

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA MASSUMI TAKAHASHI

**Clonagem e caracterização de uma proteína *zinc finger* CCCH em
*Trypanosoma cruzi***

CURITIBA

2007

JANAINA MASSUMI TAKAHASHI

**Clonagem e caracterização de uma proteína *zinc finger* CCCH em
*Trypanosoma cruzi***

Monografia apresentada à disciplina Estágio II
como requisito parcial à conclusão do curso de
Ciências Biológicas, modalidade bacharelado,
Setor de Ciências Biológicas. Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Teresa Cristina C. Ogliari (UFPR)

Co-orientadora: Patrícia Alves Mörking (FioCruz)

CURITIBA

2007

À minha família,
À Andréa Rodrigues Ávila,
À Patrícia Alves Mörking,
Ao Stênio Perdigão Fragoso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Oscar e Terezinha Takahashi, por jamais negarem o acesso à educação, fossem quais fossem as dificuldades. E ao meu irmão Juliano que, embora não tenha ajudado no desenvolvimento da monografia, também não atrapalhou... Amo vocês.

Aos meus amigos Carlos, Flávia, Francielly, Maysa, Paula, Rafael, Rodrigo e Rubia por incentivarem-me a prosseguir nos estudos, mesmo quando os caminhos tornavam-se complicados e a vontade de desistir aumentava exponencialmente.

Aos colegas de Laboratório Adriana, Alda, Dani, Flávia, Leonardo, Márcia, Maurílio e Rosana, pela paciência em ensinar-me diversas técnicas laboratoriais, por socorrerem-me inúmeras vezes quando o experimento parecia desandar, e também por chamarem minha atenção quando fazia coisas erradas várias outras vezes...

Ao Paulo Arauco, pelo seqüenciamento do gene, e pela enorme paciência na sala de equipamentos, enquanto eu sonicava bactérias.

Aos técnicos laboratoriais Janaína, Nilson, Suzana e Vanessa, por serem sempre tão eficientes no preparo das soluções necessárias. Também pelos risos e descontrações proporcionados em todos os momentos.

À Patrícia Alves Mörking, pesquisadora, por ter-me “adotado” no laboratório, pela dedicação em tempo integral à mim e ao meu projeto, guiando meus passos pelo caminho da ciência e amparando meus tropeços, sempre atenciosa às minhas dúvidas, esclarecendo-as com sabedoria, sem medir esforços.

À Patrícia Alves Mörking, grande amiga, por ouvir meus problemas e ajudar a contorná-los da melhor maneira possível, por estar ao meu lado nas inúmeras adversidades pelas quais passamos, por apoiar minhas decisões (embora nem sempre concordasse com elas) e, ainda, pelas várias caronas, tarde da noite.

Ao Stênio Perdigão Fragoso, por ter aberto as portas do laboratório, permitindo que essa monografia fosse desenvolvida em um ambiente extraordinário.

À Andréa Ávila, pela oportunidade do estágio, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto, e pela paciência em ajudar-me a repetir o mesmo experimento incontáveis vezes.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse projeto.

À Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, apresenta muitas peculiaridades em relação à sua regulação gênica, que ocorre preferencialmente em nível pós-transcricional. Um dos mecanismos envolve a modulação da estabilidade dos mRNAs por meio de interação com proteínas. A partir de estudos baseados em análises de proteômica utilizando frações polisomais de *T. cruzi* verificou-se a presença de uma proteína identificada como pertencente à família *zinc finger* (dedo de zinco) motivo CCCH, denominada de TcZFP5. Proteínas da família dedo de zinco CCCH são proteínas de ligação à RNA que modulam a expressão gênica em eucariotos inferiores e superiores. Análises iniciais das frações polisomais obtidas por meio de gradiente de sacarose sugeriram sua associação aos mesmos. Entretanto, a dissociação dos polisomos pela adição de puomicina não causou a dissociação de TcZFP5 das frações pesadas do gradiente, indicando que TcZFP5 não está associada de fato aos polisomos, mas que a mesma faz parte de um complexo de alto peso molecular independente do polissomo. Ensaio preliminares de *Western blot* indicam que o perfil de expressão gênica da proteína TcZFP5 ocorre de modo constitutivo ao longo da metaciclologênese. Atualmente, estamos realizando ensaios do tipo *pull down* com o objetivo de verificar a interação de TcZFP5 com outras proteínas e mRNAs. A compreensão da função da proteína TcZFP5 poderá contribuir para o entendimento da função dessa família de proteínas no controle pós-transcricional dos eventos relacionados ao ciclo de vida dos tripanosomas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Dedo de zinco CCCH. Metaciclologênese.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, has evolved particular mechanisms of gene regulation. Gene expression is regulated firstly at post-transcriptional level. One of the mechanisms involves the differential stability of mRNAs mediated by protein interactions. Based on the results of proteomic analysis using *T. cruzi* polysome fractions, we have identified a CCCH zinc finger protein family member named TcZFP5. CCCH zinc finger proteins are RNA-binding proteins that modulate gene expression in lower and higher eukaryotes. Preliminary polysome analysis using sucrose gradients suggested the association of TcZFP5 to polysomes. However, polysome disruption by puromycin treatment did not cause dissociation of TcZFP5 from the heavy fraction, indicating that TcZFP5 is not associated to polysomes but is in fact part of a polysome-independent complex. Western blot analyses showed constitutive expression of TcZFP5 during metacyclogenesis. We are currently carrying out pull down experiments in order to elucidate the interactions of TcZFP5 with other proteins or mRNAs. Understanding the function of TcZFP5 would provide insight into the role of this protein family in the post-transcriptional control of developmental events in the trypanosome life cycle.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Dedo de zinco CCCH. Metaciclôgênese.

SUMÁRIO

1 TERMOS E ABREVIACÕES	9
2 INTRODUÇÃO	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1- A DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	11
3.2- CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO AGENTE ETIOLÓGICO E DO VETOR.....	11
3.3- A INCIDÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NAS AMÉRICAS, MEIOS DE CONTAMINAÇÃO E SINTOMATOLOGIA.....	12
3.4- CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	14
3.5- <i>MECANISMOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TRYPANOSOMA CRUZI</i>	17
3.6-PROTEÍNAS ZINC FINGERS E TcZFP5.....	18
4 OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL.....	21
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
5 MATERIAS E MÉTODOS	22
5.1- MICROORGANISMOS.....	22
5.2- PLASMÍDEOS.....	22
5.3 -MARCADORES DE PESO MOLECULAR.....	22
5.4- MEIO DE CULTURA.....	22
5.5- SOLUÇÕES.....	22
5.6- <i>EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL E EPISOMAL DE T. CRUZI</i> ...23	
5.7- <i>AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO GENE DA TCZFP 5</i>	26
5.8- <i>PURIFICAÇÃO E DIGESTÃO DO FRAGMENTO GÊNICO</i>	26
5.9 - <i>LIGAÇÃO</i>	27
5.10- PREPARO DE CÉLULA COMPETENTE.....	27
5.11- <i>OBTENÇÃO DE CLONES</i>	28
5.12- <i>EXPRESSÃO DO GENE TCZFP5 EM E. COLI</i>	29
5.13- <i>OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI ZFP EM CAMUNDONGOS</i>	30
5.14- <i>ANALISE DO PERFIL EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DURANTE A</i>	

<i>METACICLOGÊNESE DE T. CRUZI</i>	30
5.15- FRACIONAMENTO DA TCZFP5 EM GRADIENTE DE SACAROSE	30
5.16- DEMONSTRAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA EM ESTUDO COM RNAS	31
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
7- CONCLUSÃO	38
8- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	39

1-TERMOS E ABREVIACOES

AMP: Ampicilina

BM: *Bench Marker*, Marcador de peso molecular utilizado em gel de poliacrilamida

Cana: Canamicina

Dm28c: Cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada no experimento.

GFP: *Green fluorescent protein*.

IPTG: *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*, reagente mimético da allolactose.

KDa: Kilo Dalton

LAC: lactose

LB: Meio de cultura *Luria-Bertani*

LIT: Meio de cultura *liver infusion Tryptose*

Motivo CCCH: Tipo de proteína dedo de zinco onde os aminoácidos estão dispostos coordenadamente em torno de um íon de zinco.

Pb: Pares de base

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da enzima polimerase)

pQE30: Vetor de clonagem e expressão utilizado

Primer: oligoiniciadores

SL: seqncia líder

Sonicar: Romper membrana celular utilizando ultra som.

TcZFP5: Denominação da proteína em estudo.

Zinc finger: Dedo de zinco

Λ hind: marcador de peso molecular utilizado em gel de agarose

1 Kb plus: marcador de peso molecular utilizado em gel de agarose

2- INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* (gênero Trypanosomatidae) (NEVES, 2005) é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. A enfermidade causada pelo *T. cruzi* foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) e, atualmente, é considerada um grave problema para a população americana, onde estima-se que haja 17 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América latina, com cerca de 45.000 óbitos e 400.000 casos de doenças cardíacas e digestivas por ano, além de 90 milhões de pessoas com risco de contágio (WHO, 2000).

Os tripanossomatídeos apresentam algumas características diferentes dos demais organismos eucariotos. Entre elas está o controle diferencial da expressão gênica que, nesses protozoários, ocorre principalmente a nível pós-transcricional, envolvendo o processamento e a tradução dos transcritos (BRENNER, 2000).

A partir de um estudo proteômico investigativo em frações polisomais de *T. cruzi* realizado por Ávila *et. al*, em que diversas proteínas expressas a partir do DNA genômico do parasita foram identificadas e caracterizadas, verificou-se a presença de uma proteína em especial, identificada como pertencente à família *Zinc Finger* (ou dedo de zinco), cujo motivo identificado é o CCCH, denominada de TcZFP5 e que, nesses organismos, acredita-se interagir com o processo regulatório pós-transcricional através da interação com moléculas de RNA (BLACKSHEAR, 2002)

O estudo dessa proteína possivelmente relacionada à regulação da tradução gênica em *T. cruzi* é importante, pois auxilia o estudo e compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica nesse protozoário, além de poder relacionar-se direta ou indiretamente com o processo de diferenciação entre as várias formas observadas durante o ciclo de vida do parasita.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- A descoberta da Doença de Chagas

A emergência do ramo da parasitologia nas ciências biológicas ocorreu no fim do século XIX, com a revolução bacteriologista, permitindo os primeiros passos de novas especialidades como a parasitologia, que realizariam importantes descobertas acerca das inúmeras moléstias que atingem o homem. Entretanto, já no início desse mesmo século, o cientista brasileiro Carlos Chagas conseguiu um feito ímpar na ciência ao descrever em apenas um ano todos os elementos de uma nova doença descoberta, mais tarde denominada Doença de Chagas (ou Mal de Chagas): o agente etiológico, o vetor transmissor e a descrição clínica da enfermidade.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, também chamada de Mal de Chagas ou Tripanossomíase Americana. A enfermidade causada pelo *T. cruzi* foi descoberta em 1909 pelo Dr. Chagas (CHAGAS, 1909) enquanto ele estudava outra doença tropical, a malária. Nessa época, o cientista fazia parte do Instituto Soroterápico Federal de Maginhos - atualmente chamada de Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ - que tinha Oswaldo Cruz como diretor. O instituto caracteriza-se desde àquela época até os dias de hoje pelo grande quadro de pesquisadores, pelo uso da biologia experimental nas pesquisas e pela aplicação do conhecimento desenvolvido em prol da população. (COUTINHO, 1999).

3.2- Classificação taxonômica do agente etiológico e do vetor

O protozoário causador da doença de Chagas classifica-se como pertencente ao reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastidiae, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, Subgênero *Schizotrypanum*, Espécie *Trypanosoma cruzi*. O inseto vetor da doença, popularmente conhecido como barbeiro, pertence ao reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, Gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (NEVES,2005)

O ciclo biológico do *T.cruzi* é do tipo heteroxeno, passando o parasita por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) e extracelular no

inseto vetor (triatomíneos). (NEVES 2005). Os Triatomíneos são insetos de hábitos noturnos que se alimentam do sangue de animais, e é durante a picada que este defeca, liberando as formas infectantes que penetrarão no hospedeiro vertebrado pelo local da picada ou através de mucosas.

O Gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes, dentro da família Trypanosomatidae, por albergar uma série de espécies de importância etiológica, uma vez que provocam diversas doenças tanto em humanos quanto em outros animais (BRENNER,2005). Como exemplos de parasitas citam-se: *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (doença do sono da África oriental), *Trypanosoma brucei gambiense* (doença do sono da África ocidental), *Trypanosoma equinum* (mal das cadeiras – eqüinos), *Trypanosoma equiperdum* (Durina - Eqüinos e asininos), entre outros.

3.3- A Incidência da Doença de Chagas nas Américas, meios de contaminação e sintomatologia

A doença de Chagas tem como peculiaridade o fato de ser restrita ao continente americano e estar diretamente relacionada à pobreza, uma vez que a precariedade das moradias e das condições de higiene propiciam a proliferação do inseto vetor. Atualmente, é considerada um grave problema para a população da América central e do sul (uma vez que esta foi erradicada dos Estados Unidos), sendo endêmica apenas na América Latina, onde, segundo dados divulgados pela organização mundial da saúde, estima-se que haja mais de 17 milhões de pessoas infectadas em 21 países distintos, contabilizando cerca de 45.000 óbitos anuais, além de 400.000 casos de problemas cardíacos e digestivos por conta do desenvolvimento da doença. Além disso, somam-se 90 milhões de pessoas que possuem risco de contágio (WHO, 2000). No Brasil, existem aproximadamente 5 milhões de chagásicos (DIAS (1998) e COURA (1997)). A figura 1, a seguir, ilustra a incidência da doença nas Américas e no Brasil.



Figura 1: A área onde há incidência da Doença de Chagas ocupa quase todo o continente central e sul-americano, exclusivamente. É, portanto, endêmica da região. No Brasil, a incidência abrange todo o território, à exceção da Amazônia, onde os dados estatísticos acerca da doença ainda são precários (disponível em <http://www.uta.edu/>).

A contaminação do homem pelo protozoário dá-se através das fezes do inseto vetor que, ao alimentar-se do sangue humano, defeca ao lado do local da picada e, pelo prurido resultante da picada, o homem coça o local, carregando as fezes contaminadas para o orifício da picada, ou levando a mão contaminada às mucosas como o olho e a boca, servindo como porta de entrada para o *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, nenhum inseto nasce contaminado; ele adquire os parasitas pela ingestão de sangue contaminado, tornando-se assim um inseto transmissor. Além da transmissão vetorial, que representa de 80 a 90% dos casos, há, ainda, a transmissão via transfusão de sangue, 8% a 18% dos casos. A transmissão via transfusão sanguínea tem uma grande importância na urbanização da doença e constitui um grande risco, caso não seja feito um controle adequado dos bancos de sangue. Outras formas de contágio são a transmissão congênita (0,05% a 2%) e ingestão de alimentos contaminados. A transmissão congênita se

concretiza pela presença de ninhos do parasito alojados na placenta. A contaminação oral, ou pela ingestão de alimentos ocorre de forma acidental e em volume muito reduzido. A moléstia pode ainda ser transmitida através de relações sexuais, do leite materno, transmissão acidental e através de transplante de órgãos (FERNANDES, 2005).

A doença de Chagas manifesta-se clinicamente em duas fases: Aguda e crônica: Na fase Aguda, onde a parasitemia é intensa, podem ser observados os seguintes sintomas: sinais de porta de entrada (na pele – chagoma, nos olhos – sinal de Romanã), febre, edema, linfadenomegalia, hepato-esplenomegalia, meningoencefalite, comprometimento do miocárdio. Na fase crônica, onde a parasitemia é baixa, não existe síndrome clínica predominante. Entretanto, podem ser observados casos de cardiomegalia, comprometimento do sistema digestivo, formação de granulomas cerebrais, etc. Nessa fase, pode ocorrer ainda a morte súbita do paciente por danos cardíacos, nervosos ou cerebrais (<http://www.ipecc.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html>)

Até o presente momento, existem tratamentos para a doença de Chagas, entretanto esta ainda não possui cura. A assistência oferecida aos doentes consiste na administração de medicamentos como benzonidazol e Nifurtimox (Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol 38, suplemento III. 2005).

3.4- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Os protozoários apresentam, durante seu ciclo de vida, diversas formas objetivando com isso a sua adaptação ao ambiente em que se encontram como, por exemplo, em relação à disponibilidade de alimento, variações de temperatura e pH. O ciclo biológico da *T. cruzi* inicia-se quando o hospedeiro invertebrado alimenta-se do sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Durante a alimentação, o tripomastigota presente no sangue do vertebrado é sugado pelo inseto vetor. No estômago, o tripomastigota transforma-se em epimastigota. Os parasitas ingeridos se multiplicam, por fissão binária, na luz intestinal do inseto como formas flageladas epimastigotas, e quando se encontram no intestino posterior, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas nas fezes e urina, estando hábeis para infectar outros vertebrados. No sangue do vertebrado, o tripomastigota pode invadir células e transformar-se em amastigota, que pode ou multiplicar-se por fissão binária originando outros amastigotas, ou diferenciar-se em

tripomastigota novamente, voltando para o sangue e reiniciando o ciclo. (DE SOUZA, 2002).

Nos hospedeiros vertebrados são encontradas intracelularmente as formas amastigotas e, extracelularmente, as formas tripomastigotas. No hospedeiro invertebrado é encontrada a forma epimastigota, presente na porção anterior do intestino. As três formas são morfologicamente distintas pela própria forma e pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e à inserção do flagelo.(NEVES, 2005).

As formas tripomastigotas metacíclicas apresentam o núcleo na porção posterior do protozoário, têm seu cinetoplasto na parte posterior do parasita em relação ao flagelo. Possuem um flagelo livre, cuja característica principal é a presença de uma membrana ondulante que se projeta do corpo do *Trypanosoma* até o fim da cauda deste. O tamanho desta forma é de aproximadamente 0,20mm de comprimento e 3µm de espessura. (NEVES, 2005).

As formas epimastigotas sofrem modificações para sobreviverem no intestino do inseto, em condições de estresse quanto à disponibilidade de alimento, de temperatura e pH. Eles têm seu cinetoplasto na região entre o núcleo e a base do flagelo. O flagelo é livre e apresenta membrana ondulante. Os epimastigotas têm de 10 a 20 µm.(NEVES, 2005)

As formas amastigotas são encontradas intracelularmente. Elas são arredondadas ou ovais, o cinetoplasto é encontrado próximo ao núcleo e o flagelo é reduzido ou ausente. O tamanho desta forma varia de 1,5 a 5 µm. (NEVES, 2005)

A contaminação do homem pelo protozoário ocorre no momento da picada do inseto infectado, que defeca próximo ao local da picada, por onde os parasitas presentes nas fezes invadirão o corpo, passando por diversas formas evolutivas (figura 2).

Doença de Chagas: Ciclo de Vida do *Trypanossoma cruzi*

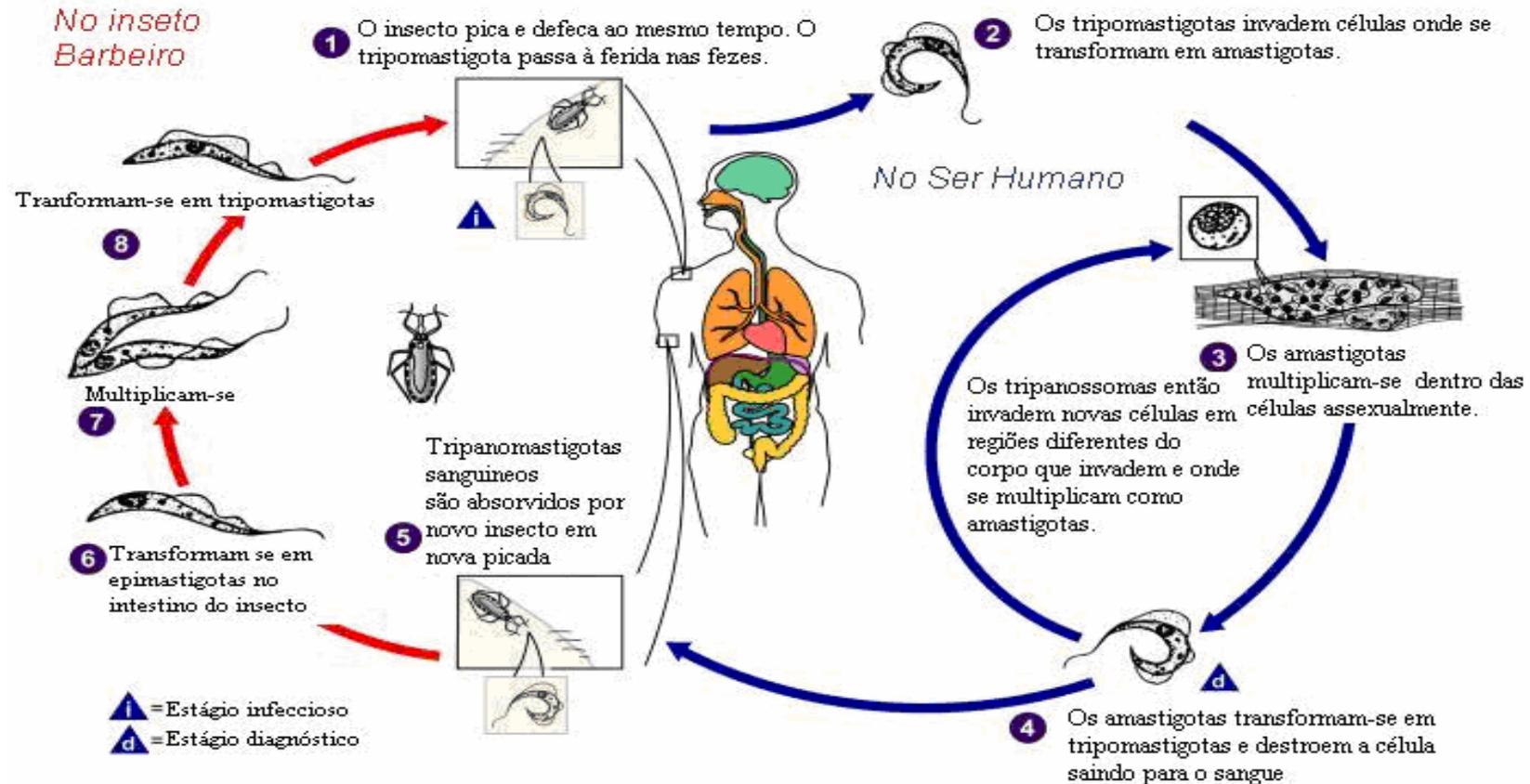


Figura 2: ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (www.wikipedia.org.br). No ciclo biológico da doença, o inseto se infecta ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. No estômago do inseto, os tripomastigotas se transformam em epimastigotas. No reto, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (infectantes para os vertebrados), sendo eliminados nas fezes ou urina. Na mucosa do vertebrado, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Eventualmente, amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, que caem na corrente sanguínea podem invadir outras células, podem ser atacados pelos macrófagos, ou serem chupados pelo inseto triatomíneo, reiniciando o ciclo. (NEVES, 1995) (http://www.arikah.net/)

3.5 - Mecanismos de expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*

Embora classificado como eucariotos, os tripanosomatídeos apresentam características biológicas excepcionais que os tornam interessantes objetos de estudo, destacando-se os seguintes pontos: presença de uma mitocôndria única (DE SOUZA, 2003); não condensamento dos cromossomos durante a divisão celular; regulação pós transcricional da expressão gênica; transcrição contínua e policistrônica, que origina RNAs primários em que estão contidos vários genes não necessariamente relacionados (BRENNER, 2000).

Os parasitas da família dos tripanosomatídeos possuem um mecanismo peculiar e ainda não muito elucidado sobre a regulação da expressão gênica. Outra particularidade que os diferem dos outros eucariotos é a transcrição policistrônica que origina RNAs primários, incluindo vários genes em uma única molécula precursora (DELANGE, 1984). Os RNAs primários, também chamados de RNAs imaturos ou pré-RNAs, são maturados no citosol através de um mecanismo denominado *trans-splicing* e adição da cauda poli A (figura 3). A maturação destes transcritos se dá pela adição em 5' de uma seqüência conservada de 30-40 nucleotídeos chamada de seqüência líder (SL), e por poliadenilação na porção 3' de cada gene, gerando assim os mRNAs monocistrônicos maduros (DOSSIM, 2005). A SL está presente em todos os mRNAs do *Trypanosoma* e, embora não se saiba a função exata dessa seqüência, acredita-se que ela esteja relacionada com a estabilidade do mensageiro, impedindo a sua degradação e auxiliando também a interação desses com os ribossomos (BRENNER, 2000).

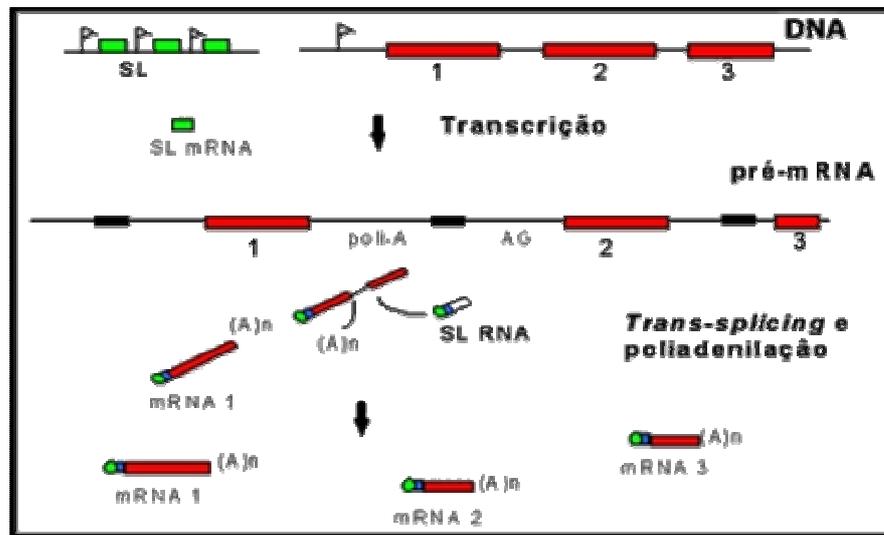


Figura 3: Mecanismo de *trans splicing* em um pré-RNA policistrônico. Após a transcrição, a sequência líder (SL) é adicionada na porção 5' de cada mRNA. Na porção 3' adiciona-se uma cauda poli A (A)_n, produzindo RNAs monocistrônicos maduros (<http://www.fiocruz.br/>).

O processo transcricional também se distingue nos tripanosomatídeos, pois presume-se que a maioria dos genes são transcritos constantemente. Ao contrário da maioria dos procariotos, onde os genes com funções relacionadas agrupam-se em unidades de transcrição policistrônica facilitando a co-regulação, em tripanosomatídeos, as unidades policistrônicas contêm genes com funções aparentemente não relacionadas. Levanta-se então a hipótese de que a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos se dá, ao contrário da maioria dos eucariotos superiores, basicamente a nível pós transcricional. (DÍAZ, 2005).

3.6-Proteínas Zinc Fingers e TcZFP5

O controle da diferenciação celular em *T. cruzi* sempre foi alvo de muita atenção, uma vez que seu pleno entendimento pode contribuir para o controle da doença e de sua transmissão. Além disso, o estudo da reprogramação gênica a que estes organismos são submetidos durante o processo de diferenciação pode prover importantes informações a respeito do entendimento desses eventos. Os tripanosomatídeos utilizam-se quase que exclusivamente de mecanismos pós transcricionais diversos para regular a expressão gênica, sendo um deles a alteração da meia vida dos RNAs mensageiros através do reconhecimento destes por proteínas contendo motivos de ligação à RNA. Essas

moléculas apresentam grande potencial para atuarem no controle da expressão gênica (HENDRICKS, 2005), e podem ser um dos principais responsáveis pelo controle da estabilidade e tradução dos mensageiros (DOSSIM, 2005). Desta forma, os transcritos são degradados seletivamente ou sua vida média é estabilizada nos diferentes estágios do parasita (FURGER, 1997).

As metaloproteínas dedo de zinco estão entre as mais abundantes no genoma eucariótico. Suas funções são diversas e incluem: reconhecimento de DNA, ligação à RNA, ativação transcricional, regulação da apoptose, dobramento protéico, interação proteína-proteína entre outras (LAITY, 2001). Essas proteínas têm como característica um motivo estrutural composto por quatro resíduos de aminoácidos (cisteína ou histidina) dispostos coordenadamente por meio de ligação covalente a um íon zinco.

As proteínas com motivos do tipo dedo de zinco são uma classe de proteínas regulatórias que podem participar de diversas atividades celulares. Tais proteínas, comuns em eucariotos, foram primeiramente identificadas no fator de transcrição IIIA do anfíbio *Xenopus laevis* (MILLER, 1985). Essa família apresenta diferentes motivos que, por sua vez, desempenham funções diferentes dentro da célula, inicialmente atribuídas apenas ao DNA. A partir dos anos 80, mostrou-se que as proteínas *zinc finger*, além de reconhecerem DNA, podiam também reconhecer RNA e outras proteínas. Os principais motivos descritos são os seguintes: **CCHH**, primeiro a ser descrito em *Xenopus*, é um fator de transcrição, que se liga ao DNA; **CCCC** promove interação com DNA; **CCHC** interage com RNA e outras proteínas. (García, 2006).

Com o seqüenciamento dos genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, foi identificado um grande número de genes codificadores de proteínas contendo motivos dedos de zinco CCCH. Essas proteínas foram caracterizadas como participantes do controle da homeostase celular e da diferenciação em vários organismos, graças à sua capacidade de ligação a seqüências presentes nos mRNAs, afetando com isso a sua estabilidade, transporte ou tradução. Em *T. cruzi*, foram identificados cerca de 80 genes que codificam potencialmente 39 proteínas CCCH distintas e a maioria destes apresentam ortólogos em *T. brucei* e *Leishmania* spp, corroborando com o papel dessas proteínas na modulação da expressão gênica em tripanosomatídeos.

O motivo CCCH é constituído por três cisteínas e uma histidina (figura 4), e não está entre os motivos mais estudados das *zinc fingers*. A seqüência dos quatro resíduos é constante , apresentando-se da seguinte maneira: $CX_8CX_5CX_3H$, onde o x representa aminoácidos variáveis (LAI, 2000).

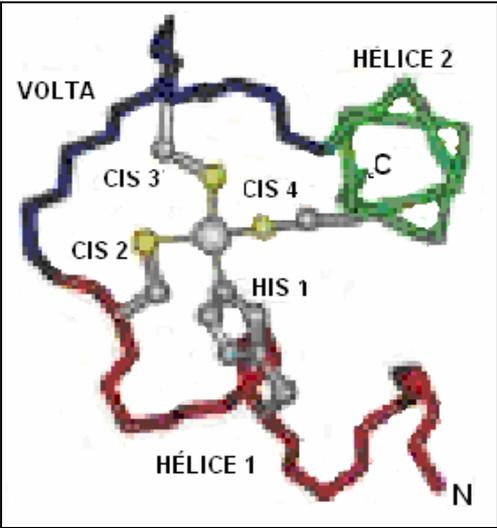


Figura 4: Estrutura tridimensional de uma proteína *zinc finger* CCCH, dobrada na sua forma característica, tendo ao centro um íon Zinco ligado aos resíduos de cisteína e histidina devidamente espaçados. (adaptado de www.eurekah.com)

4 – OBJETIVOS

4.1- *Objetivo Geral*

Tendo em vista o papel regulatório desempenhado pelas proteínas dedo de zinco motivo CCCH, bem como a descoberta da TcZFP5 em frações polisomais, o objetivo geral desta monografia é verificar a ocorrência ou não da associação dessas proteínas ao complexo polisomal.

4.2- *Objetivo Específico*

A partir de moléculas de DNA de *Trypanosoma cruzi*, pretende-se amplificar o gene codificante da proteína TcZFP5 por técnica de PCR. Por meio de ferramentas da biologia molecular, obter a expressão da mesma em clones bacterianos e, pela inoculação em camundongos, obter anticorpos policlonais contra a proteína, que serão utilizados em ensaios imunológicos de *Western blot* para análise do perfil de expressão da TcZFP5 durante a metacicloênese, e em ensaios de imunofluorescência para localização intracelular desta no parasita.

5- MATERIAS E MÉTODOS

5.1- Microorganismos:

Escherichia coli, cepas: TOP 10 F', M 15

Trypanosoma cruzi, cepa Dm28c

5.2- Plasmídeos

pQE30 (QUIAGEN)

5.3 -Marcadores de peso molecular

1Kb Plus (INVITROGEN): Solução comercial diluída 50ng/μl em TE pH 7,5, 1/10 do volume Ficoll 10X

Benchmarker (INVITROGEN)

5.4- Meio de cultura

Meio LB (Luria-Bertani): Bacto-triptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 5g/l

Meio LB/Amp: LB acrescido de ampicilina 100μg/ml

Meio LB/AMP/CANA: LB acrescido de ampicilina 100μg/ml e canamicina 10μg/ml

Meio Lit (*liver infusion Tryptose*): Infuso de fígado (Difco) 0,5%, NaCl 75,3mM, KCl 5,4mM, Glicose monohidratada 10mM, Bacto-triptose 0,5%, Fosfato bibásico 56,4%, Hemina 0,0025%, Soro fetal bovino 10%

5.5- Soluções:

Acetato de sódio 3M pH 7,0: Acetato de sódio 3x H₂O 3M, ajustar pH com ácido acético glacial

Acrilamida 33 / 0,9% para gel SDS-PAGE: 33%acrilamida, 0.9% bisacrilamida, 0,5-1% Amberlit MB-1

APS: Persulfato de amônio 10%

Azul de comassie: Azul de comassie R-250 0,1%, Metanol 45%, ácido acético 10%, H₂O 45%

BCIP: 50mg/ml *5-bromo-4chloro-3-indolylphosphate*

Brometo de etídio: Concentração final: 0,5µg/mL

DEPc (ácido dietil éster pirocarbônico): Diluição 1:1000

EDTA (*Ethylene diamine tetraacetic acid dissodium*): Na₂EDTAx2H₂O 0,5M

Fenol/clorofórmio: 24 volumes de fenol saturado com tris base 100mM, 24 volumes de clorofórmio e um volume de álcool isoamílico

Gel poliacrilamida 13% (1 gel, espaçador 1,5mm), volume final:10ml: Acrilamida 33% bisacrilamida 0,9% 3,8ml, Tris HCl 2,5M pH8,8 1,6ml, H₂O 4,6ml, SDS 10% 100µl, APS 10% 70µl, TEMED 7µl.

NBT: 50mg/ml *nitroblue tetrazolium*

PBS 1X: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ x 7H₂O 4,3mM, KH₂PO₄ 1,5mM

PBS Tween: PBS acrescido de Tween 20 em concentração de 0,005% para *western blot* fosfatase ou 0,1% para *western blot* peroxidase

PMSF: *Phenylmethyl-sulfomhyl fluoride*, 100mM

Ponceau S: Ponceau S (sigma P-3504) 0,5%, Ácido acético glacial 1%

SDS: Dodecil sulfato de sódio ,10%

Solução I (miniprep de plasmídeo): TrisHCl pH 8,0 25mM, EDTA pH 8,0 10mM

Solução II (miniprep de plasmídeo): NaOH 0,2M, SDS 1%

Solução III (miniprep de plasmídeo): Acetato de potássio 3M, Ácido acético glacial 5M

Solução de descoloração de géis corados com azul de comassie: Metanol 4%, ácido acético 7,5%, H₂O 88,5%

Solução de prata (v=50ml): H₂O 48ml, NaOH 1M 1ml, NH₄OH 0,75ml, AgNO₃ 250mg

Solução de revelação da prata: Ácido cítrico 5% 50ul, formaldeído 75µl

Solução de terminação de revelação da prata: Ácido acético glacial 5%, etanol 20%

Stacking para gel de poliacrilamida (1 gel, espaçador 1,5mm), volume final:5ml: Acrilamida 33% bisacrilamida 0,9% 0,7ml, Tris HCl 1M pH6,8 0,6ml, H₂O 3,7mL, SDS 10% 50µl, APS 10% 35µl, TEMED 7µl.

Tampão de electroforese para géis de agarose (TBE) pH 8,3 (1x): Tris base 89mM, Ácido bórico 89mM, EDTA 2mM

Tampão de electroforese para SDS-PAGE pH8,3: Tris-base 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%

Tampão de fosfatase alcalina (*AP-BUFFER* 1X): Tris-HCl pH 9,5 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM

Tampão de lise para sonicação: NaCl 500mM, Tris HCl 50mM, PMSF 1mM

Tampão de lise para *toothpick* (1x): NaOH 50mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5mM, azul de bromofenol

Tampão de amostra para géis de agarose (*Ficoll* 1x): Ficoll tipo 400 25%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25% (dissolver em TBE)

Tampão de amostra para proteínas 1X: Tris-HCl 1M pH 6,8 40mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol (14,7M) 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%

Tampão de bloqueio (1x): Tris HCl pH8,0 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%, leite desnatado em pó 5%

Tampão de eluição de proteína em resina: (Wash): TrisHCl pH 8,0 50mM, NaCl 500mM, Imidazol 50mM, PMSF 1mM. (Elution): TrisHCl pH 8,0 50mM, NaCl 500mM, Imidazol 500mM, PMSF 1mM

Tampão enzima *Eco* RI (biolabs): TrisHCl 50mM pH8,0, MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM

Tampão enzima *Hind* III (Amershan): TrisHCl 50mM pH 8,0, MgCl₂ 10mM, NaCl 50mM

Tampão enzima *Bam* HI (biolabs): NaCl 50mM, TrisHCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, pH 7,9

Tampão enzima *Taq* DNA polimerase (invitrogen): NaCl 100mM, TrisHCl 50mM, MgCl₂ 10mM, pH 7,9

Tampão enzima T4 DNA ligase (invitrogen): TrisHCl 50mM pH 7,6, MgCl₂ 10mM, ATP 5mM, DTT 5mM, polietilenoglicol 8000 25% (p/v)

Tampão de transferência de proteínas separadas em SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose (1x): Tris base 25mM, glicina 192mM, metanol 20%

TE (1x): TrisHCl pH 7,4 10mM, EDTA pH 8,0 1mM

TrisHCl pH6,7 1M (1x): Tris base 1M, ajustar pH com HCl concentrado

TrisHCl pH 8,8 2,5M (1x): Tris base 2,5M, ajustar pH com HCl concentrado

Soluções para gradiente polisomal:

Lavagem (para tratar com cicloheximida e EDTA): KCl 300mM, MgCl₂ 10mM, TrisHCl 10mM pH 7,4

Lavagem (para tratar com puromicina): KCl 500mM, MgCl₂ 2mM, TrisHCl 10mM pH 7,4

Inibidores (para tratar com cicloheximida e EDTA): KCl 300mM, MgCl₂ 10mM, TrisHCl 10mM pH 7,4, E-64 10μM, PMSF 1mM, heparina 100μg/ml, tampão de lise 1x.

Inibidores (para tratar com puromicina): KCl 500mM, MgCl₂ 2mM, TrisHCl 10mM pH 7,4, E-64 10μM, PMSF 1mM, heparina 100μg/ml, puromicina 100μg/ml, tampão de lise 1x.

Sacarose 10% (para tratar com cicloheximida e EDTA): sacarose 10%, TrisHCl 10mM pH7,5, KCl 300mM, MgCl₂ 10mM, E-64 1mM, PMSF 100mM, heparina 100μg/ml, água DEPC qsp.

Sacarose 10% (para tratar com puromicina): sacarose 10%, TrisHCl 10mM pH7,5, KCl 500mM, MgCl₂ 2mM, E-64 1mM, PMSF 100mM, heparina 100μg/ml, água DEPC qsp.

Sacarose 50% (para tratar com cicloheximida e EDTA): sacarose 50%, TrisHCl 10mM pH7,5, KCl 300mM, MgCl₂ 10mM, E-64 1mM, PMSF 100mM, heparina 100μg/ml, água DEPC qsp.

Sacarose 50% (para tratar com puromicina): sacarose 50%, TrisHCl 10mM pH7,5, KCl 500mM, MgCl₂ 2mM, E-64 1mM, PMSF 100mM, heparina 100μg/ml, água DEPC qsp.

Sacarose 60% : sacarose 60%, TrisHCl 10mM pH7,5, KCl 300mM, MgCl₂ 10mM, água DEPC qsp.

5.6 – Extração de DNA cromossomal e episomal de *T.cruzi* (E. Medina-Acosta, G. Cross, MBP, 59: (1993) 327-330)

1,5 ml de células (1×10^7 até 1×10^8 /ml) foram centrifugadas em tubo eppendorf por 10 minutos a 3000-4000 rpm. Ressuspendemos o pellet em 150μl de tampão TELT invertendo o tubo 3 vezes ou até que todas as células estivessem bem ressuspensas (não vortexa), e incubamos por 5 minutos. Após isso, adicionamos 150μl de fenol/clorofórmio e

agitamos o tubo suavemente por 5 minutos. Centrifugamos a 13000 rpm por 5 minutos. Coletamos o sobrenadante e colocamos em um novo tubo eppendorf. Adicionamos 300 µl de etanol absoluto, misturamos por 15 segundos e incubamos por 5 minutos. Centrifugamos por 10 minutos a 13000 rpm. Descartamos o sobrenadante e lavamos o sedimento com 1ml de etanol absoluto por 10 segundos. Centrifugamos por 5 minutos a 13000 rpm. Retiramos todo o sobrenadante e deixamos secar o pellet. Ressuspendemos o pellet em 100 µl de TE contendo 20µg/ml de RNase A.

O rendimento foi em torno de 20-50 ng de DNA, pois esse valor depende diretamente do estágio do parasita, maior para epimastigota e menor para tripomastigotas.

5.7 - Amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene da TcZFP 5

Um estudo baseado em análises de proteômica utilizando frações polisomais de *T. cruzi* revelou a presença de um dos membros da família dedo de zinco CCCH, denominado TcZFP5 nos mesmos.

A partir da seqüência de nucleotídeos obtida (*data not shown*), realizamos a amplificação desta por meio da técnica de PCR, utilizando DNA genômico de *T. cruzi* como molde para a reação. Desenhamos oligoiniciadores (*primers*) para a região 5' e 3', de modo que o *primer F* recebeu sitio para a enzima de restrição *Eco* RI (sítio GAATTC) e o *primer R* recebeu sítio para a enzima de restrição *Hind* III (sítio AAGCTT), tendo, cada um, as seguintes seqüências, em sentido 5'-3':

CCCGAATTCAAATGAGCGGTGTAAGAGGAGGTTGG (*primer F*)

AAAAAGCTTCTACCCGCCGTTGGCAGGTCCGTG (*primer R*)

Realizamos a amplificação do fragmento a partir do DNA genômico de *T. cruzi* (100 ng) em máquina Gene AMP PCR system 9700, seguindo os seguintes ciclos de temperatura: 94°C (3'), 94°C (30") para desnaturaçã o da fita dupla do DNA, 55°C (30") para o anelamento dos *primers* em seus sítios, 72°C (45") para a extensão do gene. Os passos 2, 3 e 4 são repetidos em ciclos 35 vezes.

5.8 - Purificação e digestão do fragmento gênico

O produto de PCR foi purificado utilizando o *Kit High Pure PCR (Roche Molecular Biochemicals)*, seguindo recomendações do fabricante.

Digerimos o produto de PCR purificado e o vetor pQE 30 com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III seguindo recomendações dos fabricantes.

O plasmídeo pQE30 (Qiagen) utilizado como vetor de clonagem apresenta sítios para as enzimas de restrição utilizadas (*Eco* RI e *Hind* III). Ele confere resistência à ampicilina e possui o sistema repressor Operon LAC. Neste plasmídeo, foi inserida previamente a seqüência gênica codificante da proteína verde fosforescente (GFP) de *Aequoria victoria* anterior ao sítio múltiplo de clonagem, formando quimera com a proteína de interesse.

A purificação do produto de PCR digerido foi feita *in house*, seguindo os passos descritos a seguir: Acrescentar 1 volume de fenol/clorofórmio; Vortexar e centrifugar por 2 minutos à velocidade máxima; Transferir a fase aquosa (superior) para outro eppendorf; Acrescentar 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 6,0; Misturar por inversão; Acrescentar 2 volumes de etanol absoluto; Misturar por inversão; Deixar o eppendorf overnight a -20°C ou por 1h a -70°C; Centrifugar por 10 minutos à velocidade máxima; Descartar o sobrenadante (deve-se observar a formação de um precipitado esbranquiçado); Acrescentar 1ml de etanol 70%; Centrifugar por 2 minutos; Descartar o sobrenadante; Secar o pellet e ressuspendê-lo em TE ou H₂O ultra pura.

5.9 - Ligação

Realizamos a ligação de dez nanogramas do fragmento purificado (quantificado por espectrofotômetro) e 100 ng do vetor pQE30 (Qiagen[®]) digerido, seguindo proporção de 3 fragmentos para cada vetor, em um volume final de reação de 10 µL contendo 2 µL de tampão da ligase 5X e 1 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen[®]). A reação foi incubada a 16 °C por 16 a 18 horas e utilizada para transformar *E.coli*, cepa *top 10f'*, quimicamente competente, segundo protocolo padrão (NOZAKI *et al*, 1995).

5.10- Preparo de célula competente

As células são preparadas para tornarem-se competentes a partir de bactérias já competentes previamente existentes e congeladas no laboratório. Para o preparo do estoque de células competentes deve-se descongelar bactérias competentes e pré-inocular 100ul dessas em 2ml de meio LB, deixando crescer por 3 horas. Plaquear a

cultura (20µl) em placa de petri contendo meio LB tet (12,5ng/ml) e incubar a placa por 16h a 37°C. Após isso, deve-se selecionar uma colônia isolada e pré-inocular em 3ml de meio LB tet, crescendo a cultura por 16h a 37°C. Inocular 2ml de cultura em 200ml de meio LB a 37°C até que a D.O. atinja aproximadamente 0,4 (a 600nm). Transferir a cultura para tubos de centrifuga previamente resfriados e centrifugar. O sobrenadante deve ser retirado e o pellet ressuspendido em 10ml de CaCl₂ 100mM / hepes, estéril, previamente resfriada. Acrescentar 90mL de solução CaCl₂ 100mM / hepes, estéril, previamente resfriada e deixar as células ressuspensas por 40 minutos em gelo. Centrifugar as células por 10 minutos à velocidade de 5000rpm. Enquanto isso, identificar 40 eppendorfs com o nome da célula preparada. Retirar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 3,7 ml de solução CaCl₂ 100mM / glicerol 15% / hepes, estéril, previamente resfriada. Aliquotar 100µl em cada eppendorf. Armazenar as células competentes a -70°C.

5.11- Obtenção de clones

Bactérias *E.coli* top 10⁸ CaCl₂ competentes foram transformadas pela técnica de choque térmico do seguinte modo: As células competentes (100 µL) foram misturadas com a reação de ligação e incubadas no gelo por meia hora. Após esse tempo, foram transferidas para banho-maria a 42 °C por dois minutos, para a introdução do DNA na célula. Após o choque térmico as células foram incubadas no gelo por dois minutos e acrescentou-se 1 mL de meio LB. A cultura foi então incubada a 37 °C sob agitação leve por uma hora e então espalhada em meio LB/ Amp/ Ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas para o aparecimento das colônias.

Colônias isoladas crescidas nessas placas foram plaqueadas novamente em *master plate* para isolamento e identificação numérica dos clones.

Por meio da técnica de palitagem (*tooth pick*), analisamos as colônias crescidas na *master plate* em gel de agarose, observando a migração dos plasmídeos de cada colônia. A técnica de palitagem consiste na análise rápida de fragmentos de DNA clonados em plasmídeo, transferindo parte de uma colônia crescida na placa com o auxílio de um palito de dente estéril para um eppendorf, incubando-o a 65°C com 15µl de tampão de lise (NaOH 50mM, SDS 0,5%, EDTA 5mM, Glicerol 5%, azul de bromofenol), aplicados em gel de agarose, A característica dos possíveis clones positivos é a migração diferenciada em

relação ao plasmídeo não digerido, ou seja, mais lenta, devido a presença do inserto. Dentre os prováveis clones positivos, escolhemos 5 colônias (colônias número 23, 33, 36, 40 e 43) para comprovar a clonagem.

Para ratificar a presença do inserto nos clones eleitos, repetimos as condições de PCR do início do experimento, não mais a partir do DNA genômico, mas sim utilizando os plasmídeos transformados como DNA molde da reação. Os plasmídeos foram obtidos por minipreparação (extração de plasmídeo de bactérias) utilizando kit Qiagen.

5.12- Expressão do gene *TcZFP5* em *E. coli*

Determinados os clones positivos, elegemos o de número 23 para a expressão da proteína. A partir da miniprep do clone número 23, bactérias *E. coli* M15 CaCl₂ competentes foram transformadas, pré-inoculadas e induzidas à expressão gênica da proteína por 1 mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*, um reagente mimético da allolactose, um metabólito da lactose que regula a transcrição do sistema operon lac). Cinco a 10 µL das amostras foram analisados por eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida 15% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) a 25 mA. O gel foi corado com solução de coomassie blue R250 (Sigma[®]) e descorado com solução contendo metanol 4% e ácido acético 7,5% a 65 °C.

A bactéria *E.coli* M15 CaCl₂ competente foi então usada para a indução de grande volume de cultura, pois visávamos obter quantidade de proteína, suficiente para inoculação em camundongos. Esta cepa contém o plasmídeo pRep4 que apresenta a seqüência gênica codificante do repressor do operon *Lac* denominado LAC I, que impede a expressão constitutiva do gene inserido no vetor pQE30.

Noventa e oito mililitros de cultura de bactérias foram induzidos com 1mM de IPTG por 3 horas a 28°C. Destes, 20 ml foram utilizados para teste de solubilidade e o restante foi centrifugado em dois eppendorfes, ressuspendido em tampão (Tris HCl pH 8,0 50mM, NaCl 500mM, TRITON 2%) e sonicadas com 4 pulsos de 15 segundos cada, em potência 4. Devido à característica insolúvel da proteína, não foi possível purificá-la através da coluna de níquel. Então, utilizamos a técnica do gel preparativo para obter a proteína purificada. O gel foi submetido à corrente elétrica de 20V por 16 horas.

Após a corrida eletroforética, a proteína foi dializada em solução de PBS 1X utilizando um saco de diálise. A proteína dialisada foi estocada em tubos do tipo *eppendorf*.

5.13 - Obtenção de anticorpos anti ZFP em camundongos

Para a obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína TcZFP5, três camundongos fêmeas da linhagem *Balb C*, previamente testados quanto à negatividade de resposta imune contra extratos protéicos de *T.cruzi*, foram inoculados intraperitonealmente, em seis aplicações de aproximadamente 100 µg de TcZFP5 recombinante em intervalos de quinze dias. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação, e incompleto nas demais aplicações. Com os anticorpos, foram realizados ensaios do tipo *Western Blot* conforme descrito por Towbin *et al.*, (1979). Extratos protéicos de diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reagidas com o antisoro anti-TcZFP5.

5.14 - Análise do perfil expressão da proteína durante a metaciclogênese de *T. cruzi*

Seguindo a técnica de *Western blot*, utilizamos como anticorpo primário o soro do camundongo anti TcZFP5 (título 1:500) contra extratos de *T. cruzi* em quatro estágios da metaciclogênese (epimastigota, stress, aderido 24 horas e tripomastigota metacíclica). O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse (título 1:10.000) (Sigma[®]), revelado por método de fosfatase alcalina, conforme recomendação do fabricante.

5.15 - Fracionamento da TcZFP5 em gradiente de sacarose

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT a 28°C (1×10^7 células/ml) são centrifugadas a 6.000g, por 10 minutos a 4°C e lisadas em tampão de lise. O lisado foi centrifugado a 18.000g e o sobrenadante foi coletado e aplicado sobre um gradiente linear de sacarose de 10 % a 40 %. O gradiente foi submetido à ultra-centrifugação a 230.000g por 2 horas. Frações do gradiente foram coletadas e a absorbância de cada uma delas foi medida em 254 nm. Alíquotas de cada fração foram analisadas por *Western blot* usando o

antisoro anti-TcZFP5. Extratos citoplasmáticos de epimastigotas foram incubados na presença de puromicina 2 mM e posteriormente analisados por fracionamento em gradiente de sacarose de 15% a 55%. Frações foram coletadas como descrito acima e analisadas para a presença da proteína TcZFP5 usando o antisoro anti-TcZFP5.

Utilizamos gradientes polisomais não tratados e tratados com puromicina (que desmobiliza o complexo polisomal), incubados com anticorpo primário anti ZFP5 (título 1:250) e secundário anti mouse peroxidase (título 1:10.000) para demonstrar a associação da ZFP5 com o complexo polisomal.

5.16- Demonstração da associação da proteína em estudo com RNAs

Proteínas contendo motivo CCCH na sua estrutura têm sido encontradas em associação com RNA. Para se avaliar a habilidade da TcZFP5 em se ligar a RNA recorreremos a ensaios de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA) com a proteína recombinante e diferentes sondas de RNA. Nesta técnica, um fragmento de DNA ou RNA marcado radioativamente (sonda), contendo uma seqüência específica, é incubado juntamente com a sua proteína de ligação cognata. O complexo sonda-proteína é separado da sonda livre (não ligada) por meio de eletroforese realizada em gel de poliacrilamida não desnaturante. A proteína retarda a mobilidade da sonda quando a mesma se encontra ligada a ela. Então a sonda livre migrará mais rapidamente que aquela complexada. Uma imagem do gel (autoradiograma) é usada para revelar as posições da sonda livre e ligada marcadas radioativamente (KERR, 1995).

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do estudo proteômico das frações polisomais de *T. cruzi*, a proteína dedo de zinco CCCH, denominada TcZFP5, foi encontrada em suposta associação com esse complexo.

A partir dos dados de seqüência disponíveis foram construídos pares de primers para amplificar por PCR a região codificante do gene *TcZFP5*. A amplificação tomou como molde o DNA total do clone Dm28c de *T. cruzi*.

A amplificação do gene correspondente à proteína TcZFP5 foi eficiente e a análise do produto amplificado mostra que *TcZFP5* possui região codificante de 843 nucleotídeos (figura 5).

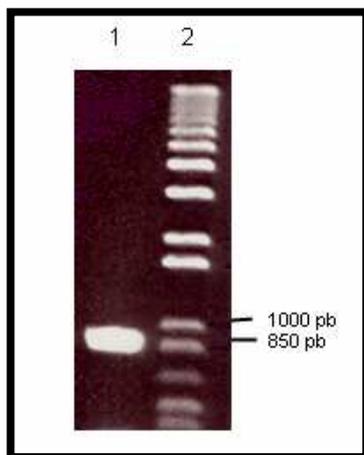


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8%, do produto de PCR do gene *TcZFP5*. 1: produto de PCR *TcZFP5* (1 μ l), 2: marcador de peso molecular 1 Kb plus (5 μ l).

Através da técnica de palitagem (*tooth pick*), selecionamos 5 colônias com possibilidade de se tratarem de clones positivos para a ZFP5. Os clones positivos apresentam migração um pouco mais lenta em relação aos controles negativos, uma vez que esses plasmídeos transformados são maiores, devido à presença do inserto (figura 6).

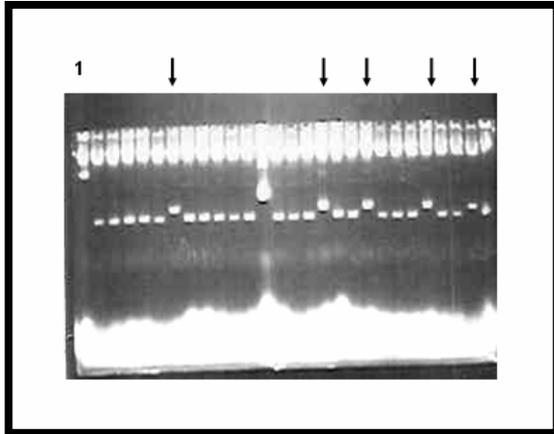


Figura 6: Gel de *tooth pick* em agarose 1%. 1: controle negativo. Os prováveis clones positivos estão indicados pelas setas.

Por meio da técnica de PCR, obtivemos a amplificação do fragmento de tamanho aproximado de 843 pb, correspondente à ZFP5, em todas as possíveis colônias clone positiva. (figura 7).

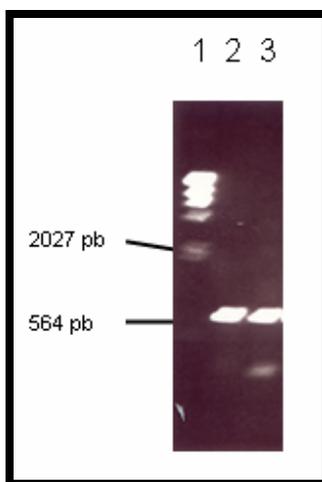


Figura 7: amplificação da seqüência do gene *TcZFP5* por meio de PCR para verificação da positividade do clone bacteriano selecionado, agarose 1%. 1: marcador *lambda Hind* (5µl), 2: PCR do fragmento a partir de DNA genômico (5µl), 3: PCR do fragmento a partir da colônia 23 (5µl).

Utilizamos o plasmídeo de expressão pQE30 (QIAGEN) para expressar TcZFP5 recombinante. Nesse sistema, a proteína recombinante é expressa juntamente com uma cauda de seis resíduos de histidina associada à porção amino-terminal, característica essa que permite sua purificação através da cromatografia de afinidade em resina de níquel-NTA (AUSUBEL *et al.*, 1987). Os resíduos de histidina em pH maior do que 7.0

possuem carga negativa e, desse modo, interagem facilmente com as cargas positivas do íon níquel. A eluição da proteína é feita reduzindo-se o pH da solução, ou por competição com imidazol.

A fim de aumentar sua solubilidade em *E. coli*, a proteína recombinante TcZFP5 foi fusionada à proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). Além da solubilidade, o uso da GFP como proteína carreadora também acarreta aumento na quantidade de produto para purificação e facilita a identificação, por meio da fluorescência, dos clones recombinantes. A metodologia também simplifica a detecção e quantificação da proteína de forma confiável (ZIMMER, 2002).

Antes de decidirmos a estratégia de purificação, fizemos um teste de solubilidade para determinar se a TcZFP5 se encontra solúvel ou localizada em corpos de inclusão. A decisão do método como a proteína recombinante será purificada depende da solubilidade da mesma. Observamos que, em condições pré-estabelecidas de tamponamento e concentração de NaCl, TcZFP5 se encontra totalmente insolúvel, sendo então utilizadas condições desnaturantes para a sua purificação. Na figura 8 é possível notar a presença da banda referente à quimera GFP TcZFP5 recombinante, com massa molecular de aproximadamente 60 KDa no extrato de *E. coli* obtido após indução com IPTG (3) e na amostra proveniente da fração insolúvel (4), observando-se também sua ausência na amostra referente a fração solúvel (5).

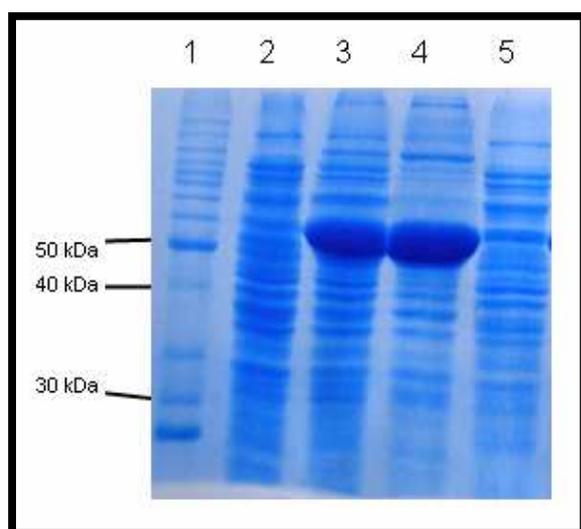


Figura 8: mini gel SDS PAGE 13% corado com comassie blue. Análise de expressão e solubilidade da proteína TcZFP 5 em *E. coli*.

A banda correspondente à proteína expressa apresenta 60 KDa, sendo 31 kDa o peso da proteína TcZFP5, somado com 28 kDa da proteína GFP, 1: marcador *Bench Marker*, 2: expressão protéica da bactéria *E coli* não induzida, 3: expressão protéica da bactéria *E coli* induzida com 1mM de IPTG, 4: fração insolúvel, 5: fração solúvel.

Com o objetivo de confirmar a identidade do polipeptídeo purificado, o anticorpo monoclonal anti-poli-histidina foi usado na técnica de *Western blot*, (figura 9). O peso molecular aparente do polipeptídeo reconhecido pelo anticorpo foi de aproximadamente 60 kDa, que é compatível com aquele obtido pela soma da seqüência de aminoácidos deduzida do gene *TcZFP5* (31 kDa) com a seqüência do gene da GFP (28 kDa)

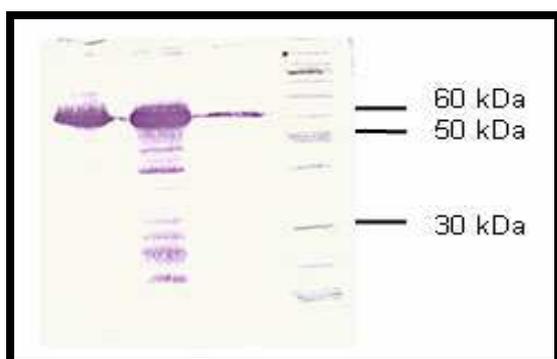


Figura 9: *Western blot* anti histidina. 1: proteína purificada, 2: Extrato de *E.coli* induzida com 1mM de IPTG, 3: Extrato de *E.coli* não induzida, 4: Marcador de peso molecular Bench Marker

Antisoro gerado contra a TcZFP5 recombinante foi usado para a detecção da proteína em extratos celulares de *T. cruzi*. Um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 31 kDa foi detectado por *Western blot* em extratos de epimastigotas, stress, aderido 24horas e tripomastigotas metacíclicos, sugerindo que *TcZFP5* não é um gene estágio-específico e que seu produto parece ser essencial para o parasita durante a metaciclogênese, entretanto, esse resultado ainda necessita ser corroborado (figura 10).

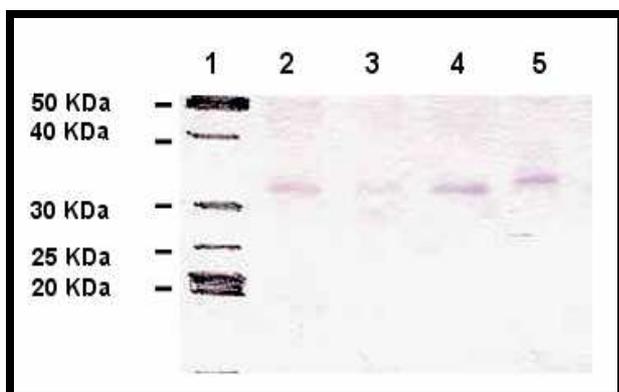


Figura 10: *Western blot* anti TcZFP5 a partir de mini gel SDS PAGE 13% demonstrando a expressão constitutiva da proteína na metaciclogênese. 1: marcador *Bench Marker*, 2: extrato *T cruzi* em estágio epimastigota, 3: extrato de *T cruzi* em stress, 4: extrato de *T cruzi* em estágio aderido 24 horas, 5: extrato de *T cruzi* em estágio tripomastigota metacíclico.

A análise por *Western blot* do anticorpo anti TcZFP5 contra fração polisomal e pós polisomal revelou a presença da proteína associada à um complexo de alto peso molecular. Como a proteína TcZFP5 foi encontrada em associada ao complexo polisomos de *T. cruzi*, decidimos então investigar as possíveis interações da TcZFP5 com as subunidades ribossomais de *T. cruzi*.

O gradiente polissomal foi obtido por fracionamento do lisado celular de *T. cruzi* em gradiente de sacarose e as frações obtidas foram analisadas por *immunoblotting*.

Utilizamos gradientes polisomais sem tratamento e também polisomos tratados com puromicina (que desmobiliza o complexo polisomal), incubados com anticorpo primário anti ZFP5 (título 1:500) para demonstrar a associação da ZFP5 com os polisomos. A TcZFP5 foi detectada na maior parte das frações do gradiente não tratado, (Figura 11), indicando que ela está associada à maquinaria de tradução. O resultado dos testes em gradientes polisomais tratados com puromicina, entretanto, descartaram a possibilidade de associação da ZFP5 com polisomos, pois a puromicina desmobiliza os complexos polisomais, logo, a proteína não estaria mais ligada a eles e seu sinal estaria presente junto às frações mais leves, somente. O resultado obtido mostra a permanência do sinal ao longo do gradiente, inferindo assim que a proteína dedo de zinco está associada a um outro complexo que não os polisomos (figura 12).

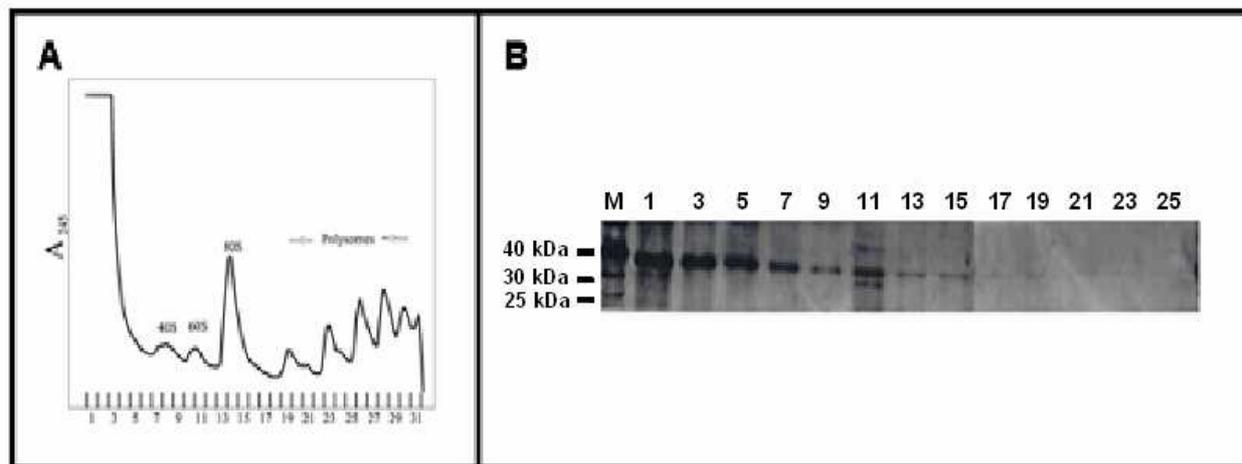


Figura 11: Perfil polisomal de epimastigotas de *T. cruzi*. (A) O lisado de 1×10^9 epimastigotas foi depositado sobre um gradiente linear de sacarose de 10 a 40% e centrifugado a 4° C por 2,5 horas a $230.000 \times g$. (B)

Western blot das frações do gradiente usando antisoros contra TcZFP5 (1:250). **M:** Marcador *Bench Marker*, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25: gradientes polisomais em índice crescente de peso.

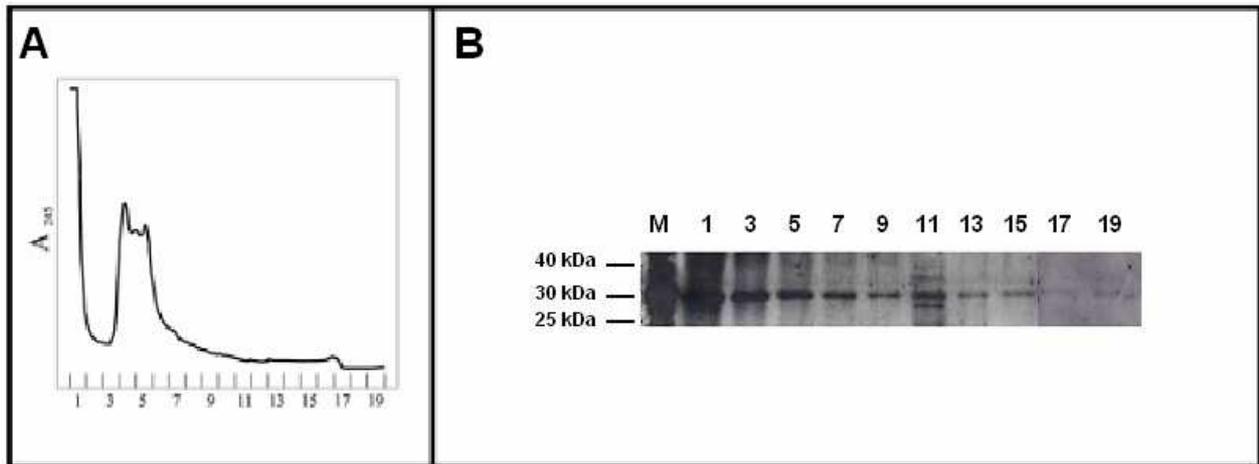


Figura 12: Perfil polisomal de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com puromicina. (A) O lisado de 1×10^9 epimastigotas foi depositado sobre um gradiente linear de sacarose de 15% a 55% e centrifugado a 4°C por 2,5 horas a $230.000 \times g$. (B) *Western blot* das frações do gradiente usando antisoro contra TcZFP5 (1:250). **M:** Marcador *Bench Marker*, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17: gradientes polisomais em índice crescente de peso.

Os resultados mostram que a TcZFP5 está associado a um complexo de alto peso molecular, embora não se saiba ainda qual é esse complexo. Ainda não foi encontrado relato de comportamento semelhante em outras proteínas da mesma família e motivo nesse tipo de organismo. Até o presente momento, existem apenas hipóteses acerca do possível complexo; ainda sem estudos confirmatórios.

7- CONCLUSÃO

O gene *TcZFP5* foi clonado em sistema bacteriano fusionado ao gene da GFP e a proteína se encontra insolúvel nesse sistema. Serão necessárias variações nesta metodologia para a obtenção da proteína nativa para a realização dos ensaios funcionais de associação com RNAs.

A proteína dedo de zinco está presente junto à fração polisomal do *T. cruzi*, mas não está associada a esse complexo. Análises complementares futuras poderão fornecer a identidade destes complexos.

A proteína ZFP5 é expressa constitutivamente durante a metaciclogênese do *T. cruzi*.

8- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons, 1994.

BLACKCHEAR, P.J. **Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover**. *Biochem Soc Trans*. Nov 30(Pt 6), p. 945-52, 2002.

BRENNER, Z.; ANDRADE,Z. & BARRAL-NETO,M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p 159-218, ago. 1909

COUTINHO, J. & DIAS, J.C.P. **A Descoberta da Doença de Chagas** Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v.16, n.2, p.11-51, maio/ago. 1999

COURA, J.R. **Tripanosomose, Doença de Chagas**. *Ciência e Cultura*, v.55, n.1, São Paulo jan./mar. 2003.

DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi***. *Current Pharmaceutical Design*, v.8, n.4, p 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. **Novel Cell Biology of *Trypanosoma cruzi***. *In: American Tripanosomiasis*. *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*. 2003

DIAS, J.C.P. **Atualidade de Carlos Chagas: os 90 Anos do Descobrimto e a Importância Social da Doença de Chagas**. 1998. Disponível em <http://www.prossiga.br/Chagas/>.

DÍAZ, L.P **Caracterización de una nueva proteína de unión al RNA en *Trypanosoma cruzi***. *Pedeciba*, 2005. 96f. Disertación de Maestría en Ciencias Biológicas (Uruguay), UDELAR - Universidad de la República - Facultad de Ciencias.

DELANGE, T, et al.. **Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species.** *Nucleic Acid Res* 12: 4431-4443, 1984

DOSSIM, F.M. **Organização nuclear da RNA polimerase II e da transcrição em *Trypanosoma cruzi*.** São Paulo, 2005. 102f. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo. Microbiologia e Imunologia.

FERNANDES, M.R. **A evolução no conhecimento e o controle da doença de Chagas no Brasil.** Belo Horizonte, 2005. 134 f. Dissertação de mestrado, Universidade federal de Minas Gerais CEDEPLAR.

FURGER, A. et al. **Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation.** *Mol Cell Biol* 17: 4372-4380. 1997

FURLANETO, L. **Transformação genética de T.cruzi mediada por *agrobacterium tumefaciens*.** Curitiba, 2006. 87f. Tese de doutorado. Universidade federal do Paraná. Departamento de biologia celular e molecular.

GARCÍA, C.C. **Las versátiles proteínas zinc fingers.** Química Viva. Número 1, año 5, abril 2006

HENDRIKS, E.; MATTHEW, K.R. **Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein.** *Molecular Microbiology*. v. 57, n. 3, 706–716. 2005

KERR, L. D. (1995). **Electrophoretic mobility shift assay.** *Methods Enzymol.*, 254: 619-632.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, W.S, et al. **Interactions of CCCH Zinc Finger Proteins with mRNA.** *Biol. Chem.*, v. 275, n. 23, 17827-17837, June 2000.

LAITY, J.H; et al. **Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity**, *Current opinion in structural biology*. 11: 39 - 46. 2001

MILLER, J, MCLACHLAN, A.D, KLUG, A. **Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes**. *EMBO J* 4: p. 1609-1614, 1985

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 11^a edição. Editora Atheneu. 2005. São Paulo-SP.

NOZAKI, T., CROSS, G. A. M. **Effects of 3'-untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi***. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 60, p. 273-280, 1995.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. Vol. 38. Suplemento III. 2005

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd Ed., 1989.

Tomas, A. M., Kelly, J. M. **Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1**. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 76, p. 91-103, 1996.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979). **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications**. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* , 76: 4350-4354.

WHO (2002) **World Health Organization** Tech Rep Ser 905, I-VI, 1-109.

ZIMMER, M. **Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior**. *Chem Rev.*, v. 102, p. 759-781, 2002.
http://www.arikah.net/enciclopedia-portuguese/Doen%C3%A7a_de_Chagas
(acesso em 30/10/07)

http://www.arikah.net/commons/en/c/c3/Carre_maladie_Chagas.png (acesso em 29/11/07)

<http://www.eurekah.com/images/chapters/luchi17Wright.jpg> (acesso em 05/12/07)

<http://www.fiocruz.br/chagas/media/santuza%2002.JPG> (acesso em 05/12/07)

<http://www.uta.edu/chagas/images/chagArea.jpg> (acesso em 03/12/07)

<http://www.ipecc.fiocruz.br/pepes/dc/dc.html> (acesso em 20/02/08)