

JULIANA IDE AOKI

Identificação de um gene que confere resistência a
tubercidina em *Leishmania (Leishmania) major*
São Paulo

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim

2013

RESUMO

Identificação de um gene que confere resistência a tubercidina em *Leishmania (Leishmania) major* (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

A identificação de genes relacionados com resistência a compostos antiparasitários tem contribuído para um melhor entendimento do mecanismo de ação de compostos antileishmania. Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação do análogo de purina tubercidina (TUB) em *Leishmania*. Utilizando a estratégia de superexpressão após transfecção gênica, isolamos um *locus* de *Leishmania (Leishmania) major*, de 31 kb, capaz de conferir níveis de resistência quatro vezes maior que o parasita selvagem. Várias deleções desse *locus* foram geradas e a construção de 3 kb (pSNBR/3kbC*l*al-EcoRI) também conferiu níveis de resistência quando comparado ao parasita selvagem. Através de análises no genoma de *L. (L.) major*, localizamos esse *locus* no cromossomo 31 e, no fragmento de 3 kb, um gene que codifica para uma proteína com função desconhecida até o momento (LmjF.31.2010). Esta proteína foi relacionada com resistência a TUB em todas as linhagens transfectadas analisadas (cosTUB2 e pSNBR/3kbC*l*al-EcoRI), assim denominamos LmjF.31.2010, de proteína relacionada com resistência a TUB (PRRT). A quantificação relativa de transcritos de mRNA na construção pSNBR/3kbC*l*al-EcoRI apresentou níveis altos de transcritos da PRRT. Foram gerados ainda mutantes de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* resistentes a TUB e estes se apresentaram bem adaptados a concentrações altas de TUB, apresentando razão de resistência maior que 200 vezes, quando comparado com os respectivos parasitas selvagens. A PRRT também foi relacionada na resistência a TUB nos mutantes gerados, pois houve amplificação gênica de *prrt*. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem dados para inferir a importância da PRRT no mecanismo relacionado com resistência a TUB.

Descritores: *Leishmania*, Tubercidina, Purinas, Transfecção

ABSTRACT

Aoki JI. Identification of a gene related with tubercidin resistance in *Leishmania (Leishmania) major* (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

The identification of genes associated with resistance to antiparasitic compounds has contributed to a better understanding of the mechanism of action of compounds against *Leishmania*. Little is known about the mechanism of action of purine analog tubercidin (TUB) in *Leishmania*. Using a strategy of gene overexpression after transfection, we isolated a *locus* of *Leishmania (Leishmania) major*, 31 kb, capable of conferring fold resistance four times greater than the wild type parasite. A set of deletions of this *locus* were generated and a 3 kb construction (pSNBR/3kbClnI-EcoRI) conferred fold resistance twice than the wild type. Analysis of *L. (L.) major* genome, located this *locus* on chromosome 31 and on 3 kb fragment we identified a gene encoding a protein with unknown function (LmjF.31.2010). This protein has been related to TUB resistance in all strains analyzed (cosTUB2 and pSNBR/3kbClnI-EcoRI), so we named mjF.31.2010 of protein related with resistance to TUB (PRRT). Relative quantification of mRNA transcripts in the construction pSNBR/3kbClnI-EcoRI showed high levels of PRRT transcripts. Mutants of *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis* resistant to TUB were also generated and these were well adapted to high TUB concentrations, presenting fold resistance greater than 200 times when compared with their respective wild type. The PRRT was also related to TUB resistance mutants generated by PRRT gene amplification. Despite the high fold resistance presented by TUB resistant mutants, the ratio of expression of these mutant PRRT transfected and wild was similar to the wild type.

Descriptors: *Leishmania*, Tubercidin, Purine 4, Transfection