

ALEXANDRE HARUO INOUE

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TcDbp5 COMO
COMPONENTE DA VIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila

**CURITIBA
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA CENTRAL – COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

I64c Inoue, Alexandre Haruo, 1984-
Caracterização funcional de TcDbp5 como componete da via de exportação de mRNA em Trypanosoma cruzi [manuscrito] \ Alexandre Haruo Inoue. – 2011.
xvi, 124 f. : il., color. ; 30 cm.

Impresso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.
“Orientadora: Profª. Drª. Andréa Rodrigues Ávila”.
Bibliografia: f. 107-121.

1. Chagas, Doença de. 2. Tripanossomose. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ávila, Andréa Rodrigues. III. Título.

CDD: 574.191

Bibliotecário: Arthur Leitis Junior - CRB 9/1548

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

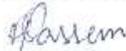
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Andréa Rodrigues Ávila

Orientadora e presidente da banca Instituto Carlos Chagas - ICC



Profa. Dra. Roseli Wassem
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Profa. Dra. Larissa Reifur
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplente,

Profa. Dra. Daniela P Pavoni

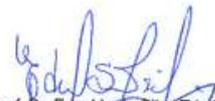
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após argüir o mestrando **Alexandre Haruo Inoue**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização funcional de TcDbp5 como componente da via de exportação de mRNA em *trypanosoma cruzi*" são de parecer favorável à Aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011




Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990 - JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031 -
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

Aos meus pais Moritaka Inoue & Elza Satiko Yassue Inoue,
aos meus irmãos Shindi e Takashi Inoue e
à Belize Keiko Arai.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais e aos meus irmãos pelos momentos de compreensão, carinho, confiança e presença durante toda minha vida.

À orientadora Dra. Andréa Rodrigues Ávila que me acolheu no Instituto Carlos Chagas e depositou em mim a confiança de gerar este trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos e momentos de apoio, amizade, alegria e compreensão.

À Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta pela amizade e confiança ao apresentar o ICC.

À Priscila Mazzochi Hiraiwa e à Mariana Serpeloni por todos os anos de companheirismo e discussão científica e, às vezes, nem tanto. E, principalmente, pelo auxílio nos momentos críticos desse trabalho.

A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica: Dra. Andréa Rodrigues Ávila, Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Bruno Dallagiovana Muniz, Dr. Augusto Savio Peixoto Ramos, Mari S., Pri Hiraiwa, Fernanda, Sharon, Lys, Camila, Fabíola, Arthur, Saloê, Eloise, Mari F., Hálisson, Eliza, Gustavo pela amizade e ambiente colaborativo.

A todos dos laboratórios: Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Laboratório de Biologia Celular, Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Laboratório de Genômica Funcional, Laboratório de Virologia Molecular.

Ao Nilson, Vanessa, Tânia e Silvio pela valiosa organização e manutenção técnica, tornando o instituto um agradável ambiente e facilitando todo trabalho experimental.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina na geração dos anticorpos em camundongo, em especial, à Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, Carline Longhi e Jackson Seiti.

À Dra. Maria Cristina Motta e ao Dr. Maurílio Soares pela colaboração nos ensaios de microscopia.

Ao Dr. João Renato Muniz pela colaboração na geração do modelo molecular.

À Dra. Fabíola B. Holetz, Dra. Gisele Picchi, Ligia Kalb e Flavia Sá Pereira de Souza por gentilmente terem cedido alguns dos anticorpos utilizados nesse trabalho.

Ao Michel Batista e Dr. Wanderson Da Rocha por gentilmente terem cedido os vetores de fusão GFP utilizados neste trabalho.

À Dra. Daniela P. Pavoni pelas correções dos relatórios, que progressivamente ajudaram na compreensão e didática deste trabalho.

A todos os pesquisadores do ICC pelos conhecimentos compartilhados que indubitavelmente fazem do instituto um interessante ambiente técnico-logístico para o aprimoramento e progresso científico, na geração de ciência de excelente qualidade.

*If I have seen a little further it is by
standing on the shoulders of Giants.*

Sir Isaac Newton, matemático inglês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. Expressão de genes codificadores de proteínas em tripanossomatídeos	3
1.3. Exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma em células eucarióticas	5
1.3.1. Complexo do poro nuclear	5
1.3.2. Transporte nucleocitoplasmático	8
1.3.3. Características funcionais de Dbp5	13
2. OBJETIVO	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Busca de proteínas nucleoporinas de <i>T. cruzi</i> por análise comparativa utilizando seqüências caracterizadas em outros tripanossomatídeos	21
3.2. Modelagem molecular por homologia estrutural de TcDbp5	21
3.3. Soluções	22
3.4. Cultivo e manutenção de microrganismos	24
3.4.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.4.2. <i>Escherichia coli</i>	25
3.5. Meios de cultura	25
3.5.1. Meio LB (Luria - Bertani)	25
3.5.2. Meio LIT (<i>Liver Infusion Tryptose</i>)	26
3.5.3. Meio TAU (<i>Triatomine Artificial Urine</i>)	26
3.5.4. Meio TAU 3AAG pH 6,0	26
3.6. Metaclogênese <i>in vitro</i>	27
3.7. Eletroforese	28
3.7.1. Eletroforese de DNA	28
3.7.2. Eletroforese SDS-PAGE	28
3.7.2.1. Coloração por Azul de Coomassie	29
3.7.2.2. Coloração por Nitrato de Prata	29
3.8. Clonagem molecular de seqüências nucleotídicas	30
3.8.1. Extração de DNA genômico de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c	30
3.8.2. Amplificação gênica de TcDbp5, TcCrm1 e Nucleoporinas	30
3.8.3. Clonagem entre inserto e plasmídeo da plataforma <i>Gateway</i> e vetor pTREXGFP	32
3.8.4. Transformação e seleção de clones recombinantes	35
3.8.4.1. Preparo das células competentes	35
3.8.4.2. Transformação de <i>E. coli</i>	36
3.8.4.3. Análise dos plasmídeos recombinantes através da técnica de palitagem (<i>toothpick</i>)	37
3.8.4.4. PCR de colônia	37
3.8.5. Extração de DNA plasmidial	38
3.9. Expressão de proteína recombinante	39
3.10. Purificação de proteína recombinante	39
3.11. Obtenção de anticorpo policlonal em coelho e camundongo	41
3.12. Purificação de antisoro policlonal em coelho	41
3.13. Ensaio do tipo <i>Western blot</i>	42
3.13.1. Revelação por Fosfatase Alcalina	42
3.13.2. Revelação por peroxidase (Quimioluminescência)	43

3.14. Localização celular de proteínas através de microscopia	43
3.14.1. Localização de proteínas por microscopia ótica	43
3.14.2. Transfecção de <i>T. cruzi</i> e localização de TcDbp5 fusionada a GFP	44
3.14.3. Imunocitoquímica ultraestrutural: localização de TcDbp5 por microscopia eletrônica de transmissão ...	45
3.15. Localização de TcDbp5 por fracionamento subcelular	46
3.16. Sedimentação de polissomos através de gradiente de sacarose	47
3.17. Localização de TcDbp5 em <i>T. cruzi</i> tratados com Leptomicina B	48
3.18. Imunoprecipitação	48
3.19. Localização de mRNA através da técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Identificação de nucleoporinas em <i>T. cruzi</i>	51
4.2. Clonagem, expressão, purificação de proteína recombinante e produção de anticorpos anti-TcDbp5, anti-TcCrm1 e anti-Nups	57
4.3. TcDbp5 é uma proteína nuclear e citoplasmática	65
4.4. Localização de nucleoporinas candidatas e exportina TcCrm1 em <i>T. cruzi</i>	75
4.5. Análises <i>in silico</i> de TcDbp5	77
4.6. TcDbp5 está associada a complexos independente de polissomos	80
4.7. TcDbp5 migra entre o núcleo e o citoplasma através da via Crm1 de transporte de proteínas	84
4.8. Análise de interação de TcDbp5 com nucleoporinas e receptores de exportação	85
4.8.1. Padronização do extrato protéico para imunoprecipitação	86
4.8.2. Possíveis parceiros de TcDbp5	87
4.9. Análise de colocalização de mRNA e TcDbp5	89
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÃO	105
7. PERSPECTIVAS	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXO	122
TcDbp5	122
TcCrm1	122
Nucleoporinas	123

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DO mRNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.	4
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPLEXO DO PORO NUCLEAR.....	6
FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NUCLEOPORINAS DO CPN	7
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE PROCESSO DE EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO DE CARGO MEDIADO POR β -CARIOFERINA E RAN LIGADA A GTP	10
FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE VIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNA	12
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA CONSENSO DA SEQÜÊNCIA LINEAR DE PROTEÍNAS DEAD-BOX.....	14
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DE mRNP NA EXPORTAÇÃO DO TRANSCRITO DO NÚCLEO PARA O CITOPLASMA.....	15
FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO SEQÜENCIAL E ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE HELICASE DE Dbp5 NO REMODELAMENTO DE mRNP	17
FIGURA 10 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DE ENTRADA pDONR TM 221 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN).....	32
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA GATEWAY (INVITROGEN).....	33
FIGURA 12 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DO VETOR pTREXGFP.....	35
FIGURA 13 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DE DESTINO pDEST TM 17 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN).....	40
FIGURA 14 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcNup95 E A ORTÓLOGA EM <i>T. brucei</i>	53
FIGURA 15 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup95.....	54
FIGURA 16 - CONSERVAÇÃO DE TcNup(HsNup98) em RELAÇÃO AOS ORTÓLOGOS EM OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS	55
FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup(HsNup98).....	56
FIGURA 18 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcNup147 E A ORTÓLOGA EM <i>T. brucei</i>	57
FIGURA 19 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup147	57
FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE DNA GENÔMICO UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS.....	58
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES POSITIVOS PURIFICADOS ATRAVÉS DE MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO.....	60
FIGURA 22 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	63
FIGURA 23 - ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DE ANTISORO POLICLONAL (ANTI-TcDbp5 , ANTI-TcCrm1 E ANTI-Nups) PRODUZIDO EM CAMUNDONGO	64
FIGURA 24 - ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISORO POLICLONAL ANTI-TcDbp5 PRODUZIDO EM COELHO	65
FIGURA 25 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5 EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c ATRAVÉS DE FRACIONAMENTO SUBCELULAR.....	66
FIGURA 26 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5 EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	67
FIGURA 27 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pTcPR-GFPN, ETIQUETA GFP AMINO-TERMINAL.....	68
FIGURA 28 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 FUSIONADA A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE NA EXTREMIDADE AMINO-TERMINAL	69
FIGURA 29 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO GÊNICO DE TcDbp5.....	70
FIGURA 30 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pTREXGFP, ETIQUETA GFP CARBOXI-TERMINAL	71
FIGURA 31 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 FUSIONADA A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE NA EXTREMIDADE CARBOXI-TERMINAL.....	73
FIGURA 32 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ULTRAESTRUTURAL....	74

FIGURA 33 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcCrm1 EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	75
FIGURA 34 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcNup95 EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	76
FIGURA 35 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcNup(HsNup98) EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	77
FIGURA 36 - ALINHAMENTO DE TcDbp5 COM PROTEÍNAS ORTÓLOGAS.....	78
FIGURA 37 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcDbp5.....	78
FIGURA 38 - PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE TcDbp5.....	80
FIGURA 39 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcDbp5 E O FATOR DE INICIAÇÃO EUCARIÓTICO, TcelF4A.....	81
FIGURA 40 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE TcDbp5 COM A MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	82
FIGURA 41 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE TcDbp5 COM A MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS SUBMETIDAS A ESTRESSE DE <i>T. cruzi</i>	83
FIGURA 42 - EXPRESSÃO DE TcDbp5 DURANTE AS FASES DA METACICLOGÊNESE DE <i>T. cruzi</i>	84
FIGURA 43 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 EM <i>T. cruzi</i> TRATADOS COM LMB.....	85
FIGURA 44 - PADRONIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE EXTRATO SOLÚVEL DE <i>T. cruzi</i>	87
FIGURA 45 - MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE LAVAGENS DA RESINA CONTENDO OS IMUNOPRECIPITADOS DE TcDbp5.....	88
FIGURA 46 - INTERAÇÃO DE TcDbp5 COM O POSSÍVEL RECEPTOR DE TRANSPORTE TcMex67.....	89
FIGURA 47 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5-GFP E mRNA ATRAVÉS DE FISH EM <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm 28c.....	90
FIGURA 48 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	122
FIGURA 49 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcCrm1 EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	122
FIGURA 50 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup95 EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	123
FIGURA 51 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup(HsNup98) EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	123
FIGURA 52 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup147A EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	124
FIGURA 53 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup147B EM VETOR pDONR TM 221 E pDEST TM 17.....	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE.....	29
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	31
TABELA 3 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GÊNICOS	32
TABELA 4 - NUCLEOPORINAS ORTÓLOGAS DE FUNGOS, METAZOÁRIOS E TRIPANOSSOMATÍDEOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Adenina difosfato
AP	- Fosfatase alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
ATP	- Adenina trifosfato
BCIP	- 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	- Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDC	- Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CPN	- Complexo de poro nuclear
C-terminal	- Carboxi-terminal
DAPI	- 4', 6-Diamidino-2-fenilindol
Dbp	- Proteína DEAD-box (<i>DEAD-box protein</i>)
DIC	- Contraste por Interferência Diferencial
DMP	- Dimetil pimelimidato dihidroclorídrico
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo trifosfatados
DO	- Densidade Ótica no comprimento de onda (λ)
DTT	- Ditioneitol
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EJC	- Complexo de junção de éxon (<i>Exon junction complex</i>)
G418	- Antibiótico análogo à neomicina
GFP	- Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HEPES	- (N-[2-hidroxietil]-1-piperazino N'-[2-ácido etanosulfônico])
ICC	- Instituto Carlos Chagas
IF	- Ensaio de Imunofluorescência
IPTG	- Isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo
LB	- Meio Luria-Bertani
LIT	- <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LMB	- Leptomicina B
MP	- Minipreparação de plasmídeo
mRNA	- RNA mensageiro
mRNP	- Ribonucleoproteína mensageira
NBT	- <i>Nitro-Blue-Tetrazolium</i>
NES	- Sinal de Exportação Nuclear (<i>Nuclear export signals</i>)
NLS	- Sinal de Localização Nuclear (<i>Nuclear localisation sequences</i>)
NP-40	- Nonil fenoxi polietoxietanol
N-terminal	- Amino-terminal
Nup	- Nucleoporina
PBS	- Solução Salina tamponada com Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PDB	- Banco de dados de proteína (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	- Fluoreto de fenil metil sulfonil
RNA	- Ácido Ribonucleico
RNAse	- Ribonuclease
rRNA	- RNA ribossomal
SDS	- Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)

SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
SFB	- Soro fetal bovino
SSC	- Tampão NaCl-Citrato de Sódio (<i>Standard Saline-Citrate</i>)
TAU	- Urina artificial de Triatomíneo (<i>Triatomine Artificial Urine</i>)
TBE	- Tampão Tris-Boro-EDTA
TE	- Tampão Tris-EDTA
TEMED	- N, N, N', N' - Tetrametiletilenodiamina
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	- RNA transportador
Tween 20	- Polioxietilenosorbitol monolaurato
UTR	- Regiões não traduzidas (<i>Untranslated region</i>)
WHO	- Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Grau Celsius
%	- Porcentagem
cm	- Centímetro
μF	- Microfaraday
μg	- Micrograma
μl	- Microlitro
μM	- Micromolar
g	- Grama (unidade de medida de massa)
g	- Aceleração de gravidade
kb	- 1000 bases
kDa	- Quilodalton
l	- Litro
M	- Molar
mA	- Miliampere
MDa	- Megadalton
mg	- Miligrama
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
rpm	- Rotação por minuto
pb	- Pares de bases
pH	- Potencial hidrogeniônico
pmol	- Picomol
U	- Unidade
V	- Volt

RESUMO

Em *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, o estudo de processos pós-transcricionais denota-se fundamentalmente importante, pois muitas das modificações celulares do parasita são decorrentes de um controle na expressão de genes que remodela o repertório de proteínas em cada estágio de seu ciclo de vida. Porém, algumas vias pós-transcricionais ainda são pouco compreendidas como o caso da via de exportação nucleocitoplasmática de RNA mensageiro. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstram que a via de exportação de mRNA é a menos conservada entre eucariotos e pouquíssimas proteínas apresentaram-se altamente conservadas. Baseados nisso, a caracterização funcional de TcDbp5 como um possível componente da via foi o objeto desse estudo, visto que está entre as proteínas altamente conservadas. As homólogas são descritas em outros organismos por interagir com proteínas do poro nuclear onde então atuam liberando o mRNA para a maquinaria da tradução. Assim, a busca de nucleoporinas em *T. cruzi* foi um dos enfoques, uma vez que TcDbp5 apresentou localização tanto no núcleo quanto no citoplasma com enriquecimento próximo ao complexo do poro. Pelas análises de associação com polissomos, foi possível observar que a localização no citoplasma não implicou em associação de TcDbp5 com a maquinaria de tradução. Porém, dados de microscopia por FISH sugerem que TcDbp5 está associada com RNA mensageiro no citoplasma. Pode ser que esta associação ocorra já no núcleo, pois análises de ultraestrutura mostraram que a proteína se encontra em regiões características de transcrição e processamento. Além disso, foi demonstrado através do tratamento com Leptomicina B, que especificamente interrompe a via Crm1 de transporte de proteínas, a capacidade de TcDbp5 migrar do núcleo para o citoplasma. Interessantemente, abordagens de imunoprecipitação permitiram demonstrar a interação de TcDbp5 com TcMex67, o receptor de transporte de mRNA. Em resumo, pressupõe-se que a atividade de TcDbp5 possa estar envolvida em vias de transporte de mRNA e para melhor compreensão da sua atuação e identificação de novos componentes da via é necessário investir em abordagens de genética reversa e proteômica.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Exportação de RNA mensageiro, TcDbp5, TcCrm1, Leptomicina B, Nucleoporina, Complexo do poro nuclear.

ABSTRACT

In *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, studies on post transcriptional processes are fundamentally important because most of cellular modifications of the parasite are due to gene expression control that changes the protein composition in each stage of its life cycle. However, some post-transcriptional pathways are poorly understood, such as the nucleocytoplasmic export of messenger RNA (mRNA). Recent data from our research group showed that mRNA export pathway is the least conserved in eukaryotes and few proteins are highly conserved. The goal of this study was the functional characterization of TcDbp5, a possible component of this pathway, since it is one of the highly conserved proteins. The homologs are described by the interaction with proteins of nuclear pore, acting on the release of mRNA to translation. Searching for nucleoporins in *T. cruzi* was one of the approaches, because TcDbp5 showed nuclear and cytoplasmic localization with enrichment near to the nuclear pore complex. By polysomes association approach, it was observed that the cytoplasmic localization of TcDbp5 is not associated with the translation machinery. Nevertheless, microscopy analyses using FISH suggest that TcDbp5 is associated with mRNA in the cytoplasm. Probably, this association starts already inside the nucleus, since ultrastructural analyses showed that the protein is present in regions that are likely to be transcription and processing sites. Besides, it was demonstrated after Leptomycin B treatment, which blocks specifically the Crm1 transport protein, the ability of TcDbp5 in shuttling from nucleus to the cytoplasm. Interestingly, immunoprecipitation showed the interaction of TcDbp5 with TcMex67, an mRNA export receptor. Taking together, it is assumed that the activity of TcDbp5 is related with mRNA transport pathways and to get further into its function, and identification of novel components, is necessary to invest in genetic reverse and proteomic approaches.

Keywords: Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, Messenger RNA export, TcDbp5, TcCrm1, Leptomycin B, Nucleoporin, Nuclear pore Complex

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A **doença de Chagas** é causada por um tripanossomatídeo hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Descoberta e descrita por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas há mais de um século, essa enfermidade começou a se expandir no fim do século dezenove e alcançou o pico de infectividade na primeira metade do século vinte (PRATA, 2001). A doença de Chagas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), atinge mundialmente em torno de 10 milhões de pessoas sendo endêmico em países da América Latina. Ademais, vem se tornando novamente cada vez mais relevante, pois se apresenta como um importante fator de risco à Europa e, consideravelmente, aos Estados Unidos (RIERA *et al.*, 2006; CDC, 2007) em decorrência do fluxo migratório de pessoas de áreas endêmicas para esses países (SCHMUNIS, 2007). No ambiente, o protozoário é encontrado em invertebrados e mamíferos do meio silvestre, assim como, em animais domésticos e humanos de áreas predominantemente rurais e periurbanas.

Muito tem se discutido em relação ao tratamento de pacientes chagásicos. A eficácia de substâncias anti-tripanosomas aparentemente é reduzida com o decorrer da infecção. Dos quimioterápicos comercialmente encontrados ou em teste, muitos apresentam elevada toxicidade às células humanas (LEVY *et al.*, 2007), sendo, portanto, utilizados com precaução na expectativa de diminuir ou eliminar o parasita nas infecções agudas. Para o desenvolvimento de novos fármacos, é importante o conhecimento básico da biologia de *T. cruzi* que apresenta a capacidade de alterar a sua morfologia, de acordo com o seu desenvolvimento e o local onde parasita.

O parasita está incluído na ordem Kinetoplastida, ou seja, é um protista flagelado (com o flagelo originado a partir da bolsa flagelar) que apresenta uma estrutura especial que o destaca, denominado de **cinetoplasto**. Este se constitui em uma região de condensação do DNA mitocondrial organizado em maxicírculos e minicírculos. A posição do cinetoplasto é um dos aspectos que diferencia as distintas morfologias de *T. cruzi* em benefício à sua adaptação às diferentes situações biológicas que enfrenta nos hospedeiros. Sendo um parasito heteroxênico, durante o

seu ciclo natural, apresenta uma fase replicativa e intracelular no hospedeiro vertebrado, e outra extracelular no inseto vetor (triatomíneo). Desse modo, o seu ciclo de vida compreende basicamente três distintas formas morfológicas e funcionais: amastigota, epimastigota (com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo) e tripomastigota (com cinetoplasto posterior ao núcleo) (BRENER, 1973).

A descrição do ciclo biológico de *T. cruzi* na Figura 1 baseou-se na transmissão natural da infecção (TYLER & ENGMAN, 2001). No inseto vetor, o parasita se prolifera no lúmen do trato gastrintestinal sob a forma não infectiva epimastigota e, quando migra para o reto, é exposto ao estresse nutricional, aderindo à glândula retal. Neste local, assim, transforma-se morfogeneticamente na forma infectiva tripomastigota metacíclica (ZELEDÓN *et al.*, 1984), processo de transformação celular denominado de **metaciclogênese**. Os tripomastigotas são eliminados junto às fezes e urina quando o triatomíneo hematófago se alimenta no hospedeiro vertebrado. Estas formas infectivas podem entrar em contato com soluções de continuidade da pele ou mucosas desse hospedeiro e, conseqüentemente, invadir células adjacentes. Após a invasão, os tripanossomatídeos se evadem dos vacúolos fagolisossomais incorporando o conteúdo dessas organelas ao vacúolo parasitóforo, tornando o interior ácido. Em seguida, os tripomastigotas alteram sua forma para um modelo arredondado e sofrem encurtamento do flagelo com mudança na posição do cinetoplasto, assumindo a forma intracelular amastigota, que se multiplica por divisão binária. O meio ácido propicia a liberação de enzimas por *T. cruzi*, como a Tc-Tox (ANDREWS *et al.*, 1990; DE SOUZA, 2000), que favorece a lise do vacúolo parasitóforo. Assim, o parasita fica em contato direto com o citoplasma da célula invadida. Após se replicarem, os amastigotas iniciam um processo inverso de transformação, ou seja, reestruturam-se para a forma tripomastigota e, posteriormente, com a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira, alcançam a corrente sanguínea e se alastram para outras células. Quando o triatomíneo ingere sangue de animais ou do homem infectado com *T. cruzi* durante o hematofagismo, o ciclo é reiniciado.

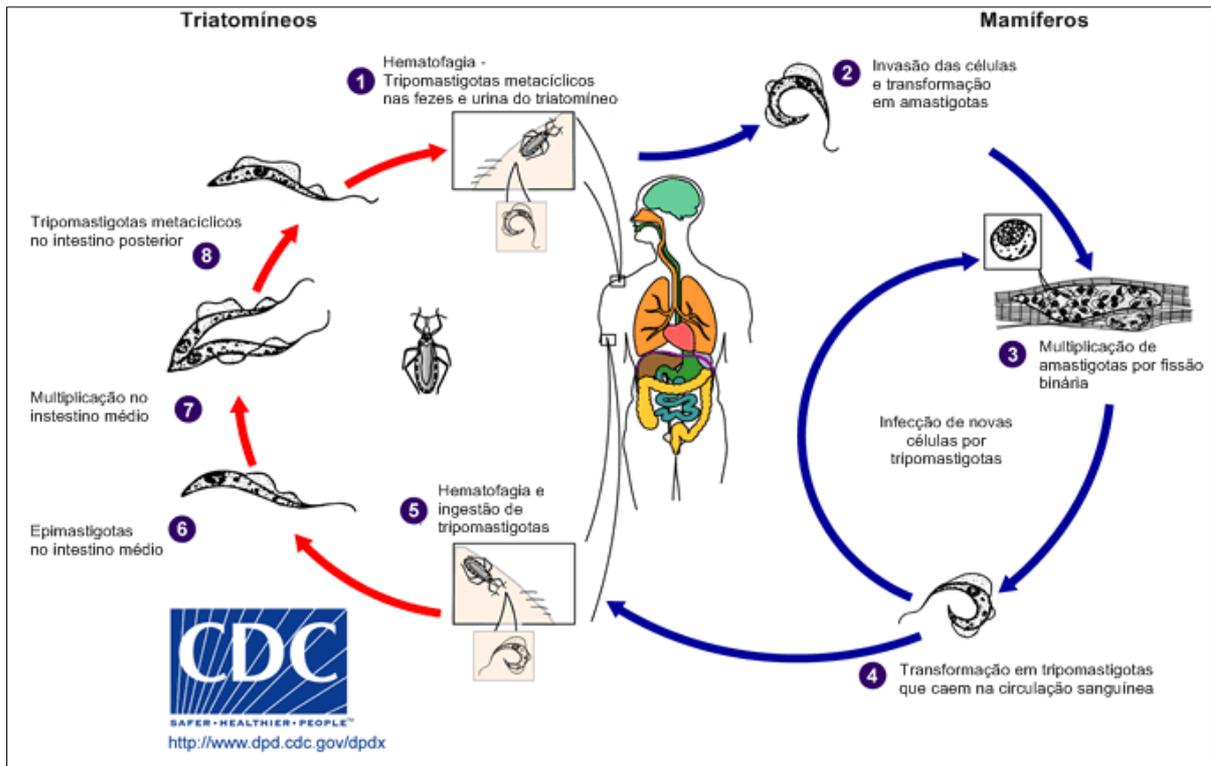


FIGURA 1 - CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi* [adaptado de CDC (2011)]. Ver texto para descrição detalhada.

1.2. Expressão de genes codificadores de proteínas em tripanossomatídeos

Em eucariotos superiores, a codificação de proteínas acontece a partir de transcritos que sofreram inúmeros processos até alcançar a maquinaria de tradução no citoplasma. Inicialmente, a transcrição de um gene acontece pela RNA polimerase II, resultando em um mRNA imaturo (pré-mRNA) que sofre associação de inúmeras proteínas envolvidas em processamento para adição de *cap* na extremidade 5', *splicing* e poliadenilação na extremidade 3'. Durante os sucessivos passos, outras proteínas ligantes de RNA também são recrutadas ao transcrito para sua exportação até a face citoplasmática onde, finalmente, ocorre a tradução. Em cada um desses passos, o mRNA sofre um rigoroso controle de qualidade que favorece a integridade da expressão gênica (revisado em ISKEN & MAQUAT, 2007). Assim, um único transcrito maduro resulta na expressão de uma única proteína.

Ante o exposto, em relação à arquitetura molecular, os tripanossomatídeos apresentam algumas peculiaridades que os tornam interessantes modelos de estudo. Os tripanossomas apresentam, na estrutura genômica, diversos genes agrupados sob o controle de uma única região promotora (VANHAMME & PAYS, 1995; KOLEV *et al.*, 2010). Conseqüentemente, a transcrição resulta em um longo transcrito policistrônico de tamanho variável, ou seja, um único transcrito contendo diferentes informações gênicas (PAYS, 1993). Essa cadeia policistrônica (pré-mRNA) sofre clivagens nas regiões intergênicas e, conseqüentemente, ocorre a conversão da cadeia policistrônica em inúmeras cadeias monocistrônicas. Estas clivagens decorrem do processamento, denominado *trans-splicing* (revisado em LIANG *et al.*, 2003) que consiste em adição de um RNA (mini-exon) na extremidade 5' (MATTHEWS *et al.*, 1994) e a formação de uma cauda composta de adenina (cauda poli A) pelo processo de poliadenilação (LeBOWITZ *et al.*, 1993) na extremidade 3' (Figura 2). Com isso, em cada um dos RNAs mensageiros existe uma sequência de 35 a 39 nucleotídeos, localizada na porção terminal 5', que não sofre tradução, chamado mini-exon (ME) ou *spliced leader* (SL) RNA. A função do ME ainda não está totalmente elucidada, entretanto, presencia-se em praticamente todos os RNA mensageiros de *T. cruzi* (WALDER *et al.*, 1986).

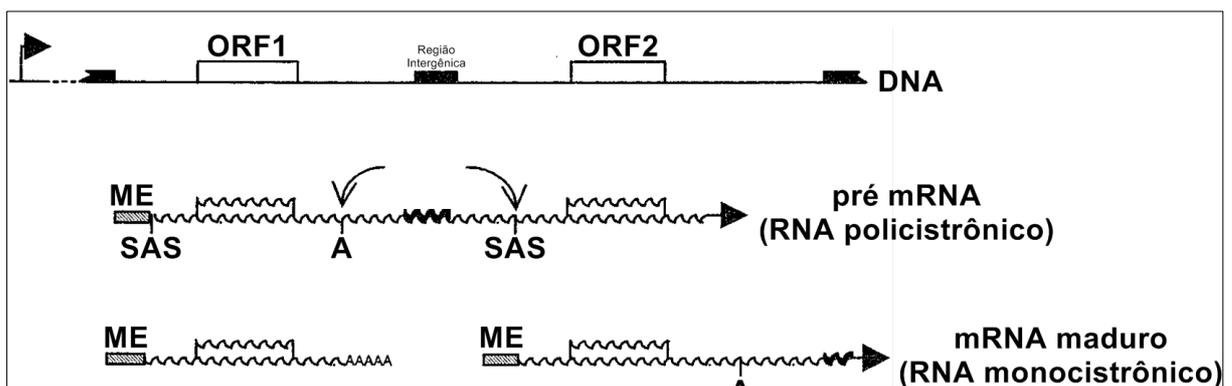


FIGURA 2 - PROCESSAMENTO DO mRNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS. A transcrição em *T. cruzi* acontece sob o controle de um único promotor, originando um RNA policistrônico. Este é clivado e processado. ORF= fase aberta de leitura; SAS = *Splice Aceptor Site*, local de adição de ME (mini-exon); A = sítio de poliadenilação [adaptado de VANHAMME & PAYS (1995)].

1.3. Exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma em células eucarióticas

Algumas características singulares distinguem células eucarióticas de procarióticas. A presença em eucariotos de uma estrutura compartimentalizada delimitada por dupla membrana lipídica, o núcleo, isolando o meio intra do extranuclear, possibilitou a distinção física de processos fundamentais, como a transcrição e a síntese proteica. Os transcritos devem ser exportados do núcleo para alcançar os ribossomos no citoplasma; e proteínas, como polimerases e fatores de transcrição, devem fazer o caminho inverso para atingir o genoma. Consequentemente, a expressão gênica requer uma rebuscada maquinaria de importação-exportação (revisado em COOK *et al.*, 2007).

1.3.1. Complexo do poro nuclear

A translocação bidirecional de moléculas entre compartimentos intra e extranuclear é facilitado por **complexos de poro nuclear** (CPNs), constituídos por proteínas denominadas de **nucleoporinas** (Nups) e por proteínas associadas às Nups (ROUT *et al.*, 2000). A estrutura de CPN tem sido amplamente investigada em fungos e vertebrados, incluindo células humanas, e estes estudos demonstram que os componentes de CPNs encontram-se estruturalmente organizados e evolucionariamente conservados em eucariotos superiores (MANS *et al.*, 2004; TRAN & WENTE, 2006). Os CPNs apresentam massa molecular de 50 MDa em fungos e 120 MDa em vertebrados (BAGLEY *et al.*, 2000) e se reorganizam repetitivamente como subcomplexos distintos agrupados de 50 até 100 Nups diferentes (revisado em SUNTHARALINGAM & WENTE, 2003), distribuídos nas faces nuclear e citoplasmática do CPN (ROUT *et al.*, 2000). Análises de tomografia e microscopia eletrônica em fungos e metazoários revelaram que, caracteristicamente, o CPN é composto basicamente por uma armação octogonal com um canal transportador central, oito filamentos citoplasmáticos (fibrilas) e oito filamentos nucleares que se intersectam em um anel distal, denominado de cesta nuclear

(Figura 3) (revisado em BAGLEY *et al.*, 2000; VASU & FORBES, 2001; KÖHLER & HURT, 2007; LIM *et al.*, 2008).

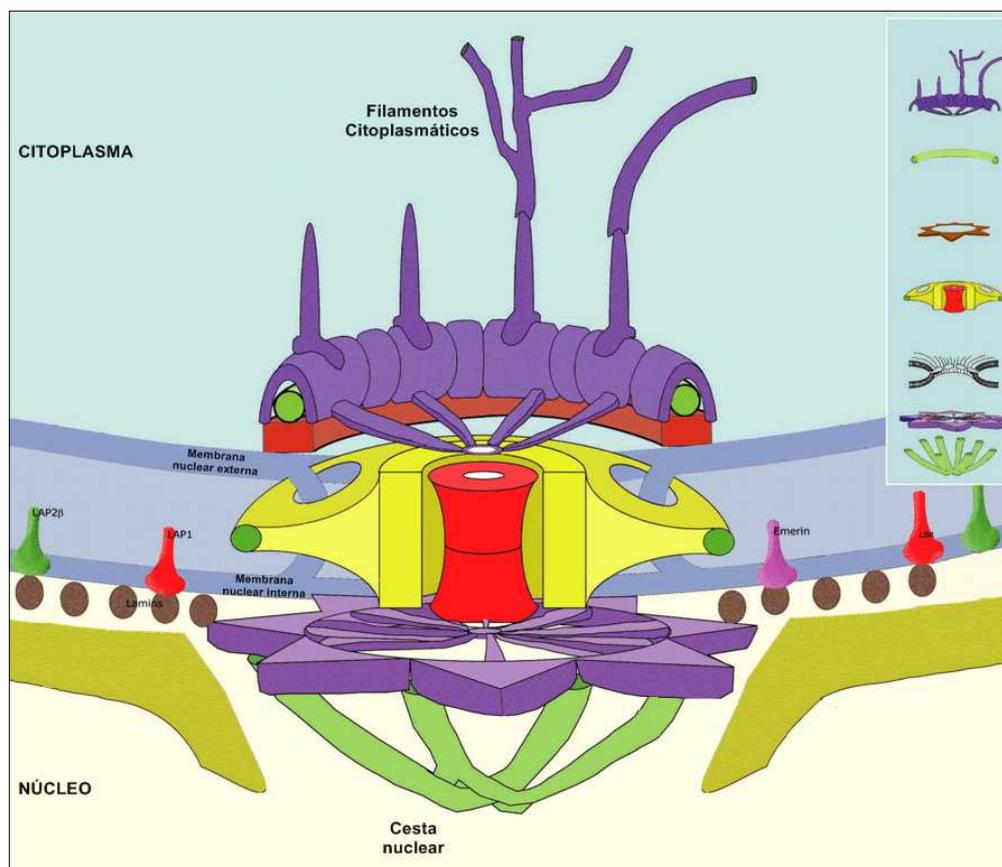


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPLEXO DO PORO NUCLEAR. O CPN é composto por um canal transportador central, oito filamentos citoplasmáticos e oito filamentos nucleares que se interseccionam no anel distal, denominado de cesta nuclear [adaptado de BAGLEY *et al.* (2000)].

Nucleoporinas são identificadas pela presença de inúmeros domínios repetitivos (MANS *et al.*, 2004), que de acordo com sua estrutura secundária, são classificadas em três grupos distintos (Figura 4) (DEVOS *et al.*, 2006): o primeiro consiste de Nups que contêm α -hélice transmembrana e dobramentos em caderina, que auxiliam no ancoramento do CPN no envelope nuclear; o segundo, em Nups atuando na sustentação do complexo e contendo dobramento tipo β -pregueado e α -solenóide; e o último grupo, denominado de Nups FG, corresponde às mais importantes proteínas do poro que regulam e facilitam funcionalmente o

translocamento nucleocitoplasmático (STOFFLER *et al.*, 1999; ROUT & AITCHISON, 2001) através de simétricos e conservados motivos repetitivos em tandem de aminoácidos fenilalanina e glicina, resultando em dobramentos tipo super-hélice (*coiled-coil*). Repetições FG são principalmente motivos do tipo FXFG, GLFG ou FG (o qual L corresponde a leucina e X a um aminoácido qualquer) estimadas em mais de 1000 cópias e distribuídas pelo CPN. Essas repetições FG nativamente são regiões das proteínas que não sofrem desdobração uma vez que a cadeia lateral altamente hidrofóbica da fenilalanina, glicina e outros aminoácidos auxiliam a associação e dissociação de fatores de transporte transientemente através de fraca interação (TERRY & WENTE, 2009) com nucleoporinas. Em suma, essas repetições são dispostas como sítios de ligação para receptores de transporte (STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010) que favorecem a formação de complexos (revisado em FRIED & KUTAY, 2003) para o traslado de moléculas. Essa interação torna-se profundamente específica, identificando repetições FG exclusivas para a interação com receptores de transporte de proteínas ou de mRNA (TERRY & WENTE, 2007).

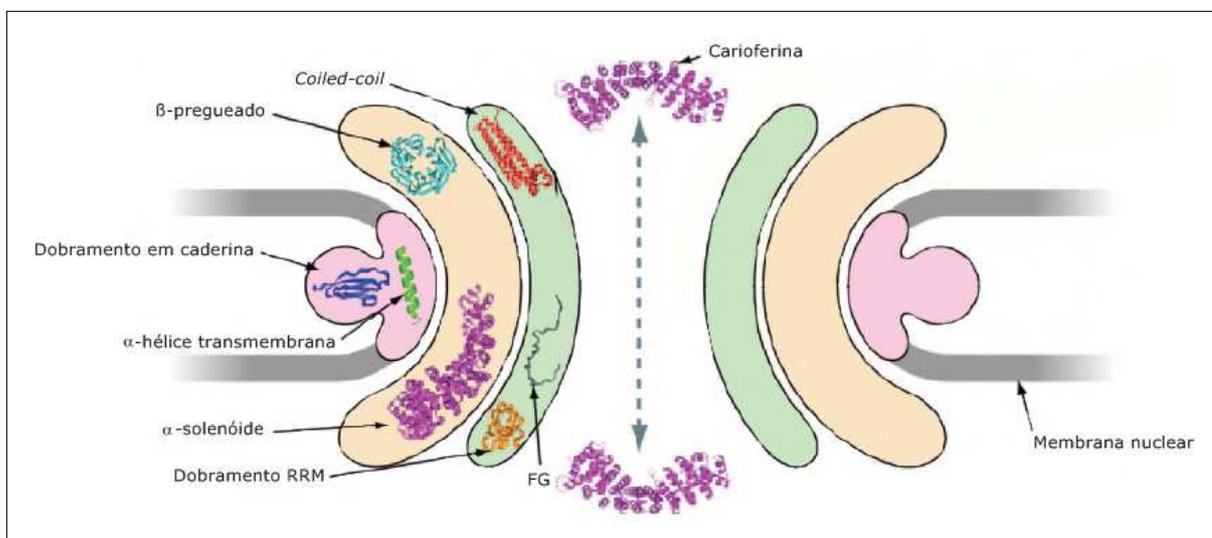


FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NUCLEOPORINAS DO CPN. Em rosa, estão representadas as Nups responsáveis pelo ancoramento do CPN na membrana nuclear, compostas de domínios em α -hélice transmembrana e dobramentos em caderina; em laranja, estão nucleoporinas com dobramentos em estrutura β -pregueado e α -solenóide; e, em verde, estão as Nups com repetições FG que interagem com os receptores de transporte, como carioferinas (roxo) [adaptado de DEVOS *et al.* (2006)].

Com relação aos tripanossomatídeos, a estrutura física de CPN foi descrita por Rout & Field (2001). Neste estudo, foi demonstrado que proteínas contendo dobramentos *coiled-coil* podem estar presentes em complexo do poro nuclear em *T. brucei*. Esses dobramentos foram essenciais para a automontagem de complexos, sendo recrutadas para múltiplas funções ocasionais durante a evolução em eucariotos (MANS *et al.*, 2004). Recentemente, DeGrasse *et al.* (2009) descreveram, a partir de análises de proteômica, diversas nucleoporinas de *T. brucei* e a sua relação de similaridade com proteínas de metazoários e fungos. Foi demonstrado que muitas das estruturas de CPN são compartilhadas com esses organismos, o que indica um alto nível de conservação tanto na composição quanto no mecanismo de ação, como, por exemplo, no transporte nucleocitoplasmático (DeGRASSE *et al.*, 2009).

1.3.2. Transporte nucleocitoplasmático

Através de Complexo do Poro Nuclear, o transporte de íons e de pequenas moléculas é favorecido por difusão passiva de modo não regulado (SUNTHARALINGAM & WENTE, 2003). Para translocação de moléculas maiores que 40 kDa, são requisitadas proteínas específicas de transporte, geralmente dependentes de ATP (FRIED & KUTAY, 2003). Embora o transporte nucleocitoplasma de diferentes ligantes, conhecidos como cargo, seja mediado pela mesma maquinaria do CPN (DWORETZKY & FELDHERR, 1988), esse intercâmbio acontece através de distintas vias de sinalização (PANTÉ & AEBI, 1996). O transporte requer a ligação do cargo a receptores que interagem com nucleoporinas através de repetições FG no canal central de CPN (ROUT *et al.*, 2000; TERRY & WENTE, 2007). Muitos dos cargos se associam a proteínas que são membros de uma conservada família de receptores de transporte denominada β -carioferina, subdividida em importinas e exportinas (Figura 5). Importinas associam-se com o cargo no citoplasma, através de proteínas adaptadoras, e reconhecem um sinal de localização nuclear (NLS – *Nuclear localisation sequences*) rico em aminoácidos básicos. NLS está presente em proteínas transportadoras de moléculas do

citoplasma celular para o interior nuclear (BAGLEY *et al.*, 2000). Já para a exportação de moléculas, sinais designados por NES (NES – *Nuclear export signals*) são reconhecidos por exportinas e, estas, são responsáveis pelo transporte através do CPN. Análises biocomputacionais demonstram que NES consistem de 4-5 resíduos hidrofóbicos contendo uma região de aproximadamente 10 aminoácidos ricos predominantemente em leucina, mas que também podem apresentar isoleucina, valina, metionina ou fenilalanina (LA COUR *et al.*, 2003) resultando na sequência consenso L_{xxx}L_{xx}L_xL (L corresponde a leucina e x, a um aminoácido hidrofóbico qualquer) (LA COUR *et al.*, 2004).

De modo geral, a interação desses receptores de transporte com o cargo requer a atuação de uma pequena molécula GTPase denominada de Ran, que está incluída na rede nuclear de transporte altamente conservada entre organismos basais (FRANKEL & KNOLL, 2009; SERPELONI *et al.*, 2011a). O ciclo de modificação molecular de RanGTP (Ran Guanosina Trifosfato) promove o direcionamento do transporte [Figura 5 (revisado em NAKIELNY & DREYFUSS, 1999)]. Ran localiza-se predominantemente no interior nuclear e, individualmente, apresenta baixa atividade de hidrolisar GTP (forma RanGDP). Por isso, é estimulada por associação a outras moléculas como RanGAP (GAP – *GTPase-activating protein*) e RanGEF (GEF – *Guanine nucleotide exchange factor*, também denominada de RCC1). Assim, durante a importação, o cargo é liberado no núcleo pela associação da importina com RanGTPase na forma GTP-ligante (RanGTP). Durante a exportação, acontece o processo inverso. O reconhecimento e translocamento de cargo e receptor de exportação é mediado pela hidrólise de RanGTP, liberando, ao final, RanGDP na face citoplasmática. Ademais, adicionais fatores como RanBPs (RanBP – *Ran binding protein*) contribuem para a ativação de Ran, atuando como cofator de RanGAP; e o receptor de transporte NTF2 (NTF – *Nuclear transport factor*), necessário para o retorno de RanGDP ao núcleo após exportação do cargo (COOK *et al.*, 2007).

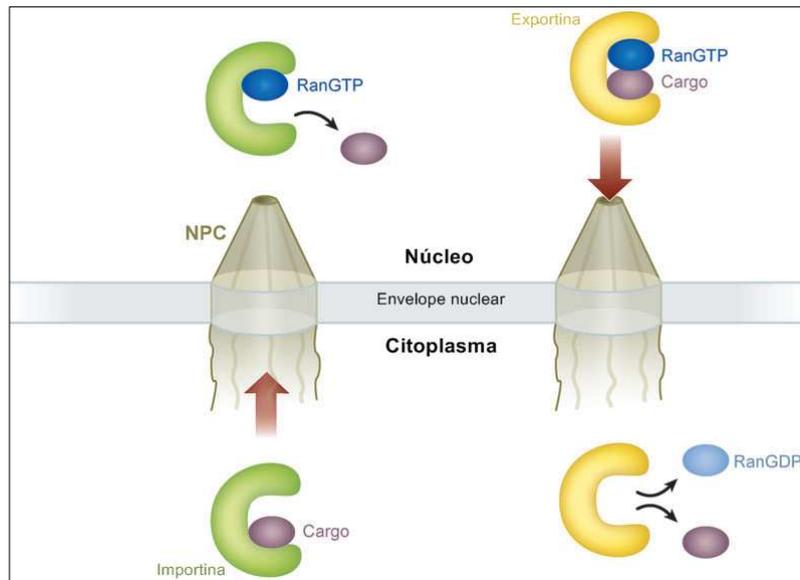


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE PROCESSO DE EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO DE CARGO MEDIADO POR β -CARIOFERINA E RAN (GTPase) LIGADA A GTP (Guanosina trifosfato) [adaptado de COOK *et al.* (2007)].

O receptor de transporte nucleocitoplasmático mais comum é a exportina Crm1 (Crm – *Chromosomal region maintenance*, também denominada de Xpo1p, Exportin-1 ou Kap124p em mamíferos), um mediador essencial da exportação de proteínas que interage especificamente com RanGTPase e motivos NES (FORNEROD *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 2009). Crm1 é uma exportina de transporte nuclear pertencente à família β -carioferina (STRÖM & WEIS, 2001) que está envolvida na exportação de alguns RNAs mensageiros em eucariotos (WATANABE *et al.* 1999), incluindo tripanossomatídeos (CUEVAS *et al.*, 2005). Stade *et al.* (1997) demonstraram em fungos que mutações em Crm1 afetaram tanto o transporte de proteínas quanto a exportação de mRNA, indicando que estas vias encontram-se profundamente interligadas. Contudo, estudos com *Drosophila* (HEROLD *et al.*, 2003), células humanas (SCHÜTZ *et al.*, 2006) e fungos (NEVILLE & ROSBASH, 1999) revelam que a via Crm1 não está diretamente envolvida no transporte de mRNA na maioria dos casos celulares. A via seria ativada em momentos específicos, como na exportação de mRNA que não sofreram *splicing* ou de transcritos que foram parcialmente processados, como em casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV (SCHÜTZ *et al.*, 2006). Assim, Crm1 atuaria

apenas coordenando a exportação de um conjunto de mRNAs que estão envolvidos em processos fisiológicos especializados (HUTTEN & KEHLENBACH, 2007).

Os estudos referentes à via de exportação dependente de Crm1 foram aperfeiçoados através da sensibilidade específica deste receptor a drogas como a Leptomicina B (LMB), um potente antifúngico (HAMAMOTO *et al.*, 1985), e Ratjadone C (MEISSNER *et al.*, 2004). Essas drogas se ligam covalentemente a resíduos de cisteína de Crm1 (KUDO *et al.*, 1999) e interferem na ligação do cargo ao NES (KUDO *et al.*, 1998; WOLFF *et al.*, 1997) em humanos, impedindo a formação do complexo NES-Crm1-RanGTP.

Além de receptores de transporte, a via de exportação de mRNA conta com a participação de proteínas de ligação ao RNA (RBP – *RNA binding protein*) que se associam ao RNA mensageiro nascente durante a transcrição, resultando em complexos ribonucleoproteicos (mRNP) (revisado em NAKIELNY & DREYFUSS, 1999; WEIS, 2002; LUNA *et al.*, 2008). Entre as proteínas relacionadas, estão membros da subfamília DEAD-box que permitem o remodelamento durante ou após a translocação dos complexos pelo envelope nuclear (revisado em LINDER, 2006; LINDER, 2008). De modo geral, o transporte de mRNA (ilustrado na Figura 6) consiste, durante a elongação do transcrito nascente, na associação de mRNPs ao complexo THO. Em fungos, esse complexo é constituído por cinco subunidades (THO2, HPR1, MFT1, THP2 e TEX1), diferindo de metazoários que apresentam somente três (THO2, HPR1 e TEX1) (KUERSTEN & GOODWIN, 2005). O complexo THO é importante, pois recruta fatores de processamento de mRNA e de exportação, tais como a proteína DEAD-box helicase Sub2 (ortólogo de UAP56 em humanos) e Yra1 (também denominado de REF e ortólogo de ALY em humanos), o que culmina na formação do complexo TREX [(TREX – *Transcription/export*) STRÄSSER *et al.*, 2002]. A maioria dos mRNAs necessita de um receptor de exportação não dependente de RanGTP e não pertencente a família β -carioferina denominado, em fungos, de Mex67 (Mex67 – *mRNA export factor*, com 67 kDa, ortólogo em humanos de TAP, também conhecido como NXF1) que forma dímero com uma pequena proteína cofatora, Mtr2 (ortólogo de p15 ou NXT em humanos) (SANTOS-ROSA *et al.*, 1998). Em processos posteriores, Sub2 é substituída pelo receptor heterodimérico Mex67-Mtr2 (LINDER, 2008), o que torna o mRNP competente ao processo de exportação (KUERSTEN & GOODWIN, 2005). Mex67-

Mtr2 carrega o mRNA pelo CPN decorrente da associação com Nucleoporinas que apresentam motivos repetitivos FG (STRÄSSER *et al.*, 2000) e, quando alcança a face citoplasmática, o mRNP é desmontado por Dbp5, conforme descrição mais a diante.

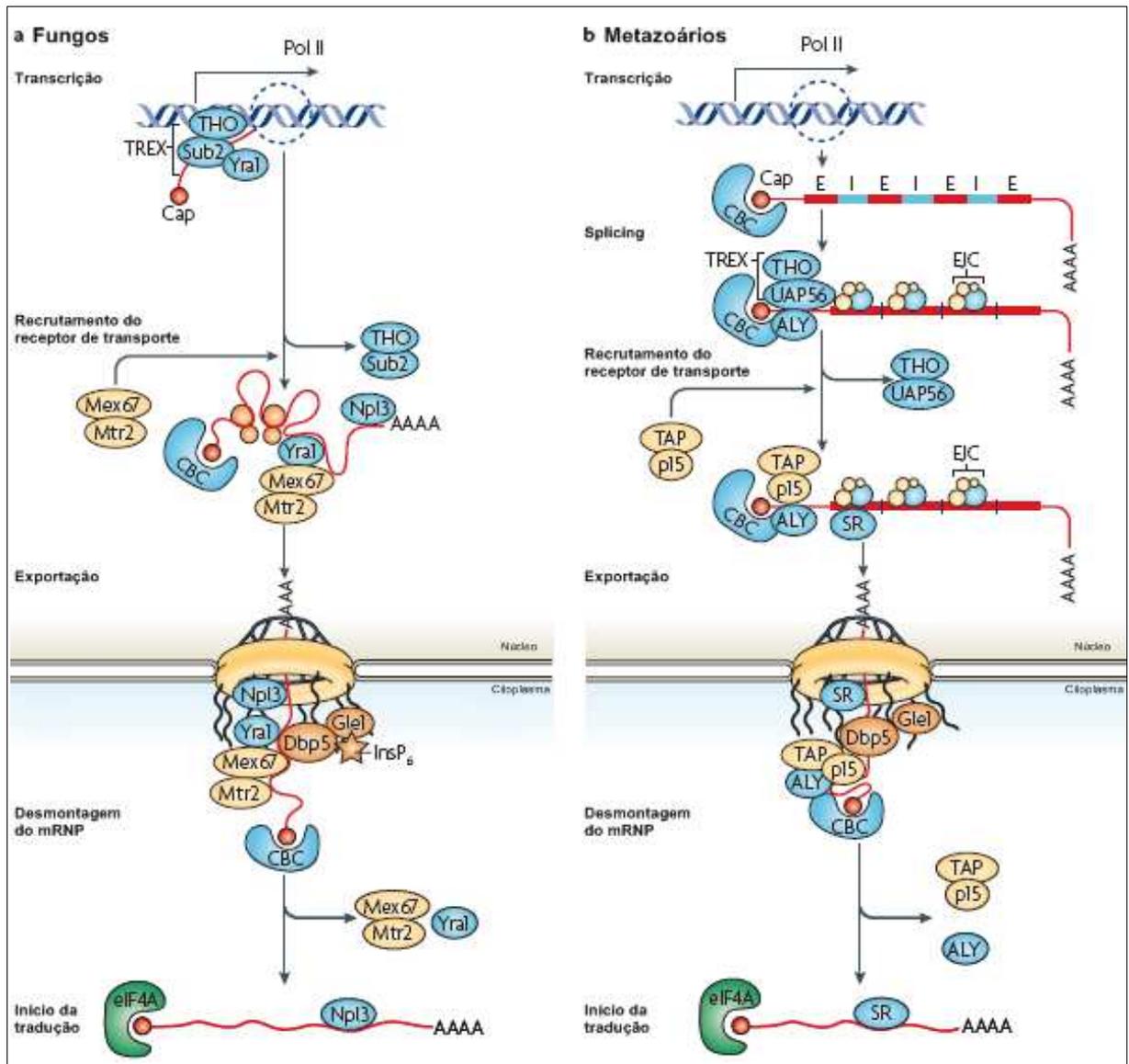


FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE VIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS (A) E METAZOÁRIOS (B). [adaptado de KÖHLER & HURT (2007)]. Ver texto para descrição detalhada.

Além disso, outras proteínas adicionais associam-se ao transcrito (Figura 6) para a eficiente exportação do mesmo. Na região do *cap*, complexos como CBC

(CBC – *Cap binding complex*, constituído por proteínas CBP20 e CBP80) são formados em metazoários. O *cap* tem sido apresentado como fator estimulatório para a exportação de mRNP, porém este efeito mediado por CBC ainda não está claro (revisado em LEWIS & IZAURRALDE, 1997). Proteínas SR (ricas em Serina e Arginina) são essenciais para exportação de mRNA por atuarem como moléculas adaptadoras após sofrerem reações específicas de fosforilação ou desfosforilação durante associação com Mex67 (HUANG *et al.*, 2004). Em fungos, as proteínas SR Npl3 associam-se à cauda poliadenilada do mRNA e conseguem migrar entre o núcleo e o citoplasma (LEE *et al.*, 1996), sendo que seu estado de fosforilação determina sua localização no núcleo/citoplasma (GILBERT *et al.*, 2001). Ademais, em eucariotos superiores, a maquinaria de *splicing*, além de promover a retirada de introns, também pode alterar a composição de proteínas do mRNP a partir de EJC (EJC – *Exon-exon junction complex*), sendo associado de 20 a 24 nucleotídeos a montante das junções de exon-exon do mRNA processado (LE HIR *et al.*, 2000). Dessa forma, a dinâmica de composição de proteínas do mRNP pode auxiliar no recrutamento da maquinaria de exportação (LE HIR *et al.*, 2001) demonstrando o quão a exportação de mRNA está acoplada a processos de regulação da expressão gênica, que incluem *splicing* e transcrição.

1.3.3. Características funcionais de Dbp5

Também denominada de DDX19 em humanos, **Dbp5** (Dbp – *DEAD-box protein*) é uma RNA helicase conservada (CHANG *et al.*, 1990) da família DExD/H-box, subgrupo DEAD-box (o qual D corresponde a aspartato, E, glutamato e A, alanina) (revisado em CARUTHERS & MCKAY, 2002). Membros dessa família de proteínas são caracterizados pela presença de nove motivos conservados e agrupados em dois domínios que se estruturam em dobramentos tipo RecA (CORDIN *et al.*, 2006; LINDER, 2006). Essa arquitetura está envolvida na atividade RNA helicase a partir da ligação e hidrólise de ATP (SCHMID & UNDER, 1992; LÜKING *et al.*, 1998). A estrutura consenso de proteínas DExD/H está ilustrada na Figura 7. O domínio amino terminal contém o motivo Q para o acoplamento e posicionamento de ATP, I (conhecido por Walker A) e II (Walker B) para a atividade

ATPase; III, para a intermediação entre hidrólise de ATP e atividade helicase; e, Ia e Ib, envolvidos na ligação ao RNA. O domínio C-terminal apresenta os motivos IV e V que também estão relacionados à ligação ao RNA e o motivo VI que coordena as atividades ATPase e helicase (CORDIN *et al.*, 2006). Assim, considerando a alta similaridade de domínios, as proteínas dessa família diferem basicamente pelas extensões amino e carboxi-terminal não conservadas, que, conseqüentemente, resultam na distinção da localização subcelular, da interação com outras proteínas e da especificidade de substrato (WANG & GUTHRIE, 1998). Além disso, uma característica do subgrupo das proteínas DEAD-box é a presença exclusiva do motivo Q (TANNER *et al.*, 2003), não presentes em outras proteínas da família DExD/H-box.

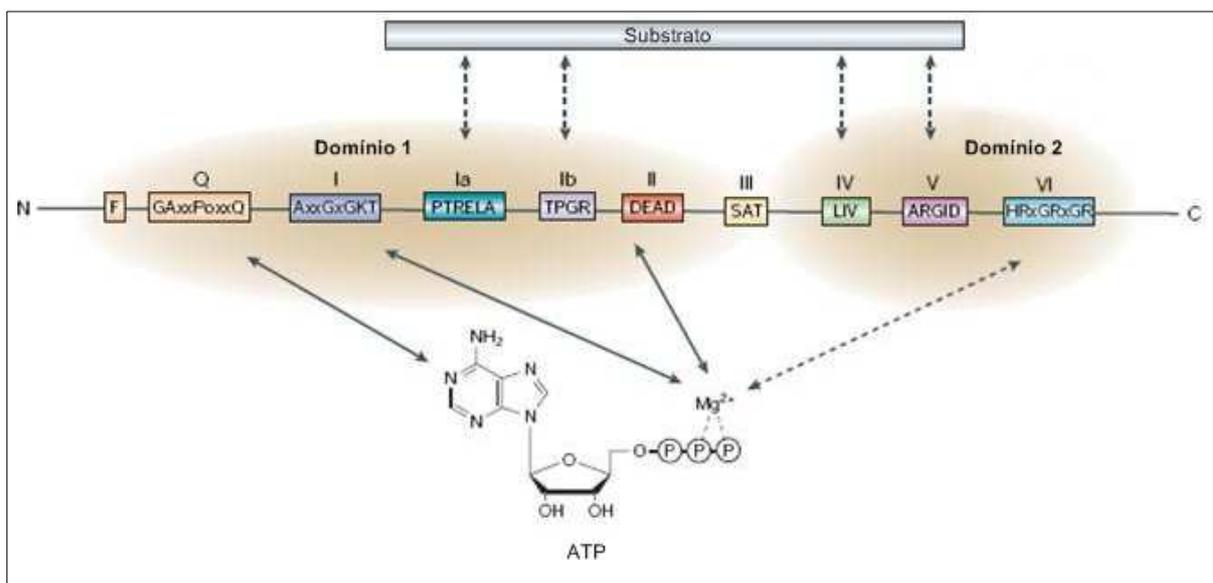


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA CONSENSO DA SEQÜÊNCIA LINEAR DE PROTEÍNAS DEAD-BOX. O domínio N-terminal é composto pelos motivos Q, I (Walker A), Ia, Ib, II (Walker B) e III; enquanto que a porção C-terminal apresenta os motivos IV, V, e VI. Os motivos Q, I, II, VI, apresentam atividade sobre a ligação e catabolismo de ATP, enquanto os motivos Ia, Ib, IV, V estão relacionados à ligação ao RNA [adaptado de ROCAK & LINDER (2004)].

Dbp5 é enriquecida na face citoplasmática (Figuras 6 e 8) do envoltório nuclear (SNAY-HODGE *et al.*, 1998) e ancorada nos filamentos citoplasmáticos do CPN através de Nup159/Rat7 em fungos, ortólogo de Nup214/CAN em humano (SCHMITT *et al.*, 1999; VON MOELLER *et al.*, 2009; WEIRICH *et al.*, 2004).

Estruturalmente, Nup159/Rat7 apresenta 1460 aminoácidos, incluindo 25 motivos repetitivos FG do tipo XXFG, dos quais a maioria é constituída pelos aminoácidos PSFG ou SAFG (o qual P corresponde a prolina; S, serina; e A, alanina) (GORSCH *et al.*, 1995) e que podem formar estruturas *coiled-coil*. O domínio N-terminal de Nup159/Rat7 forma um motivo conservado com dobramento de folhas β -pregueado responsável pelo ancoramento de Dbp5 (WEIRICH *et al.*, 2004).

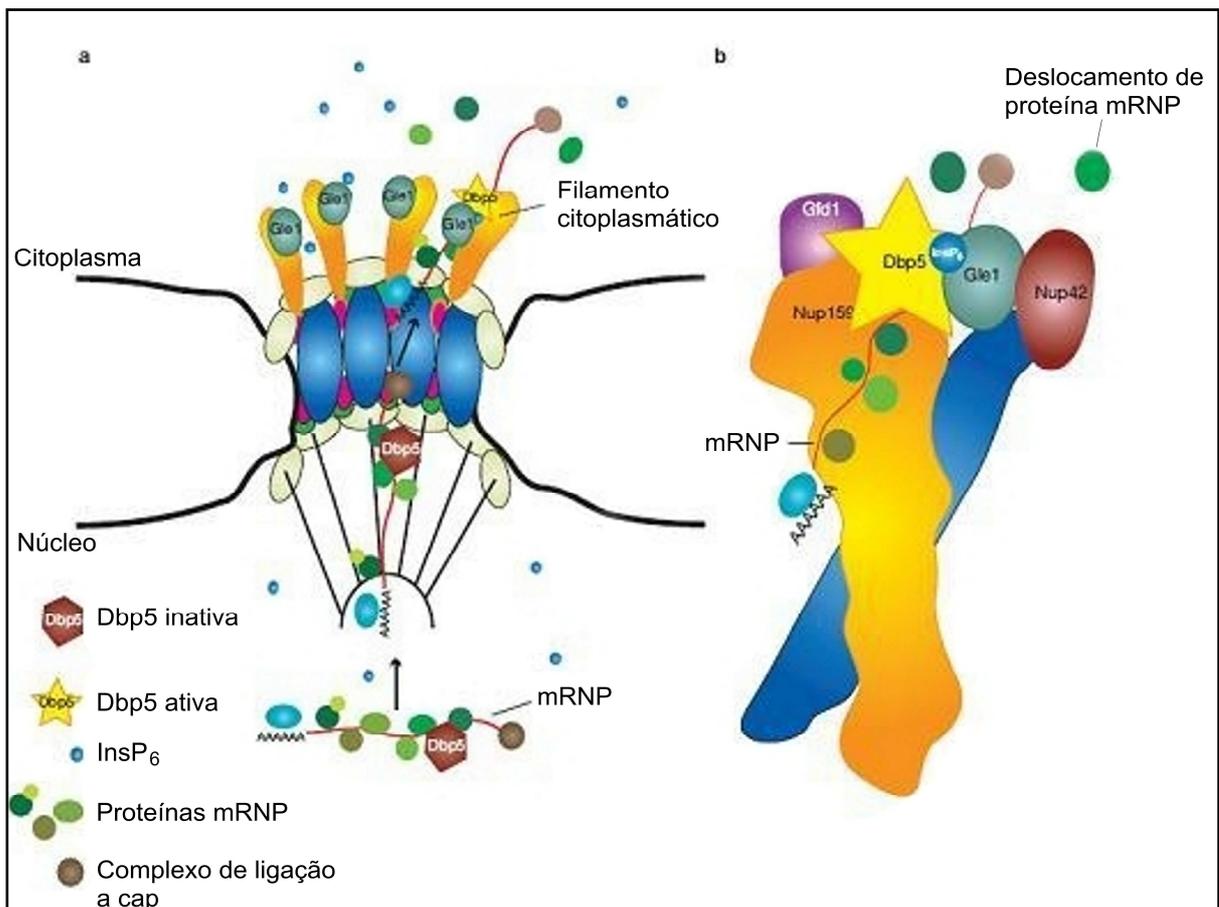


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DE mRNP NA EXPORTAÇÃO DO TRANSCRITO DO NÚCLEO PARA O CITOPLASMA. Dentro do núcleo, no início do translocamento pelo CPN, Dbp5 associa-se ao mRNA nascente, constituindo parte do complexo ribonucleoproteico (a), e é transportado ao CPN (b) onde é ativado por Gle1. Essa interação é estimulada por InsP₆. [adaptado de COLE & SCARCELLI (2006)].

Relacionada funcionalmente ao processo de exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma (SNAY-HODGE *et al.*, 1998; TSENG *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 1999), Dbp5 migra entre o núcleo e o citoplasma de modo

dependente da exportina Crm1 (HODGE *et al.*, 1999). Estudos em fungos, utilizando mutantes Dbp5 (TSENG *et al.*, 1998; SNAY-HODGE *et al.*, 1998) e deleção da região N-terminal de Nup159 (DEL PRIORE *et al.*, 1997), demonstraram o acúmulo de mRNA no núcleo, pressupondo a participação destas proteínas no processo de exportação. Ademais, outros trabalhos apresentaram a relação tanto física [em *Chironomus tentans* (ZHAO *et al.*, 2002)] quanto genética [em fungos, a partir de ensaios de mutação (ESTRUCH & COLE, 2003)] de Dbp5 com a maquinaria de transcrição, sugerindo sua interação com o mRNA ainda no núcleo. Com isso, acredita-se que Dbp5 seja transportada associada ao transcrito até o envelope nuclear onde é requisitada para a sua função mais caracterizada (Figuras 8 e 9).

Estudos *in vivo* com fungos sugerem Dbp5 como um importante componente na liberação do mRNA no lado citoplasmático do envelope nuclear, atuando na desmontagem do complexo ribonucleoproteico. Nesse processo, Dbp5 atuaria dissociando o ligante heterodimérico Mex67-Mtr2 do mRNP (LUND & GUTHRIE, 2005) através de competição direta pelo sítio de ligação ao mRNA ou às outras proteínas (revisado em STEWART, 2007). Além disso, Dbp5 também remodela o mRNP pelo deslocamento da proteína ligante de RNA Nab2 [Nab – *Nuclear Polyadenylated RNA-binding* (TRAN *et al.*, 2007)]. Contudo, análises *in vitro* demonstraram que individualmente Dbp5 apresenta baixa atividade helicase (WEIRICH *et al.*, 2006). Por isso, necessita ser ativada a partir da interação com Gle1 (Gle – *GLFG lethal*), um componente do filamento citoplasmático do CPN, e com InsP₆ (Hexafosfato de inositol), uma pequena molécula ancorada em Nup42 (também denominada de Rip1), que estimula essa interação (Figura 8) (WEIRICH *et al.*, 2006; ALCÁZAR-ROMÁN *et al.*, 2006). Essa associação com outros componentes potencializa a atividade ATPase dependente de RNA (SCHMITT *et al.*, 1999) e, conseqüentemente, a função helicase de Dbp5 (Figura 9). Adicionalmente, Gle1 também interage com o mRNP através de ancoramento em Nucleoporina Gfd1 e associação ao ligante Nab2 do mRNP (SUNTHARALINGAM *et al.*, 2004). Outro fator de exportação, Gle2 (homólogo de RAE1 – *Ribonucleic acid export 1* – em *Schizosaccharomyces pombe* e ortólogo em humano de mrnp41), foi encontrado em *Saccharomyces cerevisiae* a partir de um mesmo *screening* genético que identificou Gle1 e demonstrado ser essencial na exportação de mRNA (MURPHY *et al.*, 1996), através de conservada interação com Mex67 (revisado em REED & HURT, 2002)

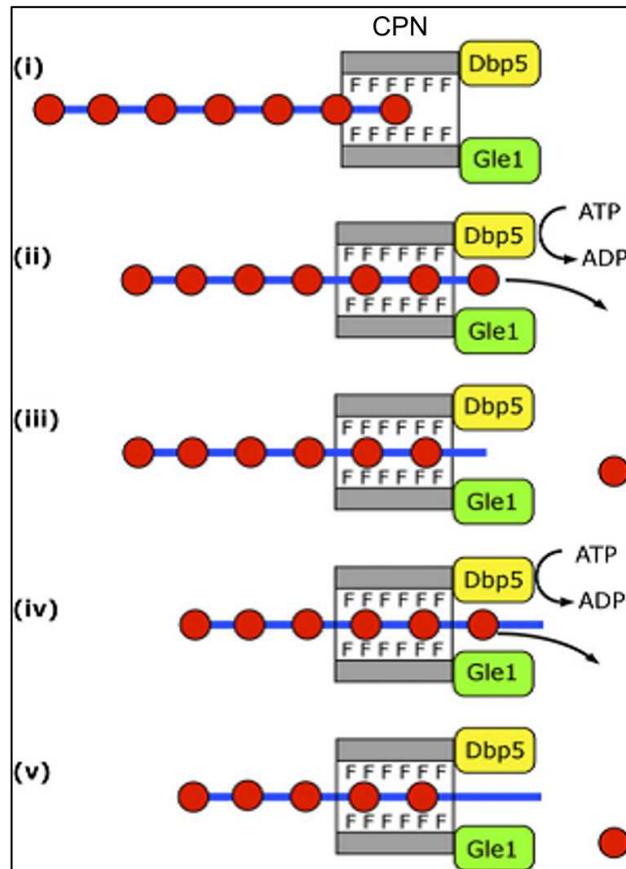


FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO SEQÜENCIAL E ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE HELICASE DE Dbp5 NO REMODELAMENTO DE mRNP. Dbp5 é ativada por Gle1 e pela hidrólise de ATP, resultando na liberação de mRNA (linha azul) para o lado citoplasmático através do deslocamento de mRNPs como o heterodímero Mex67-Mtr2 e Nab2 (vermelho). CPN = Complexo do poro nuclear; F = repetições FG presentes em nucleoporinas; i-iv representação sequencial da etapa de remodelamento [retirado de STEWART (2007)].

Baseando-se ante o exposto, a caracterização de proteínas envolvidas no transporte de RNA mensageiro do compartimento nuclear para a face citoplasmática denota-se fundamentalmente importante no conhecimento da arquitetura molecular de *T. cruzi*. As vias de exportação de mRNA têm sido amplamente descritas em outros organismos eucariotos, principalmente em *Saccharomyces cerevisiae* e *Homo sapiens*. Contudo, até o momento, pouco é conhecido em relação a *Trypanosoma cruzi* e somente o trabalho unilateral de Cuevas *et al.* (2005) demonstra a existência de vias de exportação nuclear através do receptor de transporte Crm1, porém, não apresenta descrição da maquinaria envolvida.

Análises de bioinformática realizadas pelo nosso grupo (SERPELONI *et al.*, 2011a) revelam que algumas proteínas envolvidas na exportação nucleocitoplasmática de mRNA encontram-se conservadas ao longo da filogenia, incluindo em *T. cruzi*. Dentre essas, uma proteína RNA helicase apresentou alta similaridade com Dbp5 de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo denominada de **TcDbp5**. Dbp5 foi caracteristicamente descrita como componente da via de exportação, atuando na etapa de liberação do transcrito para o citoplasma em modelos experimentais. Como o processo de exportação de mRNA apresenta-se passível de regulação em *T. cruzi*, visto que os mecanismos de controle da expressão gênica são avaliados preponderantemente por processos pós-transcricionais, esse estudo visou à caracterização funcional de TcDbp5 como potencial proteína envolvida na translocação de mRNA do núcleo para o citoplasma.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Caracterização funcional de TcDbp5 na via de exportação de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a associação de TcDbp5 com proteínas de poro nuclear.
 - Meta 1 – Buscar proteínas nucleoporinas de *T. cruzi* por análise comparativa utilizando sequências caracterizadas em outros tripanossomatídeos;
 - Meta 2 – Clonar sequências gênicas de Nucleoporinas em vetor de expressão em *E. coli*, purificar a proteína recombinante e obter antissoros anti-Nucleoporina em camundongo;
 - Meta 3 – Localizar nucleoporinas em CPN de *T. cruzi* nas frações subcelulares através de ensaios de microscopia de fluorescência.
 - Meta 4 – Analisar a associação de TcDbp5 com proteínas de poro nuclear através de ensaios de imunoprecipitação.
- Analisar TcDbp5 por localização celular.
 - Meta 1 – Clonar a sequência do gene de TcDbp5 de *T. cruzi* em vetor de expressão de proteína recombinante em *E. coli*, purificar proteína recombinante e obter antissoro policlonal através de inoculação da proteína em camundongos Balb/c e coelhos;
 - Meta 2 – Clonar a sequência do gene de TcDbp5 em vetor de expressão de proteínas fusionadas a proteína GFP (*green fluorescent protein*) em *T. cruzi*;
 - Meta 3 – Localizar a proteína TcDbp5 em frações nucleares e citoplasmáticas de *T. cruzi* através de fracionamento celular;

Meta 4 – Localizar TcDbp5 através de ensaios de microscopia ótica de fluorescência e microscopia eletrônica.

- Analisar domínios funcionais de TcDbp5 através de modelagem molecular por homologia estrutural.
- Analisar a associação de TcDbp5 com a maquinaria de tradução.
 - Meta 1 – Realizar o fracionamento de extrato proteico de *T. cruzi*, após tratamento com cicloheximida e puromicina;
 - Meta 2 – Realizar o fracionamento de extrato proteico de *T. cruzi* submetidas a estresse, após tratamento com cicloheximida e puromicina;
 - Meta 3 – Analisar a associação de TcDbp5 com polissomos através de ensaios de *Western blot*.
- Verificar se TcDbp5 migra (*shuttle*) entre o núcleo e o citoplasma.
 - Meta 1 – Analisar o acúmulo de TcDbp5 no núcleo após tratamentos de parasitas com Leptomicina B, droga que inibe a exportação de proteínas;
 - Meta 2 – Analisar a associação de TcDbp5 com a exportina TcCrm1 através de ensaios de imunoprecipitação.
- Analisar a colocalização de TcDbp5 com RNA mensageiro.
 - Meta 1 – Analisar a localização de mRNA através de FISH;
 - Meta 2 – Analisar a colocalização de TcDbp5 com mRNA por FISH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Busca de proteínas nucleoporinas de *T. cruzi* por análise comparativa utilizando sequências caracterizadas em outros tripanossomatídeos

Em DeGrasse *et al.* (2009) foi realizada a proteômica por espectrometria de massa de proteínas do complexo do poro nuclear de *T. brucei* associado à análise de bioinformática. Além disso, Neumann *et al.* (2010) também descreveram algumas nucleoporinas de *T. brucei* por outros métodos *in silico*. Desse modo, baseando-se nas sequências apresentadas nesses trabalhos, foram realizadas buscas sistemáticas das sequências de proteínas em bancos de dados de *T. cruzi* através de BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) às caracterizadas ortólogas de *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae*. Foi também utilizada ferramenta de alinhamento por Clustal W para análise de domínios conservados em *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae* após busca de ortólogos no banco de dados de *Trypanosoma cruzi*. Foram utilizados parâmetros com altos valores de critério (E-value = 0, Similaridade > 60%) para aumentar o grau de confiabilidade.

3.2. Modelagem molecular por homologia estrutural de TcDbp5

Esta etapa foi executada em parceria com Dr. João Renato Carvalho Muniz (*University of Oxford*). Assim, foram executadas análises através de modelagem molecular por homologia estrutural. Para isso, buscas por proteínas homólogas utilizando as estruturas primárias foram realizadas com o auxílio do programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e o banco de estruturas tridimensionais depositadas no banco de dados de proteínas [PDB (WESTBROOK *et al.*, 2002)]. Alinhamentos baseados em estruturas secundárias entre proteínas que apresentaram menor identidade sequencial foram realizados através do programa GenTHREADER (McGUFFIN & JONES, 2003).

Os modelos moleculares foram construídos para os alvos identificados com o emprego da técnica baseada em restrições espaciais, implementadas pelo programa MODELLER 9v3 (SALI & BLUNDELL, 1993). Foram utilizados critérios

para aumentar o grau de liberdade, facilitar a modelagem de regiões de laços e voltas, assim como, para refinar a predição e a análise comparativa no modelo gerado.

3.3. Soluções

- AP *Buffer* (tampão de reação para fosfatase alcalina) – Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.
- Solução I (solução de suspensão) – Glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0.
- Solução II (solução de lise) – SDS 1%, NaOH 0,2 N.
- Solução III (solução de neutralização) – Acetato de potássio pH 4,8 (3M de potássio), Ácido acético (5 M de acetato na soma final de acetato).
- Solução de bloqueio para *Western blot* – Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%; Leite em pó desnatado 5%.
- Solução de bloqueio para microscopia eletrônica de transmissão – BSA 3%; Gelatina de peixe 0,5%; Tween 20 0,02% diluídos em PBS pH 8,0.
- Solução de brometo de etídio – Brometo de etídio 0,5 µg/ml em água destilada.
- Solução de coloração por prata – Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%.
- Solução de descoloração para SDS-PAGE – Metanol 30%, Ácido acético 10%, Água ultra pura 60%.
- Solução de estocagem de células cálcio competentes – 100 mM CaCl₂; 10 mM Hepes pH 7,0; Glicerol 10%.
- Solução de fixação de SDS-PAGE – Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%.
- Solução de lavagem de imunoprecipitação – Trietanolamina 0,2 M pH 8,0 diluído em PBS 1X.
- Solução de lavagem IMP – KCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; Hepes 10 mM pH 7,0; Nonidet P-40 1%.
- Solução de lise para técnica de palitagem (*toothpick*) – NaOH 50 mM; Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, Azul de bromofenol 0,025% em água deionizada.

- Solução de preparo de células cálcio competentes – CaCl_2 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0.
- Solução de revelação de prata – Para 100 ml, Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização.
- Solução de sensibilização para coloração por prata – Tiosulfato de Sódio 0,02%.
- Solução de término de revelação de prata – Etanol 50%; Ácido Acético 12%.
- Solução para coloração de gel de proteína – Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%.
- Solução PBS/Tween 0,1% – Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%.
- Solução Ponceau S – Ponceau S (Sigma P-3504) 0,5%; Ácido acético glacial 1%.
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6X – Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol 0,25%; Glicerol 30%.
- Tampão de amostra de proteína 4X (TA 4X) – Tris-HCl 0,16 M pH 6.8; SDS 4%; β -mercaptoetanol 10%; Glicerol 24%; Azul de bromofenol 0,02%.
- Tampão de *crosslinking* – DMP 0,02 M diluído em solução de lavagem de imunoprecipitação.
- Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X – Tris-base 25 mM; Glicina 0,192 M; SDS 0,1%.
- Tampão de eletroporação de *T. cruzi* – NaCl 140 mM; Hepes ácido 25 mM; Na_2HPO_4 0,74 mM.
- Tampão de lise hipotônica para extração de DNA genômico de *T. cruzi* – Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl_2 10mM, NaCl 10 mM.
- Tampão de lise hipotônica para fracionamento subcelular de *T. cruzi* – Hepes 10 mM pH 7,5; MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM; DTT 0,5 mM e inibidor de protease EDTA-free.
- Tampão de pré-tratamento – Formamida 35%, BSA 0,02% diluídos em Tampão SSC 2X, adicionados de 25 μg de tRNA/ml, 0,98 mg de esperma de salmão (Sigma) por ml e 40 U de RNaseOUT (Invitrogen).
- Tampão de sonicação de proteínas – NaCl 500 mM, Triton X-100 2%, Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

- Tampão de suspensão de proteínas – NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-HCl 10 mM; Uréia 8 M pH 8,0.
- Tampão de transferência para *Western blot* – Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.
- Tampão NKM – 40 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, pH 7,4
- Tampão PBS 10x – NaCl 0,137 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM.
- Tampão TBE 1X – Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0.
- Tampão TE – Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.
- Tampão TKM – 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂ e 300 mM KCl.
- Tampão TKMP – 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂ e 500 mM KCl.
- Tampão SSC 20 X – Citrato de sódio pH 7,0 0,3 M e NaCl 3 M.
- Tampões de lavagem e eluição de proteínas recombinantes por coluna Ni-NTA (Qiagen):
 - Tampão A – GuHCl 6 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,01 M pH 8,0.
 - Tampão B – Uréia 7 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 8,0.
 - Tampão C – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 6,3.
 - Tampão D – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 5,9.
 - Tampão E – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 4,5.
 - Tampão F – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 4,0.
 - Tampão G – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 3,5.
 - Tampão H – Uréia 8 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris-Cl 0,1 M pH 3,0.

3.4. Cultivo e manutenção de microrganismos

3.4.1. *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone *Dm 28c* (CONTRERAS *et al.*, 1988) em fase de crescimento exponencial foram mantidas em culturas axênicas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28°C. A cada quatro dias as células foram transferidas para novo meio de cultivo.

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas através de metaciclogênese *in vitro*, baseando-se em Contreras *et al.* (1985) com modificações, conforme descrito no item 3.6.

3.4.2. *Escherichia coli*

- Linhagem DH5 α TM – {F- *recA1 endA1 hsdR17* (*rk*⁻, *mk*⁺) *supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*}.
- Linhagem BL21(DE3) pLysSTM – {F- *ompT hsdSB* (*rB*⁻*mB*⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (*Cm*^R)}

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura LB a 37°C durante 16 horas. Para BL21(DE3) pLysS foi acrescido cloranfenicol na concentração final de 50 μ g/ml. Para a estocagem, células em fase de crescimento exponencial foram mantidas em igual volume de glicerol a -70°C e em nitrogênio líquido.

3.5. Meios de cultura

3.5.1. Meio LB (Luria – Bertani)

	(g/l)
Bacto-triptona.....	10,00
NaCl.....	5,00
Extrato de levedura.....	5,00

LB-ágar – LB acrescido de 1,5% de ágar-ágar.

3.5.2. Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

	(g/l)
Infusão de fígado	5,00
NaCl.....	4,40
KCl.....	0,40
Glicose.....	2,20
Triptose.....	5,00
Fosfato dibásico de sódio	11,56
Extrato de levedura.....	15,00
Hemina	0,02
Soro fetal bovino	10%
Penicilina	10000 U

3.5.3. Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*)

	mM
NaCl.....	190,00
CaCl ₂	2,00
KCl.....	17,00
MgCl ₂	2,00
Tampão fosfato pH 6,0	8,00

3.5.4. Meio TAU 3AAG pH 6,0

Meio TAU suplementado com:

	mM
Glicose.....	10,00
Ácido L-aspártico	2,00
Ácido L-glutâmico	50,00
L-Prolina	10,00

3.6. Metaciclogênese *in vitro*

O processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor e pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas permitindo isolar células em vários estágios de diferenciação deste parasita (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988).

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, formas epimastigotas em final de fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 7000xg por 5 minutos a 10°C. As células foram suspensas em meio TAU com densidade de $5,0 \times 10^8$ células/ml e incubadas a 28°C durante 2 horas (CONTRERAS *et al.*, 1985). Após esse período de estresse nutricional, os parasitas foram inoculados na concentração final de $5,0 \times 10^6$ células/ml em meio TAU 3AAG e incubados a 28°C sem agitação durante 96 horas. Durante este período, os parasitas aderiram nas paredes das garrafas de cultivo e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se do substrato.

Para obtenção das células aderidas após 12 e 24 horas, o sobrenadante da cultura foi descartado e as formas aderidas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura com tampão NKM [NaCl 40 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES 10 mM pH 7,4 (BONALDO *et al.*, 1988)].

Para a obtenção de formas metacíclicas purificadas, foi coletado o sobrenadante da cultura e em seguida realizada cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 – Whatman) (CONTRERAS *et al.*, 1985).

Para a obtenção dos extratos proteicos das diferentes formas de *T. cruzi* durante a metaciclogênese, os parasitas foram lavados com PBS adicionado de inibidores de protease e suspensos em tampão de amostra de proteínas (Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%; β-mercaptoetanol 2,5%; Glicerol 6%; Azul de bromofenol 0,005%), seguido de fervura a 100°C por 5 minutos.

3.7. Eletroforese

3.7.1. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose conforme descrito em Sambrook & Russel (2001). As amostras foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese de DNA (Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol 0,25%; Glicerol 30%) e aplicadas em gel de agarose 0,8-2% (diluídas em tampão TBE 1X) submerso em tampão TBE, juntamente com o marcador de peso molecular [*1kb plus DNA Ladder* (Invitrogen)].

A corrida eletroforética foi realizada a 90V e, em seguida, o DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (Brometo de etídio 0,5 µg/ml em água destilada) e visualizado em transluminador acoplado a sistema de fotodocumentação.

3.7.2. Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas por gel vertical desnaturante SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS), conforme o descrito por Laemmli (1970). Os volumes das soluções utilizadas para montagem dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 1. As amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra de proteína, fervidas a 95°C por 5 minutos, centrifugadas a 14000xg por 2 minutos e o sobrenadante aplicado no gel, juntamente com um marcador de peso molecular [*BenchMark™* (Invitrogen) ou SDS-7B (Sigma)]. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 30 mA e, aproximadamente, 150 V.

TABELA 1 - SOLUÇÕES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE

	Gel de empilhamento	Gel de Corrida		
	5%	10%	13%	15%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	2,95 ml	3,8 ml	4,4 ml
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM)	-	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8 (concentração final 120 mM)	0,6 ml	-	-	-
H ₂ O ultra pura	3,7 ml	5,5 ml	4,6 ml	4,0 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%)	35 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Volume Final	5 ml	10 ml	10 ml	10 ml

3.7.2.1. Coloração por Azul de Coomassie

Os géis SDS-PAGE, após corrida eletroforética das amostras, foram corados em solução para coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%) por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os géis foram incubados com solução de descoloração para SDS-PAGE (Metanol 30%, Ácido acético 10%, Água ultra pura 60%) para retirada do excesso do corante e visualização das proteínas.

3.7.2.2. Coloração por Nitrato de Prata

Para coloração de maior sensibilidade em géis SDS-PAGE, alternativamente, foi utilizada a marcação por nitrato de prata. Para isso, o gel foi incubado em solução de fixação de SDS-PAGE (Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%) por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, lavado 3 vezes com solução de Etanol 50%. Posteriormente, o gel foi incubado com solução de sensibilização para coloração por prata (Tiosulfato de Sódio 0,02%) por 2 minutos, lavado com água ultrapura por 3 vezes e incubado com solução de coloração por prata (Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%) por 30 minutos. Após lavagem com água, a revelação foi realizada com solução de revelação de

prata (para 100 ml: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização). A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (Etanol 50%; Ácido Acético 12%).

3.8. Clonagem molecular de sequências nucleotídicas

3.8.1. Extração de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* Dm 28c

A extração de DNA de *T. cruzi* Dm 28c foi realizada como descrito em Fragoso & Goldenberg (1992). Assim, o total de 5×10^{10} células cultivadas em meio LIT foram separadas por centrifugação a 7000xg por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 20 ml de tampão de lise hipotônica (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; NaCl 10 mM) e lisadas pela adição de Nonidet P-40 de concentração final 1% por 3 minutos a 4°C. A fração contendo os núcleos celulares foi concentrada através de três ciclos de centrifugação a 8000xg por 10 minutos a 4°C. Esta fração foi digerida com proteinase K 100 µg/ml por 12 horas em 5 ml de solução contendo NaCl 10 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,5%; Tris-HCl 10 mM pH 7,6. O DNA foi extraído com fenol saturado em Tris-Base 100 mM e dialisado três vezes com 20 ml de solução contendo NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

3.8.2. Amplificação gênica de TcDbp5, TcCrm1 e Nucleoporinas

Para a amplificação das regiões codificantes de TcDbp5 (SERPELONI *et al.*, 2011a), TcCrm1 (identificada em Cuevas *et al.*, 2005) e Nucleoporinas de *T. cruzi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) desenhados a partir de suas sequências nucleotídicas. A reação foi realizada em volume final de 100 µl contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 1 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, tampão *High Fidelity PCR 1X*, MgSO₄ 2 mM e água deionizada q.s.p.

TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica	
TcDbp5	TcDbp5F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGGGAGACGTCGAGCAAATAG</u> 3'	
	TcDbp5R	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>AGAACTGGTCCGCAATATTTGCA</u> 3'	
TcDbp5 (clonagem em vetor pTREXGFP)	TcDbp5XbaIF	5' <i>TTCTAGATGTACCTGTCCCGGTAAGGAAATGCC</i> 3'	
	TcDbp5EcoRIR	5' <i>GAAATCTGAAACGCACGAAACGAAAAGAACCACCG</i> 3'	
TcCrm1	TcCrm1F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGGAGTCCATTTTGGACACAAGT</u> 3'	
	TcCrm1R	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>ATCCACCGTGATGTCAAGTGTCTTTTC</u> 3'	
Nucleoporinas	TcNup95	TcNup95F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGTCTATGCTTCACGATGTGTGAG</u> 3'
		TcNup95R	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>ATAGGGATGCCAGTTCATCAATAA</u> 3'
	TcNup(HsNup98)	TcNup(HsNup98)F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGGTTGATGCACCTCCTCCGCTCG</u> 3'
		TcNup(HsNup98)R	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>ATAGGAAAAGTTCCGGCCAAATCTC</u> 3'
	TcNup147A	TcNup147AF	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGGAGCCACGGGAAGGTGTAATG</u> 3'
		TcNup147AR	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>ATAATCTAAAGAGAGCGGAATGTATGC</u> 3'
	TcNup147B	TcNup147BF	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>ATGTCTCTTTAGATGACAGCAAATCACCCCT</u> 3'
		TcNup147BR	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT <u>ATAGAAAACAGGCCTGGACGTTAGCCGACTT</u> 3'

Em negrito, está a sequência *attB* adicionada à extremidade 5' do *primer*. Em sublinhado, estão destacadas as sequências que transcrevem os *códons* de início (ATG) e de término (CTA). Em itálico, estão demonstrados as sequências nucleotídicas de reconhecimento para as enzimas de restrição XbaI e EcoRI. F – oligonucleotídeo iniciador *forward*; R - oligonucleotídeo iniciador *reverse*.

As condições de amplificação referentes aos ciclos consistiram de 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos (conforme descrição na Tabela 3 para cada gene), e um ciclo a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8-2%. O tamanho esperado em pares de bases (pb) de cada produto de amplificação foi detalhado na Tabela 3.

Os amplicons obtidos foram precipitados e purificados através de solução 30% PEG 8000/MgCl₂ 30 mM, incluído no sistema *Gateway* (Invitrogen) e o protocolo seguinte foi realizado conforme o recomendado pelo fabricante.

TABELA 3 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GÊNICOS

Proteína	Ciclagem 30x			Tamanho esperado / total
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	
TcDbp5	94°C / 30 segundos	57°C / 30 segundos	72°C / 1,5 minutos	1185 pb ou 1182 pb* / 1188 pb
TcCrm1	94°C / 30 segundos	57°C / 30 segundos	72°C / 1 minuto	536 pb / 3105 pb
Nucleoporinas	TcNup95	94°C / 1 minuto	58°C / 1 minuto	2565 pb / 2586 pb
	TcNup(HsNup98)	94°C / 1 minuto	58°C / 1 minuto	2256 pb / 3036 pb
	TcNup147A	94°C / 1 minuto	58°C / 1 minuto	2202 pb / 3981 pb
	TcNup147B	94°C / 1 minuto	58°C / 1 minuto	1791 pb / 3981 pb

*Tamanho esperado para TcDbp5: 1185 pb (com códon de terminação), 1182 pb (sem códon de terminação para clonagem em vetor pTREXGFP).

3.8.3. Clonagem entre inserto e plasmídeo da plataforma Gateway e vetor pTREXGFP

Os oligonucleotídeos desenhados para a reação de PCR continham na extremidade 5', a seqüência de reconhecimento *attB* (Tabela 2) para a reação posterior de recombinação com o sítio *attP* do vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway (Invitrogen) (Figura 10).

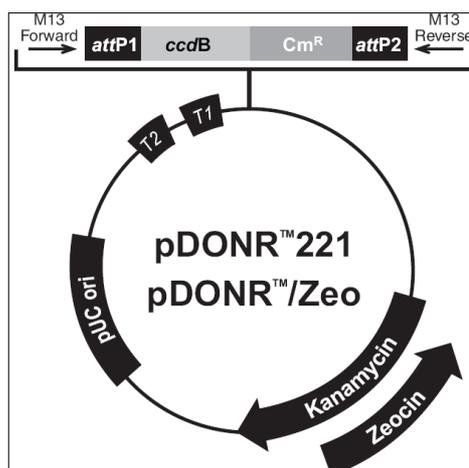


FIGURA 10 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN). *Kanamycin* = marca de resistência a Canamicina; *Zeocin* = marca de resistência a Zeomicina.

Com os insertos purificados, os amplicons de TcDbp5, TcCrm1 e Nucleoporinas obtidos anteriormente por PCR foram submetidos à primeira reação de recombinação com o vetor de entrada pDONRTM221 utilizando a enzima BP clonaseTMII (Invitrogen). Selecionados os plasmídeos recombinantes (conforme item 3.8.4.3. e 3.8.4.4.), a segunda reação (Figura 11) foi realizada para a recombinação com o vetor de destino específico (pDESTTM17, para expressão de proteína recombinante, ou pTcPR-GFPN, este somente para TcDbp5 e para fusão de etiqueta GFP na extremidade N-terminal da proteína), através da ação da enzima LR clonaseTMII (Invitrogen). As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

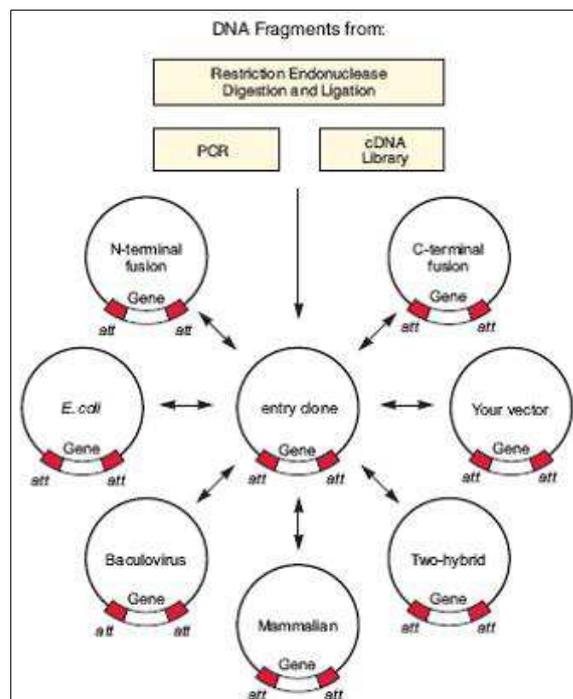


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA GATEWAY (INVITROGEN). Inicialmente é obtido o inserto gênico contendo nas extremidades o sítio de recombinação *attB*. A primeira reação de recombinação utilizando a enzima BP clonaseTMII, o fragmento gênico é inserido no vetor de entrada. A segunda reação acontece pela atividade da enzima LR clonaseTMII entre o clone de entrada e um vetor de destino.

Para a clonagem em vetor de fusão GFP na extremidade C-terminal, a região codificante de TcDbp5 foi amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores TcDbp5XbaIF e TcDbp5EcoRIR contendo nas extremidades 5' os sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição XbaI (Amersham) e EcoRI (Invitrogen), respectivamente. O produto amplificado, assim como o plasmídeo de pTREXAmaSPGFP (Figura 12) (gentilmente cedido pelo Dr. Wanderson Da Rocha, cujo vetor estava clonado com o gene de Amastina) foram submetidos a digestão com as endonucleases de restrição XbaI e EcoRI, de acordo com as recomendações do fabricante. O inserto preparado foi ligado ao vetor (digerido, sem fragmento gênico de Amastina) utilizando-se a relação molar 1:3 (plasmídeo:produto da PCR). A reação de ligação foi realizada por 16 horas a 16°C utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen), conforme especificações do fabricante.

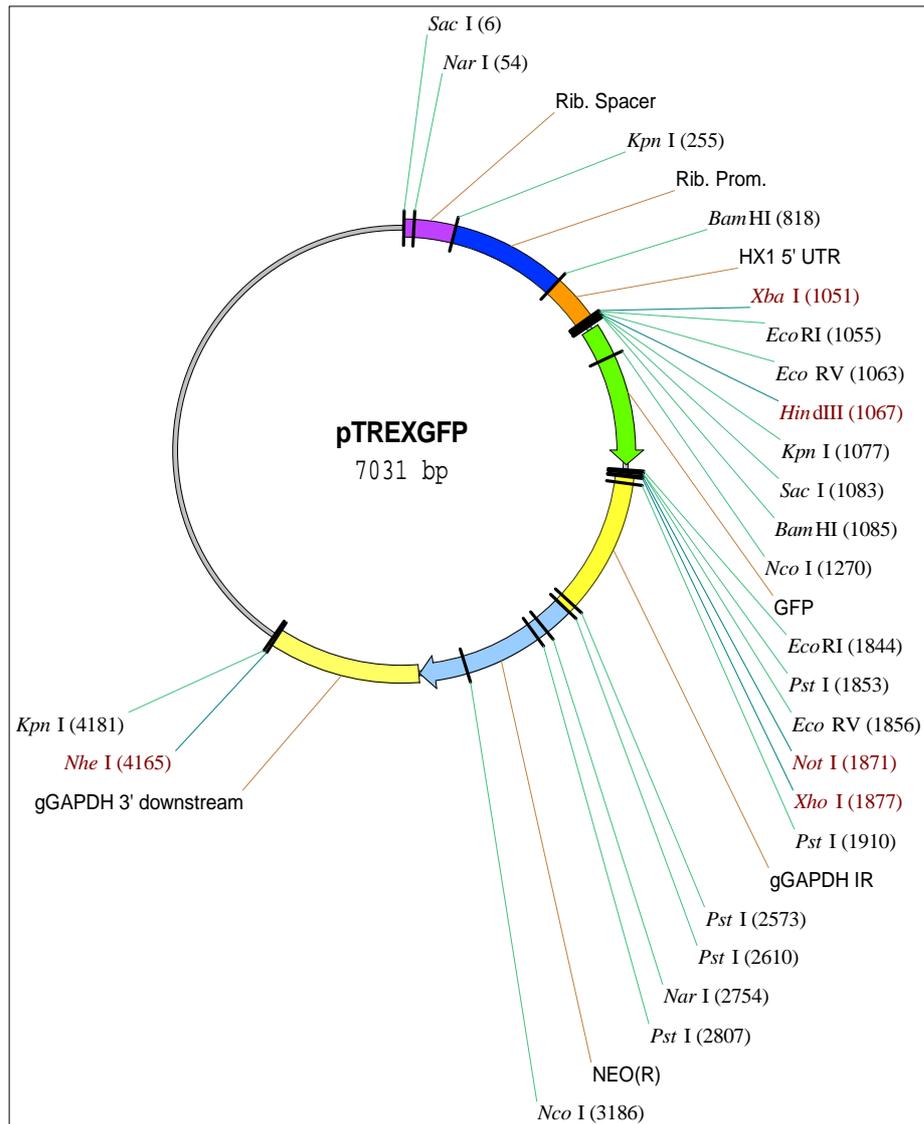


FIGURA 12 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DO VETOR pTREGFP (DaROCHA *et al.*, 2004). gGAPDH 3' downstream = sítios para poliadenição do gene da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH). HX1 = Região promotora de rRNA HX. NEO(R) = marca de resistência a Neomicina.

3.8.4. Transformação e seleção de clones recombinantes

3.8.4.1. Preparo das células competentes

Para o preparo das células competentes, foi utilizado o método do cloreto de cálcio descrito em Sambrook & Russel (2001). Assim, uma colônia da bactéria *E. coli* foi inoculada em 2 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado. A cultura foi

incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante (200 rpm). Um volume de 1,0 ml (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (DO₅₅₀ entre 0,4 e 0,6).

A cultura foi centrifugada (4000xg por 5 minutos a 4°C), as células foram suspendidas em 50 ml (metade do volume da cultura original) de solução de preparo (CaCl₂ 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0) gelado e mantidas no gelo durante 30 minutos. A suspensão foi submetida a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e as células foram suspendidas em 2,0 ml (1/50 do volume original) de solução de estocagem (CaCl₂ 100 mM; Hepes 10 mM pH 7,0; Glicerol 10%). As células foram aliquotadas e mantidas no gelo por pelo menos duas horas antes da transformação ou estocadas a -70°C.

3.8.4.2. Transformação de *E. coli*

Para a transformação dos produtos de recombinação BP e LR e da reação de ligação pTREXGFP-TcDbp5 foi utilizada a linhagem DH5αTM de *E. coli*. A expressão das proteínas recombinantes de plasmídeos selecionados foi realizada em *E. coli* BL21(DE3) pLysS cálcio-competente.

As reações de recombinação e de ligação dos insertos com os respectivos vetores foram incubadas no gelo por 30 minutos com 50-100 µl de *E. coli* preparadas anteriormente (item 3.8.4.1). Após esse período, a mistura foi incubada a 42°C durante 2 minutos e mais 2 minutos no gelo. Cerca de 1,0 ml de meio LB foi adicionado aos tubos e as células foram incubadas a 37°C por uma hora, antes do plaqueamento. Diferentes diluições das bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (meio LB; ágar 1,5%; Canamicina 30 µg/ml para transformação da recombinação com pDONR ou Ampicilina 100 µg/ml para pDEST17, pTcPR-GFPN e pTREXGFP) com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas.

3.8.4.3. Análise dos plasmídeos recombinantes através da técnica de palitagem (*toothpick*)

Para a análise dos plasmídeos recombinantes em vetor de destino pTcPR-GFPN e pTREXGFP foi utilizada a técnica de palitagem ou *toothpick*. Assim, as colônias crescidas no meio seletivo foram removidas com o auxílio de um palito estéril e transferidas para o fundo de um tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 15 µl de solução de lise (NaOH 50 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,5%; Glicerol 5%; Azul de bromofenol), homogeneizado em vórtex e incubado em banho Maria a 65°C por 10 minutos. Após, o lisado foi centrifugado e o sobrenadante aplicado em gel de agarose 0,8% não submerso em tampão TBE. O volume de tampão foi completado assim que a amostra foi carregada para dentro da malha de agarose. Os vetores pTcPR-GFPN sem inserto e pTREXamaSPGFP (apresentando um total de 7119 pb) foram utilizados como controle para as respectivas clonagens.

3.8.4.4. PCR de colônia

Para a seleção de clones das reações de recombinação, as colônias crescidas em meio seletivo foram coletadas e diluídas em 100 µl de água bidestilada. Deste, 1 µl foi utilizado como *template* para a reação de amplificação por PCR. A quantidade dos reagentes foi adicionada proporcionalmente, conforme já descrito anteriormente (item 3.8.2), para um volume final de 20 µl utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Previamente, as amostras foram aquecidas a 94°C durante 10 minutos e, posteriormente, foram submetidas aos ciclos específicos (Tabela 3) de desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão de cada um dos fragmentos gênicos. As amostras foram analisadas em gel de agarose.

Para confirmar a clonagem dos plasmídeos recombinantes, as amostras foram enviadas para *Macrogen* (Coréia do Sul) para sequenciamento. Foi utilizado o sequenciamento do tipo *single extention* e o protocolo seguido foi estabelecido pela empresa.

3.8.5. Extração de DNA plasmidial

Para extração dos plasmídeos recombinantes foi utilizado o método da lise alcalina segundo Birnboim & Doly (1979), com algumas modificações. O método baseia-se na desnaturação seletiva, em pH alcalino, de DNA cromossômico de alto peso molecular. Após a neutralização do pH, o DNA cromossômico renatura formando um precipitado insolúvel com os restos celulares, enquanto o DNA plasmidial permanece em solução, podendo ser recuperado após precipitação com etanol.

As colônias selecionadas (item 3.8.4.3. ou 3.8.4.4.) foram inoculadas em 2 ml de meio seletivo acrescido de antibiótico específico. As culturas foram incubadas a 37°C durante 18 horas sob agitação constante e, em seguida, centrifugadas a 10000xg durante 2 minutos. O sedimento foi suspenso em 100 µl de solução I (solução de suspensão: Glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução II (solução de lise: SDS 1%, NaOH 0,2 N) e homogeneizado por inversão. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de solução III [solução de neutralização: Acetato de potássio pH 4,8 (3M de potássio), Ácido acético (5M de acetato na soma final de acetato)] e também homogeneizado por inversão. A seguir, a mistura foi centrifugada 15 minutos a 10000xg e o DNA plasmidial contido no sobrenadante foi precipitado com 500 µl de isopropanol. O material foi centrifugado 10 minutos a 10000xg e submetido à lavagem com 1,0 ml de etanol 70% gelado. Após novamente centrifugado a 13000xg por 10 minutos, o sedimento foi secado e suspenso em 30 µl de água deionizada estéril ou tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

Para ensaios utilizando o clone positivo nas reações de recombinação, os plasmídeos recombinantes foram extraídos e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e, nos processos de transfecção em *T. cruzi*, foi utilizado o kit de extração *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Ambas as purificações foram realizadas conforme descrição em protocolo padrão do fabricante.

3.9. Expressão de proteína recombinante

Bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) pLysS cálcio-competente foram transformadas com os plasmídeos recombinantes isolados para TcDbp5, TcCrm1 e nucleoporinas clonados em vetor pDESTTM17. Colônias selecionadas foram inoculadas em 2 ml de meio LB contendo cloranfenicol e ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C durante 18 horas sob constante agitação. Um volume de 200 µl (inóculo de 1:10) desta cultura foi transferido para 2 ml do mesmo meio. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até atingir a fase de crescimento exponencial (DO_{600} entre 0,6 e 0,8). IPTG foi adicionado às culturas em concentração final de 1 mM e a incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições. Culturas sem adição de IPTG também foram realizadas (controles não induzidos). As culturas induzidas e os controles foram sedimentados a 4000xg por 10 minutos a 4°C e lavadas em PBS. O sedimento foi suspenso em PBS, seguido da adição de tampão de amostra para proteínas. Os extratos protéicos foram desnaturados por aquecimento a 95°C por 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10 ou 13%.

3.10. Purificação de proteína recombinante

O método de purificação das proteínas foi padronizado utilizando cultura induzida no volume de 200 ml. O controle não induzido foi feito em paralelo sob as mesmas condições, sem adição de IPTG, como descrito no item anterior (item 3.9).

As culturas induzidas e não induzidas foram submetidas à centrifugação a 6000xg por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com PBS e suspenso em 5 ml de tampão de sonicação (NaCl 500 mM, Triton X-100 2%, Tris-HCl 20 mM pH 8,0).

A lise das células foi realizada através de sonicação por 5 pulsos de 15 segundos na potência máxima. O lisado foi submetido à centrifugação a 6000xg por 10 minutos e o sedimento foi então suspenso em solução de purificação (Uréia 2M, NaH_2PO_4 100mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 2%).

Após sucessivas lavagens com tampão de purificação, o material foi submetido à centrifugação a 6000xg por 10 minutos e o sedimento suspenso em

tampão de suspensão de proteínas (NaH₂PO₄ 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Uréia 8M). Estes procedimentos de lavagens foram realizados para verificar a otimização do enriquecimento da fração contendo a proteína recombinante.

Após as etapas de enriquecimento, as proteínas foram purificadas através de cromatografia com coluna de Níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (AUSUBEL *et al.*, 1987). Esta coluna possui afinidade pela cauda de seis histidinas que é acoplada à proteína recombinante devido à engenharia do vetor pDESTTM17 (Figura 13).

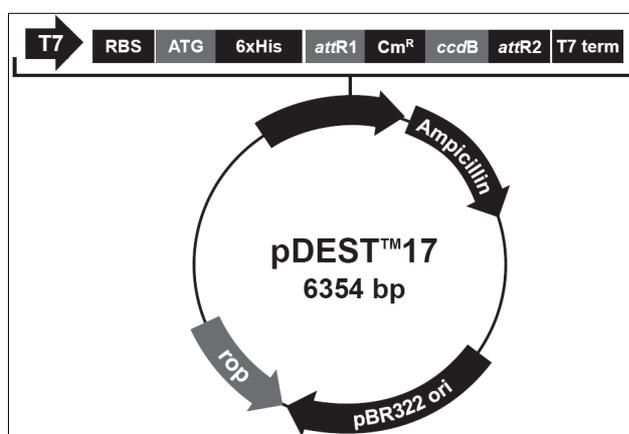


FIGURA 13 - MAPA GENÉTICO DO VETOR DE DESTINO pDESTTM17 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN). *Ampicilin* = marca de resistência a Ampicilina.

A fração enriquecida contendo a proteína recombinante, equivalente ao volume de 5 ml, foi incubada com 1 ml de Ni-NTA (Qiagen) sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade. Para as lavagens e eluições das proteínas através de gradiente de pH foi utilizado o protocolo do kit Ni-NTA *Spin Kit Handbook* (Qiagen).

A alternativa posterior à eluição pela coluna de Ni-NTA, em casos onde a eficiência de purificação foi baixa, foi o gel preparativo SDS-PAGE, de 15 cm de largura por 10 cm de altura. As amostras foram agrupadas, adicionadas de tampão de amostra de proteínas em volume final de 5 ml e inoculadas em um único poço para eletroforese por 16 horas a 20 mA. Após este período, o gel foi incubado em solução de KCl 100 mM gelada para visualização e isolamento da fração do gel correspondente à proteína recombinante. Em seguida, a fração foi eletroeluída em membrana de diálise por 2 horas a 60V em tampão SDS-PAGE.

3.11. Obtenção de anticorpo policlonal em coelho e camundongo

Os anticorpos foram produzidos em camundongo no laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP5 – Universidade Estadual de Londrina) – Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UEL) sob nº catalogado 47/09. A concentração da proteína purificada foi quantificada de modo a ser inoculado aproximadamente 100 µg por camundongo. A amostra foi misturada ao adjuvante de Freund completo para otimizar a imunogenicidade. Foram realizadas três inoculações, intercaladas por um período de 10 dias entre elas. O antissoro anti-TcDbp5 também foi produzido em coelho por *Célula B - Serviço de Produção de Anticorpos Monoclonais e Policlonais* (Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul), de acordo com o protocolo da prestadora de serviços.

3.12. Purificação de antissoro policlonal em coelho

O antissoro anti-TcDbp5 obtido de coelho foi submetido à purificação. Para isso, o equivalente a 1 mg de proteína recombinante purificada foi imobilizada em membrana de nitrocelulose após ser transferida de gel SDS-PAGE em tampão de transferência por *Western blot* a 20V por 16 horas a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau S (Ponceau S 0,5%, Ácido acético glacial 1%) por cinco minutos e a fração correspondente a proteína recombinante foi recortada. A membrana, então, foi incubada em solução de bloqueio para *Western blot* (Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%; leite em pó desnatado 5%) por uma hora sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi mantida em contato com o antissoro a 4°C durante 18 horas.

Para eluição, a membrana foi transferida para um tubo e o anticorpo foi eluído com solução de Glicina 2 M pH 2,5 durante 2 minutos. O pH foi restabelecido para 7,0 com Tris-HCl 1 M pH 9,5.

3.13. Ensaio do tipo *Western blot*

As proteínas em gel SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond N⁺, Amersham Biosciences) através de corrente elétrica a 20 V por 16 horas a 4°C em tampão de transferência para *Western blot*. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por cinco minutos e posteriormente descorada em água bidestilada para a verificação da transferência. A membrana foi incubada em solução de bloqueio para *Western blot* por uma hora sob agitação suave à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário contra a proteína de interesse em diluições padronizadas e a membrana foi mantida por uma hora a 37°C sob agitação. Para análise da expressão diferencial das proteínas recombinantes fusionadas à etiqueta de 6 histidinas na extremidade amino-terminal, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina (Gibco) na diluição de 1:3000.

3.13.1. Revelação por Fosfatase Alcalina

Nesse ensaio foi utilizada a marcação do anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (TOWBIN *et al.*, 1970). A membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com solução PBS/Tween 0,1% (Tampão PBS, Tween 20 0,1%). A membrana foi, então, incubada por 1 hora a 37°C sob agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou de camundongo conjugados com a enzima fosfatase alcalina (Promega) na diluição de 1:7500 em PBS/Tween 0,1%. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente. A reação imunoenzimática foi revelada com os substratos NBT a 50 mg/ml (Promega) e BCIP a 50 mg/ml (Promega) em tampão da fosfatase alcalina (*AP Buffer*). Após a revelação, esta reação foi interrompida por solução de EDTA 100 mM.

3.13.2. Revelação por peroxidase (Quimioluminescência)

Para aumentar a sensibilidade de revelação, alternativamente foi utilizado o método quimioluminescente. Assim, após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e incubação com o anticorpo primário, foram realizadas 3 lavagens de 15 minutos com solução PBS/Tween 0,1%, seguido de incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:8000 por 1 hora a 37°C. O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através do kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A exposição foi feita em filme (Kodak) durante 1 minuto e a revelação foi obtida na ausência de luz, em solução de revelação seguido de lavagem por 1 minuto em água e 1 minuto em solução de fixação. Os tempos de revelação foram padronizados para cada experimento.

3.14. Localização celular de proteínas através de microscopia

3.14.1. Localização de proteínas por microscopia ótica

Os anticorpos produzidos em camundongo foram utilizados para a localização da proteína endógena por ensaios de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica de transmissão. Para imunofluorescência, conforme descrito em Holetz *et al.* (2007), as lâminas foram incubadas com poli-L-lisina por 37°C durante 20 minutos, seguido de lavagem com água ultrapura. Formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas submetidas a estresse em meio TAU foram centrifugadas, suspensas em PBS e, posteriormente, aderidas e fixadas em para-formaldeído 4% nas lâminas previamente preparadas. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, foi adicionado Triton X-100 0,1% durante 2 minutos e, novamente, lavadas com PBS. O bloqueio da lâmina foi realizado através da adição de PBS contendo BSA 1% por 16 horas a 4°C em câmara úmida. O soro contendo anticorpos primários contra proteína recombinante foi, então, incubado, sob diluição

padronizada para cada proteína, por uma hora a 37°C. Para retirar o excesso de anticorpo da lâmina, foram realizadas duas lavagens com PBS. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 ou Alexa 546) por uma hora a 37°C, seguido de lavagens com PBS. Para a coloração do material genético foram acrescentado DAPI (estoque 1 mg/μl), na diluição 1:1000, em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de lavagens com PBS. Foi então adicionado N-propil-galato e as lâminas foram lacradas utilizando lamínula de microscopia e selador. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon E600), as imagens capturadas com câmara CoolSnap PROcf (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics). As imagens com melhor resolução foram obtidas a partir do microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

3.14.2. Transfecção de *T. cruzi* e localização de TcDbp5 fusionada a GFP

Uma segunda abordagem utilizada para localização de TcDbp5 foi a expressão da proteína do parasita fusionada com GFP. Neste caso, o gene de TcDbp5 clonado em vetor pDONRTM221 foi transferido pela atividade da enzima LR clonase II para o vetor pTcPR-GFPN com etiqueta na extremidade amino produzido no ICC (BATISTA *et al.*, 2010). Para a fusão GFP à extremidade carboxi-terminal, foi utilizado o vetor pTREXGFP, conforme já descrito anteriormente (item 3.8.3). A seleção dos clones foi especificada nos itens 3.8.4.3 e 3.8.4.4. Assim, um total de 1×10^8 formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 7000xg. Após lavagem com PBS estéril, 4×10^7 células foram suspensas em 0,4 ml de tampão de eletroporação de *T. cruzi* (NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM) e transferidas para cubeta de eletroporação de 0,2 mm pré-resfriada. Em seguida, foram adicionados 50 μg de DNA (pTcPR-GFPN-TcDbp5 e pTREXGFP-TcDbp5) às células e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. A mistura foi submetida à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500 μF utilizando eletroporador GenePulser[®] II Apparatus (Bio-Rad) e mantidas novamente por 10 minutos no gelo. Em seguida, as células foram

transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 ml de meio LIT e incubadas a 28°C durante 24 horas. A seleção dos parasitas foi feita através da incubação em meio contendo G418 e para controle da seleção formas epimastigotas foram eletroporadas sem a presença de DNA. Após o período de recuperação, foi acrescentado G418 na concentração final de 250 µg/ml na cultura e depois de 72 horas, foi realizada a passagem de diluição 1:4 dos parasitas em meio contendo G418 na concentração final de 500 µg/ml. As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que fosse observada a morte completa da células da cultura controle (sem adição de DNA). As células resistentes à droga foram selecionadas em intervalo de 10 a 20 dias.

Após esse período, formas epimastigotas da população transfectada foram visualizadas diretamente em microscopia ótica de fluorescência. Conforme já descrito anteriormente, as lâminas foram preparadas com poli-L-lisina e formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas foram centrifugadas, lavadas duas vezes e suspendidas em PBS. Posteriormente, foram fixadas em para-formaldeído 4% e aderidas por 20 minutos nas lâminas previamente preparadas e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS. Para a coloração nuclear e do cinetoplasto foram acrescentado DAPI em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de lavagens com PBS. Foi então adicionado N-propil-galato e as lâminas foram lacradas utilizando lamínula de microscopia e selador. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência, conforme descrito no item 3.14.1

3.14.3. Imunocitoquímica ultraestrutural: localização de TcDbp5 por microscopia eletrônica de transmissão

Nos ensaios de microscopia eletrônica, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram fixadas em solução contendo Glutaraldeído 0,3%, Formaldeído 4% e Ácido pícrico 1% diluídos em tampão Cacodilato 0,1 M pH 7,2. Após lavagem nesse tampão, os parasitas foram desidratados a -20°C em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2X em 100%) a 4°C, por 1 hora em cada etapa. Em seguida, o material foi infiltrado em resina Unycril (Pelco) a baixa temperatura, nas condições: etanol 100%: resina Unycril (2:1) a -20°C por 16 horas; etanol 100%: resina Unycril (1:1)

por 8 horas a -20°C e etanol 100%: Unicryl (1:2) a -20°C por 16 horas. Posteriormente, o material foi incluído em resina pura a -20°C e a polimerização da resina foi realizada em cápsulas BEEM a 20°C por 72 horas, sob luz UV. Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrotomo Leica Reichert Ultracuts.

Para a determinação da localização das proteínas no parasita por imunocitoquímica ultraestrutural as grades contendo cortes ultrafinos foram incubadas com NH₄Cl 50 mM por 30 minutos e, em seguida, com solução de bloqueio (BSA 3%; Gelatina de peixe 0,5%; Tween 20 0,02% diluídos em PBS pH 8,0) durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com o anticorpo anti-TcDbp5 produzido em camundongo e diluído 1:50 em solução de bloqueio durante 1 hora. Após lavagem em PBS, as grades foram então tratadas por 30 minutos em solução de bloqueio e depois incubadas por 45 minutos com IgG anti-camundongo acoplado a partículas de ouro coloidal de 10 nm diluído 1:250 em solução de bloqueio. No controle, a incubação do material com o antissoro primário foi omitida. Após o procedimento imunocitoquímico e lavagens com solução de bloqueio, as preparações foram contrastadas com Acetato de uranila e Citrato de chumbo e observadas em microscópio de transmissão Zeiss EM-900.

3.15. Localização de TcDbp5 por fracionamento subcelular

Baseando-se em Roberts *et al.* (1998), um total de $2,5 \times 10^8$ células foram coletadas e centrifugadas a 6000xg durante cinco minutos, suspensas em 775 µl de tampão de lise hipotônica (Hepes 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM; DTT 0,5 mM e inibidor de protease EDTA-free) e incubadas no gelo por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µl de NP-40 10% e as células foram lisadas através de rápida mistura no vórtex. A lise foi interrompida através da adição de 125 µl de solução de sacarose 2 M. O tubo foi centrifugado a 4000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e o precipitado foi suspenso em PBS em igual volume do sobrenadante. As frações citoplasmática (sobrenadante) e nuclear (*pellet*) foram, então, submetidas à análise através de ensaio do tipo *Western blot* (item 3.13), utilizando o anticorpo anti-TcDbp5 (diluição 1:500) e, como controle citoplasmático, anticorpo anti-TcDhh1 [na diluição de 1:100, produzido em

coelho e gentilmente cedido pela Dra. Fabíola B. Holetz (HOLETZ *et al.*, 2007)] e, como controle nuclear, anti-TcH2A [diluição de 1:500, produzido em camundongo e gentilmente cedido pela Dra. Gisele Picchi].

3.16. Sedimentação de polissomos através de gradiente de sacarose

O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através de ultracentrifugação de extratos citoplasmáticos em gradiente de sacarose segundo Brecht & Parsons (1998). O extrato citoplasmático de 1×10^9 formas epimastigotas e formas submetidas a estresse em meio TAU (descrito no item 3.6) de *T. cruzi* (cultivadas em crescimento exponencial) foi obtido após o tratamento com 100 µg/ml de cicloheximida por 10 minutos a 28°C. As células foram centrifugadas a 7000xg por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão TKM (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM; KCl 300 mM) gelado adicionado de cicloheximida 100 µg/ml. Após descartar o sobrenadante, as células foram suspensas em 900 µl de tampão TKM suplementado com 100 µg/ml de cicloheximida, 10 µg/ml de heparina, 10 µM de E-64, 10 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para um novo tubo contendo 100 µl de tampão de lise (tampão TKM suplementado com 10% (v/v) de NP-40 e Sacarose 2 M) e homogeneizado no vórtex rapidamente. O lisado foi então centrifugado a 16000xg a 4°C por 5 minutos e 400 µL do sobrenadante foi adicionado sobre o gradiente de sacarose linear (15-55%), preparado em tampão TKM acrescido de inibidores 1 mM PMSF, 10 µM E-64.

Para ensaios com puromicina, 1×10^9 formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas submetidas a estresse foram tratadas com 2 mM de puromicina por 1 hora a 28°C. Os parasitas foram centrifugados a 6000xg durante cinco minutos e suspensos em 900 µl of tampão TKMP (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 2 mM; KCl 500 mM, puromicina 1 mM) suplementado com 10 µg/ml de heparina, 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF. As células foram lisadas com a adição de 100 µl tampão TKMP suplementado com NP-40 10% e 2 M sacarose. O lisado foi centrifugado e 400 µl do sobrenadante foram adicionados ao topo do gradiente de sacarose (15–55%) preparado com tampão TKMP e adicionado de inibidores 1 mM PMSF, 10 µM E-64.

Todos os gradientes foram centrifugados a 192000xg por 2 horas a 4°C em ultracentrífuga.

Após centrifugação, foram coletados 500 µl de cada fração utilizando o sistema de separação de gradiente ISCO. Este equipamento é destinado à coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorbância contínuo (filtro 256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento foi obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 60%) que foi injetada perfurando-se a base do tubo que contém o gradiente previamente centrifugado. O volume de 30 µl de cada fração foi usado, então, para ensaios de *Western blot* (conforme item 3.13), utilizando anticorpo anti-TcDbp5. Como controle do isolamento polissomal, foi utilizado o anticorpo policlonal contra a proteína ribossomal S7 (GRADIA *et al.*, 2009), cedido gentilmente por Ms. Flávia Sá Pereira de Souza.

3.17. Localização de TcDbp5 em *T. cruzi* tratados com Leptomicina B

Parasitas com 3 dias de crescimento foram tratados baseado em dados de Cuevas *et al.* (2005). Assim, 3×10^7 células tratadas e não tratadas com Leptomicina B (Sigma) na concentração de 500 ng/ml durante 5 horas foram submetidas a ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-TcDbp5, conforme item 3.14. Também foi utilizado, como controle, parasitas tratados com o mesmo volume de metanol 70%, solução de dissolução de LMB.

3.18. Imunoprecipitação

Para o preparo da resina, 15 µl de soro contendo anticorpo anti-TcDbp5, foram diluídos em 135 µl de PBS/BSA (1 mg/ml) e incubados com 50 µl de proteína A sefarose (Sigma) (para antissoro produzido em coelho) sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após isso, a resina foi centrifugada a 600xg por 1 minuto e o anticorpo não ligado foi lavado em solução de PBS/BSA. A reação de *crosslinking*,

para fixação do anticorpo à resina covalentemente, foi realizada com tampão de *crosslinking* (DMP 0,02 M diluído em Trietanolamina 0,2 M pH 8,0) por três vezes durante 30 minutos sob agitação, intercalada por centrifugação a 600xg por 1 minuto e lavagem com solução de lavagem de imunoprecipitação (Trietanolamina 0,2 M pH 8,0 diluído em PBS 1X). A reação de *crosslinking* foi parada com 0,05 M de etanolamina pH 8,0 por duas vezes durante 5 minutos, sob agitação e temperatura ambiente, intercalada com incubação em solução de lavagem de imunoprecipitação por 5 minutos. Para remover o excesso de anticorpo não ligado, a resina foi incubada com 200 µl de Glicina 0,2 M pH 2,5 durante 2 minutos e, em seguida, centrifugada. O pH foi ajustado para 8,0 com PBS/Tris-HCl (20 mM pH 8,0). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com soro pré-imune.

Para o preparo do extrato proteico solúvel de *T. cruzi*, 1×10^9 formas epimastigotas foram centrifugadas 6000xg durante cinco minutos e lavadas com PBS por 2 vezes. Em seguida, o *pellet* foi suspenso em tampão de lise hipotônica (HEPES 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM), sem DTT, acrescentados de inibidores 1 mM PMSF e 10 µM E-64, e incubados durante 10 minutos no gelo. Após isso, foi adicionado NP-40 0,5% e homogeneizado por pipetagem. A suspensão foi submetida a sonicação por 1 pulso em potência 2 durante 5 segundos. O lisado foi então centrifugado a 7000xg durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, a concentração de proteína total foi quantificada usando o espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000* (Thermo Scientific) (Leitura ótica a 280 nm) e a concentração de MgCl₂ e KCl foram ajustadas para 5 mM e 100 mM, respectivamente, para aumentar a estringência da ligação entre os complexos ao anticorpo. Aproximadamente 1,5 mg de extrato proteico foi incubado com a resina previamente preparada durante 16 horas a 4°C sob agitação constante.

Os imunoprecipitados foram coletados após centrifugação a 600xg por 1 minuto e lavados com solução de lavagem de imunoprecipitação IMP suplementado com Triton X-100 1% por três vezes. A resina foi, então, suspensa em tampão de amostra de proteínas e submetida a eletroforese em gel de poli-acrilamida para posterior coloração com prata e visualização (item 3.7.2.2.). Os complexos imunoprecipitados foram analisados por *Western blotting* (item 3.13) através de reação com o antissoro específicos anti-TcDbp5 (diluição 1:500), anti-TcCrm1 (diluição 1:100), anti-TcNup95 (diluição 1:500), anti-TcNup(HsNup98) (diluição

1:200), anti-TcNup147 (diluição 1:50), anti-TcMex67 (produzido pelo nosso grupo de pesquisa do ICC, diluição 1:50) e anti-TcH2A (controle negativo, diluição 1:500).

3.19. Localização de mRNA através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para detecção de RNAs mensageiros em *T. cruzi*, inicialmente, as lâminas foram preparadas com poli-L-lisina a 37°C durante 20 minutos e lavadas com água ultrapura. Formas epimastigotas do parasita foram centrifugadas, lavadas duas vezes em PBS, seguido de fixação em para-formaldeído 4% e adesão durante 10 minutos nas lâminas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e os parasitas foram permeabilizados com HCl 0,2 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. As etapas seguintes de pré-tratamento do parasita e hibridização foram realizadas sob condições livres de RNase e baseando-se em Zeiner *et al.* (2003), com modificações. Assim, o parasita foi incubado com tampão de pré-tratamento (Formamida 35%, BSA 0,02% diluído em Tampão SSC 2X) adicionado de 25 µg de tRNA/ml, 0,98 mg de esperma de salmão (Sigma) por ml e 40 U de RNaseOUT (Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C.

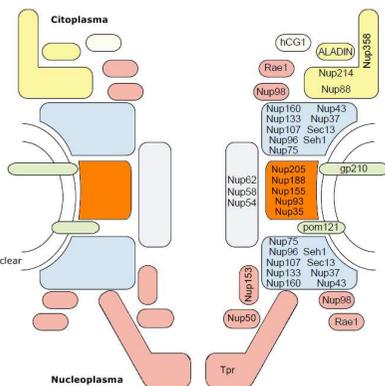
Foram utilizadas sondas de RNA oligo(dT) marcadas com digoxigenina. A sonda foi preparada diluindo 1 µl de sonda (300 ng/µl) para cada 50 µl de tampão de pré-tratamento e incubando a 65°C durante 3 minutos. Após isso, a hibridização com a lâmina ocorreu por 16 horas a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com SSC 2X por duas vezes. A detecção das sondas foi realizada através de anticorpo monoclonal anti-digoxigenina (diluição 1:300) produzido em camundongo (Sigma), conforme descrito em ensaios de imunofluorescência indireta no item 3.14.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de nucleoporinas em *T. cruzi*

Nos trabalhos de DeGrasse *et al.* (2009) e Neumann *et al.* (2010) foram identificadas as principais proteínas do CPN de *Trypanosoma brucei*. No primeiro, foram realizados ensaios de proteômica acoplando a espectrometria de massa às análises de bioinformática, resultando em predição estrutural de domínios de nucleoporinas. Além disso, no mesmo, as sequências gênicas obtidas de Nups foram fusionadas com etiqueta GFP na extremidade carboxi-terminal para embasamento experimental de localização subcelular. No segundo, foram utilizados métodos *in silico* de maior acurácia para identificação de conservação estrutural de proteínas, através do programa HMMer (EDDY, 1998), sendo que algumas nucleoporinas identificadas no primeiro, foram excluídas nesse trabalho (Tabela 4). Com base nesses dados apresentados por esses grupos em *T. brucei*, foi realizada a análise comparativa para identificação de sequências gênicas de Nups similares em *T. cruzi* (Tabela 4). Utilizando as proteínas de *T. brucei* como semente de buscas, foram identificadas proteínas altamente similares em banco de dados de *T. cruzi* utilizando a ferramenta BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As proteínas de *T. cruzi* identificadas a partir desta busca estão dispostas na Tabela 4 e, baseado em dados funcionais das nucleoporinas de metazoários, fungos, *T. brucei*, foram agrupadas conforme a localização no CPN.

TABELA 4 - NUCLEOPORINAS ORTÓLOGAS DE FUNGOS, METAZOÁRIOS E TRIPANOSSOMATÍDEOS



Localização	Nucleoporinas									
	Metazoários	Fungos	<i>T. brucei</i> (DeGrasse <i>et al.</i> (2009), Neumann <i>et al.</i> (2010))		<i>T. cruzi</i>		<i>T. cruzi</i> X <i>T. brucei</i>			
			Anotação	Número de Identificação	Anotação	Número de Identificação	Similaridade	E-value		
Filamentos citoplasmáticos (fibrilas)	Aladin	-	Aladin (TbNup48)	Tb11.02.2120	Aladin (TcNup50)	Tc00.1047053506227.220	73%	1,0e-151		
	Nup214 (CAN)	Nup159	-	-	-	-	-	-		
	MP44	Nup53	-	-	-	-	-	-		
	Rip1/Rab/hCG1	Nup42	-	-	-	-	-	-		
	Nup358 (Ranbp2, Rbp2)	-	-	-	-	-	-	-		
	Nup88	-	-	-	-	-	-	-		
	Ran-Gap1	-	-	-	-	-	-	-		
	Ubc9 (Ube21)	Ubc9	-	-	-	-	-	-		
Nlp1	-	-	-	-	-	-	-			
Anel externo	Complexo Nup107-160	Complexo Nup84	Nup107	Nup84	TbNup89	Tb11.02.0460	TcNup87	Tc00.1047053507771.90	79%	0,0
			Nup75	Nup85	TbNup82*	Tb09.211.4780	-	-	-	-
			Nup160	Nup120	TbNup132*	Tb927.7.2300	-	-	-	-
			Nup133	Nup133	TbNup109*	Tb11.01.7630	-	-	-	-
			Nup96	C-Nup145	-	-	-	-	-	-
			Nup43	-	-	-	-	-	-	-
			Nup37	-	-	-	-	-	-	-
Anel interno	Complexo Nup155	Complexo Nup170	Seh1	Seh1	TbSeh1	Tb11.01.5410	TcSeh1	Tc00.1047053509161.90	80%	2,0e-126
			Sec13	Sec13	TbSec13	Tb10.61.2630	TcSec13	Tc00.1047053506525.20	82%	8,0e-134
			Nup155	Nup157 / Nup170	TbNup144	Tb10.6k15.2350	TcNup147	Tc00.1047053506247.70	79%	0,0
			Nup205	Nup188	TbNup225	Tb1927.4.2880	TcNup142	Tc00.1047053504253.10	67%	0,0
			Nup188	Nup192	TbNup181*	Tb10.6k15.1530	-	-	-	-
Ancoramento / transmembrana	-	-	Nup35	Nup59	-	-	-	-	-	
			Nup93	Nic96	TbNup96	Tb10.6k15.3670	TcNup95	Tc00.1047053510181.50	70%	0,0
			Ndc1	Ndc1	-	-	-	-	-	-
			-	pom34	-	-	-	-	-	-
			-	pom152	-	-	-	-	-	-
Canal central	-	-	gp210 (pom210)	-	-	-	-	-	-	
			Nup62	Nsp1p	TbNup53a	Tb11.01.7200	TcNup84	Tc00.1047053504159.10	56%	2,0e-82
			Nup58/Nup45	Nup49	TbNup98*	Tb927.3.3180	-	-	-	-
Cesta nuclear	-	-	Nup54	Nup57	TbNup62	Tb927.4.5200	TcNup54	Tc00.1047053506419.60	66%	1,0e-142
			Nup98	N-Nup145 / Nup116 / Nup100	TbNup158	Tb11.03.0140	TcNup (HsNup98)	Tc00.1047053506925.440	68%	0,0
			Rae1	Gle2	TbGle2	Tb09.160.2360	TcGle2	Tc00.1047053511577.130	82%	9,0e-138
			Nup153	Nup1	-	-	-	-	-	-
			Nup50 (Npap60L)	Nup2	-	-	-	-	-	-
			Tpr1	Mlp1	TbMlp1 / TbNup110*	Tb11.03.0810	-	-	-	-
Tpr2	Mlp2	TbMlp2 / TbNup92*	Tb09.160.0340	-	-	-	-			

* Sequências excluídas em Neumann *et al.* (2010) pela baixa similaridade estrutural com nucleoporinas conhecidas.

Por esta análise, pudemos identificar em *T. cruzi* um total de 11 nucleoporinas: Aladin (TcNup50), TcNup87, TcSeh1, TcSec13, TcNup147, TcNup142, TcNup95, TcNup84, TcNup54, TcNup(HsNup98) e TcGle2. Entretanto, foram selecionadas apenas algumas dessas nucleoporinas que, em outros organismos, os seus ortólogos apresentavam descrições com a via de exportação de RNA mensageiro. Assim, três candidatas foram escolhidas para análises posteriores, conforme descrição abaixo:

1) TcNup95 (XP_812434.1 / Tc00.1047053510181.50) – ortóloga de Nup96 de *Trypanosoma brucei*, Nic96 de *Saccharomyces cerevisiae* e Nup93 de *Homo sapiens*. Em *Schizosaccharomyces pombe*, Nic96, na via de exportação de mRNA, associa-se com Gle2 conforme demonstrado em Yoon *et al.* (1997). Nesse mesmo estudo, realizando mutações em Nic96 e com ausência da nucleoporina funcional, as células foram submetidas à condição de letalidade. Também foi possível observar o acúmulo nuclear de RNA mensageiro, denotando-a como uma importante nucleoporina para a via.

Em *T. cruzi*, a ortóloga está anotada nos bancos de dados genômicos como uma nucleoporina putativa de massa molecular predita de 95 kDa. TcNup95 apresentou similaridade de 70% e identidade de 55% com E-value de 0,0 quando comparada à seqüência de *Trypanosoma brucei* (Tabela 4). O alinhamento na Figura 14 demonstra a identidade entre as seqüências. TcNup95 apresentou, na estrutura predita, um domínio Nic96, como demonstrado pela Figura 15.

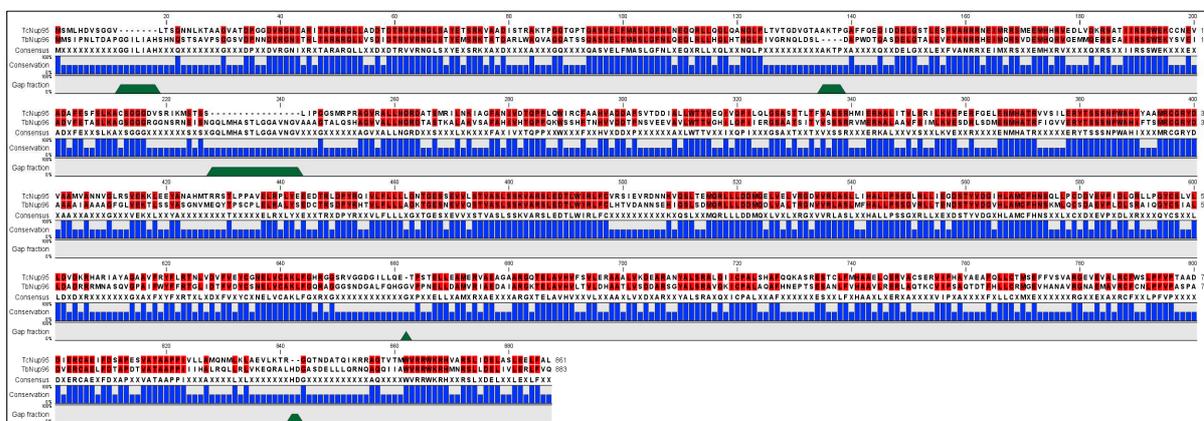


FIGURA 14 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcNup95 E A ORTÓLOGA EM *T. brucei*. Em vermelho, está indicado o alinhamento de seqüências idênticas; em azul, o gráfico apresenta as regiões conservadas entre as seqüências; e, em verde, os locais onde ocorreram *gaps*.

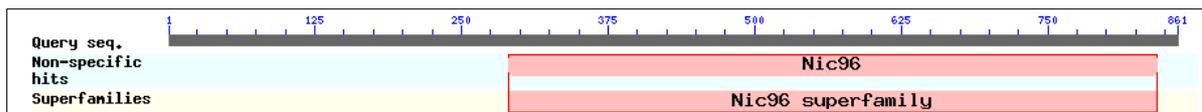
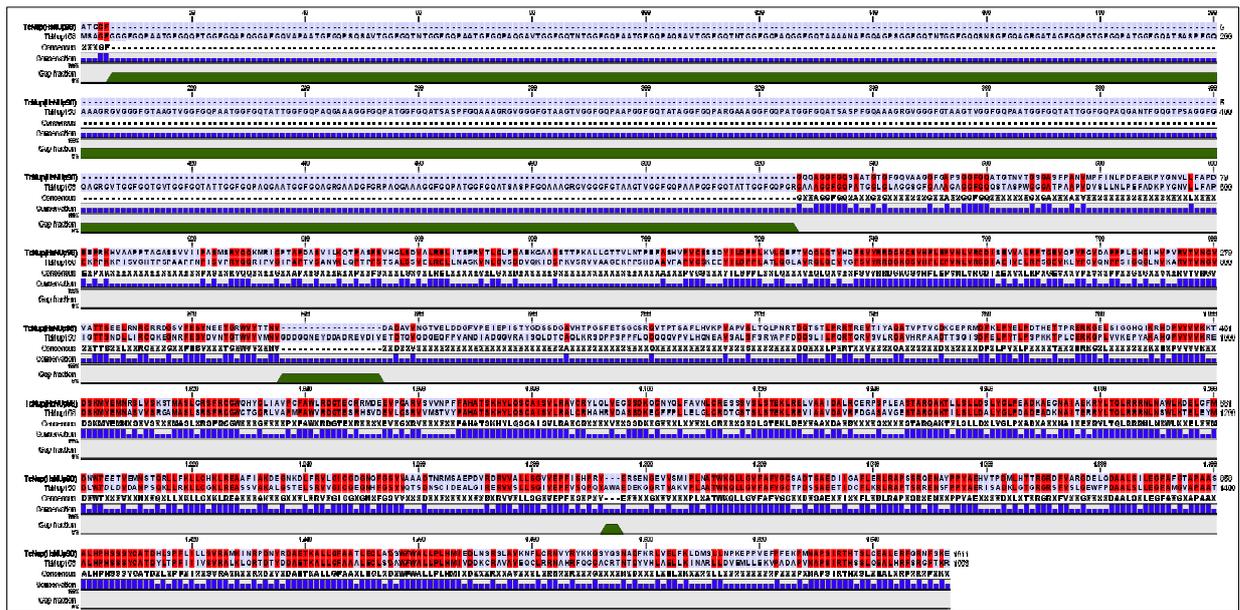


FIGURA 15 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup95. A figura demonstra a presença de domínio Nic96, característica do possível ortólogo de TcNup95 em *S. cerevisiae* Nic96.

2) TcNup(HsNup98) (Tc00.1047053506925.440) – ortóloga de TbNup158 de *T. brucei*, ScNup116/ScNup100/ScNup145 de *S. cerevisiae* e HsNup98/HsNup96 de *H. sapiens*. Os ortólogos são classificados como Nups com inúmeras repetições FG (RADU *et al.*, 1995). Essas repetições apresentaram-se altamente representadas na seqüência de *T. cruzi* (Figura 16-1). Contudo, o gene de *T. cruzi* está anotado nos bancos de dados genômicos como um pseudogene e, possivelmente, isso tenha ocorrido devido a essas repetições na região N-terminal da proteína. Desse modo, não foi possível predizer sua massa molecular. Por ser o ortólogo de HsNup98, a seqüência em *T. cruzi* foi, então, denominado de TcNup(HsNup98). Na via de exportação, seus ortólogos interagem com Gle2 e receptores de transporte Mex67 (BLEVINS *et al.*, 2003) e Crm1 (em humanos) (NEVILLE *et al.*, 1997; OKA *et al.*, 2010).

TcNup(HsNup98) apresentou similaridade de 68% e identidade de 52% com E-value de 0,0 quando comparada a seqüência de *Trypanosoma brucei* como está demonstrado pela Tabela 4 e alinhamento na Figura 16-1. Apesar da não predição da seqüência completa da proteína, o gene de TcNup(HsNup98) apresentou sintenia em relação aos ortólogos em outros tripanossomatídeos (Figura16-2). Além disso, foi identificado um domínio presente em Nup96, a ortóloga em *Homo sapiens*, como demonstrado pela Figura 17.

1) Alinhamento entre TcNup(HsNup98) e TbNup158



2) Sintenia gênica de TcNup(HsNup98)

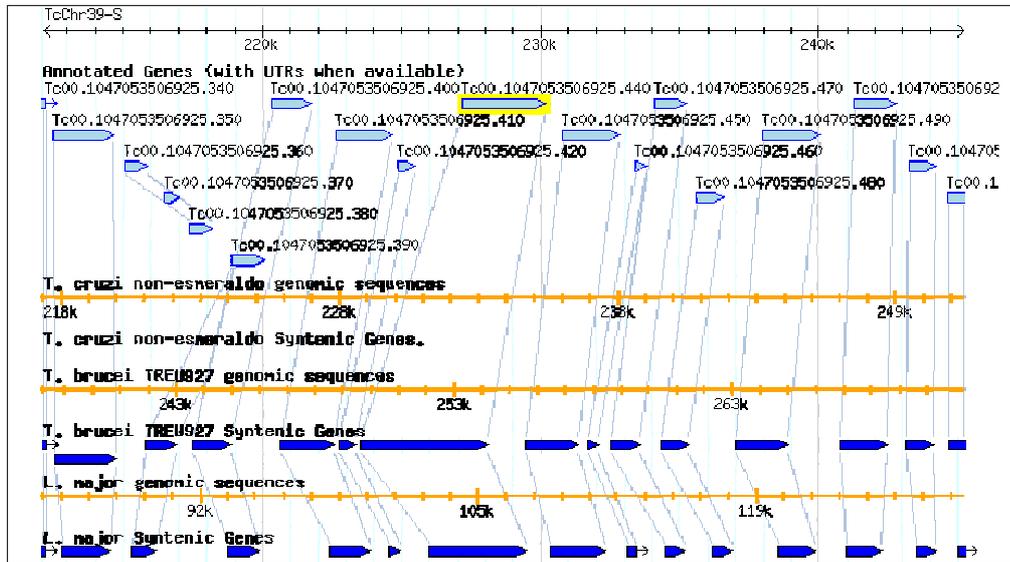


FIGURA 16 - CONSERVAÇÃO DE TcNup(HsNup98) em RELAÇÃO AOS ORTÓLOGOS EM OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS. 1) Alinhamento de seqüência de aminoácidos entre TcNup(HsNup98) e a ortóloga em *T. brucei*. Em vermelho, está indicado o alinhamento de seqüências idênticas; em azul, o gráfico apresenta as regiões conservadas; e, em verde, os locais onde ocorreram gaps. 2) Análise de sintenia cromossômica (ASLETT *et al.*, 2010) de TcNup(HsNup98) com ortólogos em *Trypanosoma brucei* (Tb11.03.0140), *Leishmania major* (LmjF27.0380). Em amarelo, está destacado o gene de TcNup(HsNup98).

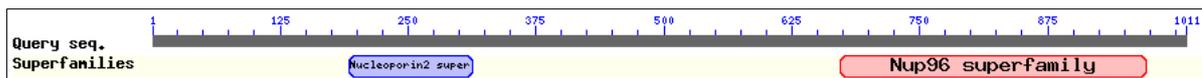


FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup(HsNup98). A figura demonstra a presença de domínio Nup96, característica dos possíveis ortólogos de TcNup(HsNup98) em *H. sapiens* Nup96 e Nup98.

3) TcNup147 (XP_820321.1 / Tc00.1047053506247.70) – ortóloga de TbNup144 de *T. brucei*, ScNup170 / ScNup157 de *S. cerevisiae*, HsNup155 de *H. sapiens*. Em células de mamífero, Nup155 apresenta, na extremidade C-terminal, um domínio de interação com Gle1 (RAYALA *et al.*, 2004). Gle1 é uma importante proteína na via de exportação de mRNA, uma vez que é responsável pela ativação de Dbp5. Como faz parte do complexo Nup155 do anel interno dentro do esqueleto do CPN, Nup155 é uma nucleoporina estrutural e, conseqüentemente, essencial para manutenção do metabolismo celular, inclusive o processo de transporte de mRNA (FRANZ *et al.*, 2005).

Em *T. cruzi*, a sequência, denominada de TcNup147, está anotada nos bancos de dados genômicos como uma provável proteína do complexo do poro nuclear. O alinhamento de TcNup147 com a seqüência de *T. brucei* demonstrou similaridade de 79% e identidade de 64% com E-value de 0,0 (Tabela 4 e Figura 18). A predição quanto a sua massa molecular foi de 147 kDa e apresentou domínios semelhantes aos de Nup170, a ortóloga em *S. cerevisiae*, conforme Figura 19.

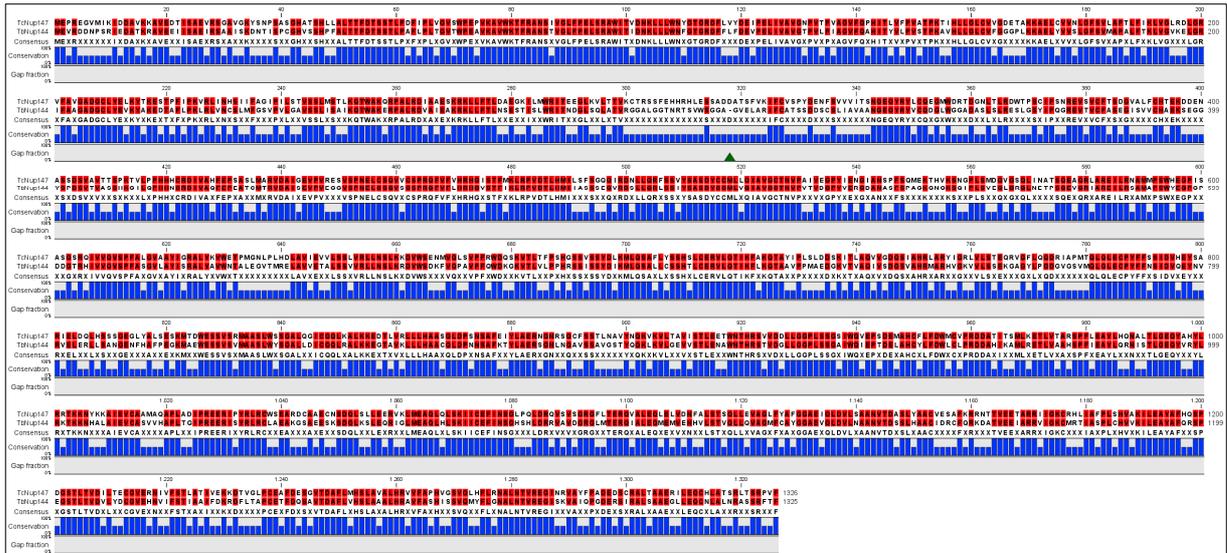


FIGURA 18 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcNup147 E A ORTÓLOGA EM *T. brucei*. Em vermelho, está indicado o alinhamento de sequências idênticas; em azul, o gráfico apresenta as regiões conservadas entre as sequências; e, em verde, os locais onde ocorreram *gaps*.



FIGURA 19 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcNup147. A figura demonstra a presença de domínio Nup170, característica do possível ortólogo de TcNup147 em *S. cerevisiae* ScNup170.

4.2. Clonagem, expressão, purificação de proteína recombinante e produção de anticorpos anti-TcDbp5, anti-TcCrm1 e anti-Nups

No banco de dados do genoma de *T. cruzi*, a proteína correspondente a TcDbp5 (XP_810822.1 / Tc00.1047053506587.40) está anotada como uma provável RNA helicase ATP-dependente e pertencente à família de proteínas DEAD/H com predição de massa molecular de 45 kDa. Já TcCrm1 (XP_818726.1 / Tc00.1047053511725.150), descrita em Cuevas *et al.* (2005) como a ortóloga da exportina Crm1, a massa molecular apresentada foi de 117 kDa.

Assim, as sequências codificadoras correspondentes à TcDbp5, TcCrm1 e às nucleoporinas TcNup95, TcNup(HsNup98) e TcNup147 foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores específicos (Tabela 2) e DNA genômico de *Trypanosoma*

cruzi Dm 28c. As regiões codificadoras completas de TcDbp5 e TcNup95 foram amplificadas quanto à seqüência gênica. TcNup(HsNup98) foi amplificado parcialmente, uma vez que o gene encontrou-se truncado na extremidade 5' e não foi possível determinar o início do gene pelos dados presentes nos bancos genômicos. Para TcNup147 foram selecionadas duas regiões para amplificação denominadas de TcNup147A (correspondendo à porção 5') e TcNup147B (correspondendo a porção 3') devido ao grande tamanho do gene. E para TcCrm1, apenas uma parte do gene (codificante para o domínio CRIME da proteína TcCrm1) foi escolhida para clonagem. Desse modo, conforme apresentado na Figura 20, os produtos de amplificação corresponderam ao tamanho esperado, como especificado na Tabela 3.

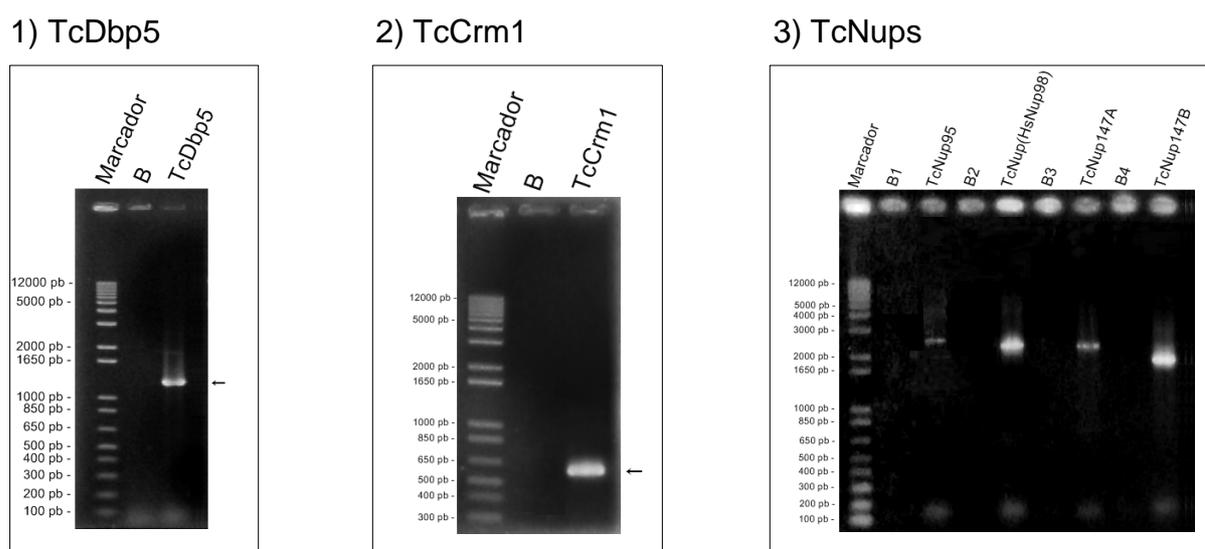


FIGURA 20 - PERFIL ELETRÓFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE DNA GENÔMICO UTILIZANDO OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS. 1) Produto de amplificação de TcDbp5. 2) Produto de amplificação de TcCrm1. As setas mostram a amplificação gênica em 1 e 2 de TcDbp5 e TcCrm1, respectivamente. 3) Produto de amplificação de nucleoporinas TcNup95, TcNup(HsNup98), TcNup147A e TcNup147B. Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = *1Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen). B = branco da reação de amplificação de TcDbp5 e TcCrm1; B1 = branco da reação de amplificação de TcNup95; B2 = branco da reação de amplificação de TcNup(HsNup98); B3 = branco da reação de amplificação de TcNup147A; B4 = branco da reação de amplificação de TcNup147B. Tamanho esperado para TcDbp5 = 1185 pb; TcCrm1 = 536 pb; TcNup95 = 2565 pb; TcNup(HsNup98) = 2256 pb; TcNup147A = 2202 pb; TcNup147B = 1791 pb.

As regiões codificadoras purificadas de cada fragmento gênico foram inseridas no vetor de entrada pDONR™221 através da reação de recombinação

utilizando a enzima BP clonase II. Para todos os insertos, foram obtidos clones no vetor pDONR™221 e estes foram utilizados para a reação de recombinação LR no vetor de destino pDEST™17 para expressão da proteína recombinante. Essa reação envolveu a inserção dos fragmentos gênicos, de modo que a proteína recombinante e o motivo de histidina fossem traduzidos na mesma fase de leitura. Neste sistema, a adição desse motivo ocorre na posição amino-terminal da proteína recombinante. A etapa de análise e seleção dos plasmídeos recombinantes em vetor pDONR™221 e pDEST™17 foi realizada após transformação em bactéria *E. coli* linhagem DH5α™ através de PCR de colônia. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 48 a 53 de Anexo.

Posteriormente, foram realizadas as purificações dos clones recombinantes referentes a TcDbp5, TcCrm1, TcNup95, TcNup(HsNup98) e TcNup147A e TcNup147B por minipreparação de plasmídeo. A eficiência desse procedimento foi verificada através da visualização por eletroforese de DNA em gel de agarose para cada plasmídeo, como mostrado na Figura 21. A clonagem foi confirmada através do sequenciamento das amostras (dados não apresentados), enviadas para a prestadora de serviços *Macrogen* (Coréia do Sul).

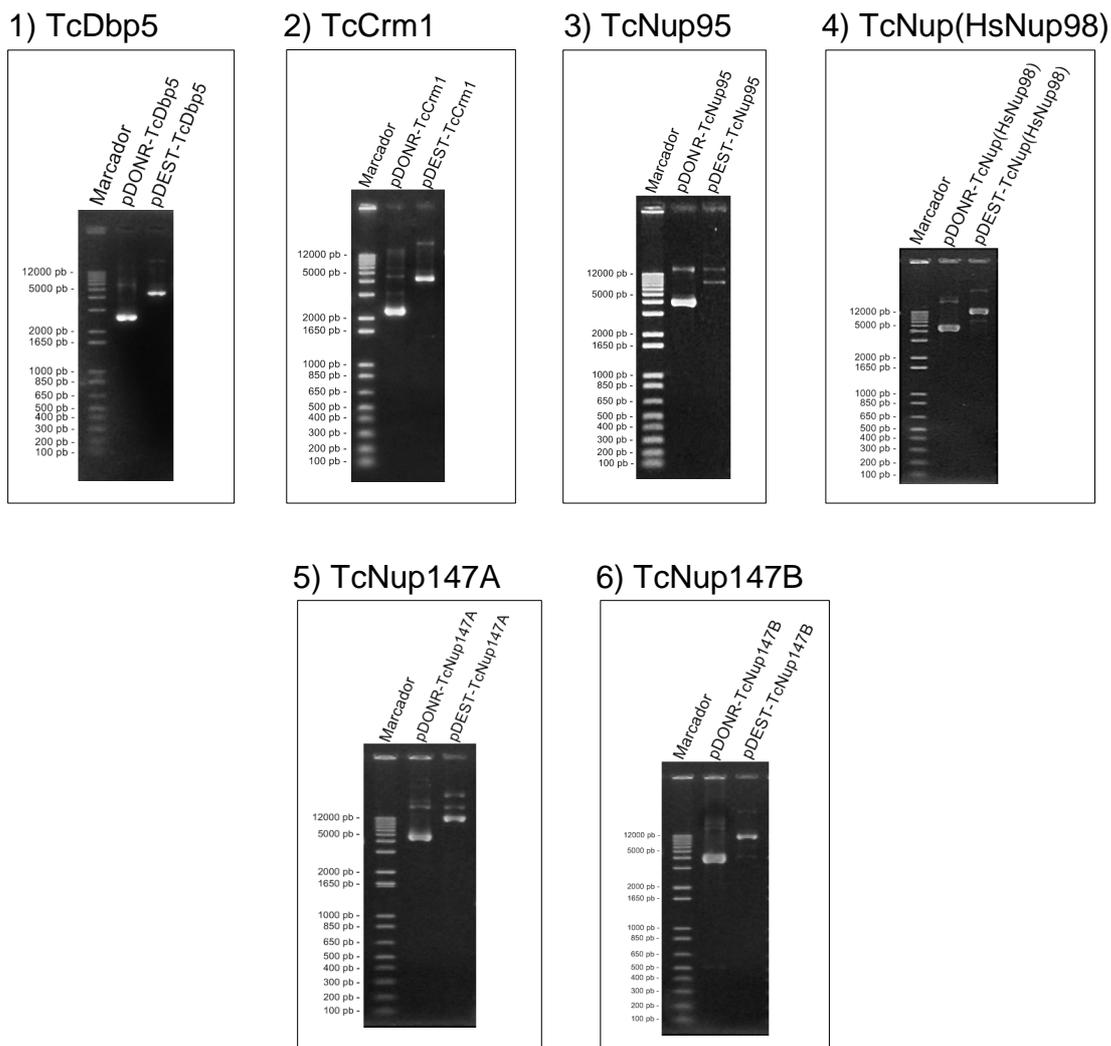


FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES POSITIVOS PURIFICADOS ATRAVÉS DE MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO. Minipreparação de plasmídeo de clones positivos em vetor pDONRTM221 e pDESTTM17 para TcDbp5, TcCrm1, TcNup95, TcNup(HsNup98), TcNup147A e TcNup147B, respectivamente em 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

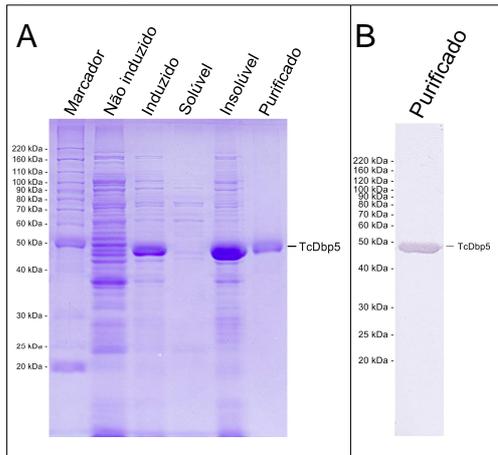
Os plasmídeos correspondentes à clonagem em vetor pDESTTM17 para cada inserto gênico (pDEST-TcDbp5, pDEST-TcCrm1, pDEST-TcNup95, pDEST-TcNup(HsNup98), pDEST-TcNup147A e pDEST-TcNup147B) foram utilizados para transformação em bactérias cálcio-competentes *E. coli* BL21(DE3) pLysS, linhagem compatível com o vetor para a indução da expressão da proteína recombinante. Então, a alta expressão de cada proteína recombinante foi possível após indução com IPTG 1 mM (Figura 22) e em quase todos os casos as proteínas recombinantes foram expressas apresentando a massa molecular esperada [aproximadamente 45

kDa para TcDbp5, 20 kDa para TcCrm1, 95 kDa para TcNup95, 90 kDa para TcNup(HsNup98), 66 kDa para TcNup147B]. A exceção ocorreu para TcNup147A pois não foi possível visualizar a expressão da proteína recombinante (dados não mostrados). Logo, para TcNup147, como a expressão da região A não foi viável procedeu-se as etapas seguintes somente com o fragmento B.

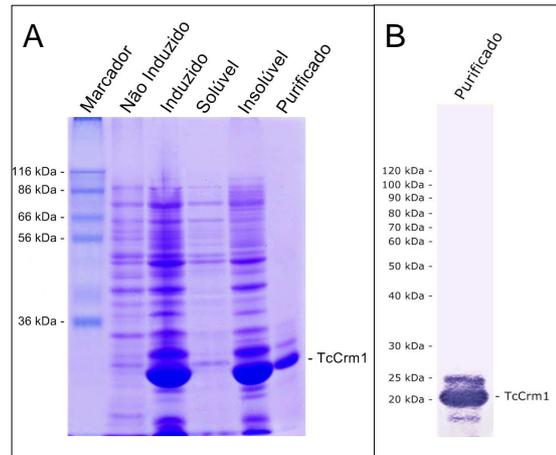
Todas as proteínas expressas apresentaram-se enriquecidas na forma insolúvel da proteína, ou seja, agregada ao corpúsculo de inclusão (Figura 22-A). Após lise bacteriana, a fração insolúvel enriquecida para cada proteína recombinante foi utilizada para purificação utilizando cromatografia de afinidade à resina de Ni-NTA (dados não mostrados), seguida de eluição a partir de gel preparativo. Para analisar a eficiência da purificação, foi realizado o ensaio de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-motivo de histidina (Figura 22-B). Por essa análise, ocorreram as purificações correspondentes às proteínas recombinantes TcDbp5, TcCrm1, TcNup95, TcNup(HsNup98) e TcNup147B.

Alíquotas de cada proteína purificada contendo a quantidade aproximada de 500 ng (100 ng por animal) foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP5 – Universidade Estadual de Londrina), para inoculação em cinco camundongos. Para produção de anticorpo anti-TcDbp5 em coelho, alíquota contendo em torno de 1 mg de proteína purificada foi enviada à prestadora de serviços Célula B (Serviço de Produção de Anticorpos Monoclonais e Policlonais – Universidade Federal do Rio Grande Do Sul / Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul) para a inoculação em dois animais.

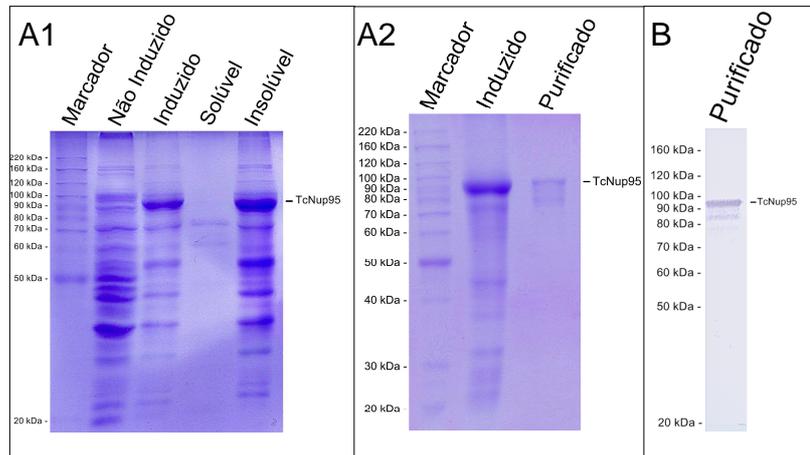
1) TcDbp5



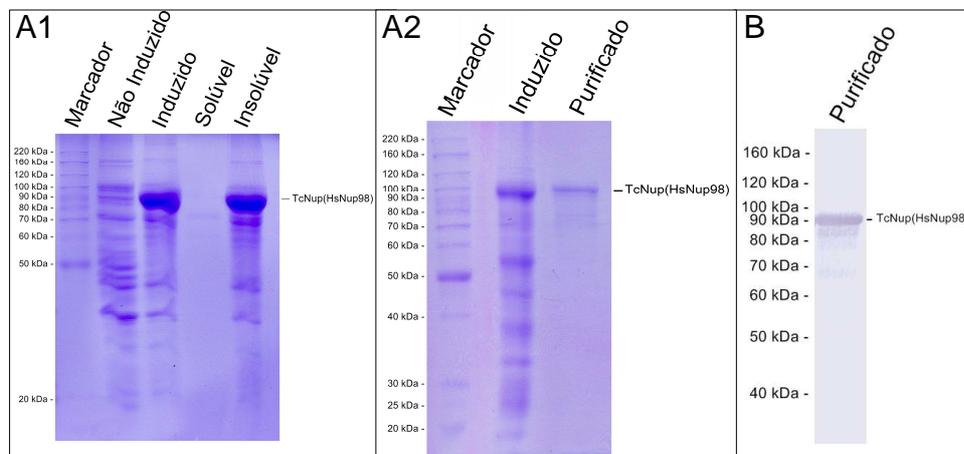
2) TcCrm1



3) TcNup95



4) TcNup(HsNup98)



5) TcNup147B

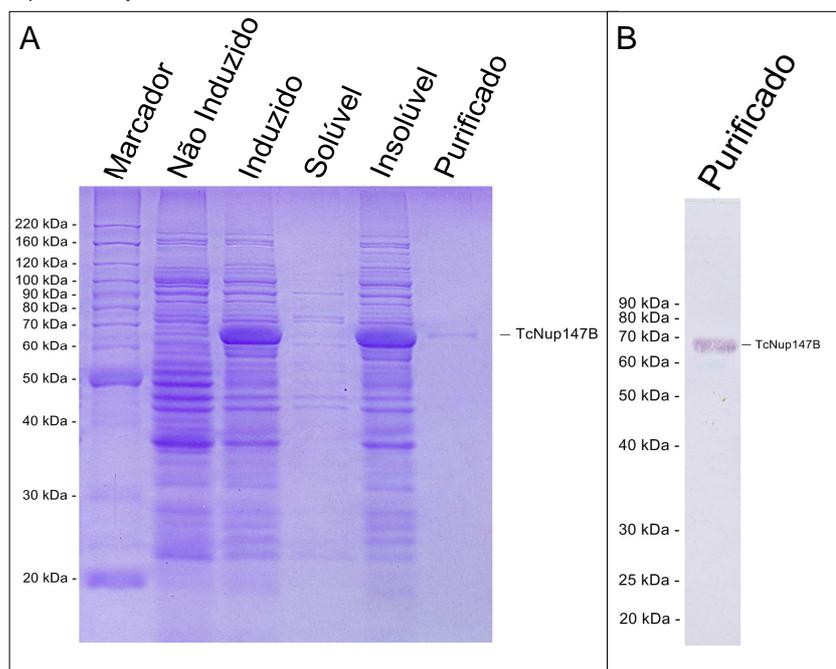


FIGURA 22 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE. Perfil eletroforético em gel desnaturante de poliacrilamida a 13% e corados com Azul de Coomassie (A, A1 e A2) e *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-motivo de histidina (diluição 1:3000) contra TcDbp5, TcCrm1, TcNup95, TcNup(HsNup98) e TcNup147B recombinante (B), respectivamente em 1, 2, 3, 4 e 5. Não induzido = extrato proteico de cultura de células sem adição de IPTG. Induzido = extrato proteico total de cultura de células com adição de IPTG 1 mM. Solúvel = fração solúvel do extrato total de células induzidas. Insolúvel = fração insolúvel do extrato total de células induzidas. Purificado = proteína recombinante purificada. Marcador = *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Marcador em 2 = *Prestained Molecular Weight Marker Sigma SDS7B2* (Sigma). Revelação por fosfatase alcalina.

A especificidade do antissoro policlonal anti-proteína recombinante gerado após inoculação dos animais foi analisada por *Western blot* utilizando tanto extrato de *T. cruzi* (correspondente a 5×10^6 células) quanto à proteína purificada. Os soros de camundongos que imunologicamente apresentaram a melhor resposta contra cada proteína recombinante estão mostrados na Figura 23. Os resultados demonstram que os soros produzidos foram específicos, com o reconhecimento da proteína pelos soros imunes com a massa molecular esperada para cada caso, enquanto que não houve reconhecimento por parte dos soros pré-ímmes. Para TcNup(HsNup98) a massa molecular observada da proteína reconhecida foi de aproximadamente 160 kDa (Figura 23-4). Além disso, para os antissoros anti-TcCrm1 e anti-Nup147, observa-se que ocorreu a geração de resposta imunogênica

nos camundongos, porém com uma baixa titulação (1:100 e 1:50 para TcCrm1 e TcNup147, respectivamente) quando comparado as outras proteínas.

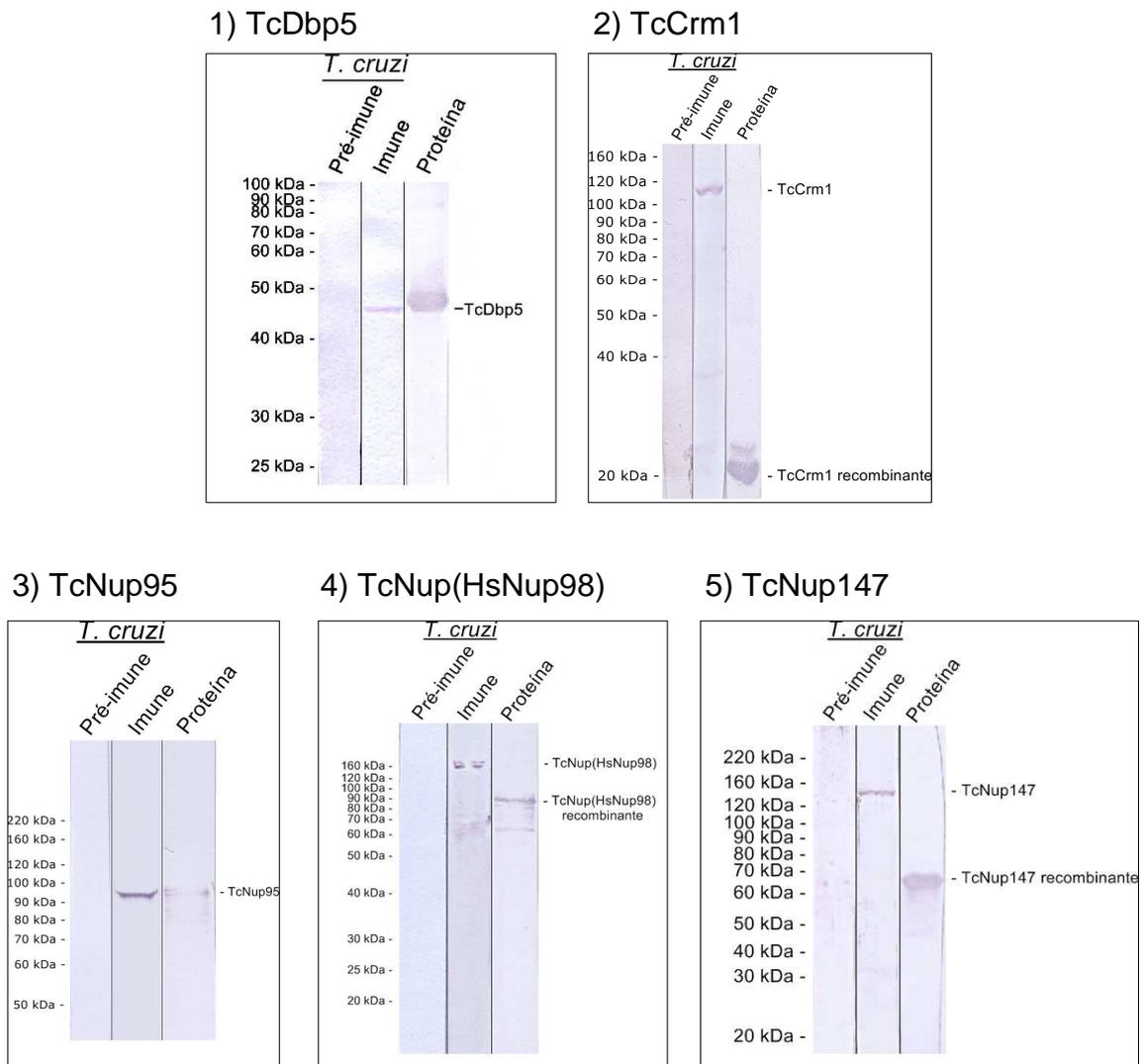


FIGURA 23 - ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DE ANTISORO POLICLONAL (ANTI-TcDbp5 , ANTI-TcCrm1 E ANTI-Nups) PRODUZIDO EM CAMUNDONGO. Western Blot contra extrato de *T. cruzi* (em Pré-Imune e Imune) e proteína recombinante (em Proteína) utilizando soro pré-imune (diluição 1:50 para TcNup147 e 1:100 para as outras proteínas) e antissoro anti-TcDbp5 (diluição 1:500), anti-TcCrm1 (diluição 1:100), anti-TcNup95 (diluição 1:500), anti-TcNup(HsNup98) (diluição 1:200) e anti-TcNup147 (diluição 1:50), respectivamente em 1, 2, 3, 4 e 5. Marcador = *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Revelação por fosfatase alcalina.

Diferente do antissoro de camundongo, o antissoro produzido contra TcDbp5 em coelho reconheceu outras proteínas (Figura 24-1), por isso, foi realizada a sua purificação. O antissoro produzido no coelho 2 foi submetido à purificação através da incubação com a proteína recombinante purificada incorporada à membrana de nitrocelulose, seguido de eluição. A eficiência da purificação e os testes de diluição estão representados na Figura 24-2.

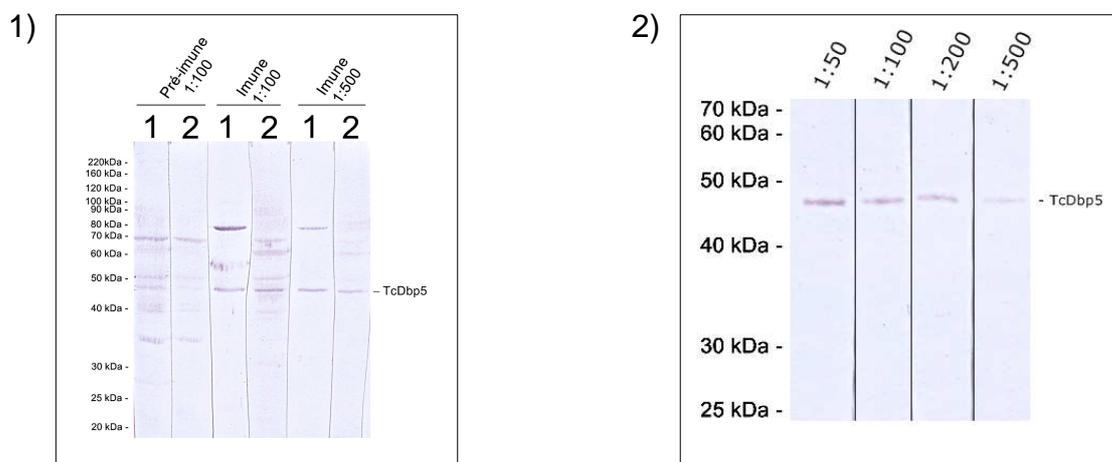


FIGURA 24 - ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISORO POLICLONAL ANTI-TcDbp5 PRODUZIDO EM COELHO. 1) *Western Blot* utilizando soro pré-ímune (diluição 1:100) e antissoro anti-TcDbp5 (diluição 1:100 e 1:500) produzido em dois coelhos (canaletas 1 e 2) contra extrato de *T. cruzi*. 2) *Western Blot* utilizando antissoro anti-TcDbp5 purificado do coelho 2 em diferentes diluições contra extrato de *T. cruzi*. Marcador = *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Revelação por fosfatase alcalina.

4.3. TcDbp5 é uma proteína nuclear e citoplasmática

Utilizando o antissoro anti-TcDbp5 obtido de camundongo, foram realizadas as análises de localização celular. O primeiro ensaio refere-se ao fracionamento subcelular de formas epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento exponencial. Para isso, o parasita foi submetido à condição hipotônica utilizando solução com baixa concentração salina e lisado com a adição de detergente. Esses passos foram monitorados por microscopia óptica até o extravasamento citoplasmático e manutenção do núcleo, sendo, então possível a separação dessas duas partes por centrifugação em baixa rotação. TcDhh1 foi utilizado como controle de localização

exclusivamente citoplasmática (HOLETZ *et al.*, 2007) e a histona TcH2A, como nuclear. Observa-se que TcDbp5 apresentou-se localizado majoritariamente no citoplasma (Figura 25). Contudo foi observado uma fraca marcação na fração enriquecida em núcleo, sugerindo que TcDbp5 não é uma proteína exclusivamente citoplasmática.

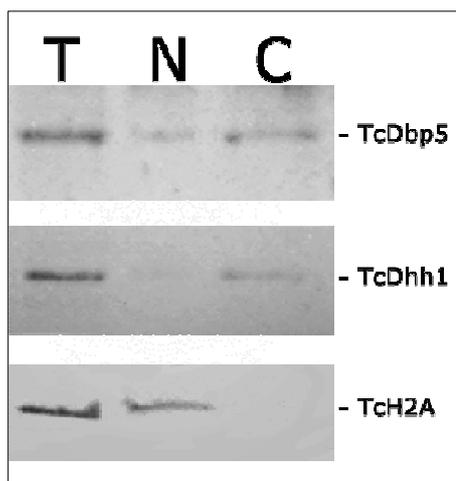
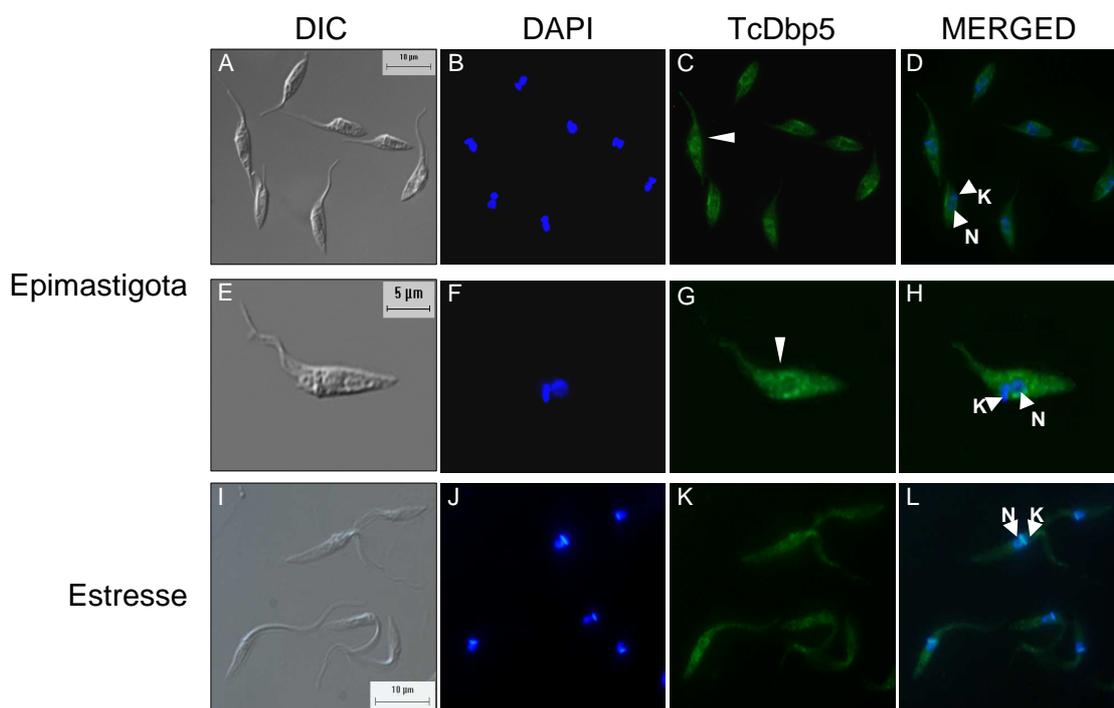


FIGURA 25 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5 EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c ATRAVÉS DE FRACIONAMENTO SUBCELULAR. *Western Blot* utilizando anticorpos policlonais anti-TcDbp5 (produzido em camundongo, diluição 1:500), anti-TcDhh1 (produzido em coelho, diluição 1:100) e anti-TcH2A (produzido em camundongo, diluição 1:500). T = Extrato total de *Trypanosoma cruzi* com três dias de crescimento. N = Extrato de fração nuclear. C = Extrato de fração citoplasmática. Revelação por quimioluminescência.

Paralelamente foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta utilizando o antissoro anti-TcDbp5 na diluição de 1:100 e a localização foi analisada em microscopia óptica (Figura 26-1) e confocal (Figura 26-2) em *T. cruzi* nas formas epimastigotas e formas submetidas a estresse. Por essas análises, em ambas as formas do parasita, TcDbp5 apresentou localização citoplasmática e nuclear. Contudo, pela disposição observada, acreditamos que a proteína aparentemente está enriquecida ao redor do núcleo, ou seja, na face citoplasmática do envoltório nuclear.

1) Microscopia óptica de fluorescência



2) Microscopia confocal

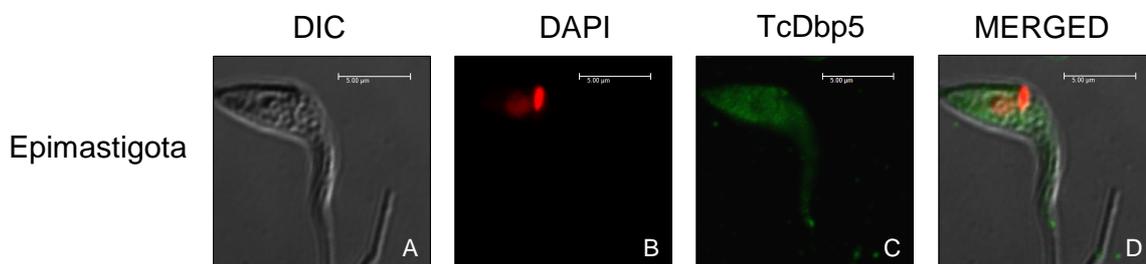


FIGURA 26 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5 EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. 1) Imunofluorescência indireta analisado em microscopia óptica de fluorescência. A-H = formas epimastigotas. I-L = formas epimastigotas submetidas a estresse. 2) Imunofluorescência indireta analisada em microscopia confocal. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. TcDbp5 = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcDbp5 (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário conjugado com Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e IF. N = núcleo; K = cinetoplasto. Pontas de seta mostram alguns parasitas com marcação nuclear e perinuclear.

Visto que os melhores resultados de anticorpos anti-Nups ocorreram nas inoculações em camundongos e o anticorpo anti-TcDbp5 de coelho purificado não

apresentou boa marcação em ensaios de imunofluorescência (dados não mostrados), resolvemos optar pela geração de parasitas expressando TcDbp5 fusionada a GFP nas extremidades amino e carboxi-terminal.

Para a fusão N-terminal, foi utilizada o vetor pTcPR-GFPN produzido no ICC (BATISTA *et al.*, 2010), que utiliza o mecanismo de recombinação da plataforma do sistema *Gateway* para a inserção do fragmento gênico. Assim, TcDbp5 foi clonado através da reação de recombinação LR entre o plasmídeo recombinante pDONR-TcDbp5 e o vetor pTcPR-GFPN. A pré-seleção dos clones aconteceu através da técnica de palitagem (*toothpick*) (dados não apresentados). A clonagem do inserto foi, então, confirmada por PCR de colônia (Figura 27-1) e sequenciamento (dados não apresentados). Entre os clones positivos, o clone 4 foi escolhido para extração e purificação do plasmídeo (Figura 27-2). Esse plasmídeo purificado foi transfectado em *T. cruzi Dm 28c* e os parasitas contendo o plasmídeo foram selecionados.

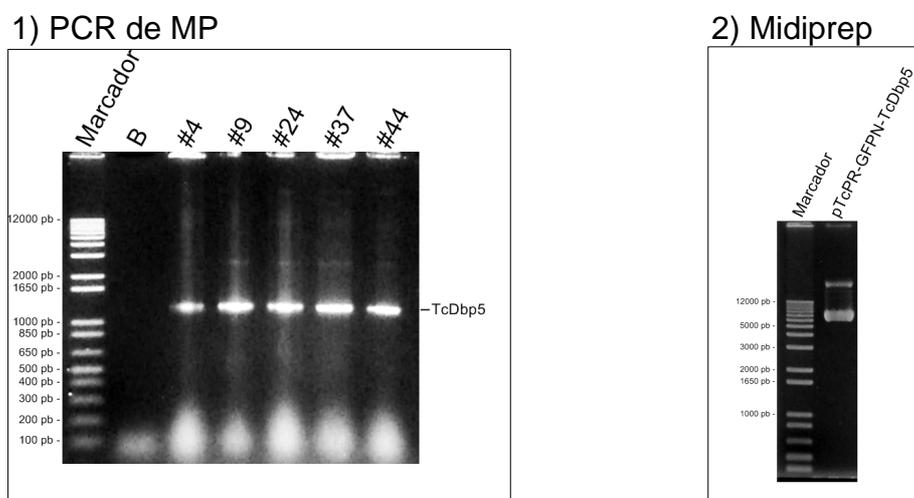


FIGURA 27 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pTcPR-GFPN, ETIQUETA GFP AMINO-TERMINAL. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pTcPR-GFPN-TcDbp5. 2) Midipreparação de pTcPR-GFPN-TcDbp5 do clone positivo. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/m. Marcador = *1Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen). B = branco.

Para avaliar a expressão da proteína fusionada (GFP-TcDbp5), 10^6 parasitas foram coletados, aderidos em lâmina, corados com DAPI e visualizados

por microscopia de fluorescência (Figura 28). Foram observados parasitas fluorescentes, no entanto, o perfil de localização foi um pouco divergente do obtido nas análises de imunofluorescência indireta com anticorpo anti-TcDbp5. Apesar de aparentemente a proteína estar presente tanto no citoplasma quanto no núcleo, o enriquecimento em volta do núcleo verificado nos ensaios com antissoro, não foi evidenciado.

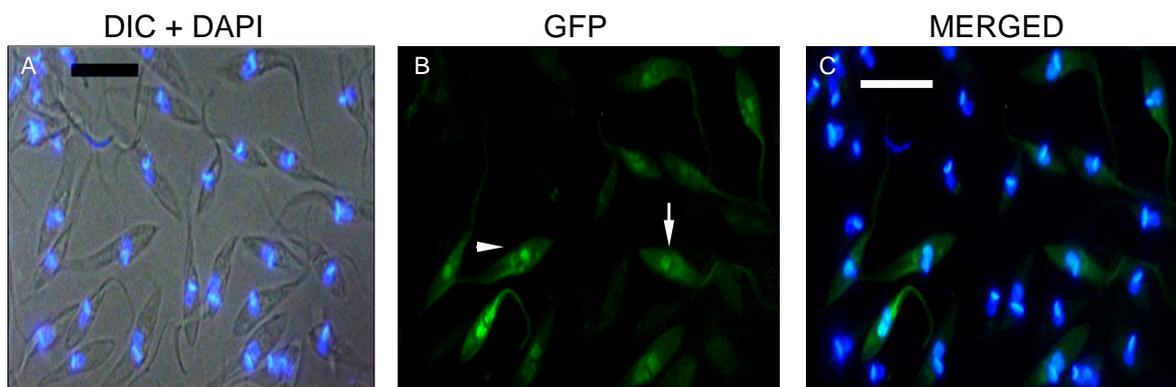


FIGURA 28 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 FUSIONADA A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE NA EXTREMIDADE AMINO-TERMINAL. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. GFP = fluorescência de GFP fusionada a TcDbp5, observado no comprimento de onda de 488 nm. A) Sobreposição de imagens capturadas por DIC e DAPI. B) Fluorescência de GFP. C) *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e fluorescência de GFP. Pontas de seta indicam alguns parasitas com marcação nuclear. Barra = 10 μ m.

No caso da construção para fusão C-terminal, foi utilizado o vetor pTREGFP (DaROCHA *et al.*, 2004), pois o vetor para fusão GFP C-terminal da plataforma *Gateway* não havia sido finalizado. Assim, o produto de amplificação de TcDbp5 (Figura 29), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores TcDbp5XbaIF e TcDbp5EcoRIR, foi submetido a clonagem após digestão com as enzimas de restrição específicas.

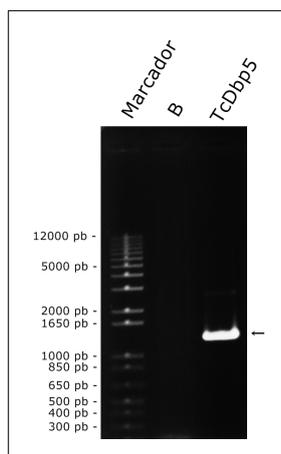
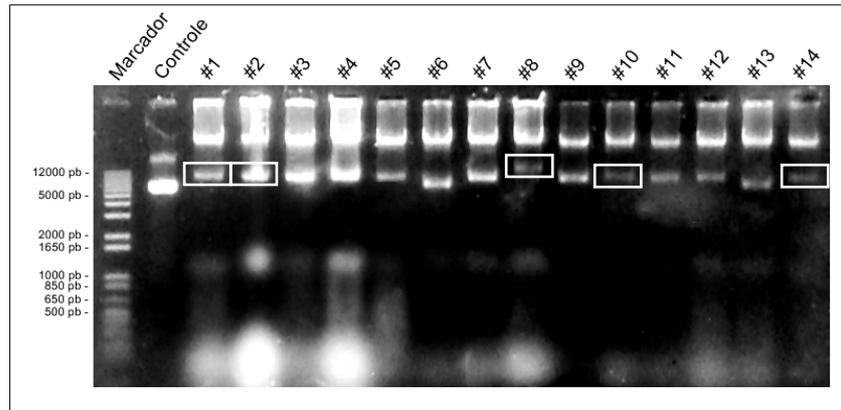


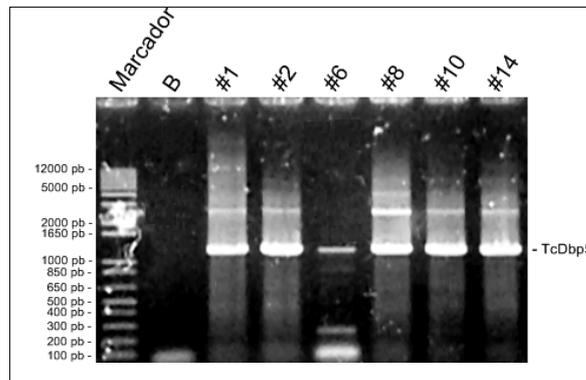
FIGURA 29 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO INSERTO GÊNICO DE TcDbp5. Produto de amplificação de TcDbp5 (seta) utilizando os oligonucleotídeos específicos TcDbp5XbaIF e TcDbp5EcoRIR. Eletroforese em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador molecular = *1Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen). B = branco. Tamanho esperado = 1182 pb.

Posteriormente às etapas de ligação e transformação em bactérias *E. coli* linhagem DH5α™, os clones foram pré-selecionados inicialmente pela técnica de palitagem (*toothpick*). Comparativamente ao controle, os plasmídeos 1, 2, 8, 10 e 14 (Figura 30-1), por apresentarem um padrão de corrida eletroforética diferencial, foram analisados por PCR de DNA plasmidial, isolado por minipreparação, utilizando oligonucleotídeos iniciadores TcDbp5XbaIF e TcDbp5EcoRIR para confirmação da clonagem. O plasmídeo 6 foi utilizado como controle negativo da reação. Dessa etapa, foram obtidos cinco plasmídeos recombinantes (Figura 30-2) e o clone 1 foi selecionado para purificação por midipreparação (Figura 30-3).

1) Técnica de palitagem



2) PCR de MP



3) Midiprep

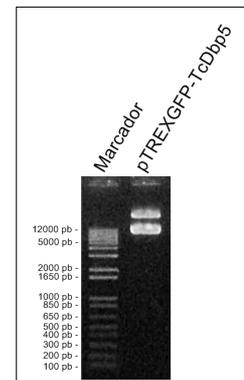
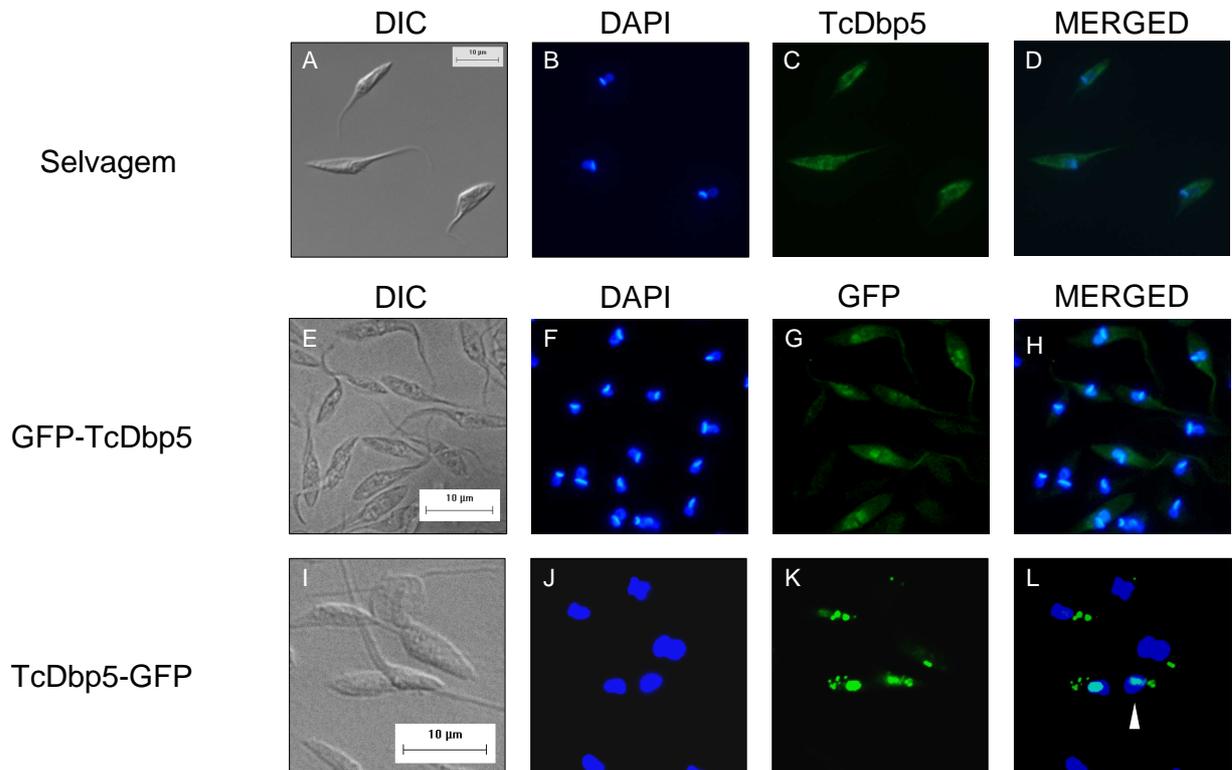


FIGURA 30 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pTREXGFP, ETIQUETA GFP CARBOXI-TERMINAL. 1) Técnica de palitagem para pré-seleção de clones 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pTREXGFP-TcDbp5 etiqueta GFP C-terminal. 3) Midipreparação de pTREXGFP-TcDbp5 do clone positivo (clone 1). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

O plasmídeo recombinante purificado foi então transfectado no parasita e analisado por microscopia de fluorescência. Para isso, os parasitas foram aderidos em lâmina e corados com DAPI (Figura 31-1). Foi observado que a fluorescência emitida por TcDb5-GFP, apresentou marcação citoplasmática em forma de grânulos e nuclear (pontas de seta em Figura 31-1L e 31-2H). Quando analisado o sinal emitido por imunofluorescência utilizando anticorpo anti-TcDbp5 nesses parasitas transfectantes, observa-se que existiu uma correspondência de localização

principalmente no citoplasma, situação não tão evidente no caso da marcação nuclear (Figura 31-2).

1) Localização de TcDbp5



2) Colocalização de TcDbp5 com GFP (C-terminal)

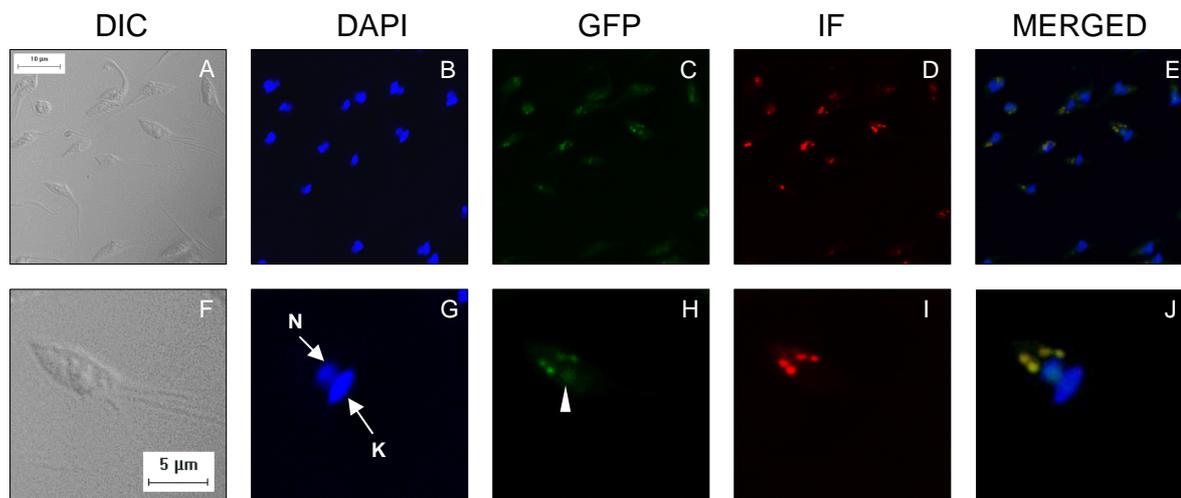


FIGURA 31 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 FUSIONADA A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE NA EXTREMIDADE CARBOXI-TERMINAL. 1) Selvagem = Localização de TcDbp5 por imunofluorescência indireta em *T. cruzi* Dm 28c selvagem (A-D). GFP-TcDbp5 = TcDbp5 fusionada à GFP N-terminal (E-H). TcDbp5-GFP = TcDbp5 fusionada a GFP C-terminal (I-L). 2) Localização de TcDbp5 por imunofluorescência indireta em parasitas transfectantes com pTREXGFP-TcDbp5. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. GFP = fluorescência de GFP fusionada a TcDbp5, observado no comprimento de onda de 488 nm. IF = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcDbp5 (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário Alexa 488 (em 1, diluição 1:400) ou Alexa 546 (em 2, diluição 1:400). Merged = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e fluorescência de GFP ou IF em 1 e por DAPI, fluorescência de GFP e IF em 2. N = núcleo; K = cinetoplasto. Pontas de seta mostram alguns parasitas com marcação nuclear.

A localização de TcDbp5 em volta do núcleo, sugere que possa estar próxima ao envoltório nuclear e, com isso, outra importante abordagem utilizada para a verificação dessa localização foi a análise através de ensaios imunocitoquímicos em microscopia ultraestrutural. Os dados obtidos mostram que TcDbp5 apresentou-se localizada em ambos os compartimentos celulares (Figura 32). No citoplasma, foi observada marcação dispersa e algumas vezes mais agrupada e, neste último caso, essa marcação foi próximo ao envoltório nuclear, representativamente junto à face citoplasmática do complexo do poro nuclear (Figura 32-1, seta preta), pressupondo uma possível interação com nucleoporinas nessa localização.

Por outro lado, interessantemente, dentro do núcleo, TcDbp5 foi detectada também em regiões perinucleolares (Figura 32-2, seta azul) e em áreas de borda de cromatina condensada (Figura 32-3, seta verde). Do mesmo modo, também foi

possível observar a ausência de marcação no centro fibrilar do nucléolo (Figura 32-3, seta vermelha)

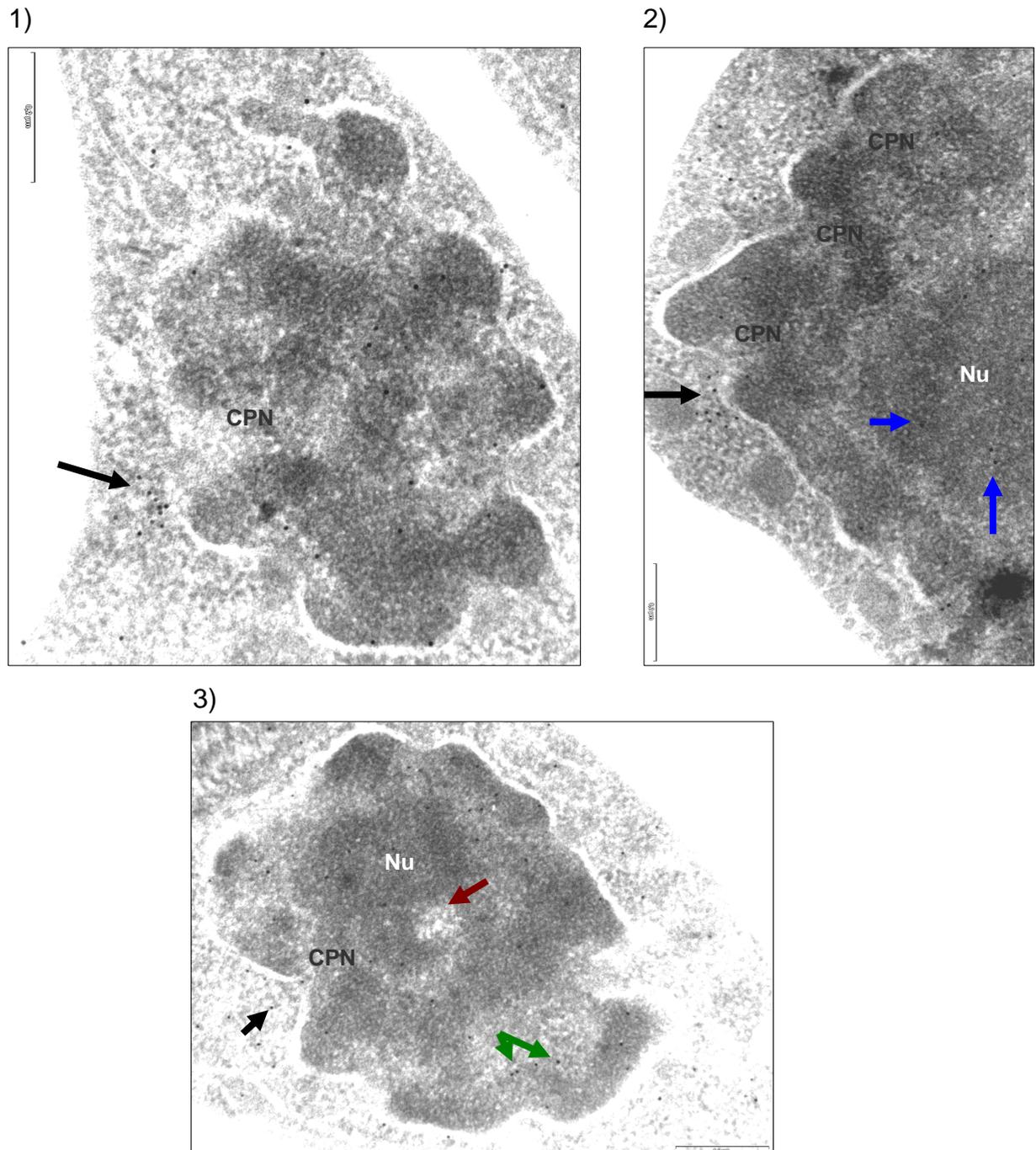


FIGURA 32 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ULTRAESTRUTURAL. Imunocitoquímica utilizando anticorpo anti-TcDbp5 (diluição 1:50, produzido em camundongo) e IgG anti-camundongo acoplado a partículas de ouro coloidal de 10 nm (diluído 1:250). Setas pretas = localização de TcDbp5 próximo ao complexo do poro nuclear. Setas azuis = localização de TcDbp5 em região perinucleolar. Seta verde = localização de TcDbp5 em borda de cromatina densa. Seta vermelha = centro fibrilar do nucléolo. CPN = complexo do poro nuclear. Nu = nucléolo.

4.4. Localização de nucleoporinas candidatas e exportina TcCrm1 em *T. cruzi*

Os anticorpos específicos anti-TcCrm1, anti-TcNup95 e anti-TcNup(HsNup98), obtidos de camundongo, foram utilizados para os ensaio de localização celular por imunofluorescência indireta.

Para TcCrm1, o ensaio foi realizado utilizando o anticorpo primário na diluição de 1:100. Pelas imagens obtidas, TcCrm1 apresentou localização citoplasmática, com marcação pontual na extremidade anterior, aparentemente na base do flagelo do parasita (Figura 33). No entanto, estes relatos divergem do que foi descrito na literatura.

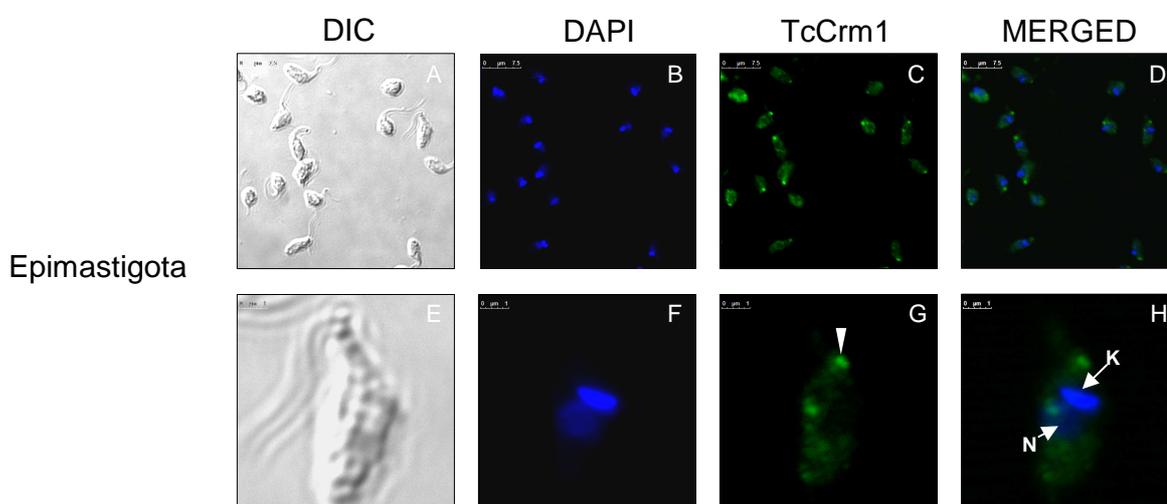


FIGURA 33 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcCrm1 EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. Imunofluorescência indireta analisado em microscopia confocal. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. TcCrm1 = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcCrm1 (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e IF. N = núcleo; K = cinetoplasto. Ponta de seta mostra marcação na região anterior do parasita, em torno da bolsa flagelar.

Para TcNup95, o ensaio de imunofluorescência foi realizado diluindo o antissoro na proporção de 1:200. TcNup95 apresentou localização citoplasmática, com enriquecimento em volta do núcleo (Figura 34), o que dedutivamente possa ser o envoltório nuclear em virtude da função da proteína como um componente do complexo do poro nuclear.

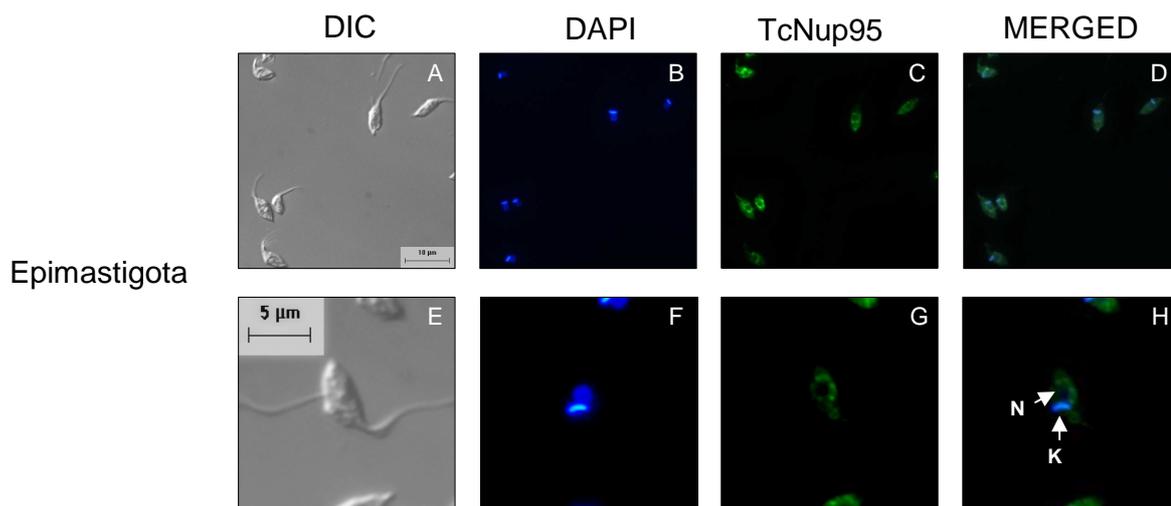


FIGURA 34 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcNup95 EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. Imunofluorescência indireta analisado em microscopia ótica de fluorescência. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. TcNup95 = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcNup95 (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e IF. N = núcleo; K = cinetoplasto.

O antissoro anti-TcNup(HsNup98) foi diluído 100 vezes para essa análise. TcNup(HsNup98) apresentou localização pontual tanto no citoplasma quanto no núcleo (Figura 35). Porém, sem uma marcação ao redor do envoltório nuclear.

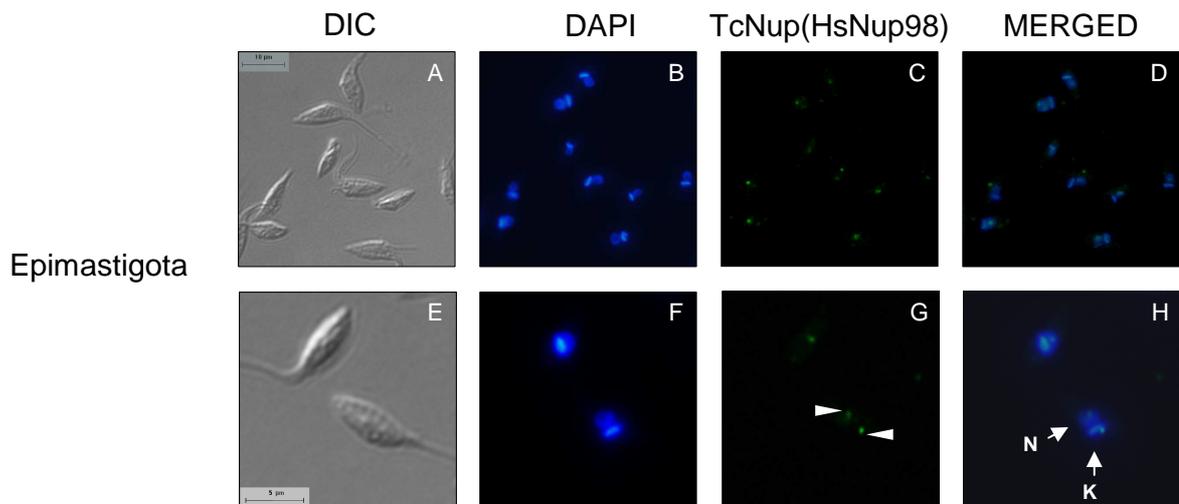


FIGURA 35 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcNup(HsNup98) EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. Imunofluorescência indireta analisado em microscopia ótica de fluorescência. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. TcNup(HsNup98) = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcNup(HsNup98) (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e IF. N = núcleo; K = cinetoplasto. Pontas de setas mostram marcações pontuais no núcleo e citoplasmática.

Por fim, o anticorpo anti-TcNup147 não apresentou marcação nos ensaios de imunofluorescência (dados não mostrados), mesmo em baixas diluições.

4.5. Análises *in silico* de TcDbp5

Pela análise de comparação de seqüência e alinhamento com proteínas ortólogas de diferentes organismos, foi possível verificar a presença de vários motivos conservados em TcDbp5 (Figura 36). Estes motivos fazem parte de dois domínios funcionais localizados nas porções amino e carboxi-terminal, conforme a descrição na Figura 37.

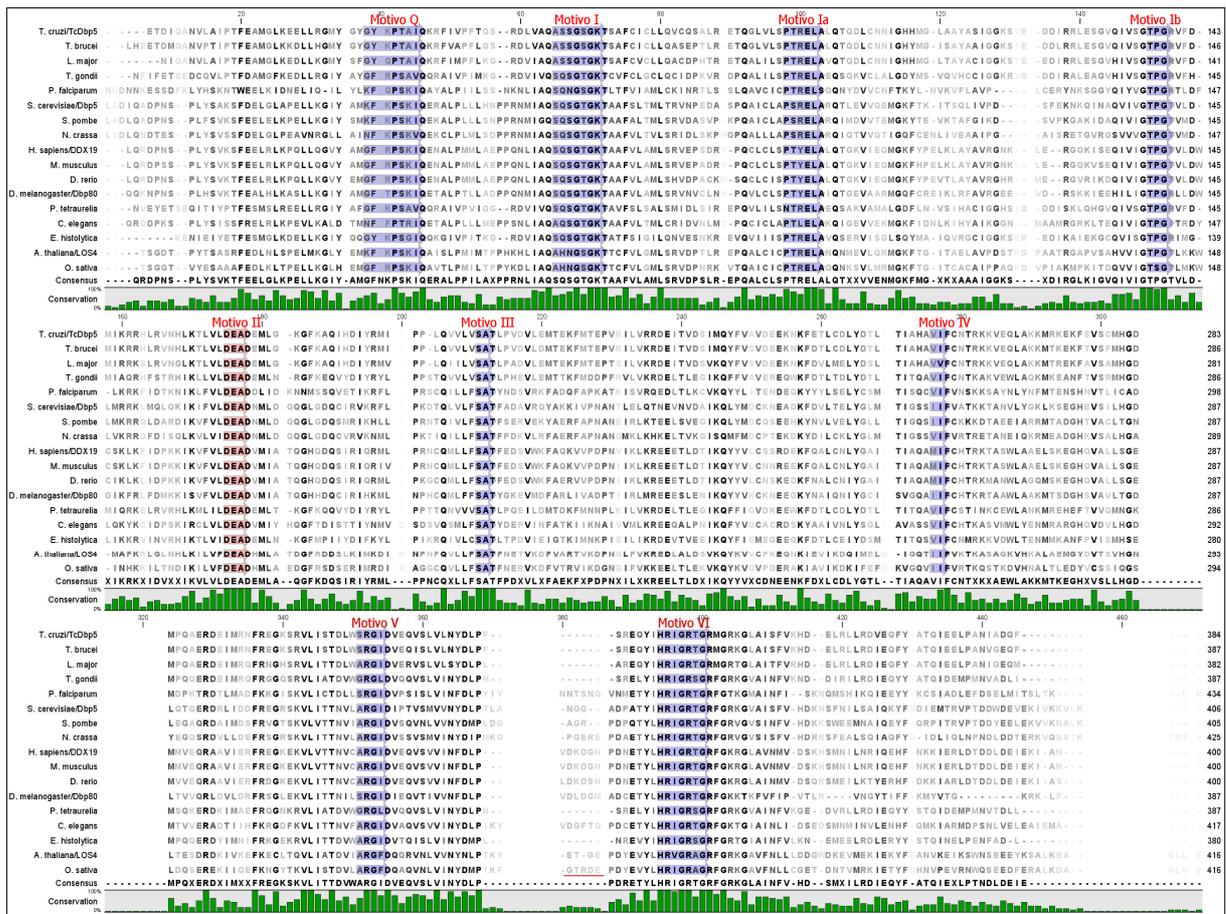


FIGURA 36 - ALINHAMENTO DE TcDdp5 COM PROTEÍNAS ORTÓLOGAS. As seqüências de aminoácidos incluem os ortólogos em *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae* (Dbp5), *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*, *Homo sapiens* (DDX19), *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Paramecium tetraurelia*, *Caenorhabditis elegans*, *Entamoeba histolytica*, *Arabidopsis thaliana* (LOS4), *Oryza sativa*. Em azul, foram destacados os motivos consensos de proteínas DEAD-box, incluindo a caixa (em vermelho) referente ao nome dessa subfamília. Em verde, o gráfico indica a conservação dos aminoácidos entre as seqüências. Entre os motivos V e VI está destacado, barra vermelha, a seqüência de seis aminoácidos não consenso, característicos de proteínas homólogas a Dbp5.

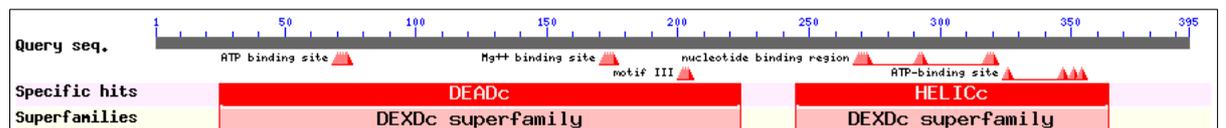


FIGURA 37 - IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS NA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE TcDdp5. Observa-se a presença de dois domínios (DEADc e HELICc) e motivos responsáveis pela ligação a ATP, ligação a nucleotídeo e atividade helicase (motivo III).

Dentro deste contexto, decidimos realizar também a análise por modelagem estrutural para buscar características de seqüência específicas de TcDbp5, além de reforçar a idéia de sua função como RNA helicase. Com o auxílio do programa BLASTP e utilizando apenas proteínas com estruturas depositadas no banco de dados PDB (PDB – *Protein Data Bank*), foi possível encontrar algumas proteínas similares que serviram de molde para a realização da modelagem estrutural de TcDbp5. Essas proteínas foram as seguintes:

- 2HYI - Cadeia C, *Structure Of The Human Exon Junction Complex With A Trapped Dead-Box Helicase Bound To RNA*.
Com identidade = 235/390 (60%), similaridade = 312/390 (80%) e *gaps* = 1/390 (0%).
- 2JOS - Cadeia A, *The Crystal Structure Of The Exon Junction Complex At 2.2 Å Resolution*.
Com identidade = 235/390 (60%), similaridade = 312/390 (80%) e *gaps* = 1/390 (0%).
- 2HXY - Cadeia A, *Crystal Structure Of Human Apo-eIF4AIII*.
Com identidade = 234/385 (60%), similaridade = 309/385 (80%) e *gaps* = 1/385 (0%).
- 2VSO - Cadeia A, *Crystal Structure Of A Translation Initiation Complex*.
Com identidade = 212/390 (54%), similaridade = 292/390 (74%) e *gaps* = 3/390 (0%).
- 2ZU6 - Cadeia A, *Crystal Structure Of The eIF4A-Pdcd4 Complex*.
Com identidade = 209/374 (55%), similaridade = 283/374 (75%) e *gaps* = 2/374 (0%).

Como todas as estruturas das proteínas selecionadas possuíam alto grau de identidade sequencial com TcDbp5 para geração do modelo, um alinhamento estrutural foi realizado com o intuito de se investigar possíveis diferenças (dados não apresentados). A sobreposição estrutural revelou que 2HYI, 2JOS e 2HXY apresentaram-se idênticas na disposição espacial atômica (mesma conformação estrutural), por isso somente uma dessas foi escolhida para modelagem, juntamente com 2VSO e 2ZU6. Além disso, 2VSO e 2ZU6 possuíam grande conservação de seus domínios estruturais.

Desse modo, foram utilizadas como molde as estruturas 2HYI, 2VSO e 2ZU6; originando o modelo apresentado na Figura 38-1. Nesta, está demonstrado a conservação da seqüência DEAD de aminoácidos presente em TcDbp5. Quando a

estrutura gerada de TcDbp5 foi sobreposta a de DDX19 (a homóloga de Dbp5 em humanos), a porção C-terminal apresentou-se altamente conservada e sobrepôs a estrutura correspondente. Porém, quanto à extremidade amino-terminal foi possível observar diferenças na estrutura principalmente quanto à presença de duas alças em alfa-hélice, destacadas em azul claro na Figura 38-2.

Ademais, pela disposição espacial no modelo gerado, possivelmente exista rotação entre os domínios amino e carboxi-terminal, caracterizando estados distintos para a funcionalidade da atividade RNA helicase de TcDbp5.

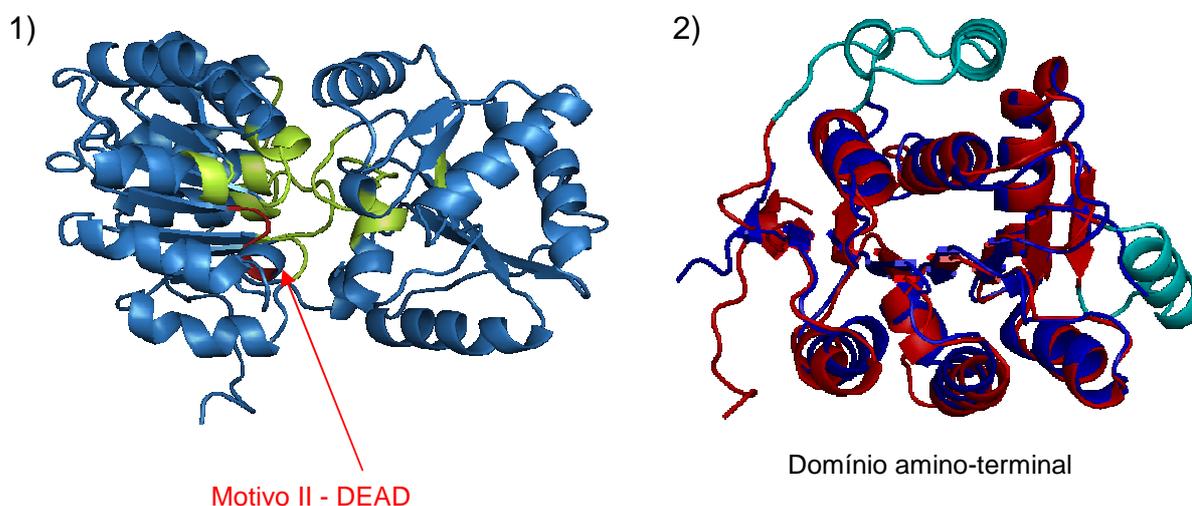


FIGURA 38 - PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE TcDbp5. 1) Modelo gerado de TcDbp5. Estão destacados os motivos (verde) da proteína, principalmente o motivo II – DEAD (vermelho). Observe-se que as porções amino e carboxi-terminal se estruturam independentemente o que pode resultar em rotação, determinando a atividade helicase ATP-dependente. 2) Sobreposição do domínio amino-terminal entre o modelo gerado de TcDbp5 (vermelho) e o ortólogo DDX19 em humano (azul escuro). Em azul claro, estão destacadas as alças presentes em TcDbp5 que não se sobrepuseram a DDX19.

4.6. TcDbp5 está associada a complexos independente de polissomos

Um fato interessante foi referente às sequências utilizadas como molde (2ZU6 de humano e 2VSO de fungo) na modelagem molecular que apresentaram maior similaridade ao fator de iniciação eucariótico 4A (eIF4A), uma proteína do complexo de iniciação da tradução. Como observado na Figura 39, o alinhamento entre o fator de iniciação eucariótico 4A de *T. cruzi*, denominado de TcelF4A

(XP_820378.1 / Tc00.1047053511585.190), e TcDbp5 realmente apresentaram alta similaridade (73% de similaridade) entre as cadeias de aminoácidos.

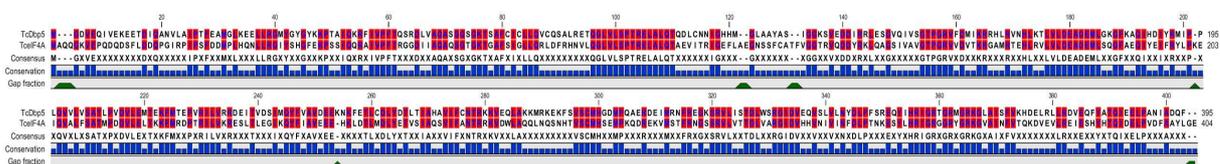


FIGURA 39 - ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE TcDbp5 E O FATOR DE INICIAÇÃO EUCARIÓTICO, TceIF4A. Em vermelho, está indicado o alinhamento de seqüências idênticas; em azul, o gráfico apresenta as regiões conservadas entre as seqüências; e, em verde, os locais onde ocorreram *gaps*.

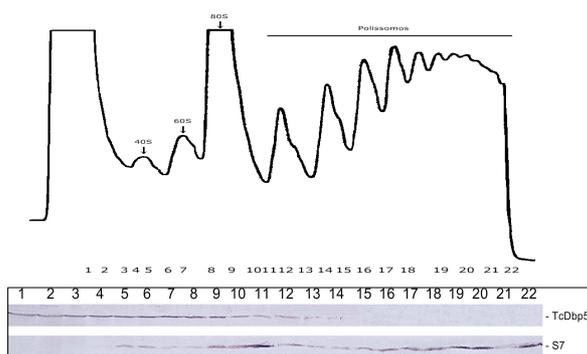
Para avaliar se a alta similaridade poderia representar funções similares, TcDbp5 foi analisado quanto a sua associação com a maquinaria de tradução. Para tanto, a avaliação da presença de TcDbp5 em frações enriquecidas em polissomos após sedimentação em gradiente de sacarose foi a abordagem utilizada.

Extratos protéicos de parasitas tratados com cicloheximida resultaram em um perfil de sedimentação com polissomos em frações de alta densidade, pois esta droga atua mantendo os polissomos associados. Como controle, foram utilizados extratos provenientes de parasitas tratados com puromicina, resultando em polissomos não associados, uma vez que o tratamento com a droga resulta em prematura terminação da tradução. Frações obtidas após sedimentação do extrato citoplasmático de *T. cruzi* por gradiente de sacarose foram então coletadas e submetidas ao ensaio de *Western blot*, utilizando antissoro anti-TcDbp5 e anti-S7. S7 é uma proteína ribossomal da subunidade menor (GRADIA *et al.*, 2009) com massa molecular de 23,9 kDa.

Em um primeiro momento, formas epimastigotas foram submetidas à análise (Figura 40). Assim, o perfil de sedimentação de TcDbp5 foi bastante semelhante tanto na presença (Figura 40-1) quanto na ausência de polissomos (Figura 40-2) em formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento, cuja tradução é altamente ativa. Na presença de polissomos, TcDbp5 encontra-se majoritariamente nas frações de baixa densidade não correspondentes a polissomos e, do mesmo modo, na ausência, o perfil de sedimentação permanece o mesmo.

Diferente do que acontece com a proteína ribossomal S7, cuja dissociação de polissomos por puomicina afetou o perfil de sedimentação. Isso reforça a idéia de que TcDbp5 não estaria associada a polissomos e, conseqüentemente, também não estaria relacionada a iniciação da tradução.

1) Epimastigota / Cicloheximida



2) Epimastigota / Puomicina

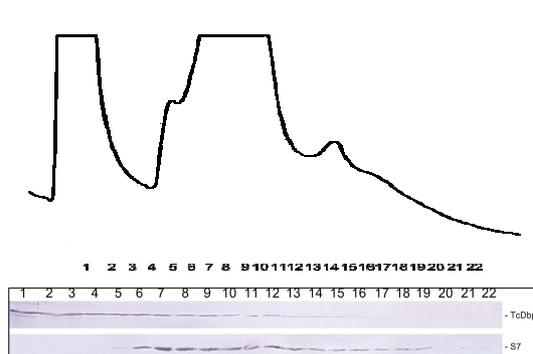


FIGURA 40 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE TcDbp5 COM A MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*. Western Blot utilizando antissoro anti-TcDbp5 (produzido em camundongo, diluição 1:500) e antissoro anti-S7, uma proteína da subunidade menor do ribossomo (produzido em camundongo, diluição 1:200) contra as frações coletadas do gradiente polissomal de sacarose. Os parasitas com 3 dias de crescimento exponencial foram tratados com cicloheximida (1) e puomicina (2) e, do extrato proteico, foram coletadas frações do gradiente correspondentes aos números no gráfico. Revelação por fosfatase alcalina.

Da mesma forma que em epimastigotas, em parasitas sob estresse nutricional, os quais apresentam o nível de tradução bastante reduzido, nenhuma associação de TcDbp5 com as frações de alta densidade correspondentes a polissomos foi observada (Figura 41-1). Igualmente, o tratamento com puomicina não alterou o perfil de sedimentação (Figura 41-2) de TcDbp5.

1) Epimastigota / Cicloheximida

2) Epimastigota / Puromicina

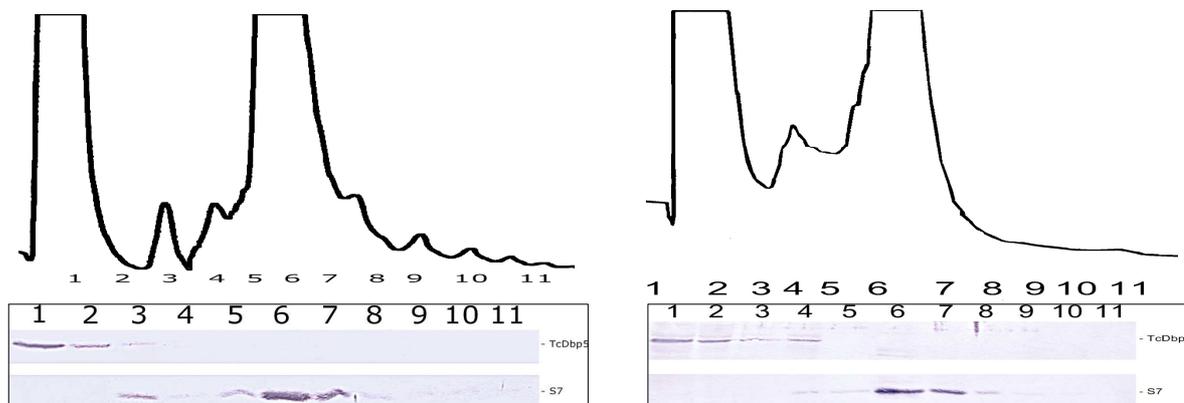


FIGURA 41 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE TcDbp5 COM A MAQUINARIA DE TRADUÇÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS SUBMETIDAS A ESTRESSE DE *T. cruzi*. *Western Blot* utilizando antissoro anti-TcDbp5 (produzido em camundongo, diluição 1:500) e antissoro anti-S7, uma proteína da subunidade menor do ribossomo (produzido em camundongo, diluição 1:200) contra as frações coletadas do gradiente polissomal de sacarose. Os parasitas com 5 dias de crescimento exponencial foram submetidas a estresse em meio TAU por 2 horas a 28°C. Em seguida, foram tratados com cicloheximida (1) e puromicina (2) e, do extrato proteico, foram coletadas frações do gradiente correspondentes aos números no gráfico. Revelação por fosfatase alcalina.

Durante o processo de metaciclôgênese, a taxa metabólica e o nível de expressão de alguns genes do parasita são bastante variáveis, pois o parasita se diferencia em formas infectivas e responde a diferenças ambientais bruscas. Em vista disso, foi avaliado se TcDbp5 seria uma proteína com expressão regulada ou constitutiva, pois este tipo de evidência poderia auxiliar no estudo da função desta proteína. Neste caso, foi analisada a sua expressão através de *Western blot* nas diferentes formas do parasita durante a metaciclôgênese, processo de diferenciação celular em formas infectivas (item 3.6). Para esse ensaio, foi utilizado como controle o anticorpo contra a actina de *T. cruzi*, o qual não apresenta a expressão regulada nas diferentes formas (KALB *et al.*, em preparação). Assim, observa-se na Figura 42 que TcDbp5 manteve-se presente em todas as formas do parasita durante a metaciclôgênese e o nível de expressão permaneceu constante, levando a pressupor que se trata de uma proteína constitutiva.

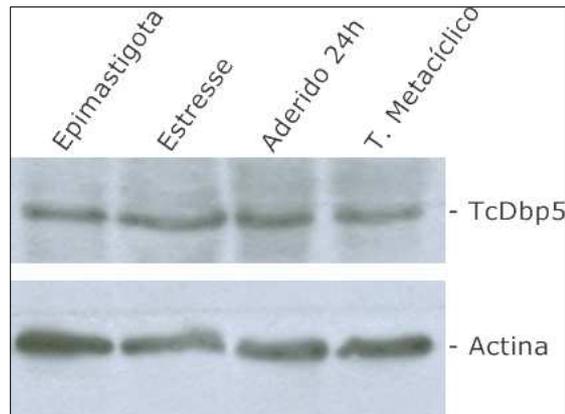


FIGURA 42 - EXPRESSÃO DE TcDbp5 DURANTE AS FASES DA METACICLOGÊNESE DE *T. cruzi*. *Western Blot* contra o extrato de proteína total de formas epimastigotas (Epimastigota), epimastigotas sob estresse em meio TAU (Estresse), epimastigotas aderidos após 24 horas (Aderido 24h) e tripomastigotas metacíclicas (T. metacíclico). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 13% e, após transferência, a membrana foi incubada com antissoro anti-TcDbp5 (produzido em camundongo, diluição 1:500) e antissoro anti-actina (produzido em camundongo, diluição 1:100). Revelação por quimioluminescência.

4.7. TcDbp5 migra entre o núcleo e o citoplasma através da via Crm1 de transporte de proteínas

TcDbp5 foi analisada quanto a sua mobilidade e capacidade de migrar entre o núcleo e o citoplasma via interação com o receptor Crm1. Para isso, formas epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento exponencial foram tratadas com Leptomicina B na concentração de 500 ng/ml durante 5 horas. LMB é um potente antifúngico que exclusivamente se liga ao receptor Crm1, tornando-o inativo (KUDO *et al.*, 1998; WOLFF *et al.*, 1997). Além disso, parasitas foram tratados na mesma quantidade com metanol 70%, solução de dissolução para LMB, e parasitas selvagens foram utilizados como controle.

Em seguida, os parasitas foram analisados através de microscopia de fluorescência utilizando anticorpo anti-TcDbp5 para localização da proteína. Na Figura 43-D observa-se marcação majoritária no núcleo do parasita. Enquanto que no parasita tratado somente com metanol e no selvagem a marcação de TcDbp5 encontra-se principalmente no citoplasma. Com isso, infere-se que TcDbp5 migra entre o núcleo e o citoplasma via receptor Crm1.

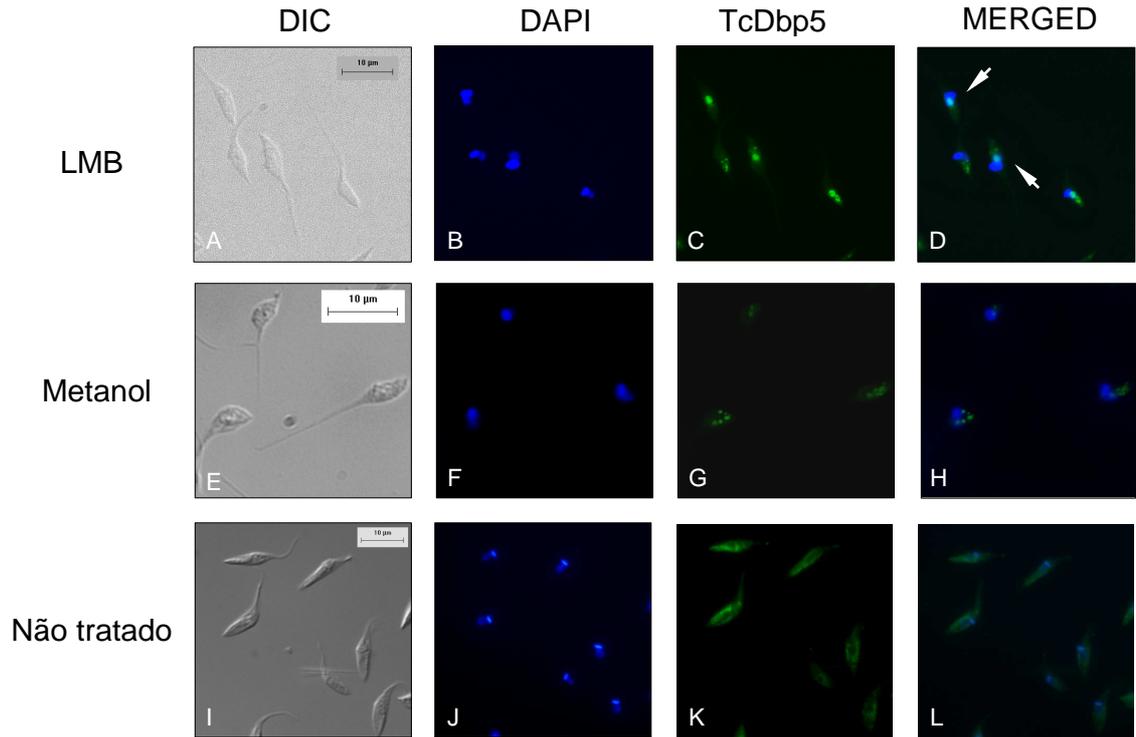


FIGURA 43 - LOCALIZAÇÃO DE TcDbp5 EM *T. cruzi* TRATADOS COM LMB. Imunofluorescência indireta analisado em microscopia ótica de fluorescência. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. TcDbp5 = imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-TcDbp5 (diluição 1:100, produzido em camundongo) e secundário Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI e IF. LMB = parasita tratados com LMB (500 ng/ml). Metanol = parasitas tratadas com metanol. Selvagem = parasitas selvagens. Pontas de setas mostram parasitas com o acúmulo nuclear de TcDbp5.

4.8. Análise de interação de TcDbp5 com nucleoporinas e receptores de exportação

Para avaliar se a localização ao redor do núcleo, conforme visto pelos ensaios de imunofluorescência e a aglomeração de TcDbp5 próximo ao complexo do poro nuclear, observada nas análises de ultraestrutura, poderia corresponder à associação com poro nuclear, foram executados testes de imunoprecipitação com a finalidade de observar a interação de TcDbp5 com nucleoporinas. Além disso, também foi avaliada sua interação com os receptores de transporte TcCrm1 e TcMex67.

4.8.1. Padronização do extrato proteico para imunoprecipitação

A primeira etapa do ensaio de imunoprecipitação consistiu na obtenção do extrato solúvel contendo componentes citoplasmáticos e nucleares. Como a maioria das proteínas do poro nuclear apresenta-se afixada dentro do CPN e este, por sua vez, está ancorado ao envelope nuclear, houve a necessidade da padronização de um protocolo que fosse suficiente para o rompimento nuclear, porém sem a degradação de proteínas. O resultado dessa padronização está apresentado na Figura 44. Para isso, os parasitas foram lisados de diferentes modos e os extratos foram analisados por *Western blot* utilizando os anticorpos contra TcDbp5, TcCrm1 e TcNup95.

Para o primeiro teste, foi utilizado o protocolo presente em Holetz *et al.* (2010), no qual o lisado celular foi obtido após a incubação do parasita por 2 horas no gelo com tampão IMP1 (KCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; Hepes 10 mM pH 7,0; Nonidet P40 0,5%). No teste 2, foi utilizado também o tampão IMP1 acrescentado a etapa de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e homogeneização em vórtex por 10 segundos (etapa adicional baseada em Luz Ambrósio *et al.*, 2009). No terceiro, foi utilizado o protocolo de fracionamento subcelular nucleocitoplasmático com a lise em tampão hipotônico (HEPES 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM) sem DTT, seguido de adição de Nonidet P40 0,5%, sonicação em potência 3 por 5 segundos e passagem do lisado em filtro 0,45 µm (etapa baseado em Allen *et al.*, 2001). No quarto e quinto teste, foram utilizados também o tampão de lise hipotônica sem DTT e adição de Nonidet P-40 0,5%. Para o teste 4, foi realizada a homogeneização por pipetagem e, para o teste 5, além de pipetagem, foi realizada uma etapa de sonicação por 5 segundos em potência 2.

Como resultado, observa-se que no teste 1, todas as proteínas analisadas permaneceram retidas na fração insolúvel do extrato. No teste dois, as proteínas também ficaram retidas na fração insolúvel e, possivelmente pela etapa de lise mecânica, a proteína TcCrm1 foi degradada. Em três, a lise por sonicação em potência 3 resultou em fragmentação de proteínas grandes como TcNup95 e TcCrm1. No teste 4, todas as proteínas apresentaram-se enriquecidas na fração solúvel, porém, foram mais representativas no teste cinco, incluindo TcNup95, um possível componente do cerne do CPN.

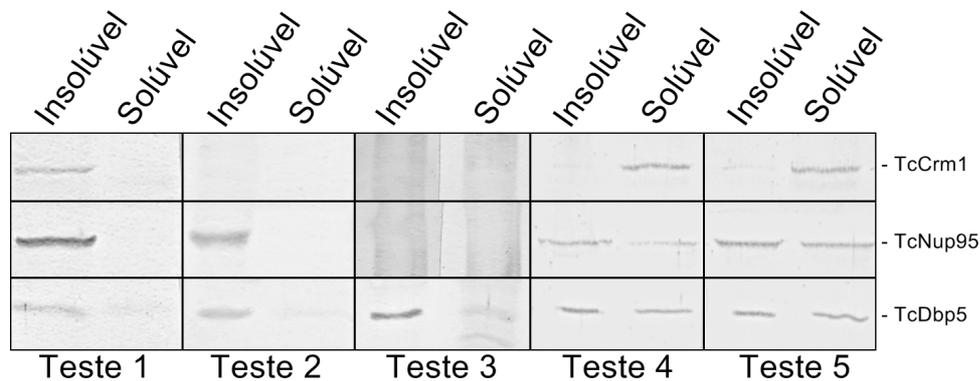


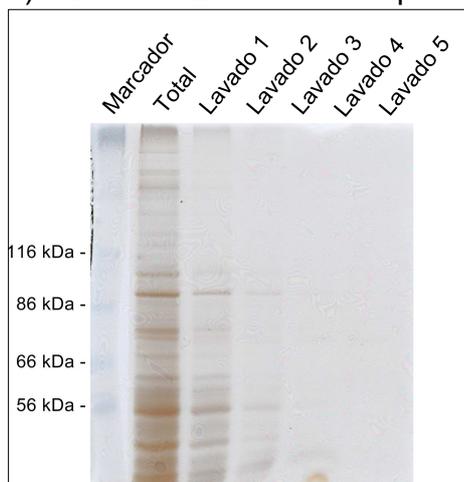
FIGURA 44 - PADRONIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE EXTRATO SOLÚVEL DE *T. cruzi*. *Western Blot* contra o extrato de proteína insolúvel e solúvel de formas epimastigotas produzidas sob diferentes protocolos. As proteínas do foram separadas por SDS-PAGE 13% e, após transferência, a membrana foi incubada com antissoro anti-TcDbp5 (produzido em camundongo, diluição 1:500) e antissoro anti-TcNup95 (produzido em camundongo, diluição 1:500) e antissoro anti-TcCrm1 (produzido em camundongo, diluição 1:100). Revelação por fosfatase alcalina.

4.8.2. Possíveis parceiros de TcDbp5

O ensaio de imunoprecipitação de complexos associados a TcDbp5 foi realizado utilizando o antissoro anti-TcDbp5 purificado de coelho e extrato de *T. cruzi* (Teste 4, conforme resultado de padronização). A especificidade das interações foi analisada por *Western blot* utilizando anticorpos anti-Nups, anti-TcCrm1 e anti-Mex67. Como controle negativo, foi utilizado o antissoro anti-H2A.

Todas as etapas de lavagem da resina em solução IMP dos imunoprecipitados foram monitoradas. Observa-se que, no último passo de lavagem, nenhuma proteína foi visualizada em gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata e que, por *Western blot*, TcDbp5, que estava presente no extrato não ligado e fracamente na primeira lavagem, não se desagregou da resina durante as outras etapas de lavagem (Figura 45).

1) SDS-PAGE corado com prata



2) Western blotting

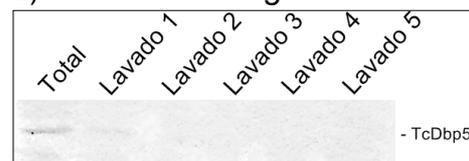
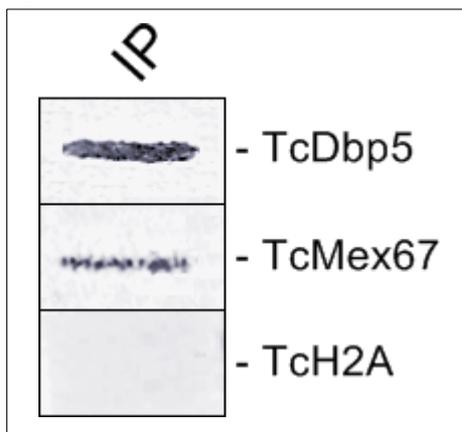


FIGURA 45 - MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE LAVAGENS DA RESINA CONTENDO OS IMUNOPRECIPITADOS DE TcDbp5. 1) Perfil eletroforético em gel desnaturante de poliacrilamida a 10% e corados com nitrato de prata. Marcador = *Prestained Molecular Weight Marker Sigma SDS7B2* (Sigma). 2) *Western Blot* contra proteínas de lavados de resina submetida a imunoprecipitação. Total = extrato solúvel proteínas não ligadas a resina durante incubação. Revelação por fosfatase alcalina. Lavados 1, 2, 3, 4 e 5 = proteínas não ligadas após lavagem com tampão de lavagem de imunoprecipitação IMP.

A análise de interação de TcDbp5 com proteínas do CPN foi realizada através de *Western blot* utilizando os anticorpos contra as nucleoporinas TcNup95, TcNup(HsNup98), TcNup147, porém, nenhuma foi reconhecida nos complexos imunoprecipitados (dados não mostrados). No entanto, quando analisada a associação com os receptores de transporte, observou-se a presença de TcMex67 no imunoprecipitado (Figura 46), enquanto que não foi observada a presença de TcCrm1 (dados não mostrados).

1) Soro imune



2) Soro pré-imune

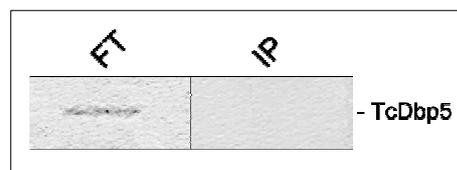


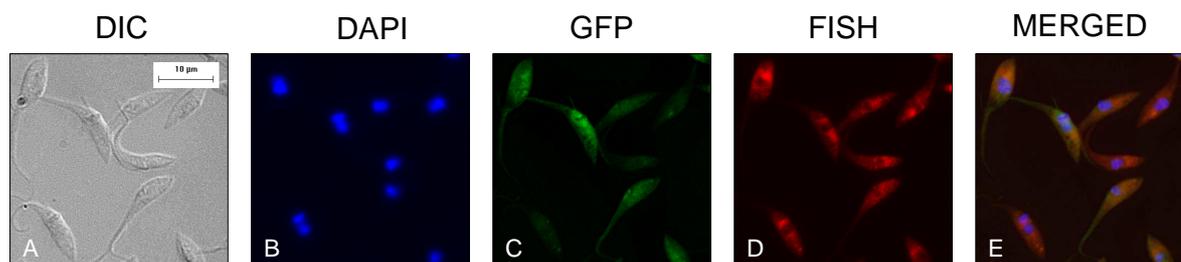
FIGURA 46 - INTERAÇÃO DE TcDbp5 COM O POSSÍVEL RECEPTOR DE TRANSPORTE TcMex67. 1) *Western Blot* contra proteínas dos complexos imunoprecipitados (IP) com o anticorpo anti-TcDbp5 produzido e purificado de coelho. Para reação, foram utilizados os anticorpos produzidos em camundongo anti-TcDbp5 (diluição 1:500), anti-TcMex67 (diluição 1:50) e anti-TcH2A (diluição 1:250). 2) *Western Blot* contra proteínas imunoprecipitadas (IP), utilizando o soro pré-imune. FT (*Flow through*) = extrato total de proteína não ligada à resina. Revelação por fosfatase alcalina.

4.9. Análise de colocalização de mRNA e TcDbp5

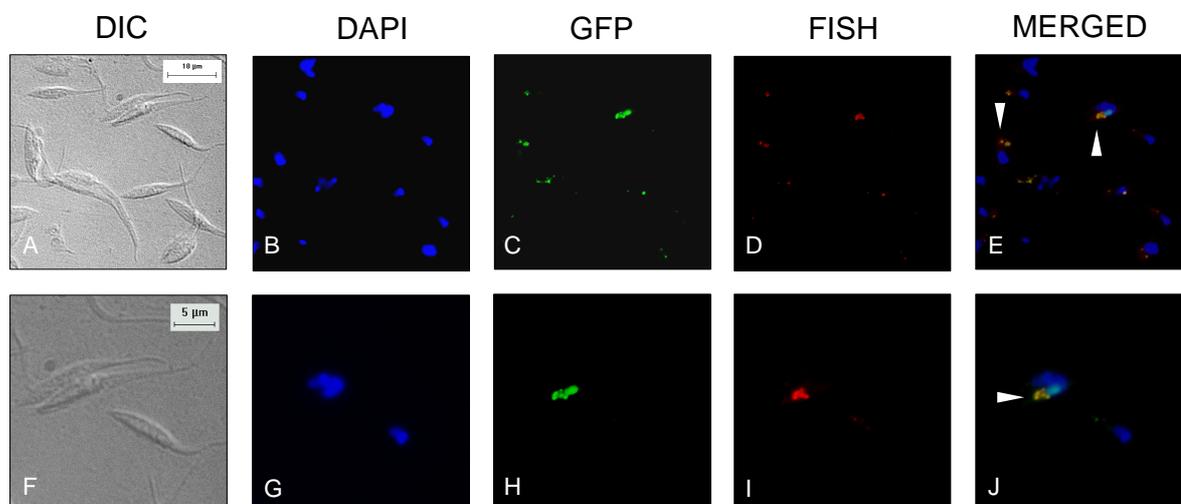
A partir de análises de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (item 3.19), foi possível a detecção de mRNA em *T. cruzi* selvagem e transfectado com o pTcPR-GFPN-Dbp5 (GFP-TcDbp5) e pTREXGFP-TcDbp5 (TcDbp5-GFP). A marcação por FISH ocorreu especificamente para RNA mensageiro, uma vez que foi utilizada a sonda oligo(dT) conjugada com digoxigenina. O sinal fluorescente foi amplificado por imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo monoclonal anti-digoxigenina, o que possibilitou a análise visual. Como controle, foi realizado também o ensaio de FISH em parasitas selvagens como padrão para a localização de mRNA.

Quando realizado o ensaio de FISH para parasitas transfectados expressando GFP-TcDbp5 (Figura 47-1D), observou-se a localização de mRNA por toda célula, sendo bastante similar ao que foi encontrado em parasitas selvagens (Figura 47-3C). Além disso, os RNA mensageiros desses parasitas transfectantes não colocalizaram completamente com a fluorescência de GFP fusionada a TcDbp5 (Figura 47-1E).

1) *T. cruzi* – GFP-TcDbp5



2) *T. cruzi* – TcDbp5-GFP



3) *T. cruzi* – Parasita selvagem

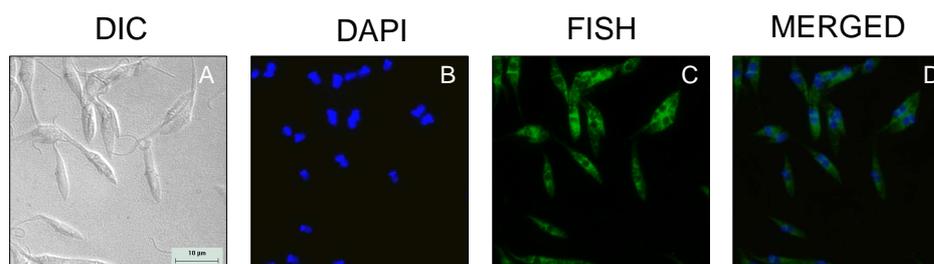


FIGURA 47 - LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcDbp5-GFP E mRNA ATRAVÉS DE FISH EM *Trypanosoma cruzi* Dm 28c. 1) FISH de mRNA utilizando *T. cruzi* transfetado com pTcPR-GFPN-Dbp5. 2) FISH de mRNA utilizando *T. cruzi* transfetado com pTREGFP-Dbp5. 3) FISH de mRNA utilizando *T. cruzi* selvagem. DIC = contraste por interferência diferencial. DAPI = DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. GFP = fluorescência de GFP fusionada a TcDbp5, observado no comprimento de onda de 488 nm. FISH = RNAs mensageiros foram marcados com sondas oligo(dT) conjugadas com digoxigenina. A localização foi realizada após imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário monoclonal anti-digoxigenina (diluição 1:300) e secundário Alexa 546 (diluição 1:400), em 1 e 2, e Alexa 488 (diluição 1:400), em 3. *Merged* = sobreposição de imagens capturadas por DAPI, GFP e FISH, em 1 e 2, e DAPI e FISH, em 3. As pontas de setas indicam algumas células com colocalização entre TcDbp5-GFP fusão C-terminal e mRNA.

Por outro lado, analisando o ensaio de FISH em parasitas com a etiqueta GFP fusionada à extremidade carboxi-terminal de TcDbp5, apesar de fraca a fluorescência emitida, obteve-se colocalização de RNAs mensageiros presentes no citoplasma do parasita com a fluorescência emitida pela fusão TcDbp5-GFP (Figuras 47-2E e D).

5. DISCUSSÃO

Apesar do desapontamento no progresso de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas nas últimas décadas, novas perspectivas foram geradas através de técnicas moleculares (FAIRLAMB, 1999; TARTELON *et al.*, 2007), como, por exemplo, a partir do resultado do sequenciamento do genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005). Além disso, a presença de funções ou estruturas exclusivas em *T. cruzi* tem um claro potencial para a identificação de alvos terapêuticos.

Muitas das modificações celulares do parasita são decorrentes do controle na expressão gênica que remodela o repertório de proteínas em cada estágio de seu ciclo de vida. O conhecimento sobre esse controle é fundamental na busca de vacinas, ainda inexistentes, e no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais específicos (DE SOUZA, 2002; CLAYTON & SHAPIRA, 2007). Nesse contexto, o processo de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos se apresenta como um interessante campo a ser explorado, principalmente por características peculiares no que tangem aos mecanismos pós-transcricionais, como a exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma.

Até o momento, muito pouco foi descrito quanto à identificação dos componentes da maquinaria de exportação de RNA mensageiro em tripanossomatídeos. Cuevas *et al.* (2005) demonstraram a presença de um ortólogo da exportina Crm1 como um possível componente envolvido no transporte de mRNA em *T. cruzi*. Kramer *et al.* (2010) descreveram a existência e localização funcional do ortólogo do receptor de transporte Mex67 de *Saccharomyces cerevisiae* em *T. brucei*. Porém, como a maquinaria do processo não foi apresentada, essa questão ainda não foi respondida.

Recentemente, no trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa (SERPELONI *et al.*, 2011a) foi apresentado, através de filogenia molecular e dados obtidos por bioinformática, o quão as vias de transporte nucleocitoplasmático dos diferentes RNAs estão conservadas ao longo da escala evolutiva. Nesse enfoque, foi realizado, através de análises de seqüência primária entre proteínas, o estudo de genética comparativa entre 45 espécies representativas da filogenia de eucariotos.

Dentre as redes de transporte, os componentes da via majoritária de exportação de RNA mensageiro independente de RanGTP através de Mex67 se mostraram muito pouco conservados quando analisado em organismos que divergiram há muito tempo, ou seja, àqueles representados na base da escala evolutiva, como *Trypanosoma cruzi*. Assim, dos componentes da via (Figura 6) somente duas proteínas se apresentaram como altamente conservadas em *T. cruzi* e estão classificadas como RNA DExD/H-box-helicases (GORBALENYA & KOONIN, 1993) ortólogas das proteínas Sub2 e Dbp5 de fungos.

Visto que Sub2 foi foco de outro trabalho do grupo (SERPELONI *et al.*, 2011b), o ortólogo de Dbp5 foi o principal objeto desse estudo com a finalidade de verificar se a função descrita em outros eucariotos se assemelha a TcDbp5. Em *S. cerevisiae* e células de mamífero, a função de Dbp5 e seus ortólogos tem sido amplamente caracterizada. Ela está relacionada à etapa tardia do processo de exportação, atuando na liberação de algumas proteínas dos complexos ribonucleoproteicos após passagem pelo CPN, o que possibilita o direcionamento do transcrito para a maquinaria de tradução. Os ortólogos de TcDbp5 apresentam-se alocados predominantemente no citoplasma e enriquecidos no envoltório nuclear (SNAY-HODGE *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*, 2004; VON MOELLER *et al.*, 2009). Semelhante aos dados apresentados na literatura, os ensaios de imunofluorescência indireta e imunocitoquímica ultraestrutural para localização celular em *T. cruzi* (Figuras 26 e 32) mostraram que TcDbp5 se trata de uma proteína presente tanto no núcleo como no citoplasma, mas também com presença perinuclear, conforme constatado pelos aglomerados de ouro em regiões próximas ao complexo de poro nuclear (Figura 32). A presença da proteína no interior do compartimento nuclear (Figuras 25, 26 e 32) foi demonstrada pelas marcações em regiões periféricas de cromatina eletrodensa (Figuras 32-2 e 32-3), ressaltando uma possível associação de TcDbp5 em sítios ativos de transcrição de mRNA (VERSCHURE *et al.*, 1999). Em tripanossomatídeos existe a localização de sítios ativos da RNA polimerase II em regiões mais centrais do núcleo preferencialmente entre a cromatina condensada e os espaços intercromatínicos (cromatina menos densa) (NARDELLI *et al.*, 2009). A única exceção ocorre no processo transcricional da seqüência *spliced leader* (CAMPBELL *et al.*, 2000), que ocorre próximo a região de nucléolo (DOSSIN & SCHENKMAN, 2005.). Esses fatos

não seriam surpreendentes, visto que em *Chironomus tentans*, foi demonstrado que o homólogo de Dbp5 liga-se cotranscricionalmente ao mRNA nascente e acompanha o mRNP até ser liberado no poro nuclear (ZHAO *et al.*, 2002). Além disso, em fungos, foi observado o envolvimento funcional de Dbp5 nas etapas iniciais da transcrição através de interação com o fator transcricional IIH (ESTRUCH & COLE, 2003), pressupondo uma função nuclear. Ademais, Mor *et al.* (2010) demonstraram *in vivo* que os mRNA nascentes são sintetizados próximos a domínios cromatínicos compactos onde, posteriormente, são canalizados em regiões intercromatínicos para atingir o CPN. Esses fatos sugerem uma possível associação de TcDbp5 com o RNA mensageiro já dentro do núcleo. Contudo, se esta associação é iniciada na transcrição ou ocorre durante ou após o processamento, esses fatos devem ser investigados para melhores inferências.

Visto que, em *S. cerevisiae*, Dbp5 é uma proteína ancorada ao complexo do poro nuclear através da associação com Nup159 (ortólogo de Nup214 ou CAN em humanos), logo se buscou avaliar o enriquecimento de TcDbp5 na região perinuclear como consequência de interação direta com proteínas do poro.

Em um primeiro momento, foi realizada uma análise das proteínas de poro nuclear de *T. cruzi* (Tabela 4) com o foco inicial de identificar uma nucleoporina, semelhante a Nup159, que atuasse no ancoramento de TcDbp5. No entanto, nenhuma proteína altamente similar foi encontrada nas buscas realizadas, uma vez que a estrutura primária não se manteve conservada. Então, foi necessária a busca de novas proteínas candidatas de interação com TcDbp5 no CPN.

As proteínas do poro nuclear são bastante similares entre fungos e metazoários (TRAN & WENTE, 2006), porém, quando analisadas em trabalhos de genética comparativa, evidencia-se a baixa conservação nos organismos basais em termos de estrutura primária das nucleoporinas (MANS *et al.*, 2004). Por isso, nos trabalhos mais recentes de evolução do CPN (DeGRASSE *et al.*, 2009; NEUMANN *et al.*, 2010) foi empregada a abordagem de proteômica acoplada às análises de bioinformática como estratégia para identificação de Nups em *T. brucei* (DeGRASSE & DEVOS, 2010), como representante de organismo primitivo. Assim, baseando-se nas proteínas de *T. brucei* descritas em DeGrasse *et al.* (2009) e Neumann *et al.* (2010), foram encontradas em *T. cruzi* onze nucleoporinas altamente similares: Aladin (TcNup50), TcNup87, TcSeh1, TcSec13, TcNup147, TcNup142, TcNup95,

TcNup84, TcNup54, TcNup(HsNup98), TcGle2. Interessantemente, Aladin que foi relatado em metazoários e plantas e não em fungos (CRONSHAW *et al.*, 2002; TAMURA *et al.*, 2010), possui um representante em tripanossomatídeos (Tabela 4), o que representa certa descontinuidade evolutiva.

TcNup87 (ortólogo de Nup107 de metazoários e Nup84 de fungos), TcSeh1 (ortólogo de Seh1 de metazoários e fungos) e TcSec13 (ortólogo de Sec13 de metazoários e de fungos), em *S. cerevisiae*, fazem parte de complexo Nup84. Enquanto que os componentes do complexo Nup170 estão representados, em *T. cruzi*, por TcNup147 (ortólogo de Nup155 em metazoários e de Nup157 / Nup170 em fungos), TcNup142 (ortólogo de Nup205 em metazoários e de Nup188 em fungos), TcNup95 (ortólogo de Nup93 em metazoários e de Nic96 em fungos). Esses dois complexos são muito importantes tanto estruturalmente, uma vez que fazem parte do esqueleto do CPN, quanto evolutivamente, pois essas nucleoporinas estão entre as mais conservadas e estão presentes também em organismos basais (DeGrasse *et al.*, 2009). Isso afirma os dados de conservação encontrados em *T. cruzi* cuja maioria das proteínas encontradas está localizada no cerne do CPN (Tabela 4).

Dentre as nucleoporinas do tipo FG, no canal central do CPN foram encontradas duas: TcNup84 (ortólogo de Nup62 de metazoários e Nsp1 de fungos) e TcNup54 (ortólogo de Nup54 de metazoários e Nup57 de fungos). Essas proteínas são essenciais para o translocamento nucleocitoplasmático de moléculas, inclusive para a exportação de RNA (TERRY & WENTE, 2007), pois são nucleoporinas com motivos ricos em fenilalanina e glicina, importantes para a interação com receptores de transporte através do CPN (TERRY & WENTE, 2009).

Duas importantes proteínas do poro nuclear associadas nas proximidades dos filamentos citoplasmáticos e com a cesta nuclear, também se mantiveram conservadas em *T. cruzi*: TcNup(HsNup98) (ortólogas de Nup98 em metazoários e de N-Nup145 / Nup116 / Nup100 em fungos) e TcGle2 (ortólogas de Rae1 em metazoários e Gle2 em fungos).

Para a análise de associação com TcDbp5, foram selecionadas então três nucleoporinas que apresentavam alguma evidência experimental com a maquinaria de exportação de RNA mensageiro em outros organismos: TcNup95, TcNup147 e TcNup(HsNup98). Essas proteínas tiveram suas sequências gênicas clonadas em

vetores apropriados com finalidade de expressar a proteína recombinante em sistema bacteriano e obtenção o anticorpo anti-nucleoporina em camundongos. Com o antissoro, seria possível analisar a interação de TcDbp5 com o poro nuclear através de ensaios de localização por microscopia e imunoprecipitação.

Os antissoros contendo anticorpo anti-Nups produzidos em camundongo se mostraram específicos no reconhecimento da proteína em extratos protéicos de *T. cruzi* pelos ensaios de *Western blot* (Figura 23). Assim, estes foram utilizados nos ensaios de microscopia para avaliar a localização dentro da célula. TcNup95 apresentou-se localizado em volta do núcleo, sugestivamente no envelope nuclear (Figura 33), em virtude de ser uma proteína pertencente ao complexo do poro nuclear. No entanto, ainda é necessário confirmar sua localização em complexo de poro nuclear através de análises de ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão. De qualquer forma, para análises de colocalização com TcDbp5, acreditamos que TcNup95 seja uma boa candidata, pois parece representar regiões de poro nuclear. Infelizmente, apenas o antissoro anti-TcDbp5 produzido em camundongo foi eficiente em ensaios de microscopia e como o anticorpo anti-TcNup95, também foi produzido em camundongo, acabamos impossibilitados de testar a associação entre as proteínas por ensaios de colocalização. Já para o anticorpo anti-TcNup147, devido a baixa titulação do soro e fraco reconhecimento de TcNup147 no extrato proteico de *T. cruzi* por ensaio de *Western Blot*, não foi possível a localização em ensaios de imunofluorescência.

Nup98 é um dos principais sítios de ancoramento de fatores de transporte (RADU *et al.*, 1995) e, em metazoários, apresenta envolvimento direto com a maquinaria de exportação de mRNA (BROWN *et al.*, 1995; BHARATHI *et al.*, 1997; KRAEMER & BLOBEL, 1997). Desse modo, a nucleoporina Gle2 atua atracando e entregando o receptor heterodimérico Mex67-Mtr2 (associado ao mRNP) para Nup98 (BLEVINS *et al.*, 2003, STRAWN *et al.*, 2001). Consequentemente, a movimentação do transcrito pelo CPN é iniciada por Nup98. Além disso, Nup98 atua também no translocamento bidirecional de outros receptores como Crm1 pelo CPN (OKA *et al.*, 2010). Analisando a estrutura dessa Nup, a maioria das repetições FG de interação com receptores de transporte foi localizada na extremidade N-terminal da proteína (RADU *et al.*, 1995). Desse modo, os resultados de análise comparativa identificaram um gene candidato como o codificador da proteína semelhante a

Nup98 em *T. cruzi*. No entanto, a seqüência está anotada nos bancos de dados genômicos como um pseudogene. O dado que reforça a existência de um problema decorrente de montagem do genoma, vem do fato deste pseudogene apresentar as repetições FG que são bastante representativas em Nup98. Sendo assim, acreditamos que esta região repetitiva resultou em erro na montagem dos *contigs* durante o sequenciamento exatamente na região 5'. Dessa maneira, não foi possível prever, a princípio, sua massa molecular. Ainda assim, por acreditarmos ser um erro de montagem, resolvemos clonar parte do gene para expressão da proteína recombinante. O anticorpo anti-TcNup(HsNup98) reconheceu nos extratos de *T. cruzi* uma proteína de aproximadamente 160 kDa (Figura 23-4). Esse valor de massa molecular pode estar correto uma vez que em *T. brucei*, o ortólogo TbNup158, apresenta 158 kDa e, em *L. major*, LmNup159, 159 kDa, ou seja, apresentam bastante semelhança quanto ao peso molecular.

Apesar de os ensaios de *Western blot* demonstrarem um reconhecimento específico por anti-TcNup98 (Figura 23-4), quando analisados os dados de microscopia de TcNup(HsNup98), observou-se uma localização aparentemente inespecífica quando comparado a outros organismos. TcNup(HsNup98) localizou-se em regiões pontuais (Figura 34) tanto no citoplasma quanto no núcleo e sem uma marcação perinuclear. No CPN de outros eucariotos, Nup98 é uma proteína localizada em ambas as faces nuclear (na cesta nuclear) e citoplasmática (próximo aos filamentos citoplasmáticos). Porém, em células humanas, caracteristicamente Nup98 apresenta mobilidade por diferentes posições dentro da célula, tanto nuclear quanto citoplasmática (GRIFFIS *et al.*, 2002; GRIFFIS *et al.*, 2003; GRIFFIS *et al.*, 2004) e não está localizada somente no CPN. No interior nuclear, Nup98 foi localizada em corpos GLFG presentes no interior do nucléolo (GRIFFIS *et al.*, 2002) e isso poderia explicar a marcação nuclear observada na Figura 34. Para certificar que a marcação observada corresponde a localização real de TcNup(HsNup98), o trabalho de Kodiha *et al.* (2002) sugere distintos protocolos para avaliar a localização subcelular nuclear ou citoplasmática de Nup98. Assim, será preciso investir em variação dos protocolos usados neste trabalho para confirmarmos a localização de TcNup(HsNup98).

Como não foi possível realizar os ensaios de colocalização entre TcDbp5 e proteínas de poro nuclear, pela inviabilidade dos anticorpos mais eficientes

produzidos em camundongos, a continuidade do trabalho prosseguiu-se através de análises *in silico* da proteína para busca de características específicas e reforçar sua estrutura como RNA helicase. A estrutura tridimensional de TcDbp5 apresentou-se bastante conservada (Figura 38), principalmente quando comparada a DDX19 de humanos (Figura 38-2). Contudo, a análise de modelagem molecular foi baseada em duas isoformas do fator de iniciação eucariótico 4A (eIF4A e eIF4AIII). Em humanos, existem três isoformas desse fator de iniciação eucariótico eIF4A, sendo denominadas de eIF4A, eIF4AII e eIF4AIII (LI *et al.*, 1999). eIF4A e eIF4AII apresentam alta similaridade e atuam na mesma função iniciando o processo da tradução. Já eIF4AIII apresenta similaridade de 65% com eIF4A e está presente no complexo de junção de éxon [EJC – *Exon junction complex* (CHAN *et al.*, 2004)]. Em mamíferos, esse complexo se localiza no núcleo e está relacionado ao processo, independente da tradução, de decaimento mediado pelo *Nonsense* (NMD) do mRNA (SHIBUYA *et al.*, 2004). Em eucariotos, a primeira etapa da tradução é favorecida pelo reconhecimento do cap (7-metil-guanosina) na extremidade 5' do mRNA pelo complexo de iniciação da tradução eIF4F. Esse complexo é composto por eIF4G, eIF4E e eIF4A. Então, eIF4A, após ativação pela proteína eIF4B, é responsável por desfazer estruturas secundárias em regiões UTR do mRNA. Consequentemente, isso permite o reconhecimento do tRNA iniciador contido na subunidade ribossomal menor pelo códon iniciador através do mapeamento de sequências (NELSON & COX, 2002). eIF4A é bastante estudado e caracterizado estruturalmente em outros organismos (PAUSE *et al.* 1993; BENZ *et al.*, 1999; JOHNSON & MCKAY, 1999; CARUTHERS *et al.*, 2000). Desse modo, é considerado o protótipo de todas DEAD-box helicases (BENZ *et al.*, 1999; ROGERS *et al.*, 2002; TUTEJA *et al.*, 2008). Essas evidências fundamentaram a idéia de se investigar a associação de TcDbp5 com a maquinaria de tradução. Um segundo ponto que justifica essa análise está relacionado a semelhança estrutural entre homólogos de Dbp5 e eIF4A, relatados em alguns trabalhos (DOSSANI *et al.*, 2009; NAPETSCHNIG *et al.*, 2009). Adicionalmente, Weirich *et al.* (2004) também realizaram a predição de estrutura de Dbp5 de *S. cerevisiae* utilizando como molde a eIF4A. Isso acontece principalmente porque a estrutura peptídica de ambas as proteínas se mantiveram conservadas. Assim como Dbp5, eIF4A e eIF4AIII também são proteínas da família DEAD/H servindo como RNA helicases modelo para a geração de estruturas como foi obtido

para TcDbp5. Porém, vale ressaltar que apesar de ser altamente semelhante a eIF4A, uma distinta característica da maioria dos homólogos de Dbp5 é a presença de seis aminoácidos não consensos inseridos na região C-terminal entre motivos V e VI (SNAY-HODGE *et al.*, 1998). Porém, essa pequena seqüência não foi encontrada em TcDbp5 (Figura 36). Uma explicação seria a grande divergência de *T. cruzi* com os organismos modelos, cujos aminoácidos não se mantiveram conservados.

Com isso, a associação de TcDbp5 com polissomos foi avaliada através de sua presença em extrato provenientes de gradientes de sedimentação. Desse modo, o extrato contendo as frações polissomais isoladas de lisado de formas epimastigotas e epimastigotas submetidas a estresse foram analisadas. Os resultados obtidos com parasitas tratados com cicloheximida, que mantém os polissomos formados (SCHNEIDER-POETSCH *et al.*, 2010), mostraram que TcDbp5 está presente majoritariamente nas frações de baixa densidade do gradiente de sacarose e não nas de alta densidade que contém polissomos (Figuras 40-1 e 41-1). O mesmo perfil de sedimentação foi observado nas análises com parasitas tratados com puromicina, que atua mimetizando o aminoacil-transferase no sítio A, resultando em término prematuro da tradução (AZZAM *et al.*, 1973) e dissociação dos polissomos (Figura 40-2). Comparando com o perfil de sedimentação observado para a proteína S7 (componente da subunidade menor dos ribossomos), infere-se que TcDbp5 está relacionada a complexos independente de polissomos, ou seja, a marcação minoritária observada em algumas frações correspondentes a polissomos possivelmente seja resultado de cossedimentação durante o fracionamento (Figura 40-1). Além disso, Alves *et al.* (2010) apresentaram, através de análise de proteômica, as proteínas que poderiam se associar ao mRNA mensageiro na formação de complexos ribonucleoproteicos durante o processo de tradução nas formas epimastigotas e epimastigotas submetidas a estresse. Nesse trabalho, foi possível verificar a presença de TcDbp5 nos dados gerados pela espectrometria de massa. No entanto, ela foi identificada em complexos não associadas a polissomos, ou seja, como uma proteína não relacionada à tradução, o que corrobora os dados obtidos em nossas análises.

Essas evidências sugerem que, em *T. cruzi*, TcDbp5 possa apresentar características diferentes da homóloga em *S. cerevisiae*, pois Gross *et al.* (2004) observaram a associação de Dbp5 com frações polissomais a partir de gradiente de

sacarose. Nesse estudo com fungos, também foi demonstrado que Dbp5 interage com complexos de terminação da tradução Sup45 (também denominado de eRF1 - *eukaryotic release factor 1*) e Sup35 (ou eRF3 - *eukaryotic release factor 3*). Dbp5 seria, então, também requisitada para a etapa final da tradução, auxiliando no reconhecimento do códon de terminação através do recrutamento de Sup35. Assim, esses fatos demonstram que a associação dos homólogos de Dbp5 com RNA pode não estar restrita a funcionalidade no CPN durante a exportação do transcrito. De qualquer forma, é intrigante a localização citoplasmática de TcDbp5, despertando o interesse em investigar sua função nesse compartimento. Como proposto por Alves *et al.*, 2010, TcDbp5 poderia fazer parte de complexos ribonucleoproteicos, o que pode pressupor que teria alguma atividade na regulação da expressão de mRNAs.

Como alternativa a utilização de anticorpos nos ensaios de colocalização e co-imunoprecipitação, foram realizados ensaios de manipulação genética voltados à obtenção de TcDbp5 fusionada a GFP. No entanto, foram observados resultados divergentes quanto a localização de TcDbp5 nos transfectantes de *T. cruzi* quando comparadas às fusões amino- ou carboxi-terminal (Figuras 28 e 31) através de microscopia de fluorescência. Inicialmente, foi analisada a fusão de GFP à extremidade N-terminal e TcDbp5 foi localizada por toda extensão do parasita, mas com enriquecimento no interior nuclear (Figuras 28 e 47) e aparentemente sem a expressiva localização perinuclear, característica dos ensaios de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-TcDbp5. Sabe-se que em fungos, a extremidade N-terminal de Dbp5 apresenta uma região não consenso que interage com proteínas do poro nuclear (WEIRICH *et al.*, 2004; NAPETSCHNIG *et al.*, 2009). Então, pode-se pressupor que a etiqueta GFP fusionada nessa extremidade estaria interferindo na localização de TcDbp5, o que representaria o posicionamento não real da proteína.

Com base nestes resultados, então, foi realizada também a fusão da etiqueta GFP na extremidade C-terminal de TcDbp5, utilizando para isso o vetor pTREXGFP (DaROCHA *et al.*, 2004). Neste caso, foi possível observar marcação perinuclear, semelhante aos resultados obtidos com anti-TcDbp5 (Figura 31). Interessantemente, ensaios de imunofluorescência com o transfectante mostraram que a marcação com anti-TcDbp5 colocaliza com a proteína fusionada a GFP na região citoplasmática (Figura 31-2). No entanto, a proteína fusionada também apresentou sinal no interior nuclear mais evidente do que nos ensaios com o

anticorpo. Isso pode ser resultado da superexpressão de TcDbp5 fusionada que estaria possibilitando a visualização da localização nuclear ou também alguma interferência em virtude da presença de GFP. É possível que o primeiro caso seja verdadeiro visto que pela microscopia eletrônica com anticorpo anti-TcDbp5 foi possível confirmar a presença da proteína no núcleo (Figura 32). Sendo assim, a presença nuclear de TcDbp5 pode inferir uma propriedade funcional caracteristicamente encontrada em organismos modelos: a capacidade de a proteína migrar por diferentes posições dentro da célula. Hodge *et al.* (1999) descreveram Dbp5 como uma proteína que migra entre o núcleo e o citoplasma dependente da exportina Crm1. Nesse mesmo estudo, mutações no gene de Crm1 resultaram no acúmulo de Dbp5 no interior do núcleo.

Apesar de não ser descartada a hipótese de que a fusão com GFP interfira com a localização de TcDbp5, acreditamos que a localização nuclear faça parte da atividade funcional da proteína. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com Leptomicina B, que especificamente atua sobre Crm1 (HAMAMOTO *et al.*, 1985), interfere na localização citoplasmática da proteína. Visto que trabalhos anteriores mostraram a alta conservação de Crm1 em *T. cruzi* (SERPELONI *et al.*, 2011a), com a presença de um domínio CCR (CCR - *Conserved Central Region*) de ligação ao cargo e à LMB (CUEVAS *et al.*, 2005), pode-se pressupor que o tratamento com a droga inviabilize o transporte da proteína para o citoplasma do parasita. TcDbp5 localizou-se no interior nuclear na maioria das células analisadas (Figura 43), ou seja, a via de Crm1 foi interrompida e o que confirma a migração de TcDbp5 através da via de exportação de proteína dependente de TcCrm1.

Outro aspecto relevante é que alguns estudos em eucariotos superiores revelaram que a via de exportação de mRNA não foi afetada quando células foram tratadas com LMB, inferindo que para esses organismos a via Crm1 não é importante para esse transporte (NEVILLE & ROSBASH, 1999; BRENNAN *et al.*, 2000; HEROLD *et al.*, 2003; SCHÜTZ *et al.*, 2006). Contudo em Cuevas *et al.* (2005) foi apresentado que a via de Crm1 poderia representar uma rota para a exportação de mRNA em *T. cruzi*. Nesse mesmo estudo, a inativação da via através do tratamento dos parasitas com LMB resultou no acúmulo de mRNA no núcleo por FISH, efeito que também foi demonstrado para duas espécies de mRNA, referentes a TcUBP e TcPABP1, por ensaios de fracionamento celular. Adicionalmente, dados

do nosso grupo obtidos por análises de genômica comparativa, mostraram que a via de exportação de mRNA é a menos conservada, incluindo o receptor de exportação de mRNA Mex67 (SERPELONI *et al.*, 2011a). Este trabalho propõe que inovações surgiram mais tarde na evolução, tornando a via de exportação de mRNA mais especializada e que Crm1 ainda faria parte da via nas linhagens mais divergentes.

Em vista disso, o tratamento com Leptomicina B em *T. cruzi* poderia estar interferindo com a exportação de proteína, de mRNA ou de ambos. Assim, caso TcDbp5 faça parte de um complexo responsável pela exportação de mRNA, nossos dados poderiam inferir que LMB interrompeu a via de forma indireta. O tratamento com LMB possivelmente resultou no acúmulo de TcDbp5 na fração nuclear, o que impediria a presença funcional da proteína no citoplasma e, conseqüentemente, resultaria no acúmulo de mRNA. Isso foi observado em fungos por Hodge *et al.* (1999) que, sob a condição de mutação em Crm1 e superexpressão de Dbp5, foi observado um visível acúmulo de Dbp5 no núcleo e a interrupção da via de exportação de mRNA. No entanto, dados em *T. brucei* mostraram que, apesar de pouco conservada, a proteína homóloga de Mex67 está presente neste organismo (SCHWEDE *et al.* 2009) e que o silenciamento do gene por RNAi causa o acúmulo de mRNA (KRAMER *et al.*, 2010), propondo que ela tenha a funcionalidade como receptor no transporte de mRNA. Ademais, os resultados de imunoprecipitação obtidos no presente trabalho mostraram que TcDbp5 imunoprecipita com TcMex67, sugerindo uma interação entre as duas proteínas. Isto possibilita especular que em *T. cruzi*, a exportação de mRNA possa ocorrer na via dependente de Crm1, no entanto, outra via de transporte dependente de TcMex67 possa existir e que, de alguma forma, TcDbp5 estaria atuando em ambas. Contudo, os dados obtidos até o momento não podem comprovar isso, sendo ainda necessário aprofundar a investigação deste fato.

Por essa razão, inicialmente resolvemos analisar a relação de TcDbp5 com mRNA através de ensaios de colocalização por ensaios de FISH, utilizando como sonda oligo(dT). Neste caso, os ensaios utilizando os transfectantes expressando TcDbp5 fusionada a GFP, forneceram pistas de que TcDbp5 colocaliza com mRNA no citoplasma. A marcação obtida pela fluorescência de GFP com a fusão C-terminal colocalizou com a marcação de FISH correspondente ao mRNA no citoplasma do parasita (Figura 47-2).

Esta colocalização não foi evidente com os transfectantes expressando a fusão N-terminal GFP-TcDbp5. Como a marcação para GFP apresentou-se difusa pelo citoplasma, algumas regiões apresentaram sobreposição e outras não. De qualquer forma, protocolos para tornar o sinal mais forte ao ponto de permitir análises de microscopia confocal deverão ser feitas para confirmar esta colocalização, e assim, avaliar se a fusão N-terminal poderia estar interferindo com a função de TcDbp5 e conseqüentemente com o transporte de mRNA.

Em princípio, os ensaios de imunoprecipitação e imunofluorescência foram as abordagens escolhidas para iniciar a investigação de TcDbp5 e sua associação com proteínas do complexo do poro nuclear, receptores de transporte (TcCrm1 e TcMex67) e mRNA. Apesar de Nup159, responsável pelo ancoramento de Dbp5 no CPN, e Gle1, o ativador de Dbp5, não estarem conservados em tripanossomatídeos, outras nucleoporinas escolhidas em *T. cruzi*, direta ou indiretamente envolvidas com a exportação de mRNA em outros organismos, foram analisadas. Porém, muitas divergências técnicas desfavoreceram esses ensaios. Para os ensaios de imunofluorescência: a marcação aparentemente inespecífica apresentada para TcCrm1, a não marcação de Nup147 e a inviabilidade da utilização de anticorpo produzido em coelho de TcDbp5 impossibilitaram o ensaio de colocalização por microscopia. Para o ensaio de imunoprecipitação, o principal empecilho foi a obtenção de um extrato nos quais os complexos de proteína do poro nuclear fossem solubilizadas sem a degradação, já que as nucleoporinas correspondem a proteínas de alta massa molecular (Tabela 4). Os resultados da padronização da obtenção do extrato estão apresentados na Figura 44. Contudo, não foi observado a interação de TcDbp5 com proteínas do poro nuclear nesse ensaio (dados não mostrados). Isto poderia ser explicado pelo fato de as proteínas escolhidas não serem as que interagem diretamente com TcDbp5. Os dados apresentados por Serpeloni *et al.* (2011a) demonstram que os componentes da via de exportação de mRNA são muito pouco conservados, incluindo os parceiros principais de TcDbp5 no CPN. Assim, para tripanossomatídeos, propõe-se que novas proteínas, ainda não descritas em outros organismos, possam estar envolvidas. Métodos quantitativos e qualitativos como a proteômica serão abordagens necessárias para avaliar esta hipótese.

Em suma, acreditamos na hipótese de que TcDbp5 se liga ao RNA mensageiro ainda no núcleo e permanece associado durante o transporte

nucleocitoplasmático até liberar o transcrito para o processo da tradução no citoplasma, ou seja, TcDbp5 apresentaria funções em ambos os compartimentos. Porém, para inferências mais assertivas, o aprofundamento nas análises apresentadas será necessário.

6. CONCLUSÃO

Enfim, o trabalho experimental permitiu gerar as ferramentas necessárias para os ensaios biológicos e, apesar de ser clara a necessidade de aprimoramento das abordagens de colocalização e imunoprecipitação, os dados apresentados são promissores quanto ao entendimento da função de TcDbp5 no processo de exportação de mRNA. Com base nos dados obtidos até o momento, TcDbp5 apresentou-se alocado nos compartimentos nuclear e citoplasmático, com enriquecimento ao redor do envelope nuclear e perfil de localização muito semelhante a TcNup95, proteína do CPN. Pelos ensaios de sedimentação de polissomos por gradiente de sacarose, a localização citoplasmática não reflete associação da proteína com a maquinaria de tradução. Os resultados preliminares de FISH de mRNA propõem que TcDbp5 colocaliza com mRNA. Pelas análises de imunoprecipitação com TcMex67 e do tratamento com Leptomicina B, demonstrando que a proteína migra entre o núcleo e o citoplasma, podemos pressupor que possivelmente TcDbp5 pode estar envolvida em vias de transporte de mRNA.

Estes resultados também serão melhor avaliados através de ensaios por genética reversa como *knockout* gênico em *T. cruzi* ou RNAi em *T. brucei*, pois o silenciamento de TcDbp5 pode resultar no acúmulo de RNA mensageiro no núcleo ou outros fenótipos que ajudarão a responder a função de TcDbp5.

7. PERSPECTIVAS

- Analisar TcNup(HsNup98) conforme Kodiha *et al.* (2002) através de distintos protocolos para localização subcelular nuclear ou citoplasmática.
- Realizar ensaios de FISH para colocalização de mRNA com TcDbp5 através de ensaio de imunofluorescência indireta.
- Analisar a associação de TcDbp5 com sítios ativos de transcrição.
- Estabelecer um sistema para estudo de genética reversa através de nocaute gênico de TcDbp5 em *T. cruzi* ou o silenciamento por RNA de interferência em *T. brucei*.
- Analisar a função de TcDbp5 no processo de exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e métodos quantitativos após silenciamento da expressão da proteína.
- Analisar o efeito na tradução em parasitas com a expressão silenciada de TcDbp5.
- Identificar as proteínas associadas a TcDbp5 por proteômica quantitativa.

REFERÊNCIAS

ALCÁZAR-ROMÁN, A.R.; TRAN, E.J.; GUO, S.; WENTE, S.R. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. **Nat Cell Biol**, v.8(7), p.711-716, 2006.

ALLEN, N.P.; HUANG, L.; BURLINGAME, A.; REXACH, M. Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. **J Biol Chem**, v.276(31), p.29268-29274, 2001.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALVES LR, AVILA AR, CORREA A, HOLETZ FB, MANSUR FC, MANQUE PA, DE MENEZES JP, BUCK GA, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v.452(2), p.72-78, 2010.

ANDREWS, N.; ABRAANS, C.K.; SLATIN, S.L.; GRIFFITHS, G. A *Trypanosoma cruzi* secreted protein immunologically related to the complement C9: evidence for membrane pore-forming activity. **Cell**, v.61, p.1277-1287, 1990.

ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B.P.; CARRINGTON, M.; DEPLEGGE, D.P.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GARDNER, M.J.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O.S.; HEIGES, M.; HERTZ-FOWLER, C.; HOUSTON, R.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J.C.; KRAEMER, E.; LI, W.; LOGAN, F.J.; MILLER, J.A.; MITRA, S.; MYLER, P.J.; NAYAK, V.; PENNINGTON, C.; PHAN, I.; PINNEY, D.F.; RAMASAMY, G.; ROGERS, M.B.; ROOS, D.S.; ROSS, C.; SIVAM, D.; SMITH, D.F.; SRINIVASAMOORTHY, G.; STOECKERT, C.J. Jr; SUBRAMANIAN, S.; THIBODEAU, R.; TIVEY, A.; TREATMAN, C.; VELARDE, G.; WANG, H.. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v.38(Database issue), p.D457-462, 2010.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, T.R.; KINGSTON, R.E. Current Protocols in Molecular Biology. **New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons**. 1987.

AZZAM, M.E.; ALGRANATI, I.D. Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.70(12), p.3866-3869, 1973.

BAGLEY, S.; GOLDBERG, M.W.; CRONSHAW, J.M.; RUTHERFORD, S.; ALLEN, T.D. The nuclear pore complex. **J Cell Sci**, v.113(22), p.3885-3886, 2000.

BATISTA, M.; MARCHINI, F.K.; CELEDON, P.A.; FRAGOSO, S.P.; PROBST, C.M.; PRETI, H.; OZAKI, L.S.; BUCK, G.A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M.A. A high-

throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v.10, p.259, 2010.

BENZ, J.; TRACHSEL, H.; BAUMANN, U. Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*-the prototype of the DEAD box protein family. **Structure**, v.7(6), p.671-679, 1999.

BHARATHI, A., GHOSH, A., WHALEN, W.A., YOON, J.H., PU, R., DASSO, M. & DHAR, R. The human RAE1 gene is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene involved in nuclear export of Poly(A)⁺ RNA. **Gene**, v.198, p.251–258, 1997.

BLEVINS, M.B.; SMITH, A.M.; PHILLIPS, E.M.; POWERS, M.A. Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. **J Biol Chem**, v.278(23), p.20979-20988, 2003.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol**, v.106, p.1349-1358, 1988.

BRECHT, M.; PARSONS, M. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. **Mol Biochem Parasitol**, v.97, p.189-198, 1998.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev Microbiol**, v.27, p.347-382, 1973.

BRENNAN, C.M.; GALLOUZI, I.E.; STEITZ, J.A. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. **J Cell Biol**, v.151(1), p.1-14, 2000.

BROHAWN, S.G.; PARTRIDGE, J.R.; WHITTLE, J.R.; SCHWARTZ, T.U. The nuclear pore complex has entered the atomic age. **Structure**, v.17(9), p.1156-1168, 2009.

BROWN, J.A., BHARATHI, A., GHOSH, A., WHALEN, W., FITZGERALD, E. & DHAR, R. A mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene causes defects in poly(A)⁺ RNA export and in the cytoskeleton. **J Biol Chem**, v.270, p.7411-7419, 1995.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.6, p.93-100, 1964.

CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R.; YU, M.C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. **Parasitol Today**, v.16, p.78-82, 2000.

CARUTHERS, J.M.; JOHNSON, E.R.; MCKAY, D.B. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97(24), p.13080-13075, 2000.

CARUTHERS, J.M.; McKAY, D.B. Helicase structure and mechanism. **Curr Opin Struct Biol**, V.12(1), p.123-133, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Blood donor screening for Chagas disease – United States, 2006-2007. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.56(7), p.141-143, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Parasites and Health: Tripanosomíase, American (*Trypanosoma cruzi*). Site: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>. Acessado em 7 de Janeiro de 2011, 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* gen.n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CHAN, C.C.; DOSTIE, J.; DIEM, M.D.; FENG, W.; MANN, M.; RAPPSILBER, J.; DREYFUSS, G. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. **RNA**, v.10(2), p.200-209, 2004.

CHANG, T. H.; ARENAS, J.; ABELSON, J. Identification of five putative yeast RNA Helicase genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p.1571-1575, 1990.

CLAYTON, C; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v.156(2), p.93-101, 2007.

COLE, C.N.; SCARCELLI, J.J. Unravelling mRNA export. **Nat Cell Biol**, v.8(7), p.645-647, 2006.

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.N.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v.16, p.315-327, 1985.

CONTRERAS, V.T.; JORGE, T.C.A.; BONALDO, M.C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the *Dm* 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.83(1), p.123-133, 1988.

COOK, A.; BONO, F; JINEK, M; CONTI, E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v.76, p.647-671, 2007.

CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N.K.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, v.367, p.17-37, 2006.

CRONSHAW, J.M.; KRUTCHINSKY, A.N.; ZHANG, W.; CHAIT, B.T.; MATUNIS, M.J. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v.158(5), p.915-927, 2002.

CUEVAS, I.C.; FRASCH, A.C.; D'ORSO, I. Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.139(1), p.15-24, 2005.

DaROCHA, W.D.; SILVA, R.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; PIRES, S.F.; FREITAS, J.M.; MACEDO, A.M.; VAZQUEZ, M.P.; LEVIN, M.J.; TEIXEIRA, S.M. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res**, v.92(2), p.113-120, 2004

DE SOUZA, W. O Parasito e sua Interação com Hospedeiro. Em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M., eds. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, Segunda Edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p.88-126, 2000.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid Biol Dis**, v.1:3, 2002.

DeGRASSE, J.A.; DUBOIS, K.N.; DEVOS, D.; SIEGEL, T.N.; SALI, A.; FIELD, M.C.; ROUT, M.P.; CHAIT, B.T. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. **Mol Cell Proteomics**, v.8(9), p.2119-2130, 2009.

DeGRASSE, J.A.; DEVOS, D. A functional proteomic study of the *Trypanosoma brucei* nuclear pore complex: an informatic strategy. **Methods Mol Biol**, v.673, p.231-238, 2010.

DEL PRIORE, V.; HEATH, C.; SNAY, C.; MACMILLAN, A.; GORSCH, L.; DAGHER, S.; COLE, C. A structure/function analysis of Rat7p/Nup159p, an essential nucleoporin of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Sci**, v.110(Pt23), p.2987-2999, 1997.

DEVOS, D.; DOKUDOVSKAYA, S.; WILLIAMS, R.; ALBER, F.; ESWAR, N.; CHAIT, B.T.; ROUT, M.P.; SALI, A. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103(7), p. 2172-2177, 2006.

DONG, X.; BISWAS, A.; SÜEL, K.E.; JACKSON, L.K.; MARTINEZ, R.; GU, H.; CHOOK, Y.M. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. **Nature**, v.458(7242), p.1136-1141, 2009.

DOSSIN, FDE M.; SCHENKMAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**, v.4(5), p.960-970, 2005.

DOSSANI, Z. Y.; WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BERGER, J. M.; WEIS, K. Structure of the C-terminus of the mRNA export factor Dbp5 reveals the interaction surface for the ATPase activator Gle1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, p.16251-16256, 2009.

DWORETZKY, S.I.; FELDHERR, C.M. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. **J Cell Biol**, v.106(3), p.575-584, 1988.

EDDY, S. R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v.14, p.755–763, 1998.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J.F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309(5733), p.409-415, 2005.

ESTRUCH, F.; COLE, C.N. An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. **Mol Biol Cell**, v.14(4), p.1664-1676, 2003.

FAIRLAMB, A.H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas' Disease. **Medicina (B. Aires)**, v.59 (Suppl II), p.179-187, 1999.

FORNEROD, M.; OHNO, M.; YOSHIDA, M.; MATTAJ, I.W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v.90(6), p.1051-1060, 1997.

FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.55, p.127-134, 1992.

FRANZ, C.; ASKJAER, P.; ANTONIN, W.; IGLESIAS, C.L.; HASELMANN, U.; SCHELDER, M.; DE MARCO, A.; WILM, M.; ANTONY, C.; MATTAJ, I.W. Nup155 regulates nuclear envelope and nuclear pore complex formation in nematodes and vertebrates. **EMBO J.**, v.24(20), p.3519-3531, 2005.

FRIED, H.; KUTAY, U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. **Cell Mol Life Sci**, v.60(8), p.1659-1688, 2003.

GATFIELD, D.; LE HIR, H.; SCHMITT, C.; BRAUN, I.C.; KÖCHER, T.; WILM, M.; IZAURRALDE, E. The DEXH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. **Curr Biol**, v.11(21), p.1716-1721, 2001.

GILBERT, W.; SIEBEL, C.W.; GUTHRIE, C. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. **RNA**, v.7(2), p.302-313, 2001.

GORBALENYA, A.E.; KOONIN, E.V. Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. **Curr Opin Struct Biol**, v.3, p.419–429, 1993.

GORSCH, L.C.; DOCKENDORFF, T.C.; COLE, C.N. A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. **J Cell Biol**, v.129(4), p.939-955, 1995.

GRADIA, D.F.; RAU, K.; UMAKI, A.C.; DE SOUZA, F.S.; PROBST, C.M.; CORREA, A.; HOLETZ, F.B.; AVILA, A.R.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P. Characterization of a novel Obg-like ATPase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v.39(1), p.:49-58, 2009.

GRIFFIS, E.R.; CRAIGE, B.; DIMAANO, C.; ULLMAN, K.S.; POWERS, M.A. Distinct functional domains within nucleoporins Nup153 and Nup98 mediate transcription-dependent mobility. **Mol Biol Cell**, v.15, p.1991-2002, 2004.

GRIFFIS, E.R.; ALTAN, N.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; POWERS, M.A. Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription dependent dynamics. **Mol Biol Cell**, v.13, p.1282-1297, 2002.

GRIFFIS, E.R., XU, S.; POWERS M.A. Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. **Mol Biol Cell**, v.14, p.600-610, 2003.

GROSS, T.; SIEPMANN, A.; STURM, D.; WINDGASSEN, M.; SCARCELLI, J.J.; SEEDORF, M.; COLE, C.N.; KREBBER, H. The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination. **Science**, v.315(5812), p.646-649, 2007.

HAMAMOTO, T.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action of leptomycin B on *Schizosaccharomyces pombe*. **J. Antibiotics**, v.38, p.1573–1580, 1985.

HEROLD, A.; TEIXEIRA, L.; IZAURRALDE, E. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. **EMBO J**, v.22(10), p.2472-2483, 2003.

HODGE, C. A.; COLOT, H. V.; STAFFORD, P.; COLE, C. N. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. **EMBO J**, v.18, p.5778–5788, 1999.

HOLETZ, F.B.; CORREA, A.; AVILA, A.R.; NAKAMURA, C.V.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.356(4), p.1062-1067, 2007.

HOLETZ, F.B.; ALVES, L.R.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; MARCHINI, F.K.; MANQUE, P.; BUCK, G.; KRIEGER, M.A.; CORREA, A.; GOLDENBERG, S. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS J**, v.277(16), p.3415-3426, 2010.

HUANG, Y.; YARIO, T.A.; STEITZ, J.A. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101(26), p.9666-9670, 2004.

HUTTEN, S.; KEHLENBACH, R.H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. **Trends Cell Biol**, v.(4), p.193-201, 2007.

ISKEN, O.; MAQUAT, L.E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes Dev**, v. 21(15), p.1833-1856, 2007.

JOHNSON, E.R.; MCKAY, D.B. Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase. **RNA**, v.5(12), p.1526-1534, 1999.

KODIHA, M.; UMAR, R.; STOCHAJ, U. Optimized immunofluorescence staining protocols to detect the nucleoporin Nup98 in different subcellular compartments. **Nature Network Protocol**, DOI: 10.1038/nprot.2009.16, 2009.

KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nat Rev Mo. Cell Biol**, v.8, p.761-773, 2007.

KOLEV, N.G.; FRANKLIN, J.B.; CARMİ, S.; SHI, H.; MICHAELI, S.; TSCHUDI, C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathog**, v.6(9). pii: e1001090, 2010.

KRAEMER, D.; BLOBEL, G. mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.9119–9124, 1997.

KRAMER, S.; KIMBLIN, N.C.; CARRINGTON, M. Genome-wide *in silico* screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. **BMC Genomics**, v.11, p.283-296, 2010.

KUDO, N.; WOLFF, B.; SEKIMOTO, T.; SCHREINER, E.P.; YONEDA, Y.; YANAGIDA, M.; HORINOUCI, S.; YOSHIDA, M. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. **Exp Cell Res**, v.242(2), p.540-547, 1998.

KUDO N, MATSUMORI N, TAOKA H, FUJIWARA D, SCHREINER EP, WOLFF B, YOSHIDA M, HORINOUCI S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. **PNAS**, v.96(16), p.9112-9117, 1999.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E.B. Linking nuclear mRNP assembly and cytoplasmic destiny. **Biol Cell**, v.97(6), p.469-478, 2005.

LA COUR, T.; GUPTA, R.; RAPACKI, K.; SKRIVER, K.; POULSEN, F.M.; BRUNAK, S. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. **Nucleic Acids Res**, v.31(1), p.393-396, 2003.

LA COUR, T.; KIEMER, L.; MØLGAARD, A.; GUPTA, R.; SKRIVER, K.; BRUNAK, S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. **Protein Eng Des Sel**, v.17(6), p.527-536, 2004.

LE HIR, H.; GATFIELD, D.; IZAURRALDE, E.; MOORE, M.J. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. **EMBO J**, v.20(17), p.4987-4997, 2001.

LE HIR, H.; IZAURRALDE, E.; MAQUAT, L.E.; MOORE, M.J. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO J**, v.19(24), p.6860-6869, 2000.

LeBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S.M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. **Genes Dev**, v.7, p.996-1007, 1993.

LEE, M.S.; HENRY, M.; SILVER, P.A. A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. **Genes Dev**, v.10(10), p.1233-1246, 1996.

LEVY, M.Z.; KAWAI, V.; BOWMAN, N. M.; WALLER, L.A.; CABRERA, L.; PINEDO-CANCINO, V.V.; SEITZ, A.E.; STEURER, F.J.; DEL CARPIO, J.G.C.; CORDOVA-BENZAQUEN, E.; MAGUIRE, J.H.; BERN, C. Target Screening Strategies to Detect *Trypanosoma cruzi* Infection in Children. **PloS Méd**, v.1(3): e103. p.1-9, 2007.

LEWIS, J.D.; IZAURRALDE, E. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. **Eur J Biochem**, v.247(2), p.461-469, 1997.

LI, Q.; IMATAKA, H.; MORINO, S.; ROGERS, GW JR.; RICHTER-COOK, N.J.; MERRICK, W.C.; SONENBERG, N. Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. **Mol Cell Biol**, v.(11), p.7336-7346, 1999.

LIANG, X.H.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors and Regulation. **Eukaryot Cell**, v.2, p.830-840, 2003.

LINDER, P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic Acids Res**, v.34(15), p.4168-4180, 2006.

LINDER, P. mRNA export: RNP remodeling by DEAD-box proteins. **Curr Biol**, v.18(7), p.R297-299, 2008.

LIM, R.Y.; AEBI, U.; FAHRENKROG, B. Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. **Histochem Cell Biol**, v.129(2), p.105-116, 2008.

- LÜKING, A.; STAHL, U.; SCHMIDT, U. The protein family of RNA helicases. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.33(4), p.259-296, 1998.
- LUNA R, GAILLARD H, GONZÁLEZ-AGUILERA C, AGUILERA A. Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. **Chromosoma**, v.117(4), p.319-331, 2008.
- LUND, M.K.; GUTHRIE, C. The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. **Mol Cell**, v.20(4), p.645-651, 2005.
- LUZ AMBRÓSIO, D.; LEE, J.H.; PANIGRAHI, A.K.; NGUYEN, T.N.; CICARELLI, R.M.; GÜNZL, A. Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. **Eukaryot Cell**, v.8(7), p.990-1000, 2009.
- MANS, B.J.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. **Cell Cycle**, v.3(12), p.1612-1637, 2004.
- MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev**, v.8(4), p.491-501, 1994.
- McGUFFIN L.J. & JONES, D.T. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. **Bioinformatics**, v.19, p.874-881, 2003.
- MEISSNER, T.; KRAUSE, E.; VINKEMEIER, U. Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. **FEBS Lett**, v.576(1-2), p.27-30, 2004.
- MOR, A.; SULIMAN, S.; BEN-YISHAY, R.; YUNGER, S.; BRODY, Y.; SHAV-TAL, Y.; Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. **Nat Cell Biol**, v.12(6), p.543-552, 2010.
- MURPHY, R.; WATKINS, J.L.; WENTE, S.R. GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. **Mol Biol Cell**, v.7(12), p.1921-1937, 1996.
- NAKIELNY, S.; DREYFUSS, G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. **Cell**, v.99(7), p.677-690, 1999.
- NAPETSCHNIG, J.; KASSUBE, S.A.; DEBLER, E.W.; WONG, R.W.; BLOBEL, G.; HOELZ, A. Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup214 and the DEAD-box helicase DDX19. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106(9):3089-3094, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA**. São Paulo: SARVIER, 975 p. 3ª ed., 2002.

NEVILLE, M.; ROSBASH, M. The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v.18(13), p.3746-3756, 1999.

NEVILLE, M.; STUTZ, F.; LEE, L.; DAVIS, L.I.; ROSBASH, M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. **Curr Biol**, v.7(10), p.767-775, 1997.

OKA, M.; ASALLY, M.; YASUDA, Y.; OGAWA, Y.; TACHIBANA, T.; YONEDA, Y. The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export. **Mol Biol Cell**, v.21(11), p.1885-1896, 2010.

PANTÉ, N.; AEBI, U. Molecular dissection of the nuclear pore complex. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.31(2), p.153-199, 1996.

PAUSE, A.; MÉTHOT, N.; SONENBERG, N. The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. **Mol Cell Biol**, v.13(11), p.6789-6798, 1993.

PAYS, E. Genome organization and control of gene expression in trypanosomatids. **Symp Soc Gen Microbiol**, v.50, p.127-160, 1993.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v.1, p. 92-100, 2001.

RADU, A.; MOORE, M.S.; BLOBEL, G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. **Cell**, v.81(2), p.215-222, 1995.

RAYALA, H.J.; KENDIRGI, F.; BARRY, D.M.; MAJERUS, P.W.; WENTE, S.R. The mRNA export factor human Gle1 interacts with the nuclear pore complex protein Nup155. **Mol Cell Proteomics**, v.3(2), p.145-155, 2004.

REED, R.; HURT, E. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. **Cell**, v.108(4), p.523-531, 2002.

RIERA, C.; GUARRO, A.; KASSAB, H.E.; JORBA, J.M.; CASTRO, M. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): A case report. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, p.1078-1081, 2006.

ROBERTS, T.G.; STURM, N.R.; YEE, B.K.; YU, M.C.; HARTSHORNE, T.; AGABIAN, N.; CAMPBELL, D.A. Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. **Mol Cell Biol**, v.18(8), p.4409-4417, 1998.

ROGERS, G.W. JR; KOMAR, A.A.; MERRICK, W.C. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v.72, p.307-331, 2002.

ROUT, M.P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **J Cell Biol**, v.148, p.635-651, 2000.

ROUT, M.P.; AITCHISON, J.D. The nuclear pore complex as a transport machine. **J Biol Chem**, v.276(20), p.16593-16596, 2001.

ROUT, M.P.; FIELD, M.C. Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. **J Biol Chem**, v.276(41), p.38261-38271, 2001.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v.234, p.779-815, 1993

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 3th ed., 2001.

SANTOS-ROSA H, MORENO H, SIMOS G, SEGREF A, FAHRENKROG B, PANTÉ N, HURT E. Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. **Mol Cell Biol**, v.18(11), p.6826-6838, 1998.

SCHMID, S.R.; LINDER, P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. **Mol Microbiol**, v.6(3), p.283-292, 1992.

SCHMITT, C.; VON KOBBE, C.; BACHI, A.; PANTÉ, N.; RODRIGUES, J.P.; BOSCHERON, C.; RIGAUT, G.; WILM, M.; SÉRAPHIN, B.; CARMO-FONSECA, M.; IZAURRALDE, E. Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/ Nup159p. **EMBO J**, v.18, p.4332-4347, 1999.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102 (Suppl1), p.75-85, 2007.

SCHNEIDER-POETSCH, T.; JU, J.; EYLER, D.E.; DANG, Y.; BHAT, S.; MERRICK, W.C.; GREEN, R.; SHEN, B.; LIU, J.O. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nat Chem Biol**, v.6(3), p.209-217, 2010.

SCHÜTZ, S.; CHEMNITZ, J.; SPILLNER, C.; FROHME, M.; HAUBER, J.; KEHLENBACH, R.H. Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. **J Mol Biol**, v.358(4), p.997-1009, 2006.

SCHWARTZ, T.U. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. **Curr Opin Struct Biol**, v.15(2), p.221-226, 2005.

SCHWEDE, A.; MANFUL, T.; JHA, B.A.; HELBIG, C.; BERCOVICH, N.; STEWART, M.; CLAYTON, C. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v.37(16), p.5511-5528, 2009.

SERPELONI, M.; VIDAL, N.M.; GOLDENBERG, S.; AVILA, A.R.; HOFFMANN, F.G. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC Evol Biol**, v.11(1), p.7, 2011a.

SERPELONI, M.; MORAES, C.B.; MUNIZ, J.R.; MOTTA, M.C.; RAMOS, A.S.; KESSLER, R.L.; INOUE, A.H.; DaROCHA, W.D.; YAMADA-OGATTA, S.F.; FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; AVILA, A.R. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. **PLoS One**, v.6(6), e20730, 2011b.

SHIBUYA, T.; TANGE, TØ.; SONENBERG, N.; MOORE, M.J. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. **Nat Struct Mol Biol**, v.11(4), p.346-351, 2004.

SNAY-HODGE, C.A.; COLOT, H.V.; GOLDSTEIN, A.L.; COLE, C.N. Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. **EMBO J**, v.17, p.2663-2676, 1998.

STADE, K.; FORD, C.S.; GUTHRIE, C.; WEIS, K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. **Cell**, v.90(6), p.1041-1050, 1997.

STEWART, M. Ratcheting mRNA out of the nucleus. **Mol Cell**, v.25(3), p.327-330, 2007.

STOFFLER, D.; FAHRENKROG, B.; AEBI, U. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. **Curr Opin Cell Biol**, v.11(3), p.391-401, 1999.

STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M.P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11(7), p.490-501, 2010.

STRÄSSER, K.; BASSLER, J.; HURT, E. Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. **J Cell Biol**, v.150(4), p.695-706, 2000.

STRÄSSER, K.; MASUDA, S.; MASON, P.; PFANNSTIEL, J.; OPPIZZI, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; RONDÓN, A.G.; AGUILERA, A.; STRUHL, K.; REED, R.; HURT, E. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. **Nature**, v.417(6886), p.304-308, 2002.

STRAWN, L.A.; SHEN, T.; WENTE, S.R. The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. **J Bio. Chem**, v.276, p.6445-6452, 2001.

STRÖM, A.C.; WEIS, K. Importin-beta-like nuclear transport receptors, **Genome Biol**, v.2(6), p.REVIEWS3008, 2001.

SUNTHARALINGAM, M.; WENTE, S.R. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. **Dev Cell**, v.4(6), p.775-789, 2003.

SUNTHARALINGAM, M.; ALCÁZAR-ROMÁN, A.R.; WENTE, S.R. Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function. **J Biol Chem**, v.279(34), p.35384-35391, 2004.

TAMURA, K.; FUKAO, Y.; IWAMOTO, M.; HARAGUCHI, T.; HARA-NISHIMURA, I. Identification and Characterization of Nuclear Pore Complex Components in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v.22(12), p.4084-4097, 2010.

TANNER, N.K. The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. **Cell Cycle**, v.2(1), p.18-19, 2003.

TARTELON, R.C.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. The Challenges of Chagas Disease – Grim Outlook or Glimmer of Hope? **PLoS Méd**, v.4(12): e332, p.1852-1857, 2007.

TERRY, L.J.; WENTE, S.R. Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v.178(7), p.1121-1132, 2007.

TERRY, L.J.; WENTE, S.R. Flexible Gates: Dynamic Topologies and Functions for FG Nucleoporins in Nucleocytoplasmic Transport. **Eukaryotic Cell**, v.8(12), p.1814-1827, 2009.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.76, p.4350-4354, 1979.

TRAN, E.J.; WENTE S.R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. **Cell**, v.125(6), p.1041-1053, 2006.

TRAN, E.J.; ZHOU, Y.; CORBETT, A.H.; WENTE, S.R. The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. **Mol Cell**, v.28(5), p.850-859, 2007.

TSENG, S.S.; WEAVER, P.L.; LIU, Y.; HITOMI, M.; TARTAKOFF, A.M.; CHANG, T.H.; Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. **EMBO J**, v.17, p.2651-2662, 1998.

TUTEJA, N.; VASHISHT, A.A.; TUTEJA, R. Translation initiation factor 4A: a prototype member of dead-box protein family. **Physiol Mol Biol Plants**, v.14(1&2), p.101-107, 2008.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v.31, p.472-481, 2001.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in Trypanosomes. **Microbiol Rev**, v.59(2), p.223-240, 1995.

VASU, S.K.; FORBES, D.J. Nuclear pores and nuclear assembly. **Curr Opin Cell Biol**, v.13(3), p.363-375, 2001.

VERSCHURE, P.J.; VAN DER KRAAN, I.; MANDERS, E.M.M.; VAN DRIEL, R. Spatial Relationship between transcription sites and chromosome territories. **The Journal of Cell Biology**, v.147(1), p. 13-24, 1999.

VON MOELLER, H.; BASQUIN, C.; CONTI, E. The mRNA export protein DBP5 binds NA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. **Nat Struct Mol Biol**, v.16(3), p.247-254, 2009.

WALDER, J.A.; EDER, P.S.; ENGMAN, D.M.; BRENTANO, S.T.; WALDER, R.Y.; KNUTZON, D.S.; DORFMAN, D.M.; DONELSON, J.E. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNAs. **Science**, v.233, p.569-571, 1986.

WANG, Y.; GUTHRIE, C. PRP16, a DEAH-box RNA helicase, is recruited to the spliceosome primarily via its nonconserved N-terminal domain. **RNA**, v.4(10), p.1216-1229, 1998.

WATANABE, M.; FUKUDA, M.; YOSHIDA, M.; YANAGIDA, M.; NISHIDA, E. Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. **Genes Cells**, v.4(5), p.291-297, 1999.

WEIRICH, C.S.; ERZBERGER, J.P.; BERGER, J.M.; WEIS, K. The N-Terminal Domain of Nup159 Forms a β -Propeller that Functions in mRNA Export by Tethering the Helicase Dbp5 to the Nuclear Pore. **Mol Cell**, v.16, p.749-760, 2004.

WEIRICH, C.S.; ERZBERGER, J.P.; FLICK, J.S.; BERGER, J.M.; THORNER, J.; WEIS, K. Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP₆ is required for mRNA export. **Nat Cell Biol**, v.8(7), p.668-676, 2006.

WEIS, K. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. **Curr Opin Cell Biol**, v.14(3), p.328-335, 2002.

WESTBROOK, J., FENG, Z., JAIN, S., BHAT, T. N., THANKI, N., RAVICHANDRAN, V., GILLILAND, G. L., BLUHM, W., WEISSIG, H., GREER, D. S., BOURNE, P. E.; BERMAN, H. M. The Protein Data Bank: unifying the archive. **Nucleic Acids Res**, v.30(1), p.245-248, 2002.

WOLFF, B.; SANGLIER, J.J.; WANG, Y. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency

virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. **Chem Biol**, v.4(2), p.139-147, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Chagas disease. Site: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Acessado em 5 de Janeiro de 2011, 2011.

YANG, Q.; JANKOWSKY, E. ATP- and ADP-dependent modulation of RNA unwinding and strand annealing activities by the DEAD-box protein DED1. **Biochemistry**, v.44(41), p.13591-13601, 2005.

YOON, J.H.; WHALEN, W.A.; BHARATHI, A.; SHEN, R.; DHAR, R. Npp106p, a *Schizosaccharomyces pombe* nucleoporin similar to *Saccharomyces cerevisiae* Nic96p, functionally interacts with Rae1p in mRNA export. **Mol Cell Biol**, v.17(12), p.7047-7060, 1997.

ZEINER, G.M.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. Exportin 1 mediates nuclear export of the kinetoplastid spliced leader RNA. **Eukaryot Cell**, v.2(2), p.222-230, 2003.

ZELEDÓN, R.; BOLAÑOS, R.; ROJAS, M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Acta Tropica**, v.41, p.39-43, 1984.

ZHAO, J.; JIN, S.B.; BJÖRKROTH, B.; WIESLANDER, L.; DANEHOLT, B. The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. **EMBO J**, v.21(5), p.1177-1187, 2002.

ANEXO

TcDbp5

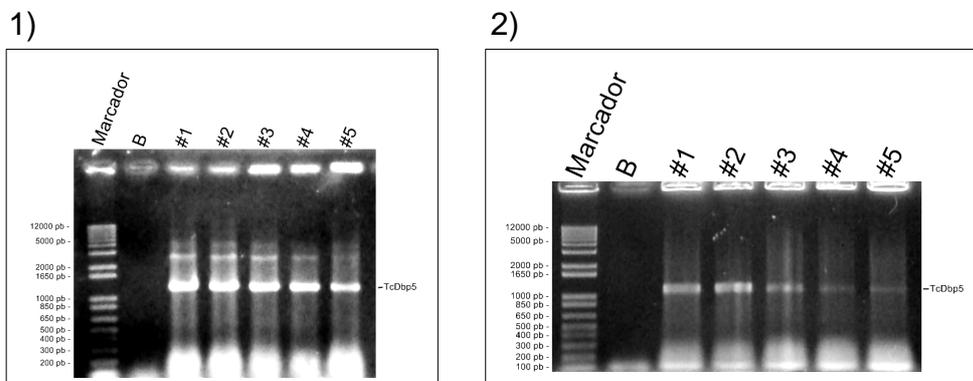


FIGURA 48 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcDbp5 EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcDbp5. 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcDbp5. #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

TcCrm1

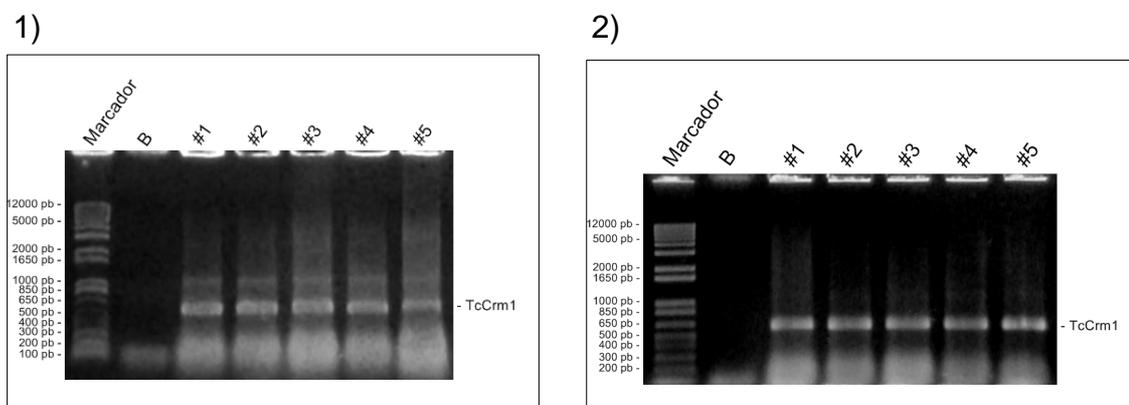


FIGURA 49 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcCrm1 EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcCrm1. 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcCrm1. #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

Nucleoporinas

- TcNup95

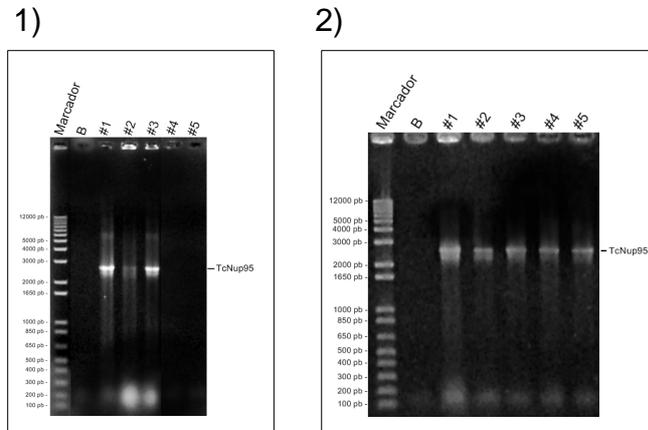


FIGURA 50 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup95 EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcNup95. 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcNup95. #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

- TcNup(HsNup98).

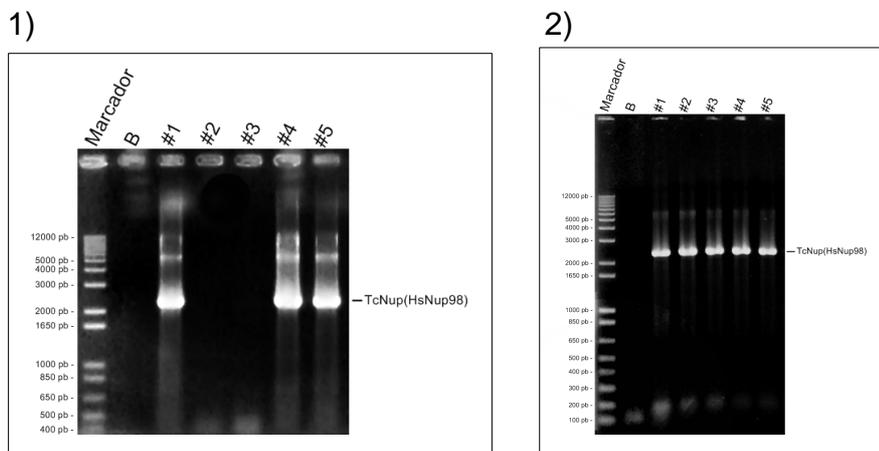
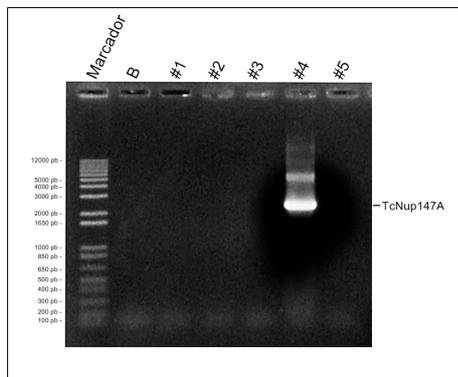


FIGURA 51 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup(HsNup98) EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcNup(HsNup98). 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcNup(HsNup98). #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

- TcNup147A

1)



2)

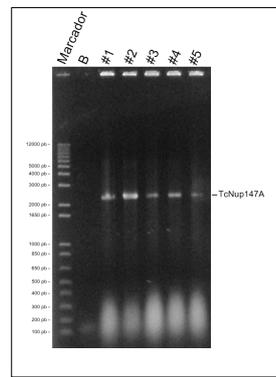
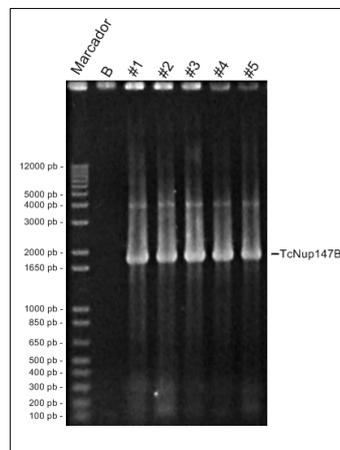


FIGURA 52 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup147A EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcNup147A. 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcNup147A. #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.

- TcNup147B

1)



2)

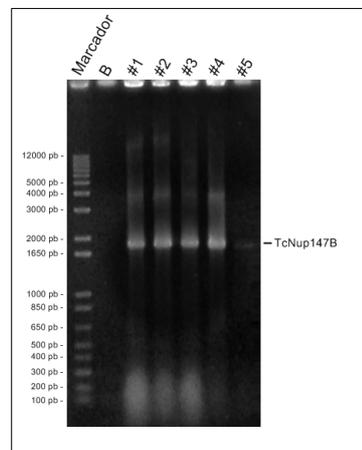


FIGURA 53 - ANÁLISE DOS CLONES RECOMBINANTES DE TcNup147B EM VETOR pDONR™221 E pDEST™17. 1) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDONR-TcNup147B. 2) PCR de colônia para seleção de clones positivos pDEST-TcNup147B. #1-5 = Clones recombinantes analisados. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Marcador = 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). B = branco.