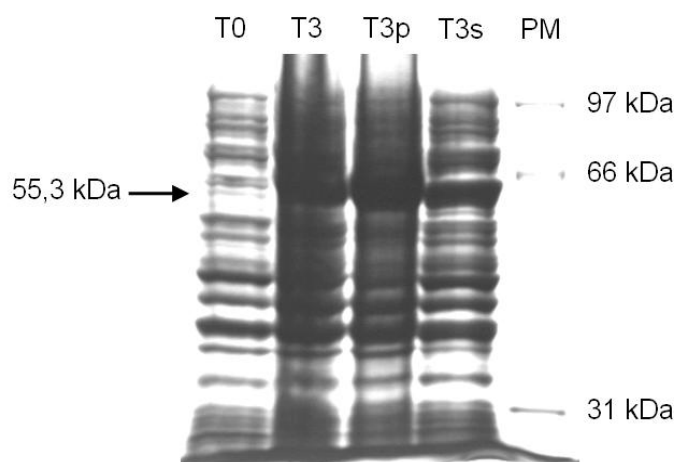


**Figura 22: Ensaio da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase.** Membrana de nitrocelulose utilizada no ensaio da atividade da enzima. 1- leveduras controle positivo transformadas com os plasmídios pAS2.1/p53 e pACT/SV40 T-antígeno; 2 a 8- clones de leveduras transformadas com os plasmídios pAS2.1/SmRbx e pGAD424/yCul1.

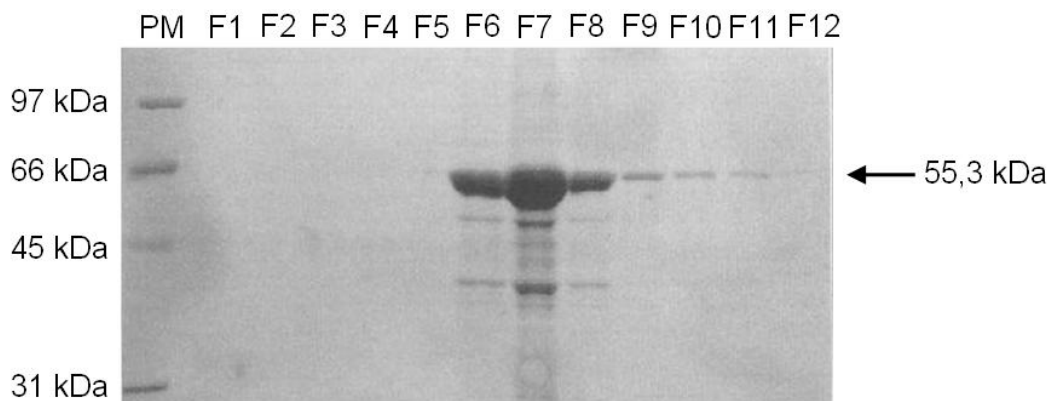


#### **4.8- Expressão, purificação e digestão da proteína de fusão MBP-SmRbx**

Após a confirmação da amplificação e clonagem bem sucedida de SmRbx no vetor para expressão pMAL-c2G, prosseguiu-se a expressão da proteína de interesse. Bactérias transformadas com a construção pMAL-c2G/SmRbx foram utilizadas para a expressão em pequena escala da proteína recombinante. A expressão da proteína de fusão MBP-SmRbx foi induzida por 3 horas com 0,6M de IPTG. Após a confirmação da expressão da proteína de fusão pelo sistema de expressão escolhido, partimos para a expressão em larga escala. Foi possível observar que a proteína de interesse (tamanho 55,3 KDa: 12,5 KDa de SmRbx + 42,8 KDa de MBP) foi expressa após 3 horas de indução com 0,6M de IPTG, e a mesma encontrava-se na forma solúvel, apesar de estar presente também na fração de proteínas insolúveis (Figura 23). Em seguida, o extrato bacteriano onde se encontrava a proteína de fusão na forma solúvel foi submetido ao processo de cromatografia de afinidade em resina de amilose (New England Biolabs) para purificação de MBP/SmRbx. O sistema de purificação escolhido baseia-se na importante propriedade da proteína MBP de se ligar a amilose (um polímero de glicose). Dessa forma, através de um único passo de cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna formada por resina de amilose, é possível purificar a proteína MBP e proteínas que tenham sido expressas como proteínas recombinantes em fusão com a MBP, através da utilização do vetor de expressão pMAL-c2G. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada e a proteína ligante foi eluída com tampão contendo 10 mM de maltose, que compete com a amilose pela ligação de MBP. O resultado da purificação pode ser observado na Figura 24, onde



**Figura 23: Expressão da proteína SmRbx em fusão com MBP (seta) em grande escala com o sistema de expressão pMAL-c2G.** SDS-PAGEs corado com coomassie blue onde estão representadas amostras de lisado de células não induzidas (T0), células com 3 horas de indução com IPTG (T3), pellet (T3p) e sobrenadante (T3s) das mesmas.



**Figura 24: Purificação da proteína MBP-SmRbx por comatografia de afinidade.** SDS-PAGE corado com *comasie blue* onde estão representadas as frações F1-12 obtidas após passagem do extrato protéico de bactérias em coluna de amilose e eluição da proteína MBP-SmRbx com maltose.

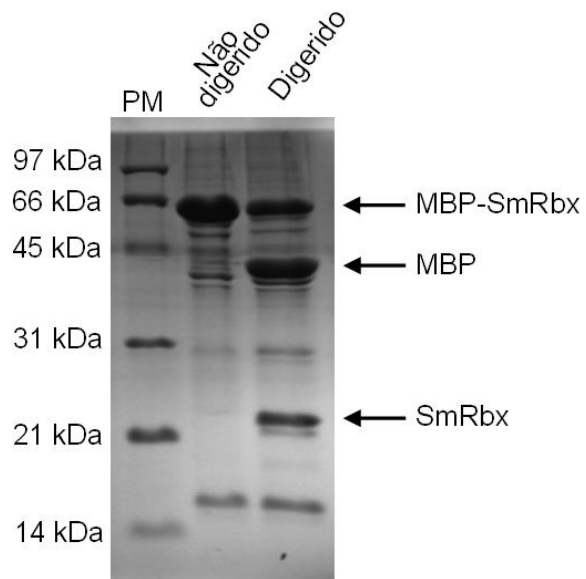
observamos a presença de MBP-SmRbx nas frações F6 a F11 coletadas após a eluição da proteína. Nota-se ainda a presença de proteínas contaminantes nas frações coletadas durante a eluição. Essas proteínas podem representar degradações sofridas pela proteína MBP-SmRbx, pois apresentam tamanho menor do que o esperado para a proteína em questão.

Com o intuito de separar a proteína SmRbx da MBP, amostras de proteínas purificadas foram submetidas à digestão com a enzima Genenase I que promove a clivagem proteolítica em um sítio específico (His-Tyr-Glu e His-Tyr-Asp) presente entre a MBP e a proteína de interesse. Sendo assim, após 12 horas de incubação a 4°C, a proteína de fusão foi digerida liberando os fragmentos de MBP e SmRbx como mostra a Figura 25. Podemos observar, no entanto, que a digestão não foi completa sendo que uma quantidade considerável de proteína de fusão não digerida está presente na amostra que foi submetida à digestão. Além disso, a proteína SmRbx liberada após a clivagem proteolítica apresentou peso molecular aparente maior do que o esperado de 12,5 kDa. Para confirmar que se tratava de SmRbx foi feito o sequenciamento da região N-terminal por degradação de Edman das bandas do gel com tamanho aparente de 15 KDa, 23 KDa e 30 KDa. Este sequenciamento foi feito pelo Prof. Marcelo Bemquerer do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do ICB/UFMG. O sequenciamento da banda de 23 KDa resultou na seguinte seqüência peptídica:

N- SEMEVXXXGP -C

Esta seqüência de aminoácidos é compatível com a seqüência da região N-terminal da proteína SmRbx:

N- SEMEVDDTGP -C



**Figura 25: Digestão da proteína MBP-SmRbx com enzima Genenase I.** SDS-PAGE corado com *comasie blue* onde estão representadas a proteína MBP-SmRbx antes e após digestão com Genenase I por 12 horas. As setas indicam a proteína MBP-SmRbx não digerida e as proteínas MBP e SmRbx após digestão.

#### **4.9- Produção de anticorpos policlonais anti-SmRbx**

Após a confirmação da obtenção da proteína SmRbx livre de fusão através de sequenciamento da região N-terminal, submetemos amostras de proteínas digeridas à eletroforese em SDS-PAGE e a proteína em questão foi puncionada do gel. O fragmento de gel foi macerado com o auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizado em volume igual de adjuvante de Freund. Esta solução foi utilizada para imunizar três camundongos BALB/c fêmeas. Após a quarta imunização, os soros dos camundongos foram utilizados em um ensaio de Western blot, porém não houve reação do soro com a proteína de fusão MBP-SmRbx imobilizada na membrana de nitrocelulose. Decidiu-se por repetir a imunização para tentar melhorar o título de anticorpos anti-SmRbx. Então, dez dias após a quinta imunização, realizou-se outro ensaio de Western blot com os soros dos camundongos e mais uma vez não foi observada nenhuma reação. A partir desse resultado, supôs-se que a alta similaridade entre a proteína SmRbx e a proteína Rbx1 de camundongos (89%) pode representar um fator limitante para a produção de anticorpos anti-SmRbx em camundongos.

## 5- Discussão

A análise da seqüência gênica de SmRbx nos *contigs* genômicos de *S. mansoni* indicou que o gene é cópia única, assim como seus ortólogos em humanos e leveduras. O transcrito do gene está presente em diversos estágios do ciclo de vida do parasito em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado, como demonstrado pela pesquisa de ESTs depositadas no dbEST. A mudança de fases durante o ciclo de vida do verme requer alterações morfológicas que provavelmente dependem de expressão protéica diferenciada. Como já descrito na literatura, a degradação de proteínas é importante para o sucesso na transformação de cercária em esquistossômulo em hospedeiros vertebrados (Guerra-Sa *et al*, 2005). Como também já exposto anteriormente, em células eucarióticas, o *turnover* de proteínas intracelular é mediado pelo sistema de ubiquitinação (Goldberg *et al*, 1997). Considerando a função da proteína na formação do complexo SCF de E3 ubiquitina ligase e sendo o gene SmRbx cópia única no genoma do parasito, parece mesmo ser fundamental que sua expressão ocorra nos diversos estágios do ciclo de vida deste organismo. De maneira semelhante, em *Drosophila melanogaster*, o gene ortólogo a Rbx1 também está presente como cópia única no genoma. Na *D. melanogaster*, ele é denominado *Roc1a* e está presente no cromossomo X ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.scgi?db=genomeprj&cnd=reprieve&opt=overview&list\\_uids=9554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.scgi?db=genomeprj&cnd=reprieve&opt=overview&list_uids=9554)).

A análise do cDNA de Skp1 nos *contigs* genômicos de *S. mansoni* também indicou que é cópia única, enquanto a análise da seqüência gênica de Cul1 no genoma do parasito mostrou que existem vários genes similares. Em

*D. melanogaster* o gene Skp1 também é cópia única no genoma. Com relação à culina, no genoma de *D. melanogaster* existe apenas uma cópia de Cul1, porém há uma cópia de outras proteínas culina. São elas Cul2, Cul3, Cul4, Cul5 e Cul6. Estes dados corroboram com o fato de Cul1 fazer parte de uma família gênica (Petroski & Deshaies, 2005).

O fato de SmRbx complementar o mutante de leveduras haplóide deletado para o gene *HRT1* indicou uma similaridade funcional entre a proteína de levedura e a do verme. No entanto, as leveduras complementadas pelo gene de *S. mansoni* mostraram uma morfologia alongada diferente da selvagem. Já foi visto que leveduras mutantes com SCF não funcional apresentam um formato alongado (Bai *et al*, 1996). Assim, nossos resultados indicam que ocorreu uma complementação parcial da função do gene *HRT1* pelo gene SmRbx.

Leveduras mutantes deletadas de genes envolvidos na regulação do ciclo celular também apresentam morfologia alongada, como observado em leveduras contendo mutações nos genes *Elm1* (Souid *et al*, 2006), *CLB 1, 3 e 4* (Hood-DeGrenier *et al*, 2007). Na coleção de mutantes *S. cerevisiae* com deleções gênicas, foi visto que o fenótipo para células alongadas estava relacionado com mutações em genes para o crescimento celular, divisão da célula e síntese de DNA (Giaever *et al*, 2002). Divisão celular é uma realização complexa e perigosa para a célula. Para manter a integridade genética e funcional, as células devem avançar unidirecionalmente através de uma seqüência de eventos definida e altamente regulada conhecida como ciclo celular. Os eventos do ciclo celular são organizados em fases: G1, S, G2 e M. A lista de proteínas reguladoras do ciclo celular que são alvo de degradação



por ubiquitinação é extensa. Esta inclui reguladores positivos como as ciclinas, mas também reguladores negativos e proteínas envolvidas em várias outras funções no ciclo celular (Reed, 2003). Complexos SCF são necessários para as transições G1/S e G2/M (Nambiar *et al*, 1998; Peters, 1998; Tyers & Jorgensen, 2000). Inibidores de ciclinas e CDK (cinases dependentes de ciclinas), que possuem um papel fundamental na regulação das transições do ciclo celular eucariótico, são também substratos para complexos SCF (Feldman *et al*, 1997; Kamura *et al*, 1999; Schwob *et al*, 1994; Skowyra *et al*, 1997; Skowyra *et al*, 1999). Formação de leveduras *S. cerevisiae* por brotamento envolve rearranjos de citoesqueleto durante o ciclo celular (Chant & Pringle, 1991). A replicação do DNA e montagem dos fusos na fase S, bem como o alongamento das fibras do fuso e separação dos cromossomos na mitose, requer ativação de Cdc28 por uma das quatro ciclinas do tipo B (Clb1, Clb2, Clb3 ou Clb4). A ativação de Cdc28 resulta na progressão de eventos no ciclo nuclear. Eventos morfogenéticos em *S. cerevisiae* são controlados pelos mesmos reguladores que agem no ciclo nuclear. Alterações na atividade de Cdc28 têm profundos efeitos na morfogênese durante o ciclo celular de leveduras gerando diversos rearranjos do citoesqueleto (Lew & Reed, 1993). Como a ativação de Cdc28 depende de ciclinas, é necessário que o sistema de ubiquitinação esteja ativo para degradar os inibidores de ciclinas que são substratos de complexos SCF. No caso da linhagem NHY, considerando a possibilidade de uma complementação parcial, existe a possibilidade de que os inibidores de ciclinas não estejam sendo degradados na proporção adequada, gerando, conseqüentemente, uma não ativação de Cdc28. Esta inativação pode estar sendo responsável por alterações de citoesqueleto que causam

defeitos na morfogênese, produzindo leveduras de forma alongada. Pelas razões assim expostas, nos parece claro que SmRbx esteja de fato agindo no processo de degradação protéica via ubiquitinação, mas sua similaridade parcial com *HRT1* a impediria de complementar integralmente as funções da proteína de levedura, o que levaria finalmente às alterações morfológicas observadas.

Outro fenótipo da levedura haplóide nocaute complementada com SmRbx, a linhagem NHY, foi sua sensibilidade a temperaturas restritivas. Mutantes sensíveis a temperaturas restritivas, apresentam morfologia alterada, normalmente alongada, as fibras do fuso não são completamente homogêneas, com uma mistura de fibras curtas e alongadas (Bai *et al*, 1996). Estes dados corroboram o fato de que a linhagem de leveduras deletadas para *HRT1* e complementadas por *SmRbx*, que se apresentou sensível a variações de temperatura, apresenta morfologia alongada por apresentar alteração na formação das fibras do fuso, como exposto acima. Células sensíveis à temperatura com mutações em componentes da via SCF/Cdc34 são sensíveis à super-expressão de substratos de SCF (Bai *et al*, 1996; Deshaies *et al*, 1995; Willems *et al*, 1996). Superprodução de Sic1 ou CLN2 impede o crescimento a 25°C de leveduras contendo mutação no gene *HRT1*, mas não em células selvagens (Seol *et al*, 1999), assim como ocorreu com leveduras NHY a 25°C. As leveduras mutantes sensíveis a temperaturas restritivas não conseguem entrar na fase S em temperaturas não permissivas porque não podem degradar o inibidor de CDK (Sic1) da fase S (Bai *et al*, 1996; Schwob *et al*, 1994). Sic1 é um potente inibidor de complexos ciclina do tipo B (CLB)-Cdk1 (Nugroho & Mendenhall, 1994). Sintetizada no final do ciclo celular, em cada ponto sua

atividade inibitória de Cdk1 potencia inicialmente a saída da mitose (Toyn *et al*, 1997). Aparentemente, a função primária de Sic1 é a inibição do complexo Clb5-Cdk1, que é responsável pela iniciação da replicação do DNA (Verma *et al*, 1997). Isso vem de encontro aos resultados que mostram que mutantes defectivos para a função de SCF não apresentam alteração no conteúdo do DNA comparado com as células selvagens (Blondel *et al*, 2000). A importância dessa regulação é ressaltada pela demonstração de que mutantes deletados para o gene *Sic1*, apesar da viabilidade, são propensos à instabilidade genômica (Lengronne & Schwob, 2002).

Apesar da morfologia alterada e da sensibilidade a variações de temperatura, a linhagem NHY não apresenta mudanças no crescimento quando comparada com as células do tipo selvagem haplóides. Para entendermos o que ocorre na linhagem NHY, seu conteúdo de DNA poderia ser determinado por citometria de fluxo, bem como a estabilidade de Sic1 por *immunoblotting* com anticorpos anti-Sic1, para verificarmos a progressão do ciclo celular nas leveduras nocaute para *HRT1* complementadas por *SmRbx*.

A estrutura da Rbx1 humana consiste de uma fita- $\beta$  de 16 resíduos (S1) que interage com a folha- $\beta$  do domínio C-terminal (CTD) de Cul1, seguida por um domínio dedo RING variante (Zheng *et al*, 2002). O domínio RING de 70 resíduos da Rbx1 adota a estrutura do motivo RING canônico estabilizado por dois íons zinco, mas ele também possui uma inserção de 20 resíduos. A inserção contém três ligantes de zinco adicionais (Cys 53, Cys 56 e Cys 68), que, juntamente com um quarto ligante de zinco do motivo RING (Cys 82), formam o terceiro sítio de ligação a zinco (Zheng *et al*, 2002). A estrutura de SmRbx é provavelmente bem similar à de Rbx1, pois SmRbx possui todos os

resíduos que formam o domínio RING e a inserção que forma o terceiro sítio de ligação a zinco.

Rbx1 de mamíferos interage diretamente com no mínimo cinco culinas, Cul1 a 5 (Ohta *et al*, 1999). A ligação Cul1-Rbx1 foi bem caracterizada e os resíduos envolvidos nessa ligação foram determinados (Zheng *et al*, 2002). Os resíduos Phe 22 e Trp 27 conservados possuem uma função central realizando múltiplos contatos de van der Waals às cadeias laterais de Cul1. Estes aminoácidos estão conservados na proteína de *S. mansoni*, bem como na proteína de leveduras. Linhagens de leveduras nocaute transformadas com diferentes cDNAs truncados de SmRbx que perderam aminoácidos dessa região são incapazes de crescer, indicando a importância desses resíduos para a função protéica. Os resíduos de Cul1 envolvidos nessas interações são altamente conservados em ortólogos e parálogos de Cul1, indicando que outras combinações de membros das famílias de Culina e Rbx formarão uma folha- $\beta$  intermolecular similar. Uma região de Rbx1 rica em triptofano (Trp33-Ala34-Trp35) também é importante para a ligação (Zheng *et al*, 2002). Estes aminoácidos estão conservados em SmRbx, mas não em HRT1. Na proteína de *S. cerevisiae* está presente a seqüência Trp33-Ser34-Trp35, ou seja, há uma troca de alanina por serina na posição 34 aumentando a possibilidade de formação de uma ligação de hidrogênio adicional na proteína da levedura. A presença da hidroxila da serina pode ser responsável por uma interação entre HRT1 e Cul1 de leveduras diferente do que ocorre entre Rbx1 e Cul1 ou entre SmRbx e Cul1. Sendo assim, a interação entre SmRbx e Cul1 de leveduras pode ser mais fraca, podendo ser responsável por uma complementação funcional parcial. No entanto, SmRbx foi capaz de interagir com a Cul1 de

leveduras por ensaio de duplo-híbrido. E as proteínas que perderam aminoácidos das regiões envolvidas na ligação a Cul1 (SmRbx $\Delta$ 24N, SmRbx $\Delta$ 29N, SmRbx $\Delta$ 38N e SmRbx $\Delta$ 11C) foram incapazes de se ligar, confirmando a importância desses aminoácidos para a interação.

Como SmRbx foi capaz de interagir com yCul1, pode ser que a complementação parcial de SmRbx em leveduras nocaute para *HRT1* seja devido a uma perda de interação do complexo SCF com enzimas E2. Os resíduos envolvidos na ligação de Rbx1 a E2 são Trp 87, Lys 89, Tre 90 e Arg 91 (Zheng *et al*, 2002). Todos estes aminoácidos estão conservados em SmRbx e HRT1. No entanto, aminoácidos vizinhos a estes são diferentes. Nas proteínas humana e de *S. mansoni* existe a seqüência Ser85-Arg86-Trp87-Leu88-Lys89-Tre90-Arg91, enquanto na proteína de *S. cerevisiae* está presente a seqüência Asn85-Lys86-Trp87-Ile88-Lys89-Tre90-Arg91. Esta diferença entre os aminoácidos vizinhos pode formar uma modificação conformacional na região de interação com E2, especialmente a troca Asn85 na levedura por Ser85 no parasito. Neste caso a proteína SmRbx não se ligaria perfeitamente com E2. Sendo assim, leveduras nocaute para *HRT1* complementadas por SmRbx poderiam não formar uma interação perfeita entre o complexo SCF e E2, gerando uma complementação parcial.

Os ensaios realizados para o estudo da função de SmRbx foram heterólogos e *in silico*. Para verificar a função de SmRbx no verme, foi proposto um ensaio de imunoprecipitação utilizando extratos protéicos do parasito para identificar proteínas capazes de interagir com a proteína de *S. mansoni*. Para isto foi necessária primeiramente a produção da proteína em sistema heterólogo. Esta produção foi feita em procarioto, utilizando um vetor que gera

a proteína em fusão com MBP. Para produzir a proteína livre da fusão com MBP é necessária uma digestão enzimática com Genenase I. No nosso caso, a digestão não foi completa, sendo que uma quantidade considerável de proteína de fusão não digerida estava presente na amostra após digestão. Além disso, a proteína SmRbx liberada após a clivagem proteolítica apresentou peso molecular aparente maior do que o esperado de 12,5 kDa. No entanto, o sequenciamento da região N-terminal desta proteína por degradação de Edman apresentou a seqüência esperada. Como a região C-terminal da proteína não foi seqüenciada, pode ter ocorrido alguma alteração nesta região que seria responsável pelo aumento do peso molecular da proteína. Uma análise da proteína por espectrometria de massa poderia confirmar a presença de alguma alteração na proteína ou confirmar o seu peso molecular absoluto. Outra possibilidade é um possível caso de migração anômala em gel SDS-PAGE, como já descrito (Manning & Colón, 2004).

Após a produção da proteína, é necessária a produção de anticorpos anti-SmRbx para os ensaios de imunoprecipitação. O soro obtido de camundongos imunizados com a proteína não apresentou anticorpos anti-SmRbx. A partir desse resultado, supôs-se que a alta similaridade entre a proteína SmRbx e a proteína Rbx1 de camundongos (89%) pode representar um fator limitante para a produção de anticorpos anti-SmRbx em camundongos. No entanto, já existem anticorpos anti-Rbx1 comerciais que podem ser utilizados nestes experimentos. Apesar de serem anticorpos para a proteína humana, acredita-se que sejam capazes de reconhecer a proteína de *S. mansoni* devido à alta similaridade entre ambas as proteínas. Estes seriam experimentos a serem posteriormente realizados.

Em suma, nossos resultados sugerem que a recém caracterizada proteína SmRbx de *S. mansoni* é um componente da maquinaria de ubiquitinação, possuindo uma função na formação do complexo SCF, assim como seus homólogos de humanos e de leveduras. A busca por proteínas capazes de interagir com a proteína de *S. mansoni* vai trazer melhor entendimento sobre este processo biológico importante. Como foi sugerido anteriormente, o sistema ubiquitina-proteassomo tem um papel crucial na biologia de *S. mansoni*. Inibidores de proteassomo são capazes de reduzir o número de esquistossômulo de fase pulmonar, a carga de vermes e consequentemente diminuir a produção de ovos em camundongos infectados (Guerra-Sa *et al*, 2005). Estudos sobre genes que codificam para o complexo SCF e proteassomo vão certamente emitir uma luz no mecanismo molecular envolvendo o desenvolvimento de *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado.

## 6- Conclusão

- O cDNA de SmRbx codifica uma proteína de 108 aminoácidos, com um peso molecular teórico de 12.570 daltons e um ponto isoelétrico teórico de 5,81, sendo, portanto, uma proteína ácida.
- O gene SmRbx é cópia única no genoma de *S. mansoni* e possui três íntrons.
- Skp1 é cópia única no genoma de *S. mansoni*, enquanto Cul1 faz parte de uma família gênica no parasito.
- O transcrito de SmRbx está presente em estágios do ciclo de vida do parasito em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado.
- A proteína SmRbx possui um único domínio RING e 3 supostos sítios de fosforilação por caseína cinase II e 1 possível sítio de fosforilação por tirosina cinase, sugerindo que esta possa ser regulada por fosforilação. A predição de localização celular indicou que SmRbx é possivelmente uma proteína citoplasmática.
- A proteína SmRbx possui 89% de similaridade com a proteína humana Rbx1, o que possibilitou a produção de um modelo estrutural da proteína do verme baseado na sua ortóloga humana, e 75% de similaridade com a proteína de levedura HRT1.
- SmRbx é capaz de complementar leveduras nocaute para o gene HRT1. Os primeiros 24 aminoácidos N-terminais e os últimos 10 resíduos C-terminais mostraram ser essenciais para a função da proteína. Interessantemente, algumas dessas regiões estão envolvidas na ligação à culina.



- Leveduras nocaute para HRT1 complementadas com o gene SmRbx de *S. mansoni* apresentam uma morfologia alongada e são sensíveis às variações de temperatura. Estes resultados indicam que a complementação com o gene do parasito não é perfeita.
- A superexpressão do gene SmRbx em leveduras nocaute não produziu alterações significantes em seu crescimento quando comparada a leveduras selvagens.
- A proteína SmRbx e Cul1 de leveduras são capazes de interagir, formando um heterodímero, demonstrado pelo ensaio de duplo-híbrido em leveduras.
- Estes resultados sugerem que a proteína SmRbx provavelmente está envolvida no processo de ubiquitinação, assim como suas ortólogas de humanos e leveduras.
- A proteína SmRbx pôde ser eficientemente produzida em sistema de expressão em procariotos, purificada e separada da fusão por clivagem proteolítica.
- Não foi possível produzir anticorpos policlonais anti-SmRbx em camundongos, provavelmente devido ao fato da proteína SmRbx ser bastante conservada, apresentando 89% de similaridade com sua ortóloga murina.

## 7- Perspectivas

- Avaliar os níveis de expressão de SmRbx nas várias fases do ciclo de vida do parasito através de um PCR em Tempo Real.
- Confirmar as interações entre SmRbx e proteínas do complexo SCF, assim como com enzimas E2, por co-imunoprecipitação com anticorpo anti-Rbx comercial e posterior eletroforese em gel bi-dimensional e espectrometria de massa.
- Imunolocalizar SmRbx nos vermes adultos por imunohistoquímica utilizando o anticorpo comercial.

## 8- Referências Bibliográficas

- ADAMS, M.D. *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science** 1991, 252: 1651-1656.
- AGUILAR, R.C., WENDLAND, B. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. **Curr Opin Cell Biol.** 2003, 15: 184–190.
- ALI, P.O. *et al.* Sequence of a small subunit rRNA gene of *Schistosoma mansoni* and its use in phylogenetic analysis. **Mol Biochem Parasitol** 1991, 46: 201-208.
- ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 1990, 215:403-10.
- AMERIK, A.Y., HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochim Biophys Acta** 2004, 1695: 189–207.
- ASHER, G., SHAUL, Y. Ubiquitin-independent degradation: lessons from the p53 model. **Isr Med Assoc J.** 2006, 8: 229-232.
- AUERBACH, D. *et al.* The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. **Proteomics** 2002, 2: 611-623.
- BAI, C. *et al.* SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. **Cell** 1996, 86: 263-74.
- BLONDEL, M., GALAN, J.M., PETER, M. Isolation and characterization of HRT1 using a genetic screen for mutants unable to degrade Gic2p in *saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 2000, 155:1033-44
- BORDEN, K.L.B. RING domains: master builders of molecular scaffolds? **J Mol Biol** 2000, 295: 1103-1112.

- BORDEN, K.L.B. RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. **Biochem Cell Biol** 1998, 76: 351-358.
- BOYLE, J.P. *et al.* Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol Biochem Parasitol** 2003, 128: 205-215.
- BRACHMANN, C.B. *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast** 1998, 14: 115-132.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry** 1976, 72: 248-254.
- BROWN, T.A. **Genomes**. USA. BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999.
- CHANT, J., PRINGLE, J. R. Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Opin Genet Dev** 1991, 1:342-350.
- CIECHANOVER, A., BEN-SAADON, R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. **Trends Cell Biol** 2004, 14: 103–106.
- CIECHANOVER, A., IWAI, K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. **IUBMB Life** 2004, 56: 193–201
- COPE, G. A., DESHAIES, R. J. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. **Cell** 2003, 114: 663–671.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research** 1988, 16:10881-90.

- CORRENTI, J.M., BRINDLEY, P.J., PEARCE, E.J. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. **Mol Biochem Parasitol** 2005, 143: 209-215.
- CURWEN, R.S. *et al.* The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Mol Biochem Parasitol** 2004, 138: 57-66.
- DENG, L. *et al.* Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell** 2000, 103: 351-361.
- DESHAIES, R.J., CHAU, V., KIRSCHNER, M. Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. **Embo J** 1995, 14:303-12.
- DILLON, G.P. *et al.* Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol** 2006, 36: 1-8.
- DINGUIRARD, N., YOSHINO, T.P. Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Mol Biochem Parasitol** 2006, 146: 219-230.
- DIPANKAR 2006
- ENGELS, D. *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop** 2002, 82: 139-146.
- FANTAPPIE, M.R. *et al.* Cloning of *Schistosoma mansoni* Seven in Absentia (SmSINA)(+) homologue cDNA, a gene involved in ubiquitination of SmRXR1 and SmRXR2. **Mol Biochem Parasitol** 2003, 131: 45-54.

FELDMAN, RM, *et al.* A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. **Cell** 1997, 91: 221-230.

FIELDS, S., SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature** 1989, 340: 245-246.

FITZPATRICK, J.M. *et al.* An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. **Mol Biochem Parasitol.** 2005, 141: 1-13.

FITZPATRICK, J.M., HOFFMANN, K.F. Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. **Int J Parasitol** 2006, 36: 1081-1089.

FRANCO, G.R. *et al.* Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene** 1995, 152: 141-147.

FRANCO, G.R. *et al.* The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art. **Int J Parasitol** 2000, 30: 453-463.

FREEMONT, P.S. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. **Ann N.Y. Acad Sci** 1993, 684: 174-192.

GIAEVER, G. *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nature** 2002, 418:387-391.

GILL, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? **Genes Dev** 2004, 18: 2046–2059.

GOLDBERG, A.L. *et al.* New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. **Biol Chem** 1997, 378: 131–140.

- GRILLARI, J., KATINGER, H., VOGLAUER, R. Aging and the ubiquitinome: Traditional and non-traditional functions of ubiquitin in aging cells and tissues. **Exp Gerontol** 2006, 41: 1067-1079.
- GUERRA-SA, R. *et al.* *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. **Exp Parasitol** 2005, 109: 228-36.
- HAAS, W. *et al.* Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercária: the key-role of L-arginine. **Parasitol** 2002, 124: 153-167.
- HAGLUND, K., DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO J** 2005, 24: 3353–3359.
- HARROP, R., COULSON, P.S., WILSON, R.A. Characterization, cloning and immunogenicity of antigens released by lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology** 1999, 118: 583-94.
- HERSHKO, A. *et al.* Components of ubiquitina-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J Biol Chem** 1983, 258: 8206-8214.
- HERSHKO, A. *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1980, 77: 1783–1786.
- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A., ROSE, I. A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. **Proc Natl Acad Sci USA** 1979, 76: 3107–3110.
- HICKE L, SCHUBERT HL, HILL CP. Ubiquitin-binding domains. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005, 6: 610–621.

- HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001, 2: 195-201.
- HILLYER, G.V. Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA. **J Parasitol** 1974, 60: 725-727.
- HIRAI, H., LOVERDE, P.T. FISH techniques for constructing physical maps on schistosome chromosomes. **Parasitol Today** 1995, 11: 310-314.
- HO, M.S., TSAI, P.I., CHIEN, C.T. F-box proteins: the key to protein degradation. **J Biomed Sci** 2006, 13: 181–191.
- HOOD-DEGRENIER, J.K., BOULTON, C.N., LYO, V. Cytoplasmic Clb2 is required for timely inactivation of the mitotic inhibitor Swe1 and normal bud morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet** 2007, 51:1–18.
- HOPPE, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. **Trends Biochem Sci** 2005, 30: 183–187.
- HORI, T. *et al.* Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. **Oncogene** 1999, 18: 6829–6834.
- HUANG, T.T., D'ANDREA, A.D. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. **Nature Rev Mol Cell Biol** 2006, 7: 323-334.
- HUIBREGTSE, J.M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995, 92: 2563–2567.
- HUNKAPILLER, M.W., *et al.* Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. **Methods Enzymol** 1983, 91: 227-236.
- KAMURA, T. *et al.* Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. **Science** 1999, 284:657-661.



- KIM, J.H. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. **J Biochem** 2003, 134: 9–18.
- KOEGL, M. *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. **Cell** 1999, 96: 635–644.
- KUS, BM, *et al.* Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro. **Proteins** 2004, 54: 455-67.
- LEGRAIN, P., JESTIN, J., SCHACHTER, V. From the analysis of protein complexes to proteoma-wide linkage maps. **Curr Opin Biotechnol** 2000, 11: 402-407.
- LENGRONNE, A., SCHWOB, E. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). **Mol Cell** 2002, 9: 1067–1078.
- LEW, D.J., REED, S.I. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and Cyclins. **J Cell Biol** 1993, 120: 1305-1320.
- LIU, J. *et al.* NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120 (CAND1), an inhibitor of CUL1–SKP1 binding and SCF ligases. **Mol Cell** 2002, 10: 1511–1518.
- LOVERDE, P.T. *et al.* *Schistosoma mansoni* genome project: an update. **Parasitol Int** 2004, 53: 183-192.
- LUCAU-DANILA, A. *et al.* Systematic disruption of 456 ORFs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 2000, 16: 547-552.
- MANNING, M., COLÓN, W. Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward b-sheet structure. **Biochem** 2004, 43: 11248-254.

- MAXWELL, P.H. *et al.* The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. **Nature** 1999, 399: 271-275.
- McKERRROW, J.H., SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma* cercária. **Trends Parasitol.** 2002, 18: 193-195.
- MINELLA, A.C., CLURMAN, B.E. Mechanisms of tumor suppression by the SCF(Fbw7). **Cell cycle** 2005, 4: 1356-1359.
- NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nat Rev Cancer** 2006, 6: 369-381.
- NAMBIAR, A. *et al.* Characterization of the DNA-binding domain of the avian Y-box protein, chkYB-2, and mutational analysis of its single-strand binding motif in the Rous sarcoma virus enhancer. **J Virol** 1998, 72: 900-909.
- NANDI, D. The ubiquitin-proteasome system. **J Biosci** 2006, 31: 137–155.
- NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 9ª edição. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1995.
- NUGROHO, T. T., MENDENHALL, M. D. An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. **Mol Cell Biol** 1994, 14: 3320–3328.
- OHTA, T. *et al.* ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. **Mol Cell** 1999, 3: 535-41.
- PAGE, A.M., HIETER, P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. **Annu Rev Biochem** 1999, 68: 583-609.
- PANDEY, A., MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature** 2000, 405: 837-846.

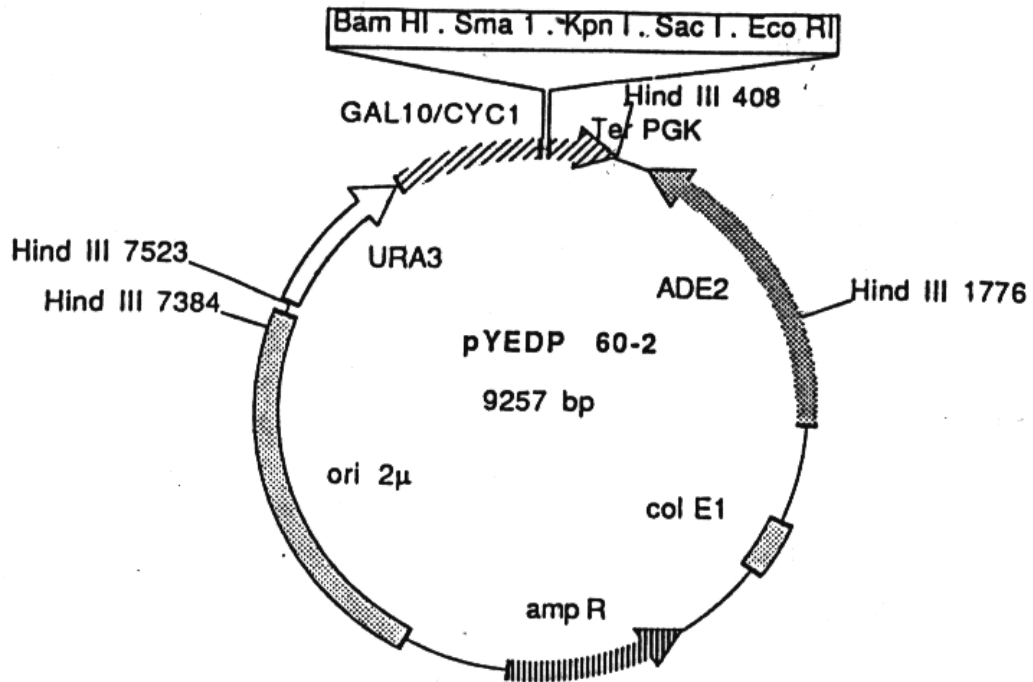
- PARAENSE, W.L. The schistosome vectors in the Américas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2001, 96: 7-16.
- PETERS, J.M. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. **Curr Opin Cell Biol** 1998, 10: 759-768.
- PETROSKI, M.D., DESHAIES, R.J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. **Nature Rev** 2005, 6: 9-20.
- PICKART 2006
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem** 2001, 70: 503–533.
- PICKART, C.M. Ubiquitin in chains. **Trends Biochem Sci** 2000, 25: 544-548.
- REED, S.I. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2003, 4: 855-864.
- SANTOS, TM, *et al.* Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. **Mol Biochem Parasitol** 2002, 125: 103-112.
- SASAGAWA, Y, *et al.* *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. **Genes Cells** 2003, 8: 857-872.
- SAVIOLI, L. *et al.* Control of schistosomiasis – A global picture. **Parasitol Today** 1997, 13: 444-448.
- SCHWARTZ, D.C., HOCHSTRASSER, M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. **Trends Biochem Sci** 2003, 28: 321–328.
- SCHWOB, E. *et al.* The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. **Cell** 1994, 79: 233–244.

- SEOL, J.H. *et al.* Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. **Genes Develop** 1999, 13: 1614-1626.
- SHORT, R.B. Presidential address: sex and the single schistosome. **J Parasitol** 1983, 69: 3-22.
- SIGISMUND, S., POLO, S., DI FIORE, P.P. Signaling through monoubiquitination. **Curr Top Microbiol Immunol** 2004, 286: 149–185.
- SIMPSON, A.J.G., SHER, A., MCCUTCHAN, T.F. The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. **Mol Biochem Parasitol** 1982, 22: 169-176.
- SKELLY, P.J., DADARA, A., HARN, D.A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **Int J Parasitol** 2003, 33: 363-369.
- SKOWYRA, D. *et al.* F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. **Cell** 1997, 91: 209-219.
- SKOWYRA, D. *et al.* Reconstitution of G1 Cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. **Science** 1999, 284: 662-665.
- SQUID, A.K. *et al.* Elm1 is required for multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 2006, 173: 1919-1937.
- SPENCE, J. *et al.* Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. **Cell** 2000, 102: 67-76.
- STAUB, O. Ubiquitylation and isgylation: overlapping enzymatic cascades do the job. **Sci STKE** 2004, 245: 43.
- STAUB, O., ROTIN, D. Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport. **Physiol Rev** 2006, 86: 669–707.

- STELMA, F.F. *et al.* Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a recently exposed community in northern Senegal. **Am J Trop Med Hyg** 1993, 49: 701-706.
- SUN, L, CHEN, ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. **Curr Opin Cell Biol.** 2004, 16: 119-126.
- TAN, P. *et al.* Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. **Mol Cell** 1999, 3: 527-533.
- TOYN, J.H. *et al.* The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. **Genetics** 1997, 145: 85–96.
- TUCKER, C.L., GERA, J.F., UETZ, P. Towards an understanding of complex protein networks. **TRENDS Cell Biol** 2001, 11: 102-106.
- TYERS, M, JORGENSEN, P. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. **Curr Opin Genet Dev** 2000, 10: 54-64.
- VALADÃO, A.F. Aspectos funcionais da proteína SMYB1 de *Schistosoma mansoni* pela avaliação de sua interação com proteínas e ácidos nucléicos. Tese de Doutorado 2002, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Brasil.
- VALADÃO, A.F. *et al.* Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. **Mol Biochem Parasitol** 2002, 125: 47-57.
- VARSHAVSKY, A. Regulated protein degradation. **Trends Biochem Sci** 2005, 30: 283-286.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat Genet** 2003, 35: 148-157.
- VERMA, R. *et al.* Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. **Science** 1997, 278: 455–460.

- WANG, M. *et al.* Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an HECT ubiquitin ligase. **EMBO J** 2006, 25: 1710-1719.
- WEISSMAN, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001, 2: 169–178.
- WELCHMAN, R. L., GORDON, C., MAYER, R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. **Nature Rev Mol Cell Biol** 2005, 6: 599–609.
- WILLEMS, A.R. *et al.* Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. **Cell** 1996, 86: 453-463.
- WILSON, R.A. *et al.* From genomes to vaccines via the proteome. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004, 99: 45-50.
- WILSON, R.A. *et al.* *Oming* in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. **TRENDS Parasitol** 2006, 23: 14-20.
- WILSON, R.A. *et al.* *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. **Parasitol** 1978, 77: 57-73.
- ZHENG, N. *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-Fbox<sup>Skp2</sup> SCF ubiquitin ligase complex. **Nature** 2002, 416: 703-709.
- ZWEIGER, G., SCOTT, R.W. From expressed sequence tags to ‘epigenomics’: an understanding of disease processes. **Cur Opin Biotechnol** 1997, 8: 684-687.

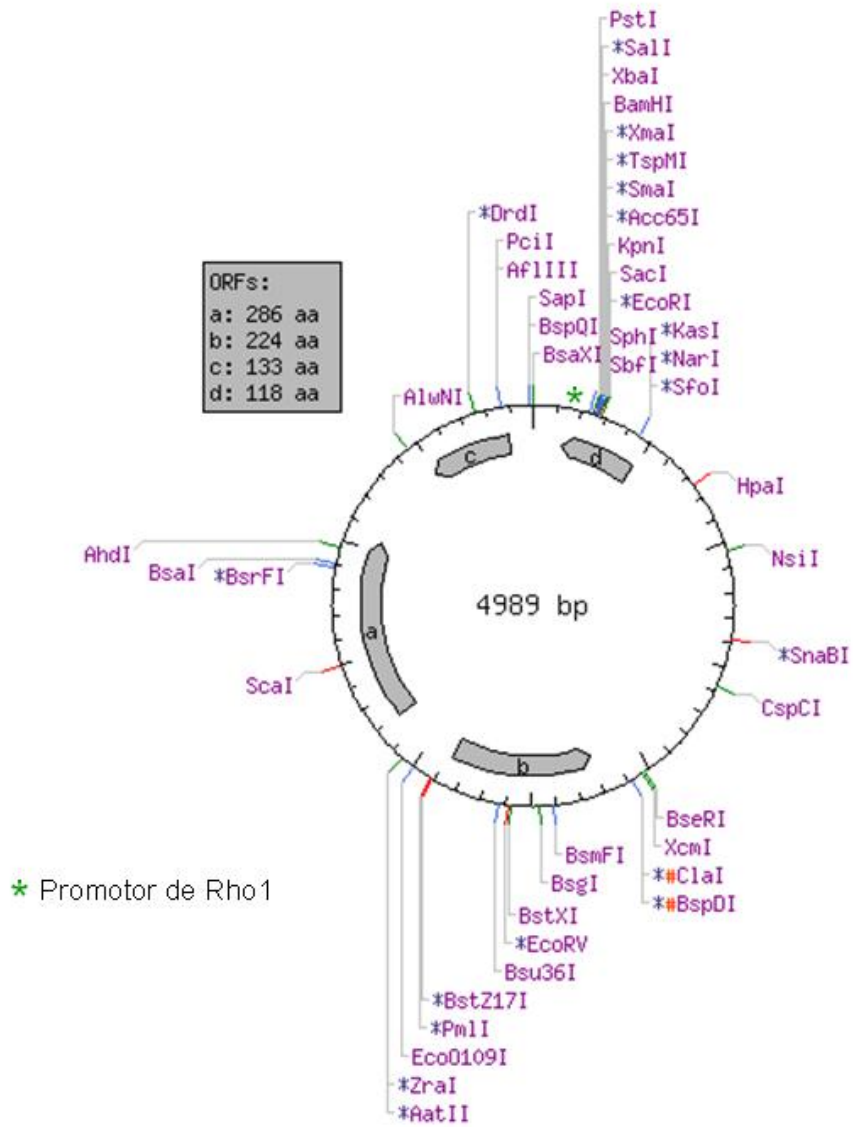
## ANEXO 1



### Mapa esquemático do vetor pYEDP 60-2.

Fonte: vetor gentilmente cedido pelo Prof. Francisco Nóbrega – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – SP.

ANEXO 2

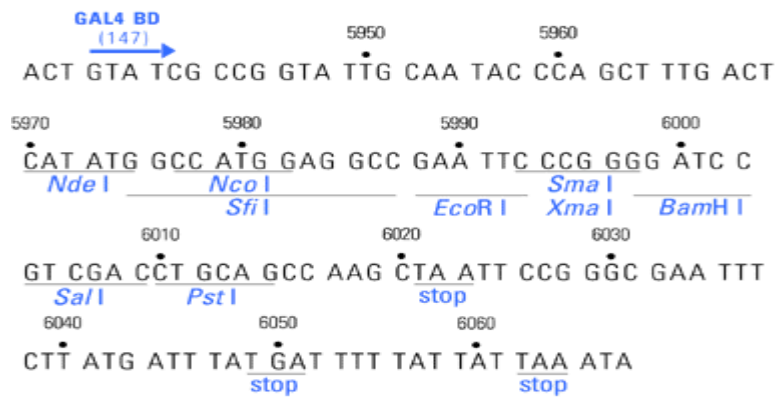
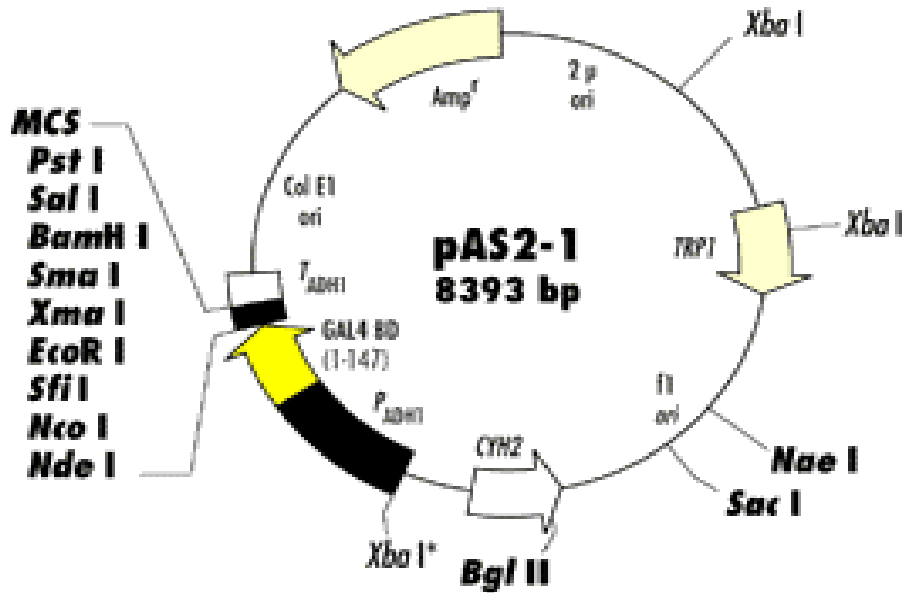


**Mapa esquemático do vetor pYTS.**

Fonte: vetor gentilmente cedido pelo Prof. José Miguel Ortega do Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG.



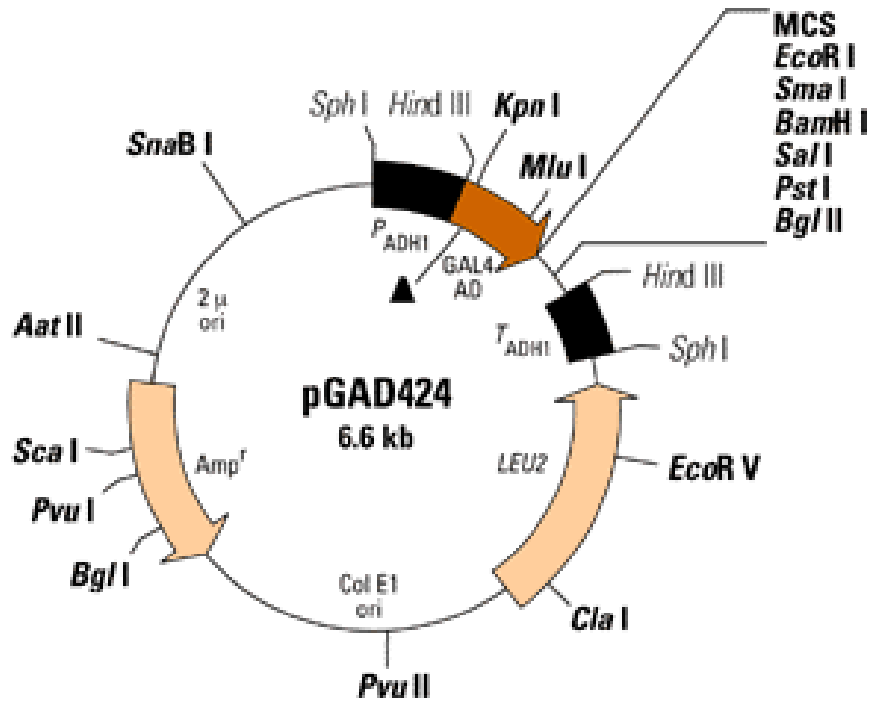
ANEXO 3



Mapa esquemático do vetor pAS2.1.

Fonte: [www.clontech.com/clontech/techinfo/vectors\\_dis/pAS2-1.shtml](http://www.clontech.com/clontech/techinfo/vectors_dis/pAS2-1.shtml)

ANEXO 4



Mapa esquemático do vetor pGAD424.

Fonte: [www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsF-I/pGAD424.shtml](http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsF-I/pGAD424.shtml)



## ANEXO 6

Artigo aceito para publicação na revista *Experimental Parasitology* intitulado:  
***Schistosoma mansoni*: Heterologous complementation of a yeast null mutant by SmRbx, a protein similar to a RING box protein involved in ubiquitination.**

----- Original Message -----

From: "EP (ELS)" <ep@elsevier.com>

To: <gfranco@icb.ufmg.br>

Sent: Monday, February 26, 2007 5:32 AM

Subject: EP-06-214R1: Final Decision

> Ms. No.: EP-06-214R1

> Title: Schistosoma mansoni: Heterologous complementation of a yeast null

> mutant by SmRbx, a protein similar to a RING box protein involved in

> ubiquitination

> Corresponding Author: Dr. Gloria Regina Franco

> Authors: Debora N Santos; Pedro H Aguiar; Francisco P Lobo; Marina M

> Mourão; José H Tambor; Analina F Valadão; Adlane Vilas-Boas; Francisco G

> Nobrega; Philip T LoVerde; Andréa M Macedo; Sérgio D Pena; Carlos R

> Machado;

>

> Dear Dr. Franco,

>

> I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been

> accepted for publication. Thank you for your very clear explanations of

> the changes you have made and the rejection of others. I agree that the

> ubiquitin pathway is well enough known that inclusion is not required, and

> also that the pathway may not be an ideal target. It is not my policy to

> edit out comments of reviewers unless I believe them to be insulting or

> derogatory. I am happy with the remainder of your responses, and do not

> think that a further review is needed.

> Your article has been forwarded to Elsevier's Production Department, and

> you should be receiving confirmation from them shortly.

>

> Many thanks for submitting your fine paper to Experimental Parasitology.

>

> Sincerely,

>

> Dr. John Horton

> Experimental Parasitology

> E-mail: ep@elsevier.com