



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CRISTINA BORINI MANSUR

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POLI-Q EM *Trypanosoma cruzi*
– ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

CURITIBA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CRISTINA BORINI MANSUR

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POLI-Q EM *TRYPANOSOMA*
CRUZI – ENVOLVIMENTO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e realizada no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Goldenberg

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

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:

Prof. Dr. Samuel Goldenberg
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC



Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Dr. Jonas Enrique Aguiar Perales
Instituto Oswaldo Cruz - IOC/Fiocruz



Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC



Prof. Dr. Helisson Faoro
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Paraná - UFPR



E tendo como suplentes,

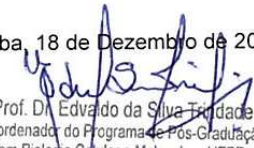
Profa. Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Nilson Zanchin
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a candidata **Fernanda Cristina Borini Mansur**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização de proteínas poli-Q em *Trypanosoma cruzi* - envolvimento na regulação da expressão gênica" são de parecer favorável à ~~aprovação~~ **Aprovação**..... da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

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

Curitiba, 18 de Dezembro de 2012


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

Aos meus pais, Neide e Fernando, a quem devo minha formação moral e intelectual.

Meu reconhecimento e gratidão por sempre terem me apoiado e incentivado na realização do meu Doutorado, sempre confiando no meu potencial e me mostrando que os obstáculos fazem parte da nossa vida.

Ao meu filho Matheus, por iluminar minha vida e me contagiar com sua alegria todos os dias.

Ao meu namorado Rafael pelo amor, companheirismo, paciência e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neide e Fernando, pelo amor incondicional e por sempre terem acreditado em mim. Sem vocês com certeza eu não seria capaz de chegar aonde cheguei.

Ao Rafael, meu namorado, agradeço a paciência e a compreensão.

Ao Dr. Samuel Goldenberg pela orientação. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado num instituto de pesquisa como o ICC e a confiança no meu trabalho.

Ao Dr. Alejandro Correa Dominguez por ter participado intensamente da minha formação profissional durante a iniciação científica e o mestrado. Você foi essencial para eu ter continuado nesta área e me ensinou muito, muito mesmo.

Ao Dr. Bruno Dalagiovanna pelas discussões e ensinamentos. Por ter sempre me apoiado em todos os momentos e dado palavras de apoio.

Ao Dr. Stênio Fragoso por ter sempre demonstrado interesse em analisar e discutir resultados e por ter me auxiliado nas tentativas de isolamento de mitocôndria.

À Dra. Fabíola Holetz pela amizade e auxílio na correção da tese.

À Dra. Maria Cristina Motta pela colaboração e discussão dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Fabricio Marchini pelo auxílio nas punções cardíacas para obtenção dos soros de camundongos e pela colaboração na realização dos experimentos de espectrometria de massas.

Ao Dr. Jonas Perales pela colaboração na realização dos experimentos de espectrometria de massas.

Aos Dr. Paulo Carvalho pela ajuda com as análises dos dados de proteômica e por sempre estar disponível para qualquer dúvida.

À Dra. Lysangela Alves pela ajuda nas análises dos dados de ribonômica.

A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica: Dr. Augusto Ramos, Dra. Andréa Ávila, Dra. Patricia Morking, Eliza, Sharon, Eloise, Haruo, Priscila, Hálisson, Camila, Mariana Serpeloni, Gustavo, Mariana Ferrarini, Saloe, Liandra, Bruno, Mayara, pelos momentos que vocês me proporcionaram. Pela amizade, pelas risadas, pelos conselhos e discussões, pela convivência maravilhosa com todos vocês.

À Maria Cristina, Vivielin e Marcele por toda a ajuda, não só na parte administrativa, mas toda ajuda que precisamos.

Aos Nilson, Vanessa, Tânia e Sílvio pelo apoio técnico, pela amizade e por proporcionar a organização ideal, facilitando a realização deste trabalho.

A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Carlos Chagas pela amizade, pelos ensinamentos, pelas trocas de experiências e pelos nossos momentos de descontração.

Às agências financiadoras CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Em tripanossomatídeos, a regulação da expressão gênica ocorre principalmente em nível pós-transcricional. A associação entre mRNAs e determinadas proteínas determinam o destino de um mRNA, direcionando-o à tradução, repressão ou degradação. Para caracterizar complexos proteicos associados a mRNAs traduzidos ou não-traduzidos, um trabalho prévio isolou mRNPs de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional utilizando microesferas poli-(T) e os complexos proteicos ligados a mRNAs poli-(A⁺) foram analisados por espectrometria de massas. Dentre estas proteínas, uma proteína poli-Q com função desconhecida, ortóloga à TbGAP2 em *T. brucei*, foi identificada, presente nas frações polissomal e pós-polissomal de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional. O objetivo deste estudo é caracterizar esta proteína e determinar se esta está envolvida com a regulação da expressão gênica. O gene codificador desta proteína foi clonado e exposto para produzir anti-soro policlonal. O anti-soro contra a proteína TcGAP2 mostrou especificidade e identificou uma proteína de tamanho esperado em extratos de *T. cruzi*. TcGAP2 está presente no cinetoplasto e no citoplasma. Além disso, análises por *Western blotting* mostraram que TcGAP2 está diminuída nas formas metacíclicas, corroborando a marcação de imunofluorescência mais fraca nestas formas. Quando lisados de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional foram aplicados em gradiente de sacarose 15-55% e as frações foram analisados por *immunoblotting*, a proteína foi detectada em polissomos apenas nas últimas formas. Marcação *in situ* de *nicks* e *gaps* nas redes de minicírculos com a *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) e dUTP fluorescente seguida de imunofluorescência mostrou co-localização parcial indicando certo envolvimento com replicação de minicírculo. Para identificar mRNAs e proteínas associadas a complexos mRNPs contendo TcGAP2, foram realizados ensaios de imunoprecipitação com o soro contra TcGAP2 usando lisados de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional. Os RNAs alvo de TcGAP2 foram identificados por sequenciamento de RNA em larga escala e as proteínas, por espectrometria de massas. Os transcritos dos complexos contendo TcGAP2 mudam entre as duas formas, entretanto eles são funcionalmente relacionados, estando enriquecidos em ligação a ATP, fosforilação de proteínas, processo metabólico, dentre outros. Análises utilizando o algoritmo MEME foram realizadas para identificar motivos de sequência comuns dentre os alvos identificados. Nenhum motivo aparente foi encontrado nas regiões 3' não-traduzidas nem nas regiões codificadoras. Entretanto, dois motivos foram encontrados na região 5' não-traduzida. Assim como os RNAs alvo mudam entre os dois estágios, as proteínas parceiras também. Algumas das proteínas identificadas em epimastigotas como parte dos complexos contendo TcGAP2 incluem proteínas ribossomais e proteínas de ligação a RNA e em epimastigotas sob estresse nutricional, várias proteínas hipotéticas. Já GAP1 foi identificada em ambas formas e, juntamente com GAP2, está envolvida com estabilização de gRNA em *T. brucei*. O duplo nocaute do gene de TcGAP2 não se mostrou viável sugerindo que este gene seja essencial. Estes dados sugerem que esta proteína pode ter diferentes funções dependendo de sua localização e que TcGAP2 é um componente de complexos ribonucleoprotéicos no citoplasma que podem estar regulando o processamento de mRNAs específicos.

ABSTRACT

In trypanosomatids, regulation of gene expression occurs mainly at the post-transcriptional level. The association between mRNAs and certain proteins determine mRNA fate, directing them to translation, repression or degradation. To characterize protein complexes associated with non-translated or translated mRNAs, previous work isolated mRNPs from epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress using poly-(T) beads and the protein complexes bound to poly-(A⁺) mRNAs were analysed by mass spectrometry. Among these proteins, one hypothetical poly-Q rich protein, ortholog of TbGAP2 in *T. brucei*, were identified, present in the polysomal and post-polysomal fractions of epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress. The aim of this study is to characterize this protein and to determine if it is involved in gene expression regulation. The gene encoding this protein was cloned and expressed to produce polyclonal antisera. TcGAP2 antisera showed specificity and identified a protein with an expected weight using *T. cruzi* extracts. TcGAP2 was shown to localize in the kinetoplast and in the cytoplasm. Moreover western blot analysis was performed and showed that TcGAP2 is downregulated in metacyclic forms, corroborating the weak immunofluorescence staining in these forms. When epimastigotes and nutritionally stressed epimastigotes lysates were loaded onto a 15-55% sucrose gradient and the fractions were analysed by immunoblot, we observed that the protein was detected in polysome complexes only in the latter. *In situ* labeling of the nicks and gaps in network minicircles with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and fluorescent dUTP followed by immunofluorescence showed partial colocalization indicating some involvement with minicircle replication. To identify mRNAs and proteins associated to TcGAP2 mRNP complexes, we carried out immunoprecipitation assays with anti-GAP2 serum using epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress lysates. The RNA targets of TcGAP2 were identified by RNA deep sequencing technology and proteins were identified by mass spectrometry. The transcripts in TcGAP2 complexes change between these two forms however they are functionally related, being enriched for ATP binding, protein phosphorylation, metabolic process, among others. MEME algorithm analysis was used to identify commonly occurring sequence motifs among the identified RNAs. No apparent motifs were found in the 3' untranslated region nor in the coding sequence. However, two motifs were found in the 5' untranslated region. As TcGAP2 RNA targets change between the two stages, protein partners also do. Some of the proteins identified in epimastigotes as part of TcGAP2 complexes include ribosomal proteins and RNA-binding proteins and in epimastigotes under nutritional stress, many hypothetical proteins. GAP1 was identified in both forms and together with GAP2 are involved in gRNA stabilization in *T. brucei*. Double-knockout of TcGAP2 gene was not successfully achieved suggesting that this gene is essential. These data suggest that this protein can have different roles depending on its localization and that TcGAP2 is a component of ribonucleoprotein complexes in the cytoplasm that might be regulating the processing of specific mRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	03
Figura 2 – Expressão gênica em tripanossomatídeos.....	08
Figura 3 – Ciclo de mRNAs.....	24
Figura 4 – Genes eucarióticos dispersos produzem transcritos que são, então, montados em complexos mRNPs.....	26
Figura 5 – Mapa dos vetores utilizados.....	41
Figura 6 – Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway®.....	43
Figura 7 – Esquema de vetores e construção para a estratégia de nocaute em <i>T. cruzi</i>	64
Figura 8 – Expressão e purificação das proteínas recombinantes GAP2, ATXN2 e WW.....	74
Figura 9 – Ensaio de <i>Western blotting</i> para análise da especificidade dos anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes.....	75
Figura 10 – Análise da expressão das proteínas TcGAP2 e TcATXN2 durante a metaciclogênese.....	76
Figura 11 – Perfil de sedimentação da proteína TcGAP2 por centrifugação em gradientes de sacarose de extratos de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional.....	78
Figura 12 – Localização subcelular da proteína TcGAP2 por imunofluorescência.....	80
Figura 13 – Imunofluorescência de TcGAP2 em epimastigotas marcados <i>in situ</i> com dUTP-FITC.....	80
Figura 14 – Imunolocalização de TcGAP2 por microscopia eletrônica de transmissão em epimastigotas.....	82
Figura 15 – Processo biológico dos alvos identificados em epimastigotas.....	91
Figura 16 – Função molecular dos alvos identificados em epimastigotas.....	91
Figura 17 – Componente celular dos alvos identificados em epimastigotas.....	91

Figura 18 – Processo biológico dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	92
Figura 19 – Função molecular dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	92
Figura 20 – Componente celular dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	92
Figura 21 – Funções moleculares mais representadas dentre os alvos identificados em epimastigotas.....	93
Figura 22 – Processos biológicos mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas.....	93
Figura 23 – Componentes celulares mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas.....	94
Figura 24 – Funções moleculares mais representadas dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	94
Figura 25 – Processos biológicos mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	94
Figura 26 – Componentes celulares mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional.....	94
Figura 27 – Domínios conservados dentre os transcritos associados aos complexos contendo TcGAP2.....	95
Figura 28 – Testes de indução em <i>E. coli</i> para obtenção da proteína GAP2 solúvel.....	96
Figura 29 – Perfil eletroforético da purificação da proteína GAP2 recombinante a partir da fração solúvel.....	97
Figura 30 – Análise da afinidade da proteína TcGAP2 recombinante por homorribonucleotídeos de repetição.....	98
Figura 31 – Imunoprecipitação da proteína TcGAP2.....	99
Figura 32 – Espectro MS2 do peptídeo R.AVGLSAFELAGR.L da proteína TcGAP2 por espectrometria de massas.....	100
Figura 33 – Diagrama de Venn das proteínas identificadas nas amostras.....	101
Figura 34 – Perfil eletroforético dos produtos de PCR das regiões intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> de <i>TcGAP2</i> e de <i>TcWW</i> para clonagem em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO.....	105

Figura 35 – PCR para confirmação do nocaute de um dos alelos de <i>TcGAP2</i>	106
Figura 36 – Ensaio de hibridação por <i>Southern blotting</i> para confirmação do nocaute de um dos alelos de <i>TcGAP2</i>	107
Figura 37 – Ensaio de hibridação por <i>Southern blotting</i> para confirmação do nocaute de um dos alelos de <i>TcWW</i>	108
Figura 38 – Quantificação da expressão da proteína TcGAP2 em população clonal de <i>T. cruzi</i> simples nocaute (KO).....	109
Figura 39 – Ciclo de vida e resumo das maiores conclusões obtidas das análises do proteoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
Figura 40 - Organização pós-transcricional da expressão gênica por mRNPs.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Proteínas selecionadas para este trabalho.....	70
Quadro 2 – mRNAs presentes em complexos contendo a proteína TcGAP2 em epimastigotas.....	83
Quadro 3 – mRNAs presentes em complexos contendo a proteína TcGAP2 em epimastigotas sob estresse nutricional.....	86
Quadro 4 – Proteínas presentes nos complexos ribonucleoprotéciso contendo TcGAP2 em epimastigotas.....	101
Quadro 5 – Proteínas presentes nos complexos ribonucleoprotéciso contendo TcGAP2 em epimastigotas sob estresse nutricional.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE: *AU-rich element* (elemento rico em AU)

ATP: adenosina trifosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfatase

BLAST: ferramenta de comparação de seqüências em banco de dados (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA: albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CaCl₂: cloreto de cálcio

cDNA: DNA complementar

CDS: região codificadora

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

DIC: contraste interferencial (*Differential Interference Contrast*)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfato

E-64: L-transepoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino)butano

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

EMSA: ensaio de mobilidade eletroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

EST: *expression sequence tag*

FC: *fold change*

FISH: hibridação *in situ* por fluorescência (*Fluorescence in situ Hybridization*)

FDR: *False Discovery Rate*

FT: *flow through*

G: aceleração da gravidade

gRNA: RNA guia

GST: glutationa-S-transferase

HCl: ácido clorídrico

IPTG: isopropil 1 tio-β-D galactosídeo

kb: quilobase

KCl: cloreto de potássio

kDa: quiloDalton

kDNA: DNA do cinetoplasto
KH₂PO₄: dihidrogeno fosfato de potássio
LB: meio Luria-Bertani
LIT: meio de infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)
M: molar
mA: miliamperagem
mg: miligrama
MgCl₂: cloreto de magnésio
mL: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
mRNP: ribonucleoproteína mensageira
Na₂HPO₄.7H₂O: fosfato dibásico de sódio heptahidratado
NaCl: cloreto de sódio
NBT: *nitro blue tetrazolium chloride*
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ng: nanograma
nm: nanômetro
NPC: complexo poro nuclear
OD: densidade ótica
ORF: região aberta de leitura (*Open Reading Frame*)
pb: pares de base
P-bodies: grânulos de processamento (*Processing bodies*)
PBS: solução salina tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PEG: polietilnoglicol
pH: potencial hidrogeniônico
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
RBP: proteína de ligação a RNA (*RNA Binding Protein*)
RNA: ácido ribonucleico
RNase: ribonuclease
RNP: ribonucleoproteína
rpm: rotações por minuto
rRNA: RNA ribossomal

SDS: dodocil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB: soro fetal bovino
SG: grânulos de estresse
SL: *splice leader* (mini-exon)
snRNA: pequeno RNA nuclear
SSC: *Standard Saline-Citrate*
TAU: meio urina artificial de triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)
TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*
Tris: hidroximetil aminometano
tRNA: RNA transportador
TS: trans-sialidasas
Tween 20: monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana
µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrômetro
µM: micromolar
URE: elemento de instabilidade rico em U
UTR: região não-traduzida (*UnTranslated Region*)
V: volts

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1.	<i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	01
1.2.	Expressão gênica em tripanossomatídeos.....	04
1.2.1.	Organização genômica.....	04
1.2.2.	Transcrição policistrônica.....	06
1.2.3.	Regulação da expressão gênica.....	11
1.2.4.	Processamento e exportação do mRNA policistrônico.....	12
1.2.5.	Controle traducional.....	14
1.2.6.	Degradação de mRNA.....	20
1.3.	Operons pós-transcricionais.....	26
2.	OBJETIVOS	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.	Procedência dos materiais e reagentes.....	32
3.2.	Soluções.....	33
3.3.	Meios de cultura.....	35
3.4.	Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.4.1.	Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento.....	36
3.4.2.	Epimastigotas sob estresse nutricional.....	37
3.4.3.	Epimastigotas em diferenciação, aderidos sob substrato.....	37
3.4.4.	Tripomastigotas metacíclicos.....	37
3.4.5.	Extratos proteicos de <i>T. cruzi</i>	38
3.4.6.	Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	38
3.5.	Clonagem e expressão dos genes de interesse.....	39
3.5.1.	Amplificação dos genes.....	39
3.5.2.	Vetores.....	40
3.5.3.	Obtenção dos clones de entrada.....	41
3.5.4.	Obtenção dos clones de expressão.....	43
3.5.5.	Expressão e purificação das proteínas recombinantes para obtenção de soros policlonais.....	44
3.5.6.	Expressão e purificação da proteína TcGAP2 solúvel.....	46
3.6.	Produção de anticorpos policlonais.....	48

3.7.	Análise por <i>Western blotting</i>	49
3.8.	Ensaio de sedimentação em gradientes de sacarose.....	50
3.9.	Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação.....	51
3.10.	Ensaio de imunolocalização por fluorescência indireta.....	52
3.11.	Marcação <i>in situ</i> da rede de kDNA.....	53
3.12.	Imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão.....	54
3.13.	Ensaio de imunoprecipitação para análises de mRNAs associados à proteína TcGAP2 – ribonômica.....	55
3.13.1.	Processamento de amostras para sequenciamento de RNA utilizando a plataforma SOLiD.....	56
3.13.1.A.	Transcrição reversa – obtenção de cDNA.....	56
3.13.1.B.	PCR de emulsão.....	57
3.13.1.C.	Seleção de microesferas positivas.....	57
3.13.1.D.	Sequenciamento.....	58
3.13.1.E.	Análises.....	58
3.14.	Ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA).....	59
3.15.	Ensaio de imunoprecipitação para a análise de proteínas associadas a TcGAP2.....	59
3.15.1.	Tripsinização das amostras, purificação e eluição dos peptídeos trípticos.....	61
3.15.2.	Análise dos dados de proteômica.....	62
3.16.	Caracterização funcional de proteínas por abordagens de genética reversa – nocaute gênico.....	63
3.16.1.	Clonagem das regiões <i>upstream</i> em vetor pBlueScript-NEO.....	65
3.16.2.	Clonagem da região <i>downstream</i> em vetor pBS-NEO-UP.....	67
3.16.3.	Clonagem das regiões <i>upstream</i> e <i>downstream</i> em vetor pBS-HIGRO.....	68
3.16.4.	Verificação de nocaute gênico por <i>Southern blotting</i> e <i>Western blotting</i>	68
4.	RESULTADOS	69
4.1.	Seleção e expressão dos genes de interesse.....	69
4.2.	Análise da especificidade dos anticorpos policlonais.....	72

4.3.	A proteína TcGAP2 está associada a polissomos em epimastigotas sob estresse nutricional.....	76
4.4.	Localização subcelular por imunofluorescência.....	78
4.5.	Localização subcelular por microscopia eletrônica de transmissão.....	81
4.6.	Identificação dos mRNAs presentes em complexos contendo TcGAP2....	81
4.7.	Análise funcional e busca por motivos conservados dentre os RNAs associados à proteína TcGAP2.....	90
4.8.	Verificação da capacidade da proteína TcGAP2 recombinante de se ligar diretamente a RNA <i>in vitro</i>	95
4.9.	Identificação de proteínas presentes nos complexos contendo TcGAP2..	98
4.10.	Nocaute dos genes <i>TcGAP2</i> e <i>TcWW</i>	103
4.10.1.	Clonagem de regiões intergênicas de <i>TcGAP2</i> e <i>TcWW</i> em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO.....	104
4.10.2.	Verificação do nocaute de um dos alelos de <i>TcGAP</i> e <i>TcWW</i> através de substituição por gene de resistência a neomicina.....	106
5.	DISCUSSÃO	111
6.	CONCLUSÃO	128
7.	PERSPECTIVAS	129
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
	ANEXOS	154

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas

Expressão gênica em tripanosomatídeos

Organização genômica
Transcrição policistrônica
Regulação da expressão gênica
Processamento e exportação do mRNA policistrônico
Controle traducional
Degradação de mRNA

Operons Pós-transcricionais

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Em 15 de abril de 1909, Carlos Chagas, um jovem pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença tropical causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que foi denominada Tripanosomíase Americana ou Doença de Chagas (CHAGAS, 1909). Apesar dos esforços de mais de um século desde sua descoberta, esta doença continua sendo um grande problema de saúde que afeta milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2005). Sem vacinas ou tratamento quimioterápico eficiente, a principal estratégia de controle limita-se à prevenção da transmissão por transfusão sanguínea e ao controle populacional do vetor barbeiro. Além da sua importância como patógeno humano, este organismo apresenta características peculiares as quais o tornam um excelente modelo para o estudo de questões biológicas básicas.

Trypanosoma cruzi está inserido no reino Protozoa o qual inclui 14 filos bem definidos (DE SOUZA, 2000), entre eles o filo Euglenozoa, dividido em três ordens: Diplonemida, Euglenida e Kinetoplastida (*NCBI Taxonomy Browser*). A ordem Kinetoplastida compreende as famílias Bodonidae e Trypanosomatidae e apresenta uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (DE SOUZA, 2000). A família Trypanosomatidae contém diversos gêneros, dentre os quais se destaca o gênero *Trypanosoma* por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes. A exemplo de *T. cruzi*, os protozoários *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* são patogênicos para o homem e causam a doença do sono na África Oriental e Ocidental, respectivamente (DUMAS, 2000). Com base no comportamento do

parasita em seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos: Stercoraria e Salivaria. Assim, os parasitas, tais como *T. cruzi* e *T. lewisi*, que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal, com a liberação das formas infectivas pelas fezes, constituem o grupo Stercoraria. Aqueles que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e, posteriormente, atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares, onde são encontradas as formas infectivas, formam o grupo Salivaria. Pertencem a este último grupo *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli*, entre outros (DE SOUZA, 2000).

Trypanosoma cruzi apresenta um ciclo complexo na natureza envolvendo pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento e dois hospedeiros filogeneticamente distantes, inseto e mamífero. As formas replicativas epimastigotas e amastigotas dos hospedeiros invertebrado e mamífero, respectivamente, alternam-se com as formas infectivas e não-proliferativas tripomastigotas metacíclicas (proveniente do inseto vetor) e tripomastigotas sangüíneas (originária do mamífero infectado) (DE SOUZA, 1984).

Durante o repasto sangüíneo do vetor, as formas tripomastigotas sangüíneas de um vertebrado infectado são ingeridas. Uma vez ingerida, a maioria dos tripomastigotas é lisada no estômago do inseto (revisto por DE SOUZA *et al.*, 2010). Os tripomastigotas sobreviventes se transformam em epimastigotas. As formas epimastigotas migram para o intestino onde se dividem repetidamente por um processo de fissão binária e podem aderir às porções terminais, cujo ambiente é pobre em nutrientes (KOLLIEN e SCHAUB, 2000). Esta etapa de adesão e o estresse nutricional parecem ser importantes para desencadear o processo de diferenciação celular de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (processo denominado metaciclogênese). Nas regiões mais posteriores do intestino e no reto, os epimastigotas se soltam da superfície intestinal e se transformam em tripomastigotas metacíclicos os quais são, então, liberados juntamente com as fezes e urina do vetor (BONALDO *et al.*, 1988; DE SOUZA, 1984; KOLLIEN e SCHAUB, 2000). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas alcançam a corrente sangüínea através de discontinuidades da pele ou da mucosa do hospedeiro. Em seguida, os tripomastigotas podem infectar uma variedade de tipos celulares. Nas células infectadas, os tripomastigotas metacíclicos permanecem no interior de um compartimento ácido, denominado vacúolo parasitóforo, onde tem

início o processo de transformação para as formas replicativas amastigotas com posterior ruptura da membrana do vacúolo (revisto por MORTARA *et al.*, 2005). Após sucessivas divisões no citoplasma da célula, as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas que rompem a célula e são liberadas na corrente sangüínea. Estas podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo inseto durante sua alimentação, onde se diferenciam em epimastigotas, fechando, assim, o ciclo - figura 1 – (CARVALHO e DE SOUZA, 1989; DE SOUZA, 2002).

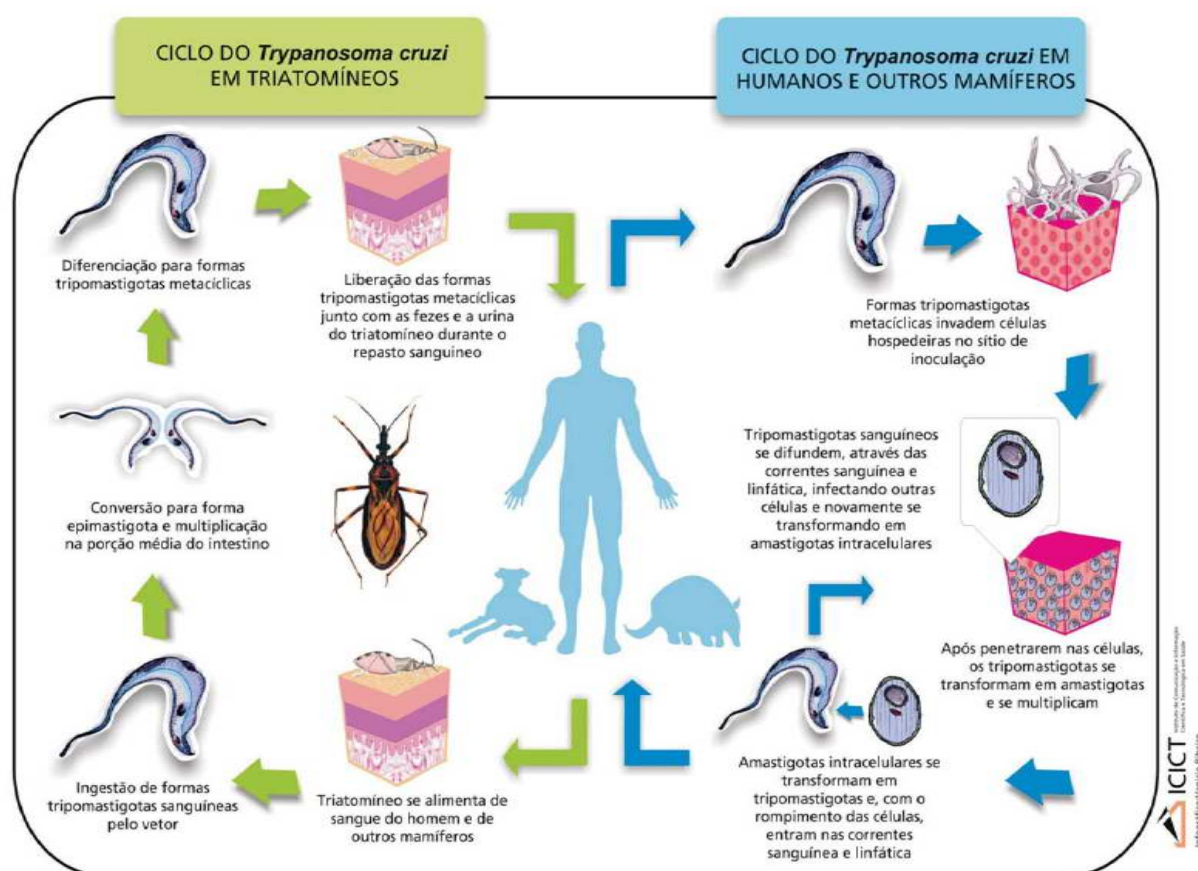


Figura 1 – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi* (simplificado). No hospedeiro invertebrado (A), formas epimastigotas (1) se multiplicam no lúmen do intestino. A diferenciação para tripomastigotas metacíclicas (2) ocorre na porção final do intestino. Estas formas infectam o hospedeiro vertebrado (B). Após adesão e penetração nas células hospedeiras (3), os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (4). Estes então se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos e são liberados, podendo infectar outras células (5). O ciclo se fecha quando o indivíduo infectado é picado pelo triatomíneo. Fonte: ARGOLLO *et al.* (2008).

Os vetores de *T. cruzi* são insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. As espécies de maior importância epidemiológica são *Triatomona infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (GARCIA e AZAMBUJA, 2000;

SHERLOCK, 2000). Os triatomíneos são popularmente conhecidos como barbeiros, dentre outros nomes vulgares. Entre os hospedeiros mamíferos de *T. cruzi*, está uma série de animais de pequeno e médio porte, tais como marsupiais e roedores, além de alguns carnívoros e do homem (DIAS, 2000).

A transmissão do parasita pode ainda ser efetuada através de transfusão sanguínea e, com menor frequência, via congênita, acidente de laboratório e transplante de órgãos (revisto por TEIXEIRA, 2008). Além disso, há também a possibilidade de contaminação alimentar, como ocorrido no Brasil, através da ingestão de caldo de cana contaminado com parasitas (STEINDEL *et al.*, 2008).

1.2. Expressão gênica em tripanossomatídeos

1.2.1. Organização genômica

Trypanosoma cruzi, bem como a maioria dos eucariotos, apresenta dois genomas distintos, um nuclear e um mitocondrial. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma complexa rede de moléculas circulares de DNA, denominada cinetoplasto (kDNA), composta por milhares de minicírculos e aproximadamente 50 maxicírculos concatenados entre si, contribuindo com até 20% do genoma (SIMPSON, 1987). Os maxicírculos contêm os genes que transcrevem RNA ribossômico e 18 genes codificadores de proteínas. Quinze dos dezoito RNAs mensageiros (mRNAs) transcritos pelos genes contidos nos maxicírculos sofrem modificação pós-transcricional por um processo denominado edição de RNA, que consiste na inserção ou remoção de resíduos de uridina para a formação de uma fase aberta de leitura funcional. A especificidade deste processo é controlada por pequenas seqüências de RNA (RNAs guias) transcritas a partir dos minicírculos (BLUM, BAKALARA e SIMPSON, 1990; SIMPSON, 1990). Os RNAs guias hibridizam na extremidade 3' de um mensageiro-alvo e encarregam-se diretamente de realizar remoções ou deleções através da maquinaria do editossomo (STUART e PANIGRAHI, 2002). O processo de edição pode ser tão massivo quanto no caso do transcrito que codifica a subunidade 9 da

NADH desidrogenase mitocondrial, onde o pré-mRNA primário (não-editado) de 322 nucleotídeos de comprimento é editado pela inserção de 345 resíduos de uridina e pela remoção de 20 uridinas, convertendo o transcrito em 647 nucleotídeos (SOUZA *et al.*, 1993).

A cromatina dos tripanosomas está organizada na forma de filamentos contendo nucleosomas com compactação limitada. Entretanto, os níveis de compactação da cromatina variam ao longo do ciclo celular de *T. cruzi* e estão associados aos padrões de transcrição. Assim, um maior nível de compactação é observado nas formas não replicativas tripomastigotas que apresentam níveis reduzidos de transcrição, quando comparado com as formas replicativas epimastigotas e amastigotas (ELIAS *et al.*, 2001). Essas variações podem ser atribuídas a diferentes padrões de histonas H1, proteínas que se dissociam mais facilmente dos nucleossomos e conferem à cromatina dos tripanosomatídeos uma estrutura mais aberta do que a de outros eucariotos (BELLI, 2000).

Em 2005, foi publicado o primeiro esboço referente à montagem do genoma de *T. cruzi*. Este trabalho é resultado da colaboração de vários pesquisadores que se uniram em um consórcio formado por três instituições – *The Institute for Genomic Research* (TIGR), *Seattle Biomedical Research Institute* (SBRI) e *Karolinska Institutet* (EL-SAYED *et al.*, 2005). A cepa utilizada foi a CL Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente (ZINGALES *et al.*, 1997). Entretanto, sua natureza híbrida com um conteúdo repetitivo de 50% fez com que a obtenção da seqüência do genoma fosse uma tarefa difícil, representando um conjunto de dados redundante distribuído em vários *contigs* (revisto por ARAÚJO e TEIXEIRA, 2011). Assim, regiões homólogas que apresentam altos níveis de polimorfismo estão montadas separadamente fazendo com que seqüências da maioria do genoma sejam encontradas em dois *contigs*, cada um correspondendo a um haplótipo. A cobertura genômica foi muito abaixo da média de projetos genomas e teve que ser complementada com o seqüenciamento adicional da cepa Esmeraldo, para que fosse possível distinguir os dois haplótipos e auxiliar na montagem. Mesmo assim, a seqüência do genoma não foi completamente montada e é representada por um conjunto de dados redundantes distribuídos em numerosos *contigs*. Assim, o genoma de *T. cruzi* possui aproximadamente 100 Mb e contém cerca de 12.000 genes. Mais recentemente, Weatherly e colaboradores (2009) geraram versões consenso de cada par de cromossomos homólogos usando mapas de sintonia para

os cromossomos de *T. cruzi*. Em última análise, 41 cromossomos foram montados, o que é acima do número predito por estudos prévios através de análises por eletroforese em campo pulsado (CANO *et al.*, 1995; VARGAS, PEDROSO e ZINGALES, 2004). O seqüenciamento dos genomas dos outros dois tripanosomatídeos, *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005) e *L. major* (IVENS, PEACOCK e WORTHEY, 2005), permitiu fazer comparações entre os três patógenos, revelando que, mesmo tendo divergido há mais de 200 milhões de anos (OVERATH *et al.*, 2001; STEVENS *et al.*, 2001), a sintonia dos genomas destes tripanosomatídeos é bastante alta.

Uma das características mais importantes revelada pelo seqüenciamento do genoma de *T. cruzi* foi a expansão dramática de famílias gênicas que codificam proteínas de superfície (EL-SAYED *et al.*, 2005). Sequências repetitivas representadas por retrotransposons e sequências subteloméricas, somadas às famílias gênicas de proteínas de superfície, representam cerca de 50% do genoma nuclear de *T. cruzi*. Quando comparado com *T. brucei* e *L. major*, *T. cruzi* tem o maior conjunto de famílias multigênicas, talvez por sua capacidade única de invadir e se multiplicar em diferentes tipos celulares. As maiores famílias gênicas são as proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), trans-sialidades (TS), mucinas e a glicoprotease de superfície gp63, as quais são geralmente específicas de *T. cruzi* e perfazem cerca de 18% dos genes codificadores de proteínas (EL-SAYED *et al.*, 2005).

1.2.2. Transcrição policistrônica

Como citado anteriormente, a organização genômica dos tripanosomatídeos difere em vários aspectos dos demais eucariotos. Geralmente, nas células eucarióticas, exons (seqüências codificantes) e íntrons (seqüências não codificantes) alternam-se ao longo dos genes que codificam proteínas e o fenômeno de transcrição é, na maioria dos casos, dirigido por uma seqüência promotora situada a montante da região codificadora, reconhecida pela RNA polimerase do tipo II. Ao transcrito primário, em sua extremidade 5', é adicionado um resíduo metilguanossina - trifosfato (m7Gppp, ou *cap*) e, em sua extremidade 3', uma cauda

poli-A. Os transcritos primários são processados pelo mecanismo de *cis*-splicing que simultaneamente remove seqüências de íntrons e liga as seqüências de exons adjacentes (KORNBERG, 2007; PROUDFOOT, FURGER e DYE, 2002).

Em contraste, nos tripanosomatídeos, a organização gênica lembra operons de procariotos, especialmente as regiões codificadoras de proteínas as quais raramente são interrompidas por íntrons; as únicas exceções são os genes que codificam a poli-A polimerase (MAIR *et al.*, 2000) e a DNA/RNA helicase (BERRIMAN *et al.*, 2005). Apesar desta semelhança, estes genes organizados em *tandem*, os quais são transcritos em uma única molécula de RNA policistrônica, não são relacionados a uma determinada via metabólica. Além disso, os genes de uma mesma unidade policistrônica podem apresentar diferenças significativas em seu nível de expressão, representadas pelas quantidades variáveis de moléculas monocistrônicas e de proteínas observadas na célula. Os transcritos policistrônicos são processados no núcleo a fim de gerarem unidades monocistrônicas estáveis e traduzíveis. O processamento do transcrito primário consiste em dois mecanismos distintos, porém, intrinsecamente acoplados – uma reação de *trans*-splicing e outra de poliadenilação – figura 2 (CLAYTON, 2002; LEBOWITZ *et al.*, 1993; VANHAMME e PAYS, 1995).

Uma característica importante dos SL RNAs é que eles possuem uma estrutura *cap* 5'. A adição do *cap* (m7G) é essencial para o metabolismo e processamento de RNA em eucariotos. Em tripanosomatídeos, o m7G é ligado por uma ponte trifosfato 5'-5' ao primeiro nucleotídeo da seqüência SL (TSCHUDI e ULLU, 2002). Entretanto, o *cap* é mais complexo e denominado *cap* 4, porque os primeiros quatro nucleotídeos 5' adjacentes ao *cap* são modificados por metilações (BANGS *et al.*, 1992).

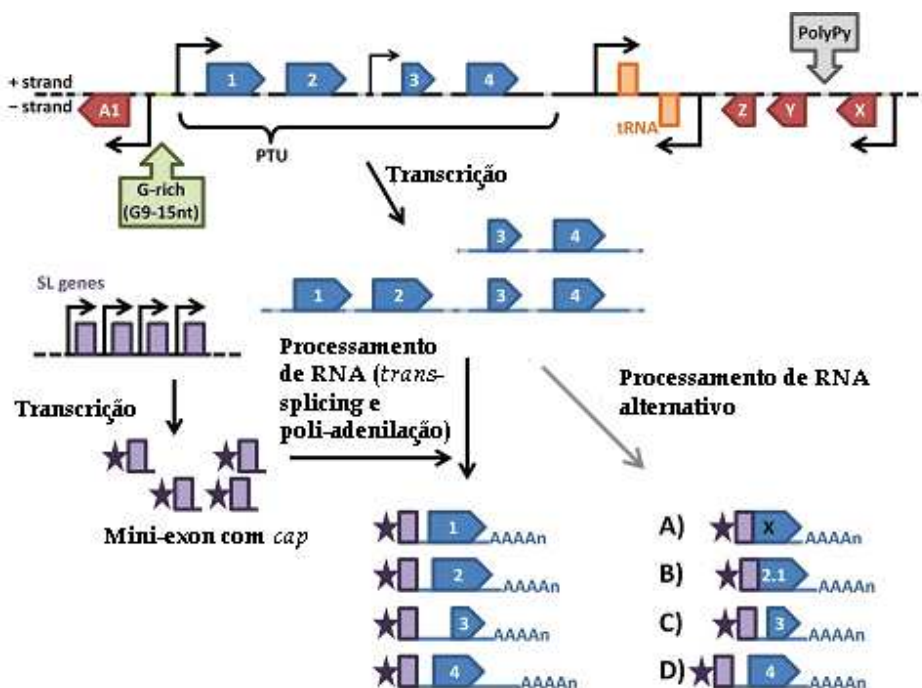


Figura 2 – Expressão gênica em tripanosomatídeos. *Clusters* extensos de genes não relacionados (caixas com setas) estão organizados em unidades de transcrição policistrônicas (PTU) que estão separadas por regiões de mudança de fita (*strand switch*) divergentes ou convergentes. Sítios de início de transcrição (TSS) por Pol II estão geralmente localizados a montante do primeiro gene do PTU. No TSS (setas dobradas), variantes de histonas, histonas modificadas e alguns fatores de transcrição estão freqüentemente associados. Os RNAs policistrônicos (pré-mRNAs) são individualizados em mRNAs monocistrônicos após a adição do mini-exon contendo o *cap* através de uma reação de *trans*-splicing acoplada à poliadenilação. Estas reações são guiadas por regiões ricas em pirimidinas (poli-Y) presentes em cada região intergênica. Os mRNAs maduros são, então, exportados para o citoplasma. Os pré-mRNAs também podem sofrer processamento alternativo que pode resultar em mudanças no iniciador AUG, alterando, assim, a tradução da proteína (A), direcionamento e/ou função (B). Splicing alternativo e poliadenilação podem também resultar na inclusão/exclusão de elementos regulatórios presente nas regiões 5'-UTR (C) ou 3'-UTR (D), alterando, desse modo, a expressão gênica (adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2012).

No processo de *cis*-splicing, os fatores envolvidos na adição do *cap*, no *splicing* e na poliadenilação interagem com o domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II em um estágio inicial da produção de mRNA e estes processos, então, estão ligados à transcrição. Embora nenhuma seqüência consenso para poliadenilação e adição do mini-exon tenha sido encontrada em tripanosomatídeos, vários estudos demonstraram que regiões ricas em polipirimidinas (poli-Y) nas regiões intergênicas têm papel fundamental no acoplamento das reações de *trans*-splicing e poliadenilação (revisto por ARAÚJO e TEIXEIRA, 2011). As seqüências intergênicas envolvidas no processamento dos mRNAs em *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* sp. foram investigadas comparando mRNAs com seqüências genômicas, inicialmente usando banco de dados de ESTs (BENZ *et al.*, 2005;

CAMPOS *et al.*, 2008; SMITH, BLANCHETTE e PAPADOPOULU, 2008) e, mais recentemente, utilizando seqüenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) (SIEGEL *et al.*, 2010; KOLEV *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2010). A distância entre a região rica em pirimidinas e o sítio consenso (AG) para *trans*-splicing tem influência sobre a adição da cauda poli-A. Para genes de *T. cruzi*, a distância média entre a região poli-Y e o sítio de adição do SL é de 18 nucleotídeos, enquanto para o sítio de poliadenilação é de 40 nucleotídeos (CAMPOS *et al.*, 2008). Em *T. brucei*, a média de comprimento das regiões 5'-UTR é de 130 nucleotídeos e das regiões 3'-UTR é de 388 (KOLEV *et al.*, 2010). Em *T. cruzi*, os comprimentos médios das regiões 5'-UTR e 3'-UTR são de 35 e 264 nucleotídeos, respectivamente (CAMPOS *et al.*, 2008). Estes tipos de predição *in silico* permitem a rápida identificação de elementos regulatórios *cis*, cujas funções na modulação da expressão gênica podem ser experimentalmente validadas.

Os três tipos de RNA polimerases (RNA pol I, RNA pol II e RNA pol III), descritos em eucariotos “superiores”, já foram identificados em tripanosomatídeos (Das *et al.*, 2008; Palenchar & Bellofatto, 2006). Os genes que codificam para as subunidades principais já foram clonados e caracterizados (EVERS *et al.*, 1989; JESS, HAMMER e CORNELISSEN, 1989; KOCK, EVERS e CORNELISSEN, 1988; SMITH, LEVIN e AGABIAN, 1989). Entretanto, as RNAs polimerases isoladas de formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentam comportamento diferente das RNA polimerases de mamíferos em relação à sensibilidade à α -amanitina, dependência de Mn^{2+} , utilização de DNA simples fita e no reconhecimento de promotores específicos (HODO e HATCHER, 1986).

Cada classe de RNA polimerases é responsável pela síntese de um tipo diferente de RNA. De um modo geral, a RNA polimerase I transcreve os cístrons para os RNAs ribossômicos 18S, 5,8S e 28S (rRNA); a RNA polimerase II, os genes que serão traduzidos em proteínas e a maioria dos pequenos RNAs nucleares (snRNAs); e a RNA polimerase III, pequenos RNAs, como os tRNAs, o rRNA 5S e alguns snRNAs.

Os promotores para as RNA polimerases I e III estão definidos (LAUFER e GÜNZL, 2001; LAUFER *et al.*, 1999). No entanto, o único promotor de Pol II caracterizado até o momento é o que direciona a expressão do SL RNA (GILLINGER & BELLOFATTO, 2001). Não foi possível identificar sequências promotoras consenso para Pol II que direcionem a expressão de genes

codificadores de proteínas em tripanosomatídeos. Apenas alguns promotores de genes que codificam proteínas foram funcionalmente identificados e caracterizados. Trata-se dos promotores dos genes dos antígenos VSG e prociclina de *T. brucei* (GÜNZL *et al.*, 2003; PAYS, 2005). A transcrição destes genes é resistente à α -amanitina, característica de RNA polimerase do tipo I. Entretanto, em relação ao requerimento para cátions divalentes, comportam-se como RNA polimerase II (LEE e VAN DER PLOEG, 1997). Além disso, alguns resultados mostraram que a RNA polimerase I e promotores ribossomais podem ser usados em construções artificiais para transcrever genes que codificam proteínas em tripanosomatídeos (RUDENKO *et al.*, 1991; TYLER-CROSS *et al.*, 1995; ZOMERDIJK, KIEFT e BORST, 1991).

Entretanto, análises por *run-on* do cromossomo 1 de *L. major* mostraram que a transcrição por Pol II do cromossomo inteiro inicia-se na região de mudança de fita, ou *strand-switch* (entre os dois *clusters* policistrônicos divergentes), e continua bidirecionalmente em direção aos telômeros. Vários sítios de início da transcrição foram mapeados para ambos *clusters* policistrônicos divergentes dentro de uma região de menos de 100 pares de bases que contém uma série de guaninas (ou citosinas), mas não contém um TATA-*box* ou nenhum elemento promotor típico de Pol II. Assim, ao contrário do caso da maioria dos eucariotos, onde cada gene possui seu próprio promotor, uma única região parece direcionar a expressão do cromossomo 1 inteiro em *L. major* (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2003).

Estudos recentes vêm demonstrando que modificações epigenéticas distintas (acetilação e metilação) estão presentes nos pontos de início e fim de unidades de transcrição pela Pol II e podem ser essenciais para regular a transcrição de genes codificadores de proteínas. Um estudo CHIP-chip em *L. major* mostrou que histonas H3 acetiladas em K9/K14, marcadores de sítios ativos de início de transcrição em outros eucariotos, foram encontradas em todas as regiões *strand-switch* divergentes no parasita (THOMAS *et al.*, 2009). Em *T. brucei* e *T. cruzi*, também foram observadas modificações em histonas que, em outros organismos, estão associadas a genes ativos nestas regiões (RESPUELA *et al.*, 2008; SIEGEL *et al.*, 2009).

1.2.3. Regulação da expressão gênica

Os tripanosomatídeos, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, são parasitas com um complexo ciclo de vida. Mudanças coordenadas na expressão gênica são vitais, já que eles se alternam entre diferentes hospedeiros, deparando-se com mudanças rápidas em seu ambiente, como disponibilidade de nutrientes, temperatura, defesas do hospedeiro, entre outras.

Em geral, a regulação da expressão gênica em eucariotos é, em grande parte, atribuída ao controle do início da transcrição pela RNA polimerase II. Entretanto, alguns trabalhos têm sugerido a presença de um controle pós-transcricional elaborado onde cada etapa do metabolismo de um mRNA em células eucarióticas superiores está sujeita a uma regulação mRNA-específica (MOORE, 2005).

As peculiaridades biológicas dos tripanosomatídeos, como, por exemplo, a estrutura mais aberta da cromatina, o caráter repetitivo e a distribuição dos genes ao longo do genoma, a edição das moléculas de RNA mitocondrial, o *trans*-splicing, a transcrição policistrônica, as inusitadas propriedades das RNA polimerases, a ausência de seqüências promotoras típicas para a transcrição de genes codificadores de proteínas e o fato de que genes presentes na mesma unidade policistrônica apresentam níveis de mRNA processado distintos, indicam que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente, se não exclusivamente, por mecanismos pós-transcricionais, majoritariamente citoplasmáticos compreendendo a estabilidade e localização tanto dos mRNAs quanto das proteínas e a disponibilidade dos mRNAs para serem traduzidos.

A seguir, discutiremos os mecanismos potenciais de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos fazendo, quando necessário, uma análise comparativa com os mecanismos de regulação mais usuais em outros eucariotos.

1.2.4. Processamento e exportação do mRNA policistrônico

Há algum tempo atrás, existiam poucos exemplos de genes regulados em nível de processamento de pré-mRNA e não havia evidências de regulação de *splicing* durante o desenvolvimento dos tripanosomatídeos (revisto por CLAYTON e SHAPIRA, 2007). Embora o processamento de pré-mRNA, por si só, pareça não contribuir para os níveis absolutos de mRNAs individuais, pode atuar em conjunto com outros mecanismos.

A maioria dos eventos de *trans-splicing* descritos em tripanosomatídeos apontam para um uso preciso dos sítios aceptores 3'. Entretanto, vários ensaios têm mostrado que mais de um sítio acceptor dentro de uma mesma região intergênica pode ser usado na produção de mRNAs maduros codificando a mesma ORF, mas com regiões 5'-UTR de diferentes extensões (revisto por MAYER e FLOETER-WINTER, 2005). Um estudo da expressão do gene arginase em *L. amazonensis* mostrou que o SL foi adicionado em mais de dois sítios distintos no pré-mRNA (DA SILVA *et al.*, 2002). Análises da sequência nucleotídica mostraram a presença de diferentes sítios aceptores adjacentes. Em tripanosomatídeos, alterações no uso dos sítios de adição do mini-exon para um determinado transcrito implicam em sítios de poliadenilação alternativos para o códon a montante. Sítios de adição de mini-exon alternativos também foram encontrados para os transcritos *TcRho1* e *Lyt1* em *T. cruzi* (NEPOMUCENO-SILVA *et al.*, 2001; MANNING-CELA, GONZÁLEZ e SWINDLE, 2002).

Um estudo em *T. cruzi* mostrou que alguns sítios de *trans-splicing* e poliadenilação podem ser “mascarados” durante o processamento dos transcritos primários. Como consequência, unidades dicistrônicas ou mesmo unidades monocistrônicas com longas regiões 3' não traduzíveis (3'- UTR) são produzidas. Estes mRNAs intermediários podem ser processados posteriormente pelos mecanismos usuais de *trans-splicing* e poliadenilação. Os autores sugerem que este mecanismo de processamento de pré-mRNA desacoplado do processo de transcrição faz parte de um mecanismo de controle de expressão gênica através do qual RNAs em “estado de latência funcional” possam ser estocados e processados em mRNAs maduros quando requeridos pela célula (JAGER *et al.*, 2007).

Com o surgimento de tecnologias de seqüenciamento em larga escala, como, por exemplo, RNAseq, a importância do processamento alternativo dos pré-mRNAs como um mecanismo de regulação da expressão gênica foi reavaliada. A maioria dos genes tem de um a três sítios de adição de mini-exon alternativos, mas os sítios de poliadenilação se mostraram mais variáveis (KOLEV *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2010; SIEGEL *et al.*, 2010). Nilsson e colaboradores (2010) analisaram três diferentes estágios do ciclo de vida de *T. brucei* e identificaram mais de 2.500 eventos de *splicing* alternativo, muitos deles parecendo ser específicos de um determinado estágio no ciclo de vida. A heterogeneidade observada em *T. brucei* tanto do *trans*-*splicing* quanto da poliadenilação gera uma coleção de mRNAs com o mesmo potencial codificador, mas com UTRs de comprimentos variáveis, o que pode influenciar na eficiência da estabilidade e/ou tradução desses RNAs. Transcritos da aminoacil tRNA sintetase são exemplos interessantes de variantes processadas por *trans*-*splicing* uma vez que diferenças na região N-terminal resultam em mudanças no sinal de direcionamento da proteína: mRNAs distintos produzem proteínas que são direcionadas para a mitocôndria ou permanecem no citoplasma (NILSSON *et al.*, 2010).

Outra etapa importante na regulação da expressão gênica em eucariotos é o transporte de mRNAs processados do núcleo para o citoplasma. A exportação de mRNA e proteínas do núcleo para o citoplasma é um processo regulado que permite o controle de expressão de proteínas durante o desenvolvimento e a diferenciação celular. Este transporte tem início no núcleo, onde a associação com complexos protéicos determina o destino dos mRNAs no citoplasma. O modelo geral de exportação de RNA envolve exportinas como receptores de transporte que conduzem o RNA para os complexos poro nuclear (NPC) de forma dependente de RanGTP. Em Metazoa e Fungi, a exportação nuclear da maioria dos RNAs, como microRNAs, rRNAs, snRNAs e tRNAs, seguem o modelo de transporte por exportinas dependente de RanGTP (KÖHLER e HURT, 2007). Entretanto, a exportação da maioria dos mRNAs não segue a via RanGTP-exportina. A maquinaria de exportação de mRNA está altamente integrada com o processamento do mRNA e inclui um conjunto diferente de adaptadores e outras proteínas de ligação a RNA, RNA helicases e proteínas associadas ao NPC. Em leveduras e humanos, os mRNAs se associam com fatores protéicos, formando complexos ribonucleoprotéicos (mRNPs), os quais são, então, exportados através do NPC por

um heterodímero receptor: Mex67/Mtr2 em leveduras e TAP/p15 em humanos (SANTOS-ROSA *et al.*, 1998; SEGREF *et al.*, 1997). Este receptor atua em conjunto com TREX (Transcription/Export), um complexo multiprotéico que conecta a transcrição com a exportação do mRNA. TREX, em leveduras, é composto por Sub2 (RNA helicase - UAP56 em humanos), Yra1 (proteína adaptadora de ligação a RNA - ALY em humanos) e pelo complexo THO (AGUILERA, 2005).

Até o momento, pouco se sabe acerca do processo de exportação de mRNAs nucleares em tripanosomatídeos. Análises comparativas, incluindo tripanosomatídeos, indicam que os componentes básicos da via dependente de RanGTP estão conservados entre os eucariotos, ao contrário da via independente de RanGTP (SERPELONI *et al.*, 2011a). Em *T. cruzi*, um estudo descreve a presença de uma exportina semelhante à proteína CRM1 de eucariotos superiores, denominada TcCRM1. Esta proteína contém uma região central conservada que interage com o sinal nuclear de exportação (NES) e um resíduo de cisteína, envolvido na interação com leptomicina B, um inibidor de CRM1 que bloqueia a exportação nuclear. Experimentos de hibridação *in situ* revelaram um acúmulo parcial de RNA poli-A(+) no núcleo e uma redução significativa nos níveis de alguns mRNAs como HSP70, TcUBP1/2 e TcPABP1, quando as células foram tratadas com este inibidor (CUEVAS, FRASCH e D'ORSO, 2005). Recentemente, outro trabalho identificou o ortólogo de Sub2/UAP56 e mostrou que o seu *knockdown* leva ao acúmulo de mRNA no núcleo e à diminuição dos níveis de tradução (SERPELONI *et al.*, 2011b). O ortólogo do fator de exportação nuclear Mex67 também foi identificado em *T. brucei*, o qual contém um motivo CCCH inesperado (KRAMER, KIMBLIN e CARRINGTON, 2010).

Uma vez translocados para o citoplasma, os mRNAs são controlados pela regulação da tradução, estabilidade e localização subcelular, processos que estão frequentemente interconectados e serão abordados na próxima seção.

1.2.5. Controle traducional

Uma vez que o mRNA maduro foi transportado para o citoplasma, dependendo da condição que o parasita se encontra, esse mRNA estará disponível

para a maquinaria de tradução. Em eucariotos, a tradução tem início a partir da ligação do complexo ternário eIF4F (eIF4E, eIF4A, eIF4B e eIF4G), via eIF4E, ao *cap* presente na extremidade 5' do mRNA. O eIF4F, juntamente com o complexo ribossomal 43S, percorre a região 5'-UTR até encontrarem o primeiro códon AUG, recrutando a subunidade ribossomal 60S para formarem o complexo 80S, dando início ao processo de alongação da tradução. A interação entre o fator eIF4G, presente no complexo eIF4F, e a proteína PABP (*poly(A) binding protein*) aproxima as regiões 3'-UTR e 5'-UTR promovendo a circularização do mRNA (MAZUMDER, SESHADRI e FOX, 2003). Dessa forma, alguns repressores da síntese proteica ligam-se à região 3'-UTR destes mRNAs e atuam como competidores de eIF4G pela ligação à eIF4E. Além disso, homólogos estruturais ao eIF4E podem se ligar ao *cap* impedindo a ligação deste com o eIF4G (RICHTER e SONENBERG, 2005). Os mecanismos de iniciação da tradução não foram estudados em detalhe em tripanosomatídeos. Foram identificadas quatro proteínas distintas de ligação ao *cap* (eIF4E) em *Leishmania* spp., todas sendo conservadas também nos tripanosomas (DHALLIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2006). Entretanto, nenhum destes ortólogos foi capaz de complementar a deficiência de eIF4E em leveduras ou em reticulócitos de coelho, provavelmente devido à divergência na estrutura para reconhecer o *cap4* (YOFFE *et al.*, 2006; YOFFE *et al.*, 2004). A estrutura *cap-4* altamente modificada presente em todos os mRNAs de tripanosomatídeos pode ter papel relevante no controle da tradução, uma vez que o *cap* protege os mRNAs da degradação, possibilita o transporte de mRNAs do núcleo para o citoplasma e tem papel fundamental na montagem do complexo de iniciação da tradução (revisado por YOFFE *et al.*, 2004). A RNA helicase eIF4A-1 e a proteína eIF4G-3 também foram identificadas como parte do complexo eIF4F, necessário para o recrutamento do ribossomo e para o início da tradução (DHALLIA *et al.*, 2006; YOFFE *et al.*, 2009).

O início da tradução é a etapa mais regulada na síntese proteica em eucariotos e é altamente influenciada por estresse celular. Uma das primeiras etapas na iniciação da tradução em eucariotos começa na formação do complexo ternário, composto por GTP, metionil-tRNA (Met-tRNA) e eIF2. Em células de mamíferos, tipos distintos de estresse levam à fosforilação de eIF2 α por quinases específicas e esta resposta ao estresse é conservada de leveduras a mamíferos e fundamental na diferenciação em protozoários (TONELLI *et al.*, 2011). Em *T. brucei*, o ortólogo de eIF2 α contém uma extensão N-terminal incomum e a fosforilação

ocorre em posição e resíduo diferentes (MORAES *et al.*, 2007). Das três potenciais quinases-eIF2 α encontradas em *T. brucei*, apenas a eIF2K2 foi capaz de fosforilar eIF2 α de mamíferos, leveduras e *T. brucei*. Interessantemente, eIF2K2 é uma proteína associada à membrana que se localiza na bolsa flagelar de *T. brucei*. Esta localização pode estar ligada à detecção de nutrientes, já que a bolsa flagelar está envolvida na endocitose. Ainda assim, eIF2 α é citoplasmático em *T. brucei* (KRAMER *et al.*, 2008), o que deixa em aberto a possibilidade da existência de quinases citoplasmáticas ainda não descritas que podem ter uma identidade baixa de seqüência com os ortólogos identificados em outras espécies (revisto por CASSOLA, 2011).

Outro ponto importante de regulação pós-transcricional se refere à estabilidade do mRNA. Diversos estudos mostram que o acúmulo de mRNAs durante estágios específicos do ciclo de vida ocorre por estabilidade diferencial do mRNA e não por um aumento do nível de transcrição do gene (TEIXEIRA, KIRCHHOFF e DONELSON, 1999; COUGHLIN *et al.*, 2000; BARTHOLOMEU *et al.*, 2002; YAMADA-OGATTA *et al.*, 2004; DA SILVA, BARTHOLOMEU e TEIXEIRA, 2006; GENTIL *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns mRNAs mantêm o mesmo nível de transcritos em diferentes estágios evolutivos, porém observa-se diferenças nos níveis de proteína, sugerindo uma regulação em nível traducional (THOMAS *et al.*, 2000). Outros estudos sugerem ainda que a expressão gênica seja dependente da mobilização do mRNA aos polissomos (ÁVILA *et al.*, 2001), bem como mecanismos que envolvem o bloqueio do alongamento e/ou terminação da tradução (NARDELLI *et al.*, 2007). Estas observações podem ser um fenômeno mais geral, pois dados obtidos usando a técnica de microarranjos de DNA mostram que outros genes apresentam comportamento similar, indicando que o controle da associação à maquinaria de tradução seja um mecanismo importante de modulação da expressão gênica neste protozoário (PROBST, 2005).

A investigação de fatores envolvidos na regulação da tradução do mRNA revelaram a importância das regiões 3'- e 5'-UTR. Na maioria dos casos, a regulação ocorre através de interações entre fatores regulatórios (*trans*) e seqüências específicas (*cis*) dentro destas regiões não traduzíveis. Dados relacionados a esses elementos foram descritos usando ensaios com gene repórter (TEIXEIRA e DA ROCHA). Por exemplo, os níveis de mRNA da amastina são 68 vezes maiores em amastigotas comparados a epimastigotas. Quando a região 3'-UTR foi clonada a

jusante do gene da luciferase para ensaios de transfecção, a atividade da luciferase foi sete vezes maior em amastigotas quando comparados com epimastigotas (TEIXEIRA, KIRCHHOFF e DONELSON, 1995). Os transcritos para a cruzipaina, a principal cisteína-protease de *T. cruzi*, apresentam níveis constantes durante todos os estágios do ciclo de vida, no entanto, os níveis da proteína, bem como sua atividade, são quatro a cinco vezes maiores nas formas epimastigotas, sugerindo um mecanismo de regulação predominantemente traducional ou pós-traducional (TOMÁS e KELLY, 1996). Experimentos de transfecção utilizando genes repórteres sob controle das regiões 3'- e 5'-UTRs dos genes HSP83 e HSP70 de *Leishmania* mostraram que a regulação da tradução foi dirigida pela região 3'-UTR (QUIJADA *et al.*, 2000; ZILKA *et al.*, 2001). A maior eficiência na tradução da glicoproteína gp72 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* também está relacionada com a porção 3'-UTR deste transcrito (NOZAK & CROSS, 1995). Estudos com o mRNA que codifica a tubulina indicam que sequências reguladoras presentes na região 3'-UTR estão envolvidas na modulação da estabilidade destes transcritos que ocorrem em resposta a mudanças na dinâmica dos microtúbulos em *T. cruzi* (DA SILVA *et al.*, 2006). Interessantemente, um número crescente de relatos tem mostrado que os níveis de mRNA e de proteína nem sempre estão relacionados, mostrando, assim, que controles traducionais e pós-traducionais têm um papel importante em tripanosomatídeos.

Em tripanosomatídeos, existem estruturas similares aos AREs sabidamente envolvidos na desestabilização de mRNAs em eucariotos superiores por interação com determinadas proteínas de ligação ao RNA (DINOIA *et al.*, 2000; D'ORSO e FRASCH, 2002). Estes elementos de instabilidade ricos em U (*U-rich instability elements* – UREs) estão presentes na região 3'-UTR de vários transcritos que são estáveis na forma procíclica, porém instáveis nas formas sanguíneas de *T. brucei*. Da mesma forma, alguns mRNAs em *T. cruzi* e o mRNA de amastina em *Leishmania infantum* são regulados via UREs (HAILE & PAPADOPOULOU, 2007). Motivos regulatórios presentes na região 3'-UTR dos transcritos de prociclina em *T. brucei* estão bem caracterizados. Um elemento de 26 nucleotídeos (26mer), rico em pirimidinas, além de afetar a estabilidade do mRNA, também reduz a taxa de tradução deste transcrito nas formas sanguíneas do parasita (HOTZ *et al.*, 1997). Outra seqüência de 16mer (*stem loop*) presente no mesmo mRNA aumenta a taxa

de tradução nas formas procíclicas, mas não tem papel relevante na regulação estágio-específica neste organismo (FURGER *et al.*, 1997).

Embora vários elementos regulatórios presentes em regiões 3'-UTR tenham sido identificados em tripanosomatídeos, até o momento pouco se sabe sobre as proteínas regulatórias que se ligam a estes elementos. A busca por genes que contêm motivos de ligação a RNA funcionais é uma abordagem útil para encontrar tais proteínas. Em tripanossomos e leishmanias já foram identificados diversos genes que codificam proteínas com domínio RRM, pumilio (PUF) e CCCH *zinc fingers* (D'ORSO, DE GAUDENZI e FRASCH, 2003; DE GAUDENZI, FRASCH e CLAYTON, 2005; IVENS, PEACOCK e WORTHEY, 2005; MORKING *et al.*; 2004).

Em geral, a tradução começa quando o complexo de iniciação encontra o primeiro códon AUG. Porém, pequenas ORFs (*short open reading frames*) começando com AUG estão presentes nas regiões 5'-UTR de alguns mRNAs eucarióticos, indicando que nem sempre o primeiro AUG é o códon mais eficientemente selecionado para o início da tradução. A significância e os efeitos regulatórios destas pequenas ORFs não estão totalmente esclarecidos, no entanto, podem freqüentemente inibir a tradução (KOZAK, 2005). A freqüência de 5'-UTR contendo pequenas ORFs varia de 26% em *Saccharomyces* sp. e 37% em humanos até 52% em *Drosophila* sp., e de apenas 19,5% em *T. brucei* (SIEGEL *et al.*, 2010). A região 5'-UTR do mRNA da proteína tuzina de *T. cruzi* contém 22 códons que antecedem o códon de iniciação AUG, destes, 3 são para metionina, seguidos por um códon de terminação que se sobrepõe ao códon de iniciação AUG deste transcrito. Vários experimentos de transfecção, com diferentes mutações e substituições na região 5'-UTR, indicaram que a expressão reduzida desta proteína durante o ciclo de vida do protozoário é devida ao processamento deficiente do mRNA, bem como à ineficiência do processo de iniciação da tradução decorrente da presença destas estruturas na região 5'-UTR (TEIXEIRA, KIRCHHOFF e DONELSON, 1999). Outros exemplos de mRNAs de tripanosomatídeos contendo múltiplos códons AUG que precedem o códon de iniciação influenciando significativamente o início da tradução foram descritos (KOENING-MARTIN, YAMAGE e RODITI, 1992; LUKES *et al.*, 2006; NORRIS, SCHRIMPF e SZABO, 1997).

A localização de mRNAs também é um mecanismo de controle pós-transcricional e estudos indicam que o papel da maquinaria de localização de mRNA

na regulação da expressão de genes está interligada com o controle da tradução do mRNA (CZAPLINSKI e SINGER, 2006). A localização de RNAs específicos pode ser observada em diversos organismos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre a localização de transcritos específicos, tal como o que codifica Ash1, durante o brotamento da célula (BEACH e BLOOM, 2001). Em embriões de *Drosophila* sp., vários mRNAs se localizam em partes específicas das células, como o mRNA que codifica a proteína Bicoide, que fica no pólo anterior, e a proteína Nanos, que fica no pólo posterior. Essa distribuição é essencial para o desenvolvimento correto do embrião (TEKOTTE e DAVIS, 2002). As células neuronais são altamente polarizadas, sendo grande o número de mRNAs localizados em dendritos ou na porção sináptica dos axônios (JOB e EBERWINE, 2001). A tradução desses mRNAs é reprimida até que eles atinjam seu destino. Para que essa repressão ocorra, evidências mostram que o transporte desses mRNAs ocorre em grânulos (BARBARESE *et al.*, 1995; KNOWLES *et al.*, 1996). Para a localização desses mRNAs, algum tipo de sinal é necessário para que o transporte seja feito. Esses sinais são encontrados em elementos *cis*, geralmente na região 3'-UTR, e são reconhecidos por fatores *trans*, na sua maioria proteínas, mas não se descarta a hipótese de pequenas moléculas de RNA atuando nesses processos (KLOC *et al.*, 2002). A ligação desses fatores *trans* levam a uma mudança conformacional da molécula de RNA, permitindo assim que outras proteínas se liguem formando mRNPs de transporte. Esses mRNPs de transporte se associam ao citoesqueleto carregando o mRNA ao seu local de destino onde este é traduzido (KLOC e ETKIN, 1994; HEASMAN *et al.*, 2001).

Modificações pós-traducionais de proteínas possuem um papel fundamental na regulação da expressão gênica em eucariotos. A expressão de vários genes pode ser alterada simultaneamente em resposta a um estímulo extracelular através de cascatas de sinalização de quinases/fosfatases, o que resulta na fosforilação e ativação de fatores transcricionais residentes no núcleo ou na modificação de fatores transcricionais latentes no citosol. Em tripanosomatídeos, existem poucos estudos que evidenciam a regulação da expressão gênica em nível pós-traducional. Embora tenham sido identificados vários genes putativos de quinases e fosfatases nos genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania*, a importância do mecanismo de fosforilação estágio-específica e sua implicação na regulação da expressão gênica ainda precisam ser determinadas (JONES *et al.*, 2006; PARSONS *et al.*, 2005). No

entanto, várias proteínas de *Leishmania* sp. que apresentam modificações pós-traducionais têm sido identificadas através de experimentos em géis bidimensionais (McNICOLL *et al.*, 2006).

1.2.6. Degradação de mRNA

Em geral, a degradação de mRNAs em leveduras e células de mamíferos tem início com a desadenilação, ou seja, um processo de encurtamento da cauda poli-A na extremidade 3' pela ação de várias enzimas desadenilases, como, por exemplo, o complexo Ccr4/Pop2/Not. Após esta etapa, o mRNA pode ser degradado por duas vias. Em uma via, a desadenilação estimula a retirada do *cap* (*decapping*) pelas enzimas Dcp1/Dcp2, expondo o transcrito à ação da enzima XRN1, uma exonuclease com atividade 5'-3'. Em outra via, após a desadenilação, o transcrito pode ser degradado na direção 3'-5' pelo exossomo, um complexo de onze proteínas com diversas funções na degradação de mRNA (BÜTTNER, WENIG e HOPFNER, 2006; PARKER e SONG, 2004). Os tripanosomatídeos contêm a maioria das proteínas envolvidas na degradação de mRNAs, incluindo desadenilases, o complexo do exossomo, as proteínas XRN e Dhh1. A atividade de *decapping* foi detectada *in vitro* (MILONE, WILUSZ e BELLOFATTO, 2002), mas as proteínas de *decapping* Dcp não possuem ortólogos que possam ser facilmente identificados por similaridade de seqüência nos genomas de tripanosomatídeos, indicando que as enzimas de *decapping* provavelmente possuem características distintas que permitem o reconhecimento da estrutura única do *cap4* (BERRIMAN *et al.*, 2005).

Em células de mamíferos, os RNAs que não estão sendo traduzidos, ou aqueles que estão destinados para a degradação, são estocados em grânulos visíveis microscopicamente. Estas estruturas citoplasmáticas distintas são denominadas *processing bodies* (*P-bodies* ou PB) e grânulos de estresse (SG). Estas estruturas participam ativamente no metabolismo de RNA e compartilham mRNAs e muitas proteínas, mas também apresentam componentes próprios e funções independentes. Em mamíferos, estas partículas estão espacialmente e funcionalmente ligadas, ambas são induzidas por estresse e ambas contêm mRNAs não traduzidos provenientes da dissociação dos polissomos. Drogas que estabilizam

os polissomos (cicloheximida) dissociam estes grânulos, enquanto drogas que desestabilizam os polissomos (puomicina) promovem um aumento no número e no tamanho dos mesmos, sugerindo a saída dos mRNAs do ciclo traducional e a entrada dos mesmos nos grânulos de estresse e *P-bodies* (KEDERSHA e ANDERSON, 2002; SHETH e PARKER, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Entretanto, estes grânulos diferem em vários aspectos, entre eles, podemos ressaltar que somente os *P-bodies* são observados em células em fase exponencial de crescimento e em células não submetidas a estresse. Além disso, o estresse induzido pela fosforilação de eIF2 α afeta somente a formação dos grânulos de estresse e não tem efeito sobre os *P-bodies*. Os grânulos de estresse são relativamente fixos no citoplasma e mudam de forma constantemente. Ao contrário, os *P-bodies* movimentam-se rapidamente sem alterar a forma esférica. De forma geral, os grânulos de estresse são definidos pela presença de fatores de iniciação da tradução enquanto os *P-bodies* são definidos pela presença de componentes da maquinaria de degradação. Além disso, vários estudos têm revelado que muitas proteínas e RNAs com funções celulares distintas estão integrados com grânulos de estresse e *P-bodies*, indicando que as funções destas estruturas vão além da triagem de mRNAs entre a tradução e a degradação (ANDERSON e KEDERSHA, 2006, 2007; KEDERSHA *et al.*, 2005).

Quando as células são submetidas a algum tipo de estresse, como choque térmico, estas reprogramam o metabolismo dos mRNAs para reparar os danos induzidos e se adaptar às novas condições. Durante esse processo, a tradução de mRNAs que codificam proteínas *housekeeping* é diminuída, enquanto a tradução de mRNAs que codificam chaperonas e enzimas envolvidas no reparo dos danos é aumentada (ANDERSON e KEDERSHA, 2006). O recrutamento seletivo de mRNAs específicos em grânulos de estresse possivelmente regula a estabilidade e tradução dos mesmos. Assim, os grânulos de estresse são agregados dinâmicos de mRNAs bloqueados no processo de iniciação da tradução. Os SGs contêm mRNAs complexados com a subunidade ribossomal 40S, o complexo eIF4F (composto por eIF4E, eIF4G e eIF4A), eIF4B, eIF3, eIF2 e várias proteínas de ligação a RNA, incluindo a proteína de ligação a poli-A (KEDERSHA *et al.*, 2002). Estes componentes formam o cerne de todos os grânulos de estresse sendo considerados marcadores destas estruturas. Dentre as proteínas de ligação a RNA presentes em grânulos de estresse, podemos mencionar TIA-1 (*T cell internal antigen-1*), TIA-R

(*TIA-1-related*) e G3BP, as quais todas possuem domínios de auto-agregação que podem contribuir para a formação destas estruturas. Até o momento, os grânulos de estresse não foram observados em *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, grânulos semelhantes aos grânulos de estresse encontrados em mamíferos, contendo eIF3, eIF4A e RNA, foram observados em *Schizosaccharomyces pombe* submetidos a choque térmico (DUNAND-SAUTHIER *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Em mamíferos, a formação de grânulos de estresse é dependente da fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 α (eIF2 α) por quinases ativadas por estresse. A fosforilação de eIF2 α reduz a disponibilidade do complexo ternário eIF2-GTP-tRNA^{iMet} resultando num complexo de pré-iniciação 48S deficiente, incapaz de recrutar a subunidade ribossomal 60S bloqueando, assim, o início da tradução e promovendo a dissociação dos polissomos (ANDERSON e KEDERSHA, 2006; DEVER, 2002; KEDERSHA e ANDERSON, 2002). A montagem e dissociação dos grânulos de estresse são reguladas por diferentes vias sinalizadoras que atuam após a fosforilação de eIF2 α . A montagem destes grânulos começa quando proteínas ligadoras de RNA, tais como TIA-1, TTP, FMRP e G3BP ligam-se preferencialmente a determinados transcritos, que estão ligados ao complexo 48S, provenientes da dissociação dos polissomos. Após esta primeira etapa de nucleação, a proteína PABP-1, ligada a todos os transcritos poli-A(+), promove a agregação destes pequenos grânulos tornando-os microscopicamente visíveis. Alguns transcritos podem estar ligados a várias proteínas de nucleação o que favorece a agregação e aumenta progressivamente o tamanho dos grânulos. Outras proteínas não ligadoras de RNA são recrutadas a estes complexos através de interações com as proteínas de nucleação o que sugere uma integração dos grânulos de estresse com outras vias de sinalização na célula (ANDERSON e KEDERSHA, 2007).

Os *P-bodies* (corpos de processamento) podem ser definidos como agregados citoplasmáticos de mRNPs associados à maquinaria de degradação de mRNA e a fatores que inibem o processo de tradução. As proteínas que constituem o cerne destes grânulos são enzimas necessárias para cada fase da via geral de degradação de mRNA, incluindo o complexo de desadenilação (Ccr4/Not/Pop2), o complexo de enzimas de *decapping* (incluindo Dcp1/2, Hedls, hEdc3 e seus co-ativadores Dhh1/Rck/p54), o complexo heptamérico Lsm1-7 e a exonuclease 5'-3' XRN1 (EULALIO, BEHM-ANSMANT e IZAURRALDE, 2007; PARKER e SHETH,

2007). Além das proteínas de degradação já citadas, vários componentes envolvidos em processos pós-transcricionais distintos foram localizados nestes grânulos em diversos organismos. Estes componentes incluem proteínas da via NMD (*Nonsense-Mediate Decay*) que degradam mRNAs que contêm códons de terminação prematuros, proteínas que se ligam a elementos AREs nas regiões 3'-UTR de transcritos específicos, proteínas Argonautas envolvidas nas vias de silenciamento de mRNA por interferência de RNA (RNAi) e micro RNA (miRNA), e proteínas que regulam a tradução, entre elas o fator de iniciação eIF4E (EULALIO *et al.*, 2007).

Além da presença das proteínas de degradação, outras evidências indicam que os *P-bodies* são sítios de degradação de mRNA. A inibição da transcrição com actinomicina D e exposição das células à ação de ribonuclease-A promovem uma redução de aproximadamente 90% no número de *P-bodies* em *S. cerevisiae*, indicando que a formação destas estruturas é dependente da presença de RNA (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Observações indicam que muitos mRNAs presentes nos *P-bodies* sofrem a retirada do *cap* e são posteriormente degradados (revisto por PARKER e SHETH, 2007). Outros estudos, por outro lado, demonstram que os *P-bodies* também podem estar atuando como sítios de armazenagem de mRNAs que podem, eventualmente, retornar à tradução (BRENGUES, TEIXEIRA e PARKER, 2005). Experimentos mostraram que mRNAs específicos se acumulam nos *P-bodies* em células em crescimento ou estresse e que os mesmos saem desses grânulos e vão para os polissomos para serem traduzidos quando as condições são alteradas (BRENGUES, TEIXEIRA e PARKER, 2005; revisto por PARKER e SHETH, 2007).

A existência de estruturas citosólicas dinâmicas relacionadas a *P-bodies* e SGs foram descritas tanto em *T. brucei* quanto em *T. cruzi*. A caracterização inicial da RNA helicase DExD/H-box DHH1 e o ortólogo de XRN1 (XRNA) em *T. cruzi* mostrou que estas proteínas estão localizadas em *foci* citoplasmáticos que lembram estruturas tipo *P-bodies* (CASSOLA, DE GAUDENZI e FRASCH, 2007; HOLETZ *et al.*, 2007). *P-bodies* em tripanossomatídeos podem conter outras proteínas, como PUF6 (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2007), UBP1, SCD6 (KRAMER *et al.*, 2008) e XRNA (CASSOLA *et al.*, 2007). Parece que os *P-bodies* possuem uma composição heterogênea em tripanossomos que pode ser específica tanto em função quanto em conteúdo de mRNAs (CASSOLA, 2011). Aparentemente, os *P-bodies* de *T. brucei* e *T. cruzi* contêm mRNAs em equilíbrio com os polissomos, já que o tratamento com

cicloheximida reduz o número e o tamanho dos *foci* estabilizando os transcritos na fração polissomal (KRAMER *et al.*, 2008; HOLETZ *et al.*, 2007).

Em *T. brucei*, grânulos de estresse similares aos de mamíferos aparecem em resposta a choque térmico severo, concomitantemente com dissociação dos polissomos e um aumento massivo na taxa de decaimento dos mRNAs (KRAMER *et al.*, 2008). Entretanto, o estresse induzido por arsenito não leva à formação de grânulos de estresse em *T. cruzi* (CASSOLA e FRASCH, 2009). SGs em *T. brucei* contêm as proteínas de ligação a poli-A PABP1 e PABP2, todas as quatro isoformas de eIF4E, eIF2 α e eIF3B e não possuem DHH1 e SDC6 (KRAMER *et al.*, 2008). Assim como em mamíferos, os grânulos de estresse em *T. brucei* parecem estar em equilíbrio com os polissomos, já que o tratamento com cicloheximida previniu sua formação, sugerindo que a dissociação dos polissomos é necessária antes dos SGs serem formados. Entretanto, a liberação de mRNAs dos polissomos, tratando os parasitas com puromicina, não induziram a formação de SGs na ausência de um estresse, sugerindo que a disponibilidade de transcritos livres não seja suficiente para induzir sua formação. Quando a temperatura normal de crescimento foi restaurada, os componentes protéicos dos SGs voltam a sua localização citoplasmática normal, sugerindo que a resposta ao estresse é reversível (KRAMER *et al.*, 2008).

Balagopal e Parker (2009) propõem um modelo para explicar o movimento de mRNAs citoplasmáticos entre polissomos, *P-bodies*, grânulos de estresse e núcleo, ao qual denominaram “ciclo do mRNA” (figura 3). Nesse modelo, os mRNAs presentes nos polissomos podem sofrer vários ciclos de iniciação, alongação e terminação da tradução para produzirem polipeptídeos. Em resposta a defeitos no início ou durante a tradução, ou através de recrutamento por proteínas específicas, os mRNAs encontrados nos polissomos interagem com os componentes da maquinaria geral de repressão ou degradação finalizando o processo de tradução e favorecendo a montagem de mRNPs nos *P-bodies*. Os mRNAs associados com os complexos de repressão e degradação podem sofrer *decapping* e degradação 5'-3', se agregar em *P-bodies* ou o complexo mRNP a ele associado pode sofrer um rearranjo onde a maquinaria de degradação é substituída por fatores de iniciação da tradução. Tais mRNAs podem, então, retornar à tradução. Entretanto, se os fatores de iniciação forem limitantes em determinado momento celular, estes mRNAs podem

se acumular em grânulos de estresse, favorecendo o eventual retorno destes transcritos para a maquinaria traducional (BALAGOPAL e PARKER, 2009). Esta propriedade de agregação de mRNPs em *P-bodies* e grânulos de estresse pode servir como um sistema de “tamponamento” para manter constante a taxa de tradução dos mRNAs, uma vez que, quantidades excessivas de mRNAs podem competir por fatores de tradução limitantes, dificultando a tradução de muitos mRNAs. Por fim, Parker e Sheth (2007) propõem que os mRNAs recém exportados do núcleo podem entrar neste ciclo de mRNA por duas maneiras. Os transcritos que codificam proteínas expressas constitutivamente são traduzidos diretamente. Porém, grupos específicos de mRNAs submetidos a controle traducional podem formar tipos diferentes de mRNPs nucleares, incluindo proteínas que direcionam estes mRNAs aos *P-bodies*, garantindo um controle traducional mais robusto (PARKER e SHETH, 2007).

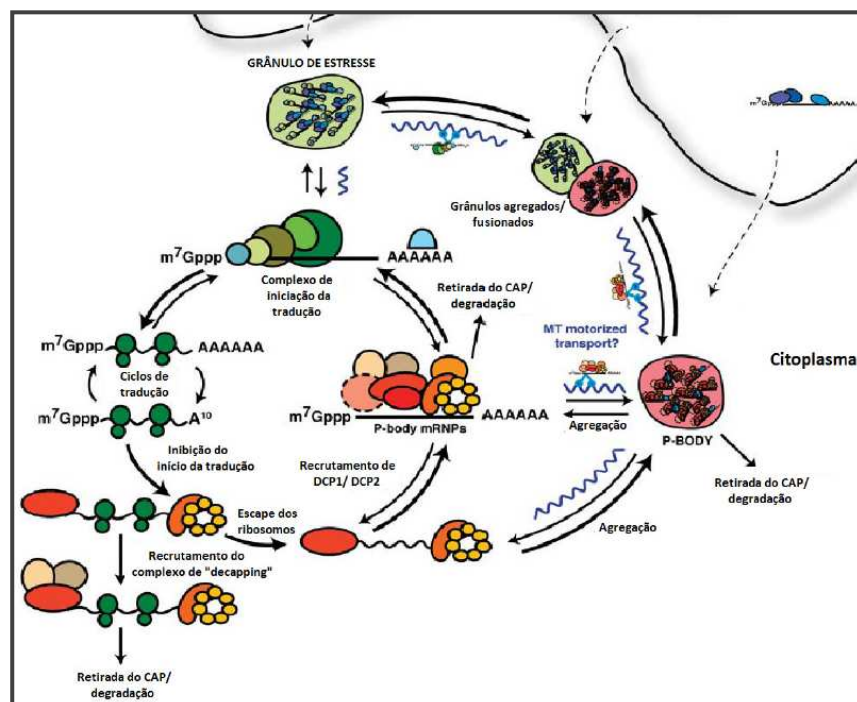


Figura 3 - Ciclo de mRNAs. O RNA mensageiro pode existir em pelo menos três estados no citoplasma: polissomos, *P-bodies* e grânulos de estresse. O recrutamento de repressores traducionais como Dhh1 e Pat1 facilita o movimento do mRNA para um estado não-traduzível. A competição cinética segue entre a dissociação do ribossomo, recrutamento da maquinaria de *decapping*, *decapping* seguido de degradação do transcrito e agregação em um *P-body*. Os mRNAs complexados com a maquinaria de *decapping* podem ser degradados, agregados em um *P-body* ou podem voltar a serem traduzidos. Condições limitantes de iniciação da tradução podem ser superadas pela agregação em grânulos de estresse onde a concentração local do aparato traducional é alta (adaptado de BALAGOPAL e PARKER, 2009).

1.3. Operons Pós-transcricionais

Como discutido anteriormente, moléculas de mRNA se associam com proteínas assim que são transcritas, formando complexos mRNPs. As proteínas associadas por fim determinam o destino dos mRNAs e esta associação é muito dinâmica, ou seja, o tipo de proteína envolvida pode mudar em resposta a vários estímulos. Dentro do núcleo, esses mRNPs estão envolvidos em vários processos, tais como transcrição, *splicing*, processamento e exportação do transcrito do núcleo para o citoplasma. Uma vez que o mRNA sai do núcleo, ocorre um remodelamento desses complexos, controlando transporte, localização, tradução, estabilidade, estocagem e degradação dos mRNAs.

Um número crescente de estudos em diversos organismos, utilizando ferramentas de genômica como microarraios ou seqüenciamento em larga escala, revelou que proteínas de ligação a RNA (RBPs) se ligam especificamente a grupos distintos de mRNAs que geralmente codificam proteínas relacionadas funcionalmente durante o crescimento e diferenciação celulares. Essa aparente coordenação, especialmente em nível de estabilidade e tradução dos mRNAs, deu base à teoria dos *RNA Regulons* ou *operons* pós-transcricionais de mRNAs (KEENE, 2007), segundo a qual fatores atuando em *trans* (proteínas, pequenos RNAs ou metabólitos) regulam de forma combinatorial múltiplos mRNAs de maneira coordenada, permitindo à célula respostas ágeis a mudanças ambientais – figura 4 (KEENE e TENENBAUN, 2002; KEENE e LAGER, 2005). Dentro destes complexos, os elementos *trans* interagem com elementos regulatórios presentes nos mRNAs, denominados USERs (*Untranslated Sequence Elements for Regulation*). *Regulons* pós-transcricionais já foram descritos em leveduras, *Drosophila* sp. e células de mamíferos (KEENE, 2007) e, possivelmente, os exemplos mais estudados são os membros da família de proteínas de ligação a RNA Pumilio (PUFs) em leveduras. Gerber, Herschlag e Brown (2004) realizaram um estudo sobre cinco membros da família PUF (PUF1-5) em leveduras e descobriram que cada uma delas se liga a subpopulações distintas de mRNAs que codificam proteínas com funções relacionadas. Desta forma, tais dados demonstram que os mRNAs não são regulados ao acaso, por eventos aleatórios no núcleo e citoplasma, mas são membros de complexos altamente organizados que possuem função desde o

momento da transcrição do mRNA até a estabilidade da proteína. Entretanto, como tal coordenação por RBPs tem impacto sobre a expressão gênica nos níveis de mRNA e proteína é uma questão a ser elucidada.

Uma vez que em tripanosomatídeos a transcrição é policistrônica e os genes de uma mesma unidade policistrônica podem apresentar diferenças significativas em seu nível de expressão, *regulons* de mRNAs parecem ser bons candidatos para regulação gênica nestes organismos (OUELLETTE e PAPADOPOULOU, 2009). Como já mencionado anteriormente, as proteínas de ligação a RNA possuem um papel muito importante na regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos e isso pode ser evidenciado pela grande quantidade de RBPs nos seus genomas, principalmente quando comparada aos genomas de outros eucariotos unicelulares (ARCHER *et al.*, 2009).

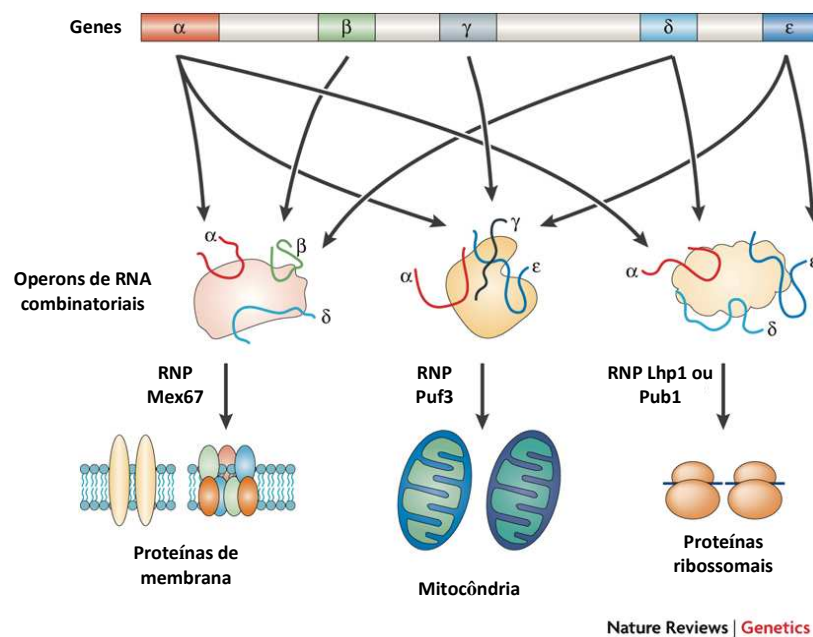


Figura 4 – Genes eucarióticos dispersos produzem transcritos que são, então, montados em complexos RNPs. mRNAs, que estão associados com cada complexo RNP específico, são traduzidos para formar complexos proteína-proteína. Entretanto, quatro RBPs de levedura – a proteína de exportação Mex67, a proteína Pumilio Puf3, Pub1 e Lhp1 – têm mostrado associação com grupos únicos, mas também com grupos sobrepostos de transcritos, tais como aqueles envolvidos na biogênese de membrana e de ribossomos. Este resultado ilustra a propriedade combinatorial e a dinâmica de *operons* de RNA pós-transcricionais (adaptado de KEENE, 2007).

Em *T. cruzi*, foram relatados alguns exemplos de RBPs que podem atuar como operons pós-transcricionais como consequência da ligação a mRNAs específicos. Um exemplo foi mostrado durante a caracterização de membros da família PUF (Pumilio) que tem sido extensivamente estudada em tripanosomatídeos.

A superexpressão de TcPUF6 em *T. cruzi* seguida de análises por microarranjo permitiu uma análise comparativa de RNA entre parasitas controle e transfectado. Este estudo mostrou que a superexpressão de TcPUF6 teve um efeito significativo na expressão gênica geral. Interessantemente, alguns dos genes afetados codificam proteínas de ligação a RNA, várias quinases e proteases, indicando a existência de redes regulatórias pós-transcricionais e pós-traducionais interconectadas em *T. cruzi*. Uma determinada RBP também pode mostrar funções biológicas diferentes dependendo de quais proteínas estejam associadas em um complexo mRNP. Assim, este estudo também sugeriu que interações entre TcPUF6 e TcDHH1, uma proteína helicase com domínio DEAD-box associada com *P-bodies*, resultou na desestabilização e, conseqüentemente, na degradação de mRNAs em formas epimastigotas. Pelo contrário, a ausência dessa interação estabiliza os mRNAs associados em tripomastigotas metacíclicos (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008). Em *T. brucei*, proteínas PUF também estão envolvidas no controle da estabilidade de mRNAs. Durante o ciclo celular, TbPUF9 estabiliza os transcritos alvo durante a fase S e, quando realizado seu *knockdown*, estes transcritos são desestabilizados e há um acúmulo de células na fase G2/M (ARCHER *et al.*, 2009). Outra proteína em *T. brucei*, TbDRBD3, se liga a um conjunto de mRNAs regulados durante o desenvolvimento e que codificam proteínas de membrana e essa associação promove a estabilização desses alvos (ESTEVEZ, 2008).

Estudos genômicos recentes em *T. brucei* demonstraram a presença de diversos *clusters* de genes corregulados. Embora muitos dos genes dentro destes *clusters* apresentem funções diversas, uma parte deles apresenta funções relacionadas e seus padrões de expressão apresentam consistência com o contexto biológico do parasita, como a repressão de proteínas envolvidas com maquinaria traducional durante a transição entre duas formas sanguíneas do *T. brucei* e superexpressão na transição da forma sanguínea para o procíclico (KABANI *et al.*, 2009; JENSEN *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2009).

Não obstante, a regulação pós-transcricional de um determinado gene não será baseada em um único fator *trans* na maioria dos casos, mas irá depender de uma combinação de tais fatores tanto competindo pelos mesmos elementos *cis* quanto se ligando a diferentes elementos. É improvável que quaisquer dois mRNAs distintos sejam regulados exatamente pelos mesmos fatores *trans*. A presença de vários níveis adicionais de controle pós-transcricional, tais como *splicing*, exportação do

núcleo para o citoplasma, modificações pós-traducionais, sugere que a regulação global é mais complexa. Além disso, as RBPs podem mostrar diferentes afinidades e especificidades com relação aos RNAs alvo e podem ainda mediar interações proteína-proteína através de domínios específicos, fazendo delas reguladores versáteis da expressão gênica. Por último, mas não menos importante, a observação mais interessante a respeito das proteínas de ligação a RNA em tripanosomatídeos é o fato de que a maioria delas não possui até agora ortólogos identificados em outros eucariotos, proporcionando um potencial considerável para descobrir novas vias incomuns.

Apesar de numerosos exemplos ilustrando a importância do controle pós-transcricional nos níveis de mRNA e na eficiência traducional em *T. cruzi* e apesar dos dados genômicos demonstrarem a abundância de seqüências que codificam RBPs, poucos estudos publicados forneceram evidências para o papel de uma RBP controlando a expressão gênica em *T. cruzi*. Análises proteômicas recentes de complexos que se ligam a mRNAs poliadenilados em *T. cruzi* identificaram proteínas que sabemos estar envolvidas no metabolismo de RNA, como PABP1, CCR4, CAF1, NOT1, TIA-1 like, TcUBP1, TcPUF6 e TcDHH1. Os complexos protéicos que contêm estas proteínas interagem com mRNAs derivados de epimastigotas em fase exponencial de crescimento ou em epimastigotas sob estresse nutricional. Durante o estresse, alterações nestes complexos protéicos podem mediar a estocagem ou degradação de mRNAs para reduzir suas taxas de tradução (ALVES *et al.*, 2010). Dentre o número limitado de RBPs envolvidas no metabolismo de RNA de *T. cruzi* que foram caracterizadas podemos citar PABP, TcUBP1, SLRBP, proteínas Pumilio, proteínas dedo-de-zinco e TcDHH1 (revisito por ARAÚJO e TEIXEIRA, 2011). Sabe-se que os complexos mRNPs contêm não só proteínas de ligação a RNA, mas, também, várias outras proteínas com diferentes funções.

Dentre os resultados obtidos por Alves e colaboradores (2010), foram identificadas duas proteínas ainda não caracterizadas, contendo regiões ricas em glutamina (Q) (ALVES *et al.*, 2010). Estas regiões ricas em glutamina nos remeteram à proteína ataxina. Ataxina-2 é uma proteína, normalmente com um domínio de 22 resíduos consecutivos de glutamina (Q), que pode expandir até 32 resíduos, causando uma doença neurodegenerativa denominada ataxia espinocerebelar tipo 2 (SCA2). Estudos mostraram que a proteína ataxina-2 interage diretamente com a proteína de ligação à cauda poli-(A) (PABP), se associando, assim, com os

polissomos sob condições normais (SATTERFIELD e PALLANCK, 2006) e sendo recrutada para grânulos de estresse sob condições de estresse (NONHOFF *et al.*, 2007). Todos esses dados, em conjunto com a presença de domínio Lsm na proteína ataxina-2, sugerem que esta proteína esteja envolvida no processamento de mRNA e/ou na regulação da tradução (RALSER *et al.*, 2005; TADAUCHI *et al.*, 2004). Foi realizada, então, uma busca no banco de dados de *T. cruzi* por seqüências similares à desta proteína, através de BLASTp, utilizando a seqüência aminoacídica da ataxina-2 (ATXN2) de humano. Através desta análise, foi identificada uma proteína com similaridade à ataxina-2. Decidimos, então, investigar o papel desta proteína em *T. cruzi*, mesmo não estando presente nos dados de Alves e colaboradores (2010).

Levando em consideração a associação das proteínas ricas em glutamina com mRNPs e as evidências do envolvimento da ataxina-2 no metabolismo de RNA em outros organismos, o objetivo deste trabalho é caracterizar funcionalmente estas proteínas e determinar se as mesmas estão envolvidas em mecanismos de regulação da expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi identificar e caracterizar funcionalmente uma proteína rica em glutamina em *T. cruzi* e avaliar o papel desta na regulação da expressão gênica do parasita. Para isso estabelecemos as seguintes metas:

1. Analisar a expressão das proteínas selecionadas durante a metaciclo gênese de *T. cruzi* utilizando anti-soros policlonais contra as mesmas;
2. Analisar a localização subcelular destas proteínas através de ensaios de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão;
3. Caracterizar o perfil de sedimentação das proteínas em gradientes de sacarose;
4. Identificar os mRNAs alvos de regulação por estes genes através de ensaios de ribonômica através de sequenciamento de RNA em larga escala;
5. Determinar se a proteína TcGAP2 se liga diretamente a RNA através de ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA);
6. Analisar possíveis interações da proteína TcGAP2 com demais proteínas nas células através de ensaios de imunoprecipitação com anticorpos e identificar o conteúdo protéico do imunocomplexo por espectrometria de massas;
7. Avaliar a viabilidade da manipulação por nocaute dos genes *TcGAP2* e *TcWW* de *T. cruzi* por recombinação homóloga.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência dos reagentes e materiais

Soluções e meios de cultura

Cultivo de *T. cruzi*

Clonagem e expressão dos genes

Produção de anticorpos policlonais

Análises por *Western blotting*

Ensaio de sedimentação em gradientes de sacarose

Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação

Ensaio de imunolocalização por fluorescência indireta

Marcação *in situ* da rede de kDNA

Imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão

Ensaio de imunoprecipitação para a análise de mRNAs associados à proteína TcGAP2 - ribonômica

Ensaio de mudança na mobilidade eletroforética (EMSA)

Ensaio de imunoprecipitação para a análise de proteínas associadas a TcGAP2

Caracterização funcional de proteínas por abordagens de genética reversa – nocaute gênico

3.1. PROCEDÊNCIA DOS MATERIAIS E REAGENTES

Amersham-Pharmacia Biotech: dNTPs; inibidores de proteases; RNase H.

Amersham Bioscience: membranas Hybond de nitrocelulose e de nylon, filmes de raio-X Hyperfilm[®], anticorpo monoclonal anti-histidina, endonucleases de restrição, resina de glutationa sefarose.

Applied Biosystems: kit Big Dye[™] Terminator Ready Reaction Mix.

Appligene: proteinase K.

BioRad: acrilamida, agarose; azul de bromofenol; bis-acrilamida, persulfato de amônia, xilenocianol.

Cult-lab: soro fetal bovino.

Difco: extrato de levedura; infuso de fígado; triptose.

Invitrogen: anticorpos secundários Alexa 488 e Alexa 546; agarose, X-gal, marcador de massa molecular Benchmark, BP Clonase[™] enzyme mix; Dapi; DTT; EDTA; fenol, hexâmeros aleatórios; IPTG, kit Nick Translation, LR Clonase[™] enzyme mix; Platinum[®] Pfx DNA Polimerase; Platinum[®] Taq DNA Polimerase; Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity; RNaseOUT[™]; sacarose; Superscript[™] II; Taq DNA polimerase.

Merck: acetato de sódio; ácido acético glacial; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de amônia; cloreto de cálcio; cloreto de lítio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; etanol absoluto; formaldeído, fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; glicina, hidróxido de sódio; isopropanol,

maltose; SDS; sulfato de amônia; sulfato de magnésio.

Microbiológica: hemina.

Millipore: filtro 0,22 µm.

New England Biolabs: endonucleases de restrição, 1kb Plus DNA ladder.

Promega: fosfatase alcalina; transcritase reversa (ImProm-ITM Reverse Transcriptase); NBT; BCIP.

Qiagen: kit RNeasy®, QIAprep Spin Miniprep; QIAprep Spin Midiprep; coluna de Ni-NTA (nitrilo-triacetic acid - QIAexpress System).

Serva Electrophoresis: Alu-gel S.

Sigma-Aldrich: membranas de diálise.

Sigma: ácido L-aspártico; ácido L-glutâmico; adjuvante completo de Freund, ampicilina; β-mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; cloranfenicol; DEAE26 celulose; DEPC; DMSO; E-64; ficoll; glicerol, heparina; hepes; imidazol; IPTG; kanamicina; L-prolina; NP-40; n-propil-galato; paraformaldeído; PMSF; poli-L-lisina; Ponceau-S; proteína A sepharose; proteína G sepharose; puromicina; triton X-100; tween 20.

Syntec: cetamina.

TPP: garrafas para cultivo de células.

USB: sacarose; ureia.

Vetbrands: xilasina.

Vetec: glicina.

3.2. SOLUÇÕES

Fenol – clorofórmio – álcool isoamílico: fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 10 partes.

H₂O: a água utilizada em todos os procedimentos foi proveniente do sistema de filtragem milli-Q (Millipore). A água utilizada para procedimentos com RNA foi tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

PBS: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄; 4,3 mM Na₂HPO₄.7H₂O e 137 mM NaCl.

Solução de bloqueio para *Western blotting*: PBS, 0,1% tween 20, 5% leite em pó desnatado.

Solução de brometo de etídeo: solução 5 µg/mL de brometo de etídeo em água destilada.

Solução de glutatona reduzida: 30 mg de glutatona em 10 mL de 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

Solução de hibridação para *Southern blotting*: SSC 6X, solução de Denhardt 5X, 0,1% SDS, 100 µg/mL DNA fita simples de esperma de salmão.

Solução de lise para eletroforese em campo de pulsos alternados: 0,5 M EDTA pH 9,0, 1% sarcosil, 0,5 mg/mL proteinase K.

Solução de Ponceau S: 0,5% Ponceau S (Sigma P-3504), 1% ácido acético glacial.

Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: 0,1% azul de Coomassie R-250 em metanol/ácido acético v/v (45%:10%), água q.s.p.

Solução PSA 2%: 75 mM fosfato de sódio pH 8,0, 65 mM NaCl e agarose *Low Melting* (p/v).

Solução PBS-tween 20 0,1%: PBS contendo 0,1% de Tween 20.

Solução PSG: 75 mM fosfato de sódio pH 8,0, 65 mM NaCl, 1,5% glicose.

Solução TE (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA.

Tampão de amostra de proteínas: 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol, 0,005% azul de bromofenol.

Tampão de *crosslink*: 0,02 de DMP (dimetil pielimidato) em tampão de lavagem para *crosslink*

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE: 25 mM Tris-HCl pH 8,4, 192 mM glicina pH 8,4, 0,1% SDS.

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: 140 mM NaCl, 25 mM HEPES ácido, 0,74 mM Na₂HPO₄ pH 7,5.

Tampão de eluição: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 300mM imidazol, 8 M uréia.

Tampão de lavagem: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol e 8 M uréia.

Tampão de lavagem para *crosslink*: 0,2 M de trietanolamina pH 8,0 em PBS.

Tampão de lise: 10 mM TrisHCl pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 10 mM NaCl e 5 mM β-mercaptoetanol (TKM mais 10% NP-40 e 2 M de sacarose – para gradiente de sacarose)

Tampão de lise IMP1: 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes pH 7,0 e 0,5% NP-40.

Tampão de lise para proteômica: 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 10 mM Hepes pH 7,0.

Tampão de parada para *crosslink*: 0,05 M etanolamina pH 8,0 em PBS.

Tampão de purificação de proteínas: 2% triton X-100, 100 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 M ureia.

Tampão de revelação para fosfatase alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂.

Tampão de solubilização de proteínas: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M ureia.

Tampão de sonicação de proteínas: 500 mM NaCl, 2% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8,0.

Tampão de transferência para *Western Blotting*: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol.

Tampão NKM: 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,4, 10 µg/mL cicloheximida; 20 U/mL heparina.

Tampão SSC 20x: 0,3 M citrato de sódio pH 7,0, 3 M NaCl.

Tampão TBE para eletroforese de DNA (Tris-ácido bórico-EDTA): 89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8,0.

Tampão TELT: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9,0, 2,5 M LiCl, 4% Triton X-100.

Tampão TKM: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 300 mM KCl.

Tampão TKM-P: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2mM MgCl₂, 500 mM KCl.

TF (tampão de amostra para DNA – Ficoll 10x): 25% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em tampão TBE 1x.

TG (tampão de amostra para DNA – Glicerol 6x): 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol.

3.3. MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani): 10 g/L bacto-triptona, 5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura.

Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*): 15 g/L extrato de levedura; 11,56 g/L fosfato dibásico de sódio; 2,2 g/L glicose; 0,02 g/L hemina; 5 g/L infuso de fígado; 0,4 g/L KCl; 4,4 g/L NaCl; 10% soro fetal bovino (v/v) e 5 g/L triptose. pH 7,2 ajustado com HCl.

Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): 2 mM CaCl₂; 17 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 190 mM NaCl; 8mM tampão fosfato pH 6,0.

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com 2 mM ácido L-aspártico, 50 mM ácido L-glutâmico, 10 mM L-prolina e 10 mM glicose.

3.4. CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho, foram utilizadas células do clone *Dm28c* de *T. cruzi* isolado de *Didelphis marsupialis* (CONTRERAS *et al.*, 1988; GOLDENBERG *et al.*, 1984), obtidas em diferentes etapas do processo de metaciclogênese *in vitro*. A metaciclogênese, processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, foi descrita por Contreras e colaboradores (1985) e consiste em um sistema de diferenciação celular que utiliza meio quimicamente definido capaz de estimular a metaciclogênese pela simulação das condições físico-químicas encontradas na porção final do intestino do inseto triatomíneo, resultando em parasitas com as mesmas propriedades biológicas encontradas nos parasitas diferenciados no inseto. Devido à ausência de replicação neste sistema, é possível obter parasitas em diferentes etapas do processo de diferenciação celular, possibilitando desta forma o estudo dos mecanismos que modulam a expressão de genes estágio-específicos ao longo do processo.

3.4.1. Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento

A cultura axênica de *T. cruzi* é mantida em meio LIT suplementado com 10% de SFB a 28 °C e, a cada três dias, é repicada em um inóculo de 1×10^6 células/mL. As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento são obtidas após 72 horas de cultivo, onde a densidade celular é de aproximadamente 2 a 3×10^7 células/mL. Estas condições foram estabelecidas de acordo com a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28 °C (CAMARGO, 1964).

3.4.2. Epimastigotas sob estresse nutricional

As formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento, ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente 5×10^7 células/mL, são centrifugadas a $7.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Após a centrifugação, as células são submetidas a estresse nutricional sendo mantidas em meio TAU, na concentração de 5×10^8 células/mL, por duas horas a 28°C (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.4.3. Epimastigotas em diferenciação, aderidos ao substrato

Após o estresse nutricional (item 3.4.2), 1×10^9 células são inoculadas em garrafas de 300 cm^2 contendo 200 mL de meio TAU3AAG, numa concentração de 5×10^6 células/mL, e incubadas a 28°C por 24 horas. Durante este período, os parasitas aderem-se às paredes das garrafas de cultivo. Para obtenção das células aderidas, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as formas epimastigotas em diferenciação foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura em 10 mL de tampão NKM (BONALDO *et al.*, 1988).

3.4.4. Tripomastigotas metacíclicos

As formas tripomastigotas metacíclicas, ou simplesmente metacíclicos, são obtidas pela incubação das formas epimastigotas estressadas em meio TAU3AAG, na concentração de 5×10^6 células/mL, por 96 horas a 28°C . Nestas condições e sem agitação, as formas epimastigotas aderem-se ao substrato e diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas que aparecem livres no sobrenadante da cultura. Ao final das 96 horas, é possível observar que 80 a 90 % das células neste sobrenadante são tripomastigotas metacíclicos (BONALDO *et al.*, 1988). As formas diferenciadas podem, então, ser purificadas. As células são concentradas por

centrifugação – 10.000 x g por 10 minutos a 10°C – ressuspensas em solução de PSG e purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) equilibrada em PBS (DE SOUZA, 1984). Esta purificação é possível já que a carga líquida da membrana dos metacíclicos é mais negativa do que a de formas epimastigotas. Para os ensaios de imunofluorescência, a etapa de purificação não foi realizada, permitindo a comparação das formas epimastigotas em diferenciação com as formas metacíclicas.

3.4.5. Extratos protéicos de *T. cruzi*

As proteínas totais foram extraídas das formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, epimastigotas aderidas ao substrato, metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas de cultura. Para isso, 2×10^8 células de cada etapa de diferenciação foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 4°C e lavadas três vezes em PBS seguidos pelos mesmos passos de centrifugação. As células foram homogeneizadas em 150 µL de PBS, sobre os quais foram adicionados 50 µL de tampão de amostra de proteínas. As amostras foram fervidas por 5 minutos e submetidas a dois pulsos de sonicação – potência 2 por 10 segundos (homogeneizador 4710 – Cole Parmer). As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes contendo o extrato protéico de 10^6 células/µL foram transferidos para novos tubos e armazenados à -80 °C até o momento do uso.

3.4.6. Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

O protocolo segue a descrição de Medina e colaboradores (1993) onde 2×10^9 parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a 7.000 x g por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS e suspensas em 10 mL de tampão TELT (sem agitação). Após 5 minutos de incubação, 10 mL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado e a suspensão foi centrifugada a 13.000 x g por 5

minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Esta etapa foi repetida quantas vezes necessárias até que não houvesse uma interface proteica muito evidente. Após isso, foram adicionados três volumes de etanol absoluto à fase aquosa e a suspensão foi centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos e o DNA precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%. O DNA foi incubado a 50°C para secar e foi ressuspendido em 50 µL de solução TE. A solução foi tratada com uma concentração final de 10.000 µg/mL de RNase A a 37°C por 30 minutos e foi mantida a 4°C para uso posterior.

3.5. CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE

3.5.1. Amplificação dos genes

Os iniciadores para os genes selecionados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Select* e *Protean (Laser Gene, DNA Star)* e estão listados em anexo. Para a amplificação dos genes, foram testadas diferentes temperaturas e concentrações de reagentes objetivando o melhor desempenho das reações de PCR. As condições de amplificação determinadas para o gene GAP2 foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 50 µL contendo 15 pmol de cada um dos iniciadores, tampão *Accume Primer Pfx* e a enzima *Platinum[®] Pfx DNA Polimerase* diluídos conforme recomendado pelo fabricante. A ciclagem consistiu de um passo inicial de dois minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C e um minuto e meio a 68 °C. Para os genes 661 e ATXN2, foram amplificadas regiões menores para produção de anticorpos. As condições de amplificação para a região selecionada do gene 661 foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 20 µL contendo 3 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, tampão e *Platinum[®] Taq DNA Polymerase*. A ciclagem consistiu de um passo inicial de dois minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C para 661 e a 60°C para ATXN2 e um minuto de extensão a 68°C. Para a região selecionada do gene ATXN2, as condições foram as mesmas

descritas para 661, porém a temperatura de anelamento foi aumentada para 62°C. Para ATXN2, também foi amplificado o gene inteiro para clonagem em vetores de expressão em *T. cruzi*. Para isso, as condições de amplificação foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em um volume final de 50 µL contendo tampão HIFI, 200 µM de cada dNTP, 2 mM MgSO₄, 10 pmol de cada primer e 1 U de Platinum[®] Taq High Fidelity. A ciclagem consistiu de um passo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 2 minutos a 68°C. Uma alíquota de 5 µL de cada reação foi misturada com tampão de amostra de DNA e analisada em gel de agarose 1% em tampão TBE a fim de se determinar o rendimento e a especificidade da reação.

Para retirar pequenos fragmentos de DNA sintetizados e os iniciadores empregados, provenientes do processo de PCR, foi utilizada a purificação com PEG (30% PEG 8000, 30 mM MgCl₂). Ao produto de PCR, foram adicionados quatro volumes de solução TE e, em seguida, acrescentou-se o PEG 50% v/v. As soluções foram completamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi incubado a 60°C por, no mínimo, 15 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 10 µL de solução TE. Após este processo de purificação, as amostras foram dosadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.5.2. Vetores

Os produtos dos genes selecionados, após purificação, foram clonados em vetores do sistema de clonagem comercial Gateway[®] (Invitrogen), cuja tecnologia é baseada em recombinação utilizando seqüências sítio-específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989), possibilitando uma rápida e eficiente análise funcional das proteínas de interesse. O sistema Gateway[®] permite que, a partir do clone de entrada, seja feita a passagem do inserto, de forma rápida e eficiente, para um segundo vetor, denominado de destino, que pode ser dos mais variados tipos, de acordo com a necessidade de caracterização funcional (figura 5).

Para gerar um clone de entrada, é necessário que ocorra recombinação entre os sítios específicos *attB* (*attachment*), inseridos nos produtos de PCR, e *attP* do vetor pDONRTM221 (figura 5 – à esquerda), dando origem aos sítios *attL*, no vetor, e *attR*, no produto intermediário (figura 6A). A enzima utilizada nesta reação é composta por uma integrase do bacteriófago lambda (*Int*) e um fator de integração ao hospedeiro de *Escherichia coli* (IHF) (*BP ClonaseTM enzyme mix*). A transferência do inserto para o vetor de destino é facilitada pela recombinação dos sítios *attL* presentes no clone de entrada com os sítios *attR* do vetor (*LR ClonaseTM enzyme mix*), originando o clone de expressão (figura 6B). Essas reações são específicas e direcionais. O vetor pDESTTM17 foi escolhido como vetor de expressão o qual é apropriado para a expressão heteróloga da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada a uma seqüência de seis histidinas em sua extremidade N-terminal (figura 5 - meio). Para a expressão de proteína solúvel, foi escolhido o vetor pDESTTM15 o qual fusiona uma etiqueta GST (glutathione-S-transferase) em sua extremidade N-terminal à proteína de interesse em *E. coli*, permitindo uma maior solubilidade da proteína expressa (figura 5 – à direita).

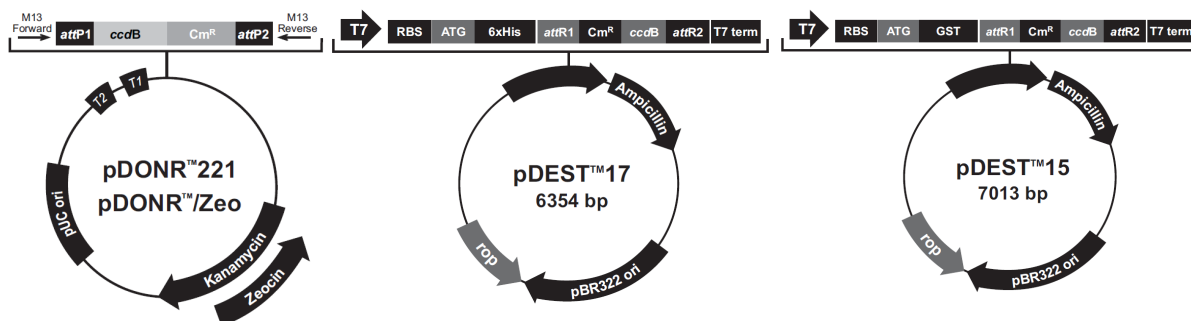


Figura 5 - Mapa dos vetores utilizados. À esquerda: vetor pDONRTM221 e, em destaque, o sítio de inserção do gene com os adaptadores *attP1* e *attP2*, que permitem a recombinação com os adaptadores *attB1* e *attB2* do gene, e o gene *ccdB*; No meio: vetor de expressão pDESTTM17, destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a seqüência codificadora de 6 histidinas, sítios *attR* que recombinam com os sítios *attL* dos clones de entrada e gene *ccdB*. À direita: vetor de expressão pDESTTM15, com as mesmas características do vetor pDESTTM17, porém a etiqueta de histidinas foi substituída pela de GST. Fonte: manual Gateway[®] Technology - Invitrogen.

3.5.3. Obtenção dos clones de entrada

A inserção dos produtos de PCR no vetor pDONRTM221, denominada reação BP, foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase Enzyme*

mix). A reação que continha 150 ng do produto de PCR com o sítio *attB*, 150 ng do plasmídeo pDONRTM221, num volume final de 8 µL completados com TE, e 1 µL de *BP ClonaseTM enzyme mix* foi incubada a 25°C por 16 horas. Após esta etapa, foi adicionado 0,5 µL de proteinase K e a reação foi incubada por 10 minutos a 37°C.

Após a conclusão dessa etapa, os clones em pDONRTM221 foram transformados em células cálcio-competentes *E.coli* da linhagem DH5α. Para tanto, 2 µL da reação BP foi adicionada a 50 µL de células cálcio-competentes. Estas células permaneceram no gelo por 30 minutos e, em seguida, foram incubadas a 42° C por 2 minutos, sendo colocadas novamente no gelo por um minuto. Após a transformação, foi adicionado 1 mL de meio LB sem antibióticos e as células foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 37°C por uma hora. Em seguida, a cultura foi semeada em placa de LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas a 37° C durante 16 horas.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foram feitas PCR de colônia, seguindo o protocolo do fabricante da enzima Taq polimerase (Invitrogen). As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas por 16 horas a 37° C sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada com o kit QIAprep[®] *Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante seguindo o protocolo para uso em microcentrífuga.

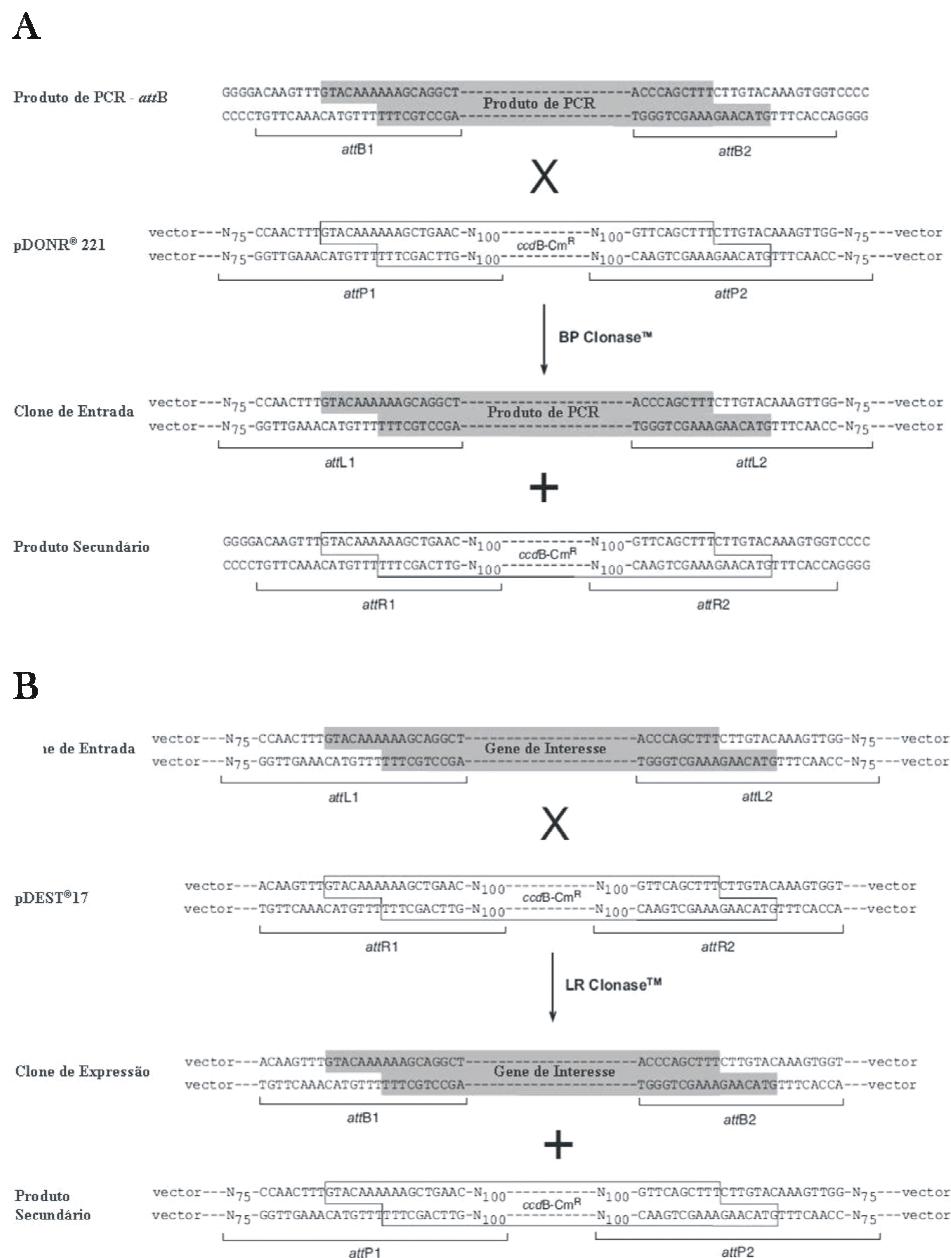


Figura 6 - Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway[®]. A) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attB* e *attP*, para a obtenção do clone de entrada. pDONR[™]221 é um dos vetores disponíveis para entrada na plataforma Gateway[®]. B) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attL* e *attR*, para a obtenção do clone de expressão. pDEST[™]17 foi usado como exemplo de vetor de destino. Fonte: adaptado do Manual Gateway[®] Technology - Invitrogen.

3.5.4. Obtenção dos clones de expressão

A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway LR clonase*

Enzyme mix). Para isso, 150 ng do vetor de entrada pDONRTM221 contendo o gene de interesse foram adicionados a 150 ng do vetor pDESTTM17, ou vetor pDESTTM15. O volume final da reação foi ajustado para 10 µL com TE e foi adicionado 1 µL de *LR ClonaseTM enzyme mix*. A reação foi incubada a 25°C por 16 horas. Após esta etapa, foi adicionado 0,5 µL de proteinase K (2 µg/µL) e a reação foi incubada por 10 minutos a 37°C.

Células cálcio-competentes de *E. coli* da linhagem DH5α foram transformadas com o produto da recombinação, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de LB contendo ampicilina (100 mg/L) e incubadas a 37 °C durante 16 horas.

A verificação de clones de destino positivos foi realizada através de PCR de colônias conforme descrito anteriormente. As colônias selecionadas foram estriadas em placa de LB contendo ampicilina (100 µg/mL), a qual foi incubada a 37° C durante 16 horas. Para a obtenção dos plasmídeos, uma colônia de cada placa referente a cada um dos genes foi selecionada e inoculada em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito anteriormente.

O seqüenciamento dos clones obtidos foi realizado de acordo com as especificações do kit BigDyeTM terminator utilizando o sequenciador *Automatic sequencer 3730xl* (Applied Biosystems), através de serviço prestado pelo Instituto Pasteur Korea.

3.5.5. Expressão e purificação das proteínas recombinantes para obtenção de soros policlonais

A expressão das proteínas foi feita primeiramente em pequena escala a fim de se otimizar as condições de expressão e verificar a solubilidade das mesmas. Assim, células da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas com o vetor pDESTTM17 contendo o gene de interesse, em fase logarítmica de crescimento (DO_{600nm} entre 0,6 - 0,8), foram induzidas através da adição de concentrações variáveis de IPTG e incubadas a 37°C. Uma vez estabelecidas as condições mais favoráveis, a expressão foi realizada em maior escala. As células foram crescidas

em 200 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e, quando atingiram a fase logarítmica de crescimento, foram induzidas com 1 mM de IPTG e mantidas a 37 °C sob agitação (200 rpm) por três horas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada desta cultura antes da adição de IPTG para servir como controle negativo. Após este período, a cultura foi centrifugada a 6.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado em tampão de sonicação de proteínas e sonicado por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto em potência 8 (*Ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer*). Após a lise, as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C para a obtenção das frações denominadas solúveis e insolúveis. A fração solúvel é constituída pelo sobrenadante obtido após a centrifugação, a qual foi armazenada a -20 °C. O sedimento foi ressuspensionado em tampão de purificação de proteínas e lavado mais uma vez com esse mesmo tampão. Em seguida, foi ressuspensionado em tampão de solubilização e, em seguida, sonicado e centrifugado conforme descrito acima. O sobrenadante desta centrifugação foi denominado fração insolúvel e armazenado a -20°C. Alíquotas das frações (solúvel, insolúvel e controle não-induzido) foram analisadas em gel SDS-PAGE conforme descrito por Laemmli (1970). O gel SDS-PAGE com estas amostras foi corado com solução de coloração contendo Coomassie-blue ou transferido para uma membrana de nitrocelulose para ensaios de *Western blotting*.

A clonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pDESTTM17 possibilitou a inserção de um resíduo de 6 histidinas na porção amino-terminal das proteínas. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA. O NTA interage com os íons (Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺) e estes com a cauda de histidinas. A eluição das proteínas foi obtida pela adição de imidazol, um análogo estrutural da histidina, que se liga à resina de Ni-NTA deslocando a proteína.

A coluna de afinidade contendo 1 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) foi lavada e equilibrada com 10 volumes de tampão de solubilização de proteínas. Feito isso, a solução de proteína solubilizada (proveniente da fração insolúvel descrita acima) foi aplicada na coluna. Esta mistura foi incubada por 16 horas a 4°C ou uma hora em temperatura ambiente em agitador orbital. Após a incubação, a solução contendo as proteínas que não se ligaram à resina foi recolhida, sendo denominada *flow through* (FT). Para retirar proteínas contaminantes da resina, foram feitas cinco lavagens com 10 mL de tampão de lavagem e a amostra proveniente da primeira e da

segunda lavagem foi armazenada para verificar a qualidade do processo de purificação. Para eluir a proteína de interesse, foram adicionados 500 µL de tampão de eluição à resina e este processo foi repetido por mais 5 vezes. Todas as amostras - alíquotas do FT, dos lavados e dos eluídos - foram analisadas em gel SDS-PAGE, posteriormente corado com solução de coloração contendo Coomassie, e armazenadas a -20 °C.

Para obter proteínas recombinantes com maior grau de pureza, as frações eluídas com imidazol foram aplicadas em gel SDS-PAGE preparativo. A concentração de acrilamida utilizada variou entre 10 e 15% dependendo do tamanho esperado das proteínas, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel. Após a corrida, o gel foi corado com 100 mM KCl previamente resfriado e a banda referente à proteína de interesse foi removida. Para retirar a proteína desejada da matriz do gel de acrilamida, foi utilizado o processo de eletroeluição. A banda foi colocada em uma membrana de diálise (Sigma-Aldrich) com aproximadamente 1 mL de tampão de SDS-PAGE. Feito isto, as membranas com as extremidades seladas foram colocadas dentro de uma cuba eletroforética contendo tampão de eletroforese para SDS-PAGE e submetidas a uma corrente de 50 mA por 2 horas. Após este período, o líquido presente dentro da membrana foi coletado e foi realizada uma segunda etapa de eletroeluição. A concentração de proteína foi dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) no equipamento Qubit® *fluorometer* (Invitrogen).

3.5.6. Expressão e purificação da proteína TcGAP2 solúvel

Células da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o vetor pDESTTM15 contendo o gene de interesse como descrito 3.5.4. Após o crescimento em meio seletivo e confirmação por PCR de colônia, as bactérias que apresentavam o inserto em questão foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas por 16 horas a 37°C e sob agitação constante. A partir desse pré-inóculo, um inóculo na diluição de 1:50 foi feito, incubado nas mesmas condições e monitorado até a densidade ótica em 600 nm alcançar valores entre 0,4 e 0,6. Antes da indução, as bactérias sofreram choque térmico (em gelo) e adição de etanol numa concentração final de 3% para aumentar a produção de chaperonas capazes

de dobrar mais eficientemente as proteínas. Após uma hora nestas condições sem agitação, foi adicionado IPTG a uma concentração de 0,1 mM para induzir a expressão da proteína. A cultura foi mantida sob agitação (180 rpm) a 25°C por 16 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 7.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento bacteriano foi ressuscitado em PBS contendo inibidor de proteases (1 mM PMSF) e sonicado em gelo por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de um minuto em potência 8 (*Ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer*). Após a lise, as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C para a obtenção das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). A fração insolúvel foi suspensa em PBS e sonicada nas mesmas condições acima. Alíquotas das frações (solúvel, insolúvel e controle não induzido) foram analisadas em gel SDS-PAGE. Em paralelo, foi realizada a indução da expressão de GST apenas, para servir de controle para experimentos seguintes. Após confirmação da expressão da proteína na fração solúvel através de corrida em gel SDS-PAGE posteriormente corado com *Coomassie blue*, a mesma foi purificada utilizando resinas diferentes, descritas a seguir.

Purificação em resina de Glutathione Sepharose[®] 4B (Amersham Biosciences):

A fração solúvel foi purificada a partir da resina de Glutathione Sepharose[®] 4B que liga especificamente à proteína GST fusionada à proteína de interesse. Cinquenta microlitros de resina foram lavados três vezes com PBS e incubados com a fração solúvel de TcGAP2 por uma hora a 4°C. Após essa incubação, a resina foi centrifugada a 600 x g por um minuto e a fração não ligada (*flow-through*) foi coletada para posterior análise. A resina foi lavada três vezes com 1 mL de PBS cada (lavados 1, 2 e 3). Em seguida, a proteína solúvel foi eluída com 50 µL de solução de glutathione reduzida. Esse passo de eluição pode ser repetido quantas vezes forem necessárias para recuperar o máximo de proteína fusionada à GST; neste caso, foram feitas seis eluições. A resina foi lavada com PBS e a fração eluída foi mantida a -20°C para uso posterior.

Purificação da proteína TcGAP2 com soro anti-TcGAP2 imobilizado em *beads* magnéticas contendo IgG anti-coelho: o anti-soro contra a proteína TcGAP2 (40 µL) foi diluído com PBS-BSA (40 mg/mL) em volume final de 100 µL e incubado por aproximadamente 16 horas a 4°C com 10 µL de *beads* magnéticas contendo IgG anti-coelho, previamente lavada e bloqueada com PBS-BSA (40 mg/mL por 10 minutos), sob leve agitação. Após essa incubação, o tubo foi colocado em uma

estante magnética para retirar os anticorpos não ligados. A resina foi lavada uma vez com PBS-BSA, uma vez com PBS e incubada com tampão de *crosslink* por 30 minutos sob leve agitação. Após essa incubação, os tubos foram colocados na estante magnética para retirar o tampão de *crosslink* e a resina foi lavada com tampão de lavagem para *crosslink* por cinco minutos sob leve agitação. A resina passou por mais dois passos de *crosslink* e lavagens iguais aos descritos acima. Após a terceira lavagem, a reação de *crosslink* foi interrompida com tampão de parada para *crosslink*, duas vezes de 5 minutos cada sob leve agitação. O excesso de anticorpo não-ligado covalentemente foi retirado com 200 μ L de glicina 0,2 M pH 2,5 por um minuto. O pH foi imediatamente ajustado com três lavagens com Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Esta resina foi guardada a 4°C ou usada em seguida para imunoprecipitar a proteína solúvel GAP2.

A fração contendo a proteína solúvel TcGAP2 foi incubada com a resina preparada como descrito acima por 2 horas em temperatura ambiente sob leve agitação. Os tubos contendo a resina foram colocados em uma estante magnética, o *flow-through* foi coletado e a resina foi lavada três vezes com 1 mL de PBS e duas vezes com 1 mL de Tris-HCl 50 mM contendo 300 mM de NaCl. A proteína solúvel GAP2 foi eluída com concentrações diferentes de sal: 100 μ L de Tris-HCl 50 mM contendo 0,5 M de NaCl seguida de 100 μ L de Tris-HCl 50 mM contendo 1 M NaCl. Uma alíquota de cada fração foi analisada em gel SDS-PAGE.

3.6. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

As proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos da linhagem Swiss. Para a primeira imunização, foram utilizados 50 μ g de cada proteína recombinante recuperada do gel preparativo como descrito anteriormente. A proteína foi diluída em 1 volume do adjuvante Freund completo e administrada por via intraperitoneal em dois camundongos. Dez dias após a primeira inoculação, os animais receberam a segunda dose do antígeno (20 μ g) misturada com 77 μ L de Alu-gel para os dois camundongos. Foram realizadas três inoculações subsequentes com intervalos de dez dias. Após a última inoculação, procedeu-se à coleta do soro. Os animais foram sedados com 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina e o sangue

foi coletado por punção cardíaca. 1 mL de PBS foi utilizado para coleta do lavado peritoneal, após o sacrifício do animal. O sangue foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente e por 15 minutos a 37°C e, em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 2.000 x g, para a obtenção do soro. O sobrenadante foi coletado em outro tubo e o processo de centrifugação foi repetido mais duas vezes. O soro obtido foi aliquoteado e armazenado a -20 °C. Os procedimentos utilizando camundongos neste trabalho foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (em anexo).

Para dispor de uma maior quantidade de soro, a proteína GAP2 foi utilizada para imunização em coelhos. As imunizações em coelhos foram feitas pelo serviço de produção de anticorpos do laboratório de imunologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 100 µg de proteína purificada para cada inoculação em dois animais. Foram realizadas quatro inoculações com intervalos de quatorze dias. Dez dias após a última inoculação, o sangue dos animais foi coletado, aliquoteado e armazenado a -20°C.

Os anti-soros contra as proteínas TcGAP2 produzidos em coelhos foram purificados por meio de incubação com a proteína recombinante previamente transferida para uma membrana de nitrocelulose. Após 16 horas de incubação a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a membrana foi lavada três vezes com PBS-tween 20 0,1%. Os anticorpos ligados à membrana foram eluídos com 200 µL de 0,2 M de glicina pH 2,5 por 2 minutos e o pH da solução foi ajustado para 7 com tampão 1 M Tris-HCl pH 9,5 (20µL). Os anticorpos purificados foram aliquoteados e guardados a -20°C para uso posterior.

3.7. ANÁLISES POR WESTERN BLOTTING

Para os ensaios de *Western blotting* (TOWBIN *et al.*, 1979), aproximadamente 200 ng de proteína recombinante e extrato protéico de epimastigotas equivalentes a 5×10^6 células foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por duas horas a 60 V ou 16 horas por 20 V. Terminada a transferência, a

membrana foi corada com solução de Ponceau para verificar a qualidade da transferência e, em seguida, descorada em água destilada e incubada em solução de bloqueio por uma hora em temperatura ambiente ou por 16 horas a 4 °C. Após essa incubação, a membrana foi colocada em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário (soro policlonal obtido) permanecendo por duas horas a 37 °C e, em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com solução de PBS/Tween 20 0,1%. A membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluído em solução de bloqueio, por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas como descrito acima e, a seguir, foram reveladas com 66 µL de NBT (cromógeno) e 33 µL de BCIP (substrato), diluídos em 10 mL de tampão de revelação para fosfatase alcalina. A reação de revelação foi bloqueada através da lavagem da membrana em 1 mM EDTA e, em seguida, em água.

3.8. ENSAIOS DE SEDIMENTAÇÃO EM GRADIENTES DE SACAROSE

O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através de centrifugação de extratos citoplasmáticos em gradientes de sacarose segundo o protocolo de Holetz e colaboradores (2007). Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e epimastigotas sob estresse nutricional foram incubados com 100 µg/mL de cicloheximida por 10 minutos em temperatura ambiente para estabilização de mRNAs que estão sendo traduzidos. As células foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão TKM suplementado com cicloheximida. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 900 µL de TKM suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida, 10 µg/mL de heparina, 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para novo tubo contendo 100 µL de tampão de lise e homogeneizada por pipetagem. A lise foi monitorada em microscópio. O lisado foi então centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante (500 µL equivalentes 5×10^8 células) foi adicionado no topo de um gradiente de sacarose linear (15-55%) preparado em tampão TKM acrescido dos inibidores já mencionados. O gradiente foi ultracentrifugado a 192.000 x g por 2 horas a 4°C em ultracentrífuga Beckman com rotor SW40.

Para os ensaios de dissociação de polissomos com EDTA, o sobrenadante obtido após a centrifugação do lisado foi tratado com 100 mM de EDTA, incubado por 30 minutos em gelo com agitação em vortex a cada 5 minutos e adicionado sobre o gradiente de sacarose preparado nas mesmas condições citadas, porém, sem adição de cicloheximida.

Nos ensaios de dissociação de polissomos com puromicina, 5×10^8 células das diferentes etapas de diferenciação de *T. cruzi* foram incubadas com 2 mM de puromicina por uma hora a 28°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão TKM-P. As condições de lise foram as mesmas já mencionadas para os testes com cicloheximida alterando-se apenas a composição do tampão de lise (tampão TKM-P acrescido de 10% de NP-40, 2 M de sacarose e 2 mM de puromicina). O sobrenadante obtido após a lise foi adicionado no topo de um gradiente de sacarose preparado com tampão TKM-P e ultracentrifugado como descrito acima.

Após a centrifugação dos gradientes de sacarose, 500 µL de cada fração foram coletados utilizando o equipamento ISCO. Este equipamento destina-se 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 é obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 60%) que é injetada perfurando a base do tubo que contém o gradiente previamente centrifugado. As frações foram aplicadas em gel SDS-PAGE (30 µL de cada fração), submetidas à eletroforese e ensaiadas por *Western blotting* com os anti-soros para as proteínas deste trabalho.

3.9. TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi* POR ELETROPORAÇÃO

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até alcançar uma densidade de aproximadamente 2×10^7 células/mL. 10^8 células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS estéril e ressuspensas em 1 mL de tampão de eletroporação. Um volume de 400 µL foi transferido para uma cubeta de eletroporação estéril (0,2 cm de GAP – BioAgency) e pré-resfriadas contendo a amostra de DNA. O controle

do experimento foi a eletroporação de parasitas na ausência de qualquer amostra de DNA. Após 10 minutos no gelo, as amostras foram submetidas a 2 pulsos de 450 V e 500 μ F utilizando o eletroporador GenePulser[®] II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram, então, transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio LIT (suplementado com 10 U de penicilina e 10 μ g/mL de estreptomicina). As culturas foram incubadas a 28°C e, após 24 a 48 horas de incubação, adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 300 μ g/mL. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:5) em meio LIT suplementado com G418 a cada 8 a 10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

3.10. ENSAIOS DE IMUNOLocalização POR FLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para verificar a localização celular das proteínas de interesse, foi utilizada a técnica de imunofluorescência utilizando os anticorpos policlonais obtidos neste trabalho. Vários ensaios foram realizados até que a melhor diluição de cada anti-soro fosse determinada. Para os ensaios com os soros obtidos antes das inoculações das proteínas recombinantes em camundongos ou coelhos (soro pré-imune), foi utilizada a menor diluição como controle.

Os parasitas em estágios distintos de diferenciação foram centrifugados a 5.000 x g por 2 minutos, lavados duas vezes com PBS e fixados com paraformaldeído 4% em PBS numa densidade de $2,5 \times 10^4$ células/ μ L. As células foram adicionadas em lâminas com campos delimitados por teflon previamente tratados com poli-L-lisina. Em cada campo, foram adicionados 10^6 parasitas e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos para permitir a adesão dos mesmos na superfície da lâmina. Após esta etapa, as células foram lavadas duas vezes com PBS e este processo se repetiu entre cada etapa seguinte. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS durante dois minutos e bloqueadas com BSA 1% em PBS por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Esta última solução também foi utilizada para diluir os anticorpos. Os parasitas foram incubados com o anticorpo primário durante uma hora a 37°C e lavados três vezes

por pipetagem em PBS por 5 minutos cada. O anticorpo secundário anti-IgG de camudongo ou de coelho conjugado com Alexa 594 ou 488 (Invitrogen) foi adicionado e as etapas de incubação e lavagem repetidas. O núcleo e o cinetoplasto das células foram corados com DAPI (1 µg/mL) diluído em solução de bloqueio durante 15 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e, sobre cada campo, foram adicionados 10 µL de n-propil-galacto. As lâminas foram seladas com lamínulas e observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 90i equipado com objetiva de 100x/1.4 PalnApoVC de imersão de óleo. As imagens foram capturadas usando a câmera DS-Nikon QiMc e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (*Media Cybernetics*).

3.11. MARCAÇÃO *IN SITU* DA REDE DE kDNA

Os *nicks* e *gaps* em minicírculos foram marcados *in situ* pela adição de dUTP conjugado a fluoróforos nas extremidades 3' livres pela enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) utilizando o kit de marcação *in situ* TUNEL (Roche).

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 5.000 x g por 2 minutos, lavados duas vezes com PBS e fixados com paraformaldeído 4% em PBS numa densidade de $2,5 \times 10^4$ células/µL. As células foram adicionadas em lâminas com campos delimitados por teflon previamente tratados com poli-L-lisina. Em cada campo, foram adicionados 10^6 parasitas e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos para permitir a adesão dos mesmos na superfície da lâmina. Após esta etapa, as células foram lavadas duas vezes com PBS e este processo se repetiu entre cada etapa seguinte. Então, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS durante dois minutos, lavadas e equilibradas com 25 µL de tampão de reação TdT (200 mM cacodilato de potássio, 25 mM Tris-HCl, 1 mM CoCl₂, 0,25 mg/mL BSA, pH 6,6) e incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, 20 µL de uma solução contendo 5 µL de *Tunel enzyme* (TdT) e 45 µL *Tunel label mix* (tampão de reação TdT acrescido de dNTPs não marcados e dUTP-FITC) foram adicionados e incubados por uma hora a 37°C. A reação foi parada com três lavagens em solução

SSC 2x (diluído em PBS) seguidas de duas lavagens em PBS. As células foram bloqueadas com BSA 1% em PBS por 16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, procedeu-se a incubação dos anticorpos, como descrito no item 3.10, para visualização em microscópio de fluorescência.

3.12. IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, foram utilizados parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram fixados em 0,3% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e 1% de ácido pícrico diluídos em tampão 0,1 M de cacodilato pH 7,2. Após lavagem neste mesmo tampão, as células foram desidratadas a -20°C em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes 100%) a 4°C por uma hora em cada etapa. Em seguida, o material foi progressivamente infiltrado em resina Unicryl em baixa temperatura: etanol 100%: resina Unicryl (2:1) a -20°C por 16 horas; etanol 100%: resina Unicryl (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 feita em cápsulas BEEM a 20°C por 72 horas sob luz UV. Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrótomo Leica (Reichert Ultracuts). As grades contendo as seções foram bloqueadas com 50 mM de cloreto de amônia (diluído em PBS pH 7,2) por 30 minutos, seguido de 1% de soro de cabra diluído em solução de bloqueio (3% BSA, 0,5% gelatina de peixe e 0,5% tween 20 diluídos em PBS pH 8,0) por 30 minutos e solução de bloqueio por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado com anti-soro anti-GAP2 produzido em camundongo diluído 1:50 em solução de bloqueio por uma hora. As grades foram 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 anti-soro primário foi omitida. Após o procedimento imunocitoquímico, as grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

3.13. ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA A ANÁLISE DE mRNAs ASSOCIADOS À PROTEÍNA TcGAP2 – RIBONÔMICA

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 produzido em camundongo com extratos citoplasmáticos de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e epimastigotas submetidos a estresse nutricional.

Os anticorpos presentes no anti-soro foram incubados com a resina contendo proteína G sefarose durante 2 horas a 4°C em agitador orbital. Para isso, 50 µL de resina foram lavados com água ultrapura, centrifugados a 600 x g por um minuto e, em seguida, lavados duas vezes com PBS. A resina foi bloqueada com 1 mg/mL de BSA diluído em PBS em temperatura ambiente por 10 minutos sob leve agitação. Em seguida, a resina foi incubada com a mistura contendo 20 µL de anti-soro, 80 µL de BSA (1 mg/mL em PBS) e 1 µL de RNaseOUT™.

Os extratos citoplasmáticos de *T. cruzi* foram obtidos durante a etapa de incubação do anti-soro com a resina. Para isso, 2×10^9 parasitas foram centrifugados a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS. Os parasitas foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise IMP1, suplementado com inibidores de proteases e RNaseOUT™ (1 U/µL), por duas horas em gelo sob moderada agitação. O extrato citoplasmático foi obtido após centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos a 4°C e 1 mL deste extrato foi incubado com a resina previamente ligada ao anti-soro, como descrito acima, por 2 horas a 4°C em agitador orbital.

Após a incubação, os complexos foram coletados por centrifugação a 600 x g por 1 minuto e o sobrenadante obtido foi denominado FT (*flowthrough*). A resina foi lavada três vezes com tampão IMP1. Os RNAs presentes na resina foram eluídos e purificados com o kit RNeasy® de acordo com o protocolo “*Cleanup*” com o passo adicional de tratamento com DNase na própria coluna, eluídos duas vezes com 40 µL de água e dosados em espectrofotômetro. O RNA imunoprecipitado foi utilizado para sequenciamento em larga escala utilizando a plataforma SOLiD (item 3.13.1) ou para síntese de cDNA (item 3.13.2).

3.13.1. Processamento de amostras para o sequenciamento de RNA utilizando a plataforma SOLiD

Para esta abordagem, foram utilizados 100 ng dos RNAs provenientes da imunoprecipitação. Os RNAs foram incubados com RNase III (1U) por 5 minutos a 37°C para obtenção de fragmentos de 150 a 250 nucleotídeos. A reação de fragmentação foi inibida pela adição de água RNase-free e as amostras foram imediatamente refrigeradas a 4°C. O kit *RiboMinusTM Concentration Module* (Invitrogen) foi utilizado para a concentração da amostra, segundo recomendações do fabricante.

A) Transcrição reversa – obtenção de cDNA

Após as etapas de fragmentação e concentração dos fragmentos, um adaptador foi ligado à extremidade 3' dos RNAs através de uma reação de hibridação por 16 horas a 16°C. Em seguida, foi realizada uma reação de transcrição reversa na qual o adaptador ligado à extremidade 3' funcionou como um oligonucleotídeo iniciador. A fita simples de cDNA gerada nesta etapa foi purificada com o kit *MinElute PCR purification* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 6% (Novex^R – Invitrogen) por 25 minutos a 180 V. O gel foi corado com o intercalante SYBR Gold por 5 minutos e os fragmentos de 150 a 250 nucleotídeos foram retirados do gel. Os fragmentos retirados do gel receberam dois adaptadores cada um: o adaptador P2 - específico para cada amostra funcionando como um código de barras para identificá-las na biblioteca de cDNA - e o adaptador P1, comum entre as amostras. Para a obtenção da biblioteca de cDNA foi feita uma amplificação *in gel* utilizando P1 e P2 como iniciadores. O cDNA amplificado passou por uma etapa de purificação com o kit *PureLinkTM PCR Micro* (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. As amostras passaram por uma análise de tamanho e qualidade no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*, utilizando o kit *DNA 1000*.

B) PCR de emulsão

Com a biblioteca de cDNA obtida, foi realizada uma PCR de emulsão (ePCR) na qual as amostras foram amplificadas de maneira clonal no interior de microreatores líquidos em uma emulsão. Em teoria, cada microreator da emulsão abriga um único fragmento de cDNA que pode ser amplificado por PCR dentro deste microambiente. Os fragmentos amplificados também foram ligados às microesferas de sequenciamento através do adaptador P1 presente nas amostras. A escala de preparação da PCR de emulsão escolhida foi a *full scale*, que gera entre 150 e 300 milhões de microesferas. Assim, os cDNAs obtidos de todas as amostras (8) foram misturados na etapa de ePCR, gerando uma biblioteca que pode ter até 16 amostras diferentes, todas identificadas por seus adaptadores que funcionam como códigos de barras (adaptador P2).

A biblioteca de cDNA contendo as oito amostras, mais oito amostras provenientes de experimentos de outras pessoas do grupo, foi diluída para duas titulações: 0,5 e 1,0 pM. Deste modo, foram feitas duas ePCRs para cada biblioteca, o que permitiu selecionar a titulação que produziu melhores resultados, tanto no que se refere à quantidade de *beads* quanto à qualidade da seqüência.

C) Seleção de microesferas positivas

Após a ePCR, as microesferas passaram por um processo de enriquecimento a fim de maximizar a quantidade de microesferas P2 positivos, ou seja, que possuísem fragmentos de DNA completos contendo os adaptadores P1, interno e P2. Nesta etapa, foram eliminadas as microesferas que não possuísem DNAs de interesse aderidos a elas. A contagem final de microesferas após o enriquecimento foi feita em câmara de Neubauer e seguiu-se o sequenciamento.

D) Seqüenciamento

As lâminas utilizadas pelo sequenciador SOLiD apresentam as configurações *full* (1 poço), *quad* (4 poços) e *octeto* (8 poços). A configuração *quad* permite um número máximo de 120 milhões de microesferas e foi utilizada neste experimento. Assim, para cada amostra (das 16 presentes na biblioteca) estima-se a obtenção de 7,5 milhões de *reads*. O tempo total de sequenciamento foi de aproximadamente sete dias, sendo que no primeiro dia foi sequenciado o adaptador com o código de barras e, nos demais dias, foram analisados os fragmentos de 50 pb referentes às amostras.

E) Análises

As análises das seqüências geradas pelo sequenciador SOLiD foram realizadas com base no mapeamento das seqüências obtidas no genoma de referência utilizando-se o programa *CLC Genomics Workbench* versão 5.5.1. As seqüências de referência para o mapeamento foram obtidas a partir da versão 4 do banco de dados do TriTrypDB Esmeraldo e não Esmeraldo num total de 25.106 seqüências não-redundantes, incluindo seqüências não codificadoras. Dentre os parâmetros utilizados para o mapeamento, foi escolhido que um *read* pareasse apenas com um gene e com cobertura de pelo menos 80% do gene. Dentro dessa porcentagem, foi permitido que houvesse uma similaridade nucleotídica de 80%, pois o banco de dados compreende seqüências do genoma de outra cepa de *T. cruzi*.

Foram utilizados dois parâmetros estatísticos para as análises, *False Discovery Rate* (FDR) e *Fold Change* (FC). O FDR é um método estatístico utilizados em testes de hipóteses múltiplas que mede a proporção esperada de resultados falso-positivos em um universo de amostras. O FC é um número que define o quanto um valor se altera em comparação com um valor inicial. Estas medidas são muito utilizadas em análises de expressão gênica, sendo introduzida em experimentos de microarranjo e estendendo sua aplicação para experimentos de

RNAseq, utilizada para analisar o nível de expressão de um gene em determinada amostra quando comparado à quantidade deste transcrito presente em outra amostra.

Para as análises de ontologia gênica, foi utilizado o software Blast2GO PRO versão 2.6.0. Para realizar as buscas por motivos conservados dentre os alvos identificados, foi utilizado o *software* MEME, disponível na página <http://meme.sdsc.edu>. Dentre os parâmetros utilizados, realizamos buscas por domínios de quatro a dez nucleotídeos.

3.14. ENSAIO DE MUDANÇA NA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Para os ensaios de EMSA, foram utilizados oligorribonucleotídeos poli-A, poli-U, poli-C e poli-G marcados com o fluoróforo Cy5-5.5.

Nas reações de reconhecimento dos homorribonucleotídeos, utilizamos 200 e 400 ng da proteína TcGAP2, 10 ng da sonda respectiva, tampão para EMSA (1 mM Tris-HCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 µM DTT), 5 mM de espermidina e 1 µg de heparina (como competidor inespecífico) em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos e imediatamente aplicadas em gel não desnaturante de poliacrilamida 6% (acrilamida:bisacrilamida 30:0,36). As reações foram submetidas à eletroforese a 4°C em tampão TBE 0,5 X a 100 V. Em seguida, cada gel foi observado no equipamento Odyssey em 700 nm de comprimento.

3.15. ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA A ANÁLISE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A TcGAP2

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 purificado com extratos citoplasmáticos de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e epimastigotas submetidos a estresse nutricional.

Os anticorpos foram incubados com *beads* magnéticas contendo anticorpos contra IgG de coelho durante 2 horas em temperatura ambiente em agitador orbital. Para isso, 10 μ L de resina foram lavados com água e, em seguida, os tubos foram colocados em uma estante magnética para retirar o sobrenadante. A resina foi lavada duas vezes com PBS e bloqueada com 40 mg/mL de BSA diluído em PBS em temperatura ambiente por 10 minutos sob leve agitação. Em seguida, 30 μ L de anti-soro purificado foram misturados com 70 μ L de BSA (40 mg/mL em PBS) e com a resina. Após esse período, as *beads* foram equilibradas com 1 mL de tampão de lise para proteômica contendo 1 μ L de RNaseOUT™.

Os extratos citoplasmáticos de *T. cruzi* foram obtidos durante a etapa de incubação do anti-soro com a resina. Para isso, 5×10^8 parasitas foram centrifugados a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C e lavados duas vezes com PBS. Os parasitas foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise para proteômica, suplementado com inibidores de proteases (100 mM PMSF e 10 μ M E-64) e 1 μ L de RNaseOUT™ (1 U/ μ L), e permaneceram por 10 minutos em gelo. Em seguida, as células foram lisadas em uma bomba de cavitação por nitrogênio (*Par Cell Disruption Bomb* modelo 4639 – 1700 psi) por 30 minutos em gelo. O extrato citoplasmático foi obtido após centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos a 4°C e 1 mL deste extrato foi incubado com a resina previamente ligada ao anti-soro, como descrito acima, por 2 horas a 4°C em agitador orbital.

Após a incubação, os tubos foram colocados na estante magnética e o sobrenadante obtido foi denominado FT (*flow through*). A resina foi lavada cinco vezes com tampão de lise para proteômica. As proteínas presentes na resina foram então eluídas com 80 μ L de glicina 0,2 M pH 2,5 por dois minutos. O eluído foi imediatamente transferido para outro tubo e o pH foi ajustado com 8 μ L de Tris-HCl 1 M pH 9,5. Uma alíquota do *input* (alíquota do extrato), *flow through*, último lavado e eluído foram aplicados em gel SDS-PAGE para verificar a eficiência da imunoprecipitação.

3.15.1. Tripsinização das amostras, purificação e eluição dos peptídeos trípticos

Após confirmada a eficiência da imunoprecipitação, os eluídos foram quantificados por microBCA. Três microgramas de cada amostra foram solubilizados em tampão de desnaturação acrescido de 1 mM de DTT e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação de 500 rpm. Em seguida, foram adicionados 5,5 mM de IAA (iodoacetamida) e a mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e mantendo a agitação. As amostras foram então diluídas com 4 volumes de tampão de digestão ABC pH 8,0 (50 mM bi-carbonato de sódio diluído em água). Finalizada esta etapa, as amostras foram tripsinizadas, utilizando 1 µg de tripsina para cada 50 µg de proteína, e incubadas em temperatura ambiente por 16 horas sob agitação. Para parar a digestão das amostras, estas foram acidificadas em pH igual ou menor que 2,5 com 10% de TFA.

Para a purificação dos peptídeos, foram utilizados *C18-stage tips*. Estes foram condicionados com 100 µL de metanol e centrifugados a 1.000 x g por 1 minuto. Então, os mesmos foram equilibrados duas vezes com solução A (0,1% TFA em água), repetindo os procedimentos de centrifugação. Em seguida, as amostras foram colocadas e centrifugadas duas vezes pelo *StageTip*. Este passo foi repetido quantas vezes necessárias até que toda a amostra estivesse contida no *StageTip*. O *StageTip* foi lavado com 100 µL de solução A e armazenado a 4°C até o momento da corrida no espectrômetro de massa.

O *StageTip* foi lavado com 100 µL de solução A e os peptídeos foram eluídos em duas etapas com 20 µL de tampão B (0,1% TFA diluído em acetonitrila) cada. As amostras foram secadas em *speed vac* (vácuo máximo sem aquecimento) para remover a acetonitrila e diluídas com 15 µL de solução A para análise em espectrômetro de massas Orbitrap XL (*Thermo*, San José).

3.15.2. Análise dos dados de proteômica

Os espectros de massas em *tandem* foram extraídos dos arquivos brutos (i.e., .raw) utilizando *RawXtractor* (McDONALD *et al.*, 2004). O banco de dados de sequências de *Trypanosoma cruzi* foi obtido a partir das sequências *RefSeq* do banco de dados NCBI em outubro de 2012. Este banco foi usado para preparar outro banco de sequências que também inclui a sequência de 127 contaminantes mais comuns encontrados em experimentos de espectrometria de massas (por exemplo, queratina, tripsina) e, para cada sequência, foi gerada uma sequência artificial revertendo a sequência da original (BARBOZA *et al.*, 2011).

O programa *ProLuCID Search Engine* foi usado para comparar os espectros MS2 experimentais com aqueles teoricamente gerados a partir do nosso banco de dados de sequências e selecionar a sequência cujo espectro teórico mais se assemelha ao experimental (XU *et al.*, 2006). O espaço de busca compreendeu todos os peptídeos trípticos ou semi-trípticos gerados a partir do banco de sequências com uma tolerância de 70 ppm da massa do precursor. Os demais parâmetros incluem a carbamidometilação como modificação fixa e a oxidação dos resíduos de metionina como uma modificação variável.

Convergiu-se para um conjunto de identificações satisfazendo um q-valor de 0.01 utilizando o programa *Search Engine Processor* (SEPro) (CARVALHO *et al.*, 2012). Resumidamente, identificações foram agrupadas por estado de carga (e.g., +2, \geq +3) e por *status* tríptico (e.g., tríptico ou semi-tríptico) gerando assim quatro grupos. Para cada grupo, os scores XCorr, DeltaCN e ZScores de cada identificação foram usados na construção de um classificador Bayesiano; em seguida, as identificações foram ordenadas por confiança de acordo com o *score* discriminante proveniente do classificador Bayesiano. Uma linha de corte foi estabelecida de forma a satisfazer com que apenas 1% das sequências artificiais estivessem presentes no resultado final (e.g., 1% FDR). Este procedimento foi realizado de forma independente para cada grupo, de forma a gerar um resultado que independe do *status* tríptico ou estado de carga. Identificações peptídicas foram aceitas com seis ou mais aminoácidos e 5 ppm de acurácia. Finalmente, consideramos proteínas contendo pelo menos duas evidências independentes, como, por exemplo, dois peptídeos ou o mesmo peptídeo identificado com estados de carga diferente ou com

uma modificação PTM, etc. Este último critério eliminou todas as sequências artificiais de nosso resultado, fazendo com que o mesmo tenha 0% FDR.

3.16. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS POR ABORDAGENS DE GENÉTICA REVERSA – NOCAUTE GÊNICO

O silenciamento de genes por nocaute mediado por recombinação homóloga é uma metodologia de genética reversa que vem sendo utilizada para estudar a função de genes em *T. cruzi* (MACRAE *et al.*, 2006).

Para a clonagem das regiões intergênicas, foram utilizados vetores pBlueScript já contendo o gene *npt*, que codifica a enzima neomicina fosfotransferase e confere resistência ao antibiótico neomicina – G418 (NEO), e gene *hph*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B (HIGRO), construídos no ICC (DE SOUZA *et al.*, 2010). Estes genes de resistência foram então flanqueados por regiões intergênicas do gene *TcWW* ou *TcGAP2* a jusante (*downstream* – DOWN) e a montante (*upstream* – UP). O esquema dos vetores utilizados para as clonagens das regiões intergênicas e da construção a ser obtida para a estratégia de nocaute podem ser observadas na figura 7.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar as regiões intergênicas *upstream* e *downstream* dos genes *TcWW* e *TcGAP2*. A estes iniciadores, foram adicionados sítios de enzimas de restrição apropriados na extremidade 5' para permitir que os produtos de PCR fossem coesivos com os vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO após a digestão de ambos com as mesmas enzimas. Estes oligonucleotídeos iniciadores estão mostrados em anexo.

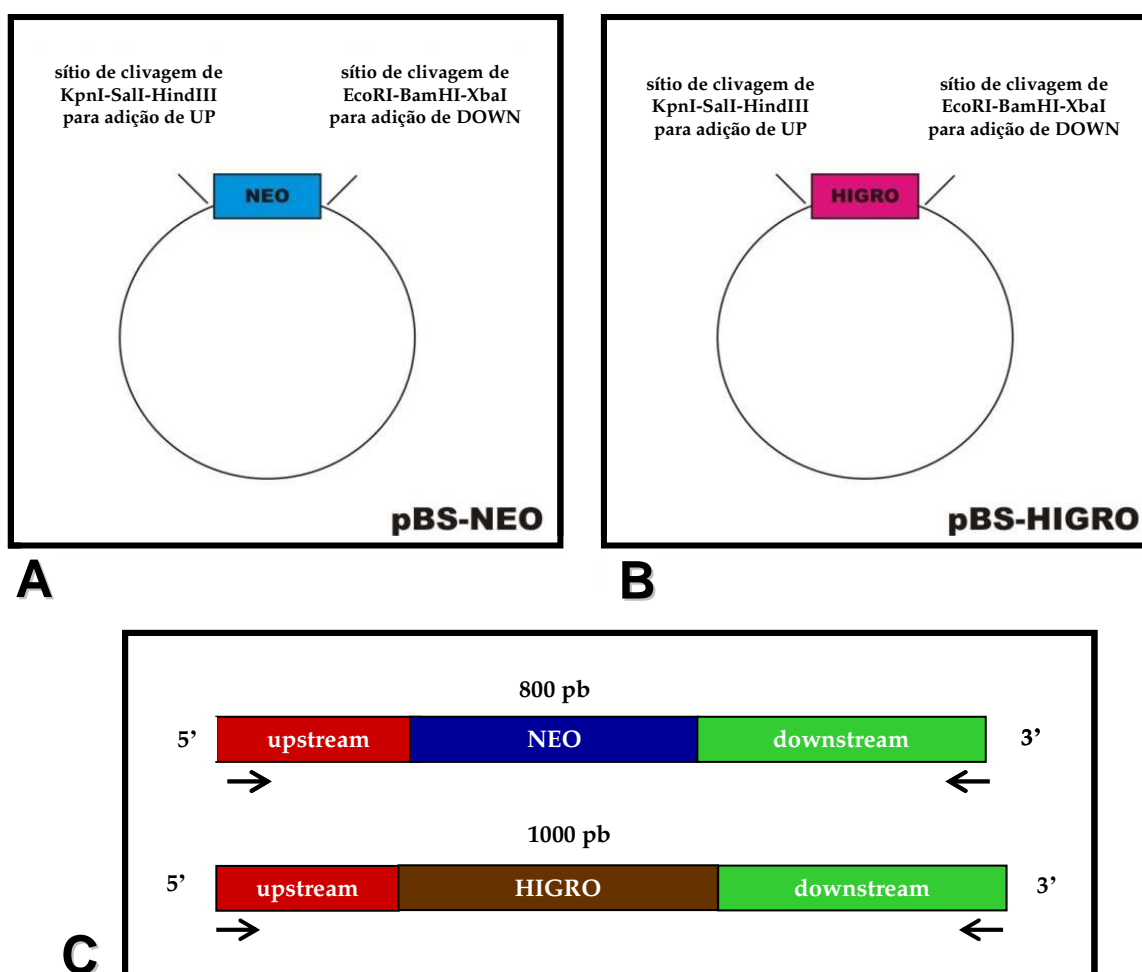


Figura 7 – Esquema de vetores e construção para a estratégia de nocaute em *T. cruzi*. A) Ilustração do vetor pBlueScript (pBS) contendo o gene *npt* (NEO) – pBS-NEO – com os devidos sítios de restrição utilizados neste trabalho para a clonagem das regiões intergênicas. B) Ilustração do vetor pBlueScript contendo o gene *hph* (HIGRO) – pBS-HIGRO – com os devidos sítios de restrição utilizados neste trabalho para a clonagem das regiões intergênicas. C) Ilustração da construção dos genes de resistência flanqueados pelas regiões intergênicas. Em vermelho, a região intergênica *upstream* do gene *TcGAP2* ou *TcWW*. Em verde, a região *downstream* do gene *TcGAP2* ou *TcWW*. Após ambas clonagens, os genes de resistência tornam-se flanqueados pelas regiões intergênicas. As setas indicam a direção dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do fragmento a ser utilizado para a transfecção de *T. cruzi* para o nocaute dos alelos dos genes *TcGAP2* e *TcWW*.

As regiões intergênicas foram amplificadas por PCR, tendo como molde 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* através de enzima *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em volume final de 20 μ L, contendo tampão de reação com 3 mM $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Para a ciclagem da reação de PCR foi padronizado o tempo de extensão de 72°C por 1 minuto para cada 1 kb do fragmento a ser amplificado. A temperatura de anelamento utilizada para

amplificação da região *upstream* dos genes *TcWW* e *TcGAP2*, bem como da região *downstream* de *TcWW*, foi de 62°C e da região *downstream* de *TcGAP2*, 56,5°C.

As clonagens foram realizadas por etapas (detalhadas nos itens a seguir). Após a finalização das construções, os plasmídeos foram utilizados como molde para amplificação dos fragmentos, delimitados pelas setas na figura 9. Após a obtenção deste amplicon, foi possível a purificação através de excisão de gel de agarose 0,8% seguido de eletroeluição a 90 V durante 2 horas. A transfecção e seleção dos parasitas mutantes foram realizadas conforme item 3.9.

3.16.1. Clonagem das regiões *upstream* em vetor pBlueScript-NEO

Para amplificação por PCR das regiões *upstream*, foram utilizados os iniciadores GAP2-UP-F e GAP2-UP-R para *TcGAP2* e WW-UP-F e WW-UP-R para *TcWW* (em anexo) com a ciclagem de *holding* de 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e *holding* de 72°C por 5 minutos. 5 µL da PCR foi aplicado em gel de agarose 2% para confirmar amplificação. A *Taq* DNA polimerase possui uma atividade de transferase terminal independente de molde que adiciona uma adenosina nas extremidades 3' dos produtos de PCR. Isto possibilita a clonagem em vetor pGEM-T[®] Easy (Promega), um vetor linearizado que possui uma timidina em ambas extremidades 3'. Assim, os produtos de PCR foram ligados neste vetor (50 ng), conforme recomendações do fabricante, numa reação contendo 2 µL da PCR, 5 µL de tampão, 1 µL de T4 DNA ligase (0,1 U), 1 µL de água a 4°C por 16 horas. Um volume de 2 µL da reação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* linhagem DH5α que, em seguida, foram semeadas em LB contendo ampicilina, X-gal e IPTG. A seleção dos clones positivos é feita por meio de avaliação da expressão da enzima β-galactosidase que, quando induzida por IPTG, degrada o substrato X-gal produzindo um subproduto azul. Como o sítio de clonagem múltipla está presente dentro do gene da enzima, caso o inserto seja incorporado com sucesso ao vetor, a enzima β-galactosidase não é mais expressa funcionalmente e as colônias permanecem brancas. Isso facilita a identificação dos clones recombinantes que, posteriormente,

foram confirmados por PCR de colônia. Os vetores contendo os amplicons foram purificados utilizando o kit Qiaprep® *Spin Miniprep* (Qiagen).

Para a construção pGEM-T Easy® contendo a região *upstream* de *TcGAP2*, foram digeridos 7 µg do vetor com 30 U de enzima HindIII (Amersham Biosciences) em solução contendo tampão M em volume final de 70 µL. Já para a que contém a região *upstream* de *TcWW*, foram digeridos 7 µg do vetor com 30 U de enzima Sall (Amersham Biosciences) em solução contendo tampão H em volume final de 70 µL. Ambas reações foram incubadas a 37°C por 16 horas. Em paralelo, foram digeridos 2 µg do vetor pBS-NEO com as mesmas enzimas e mesmos tampões em volume final de 30 µL. As digestões foram purificadas por precipitação com 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol 100%, pois as outras enzimas utilizadas exigem um tampão de composição diferente. A outra endonuclease de restrição utilizada para a clonagem da região *upstream* de *TcGAP2* foi Sall (Amersham Biosciences) e para a da região *upstream* de *TcWW* foi KpnI (Amersham Biosciences). O pGEM-T® Easy contendo a região *upstream* previamente digerido com HindIII foi digerido com 30 U de Sall em solução contendo tampão H num volume final de 60 µL. Já o pGEM-T® Easy contendo a região *upstream* de *TcWW* previamente digerido com Sall foi digerido com 30U de KpnI em solução contendo tampão L num volume final de 60 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 16 horas. Já o vetor pBS-NEO previamente digerido com HindIII ou Sall foi digerido com a mesma enzima e tampão com os quais foram digeridos os respectivos vetores pGEM-T em volume final de 40 µL. As reações de digestão foram purificadas utilizando um volume de fenol e, em seguida, o material presente na fase aquosa foi precipitado com acetato de sódio e etanol conforme já mencionado.

Para a reação de ligação, foi utilizada a proporção de 1:10 em pmol de vetor e inserto digeridos, respectivamente, adicionado 2 U de T4 DNA ligase (USB), 6 µL de tampão da T4 DNA ligase em volume final de 30 µL. A incubação foi realizada por 16 horas a 16°C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias DH5α cálcio-competentes. A verificação da clonagem foi realizada através de PCR de colônia com os oligonucleotídeos GAP2-UP-F e GAP2-UP-R para a clonagem da região *upstream* de *TcGAP2* e WW-UP-F e WW-UP-R para a de *TcWW*. Os possíveis plasmídeos recombinantes foram posteriormente purificados utilizando o sistema Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. Esta construção foi denominada pBS-NEO-GAP2-UP ou pBS-NEO-WW-UP.

3.16.2. Clonagem da região *downstream* em vetor pBS-NEO-UP

Para a reação de amplificação das regiões intergênicas *downstream* de *TcGAP2* e *TcWW* a serem clonadas em vetor pBS-NEO-GAP2-UP e pBS-NEO-WW-UP, respectivamente, foram utilizados as duplas de iniciadores GAP2-DOWN-F/GAP2-DOWN-R e WW-DOWN-F/WW-DOWN-R (em anexo). A ciclagem utilizada foi *holding* de 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e *holding* de 72°C por 5 minutos. 5 µL da PCR foi aplicado em gel de agarose 2% para confirmar amplificação. Em seguida, o produto de PCR foi ligado no vetor pGEM-T[®] Easy como descrito no item 3.15.1.

Para as construções pGEM-T Easy[®] contendo a região *downstream* de *TcGAP2*, bem como a de *TcWW*, foram digeridos 7 µg do vetor com 30 U de enzima BamHI (BioLabs) em solução contendo tampão da enzima EcoRI em volume final de 70 µL. A digestão dos diferentes vetores foi incubada a 37°C por 16 horas. A digestão do vetor contendo a região *downstream* de *TcWW* foi purificada por precipitação com 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 3 volumes de etanol 100%, pois a outra enzima utilizada para esta clonagem exige um tampão de composição diferente. A outra endonuclease de restrição utilizada para a clonagem da região *downstream* de *TcWW* foi XbaI (Amersham Biosciences). Para dar continuidade à digestão, foram adicionadas 36 U de XbaI em solução contendo tampão M em volume final de 50 µL. Após digestão do vetor contendo a região *downstream* de *TcGAP2* com BamHI, foram adicionadas 30U de EcoRI (BioLabs) na mesma reação. Então, ambas digestões foram incubadas novamente a 37°C por 5 horas e, então, purificadas. Em paralelo, foram digeridos 2 µg dos vetores pBS-NEO-GAP2-UP e pBS-NEO-WW-UP com as mesmas enzimas e mesmo tampão, respectivamente, em volume final de 20 µL. As digestões foram purificadas por fenol e, para a reação de ligação, foram mantidas as condições citadas no item 3.15.1, bem como para a transformação de bactérias DH5α cálcio-competentes. A verificação da clonagem foi realizada através de PCR de colônia com as duplas de iniciadores GAP2-DOWN-F/GAP2-DOWN-R e WW-DOWN-F e WW-DOWN-R e os plasmídeos de possíveis clones foram posteriormente purificados.

Para a transfecção de *T. cruzi*, foi realizada uma reação de PCR de maior volume, obedecendo proporcionalmente as concentrações. Foi utilizada uma

quantidade mínima de vetor (10 ng) e os iniciadores GAP2-UP-F/GAP2-DOWN-R E WW-UP-F/WW-DOWN-R para obtenção dos fragmentos de DNA (5 a 10 µg) conforme esquematizado na figura 9.

3.16.3. Clonagem das regiões *upstream* e *downstream* em vetor pBS-HIGRO

Para as clonagens das regiões *upstream* e *downstream* em vetor pBS-HIGRO, foram realizadas as mesmas etapas descritas anteriormente para o vetor pBS-NEO, itens 3.15.1 e 3.15.2 respectivamente, apenas substituindo o plasmídeo pBS-NEO pelo pBS-HIGRO.

3.16.4. Verificação de nocaute gênico por *Southern blotting* e *Western blotting*

A separação dos cromossomos de *T. cruzi* foi feita através de eletroforese em campo pulsado. Foram preparados 20 blocos contendo 2×10^7 parasitas cada um. Para estas preparações, foi utilizado o clone Dm28c selvagem (*wild-type*) como controle, bem como parasitas transfectados e clonados para o nocaute do gene *TcGAP2* e *TcWW*.

As células foram centrifugadas por 15 minutos a 5.000 x g e lavadas duas vezes com PBS pH 8,0. Após as lavagens, os parasitas foram ressuspensos em 600 µL de solução PSG, previamente aquecido a 37°C, e adicionado igual volume de solução de PSA 2%, também aquecido a 37°C. Esta suspensão (100 µL) foi imediatamente aplicada em um molde de 20 orifícios para a solidificação da agarose, resultando em pequenos blocos, cada um representando uma amostra.

Estes blocos foram depositados em 10 mL de solução de lise, previamente digerida durante uma hora a 37°C, incubados a 50°C por volta de 50 horas. Os blocos foram estocados nesta solução a 4°C. Cada bloco utilizado para a análise foi

lavado três vezes com 50 mM de EDTA pH 8,0 por uma hora antes de ser aplicado no gel de eletroforese.

O tampão de corrida TBE 0,5X foi previamente resfriado a 4°C e a eletroforese seguiu um programa com cinco fases de tempos crescentes de pulsos (N/S, E/W) por 135 horas a 83 V – *interpolation*. A fase 1 teve pulso de 90 s (30 h), fase 2, 200 s (30 h), fase 3, 350 s (25 h), fase 4, 500 s (25 h) e fase 5, 800 s (25 h).

Os cromossomos foram transferidos pelo método de *Southern blotting*. O tratamento do gel contendo o DNA consistiu de incubações consecutivas das seguintes soluções: 0,25 M HCl por 15 minutos, solução de neutralização de 0,5 M NaOH e 1,5 M NaCl por 30 minutos duas vezes e solução de 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 e 1,5 M NaCl por 30 minutos. A transferência do DNA para a membrana de náilon (Hybond-Amershan) foi realizada durante 16 horas por capilaridade utilizando tampão SSC 20X. Após a transferência, a membrana foi lavada rapidamente com SSC 2X e o DNA foi fixado na membrana com luz ultravioleta (302 nm). Em seguida, a membrana foi pré-incubada com solução de hibridação por uma hora a 65°C.

As sondas para a hibridação foram amplificadas por PCR a partir de uma pequena quantidade (10 ng) do vetor pDONR contendo o gene *TcGAP2* ou *TcWW*. O produto da PCR foi então marcado radioativamente pela técnica de *nick translation* - *Nick Translation System* (Invitrogen). Estas reações continham 100 ng de DNA, 2,5 U DNA Polimerase I, 2 um Dnase I, 0,1 mM de cada dNTP (exceto dCTP), 20 a 80 µCi de dCTP- α -P³² num volume final de 50 µL. Em seguida, esta reação foi incubada a 16°C por uma hora em banho seco e purificada por centrifugação em colunas de resina G-50 (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Logo após, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente em gelo. Foram utilizadas como sondas fragmentos referentes aos genes *TcGAP2* ou *TcWW*, *nph* de resistência à neomicina (NEO) e *hph* de resistência à higromicina (HIGRO).

RESULTADOS

Seleção e expressão dos genes de interesse

Análise da especificidade dos anticorpos policlonais

Ensaio de sedimentação em gradientes de sacarose

Localização subcelular por imunofluorescência

Localização subcelular por microscopia eletrônica de transmissão

Identificação dos alvos de TcGAP2 por sequenciamento em larga escala

Análise funcional dos RNAs associados à proteína TcGAP2

Ensaio de ligação a RNA (EMSA)

Identificação de proteínas que interagem com TcGAP2

Nocaute dos genes *TcGAP2* e *TcWW*

4.1. SELEÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE

Em trabalho prévio realizado em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2010), foram isolados complexos mRNA-proteína de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento e submetidos a estresse nutricional. Para a caracterização desses mRNPs, foram isolados complexos protéicos associados a mRNAs não traduzidos (fração pós-polissomal) ou traduzidos (fração polissomal). Inicialmente, estas frações puderam ser separadas por ultracentrifugação do lisado pós-mitocondrial em um colchão de sacarose 2M, o que permitiu a separação do sedimento enriquecido em polissomos e outros complexos pesados do sobrenadante pós-polissomal. Os complexos mRNPs de cada fração foram incubados com microesferas oligo-d(T) e, então, lavados e eluídos em tampão de proteômica (ALVES *et al.*, 2010). Dessa maneira, o conteúdo protéico obtido de cada fração foi tripsinizado e os peptídeos resultantes foram submetidos à análise do tipo 2D Nano LC-MS/MS (ALVES *et al.*, 2010).

Dentre as proteínas identificadas neste trabalho, duas foram selecionadas para caracterização funcional. Ambas são proteínas com funções desconhecidas, conservadas e possuem regiões ricas em resíduos de glutamina (Q). Uma das proteínas escolhidas é ortóloga da proteína GAP2 em *T. brucei* e assim será denominada ao longo deste trabalho. A outra proteína será mencionada como WW, já que não possui nenhuma descrição, apenas um domínio WW descrito como mediador de interações proteína-proteína (quadro 1). A proteína TcGAP2 foi identificada nas frações polissomal e pós-polissomal de epimastigotas em fase

exponencial de crescimento e polissomal e pós-polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional, enquanto a proteína WW foi identificada apenas na fração pós-polissomal de epimastigotas submetidos a estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2010).

O interesse de estudar proteínas ricas em glutamina (Q) se deu por esses domínios também estarem presentes em proteínas conhecidas como ataxinas. Estudos recentes têm demonstrado evidência do envolvimento da ataxina-2 (ATXN2) no metabolismo de RNA (RALSER *et al.*, 2005; SATTERFIELD e PALLACK, 2006; NONHOFF *et al.*, 2007). Além disso, foi observado também que a expansão desses domínios pode levar ao desenvolvimento de doenças conhecidas como ataxia, porém não se sabe ao certo, até o momento, qual seria a função desses domínios. Dessa forma, foi realizada uma busca por seqüências similares à da proteína ataxina 2 no banco de dados de *T. cruzi*, por BLASTp, utilizando a seqüência presente em humanos, adicionando mais uma proteína a este trabalho. Foi identificada uma proteína com 38% de similaridade que possui domínios ricos em glutamina, além de um domínio Lsm.

Denominação		GAP2	WW	ATXN2
Proteínas de <i>T. cruzi</i>	Número de acesso	TcCLB511815.40	TcCLB511661.10	TcCLB.511409.10
	Descrição	Guide RNA associated protein, GAP2, putative	Hypothetical protein, conserved	PAB1-binding protein, putative
Porcentagem de similaridade	<i>T. brucei</i>	90	94	67
	<i>H. sapiens</i>	NS	NS	38
	<i>S. cerevisiae</i>	NS	NS	37

Quadro 1 – Proteínas selecionadas para este trabalho. NS = não similar.

Tendo selecionado os genes de interesse e suas regiões para este projeto, foi dado início aos trabalhos de clonagem, expressão das proteínas recombinantes e produção de anticorpos. Para tanto, foram utilizados os vetores da plataforma Gateway[®] (Invitrogen), cuja tecnologia está baseada na propriedade de recombinação do bacteriófago lambda, que se integra no cromossomo da bactéria *Escherichia coli*. Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa

Primer Select (Lasergene DNA Star), levando em conta a necessidade dos sítios de recombinação (em anexo).

Para os ensaios de expressão de proteínas em *E. coli* com o objetivo de produção de anticorpos, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da região codificadora (CDS) inteira para TcGAP2. Já para a expressão das proteínas TcATXN2 e TcWW, foram selecionadas regiões que fossem mais hidrofílicas e antigênicas, com o auxílio do programa *Protean (Lasergene DNA Star)*.

Os genes escolhidos para este trabalho foram amplificados por PCR e os produtos foram purificados utilizando uma solução contendo PEG e MgCl₂. Com os genes purificados contendo os sítios de recombinação, foi realizada a reação BP que consiste na entrada do produto de PCR no vetor de entrada pDONRTM221 por meio da recombinação entre os sítios homólogos *attB* (presente no produto de PCR) e *attP* (presente no vetor pDONRTM221).

Após a inserção dos genes no vetor de entrada, uma fração do DNA recombinado foi transformada em bactérias *E. coli* cálcio-competentes, as quais foram cultivadas em meio seletivo líquido e, em seguida, semeadas. Foi realizada PCR de colônia com alguns clones utilizando os iniciadores dos próprios genes para confirmar a presença destes e, em seguida, procedeu-se à extração dos plasmídeos dos clones positivos.

Em seqüência, o vetor pDONRTM221 contendo os genes de interesse foi recombinado com o vetor de destino pDESTTM17, reação denominada LR. Novamente, uma fração da reação de recombinação foi transformada em células competentes. Os clones foram cultivados em placa contendo o antibiótico apropriado e selecionados por PCR de colônia. Clones positivos para o inserto foram utilizados para extração dos plasmídeos.

A partir dos clones obtidos no vetor destinado à expressão pDESTTM17, obtivemos as proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Nos testes de expressão, as frações protéicas totais foram comparadas com as frações de proteínas totais dos controles não-induzidos (bactéria contendo o plasmídeo pDESTTM17 com o gene de interesse, porém não induzida com IPTG). As diferentes frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante que, ao término da corrida, foi corado com azul de Coomassie (figura 8 - A). Para o gene *TcWW*, foram utilizadas quatro regiões distintas para expressão, onde apenas a região entre os aminoácidos 105 e 371 foi expressa em *E. coli* com sucesso. As proteínas

recombinantes contendo a etiqueta de histidinas foram, então, purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA (*nitrilo-tri-acetic acid*) (cromatografia de afinidade por quelante de íons metálicos). O NTA interage com os íons níquel (Ni^{2+}) e estes com a etiqueta de seis resíduos de histidina. Em seguida, as proteínas recombinantes eluídas da coluna de níquel foram purificadas através de gel preparativo seguido de eletroeluição. Para confirmar a purificação, as frações obtidas a partir da purificação em coluna de níquel e da eletroeluição foram aplicadas em gel de poliacrilamida que, em seguida, foi corado com azul de Coomassie ou utilizado para ensaios de *Western blotting* com anticorpo anti-histidina (figura 8 – B, C e D). Dessa forma, as proteínas TcGAP2, TcWW e TcATXN2 foram purificadas em quantidades suficientes para imunização de camundongos e coelhos, objetivando a obtenção de anticorpo policlonal específico contra as proteínas selecionadas.

4.2. ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

Posteriormente à purificação das proteínas recombinantes, foram realizadas inoculações em camundongos e coelhos para a produção de anticorpos policlonais específicos contra as mesmas. Previamente às inoculações em camundongos, uma pequena quantidade de soro foi retirada dos animais (pré-imune) com a finalidade de verificar se estes não possuíam anticorpos que reconheçam proteínas de *T. cruzi* (figura 9A – colunas 5 e 6). A especificidade de cada anti-soro para a proteína recombinante e para a proteína nativa de *T. cruzi* foi avaliada por ensaios de *Western blotting* (figura 9). Todos os anti-soros tiveram reatividade confirmada contra a proteína recombinante (figura 9 – colunas 1 e 2). A proteína recombinante GAP2 foi expressa inteira e fusionada a uma cauda de histidinas o que acarreta num aumento de aproximadamente 8 kDa no tamanho original de 50 kDa. Já para a obtenção dos anticorpos contra as proteínas recombinantes WW e ATXN2, foram utilizadas apenas regiões entre 30 e 40 kDa.

Os anti-soros contra a proteína TcGAP2 produzidos tanto em camundongos quanto em coelhos demonstraram claramente a presença de uma banda única de tamanho esperado, aproximadamente 50 kDa, em epimastigotas em fase

exponencial de crescimento (figuras 9 A e B). Os ensaios utilizando extratos de *T. cruzi* mostraram que o anti-soro contra a proteína TcATXN2 produzido em camundongo reconheceu uma única proteína, porém esta não apresentou o tamanho esperado de 60 kDa (figura 9A – colunas 3, 4, 7 e 8). Vários anti-soros foram produzidos contra diferentes regiões desta proteína, porém apenas a região entre os aminoácidos 252 e 546 induziu a produção de anticorpos que reconhecessem apenas uma proteína de *T. cruzi*. Já os anti-soros contra a proteína TcWW produzidos em camundongos e em coelhos reconheceram uma proteína de tamanho esperado (182 kDa), porém geraram resultados pouco satisfatórios, reconhecendo algumas proteínas inespecíficas de *T. cruzi* (figuras 9 A e B – colunas 3 e 4). Isto pode ser consequência de degradação ou de reação cruzada. O anti-soro será posteriormente purificado através de incubação com a proteína recombinante. Assim, resolvemos prosseguir o trabalho apenas com a proteína TcGAP2.

Ensaio de *Western blotting* também foram realizados com extratos protéicos das formas epimastigotas de três dias de cultivo, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas aderidos por 24 horas e tripomastigotas metacíclicos para análise da expressão das proteínas TcGAP2 e TcATXN2 ao longo da metaciclogênese. A expressão da proteína TcGAP2 diminui nas formas tripomastigotas metacíclicas (figura 10 – à esquerda). Já a proteína ATXN2 mostrou uma expressão constitutiva ao longo da metaciclogênese (figura 10 – à direita). Estes ensaios de *Western blotting* foram realizados de acordo com o número de células (5×10^6 células) e, como normalizador, foi utilizado o anticorpo policlonal contra a proteína actina. Este anti-soro foi gentilmente cedido pela doutoranda Lígia Kalb.

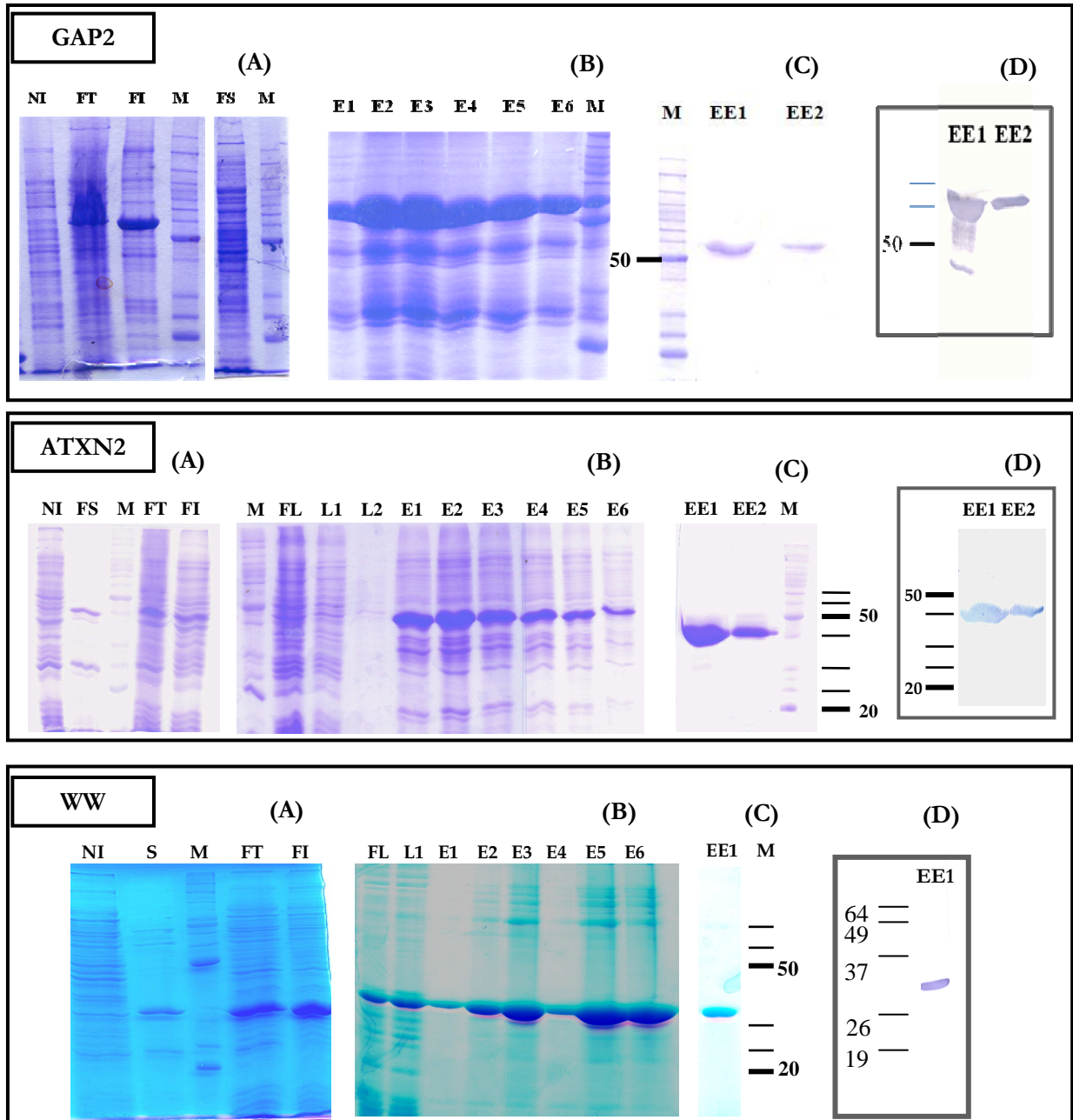


Figura 8 – Expressão e purificação das proteínas recombinantes GAP2, ATXN2 e WW. (A) Gel SDS-PAGE corado com Coomassie blue mostrando as frações do teste de indução da expressão das proteínas recombinantes em sistema heterólogo utilizando o vetor de expressão pDESTTM17; (B) Gel SDS-PAGE corado com Coomassie blue mostrando amostras coletadas ao longo do processo de purificação em coluna de níquel; (C) Gel SDS-PAGE corado com Coomassie blue mostrando as proteínas eletroeluídas; (D) Ensaio de *Western blotting* utilizando o anticorpo anti-histidina. M = marcador de massa molecular em kDa (*BenchMarkTM Protein Ladder*), NI = extrato de bactéria não-induzido com IPTG, FT = fração total, FI = fração insolúvel, FS = fração solúvel, FL = *flow-through*, L1-L2 = lavados, E1-E6 = material eluído da coluna com imidazol, EE1-EE2 = material eluído purificado por eletroeluição.

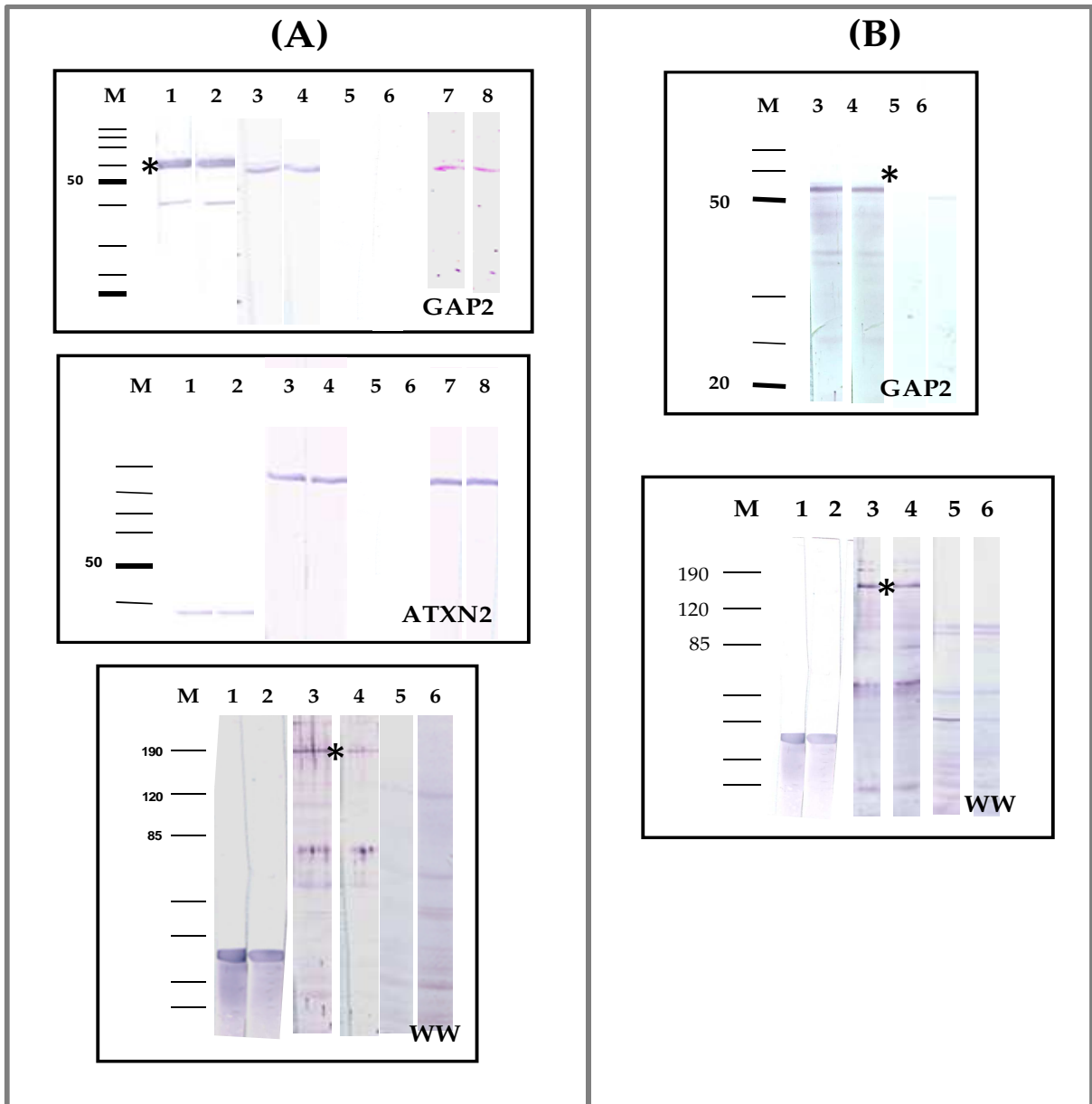


Figura 9 - Ensaio de *Western blotting* para análise da especificidade dos anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes. (A) Anticorpos produzidos em camundongos contra as proteínas TcGAP2, TcATXN2 e TcWW: 1 e 2 – proteína recombinante; 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – extratos protéicos de epimastigotas. Diluições dos soros imunes, pré-imunes e lavado peritoneal de TcGAP2: 1, 2, 3 e 4 – soro imune 1:3000; 5 e 6 – soro pré-imune 1:500, 7 e 8 – lavado peritoneal 1:500. Diluições dos soros imunes, pré-imunes e lavado peritoneal de TcATXN2: 1, 2, 3 e 4 – soro imune 1:800; 5 e 6 – soro pré-imune 1:250; 7 e 8 - lavado peritoneal 1:100. Diluições dos soros imunes e pré-imunes TcWW: 1, 2, 3 e 4 – soro imune 1:100; 5 e 6 – soro pré-imune 1:100. (B) Anticorpos produzidos em coelhos contra as proteínas TcGAP2 e TcWW: 1 e 2 – proteína recombinante; 3, 4, 5 e 6 – extratos protéicos de epimastigotas. Diluições dos soros imunes e pré-imunes de TcGAP2: 1, 2, 3 e 4 – soro imune 1:1000; 5 e 6 – soro pré-imune 1:500. Diluições dos soros imunes e pré-imunes TcWW: 1, 2, 3 e 4 – soro imune 1:100, 5 e 6 – soro pré-imune 1:100.

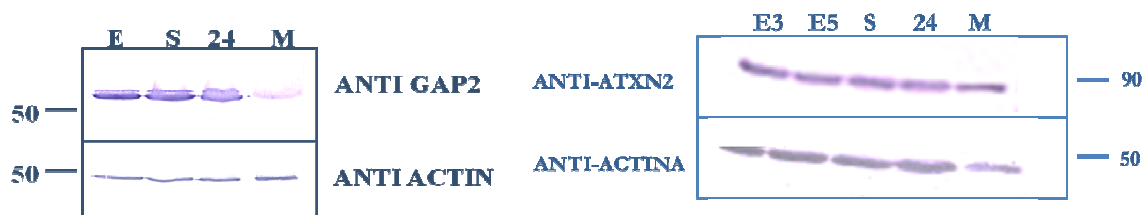


Figura 10 - Análise da expressão das proteínas TcGAP2 e TcATXN2 durante a metaciclogênese. Os extratos foram analisados por *Western blotting* com o soro imune contra estas proteínas. O soro contra a proteína TcGAP2 foi utilizado na diluição de 1:3000, contra a proteína TcATXN2 foi de 1:800 e contra actina foi de 1:400. (E) extrato de epimastigota de três (E3) ou de cinco dias (E5) de cultivo; (S) epimastigotas sob estresse nutricional; (24) extrato de epimastigotas aderidos por 24 horas; (M) extrato de tripomastigotas metacíclicos.

4.3. A PROTEÍNA TcGAP2 ESTÁ ASSOCIADA A POLISSOMOS EM EPIMASTIGOTAS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

Como a proteína TcGAP2 foi identificada na fração enriquecida em polissomos em epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2010), investigamos se os complexos contendo a proteína TcGAP2 seriam polissomos. Para isso, analisamos o perfil de sedimentação e a distribuição desta proteína em gradientes de densidade de sacarose (15-55%). Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e epimastigotas sob estresse nutricional foram tratados com cicloheximida e puromicina, lisados e adicionados nos gradientes e centrifugados a 192.000 x g por duas horas a 4 °C e em ultracentrífuga *Beckman* com rotor SW40. As frações foram coletadas e analisadas por *Western blotting* utilizando o anti-soro contra a proteína TcGAP2.

Um perfil de sedimentação típico de polissomos foi obtido quando formas epimastigotas foram tratadas com cicloheximida, uma droga que inibe a função do fator de tradução eEF2, que está envolvido na translocação do peptidil-tRNA do sítio A do ribossomo para o sítio P, bloqueando dessa maneira a elongação da tradução e mantendo os ribossomos associados ao mRNA. Neste gradiente, a proteína TcGAP2 foi detectada nas frações leves até a fração correspondente aos monossomos (figura 11 – superior esquerdo). A proteína TcGAP2 não foi portanto detectada nas frações mais pesadas correspondentes a polissomos e outros complexos pesados, como havia sido na fração enriquecida em polissomos de

epimastigotas no trabalho de Alves e colaboradores. Entretanto, TcGAP2 foi identificada apenas em uma das três réplicas biológicas (ALVES, 2010), podendo, dessa forma, estar presente em pequenas quantidades na fração enriquecida em polissomos de epimastigotas, sendo incapaz de ser detectada por ensaios de *Western blotting* a partir de frações obtidas de gradientes de sacarose.

Já nos gradientes de epimastigotas sob estresse nutricional tratados com cicloheximida, os polissomos foram menores e menos abundantes, confirmando uma diminuição nos níveis de tradução que ocorre nestas formas. Neste caso, a proteína TcGAP2 estava presente desde as frações leves até a fração correspondente aos polissomos com dois ribossomos (figura 11 – superior direito).

Para os ensaios de dissociação dos polissomos, epimastigotas submetidos a estresse nutricional foram tratados com puromicina, um antibiótico que causa a liberação prematura da cadeia polipeptídica em construção no ribossomo, e lisados obtidos a partir de parasitas tratados com cicloheximida foram tratados com EDTA, um quelante de íons divalentes. Nestes ensaios, um perfil de dissociação característico foi obtido e a distribuição de TcGAP2 nos gradientes de sacarose foi deslocada para as frações mais leves (figura 11 – inferior).

Para todos os ensaios de *Western blotting*, foi utilizado o anti-soro contra a proteína da subunidade ribossomal menor S7 como controle. Este anti-soro foi gentilmente cedido pela Dra. Daniela Gradia.

camundongo para esta proteína. A proteína TcGAP2 está presente predominantemente no cinetoplasto tanto em epimastigotas quanto em epimastigotas sob estresse nutricional (figura 12). Porém, pode-se observar também uma marcação no citoplasma. As formas não-replicativas e infectivas tripomastigotas metacíclicas apresentaram uma marcada diminuição da intensidade de fluorescência quando comparadas às formas epimastigotas (figura 12), corroborando com os dados de expressão protéica, onde os níveis de TcGAP2 estão diminuídos nestas formas infectivas (figura 10). O soro pré-imune não apresentou especificidade contra esta proteína (figura 12).

Como a marcação de TcGAP2 tinha um padrão diferente no cinetoplasto dependendo do parasita observado (figura 12) e esse padrão se assemelhava com a dinâmica dos minicírculos ao longo da replicação, analisamos a distribuição de TcGAP2 em relação à localização de minicírculos em replicação. Antes da replicação, os minicírculos estão todos covalentemente fechados. Durante a fase S, eles são liberados da rede de kDNA, através da formação de excisões (*nicks*), e se direcionam para a periferia para serem replicados. Assim, podemos identificar duas zonas: a zona central, que contém minicírculos fechados que ainda não replicaram, e a periferia, que contém minicírculos com *nicks* que replicaram ou estão sendo replicados. Ao final da fase S, após todos os minicírculos terem sido replicados, os *nicks* são reparados e as redes duplicadas são segregadas durante a divisão celular (revisto por Shapiro & Englund, 1995). O kDNA cortado pode ser marcado *in situ* com dUTP conjugado a um fluoróforo usando a *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT). Enquanto minicírculos não replicados estão covalentemente fechados, minicírculos que tenham completado sua replicação estão cortados e, assim, são seletivamente marcados por dUTP fluorescente. Desta forma, observamos uma co-localização parcial de TcGAP2 com minicírculos que sofreram replicação (figura 13).

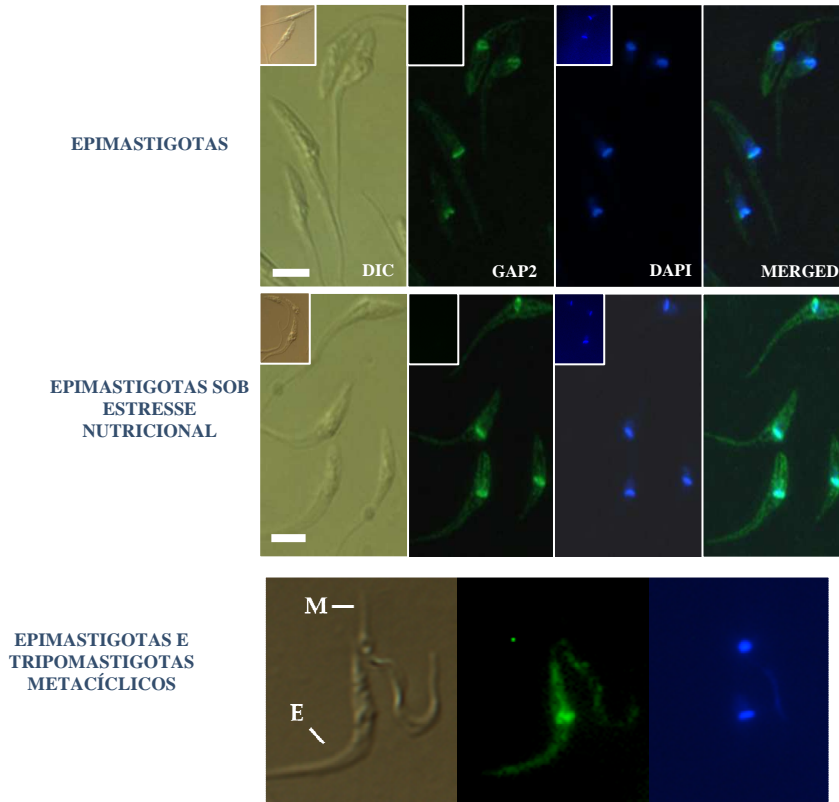


Figura 12 – Localização subcelular da proteína TcGAP2 por imunofluorescência. Ensaio de imunofluorescência com as formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicos utilizando o anti-soro contra a proteína TcGAP2. O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. As imagens correspondentes em contraste de fase (DIC) estão mostradas e as imagens sobrepostas (*merged*) de TcGAP2 e DAPI estão à direita. No topo de cada imagem, a imunofluorescência utilizando o soro pré-imune está mostrada. Diluição do soro imune e pré-imune de 1:150. Barras, 5 μ m.

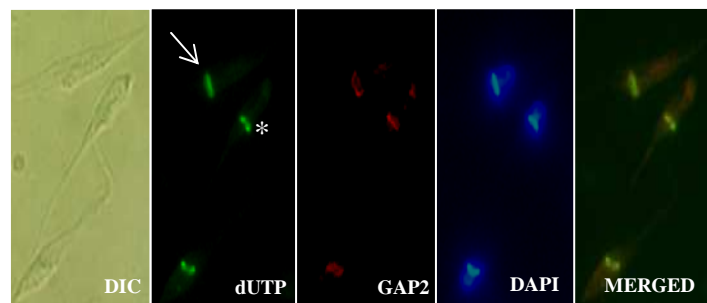


Figura 13 –Imunofluorescência de TcGAP2 em epimastigotas marcados *in situ* com dUTP-FITC. dUTP-FITC foi incorporado em minicírculos com *gaps*, decorrentes de replicação, pela TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) seguido por imunofluorescência com anticorpos contra a proteína TcGAP2 e com DAPI. As imagens de contraste de fase correspondentes estão mostradas e as imagens de TcGAP2 e dUTP-FITC estão à direita. (→) cinetoplasto após replicação; (*) cinetoplasto em fase final de replicação.

4.5. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Com o intuito de definir melhor a localização subcelular de TcGAP2, foi realizada uma imuno-eletromicroscopia de transmissão utilizando o soro contra a proteína TcGAP2 produzido em camundongo. Podemos observar que a proteína está localizada no cinetoplasto, como revelado anteriormente pela microscopia de fluorescência, e que a marcação de TcGAP2 está distribuída por todo o cinetoplasto (figura 14 – A e B). Outro ponto importante a ressaltar é a localização desta proteína também no citoplasma, fato também revelado pela microscopia de fluorescência (figura 14 – A e B). Os cortes ultra-finos foram incubados com o anticorpo secundário, na ausência do anticorpo primário, como controle e não mostrou reatividade (figura 14 – C).

4.6. IDENTIFICAÇÃO DOS mRNAs PRESENTES EM COMPLEXOS CONTENDO TcGAP2

Com o objetivo de identificar os mRNAs alvo da proteína TcGAP2, foram realizados experimentos de imunoprecipitação com o anti-soro produzido em camundongo contra a mesma. Para tanto, foram utilizados extratos de epimastigotas em fase exponencial de crescimento e de epimastigotas sob estresse nutricional. Para cada um dos grupos (epimastigotas e estresse), foram realizadas três réplicas de imunoprecipitação e, como controle, foram utilizados *pools* de soros pré-ímmunes de diversos camundongos, incluindo o referente ao camundongo utilizado para imunização da proteína TcGAP2, do qual foi obtido o anti-soro utilizado neste trabalho. As imunoprecipitações para o experimento do seqüenciamento foram realizadas com anti-soros produzidos contra proteínas de localizações e funções totalmente diferentes, sendo que na mesma lâmina existiam experimentos referentes a diferentes projetos. Partindo do princípio que os experimentos não deveriam ser relacionados, mRNAs identificados comuns a todos estes experimentos poderiam ser contaminantes inespecíficos e também foram retirados das análises.

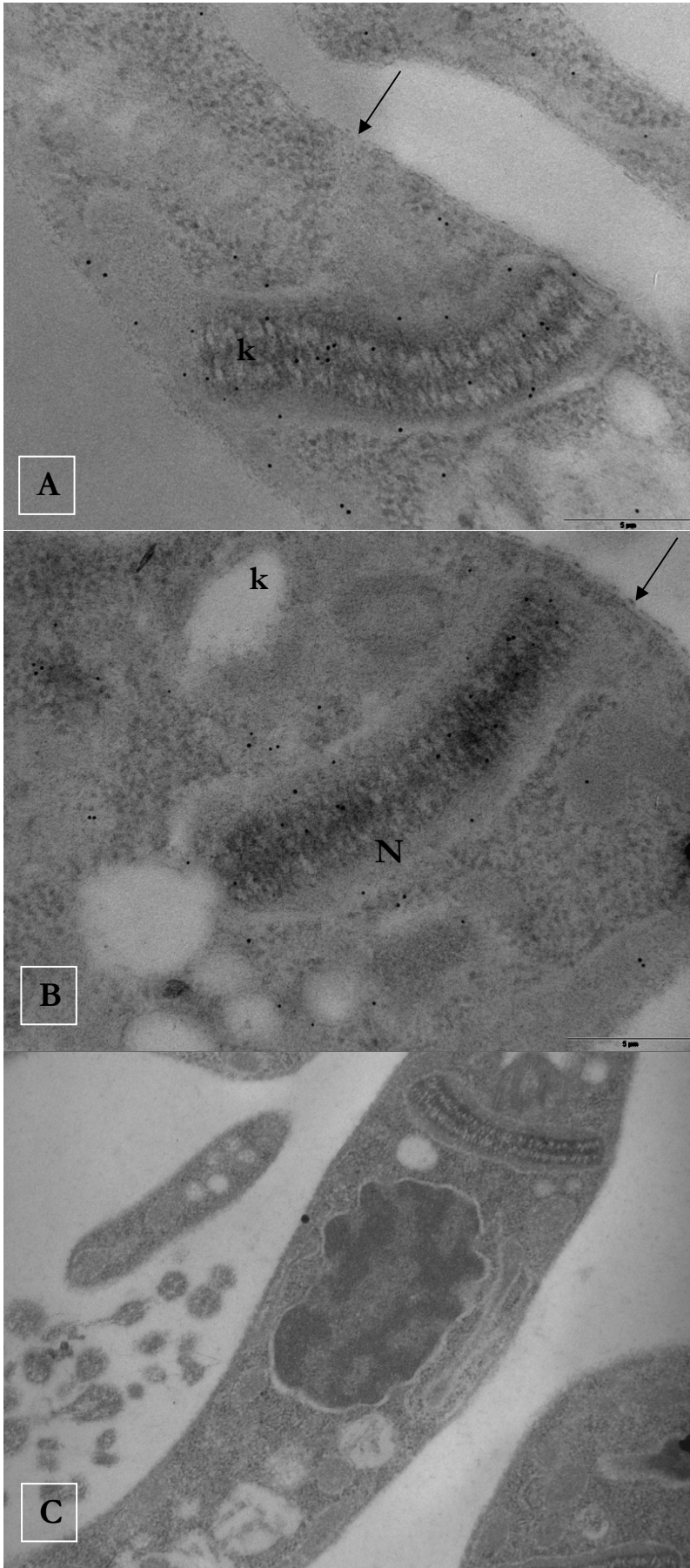


Figura 14 – Imunolocalização de TcGAP2 por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas em fase exponencial de crescimento. (A) e (B) Incubação dos cortes ultrafinos com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 (1:50) seguido do anticorpo secundário conjugado a microesferas de ouro (1:250). (C) Controle negativo omitindo o anticorpo primário e utilizando somente o anticorpo secundário conjugado a microesferas de ouro. k = cinetoplasto; N = núcleo; seta = membrana plasmática

Para obter a lista de RNAs associados à proteína TcGAP2, foram utilizados dois critérios de análises, um deles sendo um valor de FDR (*False Discovery Rate*) de 1%. Com relação ao segundo critério, primeiramente, foram selecionados alvos que não foram identificados nos respectivos controles (soro pré-imune), sendo considerada uma condição mais estrigente de análise (quadros 2 e 3 – em cinza). Em outro momento, as análises foram menos estridentes, considerando alvos com um *fold change* (FC) de quatro vezes ou mais em relação aos respectivos controles (quadros 2 e 3). Em termos práticos, o FDR revela a proporção esperada de falsos positivos entre os RNAs designados. Assim, assumimos que dentre os RNAs que apresentavam um padrão significativo de aumento de quatro vezes entre as amostras analisadas, a taxa de descoberta falsa ou a proporção de falsos positivos é de 1%.

Levando em consideração as análises mais estridentes, foram identificados 31 mRNAs distintos nas imunoprecipitações com extratos de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (quadro 2), enquanto nas imunoprecipitações com extratos de epimastigotas sob estresse nutricional, foram identificados 39 mRNAs distintos (quadro 3). A maior parte dos mRNAs associados à proteína TcGAP2 codificam proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas (aproximadamente 50%), além de transcritos codificadores de mucinas e MASPs (*mucin associated protein*).

ID	Descrição	FC
Tc00.1047053400681.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	1,798E+308
Tc00.1047053511467.13	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053511807.36	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053507907.55	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (pseudogene), putative	1,798E+308
Tc00.1047053507907.55	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053503685.5	RNA-binding protein, putative	1,798E+308
Tc00.1047053509545.50	Mucin-associated surface protein (MASP), putative	1,798E+308
Tc00.1047053509733.40	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053511735.30	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053509755.70	Mucin TcMUCII, putative	1,798E+308
Tc00.1047053431849.10	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053509779.40	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053507625.183	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053509527.154	Mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	1,798E+308
Tc00.1047053510315.30	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053506139.100	Mucin TcMUCII, putative	1,798E+308

Tc00.1047053504929.10	casein kinase, delta isoform, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510065.50	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053420989.10	protein phosphatase 2C, putative	1,798E+308
Tc00.1047053508471.10	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053510031.20	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053503981.9	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	1,798E+308
Tc00.1047053511605.90	Mucin TcMUCII, putative	1,798E+308
Tc00.1047053511893.10	ribonuclease inhibitor, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510659.4	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053510749.30	phosphoinositide-binding protein, putative	1,798E+308
Tc00.1047053506181.150	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053508987.30	protein kinase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053511543.10	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053503431.70	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053511779.31	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053509551.110	hypothetical protein, conserved	18,724617
Tc00.1047053511429.30	hypothetical protein, conserved	18,1800764
Tc00.1047053508273.40	hypothetical protein, conserved	15,9694414
Tc00.1047053506247.240	hypothetical protein, conserved	14,7913482
Tc00.1047053508989.100	hypothetical protein, conserved	12,9032755
Tc00.1047053506357.190	hypothetical protein, conserved	11,3831726
Tc00.1047053507089.140	hypothetical protein, conserved	11,1806418
Tc00.1047053509505.80	hypothetical protein, conserved	10,8126719
Tc00.1047053508175.170	hypothetical protein, conserved	10,5559114
Tc00.1047053504137.130	hypothetical protein, conserved	10,0883043
Tc00.1047053506559.524	protein phosphatase 2C, putative	9,11274198
Tc00.1047053510131.50	DNA polymerase kappa, putative, DNA polymerase IV, putative	9,0186706
Tc00.1047053506181.140	hypothetical protein	8,77241869
Tc00.1047053506025.30	hypothetical protein, conserved	8,51953755
Tc00.1047053506989.70	Flagellar radial spoke protein-like, putative	8,51953755
Tc00.1047053510159.19	hypothetical protein, conserved	8,06176426
Tc00.1047053506665.20	hypothetical protein	8,02040451
Tc00.1047053506459.280	hypothetical protein, conserved	7,81787368
Tc00.1047053508871.40	mucin-associated surface protein (MASP), putative	7,81787368
Tc00.1047053506413.50	hypothetical protein, conserved	7,7238023
Tc00.1047053510297.10	hypothetical protein, conserved	7,44990384
Tc00.1047053508355.250	60S acidic ribosomal protein P0	7,43779291
Tc00.1047053503809.100	GUP1, putative	7,37297036
Tc00.1047053420719.9	protein kinase, putative	7,22466925
Tc00.1047053509349.30	hypothetical protein	7,13475571
Tc00.1047053511907.220	hypothetical protein, conserved	7,02213842
Tc00.1047053503847.30	hypothetical protein, conserved	6,98645461
Tc00.1047053507785.10	clathrin heavy chain, putative	6,97469871
Tc00.1047053410243.10	hypothetical protein, conserved	6,82680162

Tc00.1047053503629.10	hypothetical protein, conserved	6,82440361
Tc00.1047053507143.50	hypothetical protein, conserved	6,74823996
Tc00.1047053508965.80	hypothetical protein, conserved	6,72553621
Tc00.1047053507715.100	hypothetical protein, conserved	6,72553621
Tc00.1047053509157.279	Chaperonin HSP60 mitochondrial precursor, putative	6,72553621
Tc00.1047053511033.10	hypothetical protein, conserved	6,70120427
Tc00.1047053506577.130	protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	6,67316177
Tc00.1047053506697.70	hypothetical protein, conserved	6,45163775
Tc00.1047053457101.10	hypothetical protein, conserved	6,33902046
Tc00.1047053509751.28	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	6,11491009
Tc00.1047053510311.100	hypothetical protein, conserved	5,88499443
Tc00.1047053510575.5	proton motive ATPase, putative	5,5432852
Tc00.1047053511737.60	hypothetical protein, conserved	5,45337166
Tc00.1047053507163.75	hypothetical protein	5,27064996
Tc00.1047053510265.4	hypothetical protein, conserved	5,15676945
Tc00.1047053507739.59	hypothetical protein, conserved	5,15676945
Tc00.1047053503411.20	hypothetical protein, conserved	5,05550403
Tc00.1047053503479.70	hypothetical protein, conserved	4,93072077
Tc00.1047053510357.40	hypothetical protein, conserved	4,90720293
Tc00.1047053507537.20	Cysteine peptidase, putative,cysteine peptidase, clan CA, family C1, cathepsin L-like, putative	4,8984281
Tc00.1047053474341.9	dynein heavy chain, putative	4,87157416
Tc00.1047053509995.29	hypothetical protein, conserved	4,85728962
Tc00.1047053458309.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	4,81789663
Tc00.1047053510973.30	40S ribosomal protein S13, putative	4,72611102
Tc00.1047053507539.20	hypothetical protein, conserved	4,65763641
Tc00.1047053505807.270	Ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	4,65763641
Tc00.1047053506773.40	3-methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta subunit, putative	4,65763641
Tc00.1047053510975.40	hypothetical protein, conserved	4,41747702
Tc00.1047053511907.70	Short chain dehydrogenase/reductase, putative	4,40806988
Tc00.1047053506479.39	serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	4,40806988
Tc00.1047053510659.180	hypothetical protein, conserved	4,40806988
Tc00.1047053508355.110	hypothetical protein	4,39239132
Tc00.1047053506303.130	hypothetical protein, conserved	4,39239132
Tc00.1047053507041.20	hypothetical protein, conserved	4,39239132
Tc00.1047053511393.20	Rhomboid-like protein, putative,serine peptidase, Clan S-, family S54, putative	4,39022798
Tc00.1047053506435.30	Mitochondrial DNA polymerase I protein A, putative	4,39022798
Tc00.1047053508895.60	RNA-binding protein, putative	4,28002186
Tc00.1047053510877.10	antigenic protein, putative	4,26382993
Tc00.1047053510335.30	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	4,21424226
Tc00.1047053508909.270	hypothetical protein, conserved	4,18561822
Tc00.1047053509331.134	Trypanothione synthetase, putative	4,15850336
Tc00.1047053506341.20	hypothetical protein, conserved	4,15850336

Tc00.1047053506435.40	hypothetical protein, conserved	4,15850336
Tc00.1047053503395.40	60S ribosomal protein L18, putative	4,06187442
Tc00.1047053425855.9	hypothetical protein, conserved66	4,0337201
Tc00.1047053510101.140	Pyruvate phosphate dikinase, putative	4,01587819
Tc00.1047053509607.70	serine/threonine protein kinase, putative,protein kinase, putative	4,01424077

Quadro 2 – mRNAs presentes em complexos contendo a proteína TcGAP2 em epimastigotas.

ID	Descrição	FC
Tc00.1047053506315.50	60S ribosomal protein L13a, putative	1,798E+308
Tc00.1047053504147.20	60S ribosomal protein L18, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510719.160	60S ribosomal protein L22, putative	1,798E+308
Tc00.1047053474937.9	acetyl-CoA carboxylase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053503939.10	acetyltransferase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053504575.40	adrenodoxin precursor, putative	1,798E+308
Tc00.1047053506213.120	ATP-dependent RNA helicase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053506739.90	ATP-dependent RNA helicase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053511771.30	Beta galactofuranosyl glycosyltransferase (pseudogene), putative	1,798E+308
Tc00.1047053425473.50	C/D small nucleolar RNA (snoRNA), TB11C4C1	1,798E+308
Tc00.1047053508207.240	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic, putative	1,798E+308
Tc00.1047053506387.9	chaperone DnaJ protein, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510089.219	Diacylglycerol acyltransferase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053507757.60	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510729.130	DNA replication factor, putative	1,798E+308
Tc00.1047053503521.30	Dynein light chain, putative	1,798E+308
Tc00.1047053506563.20	exosome-associated protein 1, putative,RRP42 homologue, putative,RNasePH-like protein, putative	1,798E+308
Tc00.1047053507713.30	Heat shock protein 85, putative	1,798E+308
Tc00.1047053510819.60	Heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU, putative	1,798E+308
Tc00.1047053498829.21	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053506451.35	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053508293.70	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053508979.90	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053510863.9	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053511057.50	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053511695.10	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053511215.30	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053509875.110	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053511603.480	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053506919.10	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053503967.19	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053506951.103	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053508439.40	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053506763.370	hypothetical protein	1,798E+308
Tc00.1047053510217.10	hypothetical protein	1,798E+308

Tc00.1047053427789.10	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053504003.50	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053504625.80	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053506473.10	hypothetical protein, conserved	1,798E+308
Tc00.1047053506947.100	hypothetical protein, conserved	17,2598561
Tc00.1047053507023.130	hypothetical protein, conserved	15,4798059
Tc00.1047053507049.190	hypothetical protein, conserved	14,4369586
Tc00.1047053507737.10	hypothetical protein, conserved	14,0292973
Tc00.1047053507765.50	hypothetical protein, conserved	13,1404111
Tc00.1047053509551.40	hypothetical protein, conserved	12,7327499
Tc00.1047053509695.110	hypothetical protein, conserved	12,2824933
Tc00.1047053510289.99	hypothetical protein, conserved	12,1734054
Tc00.1047053510309.10	hypothetical protein, conserved	11,8771101
Tc00.1047053510359.160	hypothetical protein, conserved	11,7989905
Tc00.1047053510359.250	hypothetical protein, conserved	11,7657442
Tc00.1047053510963.5	hypothetical protein, conserved	10,5024431
Tc00.1047053511003.180	hypothetical protein, conserved	10,3163746
Tc00.1047053506821.120	hypothetical protein, conserved	10,1729014
Tc00.1047053510183.30	hypothetical protein, conserved	10,1359155
Tc00.1047053511819.20	hypothetical protein, conserved	9,876606
Tc00.1047053506425.70	hypothetical protein, conserved	9,42634946
Tc00.1047053506943.20	hypothetical protein, conserved	8,9428466
Tc00.1047053506303.30	hypothetical protein, conserved	8,68447202
Tc00.1047053508895.89	hypothetical protein, conserved	8,64655122
Tc00.1047053508505.4	hypothetical protein, conserved	8,6133049
Tc00.1047053511899.20	hypothetical protein, conserved	8,6133049
Tc00.1047053506327.50	hypothetical protein, conserved	8,35025584
Tc00.1047053503829.40	hypothetical protein, conserved	8,31700952
Tc00.1047053504741.70	hypothetical protein, conserved	8,12980205
Tc00.1047053508839.20	hypothetical protein, conserved	7,64837754
Tc00.1047053504741.200	hypothetical protein, conserved	7,55269545
Tc00.1047053506205.10	hypothetical protein, conserved	7,35000381
Tc00.1047053511421.230	hypothetical protein, conserved	7,31675749
Tc00.1047053507521.100	hypothetical protein, conserved	7,16279634
Tc00.1047053506797.40	hypothetical protein, conserved	7,16279634
Tc00.1047053511751.70	hypothetical protein, conserved	7,09162922
Tc00.1047053508641.110	hypothetical protein, conserved	7,05370843
Tc00.1047053508741.360	hypothetical protein, conserved	6,86650096
Tc00.1047053508153.670	hypothetical protein, conserved	6,77289722
Tc00.1047053503479.40	hypothetical protein, conserved	6,76773583
Tc00.1047053510303.230	hypothetical protein, conserved	6,57020557
Tc00.1047053507521.10	hypothetical protein, conserved	6,55358242
Tc00.1047053506989.309	hypothetical protein, conserved	6,09522177
Tc00.1047053509233.210	hypothetical protein, conserved	6,08670272
Tc00.1047053504079.20	hypothetical protein, conserved	6,0534564

Tc00.1047053506559.210	hypothetical protein, conserved	6,0534564
Tc00.1047053506305.5	hypothetical protein, conserved	5,94380957
Tc00.1047053511661.20	hypothetical protein, conserved	5,91445299
Tc00.1047053511657.30	hypothetical protein, conserved	5,85850684
Tc00.1047053509145.10	hypothetical protein, conserved	5,82832813
Tc00.1047053511559.10	hypothetical protein, conserved	5,81170497
Tc00.1047053511577.160	hypothetical protein, conserved	5,62848039
Tc00.1047053503897.140	hypothetical protein, conserved	5,60319986
Tc00.1047053506717.4	hypothetical protein, conserved	5,60319986
Tc00.1047053510359.190	hypothetical protein, conserved	5,60319986
Tc00.1047053506739.20	hypothetical protein, conserved	5,60319986
Tc00.1047053508269.10	hypothetical protein, conserved	5,5865767
Tc00.1047053509625.20	hypothetical protein, conserved	5,5865767
Tc00.1047053511215.90	hypothetical protein, conserved	5,58103565
Tc00.1047053511109.20	hypothetical protein, conserved	5,56995354
Tc00.1047053506825.40	hypothetical protein, conserved	5,56704681
Tc00.1047053506303.130	hypothetical protein, conserved	5,53436999
Tc00.1047053482319.10	hypothetical protein, conserved	5,4179788
Tc00.1047053506265.114	hypothetical protein, conserved	5,28650109
Tc00.1047053506605.190	hypothetical protein, conserved	5,27365816
Tc00.1047053509769.36	hypothetical protein, conserved	5,27365816
Tc00.1047053507969.54	hypothetical protein, conserved	5,25122154
Tc00.1047053509549.110	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	5,08645069
Tc00.1047053511155.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	5,08645069
Tc00.1047053420495.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	5,08645069
Tc00.1047053506575.30	hypothetical protein, conserved (pseudogene),hypothetical protein, conserved, frameshit	4,97445605
Tc00.1047053511293.50	kinesin, putative	4,93636518
Tc00.1047053510533.180	microtubule-associated protein 1A/1B, light chain 3, putative	4,89782902
Tc00.1047053441241.10	microtubule-associated protein Gb4, putative	4,84469926
Tc00.1047053509023.130	minichromosome maintenance (MCM) complex subunit, putative	4,79336151
Tc00.1047053510519.30	mitochondrial structure specific endonuclease I (SSE-1), putative	4,79015531
Tc00.1047053508207.250	mitotic cyclin, putative	4,79015531
Tc00.1047053508113.14	mucin TcMUC (pseudogene), putative	4,79015531
Tc00.1047053508235.30	mucin TcMUCI, putative	4,77713538
Tc00.1047053506741.80	mucin TcMUCII, putative	4,6400698
Tc00.1047053507157.20	mucin TcSMUGL (pseudogene), putative	4,60671451
Tc00.1047053509527.154	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	4,56502704
Tc00.1047053511157.9	neurobeachin/beige protein, putative	4,54840388
Tc00.1047053427355.10	oligosaccharyl transferase subunit, putative	4,51526481
Tc00.1047053511317.79	OSM3-like kinesin, putative	4,4714233
Tc00.1047053503781.20	phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit C, putative	4,45324198
Tc00.1047053503823.169	protein kinase, putative	4,40541758

Tc00.1047053511657.20	protein kinase, putative	4,40025619
Tc00.1047053508215.3	protein kinase, putative	4,40025619
Tc00.1047053507275.10	protein kinase, putative	4,34223601
Tc00.1047053503673.9	protein kinase, putative	4,34223601
Tc00.1047053504625.99	protein tyrosine phosphatase, putative	4,32478681
Tc00.1047053511895.30	Receptor-type adenylate cyclase, putative	4,30665245
Tc00.1047053445777.10	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,30665245
Tc00.1047053511843.80	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,30665245
Tc00.1047053511005.10	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,30665245
Tc00.1047053453995.10	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	4,30665245
Tc00.1047053508039.10	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	4,28847113
Tc00.1047053458309.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	4,26921096
Tc00.1047053401131.10	ribosomal RNA small subunit, 5' & 3' partial	4,20788732
Tc00.1047053510149.140	RNA-binding protein, putative	4,18577674
Tc00.1047053427247.10	serine/threonine protein kinase, putative	4,16399133
Tc00.1047053503943.10	serine/threonine protein kinase, putative	4,15656694
Tc00.1047053508237.18	SNF2 DNA repair protein, putative	4,14917887
Tc00.1047053437575.18	transporter, putative	4,12364523
Tc00.1047053506961.35	trans-sialidase (pseudogene), putative	4,1091222
Tc00.1047053511081.15	trans-sialidase (pseudogene), putative	4,1091222
Tc00.1047053507771.120	trans-sialidase (pseudogene), putative	4,07598313
Tc00.1047053510431.300	trans-sialidase, putative	4,05658944
Tc00.1047053506909.100	trans-sialidase, putative	4,04671971
Tc00.1047053421321.9	tRNA exportin, putative	4,04671971
Tc00.1047053506885.270	tubulin tyrosine ligase, putative	4,02931747

Quadro 3 – mRNAs presentes em complexos contendo a proteína TcGAP2 em epimastigotas sob estresse nutricional.

Os transcritos identificados nos complexos que contêm a proteína TcGAP2, foram comparados com os dados obtidos na identificação de mRNAs presentes nas frações polissomais e pós-polissomais de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional (Alves, 2010) e com os estudos de genômica funcional realizados por Minning e colaboradores (2009), que analisaram os níveis de mRNAs das formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, ambos utilizando microarranjos de oligonucleotídeos. O resultado das comparações utilizando os dados de Minning e colaboradores não demonstrou, de forma geral, uma regulação dos transcritos associados à TcGAP2 ao longo do ciclo de vida, fato observado para a maioria dos transcritos já que para estes experimentos foi utilizado RNA total das células

(MINNING *et al.*, 2009). Já a comparação com os dados de Alves (2010) estão detalhadas na discussão desta tese.

4.7. ANÁLISE FUNCIONAL E BUSCA POR MOTIVOS CONSERVADOS DENTRE OS RNAs ASSOCIADOS À PROTEÍNA TcGAP2

A lista de RNAs gerados pela técnica de seqüenciamento em larga escala faz pouco sentido se não for traduzida de forma a melhorar a compreensão dos fenômenos biológicos observados. Com o objetivo de verificar quais processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares estão mais representadas, foi realizada uma análise por ontologia gênica (*Gene Ontology* ou GO). Em um primeiro momento, a análise dos resultados de seqüenciamento foi bastante rigorosa, sendo a linha de corte seqüências não identificadas no conjunto de dados dos respectivos controles negativos (imunoprecipitações com soros pré-ímmunes) e, ainda, com um FDR menor que 1%. Com essa análise mais conservadora, alguns resultados positivos podem ter sido omitidos, todavia, esta estratégia de análise aumenta a confiabilidade do experimento apesar de diminuir o número de RNAs identificados.

Os alvos identificados nas imunoprecipitações utilizando extrato de epimastigotas em fase de crescimento exponencial correspondem a mRNAs codificadores de proteínas relacionadas com processo metabólico, processo celular e regulação biológica para ontologia gênica de processo biológico (figura 15 – esquerda). Para a ontologia gênica de função molecular, os mRNA identificados codificam proteínas com atividade catalítica e de ligação (figura 16 – esquerda). Já para componente celular, os mRNAs identificados codificam proteínas que são parte da célula e de organelas ligadas a membranas (figura 17 – esquerda).

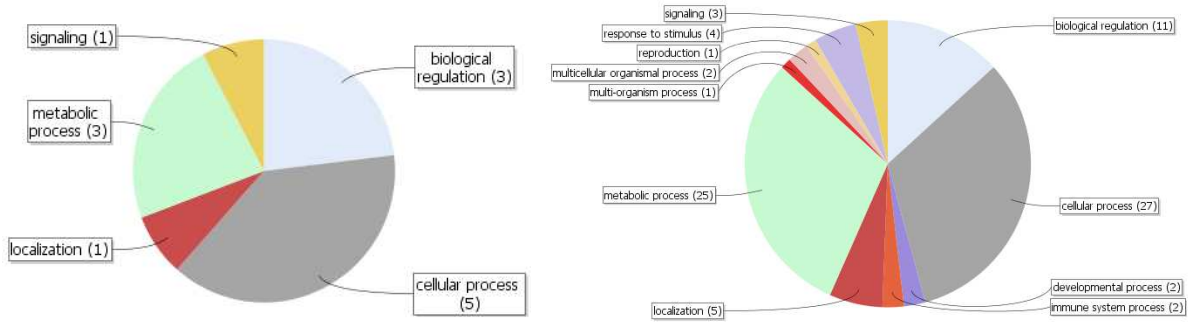


Figura 15 – Processo biológico dos alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

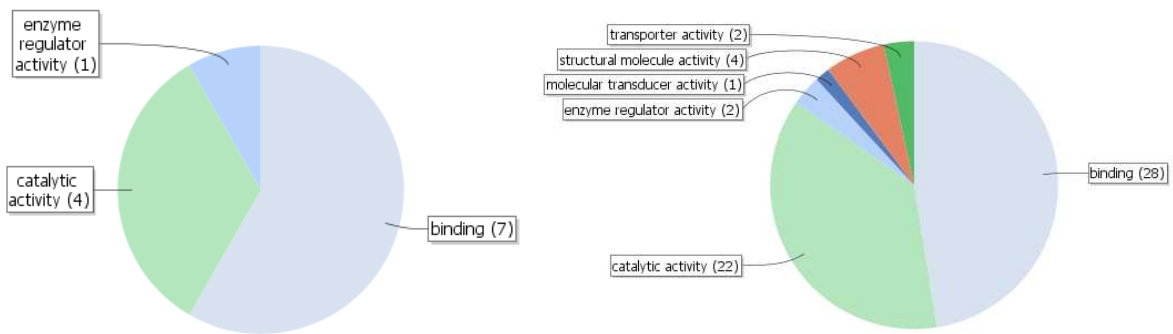


Figura 16 - Função molecular dos alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

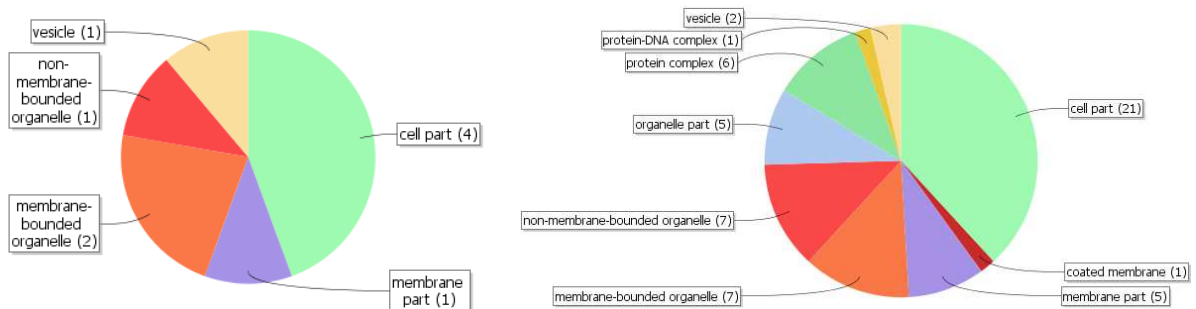


Figura 17 – Componente celular dos alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

Os alvos identificados nas imunoprecipitações utilizando extrato de epimastigotas submetidos a estresse nutricional correspondem a mRNAs codificadores de proteínas relacionadas com processo metabólico, processo celular e regulação biológica para ontologia gênica de processo biológico (figura 18 – esquerda). Para a ontologia gênica de função molecular, os mRNA identificados codificam proteínas com atividade catalítica e de ligação (figura 19 – esquerda). Já

para componente celular, os mRNAs identificados codificam proteínas que são parte da célula e de organelas ligadas a membranas (figura 20 – esquerda).

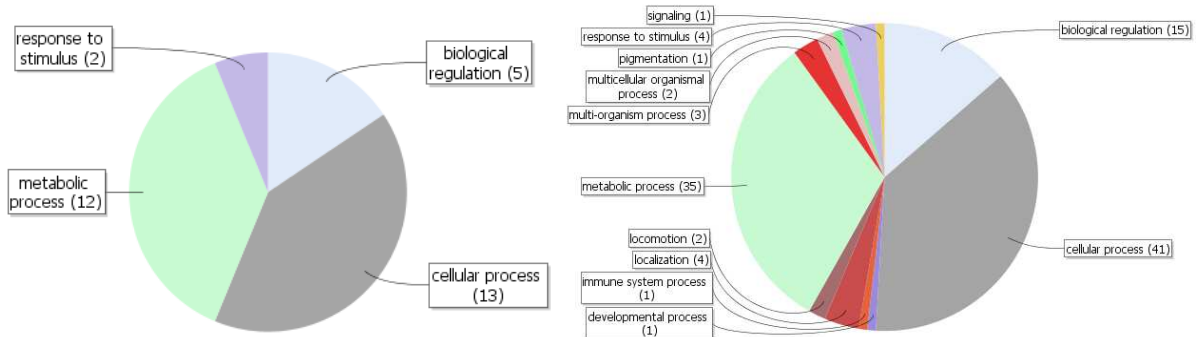


Figura 18 – Processo biológico dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

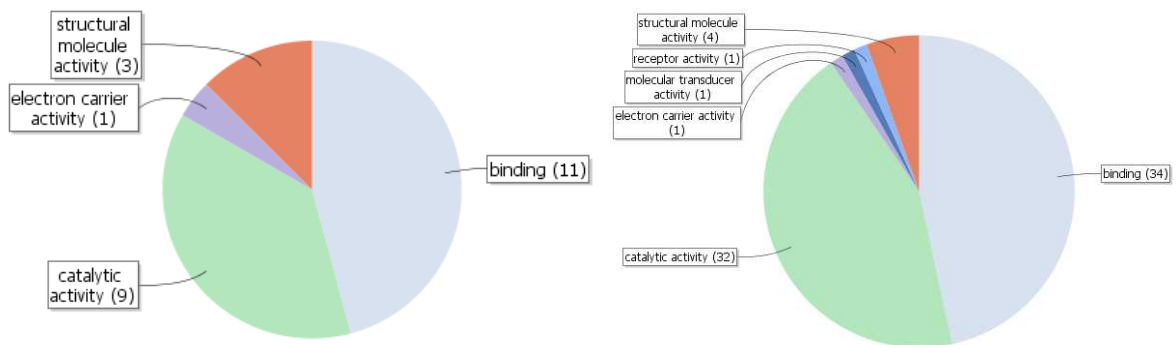


Figura 19 - Função molecular dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

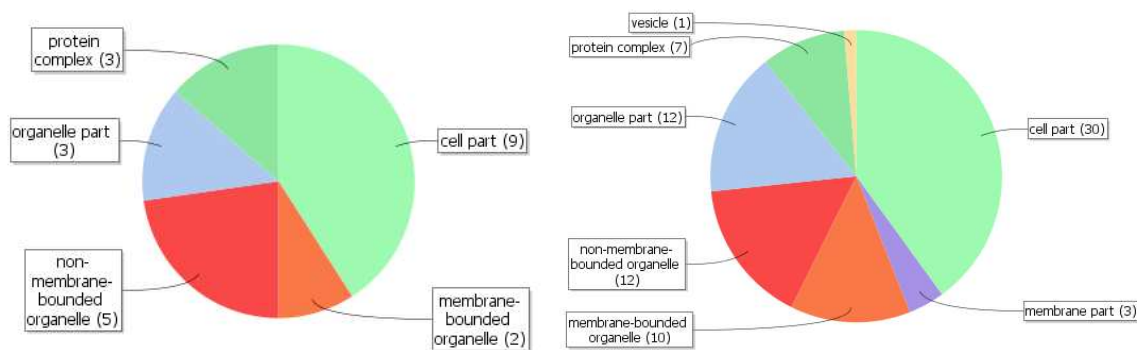


Figura 20 – Componente celular dos alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, alvos selecionados pelos critérios mais estridentes. À direita, alvos selecionados pelos critérios menos estridentes.

Num segundo momento, foi adicionado mais um critério para ampliar a lista de alvos e ver se mais componentes de uma determinada via ou função já

identificada aparecem nas análises. Para tanto, foi utilizado um valor de enriquecimento (FC) de quatro vezes em relação aos respectivos controles negativos, mantendo o FDR menor que 1%. Tanto para os alvos identificados utilizando extratos de epimastigotas quanto extratos de epimastigotas sob estresse nutricional, o perfil de ontologias gênicas se mantém de uma maneira geral, ampliando o número de alvos representando cada ontologia gênica (figuras 15 a 20 – à direita).

Outra maneira de visualizar os dados de ontologia gênica, é classificá-los independentemente dos níveis. Dessa forma, as funções moleculares mais enriquecidas dentre os alvos de TcGAP2 em epimastigotas são ligação a ATP, atividade quinase serina/treonina e ligação a ácido nucléico (figura 21). Já os processos biológicos incluem processo biosintético de auxina, fosforilação protéica, transporte mediado por vesícula, transporte protéico intracelular, transdução de sinal, desfosforilação protéica, processo metabólico e tradução (figura 22). Para componente celular, podemos observar uma maior representação de transcritos que codificam proteínas integrais de membrana, de mitocôndria, presentes no citoplasma e formadoras de complexos de fosforilação (figura 23).

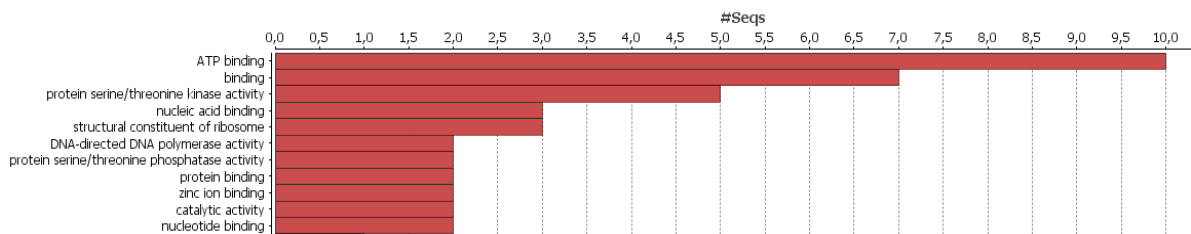


Figura 21 – Funções moleculares mais representadas dentre os alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

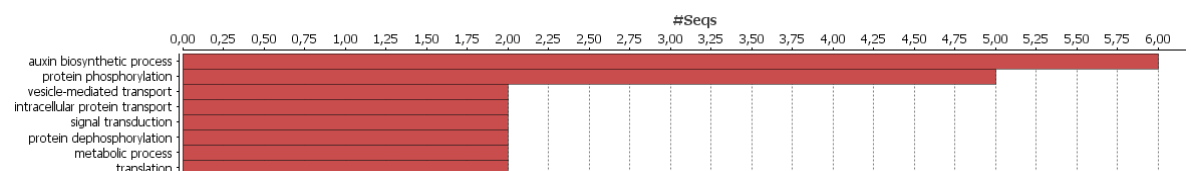


Figura 22 – Processos biológicos mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

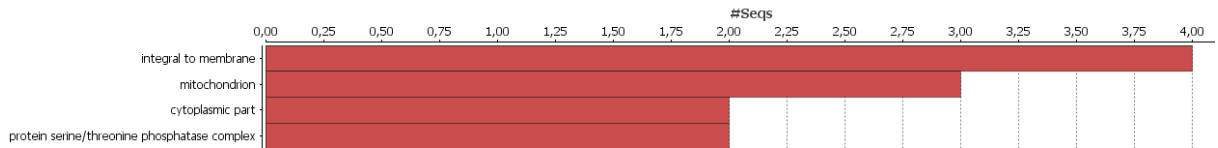


Figura 23 – Componentes celulares mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

Para os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional, as funções moleculares mais enriquecidas são ligação a ATP, atividade quinase serina/treonina, ligação a ácido nucléico, constituinte estrutural do ribossomo, atividade motora de microtúbulo, dentre outras (figura 24). Já os processos biológicos incluem processo biosintético de auxina, fosforilação protéica, transporte mediado por vesícula, transporte protéico intracelular, tradução, movimento baseado em microtúbulos, dentre outros (figura 25). Para componente celular, podemos observar uma maior representação de transcritos que codificam proteínas de membrana, integrais de membrana, de microtúbulo, de mitocôndria, dentre outros (figura 26).

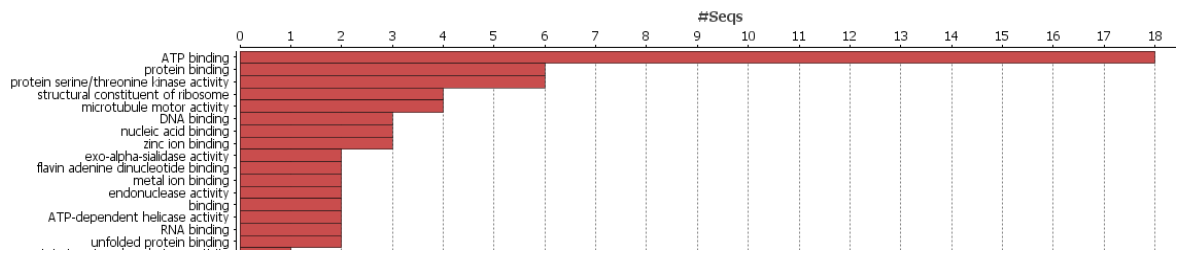


Figura 24 – Funções moleculares mais representadas dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

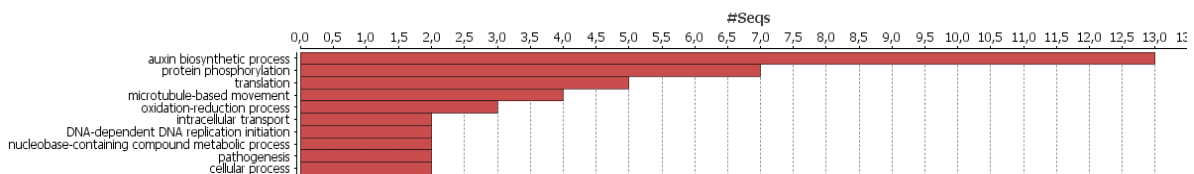


Figura 25 – Processos biológicos mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

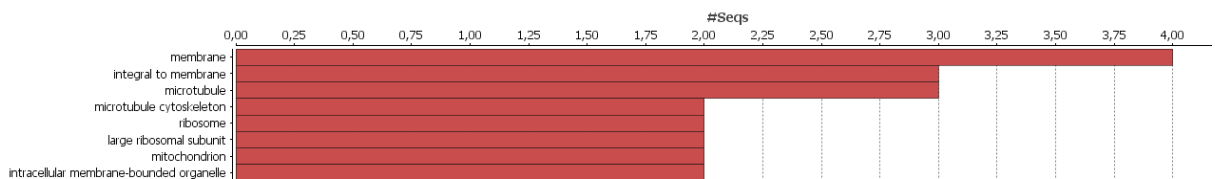


Figura 26 – Componentes celulares mais representados dentre os alvos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional. À esquerda, estão listadas as ontologias gênicas e acima o número de sequências representando uma determinada ontologia gênica.

A próxima etapa foi determinar se os mRNAs associados a TcGAP2 identificados em ambas condições pudessem conter motivos conservados. Para isso, foram utilizadas as sequências primárias das regiões codificantes e das regiões 3' e 5' não traduzíveis dos transcritos usando a ferramenta MEME, disponível na página <http://meme.sdsc.edu>. Não foram identificados motivos conservados dentre os alvos nas regiões 3' UTR nem nas regiões codificadoras. Na região 5' UTR, pudemos identificar dois domínios dentre os transcritos associados a complexos contendo TcGAP2 (figura 27). Um dos domínios é rico em guaninas e está presente em 88 alvos dos 216 identificados e com informação disponível no banco de dados (*e-value* de $1.1e-021$) (figura 27 – à esquerda). O outro domínio é uma sequência rica em citosinas e adenosinas presente em 22 alvos (*e-value* de $1.7e-015$) (figura 27 – à direita).

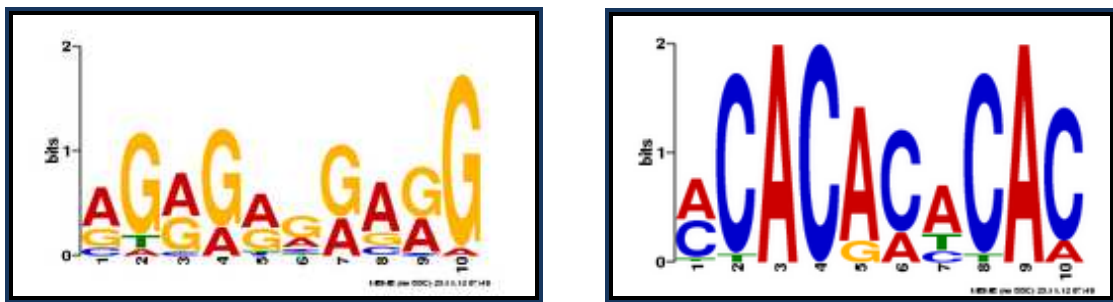


Figura 27 – Domínios conservados dentre os transcritos associados aos complexos contendo TcGAP2. À esquerda, um domínio rico em guaninas presente em 88 dentre 216 alvos. À direita, um domínio rico em citosinas e adenosinas presente em 22 dentre 216 alvos.

4.8. VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DA PROTEÍNA TcGAP2 RECOMBINANTE DE SE LIGAR DIRETAMENTE A RNA *IN VITRO*

Os complexos que contêm a proteína TcGAP2 possuem mRNAs, porém isso não nos indica se TcGAP2 se liga a esses RNAs diretamente ou se está associada a proteínas que se ligam ao RNA. Para responder essa questão, ensaios como o de mudança na mobilidade eletroforética em gel (EMSA) são úteis.

Define-se como EMSA a verificação da ocorrência de retardamento na migração de um fragmento de DNA ou RNA, marcado com fluoróforos ou isótopos radioativos, pela sua associação à proteína de ligação afim. O complexo sonda-

proteína é separado da sonda livre (não-ligada) por meio de eletroforese realizada em gel de poliacrilamida não desnaturante. A proteína retarda a mobilidade da sonda quando a mesma se encontra ligada a ela. Então, a sonda livre migrará mais rapidamente que aquela complexada.

Antes de realizar o ensaio propriamente dito, tivemos que testar diferentes protocolos de indução em *E. coli* na tentativa de solubilizar a proteína recombinante GAP2. Porém, não foi possível obter proteína solúvel quando esta foi expressa fusionada à cauda de histidinas (gene recombinado em vetor pDESTTM17) (figura 28 – coluna 1). Uma estratégia comumente usada para aumentar a solubilidade de proteínas de interesse é fusioná-la a outra que se sabe que possui uma alta solubilidade, como, por exemplo, a glutationa-S-transferase (GST) (SMITH e JOHNSON, 1988). Assim, o gene codificador de GAP2 foi recombinado em vetor pDESTTM15 o qual adiciona uma etiqueta GST. Esta fusão acarreta num aumento de aproximadamente 30 kDa no tamanho da proteína a ser expressa. Novamente foram testados vários protocolos de indução e o que resultou em solubilização foi realizar choque térmico em gelo na presença de etanol 3% no momento em que a D.O. foi atingida (0,4-0,6) antes da adição de IPTG (figura 28 – coluna 3).

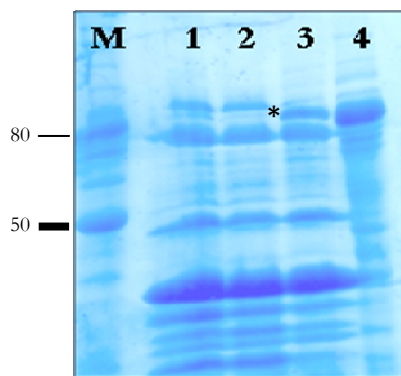


Figura 28 – Testes de indução em *E. coli* para obtenção da proteína GAP2 solúvel. Bactérias *E. coli* BL21 (DE3)pLysS contendo os vetores de expressão com a sequência codificadora da proteína de interesse foram induzidas a expressar GAP2 sob diferentes condições. M – marcador de peso molecular *BenchMark* (Invitrogen); 1 – fração solúvel resultante da expressão com o vetor pDEST17 a 25°C com choque térmico em gelo e adição de etanol 3% antes da adição de 0,1 mM de IPTG; 2 – fração solúvel resultante da expressão com o vetor pDEST15 a 25°C com adição de 0,1 mM de IPTG; 3 – fração solúvel resultante da expressão com o vetor pDEST15 a 25°C com choque térmico e adição de etanol 3% antes da adição de 0,1 mM de IPTG; 4 – fração insolúvel resultante da expressão com o vetor pDEST15 a 25°C com 0,1 mM de IPTG. (*) indica a presença da proteína solúvel com massa molecular de aproximadamente 80 kDa.

Após a padronização das melhores condições para indução de GAP2 solúvel em *E. coli*, esta deveria ser, então, purificada. Para tanto, a fração contendo GAP2 solúvel foi incubada com resina de glutationa sefarose, de acordo com item 3.5.7, e, para nossa surpresa, a proteína não se ligou a ela (figura 29 – à esquerda). Como alternativa, o anti-soro produzido em coelho foi ligado covalentemente a microesferas (*beads*) magnéticas contendo IgG anti-coelho. A fração contendo

GAP2 solúvel foi incubada juntamente a essas *beads*, de acordo com item 3.5.7, purificação esta que resultou em enriquecimento da proteína em questão (figura 29 – à direita). Extratos de *E. coli* expressando apenas a etiqueta GST foram incubados em paralelo com a mesma resina e usados como controle.

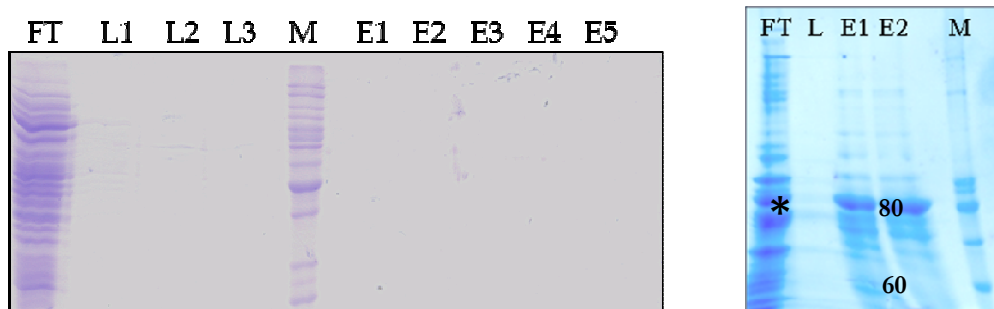


Figura 29 – Perfil eletroforético da purificação da proteína GAP2 recombinante a partir da fração solúvel. Eletroforese em gel SDS-PAGE das frações coletadas durante os testes. À esquerda – purificação utilizando a resina glutationa-sefarose. À direita – purificação utilizando anti-soro contra a proteína GAP2 ligada covalentemente em *beads* magnéticas. M – marcador de peso molecular *BenchMark* (Invitrogen); FT – *flow-through*; L – último lavado; E1 – eluído com solução contendo 0,5 M NaCl; E2 – eluído com solução contendo 1 M NaCl. (*) indica a presença da proteína solúvel com massa molecular de aproximadamente 80 kDa.

Após obtenção da proteína GAP2 purificada em quantidades suficientes, partimos para os ensaios de EMSA onde realizamos ensaios de ligação da TcGAP2 recombinante com quatro homorribonucleotídeos de repetição, sendo eles, respectivamente: Poli-A₍₁₅₎, Poli-U₍₁₆₎, Poli-C₍₁₅₎ e Poli-G₍₁₅₎. Em nossas condições experimentais, não houve ligação da proteína TcGAP2 a nenhum dos homorribonucleotídeos (figura 30). Este foi um ensaio preliminar que será repetido, inclusive utilizando uma proteína sabidamente conhecida por se ligar a RNA como controle positivo. Porém, se esse resultado se mantiver, podemos deduzir que a proteína não se liga diretamente a RNA ou ainda que ela depende não do reconhecimento de uma seqüência, mas sim de uma estrutura secundária particular.

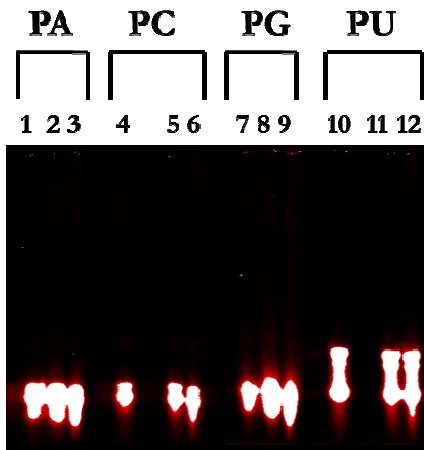


Figura 30 - Análise da afinidade da proteína TcGAP2 recombinante por homorribonucleotídeos de repetição. Por um período de 20 minutos em temperatura ambiente, os homorribopolímeros (10 ng) marcados com Cy5.5 foram incubados com 200 ou 400 ng de proteína recombinante. 1, 4, 7 e 10 - sonda livre^{*}; 2, 5, 8 e 11 - proteína TcGAP2 (200 ng) + sonda^{*}; 3, 6, 9 e 12 - proteína TcGAP2 (400 ng) + sonda^{*}. 1 a 3 - sonda poli-A^{*}; 4 a 6 - sonda poli-C^{*}; 7 a 9 - sonda poli-G^{*}; 10 a 12 - sonda poli-U^{*}. (*) oligonucleotídeo marcado com fluoróforo.

4.9. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PRESENTES NOS COMPLEXOS CONTENDO TcGAP2

Outro objetivo do trabalho foi identificar proteínas que interagem com a proteína TcGAP2. Para isso, extratos citoplasmáticos das formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e epimastigotas sob estresse nutricional foram imunoprecipitados com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 produzido em coelho e purificado (de acordo com o item 3.6) para a proteína TcGAP2 ou sem nenhum anticorpo, que serviu como controle. Antes de realizar os experimentos completos para identificação das proteínas por espectrometria de massas, realizamos um experimento piloto para padronizar as condições de lise, lavagens e eluição da imunoprecipitação para confirmar que a proteína TcGAP2 foi imunoprecipitada com sucesso. O protocolo de imunoprecipitação utilizado na abordagem de ribonômica teve que ser adaptado, já que o uso de NP-40 é incompatível com espectrômetros de massa. Para isso, alíquotas do *input*, *flow-through*, último lavado e eluído foram aplicados em gel SDS-PAGE para ensaios de *Western blotting* com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 (figura 31). A proteína TcGAP2 foi imunoprecipitada com sucesso, seguindo as condições descritas no item 3.15, e ainda pôde se observada uma depleção de TcGAP2 quando comparamos o *input* com o *flow-through* na imunoprecipitação utilizando o anticorpo contra TcGAP2, o que não ocorreu no controle negativo (figura 31).

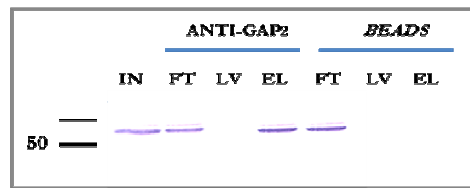


Figura 31 – Imunoprecipitação da proteína TcGAP2. Extratos de epimastigotas foram incubados com *beads* magnéticas ligadas ao anticorpo purificado contra a proteína TcGAP2 ou apenas com as *beads* sem nenhum anticorpo. Após isso, as *beads* foram lavadas e as proteínas TcGAP2 e aquelas associadas a ela foram eluídas. Uma alíquota de cada etapa foi aplicada em gel SDS-PAGE para análise por *Western blotting* com soro contra a proteína TcGAP2. IN = extrato antes da imunoprecipitação (*input*); FT = sobrenadante após incubação com as *beads* (*flow-through*); LV = quinto e último lavado antes da eluição; EL = eluído da imunoprecipitação.

Após o estabelecimento das condições de imunoprecipitação, novos ensaios foram realizados e o conteúdo protéico das amostras, obtido a partir de três experimentos de imunoprecipitação distintos, foi digerido com tripsina e os peptídeos foram detectados por espectrometria de massas e analisados como descrito no item 3.15.2. Os espectros de massas gerados foram comparados aos espectros deduzidos a partir de seqüências de proteínas depositadas em banco de dados de *T. cruzi*. Para garantir a confiabilidade da busca efetuada em banco de dados, apenas as proteínas identificadas com q-valores de 0,01, que tiveram pelo menos dois peptídeos identificados, que estavam presentes nos experimentos utilizando o anticorpo para TcGAP2 e que não apareceram nas amostras controles foram consideradas. Os quadros 4 e 5 contêm as proteínas identificadas nos ensaios de imunoprecipitação utilizando extratos de epimastigotas em fase exponencial de crescimento e de epimastigotas sob estresse nutricional, respectivamente. A proteína TcGAP2 foi identificada com alta confiabilidade nos experimentos de imunoprecipitação com o anticorpo contra TcGAP2 (figura 32) e não foi detectada nos experimentos controles.

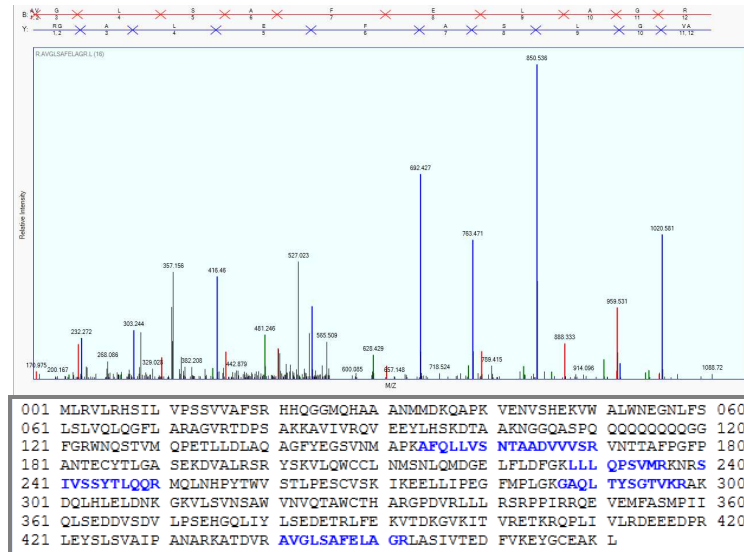


Figura 32 – Espectro MS2 do peptídeo R.AVGLSAFELAGR.L da proteína TcGAP2 por espectrometria de massas. Abaixo do espectro, estão evidenciados em azul os peptídeos sequenciados referentes à proteína TcGAP2.

As amostras imunoprecipitadas e seus respectivos controles estão representados em diagrama de Venn para facilitar a visualização das proteínas que foram identificadas em cada um (figura 33). Em ambas as condições utilizadas neste estudo, podemos observar que todas as proteínas identificadas no controle negativo estão contidas no conjunto de amostras imunoprecipitadas. Além disso, todas as proteínas identificadas no controle de estresse foram identificadas no controle de epimastigotas. Desconsiderando estas proteínas identificadas no controle, foi possível identificar 26 proteínas em epimastigotas e 21 em epimastigotas sob estresse nutricional, dados estes contendo ainda redundância e retirando contaminantes.

Nas amostras imunoprecipitadas com extrato de epimastigotas, foi possível identificar 11 proteínas sem redundância (quadro 4). Dentre elas, quatro proteínas ribossomais (L12, L13, L37 e S26), duas proteínas de ligação a RNA – uma com domínio RRM e outra com domínio RING – a proteína TcGAP1, uma ATPase, uma proteína RHS e duas proteínas hipotéticas sem domínios identificados. Já nas amostras imunoprecipitadas com extrato de epimastigotas sob estresse nutricional, foi possível identificar 13 proteínas sem redundância (quadro 5). Dentre elas, as subunidades alfa e beta da tubulina, uma proteína de ligação a RNA mitocondrial, uma proteína RHS, 6 proteínas hipotéticas, um autoantígeno I/6, a proteína TcGAP1 e uma subunidade do fator de liberação da cadeia peptídica eucariótica. Duas

dessas proteínas são comuns entre as imunoprecipitações com os diferentes extratos, GAP1 e a proteína RHS.

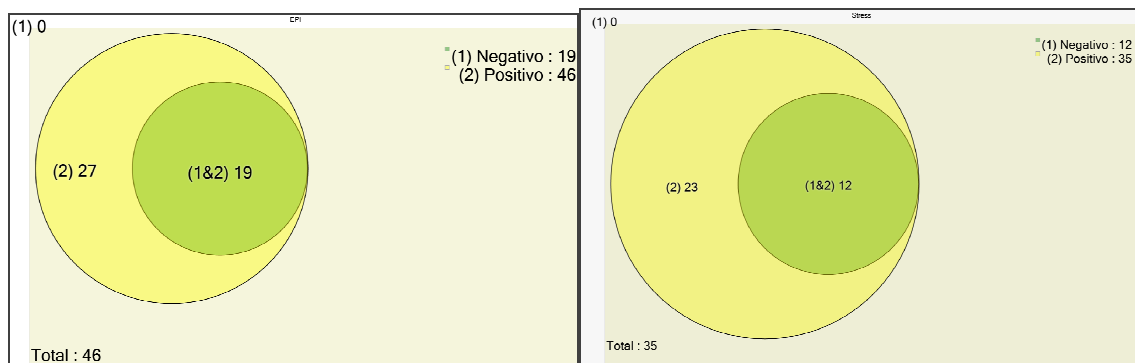


Figura 33 – Diagrama de Venn das proteínas identificadas nas amostras. À esquerda, amostras utilizando extrato de epimastigotas em fase exponencial de crescimento e, à direita, utilizando extrato de epimastigotas sob estresse nutricional. Em verde, estão as amostras referentes aos controles, ou seja, *beads* sem anticorpos foram incubadas com os extratos (negativo). Em amarelo, o conjunto de proteínas identificadas nas amostras imunoprecipitadas com o anti-soro contra a proteína TcGAP2 (positivo).

ID	Descrição	Domínio
Tc00.1047053509787.10	retrotransposon hot spot (RHS) protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RHSP
Tc00.1047053508899.54	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	Milton
contaminant_NRL_1MCOH	Immunoglobulin g1 (igg1) (mcg) with a hinge deletion, chain H...	-
Tc00.1047053511071.171	60S ribosomal protein L12 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053508413.44	60S ribosomal protein L12 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053510755.129	60S ribosomal protein L12 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053504037.30	60S ribosomal protein L12 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053508895.50	RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RING
Tc00.1047053506211.70	RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RING
Tc00.1047053508153.290	60S ribosomal protein L13 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053510323.30	60S ribosomal protein L13 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053508153.280	60S ribosomal protein L13 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053511727.270	RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RRM
Tc00.1047053511727.290	RNA-binding protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RRM
Tc00.1047053507641.233	ribosomal proteins L37 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053511145.46	60S ribosomal protein L37a [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	

Tc00.1047053504069.56	60S ribosomal protein L37a [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053506235.20	guide RNA associated protein, GAP1, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053413977.10	guide RNA associated protein, GAP1, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511871.90	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511865.10	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053510359.170	AAA ATPase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	AAA E PEPCK ATP
Tc00.1047053506755.160	AAA ATPase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	AAA E PEPCK ATP
Tc00.1047053506859.70	guide RNA associated protein, GAP2, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511815.40	guide RNA associated protein, GAP2, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053503801.20	ribosomal protein S26 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053508817.60	ribosomal protein S26 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	

Quadro 4 – Proteínas presentes nos complexos ribonucleoprotéicos contendo TcGAP2 em epimastigotas. NI = domínio não identificado. Em destaque, o identificador de TcGAP2 e de seu alelo.

ID	Descrição	Domínio
Tc00.1047053509895.20	mitochondrial RNA binding protein, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053509787.10	retrotransposon hot spot (RHS) protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	RHSP
Tc00.1047053508899.54	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	MILTON
Tc00.1047053506127.110	eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	eRF1 e Topoisom I N
Tc00.1047053506563.40	beta tubulin [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	Tubulin
Tc00.1047053411235.9	alpha tubulin [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	Tubulin
contaminant_NRL_1MCOH	Immunoglobulin g1 (igg1) (mcg) with a hinge deletion, chain H...	-
contaminant_KERATIN02		-
Tc00.1047053509207.40	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053510679.40	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	Pga1
Tc00.1047053511439.40	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	Pga1
Tc00.1047053508719.30	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053509793.50	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI

Tc00.1047053506859.180	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511815.170	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053506859.170	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511815.180	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053506235.20	guide RNA associated protein, GAP1, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053413977.10	guide RNA associated protein, GAP1, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053506859.70	guide RNA associated protein, GAP2, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053511815.40	guide RNA associated protein, GAP2, putative [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	NI
Tc00.1047053508323.100	I/6 autoantigen [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	
Tc00.1047053511825.80	I/6 autoantigen [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	

Quadro 5 - Proteínas presentes nos complexos ribonucleoprotéicos contendo TcGAP2 em epimastigotas sob estresse nutricional. NI = domínio não identificado. Em destaque, o identificador de TcGAP2 e de seu alelo.

4.10. NOCAUTE DOS GENES *TcGAP2* E *TcWW*

As técnicas que permitem a remoção de um gene e sua substituição por genes repórteres, através do processo de recombinação, têm sido usadas com sucesso para verificação da função gênica em tripanosomatídeos (SWINDLE e TAIT, 1996; DE SOUZA *et al.*, 2010). O nocaute gênico consiste na inserção de marcadores genéticos de seleção (gene codificando resistência à neomicina, higromicina, entre outros), flanqueados por seqüências pertencentes ao locus cromossômico de interesse. Através do processo de recombinação homóloga, o marcador pode então substituir o gene que se quer estudar. Desse modo, pode ser possível analisar a função de determinado gene, através das alterações decorrentes de sua ausência na fisiologia do parasita. No presente estudo, os genes repórteres que codificam resistência aos antibióticos neomicina e higromicina foram flanqueados por seqüências a montante e a jusante da região codificante dos genes *TcGAP2* e *TcWW*. As construções foram usadas para transfectar *T. cruzi* e gerar

mutantes para o gene *TcGAP2* e *TcWW*, a fim de se estudar o efeito que a ausência desse gene causa no metabolismo do parasita.

4.10.1. CLONAGEM DE REGIÕES INTERGÊNICAS DE *TcGAP2* E DE *TcWW* EM VETORES pBS-NEO E pBS-HIGRO

Primeiramente, foram amplificadas as regiões intergênicas que flanqueavam os genes *TcWW* e *TcGAP2*. O resultado da amplificação das regiões *upstream* (a montante) e *downstream* (a jusante) a *TcWW* e *TcGAP2*, tanto para clonagem em vetor pBS-NEO quanto em pBS-HIGRO, itens 3.16.1 a 3.16.3, pode ser visualizado na figura 34.

Os produtos de PCR referentes à região *upstream* de *TcWW* e *TcGAP2* (figura 34 – colunas 1 e 3) foram clonados em vetor pGEM-T *Easy* e os plasmídeos foram purificados a partir de clones previamente confirmados. Os vetores contendo as regiões *upstream* foram, então, digeridos e as amostras foram aplicadas em gel de agarose para excisão do fragmento correspondente. Em seguida, as regiões *upstream* digeridas e purificadas foram clonadas em plasmídeos pBS-NEO e pBS-HIGRO, previamente digeridos com as mesmas enzimas e purificados, conforme itens 3.16.1 e 3.16.3. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias e a análise dos clones positivos foi feita através de PCR de colônia. Após a confirmação das clonagens, os plasmídeos foram purificados e denominados pBS-UP-NEO e pBS-UP-HIGRO (GAP2 ou WW), respectivamente. Ambos foram sequenciados e, após a confirmação dos dados, foram utilizados para finalizar a construção com a região *downstream* de *TcWW* e *TcGAP2*.

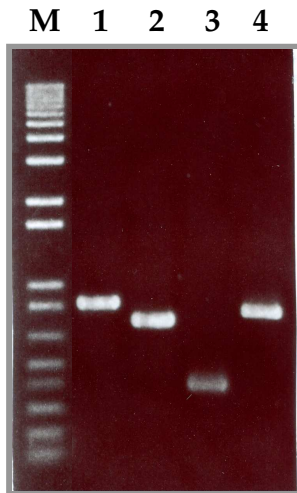


Figura 34 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* de *TcGAP2* e de *TcWW* para clonagem em vetores pBS-NEO e pBS-HIGRO. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: Marcador de massa molecular demonstrado em pares de bases. (1) Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *upstream* de *TcWW* para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO; (2) Resultado de amplificação por PCR da região *downstream* de *TcWW* para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO; (3) Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *upstream* de *TcGAP2* para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO. (4) Resultado de amplificação por PCR da região intergênica *downstream* *TcGAP2* para clonagem em vetor pBS-NEO e pBS-HIGRO.

O resultado da amplificação referente às regiões *downstream* de *TcWW* e *TcGAP2* para clonagem, tanto em pBS-UP-NEO quanto em pBS-UP-HIGRO, pode ser visualizado na figura 34 (colunas 2 e 4). Assim como os produtos de PCR das regiões *upstream*, as regiões *downstream* foram clonadas em vetor pGEM-T *Easy* e os plasmídeos foram purificados a partir de clones previamente confirmados. Os vetores contendo as regiões *downstream* foram, então, digeridos e as amostras foram aplicadas em gel de agarose para excisão do fragmento correspondente. Em seguida, as regiões *downstream* digeridas e purificadas foram clonadas em plasmídeos pBS-UP-NEO e pBS-UP-HIGRO (GAP2 ou WW), como descrito nos itens 3.16.2 e 3.16.3. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias e a análise dos clones positivos foi feita através de PCR de colônia. Os plasmídeos dos clones positivos foram purificados e analisados por PCR para verificação das clonagens. A massa molecular dos produtos de PCR estava de acordo com o esperado e os clones foram denominados de pBS-UP-NEO-DOWN e pBS-UP-HIGRO-DOWN (GAP2 ou WW).

Para os ensaios de transfecção, fragmentos de DNA correspondentes ao gene de resistência NEO e HIGRO flanqueados pelas regiões *upstream* e *downstream* de *TcWW* ou *TcGAP2* foram então amplificados por PCR e purificados por eletroeluição. O fragmento purificado foi utilizado para transfecção em *T. cruzi*, conforme item 3.9.

Primeiramente, foi nocauteado um dos alelos dos genes *TcWW* ou *TcGAP2* utilizando os fragmentos purificados referentes ao gene de resistência à NEO, flanqueado pelas regiões intergênicas de *TcWW* e *TcGAP2*. Uma vez selecionada a população, o DNA genômico apenas dos parasitas nocaute para um dos alelos de

TcGAP2 foi extraído para confirmar a recombinação do fragmento de DNA transfectado no locus correto através de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores externos às regiões intergênicas utilizadas para recombinação (figura 35). Não foi possível realizar esta abordagem para confirmar o nocaute de um dos alelos de *TcWW*, uma vez que não há informação no banco de dados referente à região montante da região codificadora de *TcWW* para utilizar como base para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores externos. Como o gene de *TcGAP2* possui 1401 pares de bases (pb), a substituição deste pelo gene de resistência à neomicina (800 pb) levaria a uma redução de aproximadamente 600 pb. Assim, numa população na qual um dos alelos foi nocauteado, esperamos obter fragmentos de dois tamanhos distintos com diferença de 600 pb (figura 35).

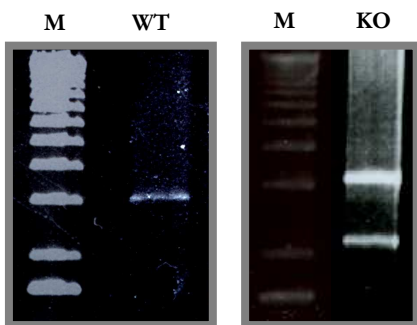


Figura 35 – PCR para confirmação do nocaute de um dos alelos de *TcGAP2*. Após seleção da população, o DNA genômico dos parasitas nocauteados para um dos alelos de *TcGAP2*, bem como de parasitas selvagens, foi extraído e utilizado como molde para as reações de PCR. Para isso, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores externos às regiões intergênicas utilizadas para recombinação. .M = marcador de peso molecular em pares de base (1 kb plus ladder), WT = parasitas *wild-type*, KO = população heterogênea de *T. cruzi* com um dos alelos nocauteado pela substituição de *TcGAP2* por gene de resistência à neomicina.

Após a confirmação do nocaute na população heterogênea, os parasitas foram clonados por diluição limitante e, posteriormente, foi verificado o nocaute gênico na população clonal por *Southern blotting*.

4.10.2. VERIFICAÇÃO DO NOCAUTE DE UM DOS ALELOS DE *TcGAP2* E *TcWW* ATRAVÉS DE SUBSTITUIÇÃO POR GENE DE RESISTÊNCIA À NEOMICINA

Após a seleção e clonagem dos parasitas, foi realizada eletroforese em campo pulsado seguida de análises tipo *Southern blotting* para confirmação da substituição de um dos alelos de *TcWW* e de *TcGAP2* pelo gene de resistência à neomicina. O experimento foi realizado com amostras dos parasitas *wild-type* (WT),

de dois clones de transfectantes para *TcGAP2* (KO clones 1 e 2) e de um clone de transfectante para *TcWW*. As figuras 36 e 37 mostram o resultado da separação de cromossomos das amostras analisadas por eletroforese em campo de pulsos alternados. O DNA foi então transferido para uma membrana de náilon posteriormente incubada com diferentes sondas.

A membrana contendo as amostras dos transfectantes de *TcGAP2* e dos selvagens foi incubada com sondas radioativas correspondentes ao gene *TcGAP2* e ao gene de resistência à neomicina para confirmação do nocaute de um dos alelos. A primeira dupla WT-KO foi incubada apenas com a sonda correspondente ao gene *TcGAP2* (figura 36 – 2), enquanto a segunda apenas com a sonda correspondente ao gene de neomicina (figura 36 – 4). Quando utilizada a sonda *TcGAP2*, a marcação do cromossomo contendo os alelos de *TcGAP2* foi observada na população WT, enquanto na população nocaute houve uma diminuição nesta marcação, provavelmente devido à deleção de um dos alelos. Nas amostras hibridadas com a sonda correspondente ao gene NEO, nenhuma marcação foi observada na população selvagem, ao contrário da população nocaute, onde ocorreu uma marcação na região que corresponderia ao alelo de *TcGAP2*. Sendo assim, foi possível confirmar que um dos alelos de *TcGAP2* foi substituído pelo gene de resistência à neomicina (NEO).

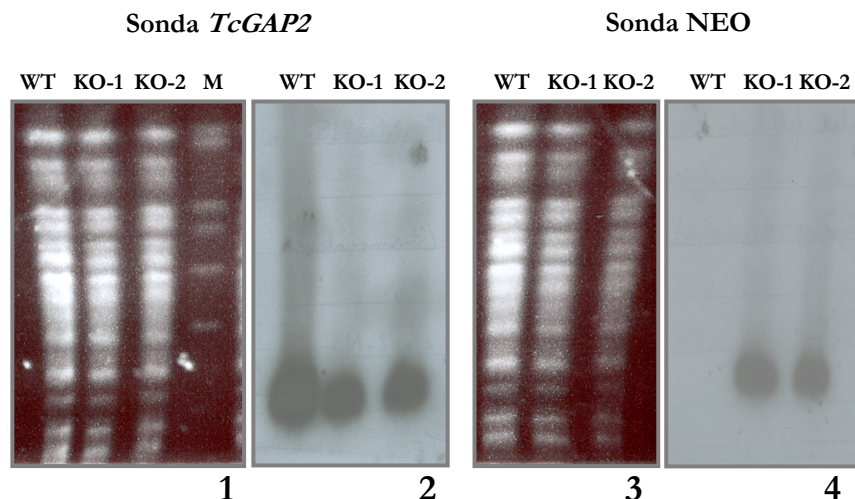


Figura 36 - Ensaio de hibridação por *Southern blotting* para confirmação do nocaute de um dos alelos de *TcGAP2*. (1) e (3) Perfil eletroforético de campo pulsado em gel de agarose 1,2% após coloração com solução de brometo de etídeo. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma membrana de náilon e incubada com sondas radioativas correspondentes ao gene *TcGAP2* (2) e ao gene de resistência à neomicina (4). M: marcador *345 yeast chromosome PFG marker*, de 225 a 1900 kb (NEB), WT: *T. cruzi wild-type*. KO: dois clones distintos de *T. cruzi* com pelo menos um dos alelos nocauteado pela substituição de *TcGAP2* por gene de resistência à neomicina.

Para a membrana com as amostras dos transfectantes de *TcWW* e dos selvagens, foram realizadas incubações com sondas radioativas correspondentes ao gene *TcWW* e ao gene de resistência à neomicina para confirmação do nocaute de um dos alelos. A primeira dupla WT-KO foi incubada apenas com a sonda correspondente ao gene *TcWW*, enquanto a segunda, apenas com a sonda correspondente ao gene de neomicina (figura 37). Quando utilizada a sonda *TcWW*, a marcação de dois alelos em cromossomos distintos foi observada tanto na população WT quanto na população nocaute. Nas amostras hibridadas com a sonda correspondente ao gene NEO, nenhuma marcação foi observada na população selvagem, ao contrário da população nocaute onde ocorreu uma marcação na região que corresponderia ao alelo de *TcWW*. Sendo assim, foi possível confirmar que um alelo de *TcWW* foi substituído pelo gene de neomicina (NEO). Porém, ainda houve marcação desse alelo com a sonda do gene *TcWW*, indicando que este gene está presente em mais de uma cópia no genoma. Assim, decidimos não prosseguir com o nocaute desse gene devido à falta de diversidade de marcadores de seleção.

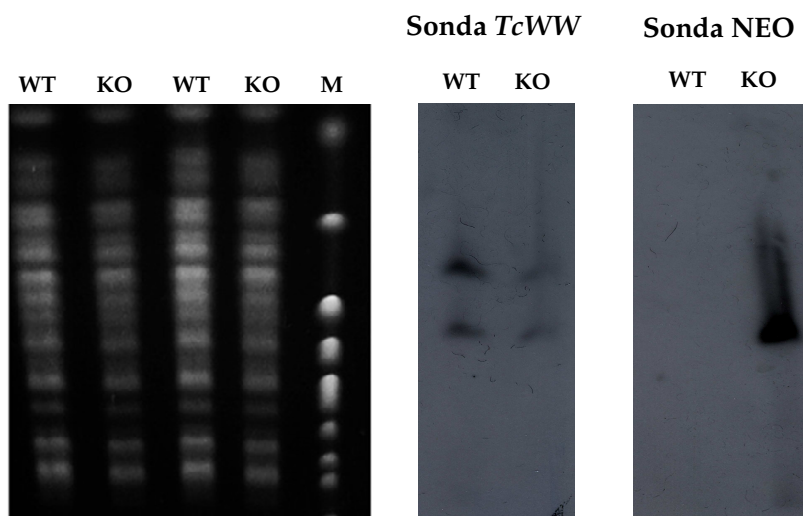


Figura 37 - Ensaio de hibridação por *Southern blotting* para confirmação do nocaute de um dos alelos de *TcWW*. (1) e (3) Perfil eletroforético de campo pulsado em gel de agarose 1,2% após coloração com solução de brometo de etídeo. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma membrana de náilon e incubada com sondas radioativas correspondentes ao gene *TcWW* (2) e ao gene de resistência à neomicina (4). M: marcador *345 yeast chromosome PFG marker*, de 225 a 1900 kb (NEB), WT: *T. cruzi wild-type*. KO: dois clones distintos de *T. cruzi* com um dos alelos nocauteado pela substituição de *TcWW* por gene de resistência à neomicina.

Após confirmar o nocaute de um dos alelos de *TcGAP2*, verificamos se isto ocasionou alguma mudança nos níveis protéicos de *TcGAP2* através de análises de *Western blotting*. Neste caso, o simples nocaute resultou numa redução de

aproximadamente 50% nos níveis de expressão de TcGAP2 para o clone 1, quando comparado ao nível de TcGAPDH, utilizada como referência para esta análise (figura 38). Porém essa redução foi de apenas 13% no nível de expressão da proteína TcGAP2 para o clone 2. O anti-soro contra GAPDH foi gentilmente cedido pelo doutorando Felipe Leprevost.

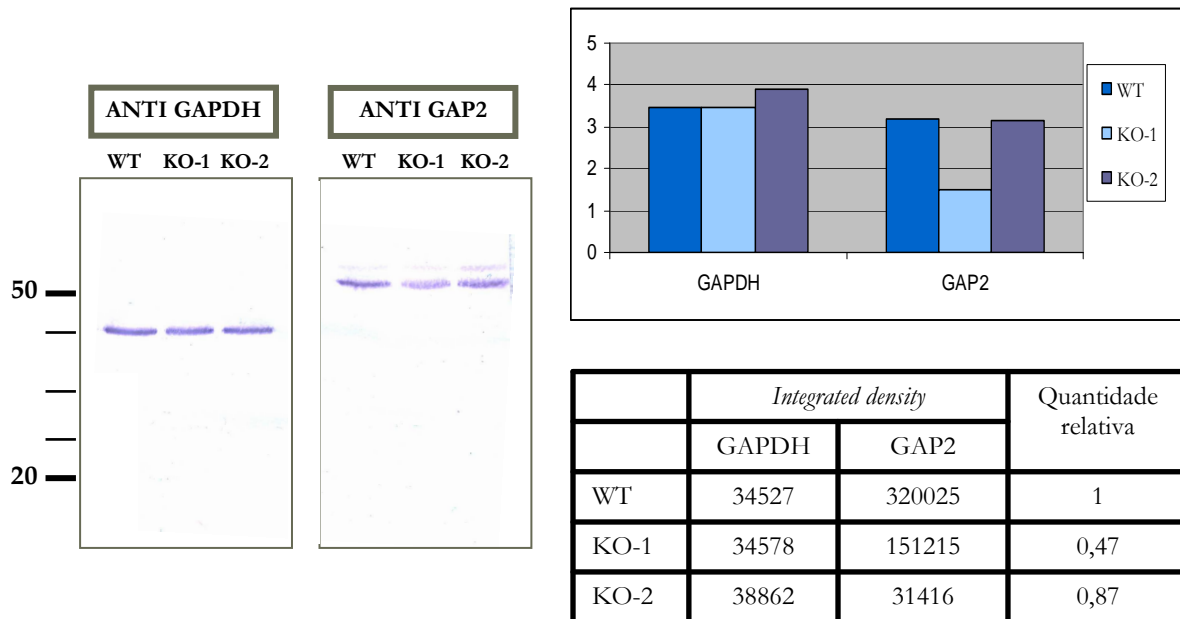


Figura 38 - Quantificação da expressão da proteína TcGAP2 em população clonal de *T. cruzi* simples nocaute (KO). Esquerda: *Western blotting* de gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelado por fosfatase alcalina. WT: extrato protéico de população *wild-type*. KO: extrato protéico de população clonal (clones 1 e 2) com um dos alelos de *TcGAP2* nocauteado. Em cada canal foi aplicada a quantidade de proteína referente a 5×10^6 parasitas. TcGAPDH foi utilizado como controle de quantidade de amostra aplicada no gel. Direita: resultado da quantificação do *Western blotting* utilizando o programa Image J.

Após a confirmação do nocaute simples, a população clonal foi então transfectada com o fragmento purificado referente ao gene de resistência à higromicina flanqueado pelas regiões intergênicas. Em uma primeira tentativa, os parasitas foram selecionados e a população foi clonada por diluição limitante. Porém, quando realizado experimento de eletroforese em campo pulsado seguido de *Southern blotting*, pudemos perceber que o plasmídeo contendo o gene de resistência à higromicina e as regiões intergênicas de *TcGAP2* permaneceu epissomal (dado não mostrado). Isto porque uma pequena quantidade de plasmídeo pode ter permanecido na amostra mesmo após eletroeluição. A transfecção foi realizada mais duas vezes, mas não foi possível obter o nocaute duplo do gene *TcGAP2*, o que sugere ser um gene essencial à sobrevivência de *T. cruzi*.

A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, processo denominado metaciclogênese, é uma etapa fundamental no ciclo de vida de *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Este processo ocorre na porção terminal do intestino do triatomíneo, onde epimastigotas alongados se aderem antes de se diferenciarem em metacíclicos (KOLLIEN e SCHAUB, 2000). Uma vez formados, os metacíclicos se soltam da parede intestinal e são excretados. A infecção é mediada pelo contato destas excretas com membranas mucosas de um hospedeiro mamífero. Ainda não está claro como este processo de diferenciação é disparado, porém foi demonstrado que a metaciclogênese é induzida por estresse nutricional que ocorre no ambiente do intestino do inseto (CONTRERAS *et al.*, 1988; FIGUEIREDO *et al.*, 2000). Desde o estabelecimento do meio artificial de urina de triatomíneo (TAU) por Contreras e colaboradores, um meio quimicamente definido que mimetiza a composição da urina do inseto, este processo pode ser reproduzido *in vitro*. A metaciclogênese é induzida *in vitro* através da incubação de formas epimastigotas em meio TAU e, subsequentemente, em meio TAU suplementado com aminoácidos e glicose (meio TAU3AAG). Sob estas condições, os parasitas aderem às garrafas e sofrem diferenciação (BONALDO *et al.*, 1988). Dessa forma, os parasitas em diferentes estágios do processo de diferenciação podem ser isolados da cultura e suas características biológicas estudadas. Várias mudanças importantes ocorrem durante a metaciclogênese, incluindo uma parada na proliferação e o desenvolvimento de infectividade com mudanças na morfologia da célula. Além do mais, modificações nucleares estruturais (ELIAS *et al.*, 2001), remodelamento da cromatina e estabilidade diferencial dos mRNAs (KRIEGER e GOLDENBERG, 1998; YAMADA-OGATTA *et al.*, 2004) resultam em diferenças na expressão protéica durante a metaciclogênese (PARODI-TALICE *et al.*, 2007).

Os tripanosomatídeos divergiram muito cedo dos demais eucariotos durante a evolução e seu mecanismo de controle da expressão gênica apresenta características peculiares. Ao contrário de outros organismos, várias linhas de evidência sugerem que os tripanosomatídeos parecem ter perdido a habilidade de regular a transcrição. Nenhum promotor para a enzima RNA polimerase II foi identificado até o momento. A transcrição tem início dentro de uma região intercistrônica, ocorre em ambas as direções e dezenas a centenas de genes são transcritos numa mesma unidade policistrônica (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2003). Estes genes não são necessariamente relacionados em função e podem apresentar diferentes níveis de expressão (GIBSON, SWINKELS e BORST, 1988). Os mRNAs policistrônicos são processados em mRNAs individuais através das reações de *trans-splicing* e poliadenilação (CLAYTON, 2002; LEBOWITZ *et al.*, 1993; VANHAMME e PAYS, 1995). Estas e outras características descritas na introdução desta tese indicam que a regulação da expressão gênica nestes organismos seja majoritariamente pós-transcricional, baseada em mecanismos que envolvam a estabilidade dos mRNAs e proteínas e a disponibilidade dos mRNAs para serem traduzidos. A quase ausência de regulação em nível transcricional é provavelmente uma das vantagens que fazem com que esses organismos tenham sucesso na adaptação a diferentes hospedeiros durante seus ciclos de vida.

Nos últimos anos, várias pesquisas têm indicado que operons pós-transcricionais e a formação de grânulos de RNA são estruturas chave na regulação da expressão gênica (MOORE, 2005). Assim, tendo em vista a importância dos mecanismos de regulação pós-transcricional em tripanosomatídeos, estudos do nosso grupo investigaram a composição protéica de complexos mRNPs em dois momentos distintos do processo de metaciclogênese de *T. cruzi*, em epimastigotas em fase exponencial de crescimento e em epimastigotas sob estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2010). O objetivo foi elucidar mecanismos moleculares envolvidos no disparo e na regulação da diferenciação, mecanismos estes ainda não elucidados completamente. Sabe-se que o estresse nutricional provoca uma diminuição da taxa geral de tradução nos parasitas estressados (SALLES *et al.*, 1984). Esta diminuição na tradução pode resultar na tradução preferencial de apenas alguns determinados mRNAs necessários para a diferenciação. De fato, a análise da composição dos mRNAs que estão sendo traduzidos e das proteínas a eles associados revelou que

há um rearranjo dinâmico em resposta ao estresse (ALVES *et al.*, 2010; ALVES, 2010).

Dentre as proteínas identificadas por Alves e colaboradores (2010), selecionamos duas proteínas hipotéticas ricas em glutamina (Q). Uma delas, GAP2, foi identificada nas frações polissomal e pós-polissomal de epimastigotas, bem como nas frações polissomal e pós-polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional. A outra proteína, WW, foi identificada apenas na fração pós-polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional. A proteína WW foi assim denominada por apresentar um domínio WW. Domínios WW possuem dois resíduos de triptofano (W) altamente conservados e são responsáveis pela interação proteína-proteína através do reconhecimento de motivos peptídicos ricos em prolina e/ou contendo serina/treonina fosforilados.

Domínios ricos em glutamina estão presentes em proteínas ataxinas. Ataxina-2 tem sido relacionada a vários processos biológicos, incluindo formação do filamento de actina, secreção e apoptose (HUYNH *et al.*, 1999; RALSER *et al.*, 2005). Em humanos, a ataxina-2 está envolvida com uma desordem neurodegenerativa chamada SCA2 (*spinocerebellar ataxia type 2*) (HUYNH *et al.*, 1999). Essa desordem é caracterizada por uma expansão das repetições GAG, aumentando a região poliglutamina da proteína (HUYNH *et al.*, 1999). A função da ataxina-2 ainda não foi estabelecida, mas ela tem sido relacionada com metabolismo de RNA. Além do domínio poli-Q, esta proteína possui um domínio Lsm, domínio este de ligação a RNA, e um motivo de ligação a PABP/Pab1 (PAM2) (HUYNTH *et al.*, 1999). ATXN2 foi também identificada associada a polissomos (RALSER *et al.*, 2005; TADAUCHI *et al.*, 2004) e interagindo com a proteína de ligação a poli(A) (PABP1) a qual possui um importante papel no controle da tradução e regulação na degradação do mRNA (RALSER *et al.*, 2005). ATXN2 interage com a RNA helicase DDX6 (ortóloga de Dhh1 em leveduras) que é um provável componente de *P-bodies*. Alterações no nível de ATXN2 afetam a associação dos *P-bodies* e leva a mudanças na distribuição de TIA-1 em grânulos de estresse. Todos esses resultados sugerem um possível papel na estocagem e degradação do RNA (SATTEFIELD e PALLANCK, 2006). Por esse motivo, esta proteína também foi selecionada para estudo.

Os anti-soros obtidos contra as proteínas WW e ATXN2 não reagiram especificamente em extrato proteico das formas epimastigotas de *T. cruzi* e, por

isso, demos prosseguimento ao trabalho com a proteína TcGAP2 cujo anti-soro foi específico em *T. cruzi* (figura 11).

A proteína TcGAP2 está localizada no cinetoplasto e no citoplasma tanto em epimastigotas quanto em epimastigotas sob estresse nutricional (figura 12). Em metacíclicos, a intensidade de marcação diminuiu quase por completo (figura 12). Esses resultados sugerem que a proteína TcGAP2 tenha um papel importante ao longo do ciclo de vida, pois se comporta de maneira dinâmica em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A intensidade de marcação reduzida em tripomastigotas metacíclicos reflete a diminuição da expressão da proteína nestas formas vista nos ensaios de *Western blotting* ao longo da metaciclogênese (figura 12), que também foi vista no trabalho de proteômica quantitativa da metaciclogênese de *T. cruzi* (DE GODOY *et al.*, 2012). Buscando um maior refinamento da localização subcelular, observamos através de microscopia eletrônica de transmissão que, dentro do cinetoplasto, TcGAP2 está distribuída por todo o cinetoplasto (figura 14). Nos ensaios de imunolocalização da proteína TcGAP2, pudemos notar um padrão diferente de marcação no cinetoplasto que nos remeteu ao padrão observado quando minicírculos estão sendo replicados.

Na família Trypanosomatidae, o genoma mitocondrial está contido em uma região específica da mitocôndria denominada cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto (kDNA) de tripanossomatídeos é organizado em um arranjo incomum de moléculas circulares, concatenadas em uma única rede compacta. Dois tipos de anéis de DNA estão presentes no cinetoplasto: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos se assemelham ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores e codifica rRNAs e subunidades da cadeia respiratória (SHAPIRO e ENGLUND, 1995). Os minicírculos codificam RNAs guia os quais modificam os transcritos dos maxicírculos por extensas inserções e/ou deleções de resíduos de uridina para formar quadros abertos de leitura funcionais, em um processo denominado edição de RNA (STUART e PANIGRAHI, 2002).

A replicação do kDNA ocorre durante a fase S do ciclo celular, aproximadamente em paralelo à replicação do DNA nuclear, e requer um repertório de moléculas, incluindo topoisomerases, DNA polimerases, proteínas de ligação a sequências universais nos minicírculos, primases e ribonucleases. Flanqueando o disco de kDNA, estão dois sítios antipodais, cada um contendo enzimas envolvidas na replicação. Dentre as enzimas, podemos citar a topoisomerase II, a DNA

polimerase β e a endonuclease específica de estrutura I (SSE-1), uma enzima que possui atividade ribonuclease H. Pouco se sabe sobre a replicação dos maxicírculos, apenas que ela ocorre de maneira unidirecional, a partir de uma origem única, sem desprendimento dos maxicírculos da rede. De acordo com o modelo proposto por Li e Englund (1997), antes da replicação ter início, os minicírculos covalentemente fechados são clivados e linearizados pela ação da enzima topoisomerase II e, assim, liberados individualmente da rede para a zona cinetoflagelar, situada entre o kDNA e a membrana mitocondrial próxima ao corpo basal flagelar. Eles então encontram a primase, e provavelmente outras proteínas, para formar os complexos de iniciação que se movem para os sítios antipodais para iniciar a replicação. Após o término da duplicação dos minicírculos e antes de retornarem ao disco de kDNA, os oligonucleotídeos são removidos pela proteínas SSE-1, alguns *gaps* são reparados pela DNA polimerase β e os minicírculos são religados pela topoisomerase II. A reintegração dos minicírculos recém-sintetizados ao redor da periferia da rede de kDNA resulta na zona periférica de minicírculos com *gaps* e uma zona central de minicírculos não replicados covalentemente fechados. À medida que a replicação ocorre, a zona periférica aumenta enquanto a zona central diminui. Após todos os minicírculos terem replicado, a rede duplicou o seu conteúdo de minicírculos, todos ainda com descontinuidades. Antes da divisão da rede para produzir duas redes filhas, todos os minicírculos da rede duplicada se tornam fechados covalentemente. Parece que os *nicks* e *gaps* marcam os minicírculos que tenham completado a replicação, garantindo que cada minicírculo replique uma vez apenas por geração.

Dessa forma, os minicírculos que sofrem replicação podem ser marcados *in situ* com dUTP conjugado a um fluoróforo usando a enzima TdT, já mencionada ao longo desta tese. Assim, foi possível fazer ensaios de imunofluorescência para observar o padrão de localização da proteína TcGAP2 em relação ao padrão de minicírculos replicados ou em processo de replicação. Observamos uma co-localização parcial de TcGAP2 com minicírculos que sofreram replicação (figura 13).

O perfil de sedimentação da proteína TcGAP2 em gradientes de sacarose demonstra que a proteína está presente desde as frações mais leves até frações que correspondem aos monossomos, inclusive é detectada em frações correspondentes a polissomos contendo dois ribossomos em epimastigotas sob estresse nutricional. Este perfil de sedimentação corrobora com a identificação nas

frações polissomal e pós-polissomal em epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional (Alves *et al.*, 2010).

A identificação da proteína TcGAP2 em complexos ribonucleoproteicos isolados das frações polissomal e pós-polissomal através da incubação destas frações com microesferas oligo-d(T) é uma evidência de que os complexos que contêm esta proteína contenham RNA poli(A)⁺ (ALVES *et al.*, 2010) Dessa forma, foi possível utilizar uma abordagem ribonômica na tentativa de identificar quais os mRNAs que se associam a estes grânulos nas formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional.

Aproximadamente 50% dos alvos identificados representam RNAs que codificam proteínas hipotéticas (quadros 2 e 3), dado este que reflete a informação obtida através do seqüenciamento do genoma de *T. cruzi* que revelou que apenas 50,8% dos genes preditos para codificar proteínas possuem função putativa baseada na similaridade significativa com proteínas previamente caracterizadas ou com domínios funcionais conhecidos (EL-SAYED *et al.*, 2005). Ainda há muito que pesquisar para melhorar nossa compreensão sobre os tripanosomatídeos, organismos estes que divergiram muito cedo e, assim, pouca informação é obtida por homologia.

Dentre os mRNAs identificados (quadros 2 e 3), foi possível observar transcritos codificadores de quinases e fosfatases. Estas moléculas fazem parte de cascatas regulatórias importantes em processos de diferenciação, transmitindo os sinais do ambiente e coordenando processos intracelulares. Um dos eventos moleculares diretamente envolvidos no disparo da metaciclogênese é a fosforilação de eIF2 α (fator de iniciação eucariótico 2 α) (TONELLI *et al.*, 2011). A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, induzida por estresse nutricional, aumentou pela superexpressão de eIF2 α e diminuiu pela superexpressão de eIF2 α contendo uma mutação pontual. Estas observações podem refletir um drástico aumento de eIF2 α após o estresse. A forma fosforilada de eIF2-GDP sequestra as quantidades limitadas de eIF2B, prevenindo a reação de reciclagem e, conseqüentemente, reduzindo as quantidades disponíveis de eIF2-GTP para novos ciclos de tradução. Por outro lado, a superexpressão da proteína mutada resultaria numa disponibilidade maior de eIF2-GTP, mesmo sob condições de estresse (TONELLI *et al.*, 2011). Estes efeitos estão refletidos nos perfis de polissomos de

células submetidas a estresse nutricional (TONELLI *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2010).

A fosforilação de eIF2 α pode afetar diferencialmente a tradução de mRNAs em geral. Alguns transcritos podem ser preferencialmente traduzidos sob condições que diminuam a disponibilidade do complexo ternário. Isto ocorre para o mRNA codificador de GCN4 em levedura (MUELLER e HINNEBUSCH, 1986) e de ATF4 em mamíferos (VATTEM e WEK, 2004). Estes mensageiros são traduzidos por um mecanismo não convencional que envolve a presença de pequenos quadros abertos de leitura (uORFs) em seus mRNAs, os quais impedem a tradução do ORF codificadora da proteína principal. Sob condições que aumentam a fosforilação de eIF2 α , a disponibilidade menor do complexo ternário permite que os ribossomos “pulem” as uORFs e traduzam a ORF principal. É possível que as proteínas envolvidas na diferenciação dos parasitas possam ser preferencialmente sintetizadas quando a fosforilação de eIF2 α é aumentada.

De fato, a fosforilação é um dos mecanismos de regulação da expressão pós-traducional e, por ser reversível, é utilizado como mecanismo chave para regular a maioria dos processos biológicos incluindo proliferação e diferenciação. Aproximadamente 2% do genoma de *T. cruzi* codifica quinases, sugerindo um papel regulatório importante no controle da função e desenvolvimento do parasita (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Dentre os alvos identificados em epimastigotas (quadro 2), podemos observar transcritos codificadores de proteínas ribossomais. Durante a transição de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, há uma redução substancial na representação de proteínas ribossomais no proteoma das formas metacíclicas (ATWOOD *et al.*, 2005). Trinta e sete das cinquenta proteínas com maiores escores no proteoma de epimastigotas e que não são detectadas no proteoma de metacíclicos são proteínas ribossomais. Uma redução na capacidade de síntese proteica seria consistente com o *status* estacionário não-replicativo de tripomastigotas metacíclicos. Análises por microarranjos de DNA também documentaram uma diminuição considerável na expressão de proteínas ribossomais nas formas metacíclicas em *Leishmania major* (SAXENA *et al.*, 2003).

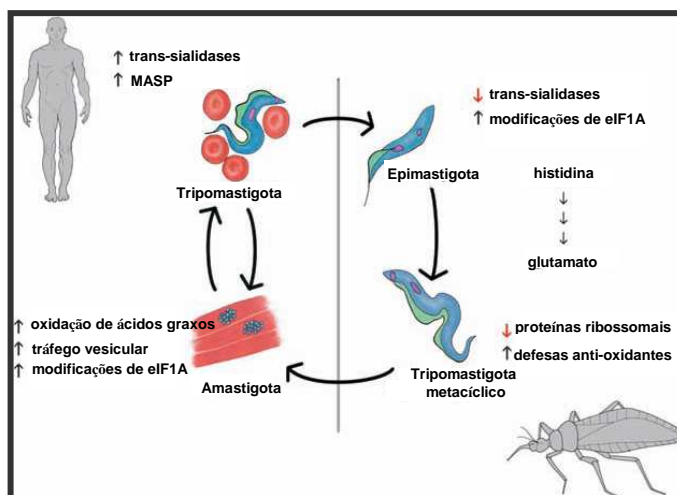


Figura 40 – Ciclo de vida e resumo das maiores conclusões obtidas das análises do proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: adaptado de ATWOOD *et al.* (2005).

Numerosos estudos, analisando proteínas ribossomais mais globalmente em nível de organismo, têm mostrado que proteínas ribossomais diferentes são expressas em níveis distintos em um determinado tipo celular. Na ameba *Dictyostelium discoideum*, os ribossomos são compostos por diferentes proteínas ribossomais quando comparados dois estágios distintos do seu ciclo de vida. Muitas proteínas ribossomais são expressas em diferentes níveis em um estágio comparado a outro, sugerindo que estas proteínas possam ser reguladas durante a diferenciação celular (RAMAGOPAL e ENNIS, 1981; RAMAGOPAL, 1990). Em camundongos, os níveis dos transcritos de Rpl38 mostram uma expressão específica de tecido. Por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de Rpl38 está aumentada em somitos em desenvolvimento e em um subconjunto específico de neurônios motores localizados no cordão espinhal (KONDRASHOV *et al.*, 2011). A expressão de RPL10 também está regulada durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, estando enriquecida na epiderme e nos ossos do feto (MILLS *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 2000). A heterogeneidade na expressão de proteínas ribossomais também foi vista em *Drosophila melanogaster*. Algumas proteínas ribossomais, RpS5b, Rps19a, RpL10Aa e RpL37b, estão aumentadas nos testículos, por exemplo (MARYGOLD *et al.*, 2007). Tal heterogeneidade na expressão de proteínas ribossomais nas gônadas sugere que o desenvolvimento de células germinativas requer variações específicas de tecido na maquinaria de tradução.

Alvos de TcGAP2 também incluem mRNAs codificadores de mucinas e MASPs (quadros 2 e 3), os quais foram identificados na fração pós-polissomal de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2010). As mucinas são glicoproteínas de superfície, codificadas por centenas de genes, responsáveis pela proteção e infectividade do *T. cruzi* modulando a resposta imune do hospedeiro. Embora os membros desta família sejam expressos durante todo o ciclo de vida do protozoário, as proteínas do grupo TcMUCII são específicas das formas tripomastigotas (BUSCAGLIA *et al.*, 2004). Da mesma forma, as proteínas da família MASP (*mucin-associated surface protein*) são expressas predominantemente nas formas tripomastigotas (ATWOOD *et al.*, 2005).

Em epimastigotas sob estresse nutricional, foram identificados mRNAs codificadores de trans-sialidases (TS) (quadro 3). Trans-sialidases (TS) são enzimas de superfície ancoradas em GPI que catalisam a transferência de resíduos de ácido siálico do hospedeiro para glicoconjugados do parasita através de uma reação de transglicosidase que parece ser crítica para a sobrevivência e habilidade de invasão de *T. cruzi*. Formas epimastigotas não infectivas não expressam TS e concomitantemente não possuem ácido siálico em sua superfície celular. Quando epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, então há expressão de TS, para que, uma vez no sangue do hospedeiro mamífero, possa adquirir rapidamente o ácido siálico a partir dos sialoglicoconjugados do hospedeiro (ATWOOD *et al.*, 2005).

mRNAs codificadores de proteínas de ligação a RNA estão representados na fração polissomal de epimastigotas (ALVES, 2010) e também aparecem como alvos da proteína TcGAP2. Proteínas de ligação a RNA são importantes, particularmente em tripanossomatídeos cuja regulação da expressão gênica se dá por mecanismos pós-transcricionais que envolvem a associação de proteínas de ligação a RNA aos transcritos para direcioná-los dentro da célula.

Muitos alvos em epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional estão relacionados com metabolismo. mRNAs que codificam proteínas envolvidas com metabolismo também foram identificadas na fração polissomal de epimastigotas (ALVES, 2010). Estes mRNAs podem estar sendo reprimidos em epimastigotas sob estresse nutricional, o que condiz com um estado de repressão do metabolismo em geral observado nestas formas. Porém, se não for o caso, e estes mensageiros estiverem sendo traduzidos, as proteínas codificantes podem apresentar funções

não-canônicas, podendo atuar na regulação da expressão gênica, como ocorre em procariotos e outros eucariotos. Exemplos de proteínas relacionadas ao metabolismo, mas que também possuem outras funções, estão a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SINGH e GREEN, 1993), inosina monofosfato desidrogenase (MCLEAN *et al.*, 2004), acetil-CoA carboxilase (BENSON *et al.*, 2008), lipin-1 (REUE e ZHANG, 2007), aminoacil-tRNA sintetase (MARTINIS *et al.*, 1999), dentre outros exemplos.

Sabe-se que várias proteínas auxiliam nas etapas de recrutamento, varredura e localização do códon AUG da iniciação da tradução. Sabe-se que, em mamíferos, eIF4A e eIF4B facilitam o processo de escaneamento, possivelmente desfazendo estruturas secundárias presentes na região 5' UTR dos transcritos. A idéia é que eIF4A é recrutada para a extremidade 5' através de interações com eIF4G. Porém, há algumas incertezas sobre este mecanismo, especialmente em leveduras (LINDER, 2003). Estudos prévios da interação entre eIF4A e eIF4G em *S. cerevisiae* se mostraram contraditórios (NEFF e SACHS, 1999; DOMINGUEZ *et al.*, 1999). Além dos fatores acima mencionados, outras RNA helicases mostraram envolvimento na iniciação da tradução em leveduras. Ded1 e seu homólogo, Dbp1, mostraram capacidade de influenciar a estabilidade de escaneamento de longas 5' UTRs (BERTHELOT *et al.*, 2004).

Proteínas de estresse, incluindo proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* ou HSPs), são muito importantes para a sobrevivência do parasita, já que este é submetido a mudanças ambientais durante seu ciclo de vida, envolvendo a mudança entre um hospedeiro invertebrado e um mamífero. mRNAs codificadores de algumas HSPs foram identificados dentre os alvos de TcGAP2 (quadros 2 e 3). Um dos transcritos identificados em epimastigotas sob estresse nutricional é o mRNA codificador da proteína DnaJ. Além de participar no dobramento de polipeptídeos nascentes, na translocação através de membranas e na montagem de complexos oligoméricos, as chaperonas da família Hsp70/DnaK e os co-fatores das famílias DnaJ mostraram ter papel essencial na degradação proteica. Uma característica típica de Hsp70/DnaK é sua habilidade de se ligar seletivamente a oligopeptídeos hidrofóbicos ou proteínas não dobradas. DnaJ estimula a atividade ATPase de DnaK e, sozinha, pode também se ligar a certas proteínas não-dobradas. Ambas chaperonas podem, dessa forma, facilitar o reconhecimento de conformações ou atuar como co-fatores em processos proteolíticos envolvidos na

degradação seletiva de polipeptídeos com conformações anormais. Outra HSP também identificada dentre os alvos em epimastigotas sob estresse nutricional é HslVU (quadro 3). Em *E. coli*, esta proteína está presente no operon hslVU o qual codifica duas proteínas de choque térmico, HslV de 19 kDa e HslU de 50 kDa. HslV possui atividade protease, enquanto HslU, uma atividade ATPase essencial. Dessa forma, HslV e HslU funcionam juntas como uma atividade proteolítica. Outra de choque térmico identificada como alvo em epimastigotas foi a HSP60 mitocondrial (quadro 2). Este mRNA foi também identificado na fração pós-polissomal de epimastigotas, indicando que este mRNA não está sendo traduzido (ALVES, 2010).

Foi identificado um grupo de mRNAs na fração polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional, cujas proteínas codificantes estão envolvidas com proteólise (ALVES, 2010). Além disso, sabe-se que mecanismos de proteólise são essenciais para o processo de metaciclogênese. Caso esteja havendo expressão das proteínas *heat shock* identificadas em estresse, pode ser um indício de que esteja ocorrendo degradação de determinadas proteínas em decorrência dessa situação de estresse.

O transporte a longa distância de mRNAs é importante na determinação da polaridade em eucariotos. Motores moleculares movem grandes complexos ribonucleoprotéicos (mRNPs) contendo proteínas de ligação a RNA e fatores associados ao longo de microtúbulos. Foram identificados transcritos codificadores de proteínas que se associam a microtúbulos, como quinesinas e dineínas, além de outras proteínas como, por exemplo, MAP1a/b e Gb4.

Transcritos de proteínas envolvidas com replicação e mitose foram identificados dentre os alvos de TcGAP2 em epimastigotas sob estresse nutricional. Dentre eles, podemos citar mRNAs que codificam a proteína MCM9 (Tc00.1047053510729.130), MCM4 (Tc00.1047053509023.130) e uma ciclina mitótica homóloga à B3 de *Trypanosoma brucei*. A replicação do DNA eucariótico envolve a ativação de múltiplas origens onde se associam complexos de pré-replicação (pré-RCs) na fase G1 que, em eucariotos, compreende o complexo de reconhecimento de origem (ORC), Cdc6, Cdt1, MCM 2-7 e MCM 10. Na transição da fase G1/S, Cdc7/Dbf4 e Cdk2/ciclina E transforma os pré-RCs em complexos de pré-iniciação. Outras proteínas se associam com os complexos para disparar a ativação da origem e, com o recrutamento da maquinaria de alongação, a síntese de DNA tem início.

Regiões não traduzidas (UTRs) têm papel crucial na regulação pós-transcricional, incluindo modulação da exportação de mRNAs do núcleo, eficiência da tradução, localização subcelular e estabilidade. A regulação por UTRs é mediada de diversas formas. Padrões de sequência ou motivos localizados nas UTRs 5' e 3' podem interagir com proteínas de ligação a RNA específicas (revisto por MIGNONE *et al.*, 2002). Sendo assim, foi realizada uma busca para determinar se havia algum motivo comum dentre os alvos identificados nos experimentos de ribonômica. Não foram identificados domínios conservados nas regiões 3' UTR nem nas regiões codificadoras, porém foram identificados dois domínios conservados dentre os transcritos presentes em complexos contendo a proteína TcGAP2 na região 5' UTR. Um dos domínios, rico em guaninas, está presente em 88 alvos dos 216 identificados (figura 28). Um outro domínio gerado pela ferramenta MEME é uma sequência rica em citosinas e adenosinas presente em 22 alvos (figura 28).

As mudanças entre os alvos quando comparamos epimastigotas com epimastigotas sob estresse nutricional podem refletir a reprogramação gênica que ocorre em virtude da situação de estresse nutricional e gatilho para o processo de diferenciação. Entretanto, as funções biológicas dos alvos se mantêm, sugerindo que esta proteína regule alvos relacionados com processos metabólicos e celulares e com funções catalíticas, de ligação a ATP e de fosforilação (figuras 16 a 27). Mudanças na expressão gênica durante condições de estresse são um fenômeno universal que ocorrem para favorecer a sobrevivência celular.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, não foi possível definir se os complexos que contêm a proteína TcGAP2 estão envolvidos na regulação da tradução, estabilidade ou degradação dos transcritos identificados. Já que TcGAP2 foi identificada tanto nas frações polissomal e pós-polissomal de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento quanto nas frações polissomal e pós-polissomal em epimastigotas sob estresse nutricional, é provável que não apenas TcGAP2 determine o destino de um mRNA, mas sim as demais proteínas no complexo mRNP (figura 41).

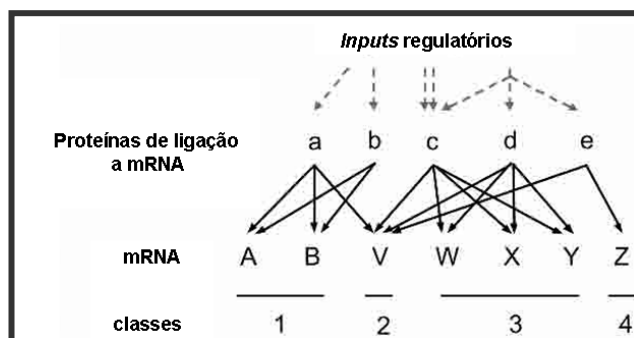


Figure 41 - Organização pós-transcricional da expressão gênica por mRNPs. Proteínas de ligação a RNA que servem como mediadores de processos da expressão gênica desde a síntese do mRNA até a degradação se ligam a mRNAs de maneira combinatorial. Algumas proteínas se ligam ou regulam os próprios mRNAs, como mostrado aqui para as proteínas a e b. A combinação específica de interações pode ditar a via que um transcrito segue dentro da expressão gênica pós-transcricional. As populações de transcritos ligados por proteína(s) de ligação a RNA específica são frequentemente enriquecidos em transcritos codificadores de proteínas de funções específicas e outras classes características. Desta forma, interações mRNA-proteínas organizam estruturalmente e funcionalmente a expressão gênica. Tem sido sugerido que *inputs* regulatórios regulam a ligação de RBPs aos seus transcritos alvo e, assim, regulam a organização da expressão gênica mediada por RNPs. Fonte: adaptado de HIERONYMUS e SILVER (2004).

Processos biológicos requerem o posicionamento de moléculas em um determinado tempo e espaço. Esta função é frequentemente alcançada pela organização em complexos macromoleculares. De fato, a maioria das proteínas celulares existe como complexos multiprotéicos. Proteínas que estão no mesmo complexo podem diferir na função específica, mas funcionar no mesmo processo geral e, assim, possuir uma função geral relacionada. A imunoprecipitação de proteínas específicas e seus complexos associados é uma abordagem útil para estudar as associações físicas e propriedades funcionais. Assim, purificação por afinidade de proteínas específicas e seus complexos associados por meio de anticorpos ou através de etiquetas fusionadas a proteínas é uma abordagem útil para o estudo de associações físicas e propriedades funcionais em vários organismos e sob diversas condições distintas. Dessa forma, realizamos ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo purificado contra TcGAP2 com extratos de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional para definir os componentes dos complexos que contêm esta proteína e qual o possível papel dos mesmos na regulação da expressão gênica de *T. cruzi*.

A análise dos complexos imunoprecipitados demonstrou que a composição proteica dos complexos contendo TcGAP2 difere entre as duas formas avaliadas (quadros 4 e 5). Nestes experimentos, foram identificadas, além da proteína TcGAP2, uma proteína previamente descrita como parceira da mesma, a proteína

GAP1 (*guide associated protein 1*) que está envolvida na edição de RNAs em *Trypanosoma brucei*.

A reação de edição de RNA é um processo de modificação pós-transcricional único em tripanosomatídeos (BENNE *et al.*, 1986). A reação acontece na mitocôndria única destes protozoários. Desde a descoberta do processo de edição de RNA em 1986 (BENNE *et al.*, 1986), esforços consideráveis têm sido direcionados na compreensão dos mecanismos moleculares que constituem a base do que foi inicialmente um processo biológico enigmático. Um grande avanço foi a descoberta dos RNAs guia os quais revelaram que a informação dos eventos de inserção e/ou deleção de uridinas (U) residem nestas moléculas e uma função dos milhares de minicírculos é codificá-los (BLUM, BAKALARA e SIMPSON, 1990). O estabelecimento de um ensaio de edição *in vitro* permitiu a obtenção de evidências experimentais de que o mecanismo de edição de RNA envolve componentes protéicos mitocondriais e que a reação é catalisada por complexos proteicos de alta massa molecular (POLLARD, HARRIS e HAJDUCK, 1992; GÖRINGER *et al.*, 1994; SEIWERT, HEIDMANN e STUART, 1996; revisto por GÖRINGER, 2012). Complexos multi-proteicos que realizam uma cascata de reações de edição foram estudados em *Trypanosoma brucei* (APHASIZHEV *et al.*, 2003; CARNES *et al.*, 2008; LAW *et al.* 2005; LAW, O'HEARN e SOLLNER-WEBB, 2007; PANIGRAHI *et al.*, 2003; PANIGRAHI *et al.*, 2006) e *Leishmania tarentolae* (APHASIZHEV *et al.*, 2003). Estes estudos criaram um quadro conciso de uma partícula de mais ou menos 20 componentes, o editossomo 20S, o qual possui atividades de clivagem de mRNA, inserção/deleção de U e religação. O isolamento e a caracterização do editossomo 20S ajudaram a melhor compreender como um complexo multiprotéico pode orquestrar as etapas catalíticas necessárias para o amadurecimento da maioria dos RNAs mitocondriais em tripanossomos (SIMPSON *et al.*, 2004; LUKES *et al.*, 2005; STUART *et al.*, 2005). Evidências apontam para existência de complexos 20S funcionalmente e composicionalmente distintos e, assim, Cames e colaboradores propuseram que pelo menos três editossomos distintos existem. É possível que a composição dos editossomos esteja em um equilíbrio dinâmico.

Outras proteínas acessórias foram caracterizadas e estas foram identificadas como componentes de um desses complexos de edição de RNA. Três grupos independentes identificaram este complexo multiproteico acessório por imunoprecipitação de duas proteínas associadas a gRNA fusionadas a alguma

etiqueta seguida de espectrometria de massas, as proteínas GAP1 e GAP2 (PANIGRAHI *et al.*, 2008; HASHIMI *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2008). Este complexo foi denominado complexo de ligação a RNA mitocondrial 1 (MRB1) em *T. brucei* e de complexo de ligação a gRNA (GRBC) em *Leishmania major*. Este complexo MRB1/GRBC possui uma composição imprecisa porque as purificações iniciais e subsequentes de MRB1 identificaram componentes comuns e distintos. As proteínas do complexo MRB1, até então caracterizadas, são essenciais para o crescimento e afetam a edição de RNA diretamente ou indiretamente em numerosas etapas incluindo iniciação (MRB3010 e TbRGG2), progressão da edição 3'-5' (TbRGG2), estabilização de gRNA (GAP 1/2 e REH2), bem como etapas não definidas de edição (Tb11.02.5390 e Tb927.6.1680). Além disso, alguns ensaios de *pull-down* de MRB1 contêm componentes dos complexos MERS1 (*mitochondrial edited mRNA stability*) e kPAP1 (*mRNA polyadenylation*) (AMMERMAN *et al.*, 2011; AMMERMAN *et al.*, 2010; ACESTOR *et al.*, 2009; HASHIMI *et al.*, 2009; WENG *et al.*, 2008). Dessa forma, o complexo MRB1 pode ter um papel central em coordenar a edição, estabilidade, poliadenilação e tradução de RNAs. Outro componente do complexo MRB1 foi identificado nos experimentos de imunoprecipitação utilizando extratos de epimastigotas sob estresse nutricional, a proteína de ligação a RNA mitocondrial (Tc00.1047053509895.20), denominada MRB4160 em *T. brucei*.

Além da proteína GAP1, várias proteínas ribossomais foram identificadas nas imunoprecipitações utilizando extratos de epimastigotas, como as proteínas da subunidade ribossomal maior L12, L13 e L37 e uma proteína da subunidade ribossomal menor S26. Algumas proteínas ribossomais possuem funções adicionais além do papel nos ribossomos. A maioria delas são proteínas de ligação a RNA e algumas podem se ligar potencialmente a outros RNAs ou a complexos fora do ribossomo. Por exemplo, várias proteínas ribossomais regulam sua própria síntese. Em leveduras e humanos, as proteínas Rpl30 e RPS13, respectivamente, inibem o *splicing* de seu próprio transcrito. Outro exemplo interessante é o da proteína RPL13A. Quando fosforilada, RPL13A é liberada do ribossomo, se liga fortemente ao fator de iniciação eIF4G e bloqueia o recrutamento do complexo 43S, inibindo a tradução do mRNA da ceruloplasmina através de sua ligação a um elemento *cis* na região 3' UTR deste transcrito (MAZUMBER, SESHADRI e FOX, 2003).

Outra proteína identificada nos experimentos de imunoprecipitação foi a proteína *retrotransposon hot spot* (RHS). Proteínas desta família se associam

preferencialmente com regiões polimórficas subteloméricas em *Trypanosoma brucei*, mas também no centro dos cromossomos (BRINGAUD *et al.*, 2002). A expressão dessa proteína em específico, identificada nos experimentos de imunoprecipitação, aumenta ao longo da metaciclologênese em *T. cruzi* (DE GODOY *et al.*, 2012).

Outra proteína identificada nos experimentos de imunoprecipitação em extratos de epimastigotas sob estresse nutricional foi a proteína I/6, um antígeno reconhecido de maneira forte e específica por reação cruzada por anticorpos auto-reativos do hospedeiro. Esta proteína foi descrita como associada a microtúbulos e pode estar envolvida no *crosslinking* dos mesmos em *Trypanosoma brucei* (DETMER *et al.*, 1997). Possui um domínio de ligação a cálcio *EF-hand* e um domínio de seis unidades de repetição arranjadas em *tandem* de oito aminoácidos de comprimento.

A estabilidade de muitos transcritos que são regulados durante o ciclo de vida dos tripanosomatídeos parece ser determinada, pelo menos em parte, por proteínas que se ligam a seqüências específicas dentro da região 3'-UTR dos mRNAs, modulando a expressão do seu mRNA alvo. Uma proteína de ligação a RNA foi identificada na imunoprecipitação em epimastigotas (Tc00.1047053508895.50/Tc00.1047053506211.70). Esta proteína possui um domínio RING *finger*, um domínio dedo de zinco modificado que contém um motivo C_3HC_4 que se liga a dois cátions de zinco. Este motivo pode ser encontrado em várias proteínas funcionalmente distintas e, inicialmente, sua função não estava clara, embora sabia-se que são mediadores de interações proteína-proteína e estão envolvidos em uma grande variedade de processos celulares, incluindo desenvolvimento, apoptose, oncogênese e replicação viral (BORDEN, 2000; BORDEN e FREEMONT, 1996). Estudos realizados em 1999 foram essenciais para esclarecer a função do motivo RING *finger*. O domínio RING de c-Cb1 é mediador de interação proteína-proteína na via de ubiquitinação e degradação por proteassomo 26S (JOAZEIRO *et al.*, 1999; WATERMAN *et al.*, 1999; YOKOUCHI *et al.*, 1999). Esta proteína está sob investigação no nosso laboratório e foi identificada no trabalho de Alves e colaboradores (2010) nas frações polissomal de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional e na fração pós-polissomal de epimastigotas sob estresse nutricional. Foram produzidos anti-soros contra esta proteína para realização de experimentos para caracterizá-la. Esta proteína é

expressa constitutivamente ao longo da metaciclologênese. Além disso, apresenta um padrão granular nas formas epimastigotas e uma diminuição na marcação em tripomastigotas metacíclicos em ensaios de imunofluorescência (ALVES, 2010).

Outra proteína de ligação a RNA foi identificada nos experimentos de imunoprecipitação utilizando extratos de epimastigotas (Tc00.1047053511727.70/Tc00.1047053511727.290) e possui domínio RRM, conhecido por mediar interações com RNA. Esta proteína foi identificada nas frações polissomal de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional (ALVES *et al.*, 2010) e também está sob investigação no nosso grupo.

Uma das melhores maneiras de obter mais informações a respeito da função de uma proteína, é deletar o gene codificador da mesma e observar o fenótipo ou até mesmo realizar ensaios mais específicos quando se tem indícios do papel desta. A obtenção de um transfectante com o gene deletado seria uma ferramenta muito importante para esse trabalho de caracterização da proteína já que *T. cruzi* não possui maquinaria de RNA de interferência. Uma possibilidade para que o nocaute do segundo alelo tenha falhado pode ser explicado por diferenças nas regiões intergênicas entre os dois alelos. Se esta proteína estiver de alguma forma ligada à replicação de minicírculos ou edição de RNA, o nocaute desta seria realmente letal. Em *Trypanosoma brucei*, TbGAP2 é essencial para o crescimento de procíclicos (HASHIMI *et al.*, 2009). A estratégia de nocaute induzível em *T. cruzi* pode ser uma alternativa. Esta abordagem foi descrita em *Toxoplasma gondii* e faz uso da ligação reversível de um ligante sintético, denominado Shield-1, a uma proteína em estudo fusionada a um domínio de desestabilização (ddFKBP) baseado na proteína de ligação à rapamicina – FKBP12 (HERM-GÖTZ *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

Com base nestes resultados, podemos concluir:

1. A proteína TcGAP2, uma proteínas hipotética poli-Q, foi identificada previamente neste parasita e sua expressão é regulada durante a metaciclogênese de *T. cruzi*.
2. Esta proteína está presente em complexos dependentes de polissomos em epimastigotas sob estresse nutricional e está localizada tanto no citoplasma quanto no cinetoplasto em epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional.
3. Os mRNAs presentes nos complexos imunoprecipitados com o anticorpo contra TcGAP2 mudam em resposta ao estresse, porém mantêm funções relacionadas.
4. A análise proteica dos complexos imunoprecipitados com o anticorpo contra TcGAP2 revelou que o conteúdo protéico nestes complexos muda em resposta ao estresse.
5. O gene codificador da proteína TcGAP2 provavelmente é um gene essencial.
6. TcGAP2 faz parte de complexos ribonucleoproteicos no citoplasma que podem estar regulando o processamento de mRNAs específicos.

PERSPECTIVAS

Os resultados desse trabalho abrem algumas perspectivas de investigação da função dos grânulos de TcDhh1 no processamento de mRNAs durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, entre elas:

1. Obter transfectantes expressando as proteínas ATXN2 e WW fusionadas a GFP ou PTP e, assim, realizar experimentos para caracterizá-las funcionalmente.
2. Confirmar os dados de ribonômica por RT-PCR.
3. Realizar ensaios de duplo híbrido com algumas das proteínas identificadas na proteômica de imunoprecipitação a fim de validar estes resultados.
4. Nocautear, de forma induzível, o segundo alelo do gene de TcGAP2 através de substituição do gene selvagem pelo gene fusionado ao domínio de desestabilização (DD).
5. Com a deleção do gene de TcGAP2, será possível realizar diversos experimentos, como determinar se há alguma modificação morfológica no cinetoplasto, diminuição nos níveis de RNA guia, avaliar os níveis dos mRNAs identificados pelos experimentos de ribonômica, dentre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acestor, N.; Panigrahi, A. K.; Carnes, J.; Zíková, A.; Stuart, K. D. The MRB1 complex functions in kinetoplastid RNA processing. **RNA**, v. 15, p. 277-286, 2009.

Aguilera, A. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, p. 242-250, 2005.

Alves, L. R. **Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas (mRNPs) em *Trypanosoma cruzi***. Tese (Doutorado em Biologia Celular), Instituto Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

Alves, L. R.; Ávila, A. R.; Correa, A.; Holetz, F. B.; Mansur, F.; Manque, P. A.; Menezes, J. P. B.; Buck, G. A.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 452, p. 72-78, 2010.

Ammerman, M. L.; Hashimi, H.; Novotná, L.; Cicová, Z.; McEvoy, S. M.; Lukes, J.; Read, L. K. MRB3010 is a core component of the MRB1 complex that facilitates an early step of the kinetoplastid RNA editing process. **RNA**, v. 17, p. 865-877, 2011.

Ammerman, M. L.; Prenyak, V.; Fisk, J. C.; Foda, B. M.; Read, L. K. TbRGG2 facilitates kinetoplastid RNA editing initiation and progression past intrinsic pause sites. **RNA**, v. 16, p. 2239-2251, 2010.

Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. **J. Cell. Biol.**, v. 172, p. 803 – 808, 2006.

Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends Biochem. Sci.**, v. 33, p. 141 – 150, 2007.

Aphasizhev, R.; Aphasizheva, I.; Nelson, R. E.; Gao, G.; Simpson, A. M.; *et al.* Isolation of a U-insertion/deletion editing complex from *Leishmania tarentolae* mitochondria. **EMBO J.**, v. 22, p. 913-924, 2003.

Araújo, P. R. & Teixeira, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.106, n. 3, p. 257-266, 2011.

Archer, S. K.; Luu, V. D.; de Queiroz, R. A.; Brems, S.; Clayton, C. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 8, e1000565, 2009.

Argolo, A. M.; Felix, M.; Pacheco, R.; Costa, J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

Atwood, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, p. 473-6, 2005.

Ávila, A. R.; Yamada-Ogatta, S. F.; da Silva Monteiro, V.; Krieger, M. A.; Nakamura, C. V.; de Souza, W.; Goldenberg, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene wich is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, n. 2, p. 169-177, 2001.

Balagopal, V. & Parker, R. Polysomes, P-bodies and stress granules: stated and fates of eukaryotic mRNAs. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 3, p. 403-408, 2009.

Bangs, J. D.; Crain, P. F.; Hashizume, T.; McCloskey, J. A.; Boothroyd, J. C. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9805 – 9815, 1992.

Barbarese, E.; Koppel, D. E.; Deutscher, M. P.; Smith, C. L.; Ainger, K.; Morgan, F.; Carson, J. H. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. **J. Cell Sci.**, v. 108, n. 8, p. 2781-2890, 1995.

Barboza, R.; Cociorva, D.; Xu, T.; Barbosa, V. C.; Perales, J.; Valente, R. H.; Franca, F. M.; Yates, J. R.; Carvalho, P. C. Can the false-discovery rate be misleading? **Proteomics**, v. 20, n. 11, p. 4105-4108, 2011.

Bartholomeu, D. C.; Silva, R. A.; Galvão, L. M.; El-Sayed, N. M.; Donelson, J. E.; Teixeira, S. M. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. **Exp. Parasitol.**, v. 102, n. 3-4, p. 123-133, 2002.

Beach, D. L. & Bloom, K. ASH1 mRNA localization in three acts. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, n. 9, p. 2567-2577, 2001.

Belli, S. I. Chromatin remodeling during the life cycle of trypanosomatids. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 679 – 687, 2000.

Benne, R.; Van den Burg, J.; Brakenhoff, J. P.; Slof, P.; Van Boom, J. H.; Tromp, M. C. Major transcript of the frameshift *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 819-826, 1986.

Benson, B. K.; Meades, G. Jr.; Grove, A.; Waldrop, G. L. DNA inhibits catalysis by the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase: implication for active site communication. **Protein Sci.**, v. 17, n. 1, p. 34-42, 2008.

Benz, C.; Nilsson, D.; Andersson, B.; Clayton, C.; Guilbride, D. L. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 143, n. 2, p. 125-134, 2005.

Berriman, M.; Ghedin, E. & Hertz-Fowler, C. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, p. 416 – 422, 2005.

Berthelot, K.; Muldoon, M.; Rajkowitsch, L.; Hughes, J.; McCarthy, J. E. G. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 987-1001, 2004.

Blum, B.; Bakalara, N. & Simpson, L. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: “guide” RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. **Cell**, v. 60, p. 189-198, 1990.

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.

Borden, K. L. B. RING domains: master builders of molecular scaffolds? **J. Mol. Biol.**, v. 295, p. 1103-1112, 2000.

Borden, K. L. B. & Freemont, P. S. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. **Cur. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, p. 395-401, 1996.

Bregues, M.; Teixeira, D. & Parker, R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 310, p. 486 – 489, 2005.

Buscaglia, C. A.; Campo, V. A.; Di Noia, J. M.; Torrecilhas, A. C. T.; De Marchi, C. R.; *et al.* The surface coat of the mammal-dwelling infective Trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 15860-15869, 2004.

Büttner, K.; Wenig, K. & Hopfner, K. The exosome: a macromolecular cage for controlled RNA degradation. **Mol. Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1372-1379., 2006.

Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 6, p. 93-100, 1964.

Campos, P. C.; Bartholomeu, D. C.; Da Rocha, W. D.; Cerqueira, G. C.; Teixeira, S. M. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, n. 12, p. 1383-1389, 2008.

Cano, M. I.; Gruber, A.; Vasquez, M.; Cortes, A.; Levin, M. J.; Gonzales, A.; Degrave, W. M.; Rondinelli, E.; Zingales, B.; Ramirez, J. L.; Alonso, C.; Requema, J. M.; Franco da Silveira, J. *Trypanosoma cruzi* genome project: molecular karyotype of clone CL Brener. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 71, p. 273 – 278, 1995.

Carvalho, P. C.; Fischer, J. S.; Xu, T.; Cociorva, D.; Balbuena, T. S.; Valente, R. H.; Perales, J.; Yates, J. R.; Barbosa, V. C. Search Engine Processor: filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 944-949, 2012.

Carvalho, T. M. & De Souza, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Struct. Funct.**, v. 14, p. 383 – 392, 1989.

Cassola, A.; De Gaudenzi, J. G. & Frasch, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol. Microbiol.**, v. 65, p. 655–670, 2007.

Cassola, A. & Frasch, A. C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 35015-35028, 2009.

Cassola, A. RNA granules living a post-transcriptional life: the trypanosome's case. **Curr. Chem. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 108-117, 2011.

Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159 – 218, 1909.

Clayton, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, v. 21, p. 1881–1888, 2002.

Clayton, C. & Shapira, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 156, p. 93-101, 2007.

Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Thomas, N.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 16, p. 315-327, 1985.

Contreras, V. T.; Araujo-Jorge, T. C.; Bonaldo, M. C.; Thomas, N.; Barbosa, H. S.; Meirelles, M. N. L.; Goldenberg, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 123-133, 1988.

Coughlin, B. C.; Teixeira, S. M.; Kirchhoff, L. V.; Donelson, J. E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 12051–12060, 2000.

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, p. 15–24, 2005.

Czaplinski, K. & Singer, R. H. Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. **Trends Biochem. Sci.**, v. 31, n. 12, p. 687-693, 2006.

D'Orso, I. & Frasch, A. C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from Trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 50520–50528, 2002.

D'Orso, I.; De Gaudenzi, J. & Frasch, A.C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 151–155, 2003.

Dallagiovanna, B.; Correa, A.; Probst, C. M.; Holetz, F. B.; Smircich, P.; de Aguiar, A. M.; Mansur, F.; da Silva, C. V.; Mortara, R. A.; Garat, B.; Buck, G. A.; Goldenberg, S.; Krieger, M. A. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 8266–8273, 2008.

Da Silva, E. R.; Castilho, T. M.; Pioker, F. C.; de Paula Silva, C. H. T.; Floeter-Winter, L. M. Genomic organization and transcription characterization of the gene encoding *Leishmania amazonensis* arginase and its proteins structure prediction. **International J. Parasitol.**, v. 32, n. 6, p. 727-737, 2002.

Da Silva, R. A.; Bartholomeu, D. C. & Teixeira, S. M. Control of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n. 1, p. 87-96, 2006.

De Gaudenzi, J.; Frasch, A. C. & Clayton, C. RNA-binding domain proteins in kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 2106 – 2114, 2005.

De Godoy, L. M. F.; Marchini, F. K.; Pavoni, D. P.; Rampazzo, R. C. P.; Probst, C. M.; Goldenberg, S.; Krieger, M. A. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694-2703, 2012.

De Lange, T.; Michels, P. A.; Veerman, H. J.; Cornelissen, A. W.; Borst, P. Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, n. 9, p. 3777-3790, 1984.

De Souza, F. S.; Rampazzo, R. de C.; Manhaes, L.; Soares, M. J.; Cavalcanti, D. P.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Fragoso, S. P. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 172, n. 2, p. 90-8, 2010.

De Souza, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt.**, v. 86, p. 197-283, 1984.

De Souza, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 88-126. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

De Souza, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, p. 269–285, 2002.

De Souza, W.; De Carvalho, T. M. U. & Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. Journal Cell Biol.**, article ID 295394, 2010.

Dever, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. **Cell**, v. 108, p. 545–556, 2002.

Dhalia, R.; Reisb, C. R. S.; Freireb, E. R.; Rochab, P. O.; Katzb, R.; Munizc, J. R. C.; Standartd, N.; de Melo Neto, O. P. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 140, p. 23–41, 2005.

Dhalia, R.; Marinsek, N.; Reis, C. R.; Katz, R.; Muniz, J. R.; Standart, N. *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 2495-2507, 2006.

Di Noia, J. M.; D'Orso, I.; Sanchez, D. O.; Frasch, A. C. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **J. Biol. Chem.**, v. 275 p. 10218–10227, 2000.

Dias, J.C.P. Epidemiologia. In *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 48-74. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

Dominguez, D.; Altmann, M.; Benz, J.; Baumann, U.; Trachsel, H. Interaction of translation initiation factor eIF4G with eIF4A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 26720-26726, 1999.

Dumas, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 184, p. 1867-1885, 2000.

Dunand-Sauthier, I.; Walker, C.; Wilkinson, C.; Gordon, C.; Crane, R.; Norbury, C.; Humphrey, T. Sum1, a component of the fission yeast eIF3 translation initiation complex, is rapidly relocalized during environmental stress and interacts with components of the 26S proteasome. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 1626–1640, 2002.

Elias, M. C.; Marques-Porto, R.; Freymuller, E.; Schenkman, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 112, p. 79–90, 2001.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409–4152, 2005.

Estevez, A. M. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 4573-4586, 2008.

Eulalio, A.; Behm-Ansmant, I.; Izaurralde, E. P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. **Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 9-22, 2007.

Evers, R.; Hammer, A.; Kock, J.; Jess, W.; Borst, P.; Memet, S.; Cornelissen, A. W. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. **Cell**, v. 56, p. 585–597, 1989.

Figueiredo, R. C. B. Q.; Rosa, D. S.; Soares, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 1213-1218, 2000.

Furger, A.; Schurch, N.; Kurath, U.; Roditi, I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 4372–4380, 1997.

Garcia, E. S. & Azambuja, P. Fisiologia de Triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), p. 41-47. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

Gentil, L. G.; Cordero, E. M.; do Carmo, M. S.; dos Santos, M. R.; da Silveira, J. F. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, v. 109, n. 2, p. 152-158, 2009.

Gerber, A. P.; Herschlag, D. & Brown, P. O. Extensive association of functionally and cytotoxically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. **PLoS Biol.**, v. 2, n. 3, p. e79, 2004.

Gibson, W. C.; Swinkels, B. W.; Borst, P. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. **J. Mol. Biol.**, v. 201, p. 315–325, 1988.

Gillinger, G. & Bellofatto, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms. **Nucleic Acids. Res.**, v. 29, p. 1556–1564, 2001.

Goldenberg, S.; Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Bonaldo, M. C.; Lima Franco, M. P. A.; Linss, J.; Lafaille, J.; Valle, D.; Morel, C. M. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79 (suppl), 1984.

Göringer, H. U.; Koslowsky, D. J.; Morales, T. H.; Stuart, K. The formation of mitochondrial ribonucleoprotein complexes involving guide RNA molecules in *Trypanosoma brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 1776-1780, 1994.

Göringer, H. U. Composition and function of the *Trypanosoma brucei* editosome. **Annual Review Microbiol.**, v. 66, p. 65-82, 2012.

Günzl, A.; Bruderer, T.; Laufer, G.; Schimanski, B.; Tu, L. C.; Chung, H. M.; Lee, P. T.; Lee, M. G. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 542-551, 2003.

Haile, S. & Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, p. 569–577, 2007.

Hashimi, H.; Cicová, Z.; Novotná, L.; Wen, Y. Z.; Lukes, J. Kinetoplastid guide RNA biogenesis is dependent on subunits of the mitochondrial RNA binding complex 1 and mitochondrial RNA polymerase. **RNA**, v. 15, p. 588-599, 2009.

Hashimi, H.; Ziková, A.; Panigrahi, A. K.; Stuart, K. D.; Lukes, J. TbRGG1, an essential protein involved in kinetoplastid RNA metabolism that is associated with a novel multiprotein complex. **RNA**, v. 14, p. 970-980, 2008.

Heasman, J.; Wessely, O.; Langland, R.; Craig, E. J.; Kessler, D. S. Vegetal localization of maternal mRNAs is disrupted by VegT depletion. **Dev. Biol.**, v. 240, n. 2, p. 377-386, 2001.

Herm-Götz, A.; Agop-Nersesian, C.; Münter, S.; Grimley, J. S. *et al.* Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. **Nature Methods**, v. 4, n. 12, p. 1003-1005, 2007.

Hieronymus, H. & Silver, P. A. A systems view of mRNP biology. **Genes & Dev.**, v. 18, p. 2845-2860, 2004.

Hodo, H. G. & Hatcher, F. M. Multiple DNA-dependent RNA polymerases in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, p. 77–81, 1986

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. Co.**, v. 356, p. 1062–1067, 2007.

Hotz, H. R.; Hartmann, C.; Huober, K.; Hug, M.; Clayton, C. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 30-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. **Nucl. Acids. Res.**, v. 25, p. 3017–3026, 1997.

Huynh, D. P.; Del Bigio, M. R.; Ho, D. H.; Pulst, S. M. Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. **Ann. Neurol.**, v. 45, p. 232-241, 1999.

Ivens, A. C.; Peacock, C. S. & Worthey, E. A. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436–442, 2005.

Jager, A. V.; De Gaudenzi, J. G.; Cassola, A.; D'Orso, I.; Frasch, A. C. mRNA maturation by two-step *trans*-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 2035–2042, 2007.

Jensen, B. C.; Sivam, D.; Kifer, C. T.; Myler, P. J.; Parsons, M. Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 482, 2009.

Jess, W.; Hammer, A. & Cornelissen, A.W. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. **FEBS Lett.**, v. 249, p. 123–128, 1989.

Joazeiro, C. A.; Wing, S. S.; Huang, H.; Levenson, J. D.; Hunter, T.; Liu, Y. C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. **Science**, v. 286, p. 309-312, 1999.

Job, C. & Eberwine, J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, n. 12, p. 889-898, 2001.

Jones, A.; Faldas, A.; Foucher, A.; Hunt, E.; Tait, A.; Wastling, J. M.; Turner, C. M. Visualization and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Proteomics*, v. 6, p. 259–267, 2006.

Kabani, S.; Fenn, K.; Ross, A.; Ivens, A.; Smith, T. K.; Ghazal, P.; Matthews, K. Genome-wide expression profiling of *in vivo* derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 427, 2009.

Kedersha, N. & Anderson, P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 963–969, 2002.

Kedersha, N.; Chen, S.; Gilks, N.; Li, W.; Miller, I. J.; Stahl, J.; Anderson, P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 195–210, 2002.

Kedersha, N.; Stoecklin, G.; Ayodele, M.; Yacono, P.; Lykke-Andersen, J.; Fritzler, M. J.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Golan, D. E.; Anderson, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **J. Cell. Biol.**, v. 169, p. 871 – 874, 2005.

Keene, J. D. & Tenenbaum, S. A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell*, 9: 1161-1167.

Keene, J. D. & Lager, P. J. Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression. **Chromosome Res.**, v. 13, p. 327-337, 2005.

Keene, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, p. 533-543, 2007.

Kloc, M. & Etkin, L. D. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlsirt RNA. **Science**, v. 265, n. 5175, p. 1101-1103, 1994.

Kloc, M.; Zearfoss, N. R. & Etkin, L. D. Mechanisms of subcellular mRNA localization. **Cell**, v. 108, n. 4, 533-544, 2002.

Knowles, R. B.; Sabry, J. H.; Martone, M. E.; Deenrick, T. J.; Ellisman, M. H.; Bassell, G. J.; Kosik, K. S. Translocation of RNA granules in living neurons. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 24, p. 7812-7820, 1996.

Kock, J.; Evers, R. & Cornelissen, A.W. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. **Nucleic Acids. Res.**, v. 16, p. 8753–8772, 1988.

Koenig-Martin, E.; Yamage, M. & Roditi, I. A procyclin associated gene in *Trypanosoma brucei* encodes a polypeptide related to ESAG 6 and 7 proteins. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 55, p. 135–146, 1992.

Köhler, A. & Hurt, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 761-773, 2007.

Kolev, N. G.; Franklin, J. B.; Carmi, S.; Shi, H.; Michaeli, S.; Tschudi, C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, e1001090, 2010.

Kollien, A. H. & Schaub, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 381–387, 2000.

Kondrashov, N.; Pusic, A.; Stumpf, C. R.; Shimizu, K.; Hsieh, A. C.; *et al.* Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*, v. 145, p. 383-397, 2011.

Kornberg, R. D. The molecular basis of eukaryotic transcription. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1989–1997, 2007.

Kozak, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, v. 361, p. 13–37, 2005.

Kramer, S.; Queiroz, R.; Ellis, L.; Webb, H.; Hoheisel, J. D.; Clayton, C. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. **J. Cell Sci.**, v. 121, p. 3002-3014, 2008.

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, 2010.

Krieger, M. A. & Goldenberg. S. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 4, p. 163-166, 1998.

Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 913-949, 1989.

Laufer, G.; Schaaf, G.; Bollgonn, S.; Günzl, A. *In vitro* analysis of alfa-amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 5466–5473, 1999.

Laufer, G. & Günzl, A. *In vitro* competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 113, p. 55–65, 2001.

Law, J. A.; Huang, C. E.; O’Hearn, S.; Sollner-Webb, B. In *Trypanosoma brucei* RNA editing, band II enables recognition specifically at each step of the U insertion cycle. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, p. 2785-2794, 2005.

Law, J. A.; O’Hearn, S.; Sollner-Webb, B. In *Trypanosoma brucei* RNA editing, TbMP18 (band VII) is critical for editosome integrity and for both insertional and deletional cleavages. **Mol. Cell Biol.**, v. 27, p. 777-787, 2007.

Lebowitz, J. H.; Smith, H. Q.; Rusche, L.; Beverley, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-*splicing* in *Leishmania*. **Gene. Dev.**, v. 7, p. 996–1007, 1993.

Lee, M. G. & Van der Ploeg, L. H. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51, p. 463–489, 1997.

Li, C. & Englund, P. T. A mitochondrial DNA primase from the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 20787–20792, 1997.

Linder, P. Yeast helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. **Biol. Cell**, v. 95, p. 157-167, 2003.

Lukes, J.; Paris, Z.; Regmi, S.; Breitling, R.; Mureev, S.; Kushnir, S.; Pyatkov, K.; Jirku, M.; Alexandrov, K. A. Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 148, p. 125–132, 2006.

Macrae, J. I.; Obado, S. O.; Turnock, D. C.; Roper, J. R.; Kierans, M.; Kelly, J. M.; Ferguson, M. A. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 147, n. 1, p. 126-136, 2006.

Mair, G.; Shi, H.; Li, H.; Djikeng, A.; Aviles, H. O.; Bishop, J. R.; Falcone, F. H.; Gavrilescu, C.; Montgomery, J. L.; Santori, M. I.; Stern, L. S.; Wang, Z.; Ullu, E.; Tschudi, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis*-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2000.

Manning-Cela, R.; González, A. & Swindle, J. Alternative splicing of *LYT1* transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4726-4728, 2002.

Martinez-Calvillo, S.; Yan, S.; Nguyen, D.; Fox, M.; Stuart, K.; Myler, P.J. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Mol. Cell**, v. 11, p. 1291–1299, 2003.

Martinis, S. A.; Plateau, P.; Cavarelli, J.; Florentz, C. Aminoacyl-tRNA synthetases: a new image for a classical family. **Biochimie**, v. 81, n. 7, p. 683-700, 1999.

Marygold, S. J.; Roote, J.; Reuter, G.; Lambertson, A.; Ashburner, M. *et al.* (2007) The ribosomal protein genes and *Minute* loci of *Drosophila melanogaster*. **Genome Biol.**, 8, 2007.

Mayer, M. G. & Floeter-Winter, L. M. Pre-mRNA *trans*-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 501-513, 2005.

Mazumder, B.; Seshadri, V. & Fox, P. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 91–98, 2003.

McDonald, W. H.; Tabb, D. L.; Sadygov, R. G.; MacCoss, M. J.; Venable, J.; Graumann, J.; Johnson, J. R.; Cociorva, D.; Yates, J. R. MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 18, p. 2162-2168, 2004.

McLean, J. E.; Hamaguchi, N.; Belenky, P.; Mortimer, S. E.; Stanton, M.; Hedstrom, L. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. **Biochem. J.**, v. 379, n. 2, p. 243-251, 2004.

McNicoll, F.; Drummelsmith, J.; Muller, M.; Madore, E.; Boilard, N.; Ouellette, M.; Papadopoulou, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 6, p. 3567–3581, 2006.

Mignone, F.; Gissi, C.; Liuni, S.; Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biology**, v. 3, n. 3, 2002.

Mills, A. A.; Mills, M. J.; Gardiner, D. M.; B.; Bryant, S. V.; Stanbridge, E. J. Analysis of the pattern of *QM* expression during mouse development. **Differentiation**, v. 64, p. 161-171, 1999.

Milone, J., Wilusz, J. & Bellofatto, V. Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. **Nucl. Acids. Res.**, v. 30, p. 4040–4050, 2002.

Moffett, L. K., Stefan, H. & Kenneth, D. S. RNA editing: getting U into RNA. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 162–166, 1997.

Moore, M.J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 30, p. 1514–1518, 2005.

Moraes, M. C.; Jesus, T. C.; Hashimoto, N. N.; Dey, M.; Schwartz, K. J.; Alves, V. S. *et al.* Novel membrane-bound eIF2alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 1979-1991, 2007.

Morking, P. A., Dallagiovanna, B., Foti, L., Garat, B., Picchi, G., Umaki, A., Probst, C. M., Krieger, M. A., Goldenberg, S.; Fragoso, S. P. TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides *in vitro*. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 319, p. 169–177, 2004.

Mortara, R. A.; Andreoli, W. K.; Taniwaki, N. N.; Fernandes, A. B.; Da Silva, C. V.; Fernandes, M. C. D. C.; L'Abbate, C.; Da Silva, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Annals Braz. Acad. Sciences**, v. 77, n. 1, p. 77-94, 2005.

Mueller, P. P. & Hinnebusch, A. G. Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. **Cell**, v. 45, n. 2, p. 201-207, 1986.

Nardelli, S. C.; Ávila, A. R.; Freund, A.; Motta, M. C.; Manhães, L.; de Jesus, T. C.; Schenkman, S.; Fragoso, S. P.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Dallagiovanna, B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot. Cell**, v. 6, n. 2, p. 337-345, 2007.

Neff, C. L. & Sachs, A. B. Eukaryotic translation initiation factors 4G and 4A from *Saccharomyces cerevisiae* interact physically and functionally. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 5557-64, 1999.

Nepomuceno-Silva, J. L.; Yokoyama, K.; de Mello, L. D.; Mendonça, S. M.; Paixão, J. C.; Baron, R.; Faye, J. C.; Buckner, F. S.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H.; Lopes, U. G. TcRho1, a farnesylated Rho family homologue from *Trypanosoma cruzi*: cloning, *trans*-splicing and prenylation studies. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 29711-29718, 2001.

Nilsson, D.; Gunasekera, K.; Mani, J.; Osteras, M.; Farinelli, L.; Baerlocher, L.; Roditi, I.; Ochsenreiter, T. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, e1001037, 2010.

Nonhoff, U.; Ralser, M.; Welzel, F.; Piccini, I.; Balzereit, D. *et al.* Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. **Mol. Biol. Cell.**, v. 18, n. 4, p. 1385-96, 2007.

Norris, K. A., Schrimpf, J. E. & Szabo, M. J. Identification of the gene family encoding the 160-dalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 349–357, 1997.

Nozak, T. & Cross, G. A. M. Effects of 3'-untranslated and intergenics regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 75, p. 55–67, 1995.

Ouellette, M. & Papadopoulou, B. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. **Journal of Biology**, v. 8, n. 11, p. 100, 2009.

Overath, P., Haag, J., Lischke, A. & O'Huigin, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 468–471, 2001.

Palenchar, J. B. & Bellofatto, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, p. 135–141, 2006.

Panigrahi, A. K.; Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Wang, B.; *et al.* Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes. **RNA**, v. 9, p. 484-492, 2003.

Panigrahi, A. K.; Ernst, N. L.; Domingo, G. J.; Fleck, M.; Salavati, R.; Stuart, K. D. Compositionally and functionally distinct editosomes in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 12, p. 1038-1049, 2006.

Panigrahi, A. K.; Zíková, A.; Dalley, R. A.; Acestor, N.; Ogata, Y.; Anupama, A.; Myler, P. J.; Stuart, K. D. Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*. **Mol. and Cel. Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 534-545, 2008.

Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, p. 121–127, 2004.

Parker, R. & Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol. Cell**, v. 25, p. 635-646, 2007.

Parsons, M.; Worthey, E. A.; Ward, P. N.; Mottram, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genom.**, v. 6, p. 127-145, 2005.

Pays, E. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends Parasitol.**, v. 21, p. 517–520, 2005.

Pollard, V. W.; Harris, M. E.; Hajduck, S. L. Native mRNA editing complexes from *Trypanosoma brucei* mitochondria. **EMBO J.**, v. 11, p. 4429-2238, 1992.

Probst, C. M. Descrição da metaciclo-gênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA. Tese (Doutorado em Biologia Celular), Instituto Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

Proudfoot, N.; Furger, A. & Dye, M. Integrating mRNA processing with transcription. **Cell**, v. 108, p. 501–512, 2002.

Queiroz, R.; Benz, C.; Fellenberg, K.; Hoheisel, J. D.; Clayton, C. Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC Genomics**, v. 10, p. 495, 2009.

Quijada, L.; Soto, M.; Alonso, C.; Requena, J. M. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 110, p. 79–91, 2000.

Ralser, M.; Albrecht, M.; Nonhoff, U.; Lengauer, T.; Lehrach, H.; Krobitsch, S. An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. **J. Mol. Biol.**, v. 346, p. 203-214, 2005.

Ramagopal, S. & Ennis, H. L. Regulation of synthesis of cell-specific ribosomal proteins during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3083-3087, 1981.

Ramagopal, S. Induction of cell-specific ribosomal proteins in aggregation-competent nonmorphogenetic *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Cell Biol.**, v. 68, p. 1281-1287, 1990.

Respuela, P.; Ferella, M.; Rada-Iglesias, A.; Aslund, L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biol. Chem.**, v. 283, p. 15884-15892, 2008.

Reue, K. & Zhang, P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 90-96, 2007.

Richter, J. D. & Sonenberg, N. C. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**, v. 433, p. 477–480, 2005.

Rudenko, G.; Chung, H. M.; Pham, V. P.; Van der Ploeg, L. H. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 10, p. 3387–3397, 1991.

Salles, J. M.; Contreras, V. T.; Lima Franco, M. P. A.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. Messenger RNA shut-off in *T. cruzi* following a nutritional stress. **Arq. Biol. Technol.**, v. 27, p. 101, 1984.

Santos-Rosa, H.; Moreno, H.; Simos, G.; Segref, A.; Fahrenkrog, B. *et al.* Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 6826-6838, 1998.

Satterfield, T. F. & Pallanck, L. J. Ataxin-2 and its homolog ATX-2 physically assemble with polyribosomes. **Hum. Mol. Genet.**, v. 15, p. 2523-2532, 2006.

Saxena, A.; Worthey, E. A.; Yan, S.; Leland, A.; Stuart, K. D.; Myler, P. J. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 129, n. 1, p. 103-114, 2003.

Segref, A.; Shama, K.; Dove, V.; Hellwig, A.; Huber, J. *et al.* Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. **EMBO J.**, v. 16, p. 3256-3271, 1997.

Seiwert, S. D.; Heidmann, S.; Stuart, K. Direct visualization of uridylyte deletion *in vitro* suggests a mechanism for kinetoplastid RNA editing. **Cell**, v. 84, p. 831-841, 1996.

Serpeloni, M.; Vidal, N. M.; Goldenberg, S.; Ávila, A. R.; Hoffmann, F. G. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC Evol. Biol.**, v. 11, p. 7, 2011a.

Serpeloni, M.; Moraes, C. B.; Muniz, J. R. C.; Motta, M. C. M.; Ramos, A. S. P.; Kessler, R. L.; Inoue, A. H.; da Rocha, W. D.; Yamada-Ogatta, S. F.; Fragoso, S. P.; Goldenberg, S.; Freitas-Junior, L. H.; Ávila, A. R. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, e20730, 2011b.

Shapiro, T. A. & Englund, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiol.*, v. 49, p. 117-143, 1995.

Sherlock, I. A. Vetores. In *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (eds Z. Brener, Z.A. Andrade & M. Barral-Neto), pp. 21 - 40. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 300, p. 805 -808, 2003.

Siegel, T. N.; Hekstra, D. R.; Kemp, L. E.; Figueiredo, L. M.; Lowell, J. E.; Fenyó, D.; Wang, X.; Dewell, S.; Cross, G. A. M. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Develop.**, v. 23, p. 1063-1076, 2009.

Siegel, T. N.; Hekstra, D. R.; Wang, X.; Dewell, S.; Cross, G. A. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 15, p. 4946-4957, 2010.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 363-382, 1987.

Simpson, L. RNA editing: a novel genetic phenomenon? **Science**, v. 250, p. 512-513, 1990.

Simpson, L.; Aphasizhev, R.; Gao, G.; Kang, X. Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. **RNA**, v. 10, p. 159-170, 2004.

Singh, R. & Green, M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science**, v. 259 (5093), p. 365-368, 1993.

Smith, J. L.; Levin, J. R.; Agabian, N. Molecular characterization of the *Trypanosoma brucei* RNA polymerase I and III largest subunit genes. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 18091-18099, 1989.

Smith, M.; Blanchette, M.; Papadopoulou, B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*, **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 158, 2008.

Souza, A. E.; Shu, H. H.; Read, L. K.; Myler, P. J.; Stuart, K. D. Extensive editing of CR2 maxicircle transcripts of *Trypanosoma brucei* predicts a protein with homology to a subunit of NADH dehydrogenase. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 11, p. 6832-40, 1993.

Steindel, M.; Kramer Pacheco, L.; Scholl, D.; Soares, M.; De Moraes, M. H.; Eger, I.; Kosmann, C.; Sincero, T. C.; Stoco, P. H.; Murta, S. M.; De Carvalho-Pinto, C. J. Grisard, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors

and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Schofield, C. J.; Gibson, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv. Parasit.**, v. 48, p. 1-56, 2001.

Stuart, K. & Panigrahi, A. K. RNA editing: complexity and complications. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 591-596, 2002.

Stuart, K. D.; Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Panigrahi, A. K. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 97-105, 2005.

Sutton, R.E. & Boothroyd, J.C. Evidence for *trans* splicing in trypanosomes. **Cell**, v. 14, p. 527–535, 1986.

Tadauchi, T.; Inada, T.; Matsumoto, K; Irie, K. Posttranscriptional regulation of HO expression. By the Mkt1-Pbp1 complex. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, n. 9, p. 3670-3681, 2004.

Teixeira, A. R. L.; Nascimento, R. J. & Sturm, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, 2006.

Teixeira, D.; Sheth, U.; Valencia-Sanchez, M. A.; Brengues, M.; Parker, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, p. 371-382, 2005.

Teixeira, S. M.; Kirchhoff, L. V.; Donelson, J. E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 38, p. 22586-22594, 1995.

Teixeira, S. M.; Kirchhoff, L. V. & Donelson, J. E. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'-UTR and spliced leader addition site. **Exp. Parasitol.**, v. 93, p. 143 – 151, 1999.

Teixeira, S. M. & da Rocha, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Gen. Mol. Res.**, v. 2, n. 1, p. 148-158, 2003.

Teixeira, S. M.; de Paiva, R. M. C.; Kangussu-Marcolino, M. M.; da Rocha, W. D. Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 1-17, 2012.

Tekotte, H. & Davis, I. Intracellular mRNA localization: motors move messages. **Trends Genet.**, v. 18, n. 12, p. 636-642, 2002.

Thomas, M. C.; Garcia-Perez, J. L.; Alonso, C.; Lopez, M. C. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. **DNA Cell Biol.**, v. 19, n. 1, p. 47-57, 2000.

Thomas, S.; Green, A.; Sturm, N. R.; Campbell, D. A.; Myler, P. J. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 152, 2009.

Tomás, A. M. & Kelly, J. M. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. **Eur. J. Biochem.**, v. 244, p. 596 – 603, 1996.

Tonelli, R. R.; Augusto, L. S.; Castilho, B. A.; Schenkman, S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 α is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e27904, 2011.

Tschudi, C. & Ullu, E. Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids. **Gene Expression**, v. 10, p. 3-16, 2002.

Tyler-Cross, R. E.; Short, S. L.; Floeter-Winter, L. M.; Buck, G. A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 72, p. 23–31, 1995.

Vanhamme, L. & Pays, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 2, p. 223-240, 1995.

Vargas, N.; Pedroso, A. & Zingales, B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 138, p. 131-141, 2004.

Vattem, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates *ATF4* mRNA translation in mammalian cells. **PNAS**, v. 101, n. 31, p. 11269-11274, 2004.

Weatherly, D. B.; Courtney, B.; Tarleton, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, e255, 2009.

Weng, J.; Aphasizheva, I.; Etheridge, R. D.; Huang, L.; Wang, X.; Falick, A. M.; Aphasizhev, R. Guide RNA-editing complex from mitochondria of trypanosomatids. **Mol. Cell**, v. 32, p. 198-209, 2008.

WHO. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. Buenos Aires, Argentina 17-20 April 2005, Vol. 2008. World Health Organization, 2005.

Xu, T.; Venable, J. D.; Park, S. K.; Cociorva, D.; Lu, B.; Liao, L.; Wohlschlegel, J.; Hewel, J.; Yates, J. R. ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. **Mol. Cell Proteomics**, S174 (5), 2006.

Yamada-Ogatta, S. F.; Motta, M. C.; Toma, H. K.; Monteiro-Goes, V.; Ávila, A. R.; Muniz, B. D.; Nakamura, C.; Fragoso, S. P.; Goldenberg, S.; Krieger, M. A. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. **Acta Trop.**, v. 232, n. 1, p. 264-271, 2004.

Yoffe, Y.; Zuberek, J.; Lewdorowicz, M.; Lewdorowicz, M.; Zeira, Z.; Keasar, C.; Orr-Dahan, I.; Jankowska-Anyszka, M.; Stepinski, J.; Darzynkiewicz, E.; Shapira, M. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **RNA**, v. 10, p. 1764-1775, 2004.

Yoffe, Y.; Zuberek, J.; Lerer, A.; Lewdorowicz, M.; Stepinski, J.; Altmann, M.; Darzynkiewicz, E.; Shapira, M. eIF4E isoforms of *Leishmania*—binding specificities and potential roles. **Eukaryot. Cell**, v. 5, p. 1969-1979, 2006.

Yoffe, Y.; Leger, M.; Zinoviec, A.; Zuberek, J.; Darzynkiewicz, E.; Wagner, G. *et al.* Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 3243-3253, 2009.

Yokouchi, M.; Kondo, T.; Houghton, A.; Bartkiewicz, M.; Horne, W. C.; Zhang, H.; Yoshimura, A.; Baron, R. Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and Ubch7. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 31707-31712, 1999.

Zilka, A.; Garlapati, S.; Dahan, E.; Yaolsky, V.; Shapira, M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania* 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 47922–47929, 2001.

Zingales, B.; Pereira, M. E.; Oliveira, R. P.; Almeida, K. A.; Umezawa, E. S.; Souto, R. P.; Vargas, N.; Cano, M. I.; Franco da Silveria, J.; Nehme, N. S.; Morel, C. M.; Brener, Z.; Macedo, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop.**, v. 68, p. 159–173, 1997.

Zomerdijk, J. C. B. M.; Kieft, R. & Borst, P. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. **Nature**, v. 353, p. 772–775, 1991.

ANEXOS

Descrição do	Seqüência dos iniciadores
GAP2-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGA AAGGAGATACTTCGTGTACTGCGGCATTCTAT
GAP2-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CCTCGCAGCCGTACTCCTTCA 3'
GAP2-UP-F	5' CACCTTGTCGACAGTGACGGCAACGGTAGGGAGTA 3'
GAP2-UP-R	5' GATGAAGCTTCCTCCCCGTCCTTCTGTGGGCAATA 3'
GAP2-DOWN-F	5' TGGGGGAATTCTGCAATGGGAAACAGAGGGGCGTATCTCACT 3'
GAP2-DOWN-R	5' GGCAGCGGATCCAGTCCCCACGGC 3'
GAP2-EXT-F	5' TCTGGTGCGATGAGGGGAATG 3'
GAP2-EXT-R	5' CAGCGATGCCTTCACTTTCC 3'
WW-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC CTTACGCCCTCCGC 3'
WW-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CCTACGCGTCATCGTC 3'
WW-UP-F	5' CCCGGTACCATGAGGGAGGAAGAGGGCAAC 3'
WW-UP-R	5' GGGCAGTCGACCATCGTCACAAGCACC 3'
WW-DOWN-F	5' CGCATTGGATCCGCCCTTCTCACTCACTCATCG 3'
WW-DOWN-R	5' CACTCTAGAGTGTGGTCATAAACTTGTGAGAGACAACGGCG3'
ATXN2-F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ACACCTGCCGCTGCCACT 3'
ATXN2-R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ACTATTTTGGGCCAGCGGGAGGATTC 3'

Em negrito, as seqüências attB para recombinação em vetor pDONR™ da plataforma Gateway®.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 635

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".


PROCESSO: 23075.028678/2012-21

APROVADO: 13/09/2012 – R.O. 08/2012

TÍTULO: Caracterização funcional de proteínas poli-Q em *Trypanosoma cruzi*

AUTORES: Samuel Goldenberg, Fernanda Cristina Borini Mansur

DEPARTAMENTO: Instituto Carlos Chagas (PR) e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular (UFPR)


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA