

DANIELA PERES ALMENARA

Estudo das vitelinas VT1 e YP170B dos
nematóides rhabditídeos *Oscheius tipulae* e
Caenorhabditis elegans: aspectos
estruturais e funcionais

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

São Paulo
2009

Resumo

ALMENARA, Daniela Peres. **Estudo das vitelinas VT1 e YP170B dos nematoides rhabditídeos *Oscheius tipulae* e *Caenorhabditis elegans***: aspectos estruturais e funcionais. 2009. 135 p. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os resultados apresentados neste trabalho elucidam aspectos estruturais e funcionais da proteína OTI-VIT-1 e do gene *Oti-vit-1*, um dos genes de vitelogenina do nematoide de vida livre *Oscheius tipulae*. A região N-terminal de OTI-VIT-1 foi expressa em *E. coli* e os polipeptídeos recombinantes PVIT1HisN e PVIT1HisC foram purificados das frações correspondentes a corpos de inclusão. Alinhamentos realizados com a sequência parcial de OTI-VIT-1 mostraram que a região N-terminal possui maior similaridade com a sequência da vitelina YP170B de *C. elegans* do que com a região N-terminal de OTI-VIT-6. As sequências obtidas da porção carboxi-terminal também puderam ser alinhadas com YP170B, porém com menor similaridade. Também foi possível a identificação de um íntron na região 5' e dois na região 3' do gene *Oti-vit-1*. Soro monoespecífico produzido contra PVIT1HisC confirmou que o gene *Oti-vit-1* codifica VT1. Também mostramos neste trabalho a interação entre o polipeptídeo recombinante P40-H, correspondente à região N-terminal da proteína OTI-VIT-6, com um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa (P100) presente em extratos proteicos totais de *O. tipulae* através da técnica de *ligand-blotting*. Trabalhos anteriores haviam mostrado que P100 é uma proteína de membrana presente apenas em vermes adultos. Para melhor compreender a fisiologia da vitelogênese em nematoides, estudamos também a interação entre a Proteína Microsômica Transportadora de Triglicérides (MTP) e a biossíntese de Vitelogenina em *C. elegans*, utilizando a metodologia de RNAi. Ensaios de interferência ambiental com bactérias expressando parte da sequência do gene da MTP (*Cel-dsc-4*) foram realizados em vermes das linhagens N2 (selvagem) e DH1033. Análises de microscopia de fluorescência mostraram acúmulo de YP170B::GFP no interior das células do intestino dos vermes da linhagem DH1033 que sofreram *knockdown* dos RNAs mensageiros de *Cel-dsc-4*. Este acúmulo sugere a participação da MTP na secreção de vitelogenina. Soros monoespecíficos contra as regiões N-terminal e C-terminal do precursor CEL-VIT-6 permitiram a análise do processamento da VTG em vermes *knockdown*. Não foram detectadas alterações nesse processamento, sugerindo que o mesmo ocorra não só no pseudoceloma, mas também no interior dos enterócitos.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*. *Oscheius tipulae*. Vitelogenina. MTP. RNAi. Ligand-blotting.

Abstract

ALMENARA, Daniela Peres. **Structural and functional analysis of VT1 and YP170B vitellins from the Rhabditid nematodes *Oscheius tipulae* and *Caenorhabditis elegans***. 2009. 135 p. Ph. D. Thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The results presented in this work elucidate some structural and functional aspects of OTI-VIT-1, coded by *Oti-vit-1*, one of the vitellogenin genes of the free-living nematode *Oscheius tipulae* (strain CEW1). The N-terminal portion of this protein was expressed in *E.coli* and the resulting recombinant polypeptides (pVIT1HisN and pVIT1HisC) were, as expected, present in inclusion bodies. Alignments of the aminoacid sequences showed that the N-terminal portion of OTI-VIT-1 is more similar to the N-terminal portion of YP170B than the N-terminal portion of OTI-VIT-6. Sequence analysis also allowed the identification of three introns in the *Oti-vit-1* gene. Monospecific polyclonal antibodies against the recombinant polypeptides were raised in mice and used to show that the *Oti-vit-1* gene codes for the yolk polypeptide VT1. We also show here that P100, a 100kDa polypeptide present in *O. tipulae* extracts specifically binds fluorescein labelled P40H, a recombinant polypeptide that corresponds to the N-terminal portion of the yolk polypeptide VT3. Previous work showed that P100 is a vitellin-binding membrane protein present only in adult worms of *O. tipulae*. Using RNA interference (RNAi) we studied the involvement of Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP/DSC-4) in the secretion of VTG in *Caenorhabditis elegans*. Wild type worms (strain N2) and transgenic worms (strain DH1033) expressing the hybrid protein YP170B-GFP were exposed to *dsc-4* dsRNA. Fluorescence analysis shows YP170B::GFP accumulation in the enterocytes cytoplasm in knockdown DH1033 worms. This accumulation suggests that the vitellogenin transport from the gut cells to the pseudocoelom depends on the presence of DSC-4. Monospecific antisera against two recombinant polypeptides corresponding to N- and C-terminal regions (YP88 and YP115, respectively) of the precursor CEL-VIT-6 were raised in mice and used to analyze precursor accumulation and processing in knockdown worms. Western blots using the YP88 and YP115 monospecific antisera on *Cel-dsc-4* knockdown worms did not show the expected accumulation of the precursor, strongly suggesting that the processing of CEL-VIT-6 can also occur inside the intestinal cells.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*. *Oscheius tipulae*. Vitellogenin. MTP. RNAi. Ligand-blotting.

1 Introdução

1.1 Nematoides

O Filo Nematoda é um grupo numeroso e diversificado de metazoários, cujas espécies apresentam características morfológicas comuns, como o corpo alongado e cilíndrico, além da presença de um pseudoceloma (WOOD, 1988). Essa aparente simplicidade morfológica esconde, no entanto, uma ampla variedade de estruturas especializadas presentes na anatomia desses animais, como por exemplo os aparelhos bucais e as ornamentações da cutícula. Essa diversidade dentro do filo está intimamente relacionada às características biológicas e ecológicas (DE LEY, 2006). Existem espécies de vida livre (terrestres e aquáticos) e parasitas, sendo as últimas encontradas tanto em hospedeiros animais (vertebrados e invertebrados) quanto em plantas. O total de espécies é estimado entre 100.000 e 1.000.000 (LAMBSHEAD, 1993).

Nematoides de vida livre encontram-se distribuídos de forma cosmopolita, adaptados a diferentes condições ambientais, incluindo as mais extremas. Espécies do gênero *Cryonema* habitam fendas no gelo ártico (TCHESUNOV e RIEMANN, 1995), enquanto representantes da subfamília Stilbonematinae são encontrados em sedimentos marinhos altamente redutores, com altíssimos níveis de enxofre (NUSSBAUMER et al., 2004). Essas espécies de vida livre ocupam principalmente o nicho de recicladores de nutrientes, fornecendo uma ligação entre os produtores e saprófitos e as guildas de predadores (BLAXTER, 2003).

O sucesso das espécies parasitas é tão amplo quanto o de seus parentes de vida livre. Estima-se que a grande maioria das espécies de vertebrados terrestres possua ao menos uma espécie de nematoide parasita associada (BUNDY, 1997). Nematoides parasitas de humanos são causadores de doenças que afetam cerca de 2,7 bilhões de pessoas em todo o mundo (HOTEZ et al., 2006; CANNING, 2006), atingindo particularmente crianças em idade escolar (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2004). Também a agricultura e a pecuária sofrem importantes danos com as infestações de nematoides. Parasitas de plantas do gênero *Meloidogyne* são os principais responsáveis por perdas em cultivos agrícolas em todo mundo, levando a uma perda aproximada de 80 bilhões de dólares americanos por ano (BARKER, 1994). Na

pecuária, estima-se que mais de 100 bilhões de dólares sejam perdidos por ano na criação de animais devido à infestações por endo e ectoparasitas (JASMER et al., 2003).

Uma relação ecológica bastante interessante também presente neste filo é a associação entre nematoides (chamados entomopatogênicos) e insetos. Esses vermes distribuem-se amplamente no solo e são capazes de invadir e matar larvas de insetos de diferentes ordens. Estas espécies entomopatogênicas possuem bactérias simbiotas que, ao se reproduzirem na larva infectada, promovem morte por septicemia (FORST et al., 1997).

A classificação dos nematoides tradicionalmente se baseava em características morfológicas e morfométricas, com os dados obtidos majoritariamente em análises de microscopia de luz (DE LEY, 2006). A primeira grande análise filogenética utilizando dados moleculares foi realizada por Blaxter e colaboradores (1998). Nesse estudo, foram avaliados os graus de semelhança entre as sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rDNA) de 53 espécies. Apenas sete anos depois, estão disponíveis em bancos de dados públicos sequências de SSU rDNA de mais de 600 espécies de nematoides. Filogenias mais recentes, incluindo essas novas sequências, classificam os nematoides em três subclasses: Cromadoria, Enoplia e Dorilaimia (Figura 1), porém os dados ainda não são suficientes para a determinação da época de surgimento desses grupos (DE LEY, 2006).

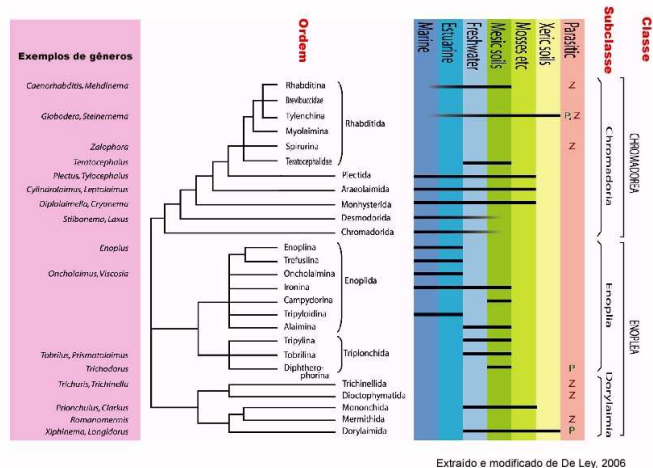


Figura 1. Classes do Filo Nematoda. Análise filogenética baseada nas sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-RNA) incluindo exemplos de gêneros e nicho ecológico.

Wasmuth e colaboradores (2008) realizaram um estudo detalhado de ESTs (Expression Sequence Tags) de 37 espécies de nematoides, a maioria delas de hábito parasita, e definiram a presença de cerca de 120.000 genes distintos, todos eles traduzidos.

Análises proteômicas dessas proteínas putativas combinadas com os dados dos proteomas das espécies de vida livre *Caenorhabditis elegans* e *Caenorhabditis briggsae* sugerem a existência de genes exclusivos do filo e outros exclusivos de espécies parasitas, provavelmente obtidos por transferência horizontal de seus hospedeiros. Esses genes são, portanto, importantes assinaturas do surgimento do parasitismo dentro do filo.

A subclasse Enoplia compreende espécies aquáticas e de solos úmidos, a maioria predadora, não havendo espécies parasitas. Possuem estruturas envolvidas na predação, como dentes e ganchos na região anterior do corpo, além de um sistema sensorial bastante desenvolvido. Apresentam características comumente classificadas como ancestrais no filo, como formas de desenvolvimento variadas e retenção do envelope nuclear nos espermatozóides maduros (DE LEY, 2006).

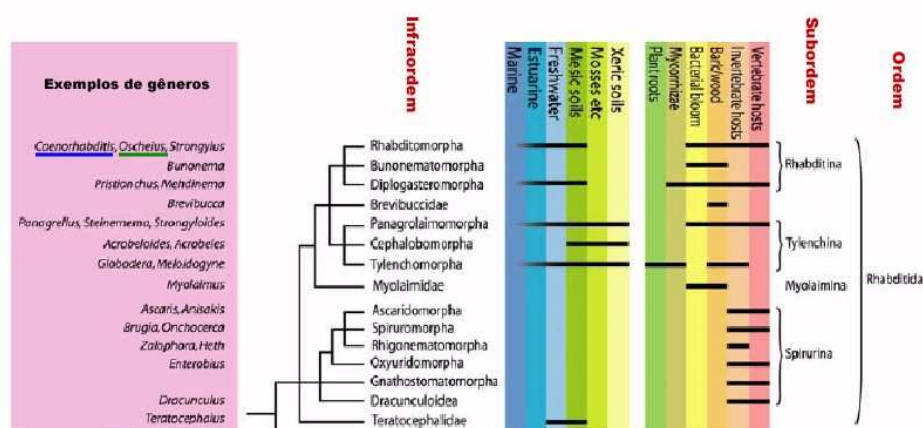
Os membros da subclasse Dorilaimia são, provavelmente, os primeiros nematoides a conquistarem habitats de águas-doces e terrestres. É uma subclasse com grande diversidade, incluindo espécies de vida livre (predadores e onívoros) e parasitas, incluindo causadores de parasitoses humanas, como os do gênero *Trichuris*.

Na subclasse Cromadoria são incluídas espécies notavelmente menores que os Enoplia e os Dorilaimia. O tamanho reduzido é provavelmente correlacionado ao hábito bacterióvoro e às altas taxas de reprodução, comuns à grande parte das espécies classificadas nesse grupo. São amplamente distribuídas tanto em sedimentos marinhos quanto terrestres.

A cutícula dos Cromadoria é estruturada de forma mais complexa que nas outras subclasses, muitas vezes apresentando ornamentações. A presença de cutícula quimicamente impermeável na ordem Rhabditida contribuiu significativamente para a conquista de ambientes hostis, e espécies dessa ordem são bem sucedidas como parasitas e colonizadores, incluindo aqueles extremófilos (DE LEY, 2006). As espécies *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae*, utilizadas neste trabalho, pertencem à ordem Rhabditida (**Figura 2**).

1.2 *Caenorhabditis elegans* e *Oscheius tipulae*

Caenorhabditis elegans é um nematoide de vida livre encontrado em diversas regiões do mundo. Alimenta-se de microorganismos, primariamente de bactérias. Ocorre em solos férteis normalmente no estágio de larva *dauer*, uma forma de resistência que não se alimenta ativamente e possui metabolismo desacelerado, permitindo a sobrevivência do verme a condições de estresse (WOOD, 1988).



Extraído e modificado de De Ley, 2006

Figura 2. Ordem Rhabditida. Análise filogenética baseada nas sequências da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU-RNA) incluindo exemplos de gêneros e nicho ecológico. Destaque para os gêneros *Caenorhabditis* e *Oscheius*.

Populações de *C. elegans* em condições ativas de alimentação e reprodução são frequentemente isoladas de frutas em decomposição, mas pouco se sabe sobre as condições de habitat natural desses animais (KIONTKE, 2008). A linhagem referência da espécie é N2, isolada em Bristol, no Reino Unido na década de cinquenta e congelada por John Sulston em 1969 (BRENNER, 1974).

Oscheius tipulae é também uma espécie de vida livre pertencente, como *C. elegans*, à família Rhabditidae, do clado Rhabditina, que inclui tanto representantes de vida livre quanto espécies parasitas de vertebrados e invertebrados (PARKINSON et al., 2004). *O. tipulae* foi encontrado inicialmente associado a larvas do díptero *Tipula paludosa* (BAÏLE et al., 2008), no entanto, a linhagem CEW1, isolada por Winter (1992) do solo da cidade de São Paulo foi considerada por Dichtel-Danjoy e Félix (2004) como sendo a linhagem-referência da espécie. Amostras selvagens deste

nematoide podem ser facilmente isoladas do solo em diferentes regiões do mundo, possibilitando estudos de genética de população e microevolução (FÉLIX, 2006).

A definição da espécie *O. tipulae* é recente (DICTHTEL-DANJOY e FÉLIX, 2004). Sendo assim, esse animal aparece em outros trabalhos com denominações distintas: *Dolichorhabditis* sp. (WINTER, 1992; EVANS et al., 1997), *Oscheius n. sp.* (WINTER et al., 1996; PENHA-SCARABOTTO, 1999; SOMMER, 2000; DICHTTEL et al., 2001; LEE e SOMMER, 2003; LOUVET-VALLÉE et al., 2003) e *Rhabditis (Oscheius) pseudodolichura* (AKAMINE, 2001; FÉLIX, 2001; WINTER, 2002).

A anatomia de *C. elegans* e *O. tipulae* é bastante semelhante. Ambas as espécies possuem um padrão corporal típico de todos os nematoides: cilíndrico e não-segmentado. Internamente, os órgãos podem ser agrupados em dois tubos principais, separados pelo pseudoceloma. O tubo mais externo compreende cutícula, hipoderme, sistema excretor, neurônios e músculos, enquanto o tubo interno inclui faringe, intestino e gônadas (ALTUN e HALL, 2006) (Figura 3).

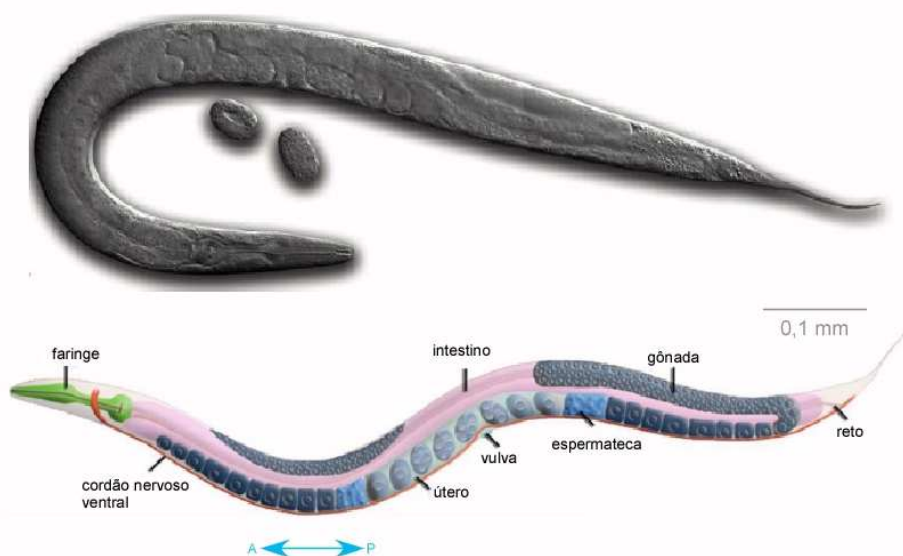
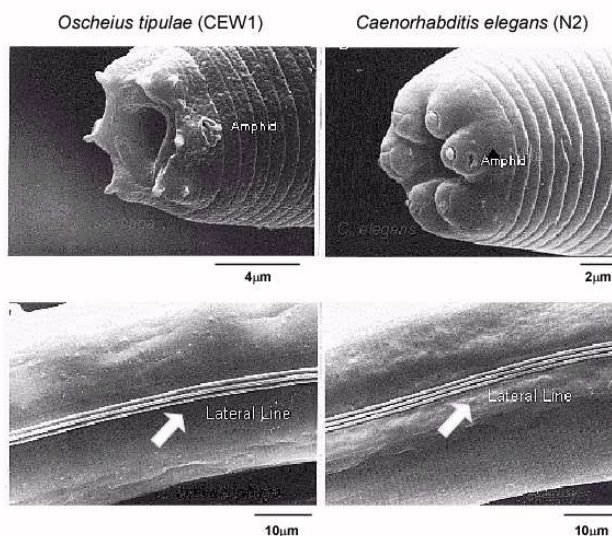


Figura 3. Anatomia e morfologia de *Caenorhabditis elegans* : hermafrodita adulto. Acima, microscopia de contraste de interferência diferencial (Nomarski), vista lateral com dois ovos. Abaixo, esquema da anatomia interna. A seta dupla indica o eixo antero-posterior do animal.

Como diferenças notáveis, *O. tipulae* possui apenas um bulbo na faringe, enquanto *C. elegans* possui dois. Também podem ser notadas diferenças na linha lateral da cutícula desses animais, quando observados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 4).

Tanto *C. elegans* quanto *O. tipulae* são hermafroditas protândricos que se autofertilizam, pois um único indivíduo é capaz de produzir espermatozóides e ovócitos. Também são encontrados indivíduos machos na natureza, porém a frequência é bastante baixa (cerca de 0,1% da população). O componente haplóide de ambas as espécies apresenta seis cromossomos: cinco autossomos e um cromossomo sexual. A linhagem somática diplóide dos hermafroditas possui dois cromossomos sexuais (XX), enquanto os machos (X0) são resultado de não-disjunção, dos cromossomos sexuais, na



Extraído e modificado de <http://www.icb.usp.br/~cewinter/sem.html>

Figura 4. Eletromicrografia de *Oscheius tipulae* (CEW1) e *Caenorhabditis elegans* (N2). Morfologia externa da região anterior (acima) e da parede do corpo (abaixo). A seta destaca a linha lateral. (Preparado por R. Turner Department of Biology, 1990 - Indiana University).

linhagem germinativa dos hermafroditas. Em condições de estresse, a porcentagem de não-disjunção, durante as meioses, pode ser aumentada, resultando em frequências maiores de machos nas populações.

O ciclo de vida das duas espécies é bastante curto, durando cerca de três dias em condições ótimas de temperatura (22 °C – 25 °C). Temperaturas mais baixas permitem que o ciclo ocorra de forma mais lenta. O ciclo é composto de uma fase embrionária seguida de quatro estádios larvais (L1-L4) e da fase adulta (**Figura 5**). O final de cada estágio larval é marcado por uma muda de cutícula, que apresenta características estruturais e de composição protéica estágio-específicas (WHITE, 1988). O adulto coloca ovos por cerca de quatro dias e vive aproximadamente 15 dias (WOOD, 1988).

As sequências-líder de “trans-splicing” SL1 e SL2 diferem entre as duas

espécies, mostrando que *O. tipulae* está mais distante de *C. elegans* do que *Caenorhabditis briggsae*, uma outra espécie-modelo pertencente à ordem Rhabditida. Os genes de SL1-RNA em *O. tipulae* não se encontram agrupados em um único conjunto (*cluster*), como em *C. elegans*. Tanto *C. elegans* como *O. tipulae* possuem *operons*, sendo os dois primeiros metazoários em que esse arranjo gênico foi descrito (EVANS et al., 1997).

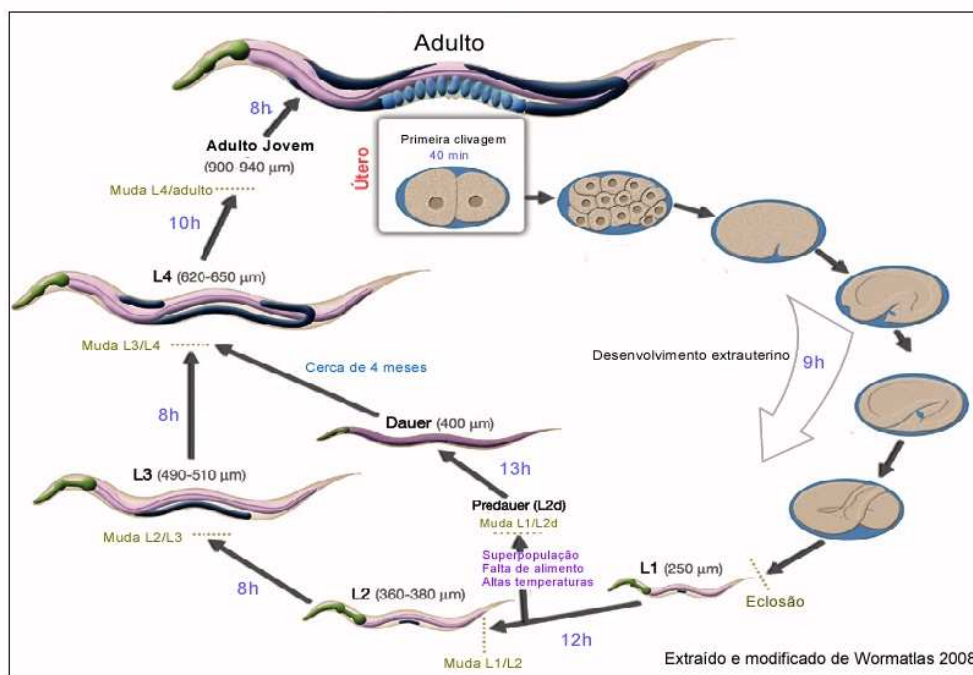


Figura 5. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22° C. Os tempos informados são relativos ao momento da fertilização. O tamanho de cada um dos estádios larvais está indicado ao lado dos esquemas em micrômetros. Notar a via de entrada no estágio de resistência “dauer”.

O uso de nematoides de vida livre como modelos animais teve seu mais importante impulso por volta de 1963, quando Sydney Brenner propôs a utilização de *C. elegans* para estudos de neurobiologia. Algumas características dessa espécie, tais como simplicidade anatômica (o adulto apresenta 959 células), corpo e ovos transparentes, autofertilização e facilidade de cultivo o tornavam especialmente adequado para este tipo de investigação (WOOD, 1988). No ano de 2002, Brenner recebeu o prêmio Nobel pela criação da pesquisa moderna com *C. elegans* (BRENNER, 1974), juntamente com Robert Horvitz, que descobriu o mecanismo molecular da morte celular programada e John Sulston, que definiu as linhagens celulares e construiu um mapa físico do genoma desse organismo (SULSTON e HORVITZ, 1977). Hoje, o uso de modelos em substituição ao estudo direto de espécies parasitas é uma ferramenta

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

