

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
E
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ**

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA
NOVA GTPASE EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

**CURITIBA
2004**

KARLAN RAU

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA
NOVA GTPASE EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

**CURITIBA
2004**

KARLAN RAU

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA
NOVA GTPASE EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

**Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
– Área Biologia Celular e Molecular, do Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná .**

Orientador: Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso.

**CURITIBA
2004**

Rau, Karlan, 1975 –

Clonagem e caracterização de um gene que codifica uma nova GTPase em *Trypanosoma cruzi* / Karlan Rau. – Curitiba: UFPR: IBMP, 2004.
84p.:il.; 210 x 297

Bibliografia.

1. GTPase. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Tripanossomatídeos. I. Título.

Índice para catalogação:

1. Biologia Molecular
2. Parasitologia.
3. *Trypanosoma cruzi*

TERMO DE APROVAÇÃO

KARLAN RAU

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA UMA
NOVA GTPASE EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, SETOR DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ,
PELA SEGUINTE BANCA EXAMINADORA:**

Orientador e

Presidente da Banca:

Dr. Stenio Perdigão Fragoso
Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP

Dr. Marco Aurélio Krieger
Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP

Dr. Alejandro Dominguez Correa
CNPq – FIOCRUZ

Curitiba, 03 de setembro de 2004.

Este trabalho é dedicado a minha
esposa Débora que tem batalhado
ao meu lado hoje e sempre
pelos nossos ideais
Ti amo

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso pelo incentivo, dedicação, competência, conhecimento científico, perseverança, entusiasmo, encorajador e rigoroso na correção dos erros e na objetividade. Palavras repetidas milhares de vezes não poderão demonstrar tudo aquilo que é Stênio, simples, batalhador, fiel aos princípios que regem a sabedoria e conhecimento. Poucos conseguem aliar ao mesmo tempo a amizade, tenacidade e respeito de tudo e de todos.

Aos Doutores Marco Aurélio Krieger e Samuel Goldenberg que mesmo conversando pouco mostraram sua dedicação e o prazer de trabalhar e dirigir um Instituto que abre os braços e apóiam e incentivam todos para a realização dos trabalhos.

A minha esposa Débora Toniolo Rau pelo amor, apoio, dedicação, sacrifício, incentivo, paciência (muita paciência) e confiança do meu caminho (apesar de tortuoso) como profissional.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná pela bolsa ofertada no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

A Prof^a Dra. Dorly de Freitas Buchi pela amizade, confiança, incentivo e conversas gostosas nos entremeios da correria de trabalho.

À Dra, Maria Cristina M. Motta pelo incentivo e profissionalismo.

Aos colegas do Lab 2 Gisele Picchi, Márcia Shimada, Lauro Manhães, Adriana Umaki, Edio Lourenço, Tatiana Vancini, Patrícia Morking, Leonardo Foti, Daniela Fiori, Flavia de Souza e Brenda Folly pela amizade e colaboração.

Ao pessoal da secretaria do IBMP Edilaine Azevedo, Luiz Casarotto e Marcello Carollo. Aos Técnicos Nilson José Fidêncio, Paulo Arauco e Cassiano Lis Barroso.

A todos os demais colegas do IBMP que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

A tese que leva a síntese
Mistério da morte em vida
Explica-se na antítese

IA Penicilina antibioticv
*(autor desconhecido)**

*Escritos no painel frontispício do Hospital Santa Catarina. Av. Paulista - São Paulo - SP

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| LISTA DE SÍMBOLOS | xi |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA..... | 3 |
| 1.2 PEQUENAS PROTEÍNAS G..... | 4 |
| 1.2.1 Família Ras..... | 5 |
| 1.2.2 Família Rho..... | 6 |
| 1.2.3 Família Rab..... | 7 |
| 1.2.4 Família Arf..... | 8 |
| 1.2.5 Família Ran..... | 10 |
| 1.3 CICLOS DE ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS G..... | 13 |
| 1.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS..... | 13 |
| 1.5 PROTEÍNAS G DE PROCARIOTOS..... | 14 |
| 1.6 PROTEÍNAS G DE TRIPANOSOMAS..... | 17 |
| 1.7 OBJETIVO..... | 20 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 2.1 REAGENTES..... | 21 |
| 2.2 MEIOS DE CULTURA..... | 22 |
| 2.3 TAMPÕES E SOLUÇÕES..... | 22 |
| 2.4 MICRORGANISMOS..... | 25 |
| 2.5 TÉCNICAS..... | 26 |
| 2.5.1 Amplificação dos Fragmentos do Gene <i>TcGBP</i> | 26 |
| 2.5.2 Ligação..... | 27 |
| 2.5.3 Preparação de <i>Escherichia coli</i> Cálcio-competentes..... | 27 |
| 2.5.4 Transformação de Bactérias Cálcio-competentes..... | 28 |
| 2.5.5 Seleção dos Clones Recombinantes..... | 28 |
| 2.5.5.1 Técnica da palitagem..... | 29 |
| 2.5.5.2 PCR de colônia..... | 29 |
| 2.5.6 Minipreparação do Plasmídeo..... | 30 |
| 2.5.7 Seqüenciamento e Análises Computacionais..... | 30 |
| 2.5.8 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c e o Processo de Metaciclogênese..... | 31 |
| 2.5.9 Isolamento de RNA Total de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| 2.5.10 Isolamento de DNA Total de <i>T. cruzi</i> | 32 |
| 2.5.11 Análise do Gene <i>TcGBP</i> por Ensaio Tipo <i>Southern Blot</i> | 32 |
| 2.5.12 Análise do Gene <i>TcGBP</i> por Ensaio Tipo <i>Northern Blot</i> | 33 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.5.13 | Clonagem do Gene <i>TcGBP</i> no Vetor de Expressão pTrcHis-TOPO..... | 34 |
| 2.5.14 | Análise da Solubilidade da Proteína TcGBP Recombinante..... | 35 |
| 2.5.15 | Purificação da Proteína TcGBP por Cromatografia de Afinidade em Resina de Ni-NTA Agarose..... | 36 |
| 2.5.16 | Produção de Anticorpos Dirigidos Contra a Proteína Recombinante TcGBP..... | 36 |
| 2.5.17 | Análise da Expressão da TcGBP por Ensaio Tipo <i>Western Blot</i> | 37 |
| 2.5.18 | Obtenção de Polisomos de <i>T. cruzi</i> e Análise por <i>Western Blot</i> | 38 |
| 2.5.19 | Fracionamento de Polisomos de <i>T. cruzi</i> em Gradiente de Sacarose..... | 38 |
| 2.5.20 | Localização Celular da TcGBP no <i>Trypanosoma cruzi</i> por Imunofluorescência. | 39 |
| 3 | RESULTADOS | 41 |
| 3.1 | AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE FRAGMENTOS DO GENE <i>TcGBP</i> | 41 |
| 3.2 | ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO GENE <i>TcGBP</i> | 42 |
| 3.3 | ORGANIZAÇÃO DO GENE TCGBP NO GENOMA DO <i>T. cruzi</i> Dm28c..... | 48 |
| 3.4 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>TcGBP</i> POR NORTHERN BLOT..... | 50 |
| 3.5 | EXPRESSÃO DO GENE <i>TcGBP</i> EM <i>Escherichia coli</i> E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE..... | 51 |
| 3.6 | EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcGBP EM <i>Trypanosoma cruzi</i> | 54 |
| 3.7 | IDENTIFICAÇÃO DA TcGBP EM FRAÇÕES POLISOMAIIS DE <i>T. cruzi</i> | 55 |
| 3.8 | LOCALIZAÇÃO DA TcGBP EM <i>Trypanosoma cruzi</i> POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA..... | 57 |
| 4 | DISCUSSÃO | 59 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 68 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1.1 - CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| QUADRO 2.1 - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS..... | 26 |
| FIGURA 2.1 - EM A DESTACA-SE A SEQÜÊNCIA 5' ENCONTRADA NO VETOR O QUE ELEVA A MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA EXPRESSA EM 3,3 KDA. EM B O VETOR DE EXPRESSÃO pTRCHis TOPO..... | 35 |
| FIGURA 3.1 - SEQÜÊNCIA DO CLONE cDNA CONTENDO A REGIÃO DE LEITURA ABERTA DO GENE <i>TcGBP</i> | 42 |
| QUADRO 3.1 - QUADRO COMPARATIVO ENTRE ORGANISMOS QUE APRESENTAM PROTEÍNAS SIMILARES A <i>TcGBP</i> | 40 |
| FIGURA 3.2 - ALINHAMENTO ENTRE A <i>TcGBP</i> E PROVÁVEIS ORTÓLOGOS EUCARIÓTICOS..... | 44 |
| FIGURA 3.3 - ALINHAMENTO ENTRE A <i>TcGBP</i> E DIVERSAS YchF GTPASES... 46 | 46 |
| FIGURA 3.4 - ALINHAMENTO DO DOMÍNIO G DA <i>TcGBP</i> COM AQUELES DAS GTPases BACTERIANAS DAS SUPERFAMÍLIAS OBG E ERA | 47 |
| FIGURA 3.5 - ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>TcGBP</i> POR ENSAIO DO TIPO <i>SOUTHERN BLOT</i> | 49 |
| FIGURA 3.6 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>TcGBP</i> POR ENSAIO DO TIPO <i>NORTHERN BLOT</i> | 50 |
| FIGURA 3.7 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA <i>TcGBP</i> EM <i>E. coli</i> | 52 |
| FIGURA 3.8 - GÉIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 10 % MOSTRANDO TODAS AS AMOSTRAS RECOLHIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>TcGBP</i> | 53 |
| FIGURA 3.9 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA <i>TcGBP</i> POR <i>WESTERN BLOT</i> EM EXTRATOS DE <i>T. cruzi</i> | 55 |
| FIGURA 3.10 - IDENTIFICAÇÃO DA <i>TcGBP</i> EM FRAÇÕES POLISOMAIS DE <i>T. cruzi</i> POR <i>WESTERN BLOT</i> | 56 |
| FIGURA 3.11 - PERFIL DO FRACIONAMENTO DE POLISOMOS E ANÁLISE DESTAS FRAÇÕES POR <i>WESTERN BLOT</i> | 57 |
| FIGURA 3.12 - IMUNOLOCALIZAÇÃO DA <i>TcGBP</i> EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------|---|
| Amp | - Ampicilina |
| AMPc | - AMP (adenosina monofosfato) cíclico |
| BCIP | - 5 bromo 4 cloro 3 indolil fosfato |
| BLAST | - <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BSA | - Albumina de soro bovino |
| CAS | - Receptor específico para exportação celular |
| COP | - <i>Coatomer protein complex</i> |
| CTA | - A-subunit of cholera toxin |
| DAPI | - 4'-6-Diamidino-2-phenylindole |
| DEAE | - Diethylaminoethyl |
| DEPc | - ácido dietil éster pirocarbônico (dietil pirocarbonato) |
| DNA | - Ácido desoxirribonucléico |
| DNAc | - DNA complementar |
| DNase | - Desoxirribonuclease |
| dNTP | - Desoxirribonucleotídeo |
| EDTA | - Ácido etileno-diamino-tetracético |
| FITC | - Isotiocianato de fluoresceína |
| G418 | - Antibiótico neomicina |
| GAP | - GTPase-activation protein |
| GDI | - Guanine nucleotide dissociation inhibitors |
| GDP | - Guanosina difosfato |
| GEF | - Guanine nucleotide exchange factor |
| GEP | - <i>Guanine nucleotide exchange protein</i> |
| GRP | - Partícula de reconhecimento do sinal de exportação |
| GTP | - Guanosina trifosfato |
| GTPase | - Atividade enzimática que converte GTP em GDP. Refere-se também a proteínas monoméricas que ligam-se à GTP |
| HEPES | - N-[2-hidroxietil] piperazina N'-[2-ácidoetanosulfônico] |
| IgG | - Imunoglobina G |
| IPTG | - Isopropil 1 tio-β-D galactosídeo |
| kb | - Quilobase; em RNA – 1000 nucleotídeos; em DNA 1000 pares de nucleotídeos |
| kDa | - QuiloDalton. Unidade de massa molecular. Aproximadamente 1 Dalton equivale a massa do átomo de hidrogênio (1.66×10^{-24} g) |
| LB | - Meio Luria-Bertani |
| LIT | - <i>Liver Infusion Tryptose</i> – Meio Infusão de fígado e triptose |
| NBT | - <i>Nitroblue tetrazolium</i> |
| NES | - Sinal de exportação celular |
| NLS | - Sinal de localização celular |

| | |
|----------|---|
| NPC | - <i>Nuclear pore complex</i> – complexo do poro nuclear |
| nt | - nucleotídeo |
| ORF | - <i>Open read frame</i> – região de leitura aberta |
| pb | - Pares de bases |
| PBS | - Tampão fosfato |
| PCR | - Reação em cadeia da polimerase |
| PEG | - Polietilenoglicol |
| pfu | - <i>Plaques forming unit</i> - unidade formadora de plaques |
| PIP2 | - Fosfatidilinositol 4, 5 difosfato |
| PLD | - Fosfolipase Ds |
| POP | - 2,5 difenioxazole |
| POPOP | - 1,4 bis[2-(5-feniloxazolil)] benzeno |
| RNA | - Ácido ribonucléico |
| RNAm | - RNA mensageiro |
| RNase | - Ribonuclease |
| SDS | - Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with SDS |
| SSC | - Tampão salina-citrato |
| TAU | - <i>Triatomine Artificial Urine</i> – Meio Urina artificial de Triatomíneo |
| TCA | - Ácido tricloro acético |
| Tet | - Tetraciclina |
| TGS | - Domínio TGS derivado dos nomes ThrRS, GTPase, e SpoT |
| Tris | - Tris (hidroximetil) aminometano |
| Tween 20 | - Polioxietilenosorbitol monolaurato |
| UTR | - Região não traduzida |
| X-gal | - 5 bromo 4 cloro 3 indolil p-galactosídeo |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|---|
| °C | - Grau Celsius |
| % | - Porcentagem |
| μCi | - Micro |
| μg | - Micrograma |
| μL | - Microlitro |
| μM | - Micromolar |
| CaCl_2 | - Cloreto de cálcio |
| cm^2 | - Centímetro cúbico |
| DO | - Densidade ótica |
| g | - Aceleração de gravidade |
| LiCl | - Cloreto de lítio |
| M | - Molar |
| mA | - Miliamperagem |
| Mg | - Magnésio |
| MgCl_2 | - Cloreto de magnésio |
| min. | - Minuto |
| mJ | - Milijoule |
| mL | - Mililitro |
| mM | - Milimolar |
| nm | - Nanômetro |
| pH | - Potencial hidrogeniônico. Definido como o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio em moles por litro |
| PM | - Peso molecular |
| pmol | - Picomol |
| s. | - Segundo |
| U | - Unidade |
| V | - Volts |
| V | - Volume |

Aminoácidos

| | | | | | | | |
|---|-----------------|---------|------------|---|------------|---|------------|
| A | Alanina | G | Glicina | M | Metionina | S | Serina |
| C | Cisteína | H (His) | Histidina | N | Asparagina | T | Treonina |
| D | Ácido aspártico | I | Isoleucina | P | Prolina | V | Valina |
| E | Ácido glutâmico | K | Lisina | Q | Glutamina | W | Triptofano |
| F | Fenilalanina | L | Leucina | R | Arginina | Y | Tirosina |

Al Aminoácidos alifáticos = I, L, V

RESUMO

Nós caracterizamos um gene do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, denominado de *TcGBP*, que codifica uma nova proteína que liga GTP. A região codificante do gene *TcGBP* tem 1.185 pb e codifica uma proteína de 44,3 kDa. A busca por homologia, usando o algoritmo BlastX, revelou que TcGBP compartilha alta similaridade com outras prováveis proteínas ligadoras de GTP em eucariotos, incluindo algumas espécies de tripanossomatídeos (*Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*). Homologia menor, porém significativa foi também encontrada entre a seqüência predita da TcGBP e GTPases bacterianas da família YyaF/YchF. Características importantes do domínio G dessa família de GTPases são encontradas conservadas na TcGBP. Embora a função das GTPases YyaF/YchF seja desconhecida, outros membros dessa família têm função de fatores de tradução. *Imunoblot* de polissomos de *T. cruzi*, fracionados em gradiente de sacarose, mostra que a TcGBP está associada às subunidades ribossomais, sugerindo que TcGBP seja um novo fator de tradução em *T. cruzi*, relacionado a GTPase YchF bacteriana.

ABSTRACT

We have characterized a gene of the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, named *TcGBP* that encodes a novel GTP binding protein. The coding region of *TcGBP* gene is 1,185 pb long and encodes a protein of 44.3 kDa. A search for homology using the BlastX algorithm showed that TcGBP shares high similarity with other putative GTP binding proteins from eukaryotes, including some species of trypanosomatids (*Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*). A lower but significant homology is also found between the predicted sequence of the TcGBP and the bacterial YyaF/YchF GTPases. Important features of the G domain of this family of GTPases are found to be conserved in TcGBP. Although the function of YyaF/YchF GTPases is unknown, other members of this family have been found to function as translation factors. Immunoblot from the *T. cruzi* polysome fractionation in sucrose gradient shows that TcGBP is associated to ribosomal subunits, suggesting that TcGBP is a novel translation factor of *T. cruzi* related to the bacterial YchF GTPase.

INTRODUÇÃO

Todos os sistemas biológicos têm a habilidade de processar e responder uma enorme quantidade de informações. A questão fundamental é entender como as células percebem e discriminam entre os vários estímulos os quais são expostas, traduzindo-os em uma resposta celular apropriada. Entre as várias proteínas que medeiam a resposta celular a esses sinais encontra-se uma classe de proteínas ligadoras de GTP, conhecidas normalmente como proteínas G. As proteínas G consistem de uma grande família com mais de 200 representantes. Presentes em todas as células e, envolvidas em diferentes processos celulares tais como: síntese protéica, transporte intracelular, crescimento e diferenciação celular (VETTER; WITTINGHOFER, 2001).

Na literatura, as proteínas G apresentam uma diversidade de nomenclaturas e abreviaturas as quais confundem o discernimento das mesmas. Para exemplificar, a Proteína G é referida por Casey e Gilman (1988), Simon *et al.* (1991) e Neves (2002) somente à proteína G heterotrimérica (com 3 subunidades α , β , γ). De maneira mais genérica, Vetter e Wittinghofer (2001) definem as proteínas que ligam ao nucleotídeo guanina como GNBPs (*guanine nucleotide binding proteins*). Por sua vez, Takai *et al.* (2001) preferem separar a grande família da proteína G em três tipos: a proteína G heterotrimérica; pequenas proteínas G (*small G proteins*) e proteínas G envolvidas em síntese protéica, como os fatores de tradução. É importante lembrar que existem outras proteínas que ligam GTP ou têm atividade de GTPase, tais como tubulina, guanilil ciclases, GTP-quinases, mas que são evolutivamente distantes das proteínas G e não possuem os domínios que caracterizam estas últimas.

As proteínas G em questão são conhecidas genericamente como P-loop NTPases. O P-loop ou domínio Walker A é caracterizado pela sequência GxxxxGK(S/T), cuja função é posicionar o grupamento trifosfato do NTP de modo adequado na proteína. O P-loop está presente tanto em GTPases como em ATPases. Entretanto, existem outros domínios nas proteínas G que conferem especificidade ao GTP, como veremos mais adiante.

Uma nova classificação para as *P-loop* GTPases foi recentemente sugerida por Leipe e colegas (2002). Por essa nova nomenclatura, a superclasse das *P-loop* GTPases pode ser dividida em duas grandes classes. A primeira classe, designada TRAFAC (*translation factor-related*), inclui as GTPases envolvidas na tradução (iniciação, alongação e fatores de liberação), transdução de sinais (em particular a família das proteínas tipo Ras), motilidade celular e transporte intracelular. A segunda classe, designada SIMIBI (*signal recognition particle, MinD and BioD*), consiste de GTPases associadas à partícula de reconhecimento do sinal de exportação (SRP), ATPases tipo MinD, que são envolvidas na localização de proteínas, partição de cromossomos, transporte através de membranas e um grupo de enzimas metabólicas com atividade de quinases ou fosfotransferases. Essas duas classes contêm mais de 20 famílias distintas que são subdivididas em 57 subfamílias (linhagens ancestrais) com base em motivos de aminoácidos e características estruturais conservadas. Dez subfamílias mostram uma distribuição filética universal, sugerindo que elas evoluíram de proteínas que estavam presentes em formas de vida anteriores à divisão dos grandes reinos de seres vivos (LEIPE *et al.*, 2002; CALDON; YOONG; MARCH, 2001).

Diferentemente de várias enzimas, as proteínas G formam complexos relativamente estáveis com seu substrato (GTP) e seu produto (GDP). Essas proteínas contêm de quatro a cinco elementos de seqüência conservados, também designados motivos, que formam o domínio G. Esse domínio serve para o reconhecimento do nucleotídeo e atividade GTPásica, embora os mecanismos de hidrólise da GTP possam ser diferentes (VETTER; WITTINGHOFER, 2001).

Como anteriormente mencionado, a alça que contata os grupamentos fosfatos β e γ do nucleotídeo é conhecida como *P-loop*, Walker A ou G-1 e têm como motivo conservado a seqüência **GxxxxGK(S/T)**, onde x é qualquer aminoácido. As cadeias laterais dos resíduos K e S (ou T) do *P-loop* são críticas. O resíduo de lisina (K) interage com os fosfatos β e γ , enquanto o grupamento hidroxila da serina (S) ou treonina (T) ajuda na coordenação do Mg^{+2} . Os motivos conservados G2 (xTx) e G3 (DxxG) são responsáveis pela coordenação do íon magnésio à GTPase. A base

nitrogenada guanina é reconhecida em parte pelo motivo G4 (**[N/T]KxD**), enquanto o motivo G5 (**ExSAK**) dá suporte ao sítio de reconhecimento da base nitrogenada (BOURNE *et al.*, 1991; SPRANG, 1997; LIRI *et al.*, 1998). Enfim, o domínio com atividade GTPásica é caracterizado pela presença dos quatro (ou cinco) motivos conservados na seqüência aminoacídica das proteínas G.

1.1 PROTEÍNA G HETEROTRIMÉRICA

A Proteína G Heterotrimérica é uma proteína transdutora de sinais. Está presente na superfície interna da membrana plasmática, conectando receptores e efetores em vias de sinalização intracelular. Consiste de três subunidades: α , β e γ em ordem de decréscimo de massa (CASEY; GILMAN, 1988). Porém, funcionam em essência como dímeros porque o sinal é comunicado da subunidade $G\alpha$ para o complexo $G\beta\gamma$ (NEVES, 2002). A subunidade α contém um sítio de alta afinidade ao nucleotídeo guanina, possuindo uma atividade GTPásica a qual é crucial para a ação dessas proteínas. São conhecidos 20 genes para a subunidade α que são divididos em 4 famílias. Sua classificação serve para definir o receptor e o efetor acoplado: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ e $G\alpha_{12/13}$ (NEVES, 2002; SPRANG, 1997). Estas quatro famílias de $G\alpha$ servem também para classificar os tipos proteínas G heterotriméricas. Sua massa varia entre 40 e 46 kDa. São conhecidos 6 tipos de $G\beta$ e 11 subunidades de $G\gamma$ (NEVES, 2002). A massa de $G\beta$ varia de 35 a 36 kDa. Há vários genes para $G\gamma$ com 4 distintos isotipos. Sua massa varia também entre 7,3 a 8,4 kDa (MORRIS; MALBON, 1999).

Um crescente número de evidências mostra a inter-relação entre a sinalização das proteínas G heterotriméricas e Ras e outras pequenas proteínas G (CRESPO *et al.*, 1994; HART *et al.*, 1998). Talvez a mais marcante é a demonstração de que a estimulação da atividade da adenilato ciclase e produção de AMP cíclico representam somente a primeira onda da sinalização pelo receptor β -adrenérgico da subunidade G_s

(VRIES, *et al.*, 2000). Após o término desse sinal, uma segunda onda de sinalização atinge a proteína Ras e leva a ativação da MAP quinase (*Mitogen-activating Protein kinase*) (CRESPO *et al.*, 1994; LUTTRELL *et al.*, 1999).

1.2 PEQUENAS PROTEÍNAS G

As Pequenas Proteínas G (*small G proteins*) são monoméricas com massa molecular entre 20 a 40 kDa. Apresentam variadas funções desde determinantes de períodos de tempo (*biotimers*) até a regulação da expressão gênica, a reorganização do citoesqueleto, o tráfego de vesículas e o transporte de moléculas entre o núcleo/citoplasma.

Essas proteínas compartilham um cerne estrutural comum e identidade de seqüência significativa, que sugerem uma origem evolucionária comum (SPRANG, 1997).

As primeiras proteínas G monoméricas descobertas em eucariotos (Ha-Ras e Ki-Ras) foram descritas em 1980, a partir de sarcomas virais, mais propriamente em mutantes que estimulam a proliferação celular e transformações de culturas celulares. Em 1983 foi encontrada pequena proteína G, YPT1, em *S. cerevisiae*. Em 1984, a proteína Arf foi purificada como um cofator da toxina cólera, mas somente em 1986 foi identificada como uma pequena proteína G. Em 1985, Rho foi isolada em *Aplysia* como homólogo de Ras. Em 1980, Sec4 foi isolada em levedura e somente em 1987 foi identificada como uma pequena proteína G envolvida com secreção (reformulado de TAKAI, 2001).

As pequenas proteínas G constituem uma grande superfamília dividida em cinco famílias: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. Numerosas comparações da seqüência de aminoácidos das pequenas proteínas G de várias espécies revelaram que eles são conservados em sua estrutura primária no nível de 30 a 55% de homologia (PADUCH *et al.*, 2001).

1.2.1 Família Ras

Estão incluídas nesta família as proteínas Ras, Rap1, Rap2, R-Ras, TC21, Ral, Rheb e M-Ras (BOS, 1997). O principal papel desta família é na transdução de sinais, [que promovem] proliferação e transformações malignas celulares (BOS, 1998). Ras não regula somente a proliferação, mas, também, a diferenciação, morfologia e apoptose celular. Sabe-se que Ras regula todas essas funções por meio da expressão de genes, entretanto, não foi estabelecido se as mudanças morfológicas mediadas por ela apresentam efeitos diretos ou indiretos sobre a expressão dos genes (TAKAI *et al.*, 2001).

Os principais representantes em mamíferos são as proteínas Ha-Ras, Ki-Ras, N-Ras. Em síntese, são capazes de causar transformações celulares quando ativadas por mutações pontuais (BRTVA, 1995). Mutação de seus genes ou em um dos genes de seus reguladores (efetores) causam cânceres em humanos (RODENHUIS *et al.*, 1988, ALMOGUERA *et al.*, 1988). Cerca de 15% a 30% de todos os tumores humanos são causados por mutações nestas proteínas (BOS, 1989; VOJTEK; DER, 1998) variando, é claro, pelo tipo e frequência do tumor.

Em *S. cerevisiae*, temos Ras1 e Ras2 que são essenciais na viabilidade celular (POWERS *et al.*, 1984) e onde foi identificado seu primeiro efetor: a adenilato ciclase (TODA *et al.*, 1985). Mas, em mamíferos, quem direciona a adenilato ciclase é a proteína G heterotrimérica. Nos estudos com *C. elegans*, *Drosophila* e células de mamíferos, Ras liga e ativa a proteína Raf quinase (HAN *et al.*, 1993), que induz a expressão de genes por meio da MAP quinase (HUANG *et al.*, 1993).

Ras também pode mediar os efeitos da proliferação celular em parte por ativação da cascata de quinases: Raf, MEK e ERK (EGAN; WEINBERG, 1993). Com a fosforilação de ERKs, são translocados para o núcleo aonde estimulam a atividade de vários fatores de transcrição como Elk-1 (VOJTEK; DER, 1998). Ras ativa esta cascata de quinase, pelo direcionamento de Raf (VOJTEK *et al.*, 1993). Outras

proteínas que contribuem para a ativação de Raf-1 incluem fosfolipídios, serina/treoninas e tirosina quinases (MORRISON; CUTLER, 1997).

Outras proteínas Ras, como a GTPase Ral, estão implicadas na regulação do processo da dinâmica celular incluindo proliferação, transformação oncogênica, dinâmica de actina no citoesqueleto, endocitose e exocitose (MOSKALENKO, 2003). Feig (2003) reforça a atuação de Ral na morfologia celular e na grande possibilidade de cânceres humanos serem iniciados além, de atuar na transcrição. Ribeiro-Neto *et al.* (2002) mostraram que Rap1b é uma proteína antagônica de Ras, dotado de propriedades mitogênica e tumorigênica e, quando ativada por cAMP, torna-se um mensageiro intracelular que estimula ou inibe a proliferação da célula.

1.2.2 Família Rho

A família Rho engloba as proteínas Rho, Rac e CDC42. Rho e CDC 42 estão envolvidas no processo de brotamento por meio da organização da actina do citoesqueleto, conforme visto em mutantes de levedura (JOHNSON, PRINGLE, 1990; YAMOCHI *et al.*, 1994). Rac, também deste grupo, mostra estar envolvida na ativação da NADPH oxidase em células fagocíticas de mamíferos (ABO *et al.*, 1991; KNAUS, 1991, SEGAL, ABO, 1993). As proteínas Rho primeiramente mostram estar envolvidas no controle do citoesqueleto (CHARDIN *et al.*, 1989, PATERSON *et al.*, 1990), subsequente mostrou-se que elas poderiam regular a formação das fibras de *stress* e de adesão focal nos fibroblastos (RIDLEY; HALL, 1992 e 1994) e regulação do íon cálcio necessário para a contração da musculatura lisa (HIRATA, 1992).

Proteínas Rac e CDC42 regulam a formação de lamelipódia e filopódia respectivamente (RIDLEY *et al.*, 1992; NOBES; HALL, 1995). Esses três grupos de proteínas regulam primariamente a reorganização do citoesqueleto em resposta de estímulos extracelulares em células de mamíferos. Também participam de diversos

eventos celulares como crescimento celular, tráfico de membranas, orientação do axônio e extensão (TAKAI *et al.*, 2001).

1.6 Família Rab

O primeiro gene de uma proteína Rab denominado *YPT1* foi identificado em 1983 por D. Gallwitz e colegas, como uma ORF entre os genes de actina e tubulina em *Saccharomyces cerevisiae*. Quatro anos mais tarde, A. Salminen e P. Novick (1987) forneceriam a primeira evidência que Sec4, outra proteína, mas homólogo de YPT1, estava diretamente envolvida com o processo de tráfego vesicular. Tavitian e colegas (1987) clonaram o primeiro homólogo de *SEC4/YPT* em mamíferos, denominado gene *rab* (*ras-like in rat brain*). Quinze anos depois, pequenas GTPases da família Rab/Ypt foram reconhecidos como chave principal da maquinaria protéica envolvida no transporte vesicular e a dinâmica de organelas em células eucarióticas (modificado de TAKAI *et al.*, 2001).

Takai *et al.* (2001) relembra que novas proteínas sintetizadas e secretadas são transportadas dentro do retículo endoplasmático para a membrana do complexo de Golgi por vesículas e algumas dessas proteínas são enviadas para os pré-lisossomos. Em paralelo, macromoléculas que entram pela membrana plasmática são transportadas para dentro de endossomas. Algumas proteínas de superfície, inclusive receptores extracelulares, transitam por endossomas de reciclagem, reciclam-se e voltam para a membrana plasmática. Martinez e Goud (1998) reforçam que muitas proteínas da família Rab foram localizadas em diversas membranas dos compartimentos, tanto das vias biossintética e secretória como da via endocítica.

Estudos genéticos em leveduras e mamíferos levaram à hipótese de que as proteínas Rab estão envolvidas com o encontro e fusão de vesículas, funcionando como rotuladores de membrana, participando ou modulando a formação do complexo v/t-SNARE (*vesicle/target-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor acceptor receptor*). Esses complexos protéicos fundidos na membrana de vesículas de

transporte (*VAMP/synaptotagmin family*) e em membranas do compartimento receptor (*syntaxin family*) estão envolvidas no reconhecimento específico de vesículas transportadoras, contendo membranas “rotuladas” (ROTHMAN, 1994; MARTINEZ; GOUD, 1998; SCHIMMÖLLER, 1998).

As proteínas Rab regulam todas as etapas nos eventos de transporte de vesículas intracelularmente: formação da vesícula, marcação desta com um acceptor de membrana, ancoragem de vesículas pelo acceptor de membrana e fusão da vesícula com o acceptor de membrana (TAKAI *et al.*, 2001). Rab também está envolvido com a regulação da secreção, por exemplo, neurotransmissores dependentes de cálcio, mas principalmente de moduladores conferindo plasticidade sináptica (GEPPERT *et al.*, 1997).

Pereira-Leal e Seabra (2000) analisaram diversas seqüências de aminoácidos das proteínas da família Rab e identificaram cinco regiões conservadas de proteínas Rab além das já citadas anteriormente que identificavam as proteínas G monoméricas. As seqüências de aminoácidos são: RabF1 **IGVDF**; RabF2 **KLQ(I/L)W**; RabF3 **R(F/Y)(r/k/d)(s/t/r/p)(i/l)(T/R)**; RabF4 **YYRGA** e RabF5 **LV(Y/F)DIT**.

1.2.3 Família Arf

As proteínas representantes desta família são Arf (*ADP-ribosylation factors*), Arl (*ARF-like*), Arp (*Arf-related proteins*) e Sar (*secretion-associated and Ras-related*). As proteínas Arf foram identificadas e purificadas pela habilidade de estimular a atividade da ADP-ribosiltransferase na subunidade A da toxina da cólera (CTA) (SCHLEIFER *et al.*, 1982; KAHN; GILMAN, 1984). Porém, sabemos, hoje, que ela está envolvida em diferentes vias do tráfego de vesículas em células eucarióticas bem como ativando especificamente a fosfolipase Ds (PLDs) (ROTHMAN, 1994).

Arf também interage com muitas proteínas e outras moléculas que regulam seu estado ativo, bem como envolvidas em funções intracelulares. De acordo com

Moss e Vaughan (1998), basicamente há três tipos de moléculas que interagem com as Arf: proteínas regulatórias GEP e GAP e arfaptinas que recrutam Arf para o complexo de Golgi; efetores PLD, PIP2, coatômeros, proteína G subunidade β/γ e $G\alpha_s$ e moléculas que mantêm a estrutura ativa de Arf: CTA, PLD e nucleotídeo guanina.

A primeira identificação de Arf obtida foi no Complexo de Golgi de *S cerevisiae* (BOTSTEIN *et al.*, 1988). Grande parte das informações sobre a função de Arf na célula é relatada no transporte de vesículas do Complexo de Golgi (ROTHMAN; ORCI, 1992). Arf também foi implicado na acidificação e fusão de vesículas microssomais, fusão de endossomas, reunião de membrana nuclear e formação de vesículas com capa de clatrin. No transporte vesicular do retículo endoplasmático para Complexo de Golgi, Arf são requisitadas para ligar a β -COP, um componente da capa que cobre vesículas sem clatrin (STAMNES; ROTHMAN, 1993).

Na formação de vesículas cobertas de clatrin derivadas de Golgi, Arf é requisitada para ligar ao adaptador protéico AP-1 (γ -adaptina), um análogo de β -COP (STAMNES; ROTHMAN, 1993). Moss e Vaughan (1998) simplificam o papel das proteínas Arf na formação de vesículas onde, quando ativas, interagem com um dos sete monômeros do complexo de revestimento (coatômeros) interagindo diretamente na subunidade beta (ZHAO *et al.*, 1997). Várias Arf recrutam vários coatômeros que causam deformação na membrana, surgindo um broto (MALSAM *et al.*, 1999; STEPHENS; PEPPERKOK, 2001). Fusões laterais na base deste broto induzem o lipídio Acil-CoA, resultando na sua liberação. Na apresentação de vesículas cobertas por COPII, Arf é substituída por Sar1 (BARLOWE *et al.*, 1994).

O gene *Sar1* foi originalmente isolado como um supressor de cópia múltipla de um mutante do gene *SEC12* o qual é exigido para o transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi em *S. cerevisiae*. *SEC12* codifica uma glicoproteína integral de membrana essencial para a formação de vesículas a partir do retículo endoplasmático de leveduras (NAKANO; MURAMATSU, 1989).

Proteínas Arl_s são estruturalmente semelhantes as ARFs (HONG *et al.*, 1998), porém, não têm atividade Arf, ou seja, não ativam a toxina da cólera (MOSS; VAUGHAN, 1993). Isolada primeiramente em *Drosophila*, sendo essencial para seu crescimento normal (TAMKUN *et al.*, 1991) e posteriormente em mamíferos, mostraram estar associadas ao Complexo de Golgi. As proteínas Arl2 aparecem no citosol, prevenindo a destruição da tubulina por meio de uma chaperona denominada cofator D (BHAMIDIPATI *et al.*, 2000) que, juntamente com os cofatores C e E, associam-se α/β tubulina (LEWIS *et al.*, 1997), estimulando sua polimerização. Outras proteínas como Arl4/7 foram localizadas no núcleo e nucléolo (LIN *et al.*, 2000). Arp localizado na membrana plasmática de mamíferos interage com Sec7 (SHURMANN *et al.*, 1999).

1.2.4 Família Ran

A característica mais marcante dos eucariontes é a presença de compartimentos intracelulares. Esses compartimentos são rodeados interna e externamente por moléculas permeáveis e impermeáveis ao sistema membranar. Para que tais macromoléculas possam se movimentar entre os compartimentos, é necessário um sistema de transporte por vesículas controladas por proteínas específicas que orientam tanto para entrar como sair da célula, bem como entre os compartimentos membranares. Utilizando como exemplo temos a síntese protéica, que ocorre em grande parte no ergastoplasma. As proteínas sintetizadas são transportadas para o Complexo de Golgi que são encaminhadas ou para fora da célula ou, por exemplo, para formar os lisossomos.

Há um rico e fascinante tráfego de vesículas por toda a célula, mas também há passagem de moléculas dos compartimentos para o citosol ou vice-versa. Na importação, por exemplo, em mitocôndrias, cloroplastos ou ergastoplasma, requer uma seqüência específica, o qual é removida durante a importação (RAPOPORT *et al.*, 1996; SCHATZ; DOBBERTEIN, 1996). Em contraste, no caso de transporte nuclear,

os principais processos, a importação e exportação são iguais (GÖRLICH, 1997). Sabemos, por consenso, que naturalmente há uma demanda de moléculas necessárias aos processos nucleares. Estas moléculas são seletivas e específicas ao sistema de transporte nuclear, devendo apresentar um sinal específico para que ocorra o transporte.

A família de proteínas de transporte nuclear é conhecida. As principais são as importinas e exportinas, ambas também chamadas de carioferinas. Elas medeiam o movimento de proteínas entre o citoplasma e o núcleo (IMAMOTO *et al.*, 1998; IZAURRALDE; ADAM, 1998). Proteínas ou RNAs (cargas), para serem transportadas, deverão conter um sinal de localização celular (NLS) (GÖRLICH; MATTAJ, 1996), ou um sinal de exportação nuclear (NES). Tais seqüências são reconhecidas pelas importinas e exportinas, respectivamente. A interação da carga, com os transportadores, é modulada pelas pequenas GTPases Ran (IMAMOTO *et al.*, 1998; IZAURRALDE; ADAM, 1998).

Para que certa proteína possa atravessar o complexo poro nuclear (NPC), é necessária uma combinação de eventos. Inicialmente, a proteína com NLS, que contém uma seqüência conservada de aminoácidos – *clusters*, é reconhecida pelo complexo importina α/β (PANTÉ; AEBI, 1996) mais exatamente na subunidade alfa, que apresenta um sítio de reconhecimento para NLS (IMAMOTO *et al.*, 1995; WEIS *et al.*, 1995) e a subunidade beta interage com o poro nuclear (MOROIANU *et al.*, 1995).

A passagem deste complexo trimérico NLS/importina α/β através do NPC é dependente de energia provinda da hidrólise de Ran-GTP (MELCHIOR *et al.*, 1993; MOORE; BLOBEL, 1993). Após sua passagem, importina α e β dissociam-se (REXACH; BLOBEL, 1995), liberando a carga no núcleo retornado ao citoplasma. Importina β é provavelmente exportado ao citoplasma como um complexo com Ran-GTP (IZAURRALDE *et al.*, 1997). Ran-GTP libera a importina β no citoplasma com o auxílio de RanBP1, RanGAP1 e importina α restaurando o complexo importina α/β (BISCHOFF; GÖRLICH, 1997; LOUNSBURY; MACARA, 1997). Já importina α

necessita ser exportada necessitando de um receptor específico de exportação nuclear denominado CAS. Quando RanGTP dissocia o dímero importina α de β na passagem pelo poro nuclear, aumenta a afinidade de CAS por importina α , regulada por RanGTP (modificado de KUTAY *et al.*, 1997). CAS, por sua vez, direciona o contato pelo NPC, dirigindo-os para fora do núcleo (GÖRLICH, 1998).

No citoplasma, a liberação do complexo trimérico RanGTP/CAS/importina α é executada por RanBP1 que, inicialmente, liga a Ran (BISCHOFF; GÖRLICH, 1997). O complexo RanBP1/RanGTP é instável, sendo atacado por RanGAP1, que hidrolisa GTP, fazendo que a dissociação seja irreversível (GÖRLICH, 1998). CAS livre de RanGTP tem baixa afinidade por importina α retornado ao núcleo sem a necessidade de energia (KUTAY *et al.*, 1997).

Na exportação, diferente com o que ocorre com a importina β , é necessário um transportador específico como CAS, responsável pela importina α (KUTAI *et al.*, 1997). Diferentemente, há uma exportina CRM1 (exportina 1) que exporta uma grande variedade de proteínas contendo um sinal de exportação nuclear rica em leucina (NES) (FORNEROD *et al.*, 1997) como por exemplo em alguns RNAs (FISHER, *et al.*, 1995). Já RNAt, em eucariotos superiores, apresenta uma exportina específica denominada exportina t (Exp-t/Xpo-t) (ARTS *et al.*, 1998; KUTAY *et al.*, 1998). Todas acima citadas dependem, sem exceção, da interação com RanGTP para efetivar a passagem pelo NPC.

1.3 CICLOS DE ATIVAÇÃO E INATIVAÇÃO DAS PROTEÍNAS G

A ligação ao GTP ou GDP define os estados ativo e inativo, respectivamente, da proteína G, atuando como uma molécula reguladora. A ativação requer a dissociação do GDP ligado à enzima, um processo que é intrinsicamente lento, o qual

é acelerado por fatores de substituição do nucleotídeo, os GEFs (*Guanine nucleotide-Exchange Factors*).

O estado inativo, por outro lado, envolve a hidrólise do GTP para GDP, processo basicamente irreversível, também acelerado pela ligação das proteínas ativadoras da atividade GTPásica, as GAPs (*GTPase-activating protein*). Além disso, proteínas conhecidas como GDIs (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) inibem a liberação do GDP de certas proteínas G, mantendo-as no estado inativo (VETTER; WITTINGHOFER, 2001; SPRANG, 1997).

1.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

A função biológica das pequenas proteínas G, principalmente, depende de modificações pós-traducionais. Nas famílias Ras, Rho e Rab, as modificações ocorrem na extremidade C-terminal e são essenciais tanto para a sua localização celular quanto para a interação com moléculas efetoras. Entre as modificações mais importantes estão a adição de isoprenóides e lipídeos, juntamente com a metilação e a clivagem proteolítica (HALL, 1990; PADUCH *et al.*, 2001; TAKAI *et al.*, 2001). Essas modificações podem determinar cinco grupos de Carbono-terminais, como descritos abaixo:

- **C-AI-AI-X** - H-Ras e N-Ras são palmitolados e farnesilados, seguidos da remoção proteolítica do peptídeo (-AAX) e metilação da cisteína exposta (HANCOCK *et al.*, 1989);
- **C-AI-AI-L/F** - K-Ras é modificado da mesma maneira que o grupo 1, apenas não é palmitolado numa cisteína, pois há uma região polibásica precedendo a cisteína do carbono terminal (JACKSON *et al.*, 1990);
- **CXC** - Rap1 é geranilgeranilado; uma curta porção (-AAL/F) é removida e a região polibásica e a carboximetilação estão presentes (KAWATA, 1990);
- **CAC** - Em Rab3a ambas as cisteínas são geranilgeraniladas, nenhum resíduo é removido e a região carboxi-terminal é apenas metilada (OCH₃) (FARNSWORTH, 1991);

- **CC** - Em Rab1 ambas as cisteínas são apenas geranylgeraniladas (SMELAND, 1994).

* - veja o significado dos símbolos na página x.

1.5 PROTEÍNAS G DE PROCARIOTOS

GTPases bacterianas aparecem muito limitadas em comparação com as GTPases de eucariotos quanto ao número e função (MARCH, 1992). Por exemplo, não há proteína análoga à subunidade alfa da proteína G heterotrimérica, a qual é essencial na transmissão de sinais provindos de receptores membranares (HAMM, 1998). Também as subfamílias das pequenas GTPases são ausentes (CALDON *et al.*, 2001). Outra característica das GTPases de procariotos é que apresentam os motivos G1, G2, G3 e G4 dos cinco caracterizadas (CALDON *et al.*, 2001).

Bactérias com grandes genomas apresentam de 20 a 30 GTPases enquanto pequenos genomas apenas 11 representantes (FRASER *et al.*, 1995). Caldon *et al.* (2001) constataram que essas onze GTPases (EF-G, EF-Tu, Era, Ffh, FtsY, IF-2, LepA, Obg, EngA, ThdF/TrmE e YchF) são essenciais ou extremamente importantes na sobrevivência celular. Yoong *et al.* (citado por CALDON *et al.*, 2001) agruparam essas onze GTPases essenciais em quatro subfamílias de acordo com sua similaridade: fatores de alongação, Era, FtsY/Ffh e Obg. Segundo Leipe *et al.* (2002), cada uma dessas GTPases constituem uma subfamília da classe TRAFAC.

A primeira subfamília, dos fatores de alongação, agrupa as proteínas EF-G, EF-Tu e IF2. Esses três fatores agem em diferentes pontos durante o processo de síntese protéica (FRASER *et al.*, 2000). IF2 age durante a iniciação, promovendo a ligação do RNAt ao sítio ribossomal P (GUALERZI; PON, 1990; BROCK *et al.*, 1998). EF-Tu e EF-G agem em diferentes tempos durante o ciclo de alongação; EF-Tu entrega o RNAt contendo o aminoácido específico ao sítio A e, após a ligação peptídica, EF-G promove a translocação do ribossomo (WILSON; NOLLER, 1998; RODINA *et al.*, 1999), ou seja, aceleram o movimento dos corpos dos RNAt entre os sítios ribossomais A/P e P/E. Dentre os fatores de alongação, mais precisamente em

EF-Tu encontra-se um motivo chave (**KNMIT**) para reconhecimento do RNAt com o aminoácido (GAUCHER *et al.*, 2001), situado entre os motivos G3 e G4.

A subfamília Era consiste das proteínas Era, ThdF/TrmE e EngA (YfgK). Era é essencial para o crescimento celular em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus mutans* (TAKIFF *et al.*, 1989; GOLLOP; MARCH, 1991; BRITTON *et al.*, 1998). Os mutantes do gene Era têm fenótipos pleiotrópicos, incluindo alterações na regulação da divisão celular e do metabolismo do carbono (BRITTON *et al.*, 1998) e nitrogênio. A estrutura tridimensional de alta resolução de Era demonstrou que há na porção carboxi-terminal um domínio KH (**VIGXXGXXIK**) de ligação para reconhecimento de RNA (CHEN *et al.*, 1999). Era também foi encontrada associada ao RNA ribossomal 16S (SAYED *et al.*, 1999).

O segundo membro deste grupo, EngA, é essencial para o crescimento em *Neisseria gonorrhoea* (MEHR *et al.*, 2000). Uma curiosidade encontrada por DOORN e colegas (1997) que proteínas ortólogas de EngA apresentam dois domínios adjacentes de ligação à GTP, codificados por uma simples região de leitura aberta (ORF). Sabendo que as GTPases, mediante os domínios G, agem mudando sua conformação, estas proteínas apresentam característica de um sensor ou relógio dentro da célula (BOURNE, 1995). A ocorrência de dois domínios adjacentes dá a possibilidade de uma mudança estrutural (*switch*) em seqüência (*tandem*) que poderia não somente interagir com múltiplos efetores (*targets*), mas também sincronizar eventos celulares (CALDON *et al.*, 2001).

O terceiro membro desta subfamília são as ThdF/TrmE, descritas primeiramente por Alam e Clark (1991) e, posteriormente, por Burland e colegas (1993). Alam e Clark (1991) sugerem que essas proteínas, de 439 aminoácidos, quando expressas em altos níveis medeiam a oxidação de certos tiofanos e furanos. Cabedo *et al.* (1999) sugeriram, por sua vez, que essas GTPases estão envolvidas na modificação do RNAt.

O domínio G de todos os ortólogos da ThdF/TrmE é fundamental na porção carbono-terminal. Parte da porção amino-terminal pode ser removida sem afetar a

função de ligação e hidrólise de GTP (CABEDO *et al.*, 1999). Os quatro últimos aminoácidos são bem conservados (CXGK). No item 1.4 desta introdução, verifica-se que o motivo CAAX, encontrado na poção carboxi-terminal, é motivo para isoprenilação, o qual ancora a proteína G às membranas celulares de eucariotos (CLARKE, 1992). Entretanto, a isoprenilação nunca foi evidenciada em bactérias. Mas Cabedo *et al.* (1999) demonstraram, por meio de experimentos bioquímicos, que proteínas ThdF/TrmE de *E. coli* estão associadas periferalmente às frações membranares.

As proteínas da subfamília FtsY/Ffh estão ligadas ao RNA ribossomal. FtsY é ortólogo bacteriano do receptor da partícula de reconhecimento do sinal de exportação (SRP) (LUIRINK *et al.*, 1994; SELUANOV; BIBI, 1997). Ffh liga-se ao RNA 4.5S para formar o equivalente bacteriano de uma SRP (BERNSTEIN *et al.*, 1993; ULBRANDT *et al.*, 1997). Esse complexo é dirigido para a membrana, onde o ribossomo interage com o receptor SRP.

A subfamília Obg tem como exemplo os membros bacterianos Obg de *Bacillus subtilis* (WIDWANS *et al.*, 1997), *Streptomyces griseus* (OKAMOTO *et al.*, 1997) e *S. coelicolor*; CgtA de *Caulobacter crescentus* e YhbZ de *Escherichia coli* e *Haemophilus influenzae*. A proteína Obg, originalmente descoberta em *B. subtilis*, é essencial para o crescimento e início da esporulação nestes organismos (TRACH; HOCH, 1989; VIDWANS *et al.*, 1995). Também foi demonstrada estar envolvida no controle da replicação do DNA (KOK *et al.*, 1994), onde é necessária em situações de estresse, ativando o factor σ^B da transcrição por meio da proteína Rsb (SCOTT; HALDENWANG, 1999; SCOTT *et al.*, 2000). Em relação à esporulação, Kok *et al.* (1994) propuseram que Obg poderia funcionar detectando o nível intracelular de GTP, o qual é necessário para estimular a fosforilação em cadeia confirmado posteriormente por Vidwans *et al.* (1995), sugerindo este mecanismo como controle (modulação) da esporulação. CgtA mostrou-se indispensável no crescimento celular de *C. crescentus* (MADDOCK *et al.*, 1997). YhbZ (renomeado ObgE) de *E. coli* foi relatado como sendo gene essencial envolvido na separação cromossômica (KOBAYAHY *et al.*, 1997).

Quanto à YchF, uma das 11 GTPases universalmente conservadas, sua função ainda não é conhecida.

1.6 Proteínas g de Tripanossomas

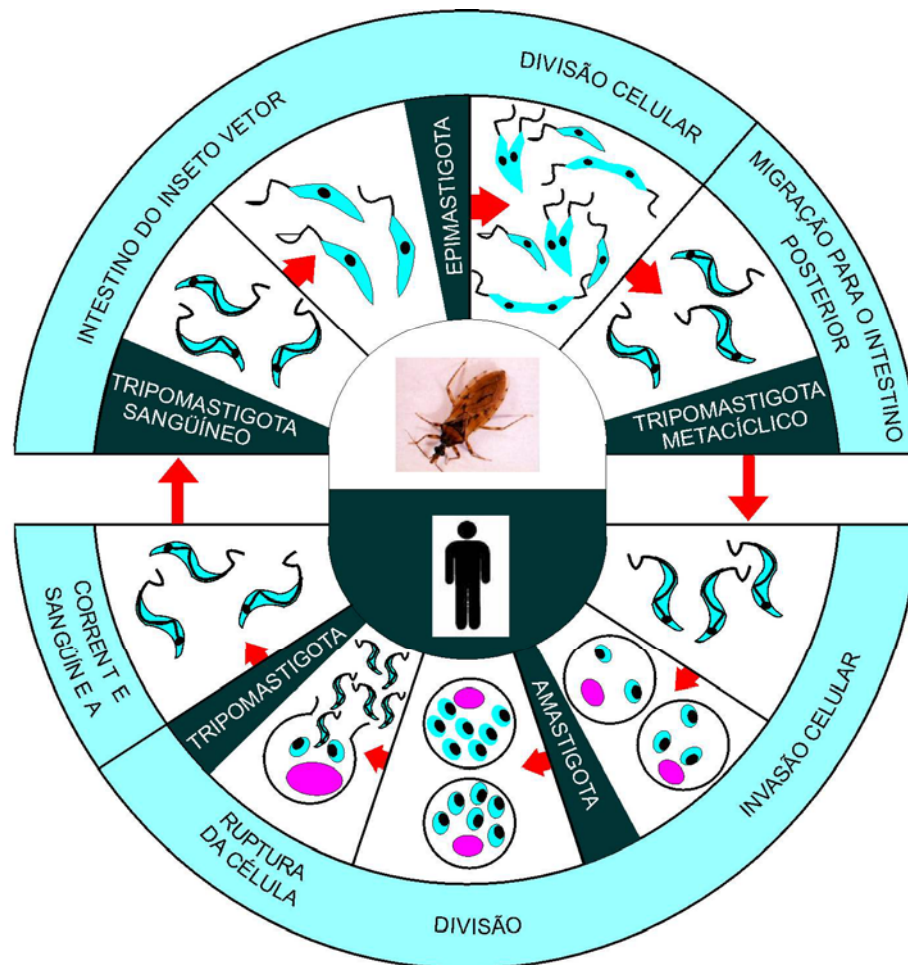
O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário que possui um ciclo de vida extremamente complexo, apresentando diversas variações morfológicas que se alternam entre dois tipos de hospedeiro: insetos da família *Reduviidae* e mamíferos (incluindo o homem).

Há dois tipos de formas replicativas do parasita, os amastigotas, que se replicam no interior das células infectadas do hospedeiro mamífero, e os epimastigotas, que se replicam no interior do trato digestivo dos insetos vetores. Estas formas replicativas se transformam nas formas tripomastigotas infectivas, não-replicativas, que são encontradas no sangue dos mamíferos infectados (tripomastigotas sanguíneos) ou na porção posterior do trato digestivo dos insetos vetores (tripomastigotas metacíclicos) (Figura 1.1).

A diferenciação celular do *T. cruzi* sempre foi alvo de muita atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que seu pleno entendimento pode contribuir para o controle da doença e de sua transmissão, que afeta milhões de pessoas no continente americano. Nesse contexto, foram desenvolvidas condições quimicamente definidas que mimetizam o processo de transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988).

A compreensão desta etapa do ciclo de vida do parasita pode contribuir para a elucidação dos mecanismos que modulam a expressão de genes estágio-específicos e que permitem que o parasita rapidamente se adapte às mudanças bruscas no ambiente, um processo que é de importância central para sua sobrevivência, infectividade e eventual escape do sistema imune do hospedeiro vertebrado (GOLDENBERG, 1990).

FIGURA 1.1 – CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: esquema modificado de ROITT *et al.* (1985, p. 17.14)

Embora muitas etapas do processo de invasão do *T. cruzi* e sua interação com células de diferentes hospedeiros (insetos e mamíferos) tenham sido elucidadas, pouco se conhece sobre as vias endocítica, secretória e de transdução de sinais que podem estar envolvidas com a diferenciação do parasita, nos diferentes hospedeiros.

Vários estudos têm se concentrado no papel das vias de sinalização envolvendo AMPc. O AMPc além de reduzir a proliferação do parasita (OLIVEIRA *et al.*, 1993), parece ter papel importante na diferenciação dele (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988), uma vez que seus níveis aumentam três a quatro vezes antes da diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas (RANGEL-ALDAO *et al.*,

1987). A transformação de tripomastigotas metacíclicos para amastigotas envolve a ligação do parasita à superfície da célula hospedeira. Esse fenômeno leva a um aumento da concentração do AMPc intracelular, estimulação da síntese protéica e fosforilação de várias proteínas do parasita. Estudos em *Trypanosoma brucei* mostram, contudo, que a adenilato ciclase, dos tripanossomatídeos, parece ser insensível a agentes que ativam ciclases de mamíferos, indicando que, nos tripanossomatídeos, essas enzimas não são reguladas via proteína G heterotrimérica. Uma hipótese é de que essas ciclases possam atuar como receptores extracelulares (NAULA; SEEBECK, 2000).

Entretanto, o estudo sobre proteínas G em tripanossomatídeos tem se concentrado nas pequenas proteínas G envolvidas nas vias endocítica e secretória e em sinalização celular. Várias proteínas G de baixo peso molecular envolvidas no tráfego de vesículas (FIELD *et al.*, 1999; LEAL *et al.*, 2000; MAURÍCIO DE MENDONÇA *et al.*, 2000), e subunidades da proteína G heterotrimérica (COSO *et al.*, 1992; OZ *et al.*, 1994; COULTER; HIDE, 1995) foram encontradas em tripanossomatídeos, muito embora pouco ainda se conheça sobre suas funções. Interessantemente, algumas delas são proteínas estágio-específicas, sugerindo que possam estar envolvidas na transdução de sinais provenientes da célula hospedeira (OZ *et al.*, 1994; COULTER; HIDE, 1995).

Pouco também é conhecido sobre as GTPases que atuam em conjunto com a maquinaria de tradução dos tripanossomatídeos. Só recentemente foi descoberta, em *T. brucei*, uma GTPase nucleolar, a NOG1, pertencente à família das Obgs e que está associada à subunidade ribossomal 60S (PARK *et al.*, 2000; JENSEN *et al.*, 2003). Sua função, contudo, ainda é desconhecida.

Logo, o envolvimento das diferentes proteínas G em todos esses processos deve ser mais bem investigado nesses parasitas, a fim de se compreender melhor a fisiologia do parasita, bem como identificar processos vitais para a exploração de potenciais alvos para tratamento terapêutico (FIELD *et al.*, 1999).

1.7 OBJETIVO

Recentemente, identificamos um gene, o qual denominamos *TcGBP*. Esse gene codifica uma provável proteína G. Essa proteína G possui ortólogos eucarióticos e procarióticos. Contudo, sua função ainda é desconhecida nesses dois grupos. O objetivo deste trabalho, portanto, é descobrir a função dessa proteína G, analisar sua expressão e dimensionar sua importância para os processos celulares do *Trypanosoma cruzi*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Procedência dos reagentes mais utilizados:

Amersham Bioscience: α -[P³²]-dCTP (10 μ Ci/ μ L; 3000 Ci/mMol); dNTPs; Hybond C; Hybond N; ProbeQuant Sephadex G-50, filmes de raio-X Hyperfilm[®].

Bio-Rad.: Acrilamida, Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis-Acrilamida; Persulfato de Amônia.

Cult-lab: Soro Fetal Bovino.

Difco: Bacto-ágar; Bacto triptona; Extrato de levedura.

Invitrogen Inc.: Kit TA cloning[®], T4 DNA ligase, pTrcHis-TOPO[®]; EDTA; Fenol; TRIS, Nick Translation Kit, Taq DNA polimerase, IPTG, Agarose, DNA de Lambda/HindIII, X-Gal, Marcador de massa molecular Bench Mark

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial; CaCl₂; Etanol absoluto; Formaldeído; Formamida; Glicina; Glicose; HCl; Isopropanol; KCl; Metanol; Na₂HPO₄; NaH₂PO₄; NaCl; NaOH; TCA; Tolueno.

New England Biolabs: Endonucleases de Restrição.

Pierce Biotechnology Inc.: SDS, Micro-BCA Protein Assay Kit.

Promega: plasmídeo pGEM[®]5Zf, reagentes para revelação com fosfatase alcalina (NBT e BCIP), anti IgG camundongo e coelho.

Sigma: Acetato de amônia; Ampicilina; Brometo de Etídeo; BSA; Canamicina; Glicerol; HEPES; MgCl₂; Tetraciclina; β-mercaptoetanol; DNA de esperma de salmão; DEAE-celulose; HEPES; PPO; POPOP; Tween 20, α-rabbit IgG + FITC, adjuvante completo de Freund.

Roche: High Pure PCR Product Purification Kit.

USB: Sacarose.

2.2 MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona 10,00 g/L; NaCl 5,00 g/L; Extrato de levedura 5,00 g/L.

Meio LB/Ampicilina

Meio LB acrescido de Ampicilina 100 µg/mL.

LB/tet

Meio LB acrescido de Tetraciclina 15 µg/mL.

Meio sólido LB/Amp/IPTG/X-gal

Meio LB acrescido de Ampicilina 100 µg/mL; IPTG 0,1 mM X-gal 0,004 %; Ágar 1,5 %.

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose) - Infusão de fígado e triptose pH 7,2

Infusão de fígado 5,00 g/L; NaCl 4,40 g/L; KCl 0,40 g/L; Glicose 2,20 g/L; Triptose 5,00 g/L; Fosfato Dibásico de Sódio 11,56 g/L; Extrato de Levedura 15,00 g/L; Hemina 0,02 g/L; Soro Fetal Bovino 10%.

TAU (Triatomine Artificial Urine) –Urina artificial de Triatomíneo

NaCl 190,0 mM; KCl 17,0 mM; CaCl₂ 2,0 mM; MgCl₂ 2,0 mM; Tampão Fosfato pH 8,0 200 mM.

TAU3AAG pH 6.0

Meio TAU suplementado com ácido L-glutâmico 50,0 mM; ácido L-aspártico 2,0 mM; L-prolina 10,0 mM; glicose 10,0 mM.

2.3 TAMPÕES E SOLUÇÕES

FENOL/CLOROFÓRMIO:

Fenol saturado 25V; Álcool isoamílico 1V; Clorofórmio 24V.

LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO:

POP 0,5%; POPOP 0,03% em tolueno.

PBS:

NaCl 150 mM; Tampão fosfato 20 mM pH 8,0.

PBS/TWEEN 20:

PBS contendo o detergente Tween 20 na concentração de 0,05%.

SOLUÇÃO DE ALTA ESTRINGÊNCIA:

SSC 2X; SDS 0,1%.

SOLUÇÃO DE MÉDIA ESTRINGÊNCIA:

SSC 1X; SDS 0,1%.

SOLUÇÃO DE BAIXA ESTRINGÊNCIA:

SSC 0,1X; SDS 0,1%.

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO PARA WESTERN BLOT:

PBS 1X, Tween 20 0,05%; leite em pó desnatado Molico 5%.

SOLUÇÃO DE DENHARDT:

Albumina bovina sérica (BSA) 0,02%; polivinilpirolidona 0,02%; ficoll 0,02%.

SOLUÇÃO DE DEPURINAÇÃO PARA SOUTHERN BLOT:

HCl 0,25 M.

SOLUÇÃO DESNATURANTE PARA SOUTHERN BLOT:

NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.

SOLUÇÃO NEUTRALIZANTE PARA SOUTHERN BLOT:

Tris HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M.

SOLUÇÃO DE ESTOQUE PARA CÉLULAS CÁLCIO-COMPETENTES:

CaCl₂ 100 mM; HEPES 10 mM pH 7,0; glicerol 10 %.

SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO PARA SOUTHERN BLOT:

DNA de esperma de salmão do tipo III 0.1 mg/mL fragmentado por ultra-som e desnaturado; SSC 6x; solução de Denhardt 5x; ; SDS 1%.

SOLUÇÃO DE HIBRIDAÇÃO PARA NORTHERN BLOT:

50 % formamida; SSC 5x; 20 mM NaHPO₄ pH 7,0; Denhardt's 5x; 0,5 % SDS; DNA de esperma de salmão do tipo III 0.1 mg/mL fragmentado por ultra-som 100 µg/mL.

SOLUÇÃO DE LISE PARA TOOTHPICK:

NaOH 50 mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM; azul de bromofenol 0,025%.

SOLUÇÃO DE LISE PARA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL:

Isotiocianato de guanidina 5M; EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; β-mercaptoetanol 8%.

SOLUÇÃO DE RESSUSPENSÃO DE RNA TOTAL:

Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; SDS 0,1%.

SOLUÇÃO DE PONCEAU S:

Ponceau S (Sigma P-3504) 0,5%, Ácido acético glacial 1%.

SSC 1X :

NaCl 0,15 M; Citrato de sódio 0,015 M pH 7,0.

TAMPÃO DA T4 DNA LIGASE 5X:

Tris HCl pH 7,6 250 mM; MgCl₂ 50 mM; ATP 5 mM; DTT 5 mM; 25% PEG-8000.

TAMPÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA 10X:

Tris HCl pH 8,5 500 mM; EDTA 1 mM.

TAMPÃO DE AMOSTRA DE RNA:

Formamida 80%, formaldeído 6%, tampão MOPS 1x; 15% de corante (Mops 1x; glicerol 25%, azul de bromofenol 0,025%).

TAMPÃO DE AMOSTRA PARA PROTEÍNA 4X:

Tris-HCl 125 mM pH 6.8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; Glicerol 12%; azul de bromofenol 0,012%.

TAMPÃO DE ELUIÇÃO PARA RESINA DE NÍQUEL:

Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, Imidazol 300 mM e PMSF 1 mM.

TAMPÃO DE LAVAGEM PARA RESINA DE NÍQUEL:

Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol 10%, Imidazol 10 mM, PMSF 1 mM.

TAMPÃO DE SONICAÇÃO PARA RESINA DE NÍQUEL:

Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM.

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA PARA WESTERN BLOT:

Tris base 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%.

TAMPÃO MOPS:

MOPS 20 mM; acetato de sódio 5 mM; EDTA 2 mM, pH 7,5.

TAMPÃO DE LISE HIPOTÔNICO:

Tris HCl 10 mM ph 7,6, MgCl₂ 5 mM , NaCl 10 mM, betamercaptoetanol 5 mM, ciclohexamida 10µg/mL, heparina 20 unid/mL.

TAMPÃO DE LAVAGEM PARA ISOLAMENTO DE RNA POLISOMAL:

NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM pH 7,4, cicloheximida 10 µg/mL e heparina 10 unidades/mL.

TBE 10X:

Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8.0.

TE:

Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM.

2.4 MICRORGANISMOS

- *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c (CONTRERAS *et al*, 1985).
- *Escherichia coli*, Cepa TOP10F' [lac I^q, Tn 10 (Tet^R) mer A Δ(mrr-hsd RMS-merBC) θ 80 lacZ Δm15 ΔlacX74 deoR recA1 ara D139 Δ (ara-leu) 7697 glU galK rpsL (str^R) end A1 nupG

2.5 TÉCNICAS

2.5.1. Amplificação dos Fragmentos do Gene *TcGBP*

A partir de uma seqüência parcial do gene, denominado *TcGBP*, obtida pelo seqüenciamento de clones de uma biblioteca de cDNA das formas epimastigotas de *T. cruzi*, construímos oligonucleotídeos com o objetivo de amplificar a região de leitura aberta (ORF – *open reading frame*) e as regiões 5' e 3' não traduzidas, presentes no transcrito deste gene.

QUADRO 2.1 - SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.

| | |
|---------------|---|
| cl7F | CAG GTC GGC CCA GCA AAA TCG T |
| cl7R | GTT GCC AAT GGA ACG GTA AG |
| 7orfF | CCC CGG ATC CAT GCC CCC CAA GAA GAA |
| 7orfR | GGG GAA GCT TGG CAA CAC CGA ATC TGT TCA CCA T |
| GBPF | ATG CCT CCC AAG AAG AAG GAT GAG AAG TC |
| GBPR | CTA CTT CTT ACC TCC TTT AGC GGC GTT A |
| λF | GGT GGC GAC TCC TGG AGC CCG |
| λR | TTG ACA CCA GAC CAA ATG GTA ATG |
| RDE-MINI-EXON | GCG GCG GAT CCA CAG TTT CTG TAT ATT G |
| RDE-dT | GCG GCG GAT CCT TTT TTT TTT TTT TT |

Diferentes combinações desses oligonucleotídeos (λF+cl7F; λF+7orfR; RDE-MINI-EXON+cl7F; cl7R+RDE-dT; cl7R+λR; GBPF+GBPR) foram usadas em reações de PCR contendo: 2 μL do lisado de fagos ($7,6 \times 10^5$ pfu/μL) de uma biblioteca de cDNA de *T. cruzi* em λgt11 (FRAGOSO; GOLDENBERG, 1992), 10 pmol de cada oligo, 200 μM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, 10x tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 minutos a 96 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto.

2.5.2 Ligação

Os produtos da amplificação da PCR foram purificados utilizando o sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), segundo as recomendações do fabricante.

O plasmídeo pDK101 (KOVALIC *et al.*, 1991) digerido com a enzima de restrição *XcmI* (pDK101/*XcmI*) foi utilizado para a clonagem dos fragmentos de DNA obtidos da amplificação pela PCR. O plasmídeo pDK101 possui dois sítios para *XcmI* distantes 14 pb um do outro, dentro da região de clonagem múltipla. A digestão com *XcmI* gera extremidades 5' no plasmídeo que contém, cada uma, um resíduo de timina desapareado. Por sua vez, a enzima Taq DNA polimerase tem a propriedade de adicionar um resíduo de adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado. Desse modo esses fragmentos podem ser facilmente clonados no vetor pDK101/*XcmI*.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pDK101/*XcmI* na relação molar 3:1 respectivamente, em uma reação de ligação contendo tampão da ligase 1X e 1 unidade de T4DNA ligase (Invitrogen) em volume final de 10 μ L. A ligação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

2.5.3 Preparação de *E. coli* Cálcio-competente

A bactéria *E. coli*, cepa TOP10F', foi preparada segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Uma alíquota de 10 μ L do estoque em glicerol da bactéria mantida a - 20 °C foi inoculada em 5 mL de meio LB/tet e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação constante (pré-inóculo). Um mililitro do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL no meio LB/tet e incubado a 37 °C, sob agitação constante, durante tempo suficiente para que alcançasse a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} = 0,6$).

Após esse tempo, a cultura foi colocada no gelo por 15 min. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em uma solução gelada de CaCl₂ 100 mM, tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0, em um volume final correspondente à metade do volume da cultura original. As células foram novamente coletadas por centrifugação, nas mesmas condições anteriores, ressuspensas gentilmente com a solução anterior acrescida de glicerol 10% (1/50 do volume da cultura original) e mantidas no gelo por 2 horas, sendo em seguida armazenadas a - 70 °C.

2.5.4 Transformação de Bactérias Cálcio-competentes

As reações de ligação foram incubadas com 100 μ L da suspensão de *E. coli*, cepa Top10F' competente, por 30 minutos no gelo. Após esse período, as suspensões bacterianas foram submetidas ao choque térmico a 42 °C por 2 minutos e imediatamente colocadas no gelo por 2 minutos, antes da adição de 1 ml de meio LB.

As células transformadas foram incubadas sob agitação constante a 37 °C por uma hora. Aliquotas de 100 µL, 200 µL e 700 µL foram espalhadas em placas contendo meio LB/Amp/IPTG/X-gal e incubadas a 37 °C por 18 horas.

2.5.5 Seleção dos Clones Recombinantes

O plasmídeo pDK101 apresenta duas características importantes para auxiliar na seleção dos clones recombinantes: presença do gene Amp, que codifica resistência à ampicilina e um fragmento do gene da enzima β-galactosidase (peptídeo α), onde estão localizados os diferentes sítios de clonagem do plasmídeo. A bactéria hospedeira contém um fragmento que codifica para porção carboxi-terminal da enzima que complementa o peptídeo α, resultando em uma β-galactosidase funcional. Este fenômeno é denominado α-complementação. A presença de IPTG (análogo do açúcar utilizado para indução do *operon lac*) resulta na síntese da enzima β-galactosidase funcional, que por sua vez cliva o X-gal (análogo do substrato), fornecendo à colônia uma coloração azul.

Assim, a seleção das bactérias transformadas é efetuada pela resistência à ampicilina e pela inativação da enzima β-galactosidase devido à presença de DNA inserido na região codificante do polipeptídeo-α, onde estão localizados os diferentes sítios de clonagem. Entre as bactérias transformadas, foram selecionadas aquelas cujas colônias são claras, pois, com isso, há o indicativo da presença do plasmídeo com o inserto de DNA (não há degradação do X-gal, responsável pela coloração azul).

A análise dos clones recombinantes também foi feita pela técnica de palitagem (*toothpick*) e PCR de colônia.

2.5.5.1 TÉCNICA DA PALITAGEM

As colônias claras que podem apresentar plasmídeos recombinantes, conforme descrito no item anterior, foram coletadas com auxílio de palitos de dente estéreis e espalhadas no fundo de um tubo de microcentrífuga. Os mesmos palitos foram usados

para perfurar suavemente a superfície de uma placa contendo meio LB/Amp (*masterplate*), que foi incubada a 37 °C durante 12 horas. Aos tubos, devidamente numerados, foram adicionados 10 µl da solução de lise de *toothpick*. A lise procedeu-se em banho a 65 °C durante 10 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % em tampão TBE 1X.

Depois da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) por aproximadamente 20 minutos e lavado com água bidestilada. O DNA foi então observado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad®).

2.5.5.2 PCR de colônia

As colônias claras selecionadas foram transferidas para tubos de PCR contendo os reagentes da PCR e os oligonucleotídeos SP6 (5' TAT AGT GTC ACC TAA AT 3') e T7 (5' TAA ACG ACT CAC TAT AGG G 3'), que são os iniciadores que hibridizam com regiões do plasmídeo que flanqueiam o fragmento de DNA clonado, em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 94 °C por 10 minutos e submetidas a 30 ciclos ou PCR com as seguintes etapas: 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, finalizando com 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel agarose 1%.

2.5.6 MINIPREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

A minipreparação do plasmídeo foi realizada com base no método da lise alcalina, adaptado de Birnboim e Doly (1979). Os clones recombinantes foram cultivados em 2 mL de LB/amp, a 37°C por 16 a 18 horas. Os plasmídeos foram purificados utilizando o sistema Qiaprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. Nessas condições, obtém-se de 1 a 5 µg de DNA dos diferentes plasmídeos, sendo este material utilizado para o seqüenciamento do gene *TcGBP*.

2.5.7 Seqüenciamento e Análises Computacionais

O seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes foi feito pelo método de Sanger *et al.* (1977) modificado, utilizando o protocolo para *BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems). As reações foram aplicadas no seqüenciador automático 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

A seqüência nucleotídica do gene *TcGBP* foi analisada utilizando-se o pacote de programas Lasergene (DNASTAR Inc.) e o algoritmo BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*, 1997), do *National Center of Biotechnology Information* – NCBI vinculado ao *National Institute of Health* – NIH no endereço eletrônico <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>.

A seqüência aminoacídica da proteína TcGBP foi analisada também pelo sistema de análise de proteínas ExpPASy (*Expert Protein Analysis System*) do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) <<http://bo.expasy.org/>>, com o objetivo de detectar motivos protéicos (SIGRIST *et al.*, 2002; HULO *et al.*, 2004).

2.5.8 Cultivo de *T. cruzi* Dm28c e o Processo de Metaciclogênese

As culturas de epimastigotas foram iniciadas com 2×10^6 células/mL e mantidas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C. Nos experimentos, foram utilizadas epimastigotas de 3 e 5 dias.

As formas tripomastigotas foram obtidas em meio de diferenciação TAU3AAG (BONALDO *et al.*, 1988). A diferenciação foi induzida a partir de epimastigotas em fase exponencial de crescimento. As células foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C e ressuspensas na concentração de 5×10^8 células/mL de TAU, para serem submetidas a um estresse nutricional de duas horas a 28 °C (CONTRERAS *et al.*, 1985). A seguir, foi feito inóculo de 1 mL desta amostra em 100 mL de TAU3AAG para que fosse obtida uma concentração final de 5×10^6 células/mL.

A incubação foi feita em garrafas Falcon (175 cm²) a 28 °C. Sob tais condições, os epimastigotos se aderem ao substrato e, após 96 horas, obtêm-se 80-90% de tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante da cultura (BONALDO *et al.*, 1988). A purificação das formas tripomastigotas metacíclicas foi executada por cromatografia de troca iônica por meio da coluna de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) (CONTRERAS *et al.*, 1985).

Sob as mesmas condições de diferenciação, as formas aderidas foram obtidas após 24 horas de diferenciação TAU3AAG. O sobrenadante foi descartado e apenas as células aderidas ao substrato foram utilizadas nos experimentos.

2.5.9 Isolamento de RNA Total de *T. cruzi*

O protocolo para a extração de RNA total foi baseado ao descrito por Karlinsey *et al.* (1989). Os parasitas foram cultivados como descrito no item 2.5.8. Um total de 1×10^{10} parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a $9.600 \times g$ por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS e lisadas com agitação suave em 9 mL de tampão de lise. Após a lise, foram adicionados 63 mL LiCl 4 M e o material foi guardado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas.

Posteriormente, o material foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sedimento foi ressuspensão em 55 mL de LiCl 3M e novamente centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Essa última etapa foi repetida por mais uma vez. O sedimento foi ressuspensão em 10 mL no tampão de ressuspensão de RNA total. A suspensão foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e descongelada em banho-maria $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob forte agitação. O RNA foi extraído uma vez com fenol saturado e uma vez com fenol/clorofórmio e precipitado com 1 volume de isopropanol a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. O material foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 20 minutos, lavado com etanol 70% e ressuspensão em água ultrapura livre de RNase após tratamento com dietil pirocarbonato (DEPC).

2.5.10 Isolamento de DNA Total de *T. cruzi*

Os parasitas foram cultivados como descrito no item 2.5.8. Um total de 5×10^{10} parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a $9600 \times g$ por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, ressuspensas com tampão de lise hipotônica e lisadas pela adição de Nonidet P-40 para concentração final de 1% por 2 a 3 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Os núcleos celulares foram parcialmente purificados por meio de três ciclos de centrifugação a $8000 \times g$ por 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta fração foi digerida com proteinase K $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ por 12 horas em NaCl 10 mM; EDTA 5 mM; SDS 0,5%; Tris-HCl 10 mM pH 7,6. O DNA foi extraído com fenol saturado em Tris base 100 mM e dialisado várias vezes contra uma solução contendo NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

2.5.11 Análise do Gene *TcGBP* por Ensaio Tipo *Southern Blot*

O DNA gênomico (5,5µg) de *T. cruzi* Dm28c foi submetido a digestões simples com as enzimas de restrição *Ava*I, *Ava*II, *Bam*HI, *Cla*I, *Dra*I, *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*I e *Ssp*I, de acordo com as especificações do fornecedor. Após 3 horas, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE a 100V. O gel foi corado por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob a luz ultravioleta (310 nm).

Posteriormente, o gel foi tratado com soluções de depurinação por 15 minutos, de desnaturação por 30 minutos (2 vezes) e solução de neutralização por 30 minutos (2 vezes). O DNA foi transferido para uma membrana de *nylon* (Hybond N, Amersham Biosciences) por capilaridade (MANIATIS *et al.*, 1982) utilizando-se de uma “ponte” de papel 3 MM embebido em SSC 20X. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm², usando o aparelho Spectrolinker (Spectronics corp., USA).

A membrana contendo o DNA de *T. cruzi* foi pré-hibridizada em solução de hibridização de DNA por 1 hora a 65 °C, seguido da adição da sonda (*TcGBP*) marcada radioativamente com α -[P³²]-dCTP (10 µCi/µL; 3.000 Ci/mMol) (Amersham Biosciences), preparada segundo método de *nick translation*, descrito por Rigby *et al.* (1977), utilizando-se o Nick Translation Kit (Amersham Biosciences), conforme recomendação do fabricante. Após a marcação, a sonda foi purificada em colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant - Amersham Biosciences). A sonda foi adicionada ao tampão de hibridização na concentração de 5 x 10⁶ cpm/mL. A membrana foi incubada por 16 horas a 65 °C e, em seguida, lavada nessa temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de alta, média e baixa estringência. A membrana foi exposta a filme de raio-X (Hyperfilm[®]) na presença de intensificador (Dupont Cronex Lightning Plus), por 3 a 5 dias a -70 °C. Os fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda radioativa foram visualizados por auto-radiografia.

2.5.12 Análise do Gene *TcGBP* por Ensaio Tipo *Northern blot*

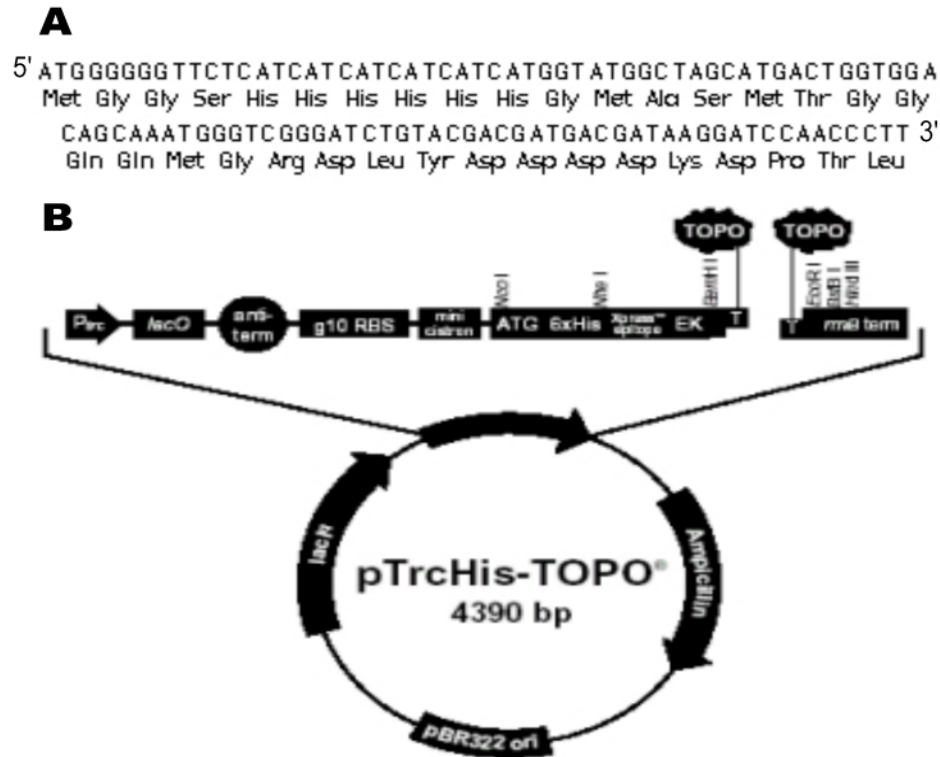
O RNA total (10 µg) das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi fracionado em gel de agarose/formaldeído como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a corrida eletroforética em tampão MOPS o gel foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond N - Amersham Bioscience) por capilaridade durante 16 horas. O RNA foi fixado à membrana por luz ultravioleta (120 mJ/cm²). A membrana foi incubada em solução de pré-hibridação para *northern blot* por 1 hora a 42 °C e hibridizada com sonda radioativa (*Tcgbp*) durante 16 horas a 42 °C em solução de hibridização para *Northern Blot*. A sonda radioativa foi marcada radioativamente por *nick translation* como descrito no item 2.5.11 e usada na concentração de 1 x 10⁶ cpm/mL. A membrana foi incubada por 16 horas a 42 °C e, em seguida, lavada nesta temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de alta, média e baixa estringência. A membrana foi exposta a filme de raio-X (Hyperfilm[®]) na presença de intensificador (Dupont Cronex Lighttining Plus) por 4 dias a -70 °C. O RNA que hibridizou com a sonda foi visualizado por auto-radiografia.

2.5.13 Clonagem do Gene *TcGBP* no Vetor de Expressão pTrcHis-TOPO

O gene *TcGBP* foi clonado no vetor de expressão pTrcHis TOPO (Invitrogen) que adiciona seis resíduos de histidina associados à porção amino-terminal da proteína (FIGURA 2.1). Esse sistema apresenta a vantagem de facilitar a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-NTA (AUSUBEL *et al.*, 1987). Os oligonucleotídeos GBPF (5' ATG CCT CCC AAG AAG AAG GAT GAG AAG TC 3') e GBPR (5' CTA CTT CTT ACC TCC TTT AGC GGC GTT A 3') foram usados para amplificar a região codante de *TcGBP*, nas seguintes condições: 100 ng de DNA total from *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligos GBPF e GBPR, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, 10x tampão Taq DNA polimerase, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Os reagentes foram misturados e aquecidos por 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. O fragmento de DNA amplificado foi clonado no plasmídeo pTrcHisTOPO segundo as recomendações do fabricante. *Escherichia coli* TOP10F' foi transformado com o produto resultado da clonagem. Clones contendo o gene *Tcgbp* na orientação correta foram selecionadas por PCR de colônia (item 2.5.5.2).

FIGURA 2.1 – EM A DESTACA-SE A SEQUÊNCIA 5' ENCONTRADA NO VETOR O QUE ELEVA A MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA EXPRESSA EM 3,3 kDa. EM B O VETOR DE EXPRESSÃO pTrcHis TOPO.



Fonte: Invitrogen (modificado).

2.5.14 Análise da Solubilidade da Proteína TcGBP Recombinante

O clone recombinante expressando TcGBP foi cultivado em 20 mL de LB/amp a 37 °C durante 16 horas. Essa cultura foi diluída em 200 mL de meio LB/Amp e incubada a 37 °C durante 1 hora. Após esse tempo, IPTG foi adicionado na concentração final de 2 mM e a cultura foi incubada por mais 4 horas a 28 °C. As bactérias foram então coletadas por centrifugação a 7.000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS 1X e ressuspensas com o tampão de sonicação. As células foram lisadas por sonicação (Homogenizador 4710 - Cole Parmer), 5 vezes na potência 7,5 por 15 segundos com intervalos de 2 minutos no gelo. A suspensão foi centrifugada a 7.000 x g por 20 minutos a 4 °C.

Amostras protéicas do material sedimentado e em suspensão juntamente com extratos protéico de *E. coli* induzidos e não induzidos foram separadas por SDS-PAGE 10%. Transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reagidas contra anti-soro

monoclonal anti-histidina. O resultado obtido mostrou que a proteína TcGBP se encontra na porção solúvel, o que facilita sua purificação em cromatografia de afinidade com Ni-NTA.

2.5.15 Purificação da Proteína TcGBP por Cromatografia de Afinidade em Resina de Ni-NTA Agarose

Uma vez que foi determinado que a TcGBP recombinante estava na fração solúvel do extrato de *E. coli*, procedemos com a etapa de purificação dessa proteína em resina de Níquel-NTA, em condições nativas. O sobrenadante, correspondente à porção solúvel, foi transferido para a coluna contendo 1 mL de Ni-NTA (Qiagen) e incubado sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, o material não ligado à resina foi coletado por gravidade. A resina foi lavada com 50 mL de tampão de lavagem. A proteína TcGBP recombinante ligada à resina foi então eluída com 5 mL de tampão de eluição. Aliquotas do material proveniente de cada etapa da purificação foram recolhidas (sobrenadante pós-sonicação, proteínas não-ligadas à resina, lavado e eluído) para posterior análise em SDS-PAGE 10%. A dosagem protéica da fração purificada foi feita usando o *kit Micro-BCA Protein assay* (Pierce), segundo as recomendações do fabricante.

2.5.16 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE TCGBP

Coelhos *New Zeland* foram inoculados 3 vezes, por via subcutânea, com 150 µg de proteína recombinante em intervalos de 7 dias. Em camundongos, foram feitas 3 aplicações de 50 µg de antígeno em intervalos de 7 dias. Para ambos os animais, o soro imune foi coletado uma semana após a última inoculação. Na primeira inoculação, o antígeno foi emulsionado com volume igual de adjuvante completo de Freund (Sigma) e, nas demais, com adjuvante de Freund incompleto.

2.5.17 Análise da Expressão da TcGBP por Ensaio Tipo *Western Blot*

A análise da expressão da TcGBP por ensaio tipo *Western blot* foi executada segundo o método de Towbin *et al.* (1970). Extratos protéicos equivalentes a 1×10^7 células de formas epimastigotas, epimastigotas em diferenciação (aderidos) e tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi feita em tampão de *Western blot* a 20 V por 16 horas a 4 °C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos à temperatura ambiente, para a identificação das bandas do marcador de massa molecular *Benchmark* (Invitrogen) e então descorada em água bidestilada. Em seguida, a membrana foi transferida para a solução de bloqueio por uma hora sob agitação suave, seguida da incubação com anti-soro anti-TcGBP (diluições de 1:2000 a 1:4000 - coelho ou 1:500 - camundongo em solução de bloqueio) por uma hora a 37 °C sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS/Tween por 5 minutos.

Posteriormente, dependendo da origem do anticorpo primário, a membrana foi incubada por 1 hora a 37 °C sob agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou de camundongo (Promega) (diluições de 1:7500), conjugados com a enzima fosfatase alcalina. A membrana foi lavada como anteriormente. A reação imunoenzimática foi revelada com os substratos NBT a 50 mg/mL e BCIP a 50 mg/mL em tampão da fosfatase alcalina. A reação foi interrompida pela transferência da membrana para uma solução de EDTA 100 mM.

Esta mesma técnica foi utilizada para analisar outras frações protéicas como, por exemplo, frações polissomais.

2.5.18 Obtenção de Polissomos de *T. cruzi* e Análise por *Western Blot*

Epimastigotas, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional e epimastigotas aderidos por 24 horas foram obtidos como descrito no item 2.5.8. Cicloheximida foi adicionada ao meio de cultura na concentração final de 10 µg/mL, 30 minutos antes da coleta da células ($5,0 \times 10^{10}$) por centrifugação a 8.000 x g por 15 minutos a 10 °C. As células foram lavadas 3 vezes em tampão de lavagem (epimastigotas) ou 1 vez em TAU3AAG (epimastigotas sob estresse, epimastigotas aderidos, tripomastigotas metacíclicos), suplementadas com cicloheximida (10 µg/mL).

As células foram ressuspensas em 4 volumes do sedimento com tampão de lise hipotônico e lisadas pela adição de Nonidet P-40 na concentração final de 1% por 2-3 minutos a 4 °C com agitação. O processo de lise foi interrompido com adição de sacarose na concentração final de 0.25 M. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C. A fração polisomal foi obtida após centrifugação da fração pós-mitocondrial (9 mL) em colchão de sacarose 2 M (2 mL) a 365.000 x g por 90 minutos a 4 °C. Os sedimentos contendo os polissomos foram ressuspensos em tampão de amostra contendo uréia 8M. A concentração das proteínas na fração polissomal foi determinada usando o kit BCA para dosagem de proteínas (Pierce). Quantidades equivalentes de proteínas (10 µg) provenientes das diferentes frações polissomais foram resolvidas em SDS-PAGE. As frações foram analisadas por *Western blot* conforme descrito no item 2.5.17.

2.5.19 Fracionamento de Polissomos de *T. cruzi* em Gradiente de Sacarose

O protocolo para a extração de fracionamento de polissomos em gradiente de sacarose foi baseado no protocolo descrito por Salmon *et al.* (2001). Resumidamente, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas como descrito no item 2.5.8. Cicloheximida foi adicionada ao meio de cultura na concentração final de 10 µg/mL, 30 minutos antes da coleta das células por centrifugação. Após centrifugação as células foram lavadas com tampão de lavagem e lisadas em tampão hipotônico, após a adição de Nonidet P-40, o lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado sobre um gradiente de sacarose de 15 a 50 %.

O gradiente foi submetido à ultracentrifugação a 230.000 x g por 2 horas. Após a centrifugação, frações do gradiente (400 µL) foram coletadas com o auxílio de uma bomba peristáltica com um fluxo de 1 mL/min. A concentração dos RNAs presentes em cada fração foi determinada pela absorbância no comprimento de onda de 260nm. Após a dosagem do RNA, as proteínas de cada fração foram precipitadas com ácido tricloroacético 12,5% a -20 °C. As proteínas foram coletadas por centrifugação, lavadas posteriormente com acetona e ressuspendidas em tampão de amostra 4X para posterior análise por *western blot* conforme descrito no item 2.5.17.

2.5.20 Localização Celular da TcGBP no *Trypanosoma cruzi* por Imunofluorescência

Os parasitas cultivados no meio LIT por 3 dias (item 2.5.8) foram coletados por centrifugação (8000 x g por 10 minutos), e lavados com PBS. As células foram aderidas em lâmina revestida com poli-L-lisina 0,1% por 15 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram feitas 3 lavagens sucessivas com 0,1 M de glicina por 15 minutos, seguidas de uma lavagem em PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,08% por 2 minutos. A lâmina foi lavada com PBS por 15 minutos e incubada com NaCl 0.85% DAPI (1:1000) por 5 minutos a 37 °C em câmara úmida. Após lavagem com PBS por 5 minutos, a lâmina foi incubada com 1% BSA em PBS por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. Os parasitas foram incubados com o anti-soro anti-TcGBP, diluídos 1:80 em PBS/BSA, por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. Após incubação, a lâmina foi lavada à temperatura ambiente, por 15 minutos, com BSA 1% em PBS e 3 vezes somente com PBS 1X também por 15 minutos. O segundo anticorpo anti-IgG de coelho (Sigma) conjugado à fluoresceína (FITC) foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C em câmara úmida no escuro. Após a incubação do anticorpo secundário, a lâmina foi lavada por 3 vezes com PBS no escuro e montada com n-propil galato. Os parasitas foram observados em microscópio de contraste de fase ou fluorescência usando o microscópio Eclipse E600 (NIKON). As imagens foram capturadas usando a câmera CCD CoolSNAPPro_{cf} (Media Cybernetics) e analisadas usando o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

3 RESULTADOS

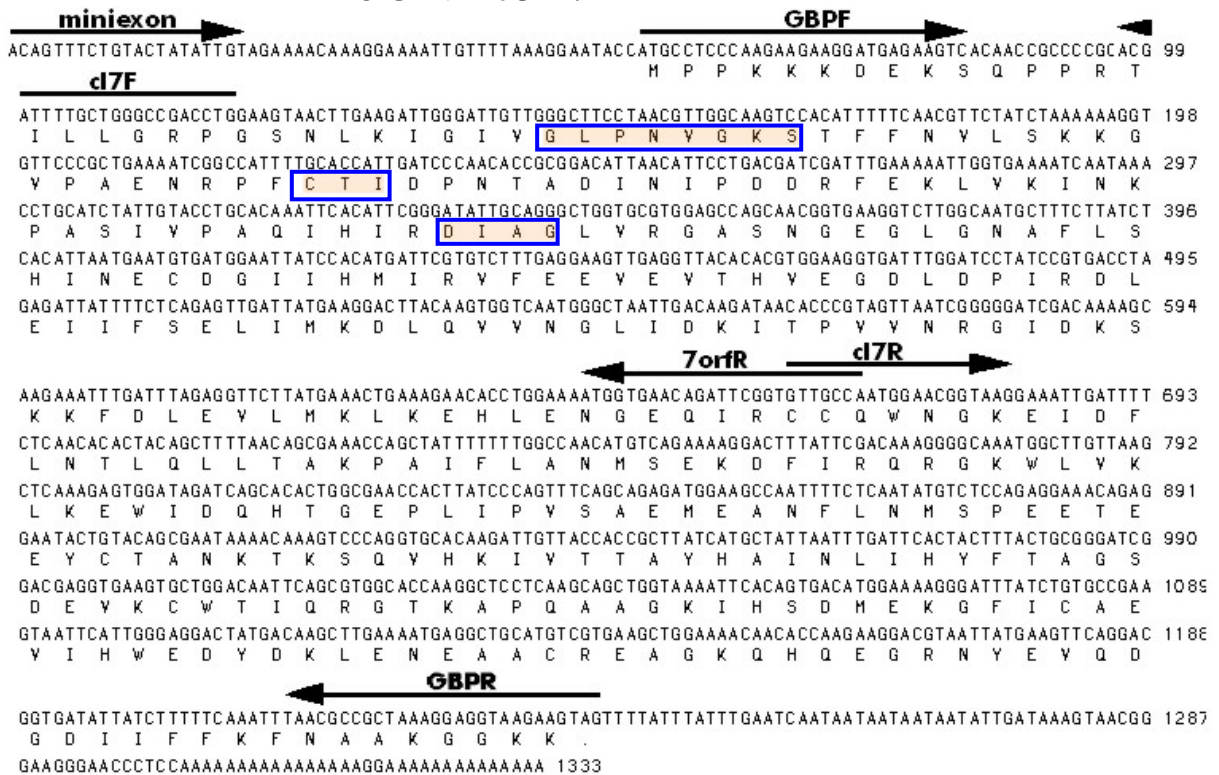
3.1 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE FRAGMENTOS DO GENE *Tcgbp*

O seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA das formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c revelou a presença de um clone com um inserto de 711 pb. A análise da seqüência desse clone, usando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), revelou que o inserto se tratava de um fragmento de um gene que codifica uma proteína com domínios de interação com o nucleotídeo guanina, o qual denominamos de *TcGBP*.

A região codificante do gene *TcGBP*, bem como as regiões 5'-UTR e 3'-UTR presentes no transcrito maduro foram obtidas por amplificação por PCR, a partir de uma biblioteca de *T. cruzi* Dm28c em λ gt11. Essa biblioteca foi utilizada por duas razões: (1) alto título ($7,6 \times 10^8$ pfu/mL), que aumenta a possibilidade de encontrarmos cDNAs completos e (2) facilidade em se amplificar o produto desejado por PCR, já que se utiliza o lisado de fagos (2 μ L) diretamente na mistura de reação da PCR. Nessa estratégia, utilizamos iniciadores que hibridizam com seqüências internas da região codificante do gene *TcGBP*, bem como iniciadores (λ F e λ R) que hibridizam com seqüências do DNA do bacteriófago Lambda flanqueando o inserto.

Os transcritos de tripanossomatídeos oriundos de genes que codificam proteínas apresentam em sua extremidade 5' uma seqüência denominada de *mini-exon* ou *spliced leader* (BOOTHROYD; CROSS, 1982, VAN DER PLOEG *et al.*, 1982, ULLU *et al.*, 1996). O sítio de adição do *mini-exon* no transcrito *TcGBP* foi identificado pela amplificação da biblioteca de *T. cruzi* em λ gt11, usando um iniciador com a seqüência parcial do mini-exon de *T. cruzi* e um iniciador interno à região codificante do gene *TcGBP* (c17F) (FIGURA 3.1). Os pares de oligonucleotídeos que foram usados para amplificação de diferentes regiões do gene pela PCR estão representados na FIGURA 3.1.

FIGURA 3.1 - SEQÜÊNCIA DO CLONE cDNA CONTENDO A REGIÃO DE LEITURA ABERTA DO GENE *TcGBP*.



FONTE: o autor.

NOTA: As setas indicam a direção dos principais oligos utilizados para obter a seqüência completa do cDNA *TcGBP*. Os três domínios conservados das proteínas G estão mostrados em retângulos.

3.2 ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO GENE *TcGBP*

O gene *TcGBP* possui uma região codificante de 1.185 pares de bases e codifica uma proteína de 394 aminoácidos, com massa molecular de 44,32 kDa (FIGURA 3.1).

A análise da seqüência de aminoácidos da *TcGBP* revela que esta proteína apresenta alguns dos domínios que caracterizam as pequenas proteínas G (SPRANG, 1997; LIRI *et al.*, 1998): G1 ou P-loop $_{31}\text{GLPNVGKS}_{38}$ que contata os grupamentos fosfatos beta e gama do nucleotídeo, G2 $_{57}\text{CTI}_{59}$ e G3 $_{94}\text{DIAG}_{97}$ que interagem com o íon magnésio, importante co-fator da atividade GTPásica (FIGURA 3.1). Porém, não conseguimos identificar o domínio G4 (NKxD), conservado em diversas proteínas G e responsável pela especificidade dessas proteínas pelo nucleotídeo guanina.

A busca por homologia entre a *TcGBP* e outras seqüências depositadas no banco de seqüências GenBank, usando o algoritmo BLASTX, mostrou que a *TcGBP* apresenta grande similaridade com várias proteínas de eucariotos (> 62%) e também de procariotos (eubactérias > 59%, arqueobactérias > 40%) (QUADRO 3.1).

As proteínas eucarióticas homólogas da TcGBP possuem uma massa molecular conservada de aproximadamente 45 kDa, apresentam o domínio G na sua porção amino-terminal (FIGURA 3.2) e não têm função conhecida.

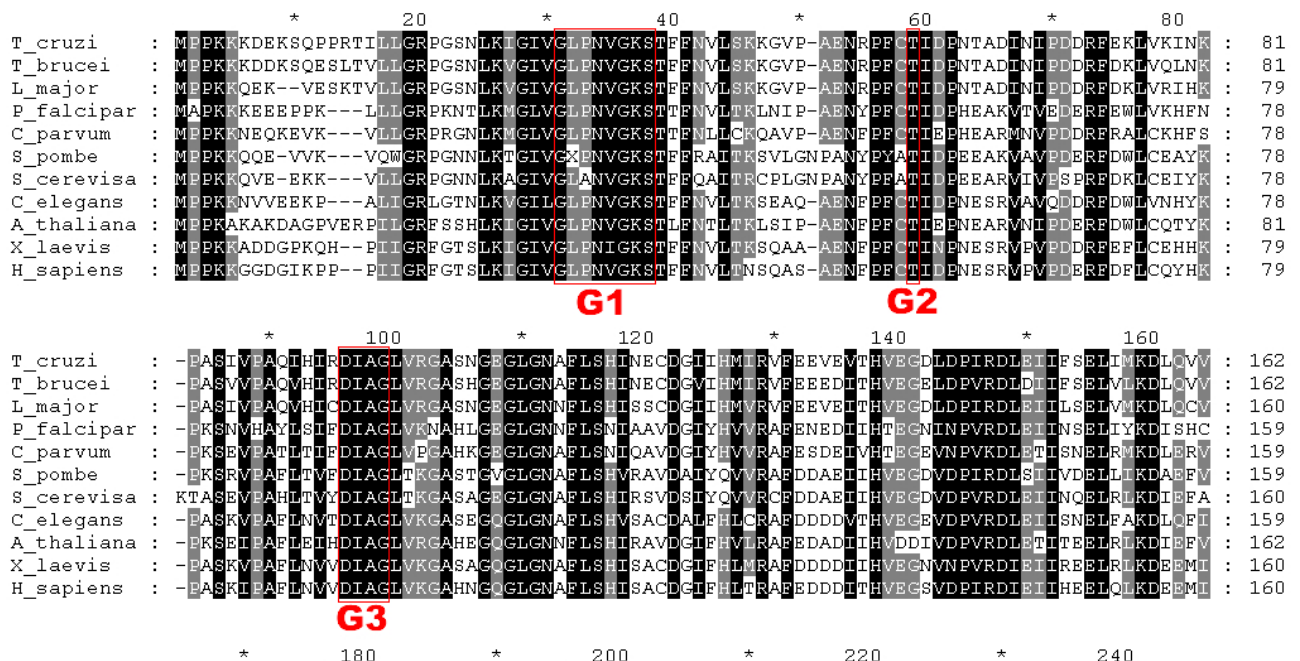
QUADRO 3.1 - SIMILARIDADE ENTRE A TcGBP E OUTRAS GTPASES.

| ORGANISMO | ANOTAÇÃO | % | ORGANISMO | ANOTAÇÃO | % |
|---|----------|----|---|----------|----|
| euk <i>Trypanosoma brucei</i> | | 94 | euk <i>Aspergillus nidulans</i> | | 63 |
| euk <i>Leishmania major</i> | pgbp | 90 | eub <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | GTP | 62 |
| euk <i>Xenopus laevis</i> | | 73 | eub <i>Clostridium perfringens</i> | pgbp | 62 |
| euk <i>Homo sapiens</i> | pgbp | 72 | eub <i>Clostridium tetani</i> | | 62 |
| euk <i>Mus Musculus</i> | | 72 | eub <i>Coxiella burnetii</i> | yehF | 62 |
| euk <i>Anopheles gambiae</i> | | 71 | euk <i>Neurospora crassa</i> | pgbp | 62 |
| euk <i>Drosophila melanogaster</i> | | 71 | eub <i>Bacillus anthracis</i> | yehF | 61 |
| euk <i>Rattus norvegicus</i> | | 71 | eub <i>Bacillus cereus</i> | yehF | 61 |
| euk <i>Arabidopsis thaliana</i> | pgbp | 70 | eub <i>Staphylococcus aureus</i> | | 61 |
| euk <i>Caenorhabditis briggsae</i> | | 70 | eub <i>Bacillus subtilis*</i> | yehF | 60 |
| euk <i>Caenorhabditis elegans</i> | GTP | 70 | eub <i>Escherichia coli</i> | yehF | 60 |
| euk <i>Capsicum annuum</i> | GTP | 70 | eub <i>Haemophilus influenzae*</i> | yehF | 60 |
| euk <i>Oriza sativa</i> | pgbp | 70 | eub <i>Nitrosomonas europaea</i> | Gtp1 | 60 |
| euk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | GTP | 69 | eub <i>Salmonella enterica</i> | A/GTP | 60 |
| euk <i>Cryptosporidium parvum</i> | rbd | 68 | eub <i>Xylella fastidiosa</i> | | 59 |
| euk <i>Plasmodium falciparum</i> | pgbp | 68 | arq <i>Halobacterium sp.</i> | GTP | 52 |
| euk <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> | GTP | 68 | arq <i>Ferroplasma acidarmanus</i> | ptf | 51 |
| euk <i>Schizosaccharomyces pombe*</i> | YBR025c | 67 | arq <i>Pyrobaculum aerophilum</i> | GTP | 51 |
| eub <i>Candida albicans</i> | | 66 | arq <i>Methanococcus jannaschii</i> | GTP1 | 46 |
| euk <i>Cryptococcus neoformans</i> | | 66 | arq <i>Nanoarchaeum equitans</i> | | 44 |
| eub <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> | | 65 | arq <i>Sulfolobus solfataricus</i> | GTP | 43 |
| eub <i>Clostridium acetobutylicum</i> | yehF | 64 | arq <i>Sulfolobus tokodaii</i> | pgbp | 42 |
| eub <i>Clostridium thermocellum</i> | ptf | 63 | arq <i>Methanococcus maripaludis</i> | | 40 |

FONTE: o autor.

LEGENDA: eub – Eubacterias; euk – Eucariota; arq – Arqueobactéria; * Proteína cristalizada; % Similaridade %; gtp - GTP-binding protein; rbd - yehF/YCHF TRASFAC/OBG family small GTPase plus RNA binding domain TGS; pgbp - Probable or hypothetical GTP-binding protein; ptf - probable translation factor; A/GTP - ATP/GTP-binding protein; GTP1 - GTP1/OBG family; YBR025c - ortólogo da YehF em *S. pombe*.

FIGURA 3.2 - ALINHAMENTO ENTRE A TcGBP E PROVÁVEIS ORTÓLOGOS EUCARIÓTICOS.



FONTE: o autor.

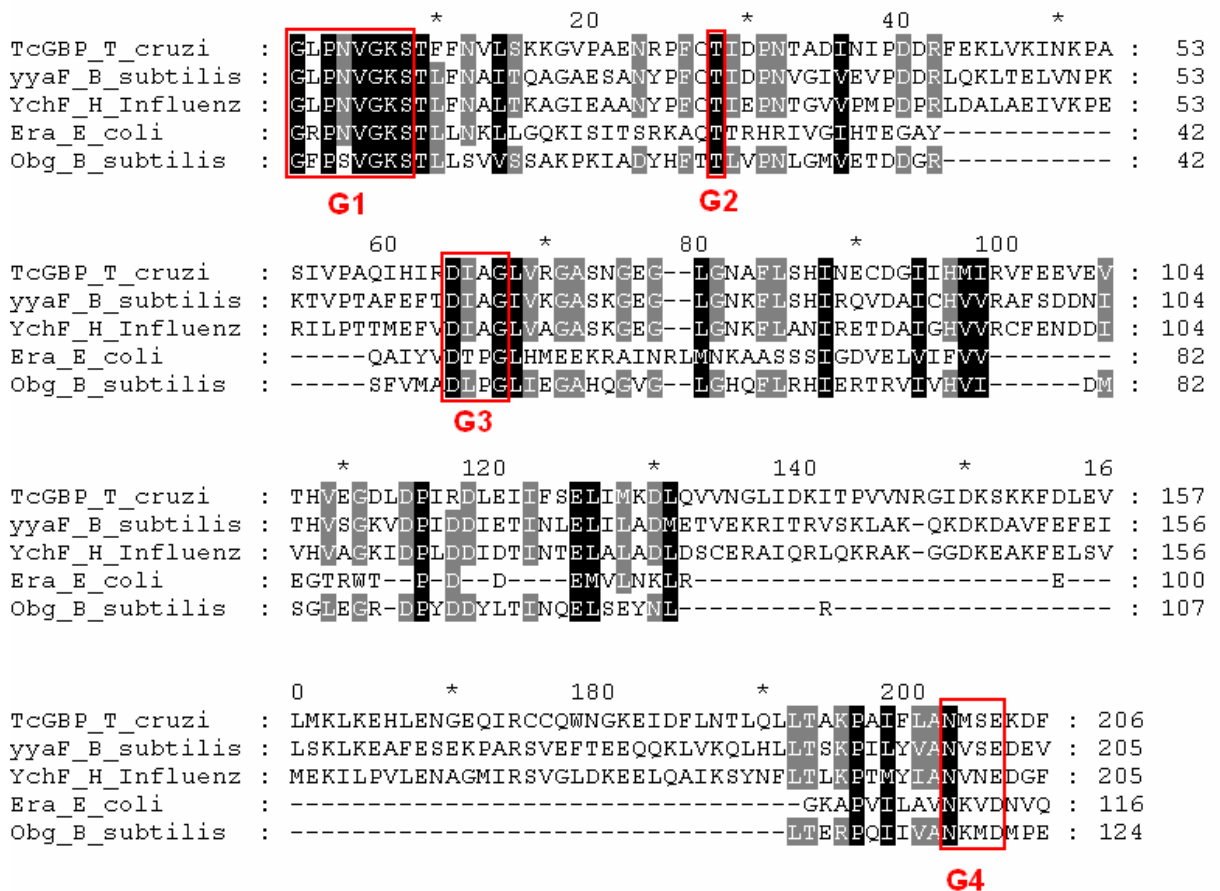
NOTA: Os aminoácidos conservados estão coloridos de preto (conservação em todas as proteínas) ou cinza (conservação na maioria das proteínas). Os motivos G1 a G4 estão indicados em retângulos vermelhos.

As proteínas de origem procariótica que apresentavam similaridade com a TcGBP são GTPases da subfamília YyaF/YchF, pertencentes à família Obg (Figura 3.3). A família Obg inclui ainda as subfamílias Obg, DRG, Ygr210 e NOG1 (LEIPE *et al.*, 2002). A função das GTPases YyaF/YchF ainda é desconhecida. Contudo, algumas proteínas da família Obg, incluindo a própria GTPase Obg, interagem com a maquinaria de tradução e podem ser fatores de tradução ainda não caracterizados (CALDON, YOONG, MARCH, 2001; LEIPE *et al.*, 2002).

Na figura 3.3 se pode observar que a homologia dessas proteínas está espalhada ao longo das seqüências e que elas apresentam os motivos característicos das *P-loop* GTPases. O motivo G4 do domínio G nessas proteínas é um pouco divergente daquele presente nas proteínas G da superfamília Ras (NKxD). Teplyakov e colegas (2003) determinaram a estrutura tridimensional da YchF de *H. influenzae* e mostraram que este é substituído, espacialmente, pelo motivo $_{207}NVNE_{210}$, onde os resíduos de asparagina (N_{207}) e glutamato (E_{210}), são conservados. Nesta mesma figura (3.3), pode-se observar que esse motivo se alinha ao motivo $_{230}NMSE_{233}$ da TcGBP.

O alinhamento entre o domínio G da TcGBP com aqueles das proteínas das subfamílias YyaH/YchF, Obg e ERA é mostrado na figura 3.4. A proteína ERA, uma *P-loop* GTPase, embora não faça parte da família Obg, foi adicionada ao alinhamento por sua capacidade de se ligar ao RNA ribossomal 16S e, portanto, atuar como possível fator de tradução bacteriano. A homologia entre TcGBP e ERA de *E. coli* é muito baixa, apenas 18%, quando comparada com as YchF das eubactérias (> 60%), porém, ainda é possível alinhar somente pelo domínio G.

Embora o domínio G seja estruturalmente invariante, a seqüência de aminoácidos desse domínio é extremamente diversa, excetuando-se ilhas de aminoácidos bem conservados que incluem os 4 motivos do domínio (G1 a G4). O espaçamento entre os motivos conservados também é uma característica vantajosa para a definição das subfamílias dessas GTPases. Por exemplo, a proteína Obg apresenta o



FONTE: o autor.

NOTA: Os aminoácidos conservados estão coloridos de preto (conservação em todas as proteínas) ou cinza (conservação na maioria das proteínas). Os motivos G1 a G4 estão indicados em retângulos vermelhos.

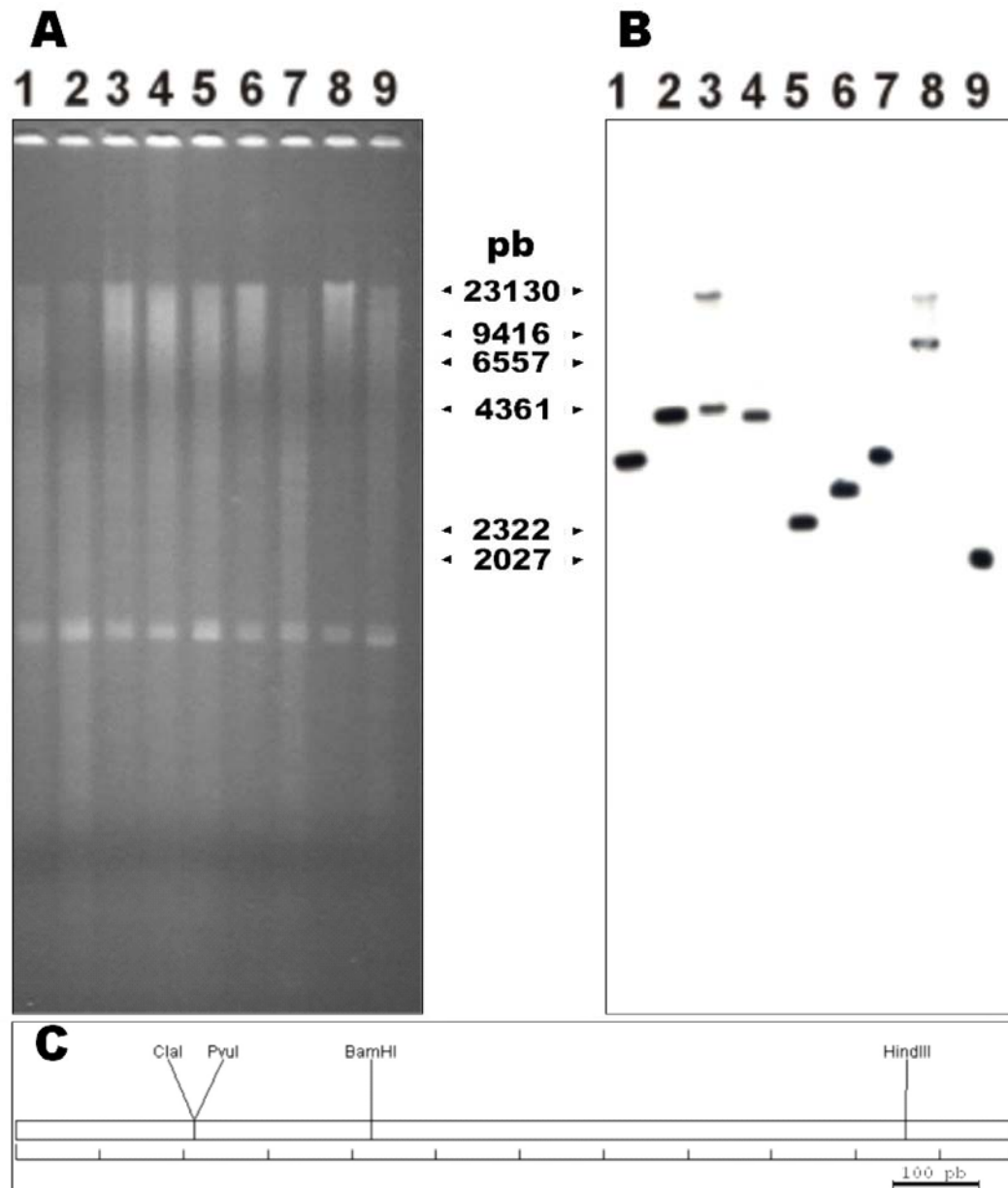
3.3 ANÁLISE DO GENE TcGBP NO GENOMA DO *Trypanosoma cruzi* Dm28c POR SOUTHERN BLOT

A análise do DNA genômico de *T. cruzi* por *Southern blot*, usando como sonda radioativa um fragmento de DNA contendo a região codante do gene *TcGBP* (aprox. 1,2 kb), sugere que este gene possui apenas uma cópia no genoma do parasita

(FIGURA 3.5). Isso pode ser evidenciado não apenas pelo padrão relativamente simples de bandas no auto-radiograma, como, também, pela identidade dos tamanhos dos fragmentos de restrição esperados, que deveriam ser reconhecido pela sonda, com aqueles efetivamente observados no auto-radiograma. Dessa maneira, o mapa de restrição do gene *TcGBP* mostra que as enzimas *Bam*HI, *Hind*III, *Cla*I e *Pvu*I cortam apenas uma vez dentro da região codificante desse gene e que, portanto, a sonda radioativa representada pela região codificante do gene *TcGBP* deve reconhecer no *Southern blot* do DNA genômico do *T. cruzi* duas bandas, com intensidades variáveis, caso o sítio de restrição seja assimétrico em relação à seqüência da sonda.

De fato, podemos observar claramente os perfis esperados quando analisamos a hibridização da sonda para as digestões com *Bam*HI e *Hind*III. As digestões com *Cla*I e *Pvu*I apresentam apenas uma banda no auto-radiograma. Uma explicação para isso é a possível presença de sítios *Cla*I e *Pvu*I próximos do início da região codificante do gene *TcGBP*, gerando um fragmento muito pequeno e que não pode ser detectado no autoradiograma, durante o tempo de exposição ao filme de raios-X. Outra indicação de que o gene *TcGBP* é de cópia única é que o perfil de bandas no autoradiograma para digestões com enzimas de restrição que cortam fora da região codificante é também muito simples (2 a 4 kb). Considerando-se que gene *TcGBP* tem uma região codificante de 1,2 kb, esses fragmentos identificados pela sonda devem comportar a presença de, no máximo, 2 cópias desse gene (sendo um pertencente a cada alelo).

FIGURA 3.5 - ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DO GENE *TcGBP* POR ENSAIO DO TIPO SOUTHERN BLOT.



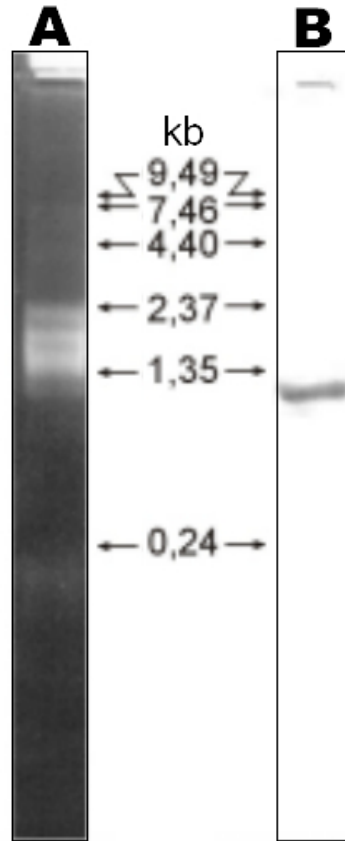
FONTE: o autor.

NOTA: **A**) Gel de agarose mostrando o perfil eletroforético do DNA genômico de *T. cruzi* digerido com as enzimas *Ava*I (1), *Ava*II (2), *Bam*HI (3), *Cla*I (4), *Dra*I (5), *Hind*III (6), *Pst*I (7), *Pvu*I (8), *Ssp*I (9). Após a eletroforese, o DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado com o fragmento contendo a região codificante do gene *TcGBP* marcado radioativamente. O resultado da hibridização é mostrado no autoradiograma em **B**; **C**) Localização das enzimas que possuem sítios únicos dentro da ORF do gene *TcGBP*.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *TcGBP* POR NORTHERN BLOT

A análise da expressão do gene *TcGBP* por *northern blot*, usando RNA total obtido das formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c, mostrou que esse gene codifica um RNA 1,3 Kb compatível com a soma dos tamanhos de sua região codificante (1,2 kb) e das regiões 5'-UTR (33 pb) e 3'-UTR (94 pb), obtidas por PCR (FIGURA 3.6).

FIGURA 3.6 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *TcGBP* POR ENSAIO DO TIPO *NORTHERN BLOT*.



FONTE: o autor.

NOTA: **A)** Gel de agarose/Formaldeído mostrando o perfil eletroforético do RNA total das formas epimastigotas de *T. cruzi*, onde se observa mais claramente as bandas dos RNAs ribossomais

B) Autoradiograma mostrando o resultado da hibridização da sonda radioativa (ORF do gene *TcGBP*) com o RNA total das formas epimastigotas resolvido em gel de agarose/formaldeído.

3.5 EXPRESSÃO DO GENE *TcGBP* EM *Escherichia coli* E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

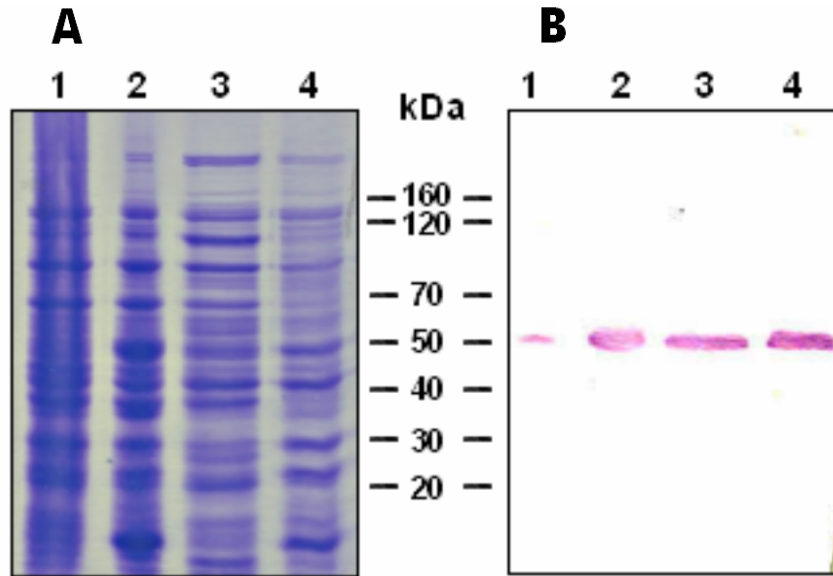
O gene *TcGBP* foi expresso em *E. coli* ao partir do plasmídeo pTrcHis-TOPO (Invitrogen). A indução da expressão do gene foi feita pela adição de IPTG à cultura (cultura induzida). Uma cultura do clone recombinante sem adição de IPTG (cultura não induzida) foi utilizada como controle negativo. Extratos protéicos preparados a partir das culturas, induzida e não induzida, foram analisados em SDS-PAGE, a fim de se identificar a banda da *TcGBP* recombinante. Deve-se salientar que no plasmídeo

pTrcHis-TOPO, o gene de interesse é clonado em fase com uma região do plasmídeo que codifica um polipeptídeo de 3,8 kDa (item 2.5.13, figura 2.1, p. 35 em materiais e métodos) e que contém, na sua porção amino-terminal, a etiqueta de 6 resíduos de histidina.

Assim, a expressão do gene *TcGBP* em *E. coli*, a partir do plasmídeo pTrcHis-TOPO, deve produzir uma proteína de aproximadamente 48 kDa. Podemos observar que no perfil eletroforético do extrato da cultura induzida com IPTG (canaleta 2 da figura 3.7-A) é possível notar a superexpressão de um polipeptídeo de tamanho compatível com aquele calculado de 48 kDa e que não está visível no perfil do extrato da cultura não induzida (canaleta 1 da figura 3.7-A).

A análise por *western blot* mostra que apenas esse polipeptídeo reage contra o monoclonal anti-polihistidina (canaleta 2 da figura 3.7-B), indicando que essa proteína contém a etiqueta de 6 resíduos de histidina, como esperado. Observa-se, também, que o monoclonal detecta uma banda no extrato não induzido, do mesmo tamanho da banda da proteína induzida (canaleta 1 da figura 3.7-B). Isso provavelmente se deve à expressão basal do gene *TcGBP*, mesmo na ausência do indutor IPTG, resultado que é muito comum nesse tipo de sistema de expressão indutível, embora muitas vezes indesejável.

Testamos também a solubilidade da TcGBP recombinante. Para tanto, uma cultura do clone recombinante induzida com IPTG foi lisada por sonicação. O lisado foi então centrifugado. O sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) obtidos da centrifugação foram analisados por SDS-PAGE e por *western blot*. Como pode ser observado nas canaletas 3 e 4 da figura 3.7-A, a proteína está mais enriquecida na fração insolúvel (canaleta 4). Embora a TcGBP recombinante não seja muito visível na fração solúvel, ela pode ser detectada nessa fração por *western blot* usando o monoclonal anti-polihistidina (canaleta C da figura 3.7-B). De fato, obtivemos um maior enriquecimento da proteína recombinante na fração solúvel quando reduzimos a temperatura de incubação, após a adição de IPTG, de 37 °C para 28 °C, o que facilitou sua purificação por cromatografia em resina de Níquel-NTA.

FIGURA 3.7 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcGBP EM *E. coli*.

FONTE: o autor.

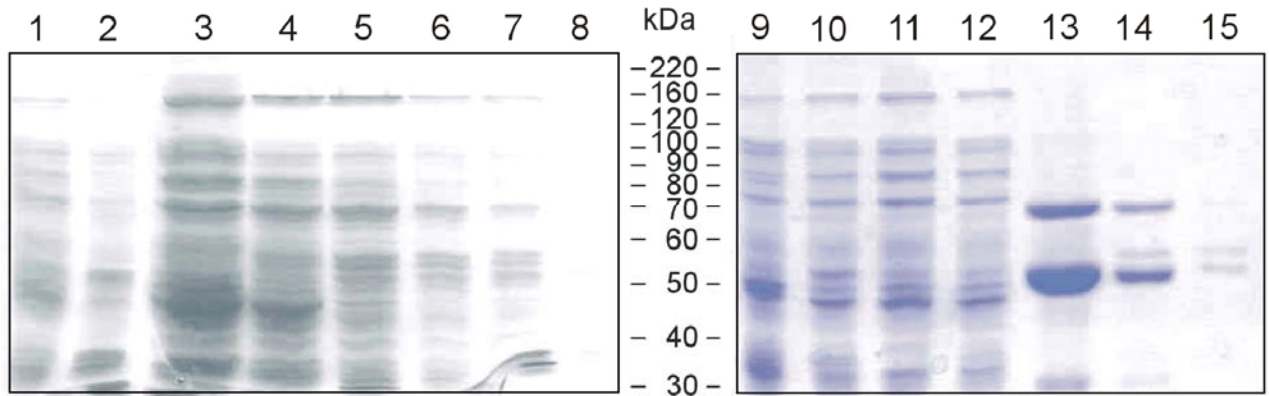
NOTA: **A)** SDS-PAGE com o perfil dos extratos de um clone recombinante de *E. coli*, não induzido (1) e induzido com IPTG (2), bem como as frações do sobrenadante (3) e sedimento (4) obtidas após a centrifugação do lisado de um clone recombinante induzido com IPTG.

B) Análise por *western blot* dos perfis mostrados em **A**, usando o monoclonal anti-poli-histidina.

Usando essa estratégia, fomos capazes de obter até 4 mg de proteína recombinante por 100 ml de cultura após a purificação cromatográfica. Na figura 3.8 (canaletas 13 a 15) podemos observar os perfis eletroforéticos em SDS-PAGE das diferentes etapas da purificação da TcGBP recombinante em resina de Níquel-NTA.

Podemos observar que a TcGBP, embora bem visível na fração do material eluído da resina com imidazol, não está totalmente pura. Algumas proteínas de *E. coli* ainda podem ser visualizadas no gel de poliacrilamida corado com *coomassie blue*. Particularmente, uma delas, com massa molecular aparente de 70 kDa, chamou nossa atenção porque co-purifica com a TcGBP, indicando que pode haver uma interação específica entre elas.

FIGURA 3.8 - GÉIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE 10 % MOSTRANDO TODAS AS AMOSTRAS RECOLHIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TcGBP.



FONTE: o autor.

NOTA: 1 e 10 EXTRATO TOTAL PÓS-SONICAÇÃO, 2 SEDIMENTO, 3 A 7 SOLUÇÃO PÓS LAVAGEM DA COLUNA, 8 SOLUÇÃO DE LAVAGEM APÓS 60 ML, 9 EXTRATO NÃO INDUZIDO, 11 SOBRENADANTE, 12 SOLUÇÃO DO EXTRATO NÃO LIGADO A COLUNA Ni-NTA, 13 A 15 ELUIÇÕES DE 1,5 ML CADA.

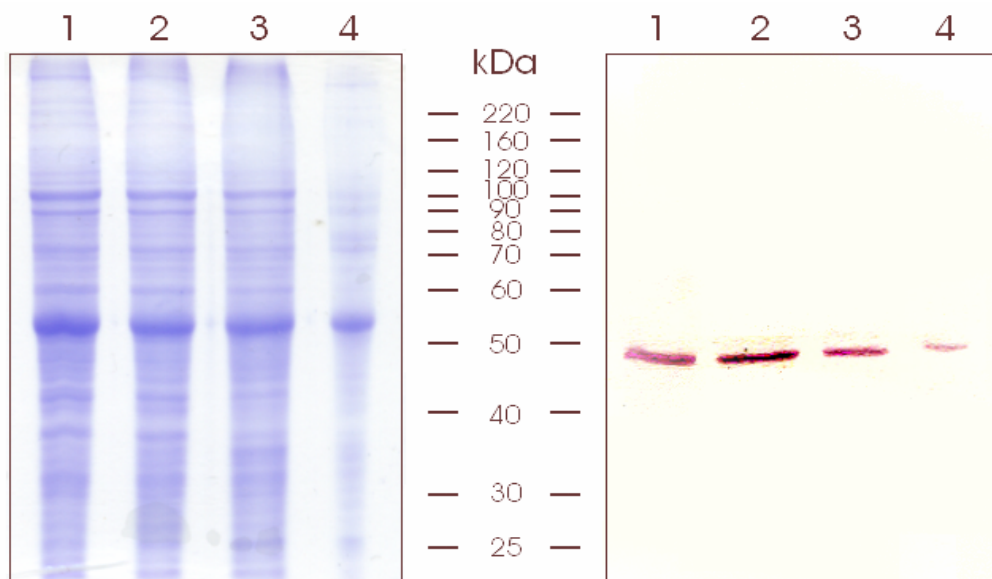
A identificação dessa proteína de *E. coli* poderia, portanto, permitir que, por associação, inferíssemos uma função para a TcGBP em *T. cruzi*. A proteína de 70 kDa foi enviada para o seqüenciamento da sua porção amino-terminal por reação de Edman, no laboratório de Proteômica do Departamento de Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz. A seqüência amino-terminal encontrada foi XGIVGAIQRXVAEILLEG e identificada como sendo parte da enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase de *E. coli* (66,9 kDa). Essa enzima cataliza a síntese de glucosamina-6-fosfato a partir de frutose-6-fosfato e glucosamina, que por sua vez está envolvida com a formação de UDP-N-acetilglucosamina, o principal intermediário na biosíntese de açúcares aminados na célula. Entretanto, não fomos capazes de estabelecer qualquer associação entre a via metabólica onde atua a enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase e a função predita para a TcGBP.

3.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcGBP EM *T. cruzi*

Os antisoros policlonais anti-TcGBP obtidos de camundongo e coelho foram utilizados para detectar por *western blot* a presença da proteína em extratos celulares de *T. cruzi*, obtidos a partir do processo de metaciclogênese desse parasita *in vitro*.

Durante esse processo, quatro estágios do parasita foram analisados: (1) epimastigotas cultivados em meio LIT, (2) epimastigotas submetidos ao estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, (3) epimastigotas aderidos por 24 horas (epimastigotas em diferenciação) em meio TAU3AAG e (4) tripomastigotas metacíclicos em meio TAU3AAG. Em todos os extratos de *T. cruzi* testados, os anti-soros reconhecem especificamente uma proteína de aproximadamente 45 kDa, compatível com o tamanho esperado da TcGBP (figura 3.9). Esse resultado indica que a TcGBP é expressa constitutivamente ao longo do processo de metaciclogênese do *T. cruzi*.

FIGURA 3.9 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA TcGBP POR WESTERN BLOT EM EXTRATOS DE *T. cruzi*.



FONTE: o autor.

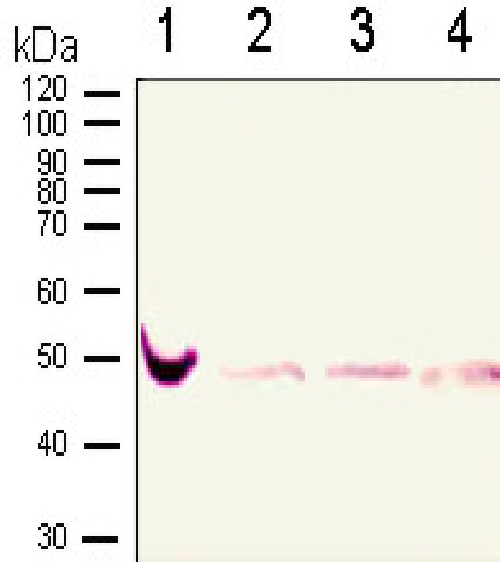
NOTA: **A)** SDS-PAGE de extratos protéicos de epimastigotas (1), epimastigotas submetidos ao estresse nutricional (2), epimastigotas aderidos (parasitas em diferenciação) (3) e tripomastigotas metacíclicos (4). Os extratos foram normalizados em relação ao número de parasitas (1×10^7).

B) Análise por *western blot* dos extratos mostrados em **A**. Após a eletroforese, os extratos foram transferidos para membrana de nitrocelulose e reagidos contra o soro anti-TcGBP.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DA TCGBP EM FRAÇÕES POLISSOMAS DE *T. cruzi*

A TcGBP compartilha grande homologia com GTPases da família Obg. Membros dessa família de GTPases são encontrados em associação com ribossomos. Com base nesses fatos, resolvemos investigar a possibilidade da TcGBP também estar associada com a maquinaria de tradução em *T. cruzi*. Para tanto, analisamos inicialmente a presença da TcGBP nas frações polissomais de diferentes estágios do parasita obtidos do processo de metaciclogênese *in vitro*. *Western blot* usando o anti-soro anti-TcGBP mostrou de fato que a TcGBP está presente nas frações polissomais de todos os estágios do *T. cruzi* testados (Figura 3.10), sugerindo que essa proteína possa se tratar de um fator traducional. Contudo, por se tratar da fração polissomal obtida apenas por ultracentrifugação da fração citosólica do parasita em colchão de sacarose 2M, ainda podemos ter, mesmo que improvavelmente, a presença de proteínas citosólicas como contaminantes no sedimento contendo os polissomos.

FIGURA 3.10 -IDENTIFICAÇÃO DA TcGBP EM FRAÇÕES POLISSOMAS de *T. cruzi* POR WESTERN BLOT.



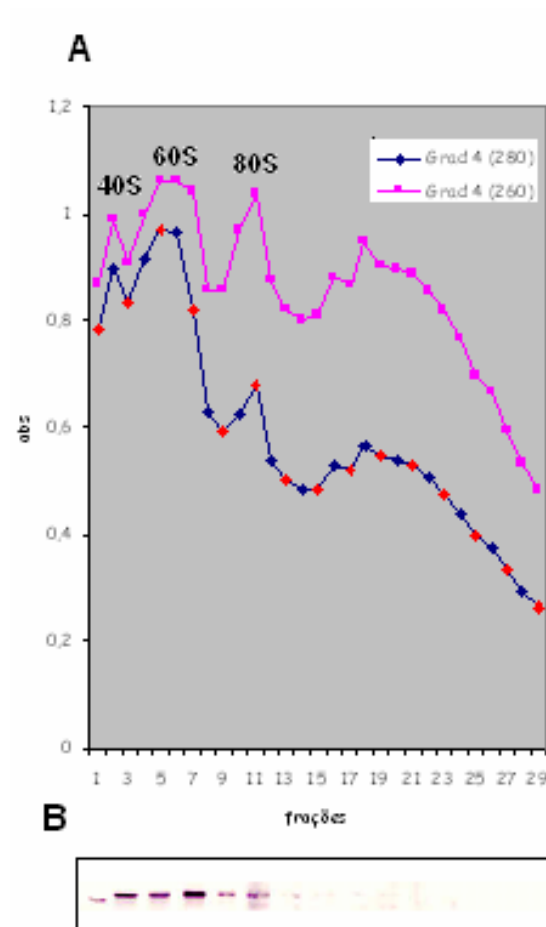
FONTE: o autor.

NOTA: 1) Extrato total de epimastigota, 2) fração polissomal de epimastigota, 3) fração polissomal de epimastigota em ao estresse nutricional 4) fração polissomal de epimastigota aderido 24 h.

Portanto, a associação da TcGBP com ribossomos foi investigada com o fracionamento dos polissomos em gradiente de sacarose (Figura 3.11-A). Análise por *western blot* das frações do gradiente mostra que a TcGBP está presente principalmente nas frações que formam o

pico de 60S (Figura 3.11-B), embora também seja visível nas frações de 40S e 80S, sugerindo fortemente que a TcGBP é um fator traducional. A fração polissomal de tripomastigotas metacíclicos não foram analisadas pela grande dificuldade em se obter polissomos desse estágio do parasita.

FIGURA 3.11 -PERFIL DO FRACIONAMENTO DE POLISOMOS E ANÁLISE DESTAS FRAÇÕES POR *WESTERN BLOT*.



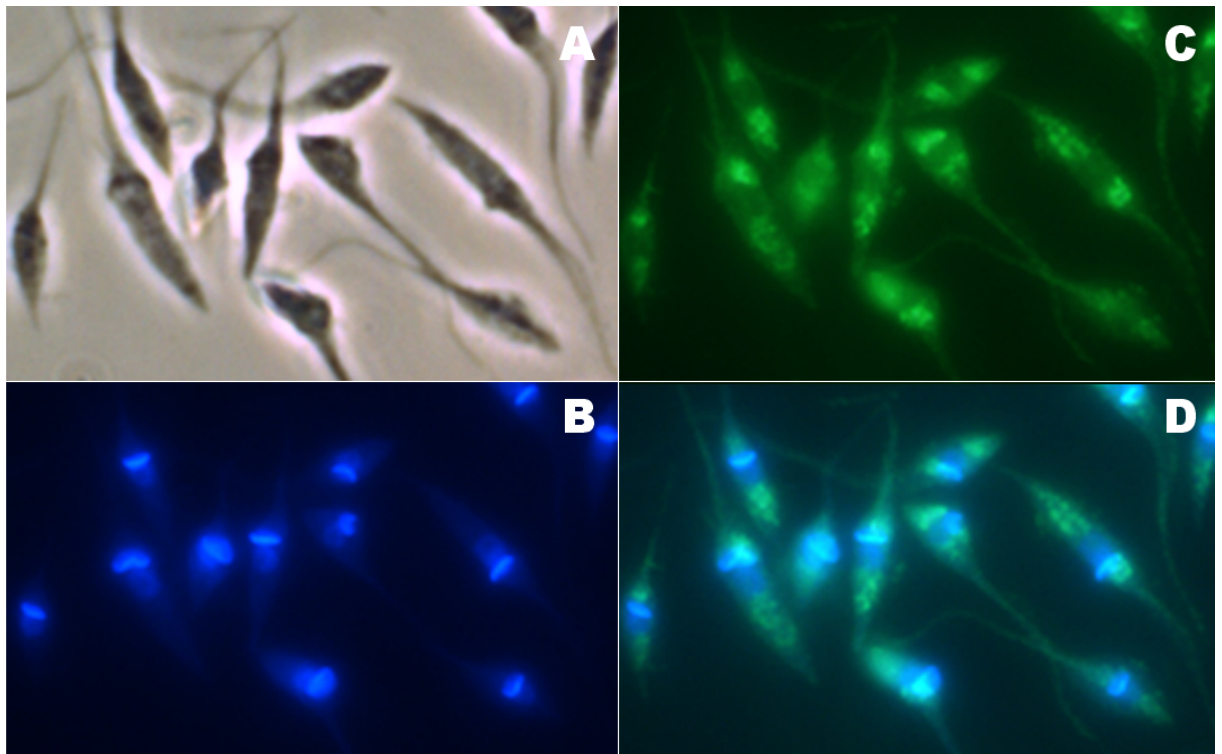
FONTE: o autor.

NOTA: (A) Perfil do fracionamento de polissomos de *T. cruzi* em gradiente de sacarose. Linha azul corresponde a medida da absorbância a 280 nm (proteínas) e a linha rosa corresponde a medida da absorbância a 260 nm (RNA). Os picos representando as subunidades 40S e 60S, bem como os monossomos (80S) estão indicados. (B) As proteínas das frações ímpares do gradiente foram precipitadas e analisadas por *western blot* usando o anticorpo anti-TcGBP.

3.8 LOCALIZAÇÃO DA TCGBP EM *Trypanosoma cruzi* POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA

O anti-soro anti-TcGBP obtido em coelho foi usado em ensaios de imunofluorescência indireta a fim de detectarmos o sítio de atuação da TcGBP no *T. cruzi*. Podemos notar que a fluorescência está bem concentrada em duas regiões do parasita (anterior e posterior) (Figura 3.12-C), excetuando-se o núcleo e o cinetoplasto, que não fluorescem. Vale ressaltar que a região anterior do *T. cruzi* (próxima ao flagelo) é uma região de intensa atividade de síntese protéica, secreção e endocitose em tripanossomatídeos (McCONVILLE *et al.*, 2002) e onde fatores de tradução certamente estão atuando. Mais uma vez, esse dado sugere uma função ligada à maquinaria de tradução para a TcGBP.

FIGURA 3.12 - IMUNOLocalização da TcGBP em epimastigotas de *T. cruzi*.



FONTE: o autor.

NOTA: Epimastigotas de *T. cruzi* foram incubados com antisoro anti-TcGBP, desenvolvido em coelho. A localização da proteína foi evidenciada pela utilização de anticorpos anti-IgG de coelho marcados com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (C). O núcleo e o cinetoplasto dos parasitas foram corados com DAPI (B). Uma sobreposição das imagens B e C é mostrada em D). em (A) temos a imagem dos parasitas obtidas por microscopia de contraste de fase.

4 DISCUSSÃO

Proteínas que ligam e hidrolisam GTP (GTPases) são cruciais em quase todos os aspectos da biologia dos seres vivos. Uma classe importante de GTPases são aquelas que apresentam em sua estrutura um domínio conhecido como *P-loop* (*P-loop* GTPases). O *P-loop* é caracterizado pelo motivo Walker A (GxxxxGK[S/T]), cuja função é posicionar corretamente o grupamento trifosfato do nucleotídeo à proteína (BOURNE *et al.*, 1990). Outro domínio importante é aquele que confere especificidade à base nitrogenada guanina do nucleotídeo, representado pela seqüência NKxD (BOURNE *et al.*, 1990). É importante salientar que as diversas GTPases apresentam tamanhos bem distintos e sua relação evolutiva se faz apenas com relação aos domínios que caracterizam as GTPases.

Nós caracterizamos uma nova GTPase em *T. cruzi*, que denominamos de TcGBP. A proteína TcGBP apresenta homologia com proteínas da subfamília das GTPases YyaF/YchF e que, por sua vez, pertencem à grande família das GTPases Obgs. A homologia da TcGBP com proteínas homólogas eucarióticas está entre 62 a 94%. A conservação de seqüência entre a TcGBP e seus homólogos procarióticos é também bastante significativa e está entre 40 a 65%.

Com base nas características estruturais e de seqüência, estas proteínas (YyaF/YchF/Obg) estão incluídas na classe TRAFAC (*Translation Factors-related*) das GTPases, que incluem os fatores de tradução universais e reino-específicos, as proteínas G heterotriméricas, a extensa família Ras, as septinas, as dinaminas e algumas ATPases, tais como a kinesina e a miosina (LEIPE *et al.*, 2002). Uma característica estrutural das TRAFAC GTPases é a presença de um resíduo de treonina conservado entre os motivos Walker A (G1) e Walker B (G3) (DxxG). Esse resíduo interage com o Mg^{+2} , que é necessário para a hidrólise do nucleotídeo GTP. Esse resíduo na TcGBP é observado na posição ${}_{57}CTI_{59}$, quando do alinhamento dessa proteína com outros membros da grande família Obg.

A grande família Obg consiste de cinco subfamílias bem delimitadas e antigas, a saber: Obg, DRG, YyaF/YchF, Ygr210 e NOG1. Quatro desses grupos (Obg, DRG, YyaF/YchF e Ygr210) são caracterizados por um motivo rico em glicina (GAXxGxGxGxxxI, onde I é um resíduo de aminoácido alifático I, L ou V) (LEIPE *et al.*, 2002), situado imediatamente ao motivo Walker B (DxxG). Esse motivo pode ser encontrado na TcGBP na posição ₁₀₁GASNGEGLGNAFL₁₁₃, mais uma vez indicamos que TcGBP é membro dessa família.

A proteína Obg de *B. subtilis* e seu homólogo CgtA em *Caulobacter crescentus* são codificadas por genes essenciais e estão envolvidas na iniciação da esporulação e da replicação do DNA, contudo, sua exata função molecular ainda permanece obscura. A obg de *Bacillus subtilis* é necessária para a ativação do fator de transcrição σ^B , em condições de estresse (SCOTT; HALDENWANG, 1999) e também foi encontrada associada com a subunidade ribossomal 50S, o equivalente procarioto da subunidade ribossomal 60S eucariótica (SCOTT *et al.*, 2000). Homólogos da Obg foram encontrados em outros procariotos e alguns deles estão envolvidos com diferenciação morfológica (VIDWANS *et al.*, 1995, OKAMOTO *et al.*, 1997, OKAMOTO *et al.*, 1998).

Da família das Obgs, apenas outra proteína, a NOG1, foi caracterizada em tripanossomatídeos, mais precisamente em *T. brucei*. A NOG1 de *T. brucei* tem uma massa molecular de 75 kDa e está associada com o nucléolo (PARK *et al.*, 2001). Estudos de RNA interferência mostram que a ausência de NOG1 causa defeitos na biogênese da subunidade ribossomal 60S. De fato, NOG1 é encontrada associada a essa subunidade quando os polissomos são submetidos ao fracionamento em gradiente de sacarose (JENSEN *et al.*, 2003). NOG1 e DRF são encontradas exclusivamente em Arqueobactérias e Eucariotos.

Muito pouco se conhece sobre a função da proteína YchF, o que é surpreendente, pois ortólogos dessas proteínas estão presentes nos três grandes reinos: Arqueobactérias, Eubactérias e Eucariotos. YchF é ainda uma das onze GTPases universalmente conservadas (CALDON *et al.*, 2001). A YchF e seus ortólogos eucarióticos mostram também uma notável conservação de seqüência, como podemos

observar pelo alinhamento múltiplo da figuras 3.2 e 3.3. Esse dado, associado com a distribuição ubíqua dessa família, é compatível com a hipótese de que essas proteínas evoluíram a partir de um ancestral presente muito antes da divisão dos três grandes reinos (LEIPE *et al.*, 2002).

Recentemente foi mostrado que o gene *ychF* é co-transcrito com o gene *pth* em *E. coli* (CRUZ-VERA *et al.*, 2002). O gene *pth* codifica a peptidil-tRNA hidrolase, uma enzima que cliva o peptidil tRNA que foi liberado abortivamente do ribossomo durante a síntese protéica. Outro dado interessante é que a organização desse *operon* é mantida em vários genomas bacterianos (CALDON; MARCH, 2003), o que liga, embora de maneira indireta, a proteína YchF com a regulação da síntese protéica e a função do ribossomo.

O fato de alguns membros da superfamília Obg interagirem com as subunidades ribossomais e possuírem o domínio TGS, observado em algumas proteínas que se ligam à RNA (WOLF *et al.*, 1999), sugere que essas GTPases são fatores de tradução, cujas funções específicas ainda precisam ser melhor caracterizadas.

Outra indicação de que as YchF estão envolvidas com o processo de tradução vem da caracterização de complexos multiprotéicos em *S. cerevisiae* (GAVIN *et al.*, 2002), no qual se mostrou, usando a técnica *Tandem-Affinity Purification* (TAP), que o homólogo da YchF, YBR025c, interage com o fator de alongação eEF1.

Considerando o que foi exposto acima, associado ao fato de nossas análises preliminares mostrarem que TcGBP também está associada com os ribossomos, acreditamos que TcGBP trata-se de um novo fator de tradução em *T. cruzi*, da família das GTPases YchF.

Algumas GTPases não apresentam uma estrita conservação do motivo NKxD, o que resulta em uma perda ou diminuição da especificidade pelo GTP, como observado por exemplo na miosina e kinesina. Isto também pode ser notado na seqüência das YchF. A estrutura cristalina da YchF de *Haemophilus influenzae* (TEPLYAKOV *et al.*, 2003) e *Schizosaccharomyces pombe* [não publicada, mas depositada no banco de dados de proteínas (Protein Data Bank, PDB) sob o número de

acesso 1NI3] foram determinadas. Como já salientado, o motivo G4 do domínio G dessas proteínas é um pouco divergente daquele presente nas proteínas G da superfamília Ras (NKxD), o que levantava questões sobre a especificidade dessa proteína para o GTP. Teplyakov e colegas (2003) mostraram que este motivo é substituído, espacialmente pelo motivo $_{207}NVNE_{210}$, onde o resíduo de glutamato (E) substitui o aspartato (D) presente no motivo NKxD e, junto com o resíduo de asparagina (N), posiciona-se para interagir os grupamentos amino da guanina. Por meio do alinhamento da seqüência da TcGBP com as proteínas YchF cristalizadas de *H. influenzae* e *S. pombe*, podemos observar que esse motivo corresponde aos aminoácidos $_{230}NMSE_{233}$ na proteína de *T. cruzi* e $_{232}NMSE_{235}$ na proteína de *S. pombe*. Nas três proteínas, os resíduos invariantes desse motivo são, portanto, a asparagina (N) e o ácido glutâmico (E).

Tentativas para se obter cristais da YchF de *H. influenzae* complexada com GTP ou GDP não obtiveram êxito. Uma possível explicação é que as mudanças conformacionais que acompanham a ligação do nucleotídeo são inconsistentes com a forma do cristal obtido (TEPLAYAKOV *et al.*, 2003). Contudo, a ligação de GTP pela YchF de *H. influenzae* pode ser observada pela medição da fluorescência do GTP marcado com TNP (2'[3']-O-[2,4,6-trinitrofenil]).

Além da interação com o GTP, outro parâmetro cinético importante para classificar as GTPases é a velocidade intrínseca de hidrólise do GTP. Isso pode ser bem observado nas proteínas G tipo-Ras, cuja velocidade de hidrólise do GTP é baixa (SPRANG, 1997). Estudos com a proteína H-ras p21 sugerem um papel chave de um resíduo de glutamina (Gln61) na ativação de uma molécula de água para o ataque nucleofílico ao fosfato γ do GTP (PAI *et al.*, 1990). Na proteína p21, o resíduo Gln61 está localizado imediatamente após o motivo Walker B (DIAG). Observou-se que a substituição da Gln61 por Glu (mutante Q61E) gerava uma proteína com uma taxa de hidrólise de GTP vinte vezes maior do que a proteína nativa, enquanto que a substituição da Gln61 por outros aminoácidos reduzia a atividade de GTPase (DER *et al.*, 1986; FRECH *et al.*, 1994). Enquanto que o resíduo de glutamina é conservado nas proteínas da superfamília Ras, o mesmo não ocorre, por exemplo, para os fatores de

tradução, no quais essa posição é ocupada por um resíduo de histidina. Isso coincide com a baixa atividade de GTPase que é observada para esses fatores. Em outros membros da classe TRAFAC de GTPases, a posição imediatamente após o motivo Walker B é ocupada por resíduos hidrofóbicos. Nas YchF até agora analisadas, aparece um resíduo de leucina conservado nessa posição (Leu98 na TcGBP e Leu76 na YchF de *H. influenzae*). Dados de cristalografia da YchF de *H. influenzae* mostram que a estrutura da proteína não indica nenhum outro resíduo alternativo que possa atuar como base na catálise do GTP (TEPLYAKOV *et al.*, 2003). Desse modo, parece provável que as proteínas da família YchF, juntamente com outros membros da superfamília Obg, funcionam não como GTPases ativas, mas como sensores dos níveis relativos de GTP e GDP na célula. Aparentemente eles não requerem atividade extrínseca para fazer a reciclagem entre os diferentes estados, como ocorre com as pequenas proteínas G eucarióticas, que necessitam de fatores tais como GAPs e GEFs.

A hipótese de GTPases atuando como sensores é corroborada pelos dados sobre a GTPase NOG1 de *T. brucei*. NOG1 é uma proteína nucleolar e interage com o ribossomo nascente. Observou-se que a remoção de GTP não libera NOG1 da partícula ribossomal (JENSEN *et al.*, 2003). Por sua afinidade por GTP, pequena o suficiente para impedir a rápida substituição deste por GDP e a sua reduzida velocidade de hidrólise do GTP e sua baixa afinidade por GDP, acredita-se que uma das funções de NOG1 é sentir o nível de GTP intracelular e regular a biogênese ribossomal. Especula-se que NOG1, uma vez ligada ao GTP, poderia ser capaz de recrutar ou remodelar proteína(s) para atuar na biogênese do ribossomo, enquanto que a forma ligada ao GDP não poderia executar tal função (JENSEN *et al.*, 2003).

A possibilidade das proteínas do tipo YchF também atuar como sensores, tal como a NOG1, abre uma perspectiva muito interessante para o estudo da TcGBP como fator de regulação da expressão gênica ao nível da tradução em *T. cruzi*, modulada pelos níveis de GTP intracelulares. Os eventos moleculares do processo de tradução dos tripanossomatídeos em geral têm recentemente recebido mais destaque, visto que a regulação de vários genes, cuja expressão é estágio-específica, se dá ao nível da tradução (BOUCHER *et al.*, 2002) e não apenas pela estabilidade do RNA transcrito,

como geralmente ocorre nesses parasitas (CLAYTON, 2002). Temos observado que alguns mRNAs de *T. cruzi*, embora presentes em vários estágios do ciclo de vida do parasita, estão, dependendo do estágio, mobilizados diferencialmente para a fração dos RNAs polissomais (ÁVILA *et al.*, 2001; ÁVILA *et al.*, 2003; YAMADA-OGATTA *et al.*, 2004; FRAGOSO *et al.*, 2003; DALLAGIOVANA *et al.*, 2001; KRIEGER *et al.*, submetido), sugerindo que a associação de proteínas ligadas aos mRNAs com maquinaria de tradução desempenha um papel chave na regulação da expressão gênica estágio-específica.

A natureza dessa associação ainda não é conhecida, ou seja, não se sabe se ela é feita entre as proteínas ligadas ao RNA com o ribossomo diretamente ou se envolve a participação de outras proteínas, interligando os fatores específicos associados aos mRNAs e os ribossomos. Será interessante verificar se GTPases, tais como NOG1 e TcGBP são capazes de interagir com esses fatores transcricionais, recrutando-os e/ou modulando suas atividades.

Temos estudado o processo de diferenciação de *T. cruzi*, do estágio de epimastigotas para estágio de tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988). Nesse processo, ocorrem tanto alterações morfológicas como mudanças no padrão da expressão gênica do parasita. Observamos que a proteína TcGBP está presente em todos os estágios analisados ao longo da metaciclogênese (epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional por 2 horas, epimastigotas aderidos e tripomastigotas metacíclicos), em níveis relativamente equivalentes. Isso indica que a expressão do gene TcGBP sofre pouca ou nenhuma regulação. Não sabemos, no entanto, se a TcGBP está associada aos ribossomos ou às suas subunidades individuais em todos os estágios. Sabemos, contudo, que o tripomastigota metacíclico do *T. cruzi* é um estágio transcricionalmente reprimido (ELIAS *et al.*, 2001) e que, possivelmente, a maturação do RNA ribossomal 18S não ocorra nessa forma, pela ausência de proteínas de processamento (FRAGOSO *et al.*, 2003), levando à interrupção da síntese de novas subunidades ribossomais.

Nesse contexto, o tripomastigota metacíclico teria a sua disposição o *pool* de ribossomos livres provenientes de estágios anteriores ou aqueles já associados com os mRNAs, formando os polissomos. Se a TcGBP está associada com esses polissomos, é uma questão a ser estudada. Isso é importante, se considerarmos a hipótese de que as GTPases da família YchF estão atuando como sensores moleculares do nível de GTP intracelular e modulando a atividade de outras proteínas que interagem com o ribossomo. Se realmente isso ocorrer, o balanço entre as concentrações intracelulares de GTP e GDP pode ser um fator crítico na modulação de processos celulares do tripomastigota metacíclico envolvendo a participação de GTPases.

Embora não tenhamos informação sobre as diferenças de concentração de GTP e GDP em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, acreditamos que nos tripomastigotas metacíclicos, os níveis de GTP devem estar bastante reduzidos, visto que nesse estágio o metabolismo é reduzido e os parasitas sobrevivem em um ambiente nutricionalmente pobre. Sendo assim, a TcGBP estaria presente nos tripomastigotas metacíclicos preferencialmente na forma livre ou ligada ao GDP, indicando para a célula um novo *status* no processo de tradução.

Análise por imunofluorescência indireta revela que em epimastigotas a proteína TcGBP está concentrada nas regiões anterior e posterior do parasita, excetuando-se o núcleo e o cinetoplasto. A região anterior, próxima à bolsa flagelar, é onde se situa o complexo de Golgi e onde ocorrem os principais eventos das vias endocítica e secretória do parasita (McCONVILLE *et al.*, 2002) e que, portanto, deve ser um sítio de intensa síntese protéica. Assim, a localização da TcGBP nessa região é condizente com sua provável função como um fator de tradução.

Contudo, não podemos explicar a localização dessa proteína na região posterior. Não sabemos se esta região é sítio para de síntese protéica, pois ainda não há estudos mostrando a distribuição de fatores de tradução e ribossomos em tripanossomatídeos, nem se esses podem estar co-localizados. Estamos também realizando ensaios de imunoeletromicroscopia para averiguar se a TcGBP pode também estar associada a vesículas ou organelas citoplasmáticas, visto que essa proteína pode ter outras funções além de servir como fator de tradução, como, por

exemplo, atuar na via endocítica do parasita, exercendo uma função relacionada àquela das pequenas proteínas G da família das Rabs. Esse aspecto de multifuncionalidade é visto nas proteínas Obgs bacterianas, que estão implicadas na regulação da esporulação, partição e replicação dos cromossomos, desenvolvimento de micélio e resposta ao estresse (CALDON; MARCH, 2003).

Não podemos eliminar, contudo, a possibilidade do anti-soro anti-TcGBP estar reagindo contra outras proteínas de *T. cruzi*, além da TcGBP. Vale lembrar que o anti-soro foi produzido contra a TcGBP purificada por afinidade em resina de Níquel-NTA. Embora a proteína TcGBP tenha sido eluída da resina com grande enriquecimento, foi possível notar a presença de algumas proteínas de *E. coli* contaminantes, quando da análise em SDS-PAGE. Observamos que uma proteína de aproximadamente 70 kDa sempre co-purificava com a TcGBP e possivelmente estava associada a esta. O seqüenciamento do amino-terminal dessa proteína mostrou que se tratava da enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase de *E. coli* (66,9 kDa). Essa enzima cataliza a síntese de glucosamina-6-fosfato a partir de frutose-6-fosfato e glucosamina, que por sua vez está envolvida com a formação de UDP-N-acetilglucosamina, o principal intermediário na biosíntese de açúcares aminados na célula. Se essa interação é específica, não vemos aparentemente nenhuma relação com a função predita para a TcGBP. Diversas tentativas foram feitas para tentar eliminar tal interação, incluindo a adição de detergentes não iônicos (NP-40 ou Tween-20) e aumento da concentração de NaCl (até 2 M) durante as etapas de sonicação e ligação do extrato bacteriano à resina de Níquel-NTA. Nenhuma dessas tentativas foi bem-sucedida. Tentamos repurificar a proteína eluída da resina de Níquel-NTA usando cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e por interação hidrofóbica (n-octil-sepharose), mas a proteína contaminante sempre co-purificava com as frações onde a TcGBP era eluída.

Comparamos a seqüência da glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase de *Escherichia coli* com aquela predita em *Trypanosoma cruzi* (80 kDa), que obtivemos por meio da anotação do genoma desse parasita (Locus Name: Tc00.1047053510303.200 <<http://www.tigr.org>>). O resultado foi que essas duas proteínas compartilham uma similaridade de 42%. Desse modo, é possível que

anticorpos contra a enzima de *E. coli* possam estar reagindo contra aquela de *T. cruzi* e revelando sua localização nos ensaios de imunofluorescência. Contudo, nunca visualizamos uma banda do tamanho esperado para a enzima de *T. cruzi* (80 kDa) quando da análise de extratos do parasita por *western blot* usando o soro anti-TcGBP, mesmo em diluições de 1:250.

A proteína TcGBP é, portanto, o primeiro membro da classe das GTPases YchF a ser caracterizado em tripanossomatídeos. A universalidade dessa classe de proteínas mostra que essas GTPases são indubitavelmente importantes para processos celulares, nos quais podem estar atuando como sensores moleculares no processo de tradução. O estudo da TcGBP se reveste de importância, pois pode trazer luz sobre as funções dessas GTPases, ainda pouco caracterizadas, e dimensionar sua importância para os processos de síntese protéica e regulação expressão gênica do *T. cruzi*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O gene *TcGBP*, um gene de cópia única, apresenta uma fase de leitura aberta de 1185 pares de bases.

O *TcGBP* mRNA contém aproximadamente 1.300 bases, com regiões 5' e 3' muito pequenas, sugerindo que sua expressão sofre pouca ou nenhuma regulação estágio-específica. De fato, a proteína TcGBP (44,32 kDa) está presente em todos os estágios analisados ao longo da metaciclogênese do *T. cruzi*.

A proteína TcGBP apresenta três motivos conservados característicos do domínio G que são G1 ou P-loop situado entre ₃₁**GLPNVGKS**₃₈, G2 ₅₇**CTI**₅₉ e G3 ₉₄**DIAG**₉₇. Porém, o motivo G4 (**NKxD**), responsável pela especificidade do nucleotídeo guanina, não foi observado. Esse motivo é substituído pela seqüência ₂₃₀**NMSE**₂₃₃, de acordo com o alinhamento com proteínas homólogas.

A proteína TcGBP, cuja função ainda é desconhecida, tem homologia extremamente alta com ortólogos eucarióticos (>63%) e procarióticos (>40%), sugerindo que sua função é conservada ao longo da evolução. Homologia significativa (>60%) é observada com GTPases da família de GTPases bacterianas YchF, sugerindo que TcGBP evoluiu a partir dessa família.

Análises com frações polissomais indica que a TcGBP pode estar associada com os ribossomos, sugerindo que a TcGBP seja um novo fator de tradução.

Análise por imunofluorescência indireta mostra que a TcGBP está concentrada nas regiões anterior e posterior do parasita, excluindo-se o núcleo e o cinetoplasto. A região anterior do parasita é sítio de intensa síntese protéica e local de secreção e endocitose, corroborando com sua atuação no processo biossintético, ou seja, atuando como mais um fator de tradução.

Experimentos estão sendo realizados para confirmar essa hipótese, bem como testar a capacidade da TcGBP ligar GTP e a interação com outras proteínas da maquinaria de tradução.

O fato da TcGBP recombinante ser obtida em quantidades elevadas e na forma solúvel em *E. coli*, abre a perspectiva de obtermos cristais dessa proteína e analisar sua estrutura tridimensional, para melhor entendermos sua função.

REFERÊNCIAS

- ABO, A.; PICK, E.; HALL, A. *et al.* Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. **Nature**, v. 353, p. 668–670, 1991.
- ALAM, K. Y.; CLARK, D. P. Molecular cloning and sequencing of the *thhdF* gene, which is involved in thiophene and furan oxidation by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v 173, p. 6018-6024, 1991.
- ALMOGUERA, C.; SHIBATA, D.; FORRESTER, K. *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**, v. 53, p. 549–554, 1988.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ARTS, G. J.; FORNEROD, M.; MATTAJ, I. W. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 305-314, 1998.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., *et al* **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons, 1987.
- AVILA A.R.; DALLAGIOVANNA, B.; YAMADA-OGATTA, S. F. *et al.* Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genet Mol Res.**, v. 2, n. 1, p.159-168, 2003.
- AVILA, A. R.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DA SILVA MONTEIRO, V. *et al* Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 117, n. 2, p. 169-77, 2001
- BARLOWE, C.; ORCI, L.; YEUNG, T. *et al.* COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. **Cell**, v. 77, p. 895-907, 1994.
- BERNSTEIN, H. D.; ZOPF, D.FREYMAN, D. M. *ET AL.* Functional substitution particle 54 kD subunit by its *Escherichia coli* homolog. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 5229-5233, 1993.
- BHAMIDIPATI, A.; LEWIS, S. A.; COWAN, N. J. ADP ribosylation factor-like protein 2 (Ar12) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. **J. Cell Biol.**, v. 149, n. 5, p.1087-1096, 2000.

- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** v. 7, n. 6, p. 1513-1523. Nov., 1979.
- BISCHOFF, F. R.; GÖRLICH, D. RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin β -related nuclear transport factors. **FEBS Letters**, v. 419, p. 249-254, 1997.
- BONALDO, M. C., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W., *et al.* Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation., **J. Cell Biol.** v. 106, p. 1349-1358, 1988.
- BOOTHROYD, J. C.; CROSS, G. A. M. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. **Gene**, v. 20 p. 218, 289, 1982.
- BOS, J. L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. **EMBO J.**, v. 17, p. 6776-6782, 1998.
- _____. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4682-4689, 1989.
- _____. Ras-like GTPases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1333, M19-M31, 1997.
- BOTSTEIN, D.; SEGEV, N.; STEARNS, T. *et al.* **Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.**, v. 53, p. 629-636, 1988.
- BOUCHER, N.; WU, Y.; DUMAS, C. *et al.* A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 19511-19520, 2002.
- BOURNE, H. R. GTPases: a family of molecular switches and clocks. **Phil. Trans. R. Soc London**, v. 349, p. 283-289, 1995.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch of diverse cell functions. **Nature**, v. 348, p. 125-132, 1990.
- _____. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, p. 117-127, 1991.
- BRITTON, R. A.; POWELL, B. S.; DASGUPTA, S. *et al.* Cell cycle arrest in Era GTPase mutants: a potential growth rate-regulated checkpoint in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol**, v. 27, p. 739-750, 1998.
- BROCK, S.; SZKARADKIEWICZ, K.; SPRINZL, M. Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 409-417, 1998.

- BRTVA, T. R.; DRUGAN, J. K.; GHOSH, S. *et al.* Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 9809–9812, 1995.
- BURLAND, V. PLUNKETT, G.; III, DANIELS, D. L. *et al.* DNA sequence of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. **Genomics**, v. 16, p. 551-561, 1993.
- CABEDO, H.; MACIAN, F. VILLAROYA, M. *et al.* The *Escherichia coli* trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionary conserved GTPase with unusual biochemical properties. **EMBO J.**, v. 18, p. 7063-7076, 1999.
- CALDON, C. E.; MARCH, P. E. Function of the universally conserved bacterial GTPases. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 135-139, 2003.
- CALDON, C. E.; YOONG, P.; MARCH, P. E. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 289–297, 2001.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.
- CASEY, P. J.; GILMAN, A. G. G protein involvement in receptor-effector coupling. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 6, p. 2577-2580, 1988.
- CHARDIN, P.; BOQUET, P.; MADAULE, P. *et al.* The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. **EMBO J.**, v. 8, p. 1087–1092, 1989.
- CHEN, X., COURT, D.L. ; JI, X. Crystal structure of Era: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 96, p. 8396-8401, 1999.
- CLARKE, S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 355-386, 1992.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, v. 21, p. 1881-1888, 2002.
- COLE, C. N.; HAMMELL, C. M., Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 184-188, 1998.
- CONTRERAS, V. T., ARAUJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., *et al.* 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.

CONTRERAS, V. T.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem Parasitol.**, v. 14, p. 83-96, 1985.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAAS, N. *et al.* In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem Parasitol.**, v. 16, p. 315-327, 1985.

COSO, O. A.; DIAZ ANEL, A.; MARTINETTO, H. *et al.* Characterization of a Gi-protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigote membranes. **Biochem. J.**, v. 287, p. 443-446, Oct., 1992.

COULTER, L. J.; HIDE, G. *Trypanosoma brucei*: characterisation of a life cycle stage-specific G-protein. **Exp. Parasitol.**, v. 80, n. 2, p. 308-318, Mar., 1995.

CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W.F.; GUTKIND, J.S. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. **Nature**, v. 69, p. 418-420, 1994.

CRUZ-VERA, L. R.; GALINDO, J. M.; GUARNEROS, G. Transcriptional analysis of the gene encoding peptidyl-tRNA hydrolase in *Escherichia coli*. **Microbiol.**, v. 148, p. 3457-3466, 2002.

DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 7-16, 2001.

DER, C. J.; FINKEL, T.; COOPER, G. M. Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. **Cell**, v. 44, p 167-176, 1986.

DOHLMAN, H. G.; THORNER, J. W. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: Paradigms and principles. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 703-754, 2001.

DOORN, L. J. van; GIESENDORF, B. A.; BAX, R. *et al.* Molecular discrimination between *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by polymerase chain reaction based on a novel putative GTPase gene. **Mol. Cell Probes**, v. 11, p. 177-185, 1997.

EGAN, S. E.; WEINBERG, R. A. The pathway to signal achievement. **Nature**, v. 365, n. 6449, p. 781-783, 1993.

ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E. *et al.* Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 112, n. 1, p. 79-90, 2001.

FARNSWORTH, C. C.; KAWATA, M.; YOSHIDA, Y. *et al.* C terminus of the small GTP-binding protein smg p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 6196–6200, 1991.

FEIG, L. A. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. **Trends Cell. Biol.**, v. 13, n. 8, p. 419-425, Aug., 2003.

FIELD, M.C.; ALI, B.R.; FIELD, H. GTPases in protozoan parasites: Tools for cell biology and chemotherapy. **Parasit. Today**, v. 15, p. 365-371, 1999.

FISCHER, U.; HUBER, J.; BOELEN, W. C. *et al.* The HIV-1 Rev activation domains is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. **Cell**, v. 82, p. 475-483, p. 1995.

FORNEROD, M.; OHNO, M.; YOSHIDA, M.; MATTAJ, I. W. Crm1 is an export receptor receptor for leucine rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, p. 1051-1060, 1997.

FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 55, n.1/2, p. 127-34, 1992.

FRAGOSO, S. P.; PLAZANET-MENUT, C.; CARREIRA, M. A. *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 126, n. 1, p. 113-117, 2003.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O. *et al* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, p. 397-403, 1995.

FRECH, M.; DARDEN, T. A.; PEDERSEN, L. G. *et al.* Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. **Biochemistry** v. 33, p. 3237–3244, 1994.

FUKUDA, M.; ASANO, S.; NAKAMURA, T. *et al.* CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by nuclear export signal. **Nature**, v. 390, 308-311, 1997.

GALLWITZ, D.; DONATH, C.; SANDER, C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. **Nature**, v. 306, n. 5944, p. 704-707, 1983.

GAUCHER, E. A.; MIYAMOTO, M. M.; BENNER, S. A. Function structure analysis of proteins using covarion-based evolutionary approaches: elongation factors. **PNAS**, v. 98, n. 2, p. 548-552, 2001.

- GAVIN, A. ; BOÈSCHE M.; KRAUSE, R. *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, p. 141-147, 2002.
- GEPPERT, M.; GODA, Y.; STEVENS, C. F. *et al.* The small GTPbinding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. **Nature**, v. 387, p. 810–814, 1997.
- GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi* as a model system for studying cell differentiation. In: AGABIAN, N.; CERAMI, A., ed. **Parasites: molecular biology, drug and vaccine design**. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New York: Alan R. Liss, 1990. (New Series, v. 131)
- GOLLOP, N.; MARCH, P. E. A GTP-binding protein (Era) has an essential role in growth rate and cell cycle control in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 2265-2270, 1991.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp. Parasitol.**, v. 66, n. 2, p. 205-212, Aug., 1988.
- GÖRLICH, D. Nuclear protein import. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 412-419, 1997.
- _____. Transport into and out of the cell nucleus. **EMBO J.**, v. 17, p 2721-2727, 1998
- GÖRLICH, D.; MATTAJ. I. W. Nucleocytoplasmic transport. **Science**, v. 271, p. 1513–1518, 1996.
- HALL, A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. **Science**, v. 249, p. 635–640, 1990.
- GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Initiation of mRNA translation in prokariotes. **Biochemistry**, v. 29, p. 5881-5889, 1990.
- HAMM, H. E. The many faces of G protein signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 669-672, 1998.
- HAN, M.; GOLDEN, A.; HAN, Y. *et al.* *C. elegans* lin-45 raf gene participates in let-60 ras-stimulated vulval differentiation. **Nature**, v. 363, p. 133–140, 1993.
- HANCOCK, J. F.; MAGEE, A. I.; CHILDS, J. E. *et al.* All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. **Cell**, v. 57, p. 1167–1177, 1989.

- HART, M. J.; JIANG, X.; KOZASA, T. *et al.* Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G α 13. **Science**, v. 280, p. 2112-2114, 1998.
- HIRATA, K.; KIKUCHI, A.; SASAKI, T. *et al.* Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 8719-8722, 1992.
- HONG, J.-X., LEE, F.-J. S., PATTON, *et al.* Phospholipid- and GTP-dependent Activation of Cholera Toxin and Phospholipase D by Human ADP-ribosylation Factor-like Protein 1 (HARL1) **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15872-15876, 1998.
- HUANG, W.; ALESSANDRINI, A.; CREWS, C. M. *et al.* Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 90, p. 10947-10951, 1993.
- HULO, N.; SIGRIST, C.J.A.; Le SAUX V. *et al.* Recent improvements to the PROSITE database. **Nucl. Acids. Res.**, v. 32, p.D134-D137, 2004.
- IMAMOTO, N.; KARNEI, Y.; YONEDA, Y. Nuclear transport factors: function, behavior and interaction. **Eur. J. Histochem**, v. 42, p. 9-20, 1998.
- IMAMOTO, N.; SHIMAMOTO, T.; TAKAO, T. *et al.* In vivo evidence for involvement of a 58kDa component of nuclear pore targeting complex in nuclear protein import. **EMBO J.** v. 14, p. 3617-3626, 1995.
- IZAURRALDE, E.; ADAM, S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. **RNA**, v. 4, p. 351-364, 1998.
- IZAURRALDE, E.; KUTAY, U.; VON KOBBE, C. *et al.* The asymmetric distribution of constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. **EMBO J.**, v.16, p. 6535-6547, 1997.
- JACKSON, J. H.; COCHRANE, C. G.; BOURNE, J. R. *et al.* Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 3042-3046, 1990.
- JENSEN, B. C.; WANG, Q.; KIFER, C. T. *et al.* The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 34, p. 32204-32211, 2003.
- JOHNSON D. I.; PRINGLE, J. R. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. **J. Cell Biol.**, v. 111, p. 143-152, 1990.

KAHN, R.A.; GILMAN, A.G. Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 6228–6234, 1984.

KARLINSEY, J.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; ENVER, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukariotic cells. **Anal Biochem.**, v. 180, p. 303-306, 1989.

KAWATA, M.; FARNSWORTH, C. C.; YOSHIDA, Y. *et al.* Posttranslationally processed structure of the human platelet protein smg p21B: evidence for geranylgeranylation and carboxyl methylation of the C-terminal cysteine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 8960–8964, 1990.

KNAUS, U. G.; HEYWORTH, P. G.; EVANS, T. *et al.* Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTPbinding protein Rac 2. **Science**, v. 254, p. 1512–1515, 1991.

KOBAYASHI, G.; MORIYA, D.; WADA, C. Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. **Mol. Microbiol.** v. 41, p. 1037-1051, 2001.

KOK, J., TRACH, K. A.; HOCH, J. A. Effects on *Bacillus subtilis* of a conditional lethal mutation in the essential GTPbinding protein Obg. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 7155-7160, 1994.

KOVALIC, D.; KWAK, J. H.; WISBLUM, B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 16, p. 4560, 1991.

KUTAY, U.; BISCHOFF, F. R.; KOSTKA, S. *et al.* Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. **Cell**, v. 90, p. 1061-1071, 1997.

KUTAY, U.; LIPOWSK, G.; IZAURRALDE, E. *et al.* Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. **Molec. Cell**, v 1, p. 359-369, 1998.

LEAL, S. T.; ARARIPE, J. R.; URMENYI, T. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of a RAB7 gene. **Exp Parasitol.**, v. 96, n. 1, p. 23-31, Sep., 2000.

LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. *et al.* Classification and evolution of P-loop GTPase and related ATPase. **J. Mol. Biol.**, v. 317, p. 41-72, 2002.

LEWIS, S. A.; TIAN, G.; COWAN, N. J. The alpha and beta tubulin folding pathways. **Trends Cell Biol.**, v. 7, p. 479–485, 1997

- LIN, C. Y., HUANG, P. H., LIAO, W. L., *et al.* ARL4, an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 37815-37823, 2000.
- LIRI, T.; FARFEL, Z.; BOURNE, H. R. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. **Nature**, v. 394, p. 35-38. 1998.
- LOURSBURY, K. M.; MACARA, I. G. Ran binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces GTPase-activation protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 551-555, 1997.
- LUIRINK, J.; ten HAGEN-JONGMAN, C. M.; van der WEIJDEN, C. C. *et al.* An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. **EMBO J**, v 13, p. 2289-2296, 1994.
- LUTTRELL, L. M., FERGUSON, S. S. G., DAAKA, Y. *et al.* β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. **Science**, v. 283, p. 655 – 661, 1999.
- MADDOCK, J.; BHATT, A.; KOCH, M. *et al.* Identification of an essential *Caulobacter crescentus* gene encoding a member of the Obg family of GTP-binding proteins. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 20, p. 6426–6431, 1997.
- MALSAM, J., GOMMEL, D., WIELAND, F. T. *et al.* A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. **FEBS Lett.**, v. 462, p. 267-272, 1999.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MARCH, P. E. Membrane-associated GTPases in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 1253-1257, 1992.
- MARTINEZ, O.; GOUD, B. Rab proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1404, p. 101-112, 1998. Review
- MAURÍCIO DE MENDONÇA, S. M.; NEPOMUCENO DA SILVA, J. L., CUNHA E SILVA, *et al.* Characterization of a Rab11 homologue in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 243, p. 179-185, 2000.
- McCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C. *et al.*, Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 66, n. 1, p 122-154, 2002.
- MEHR, I. J.; LONG, C. D.; SERKIN, C. D. *et al.* A homologue of the recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in gonococcal pilin antigenic variation. **Genetics**, v. 154, p.523-532, 2000.

- MELCHIOR, F.; PASCHAL, B.; EVANS, J. *et al.* Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 1649–1659, 1993.
- MOORE, M. S.; BLOBEL, G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature**, v. 365, p. 661–663, 1993.
- MORIMOTO, T.; LOH, C. L.; HIRAI, T. *et al.* Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. **Microbiol.**, v. 148, p. 3539-3552, 2002.
- MOROIANU, J., M. HIJIKATA, G. BLOBEL, AND A. RADU. Mammalian karyopherin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ heterodimers: $\alpha 1$ or $\alpha 2$ subunit binds nuclear localization sequence and β subunit interacts with peptide repeat containing nucleoporins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 6532–6536, 1995.
- MORRIS, A. J.; MALBON, C. C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p.1373 - 1430, 1999.
- MORRISON, D. K.; CUTLER, R. E. The complexity of Raf-1 regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, n. 2, p. 174–179, 1997. Review.
- MOSKALENKO, S.; TONG, C.; ROSSE, C. *et al.* Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit Interactions **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 51, p.51743-51748, 2003
- MOSS, J.; VAUGHAN, M. ADP-ribosylation factors, 20,000 Mr guanine nucleotide-binding protein activators of cholera toxin and components of intracellular vesicular transport systems **Cell. Signalling**, v. 5, p. 367-379, 1993.
- _____. Molecules in the ARF Orbit. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 21421–21434, 1998.
- NAKANO, A.; MURAMATSU, M.. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. **J. Cell Biol.**, v. 109, p. 2677–2691, 1989.
- NAULA, C.; SEEBECK, T. Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. **Parasitol Today.**, v. 16, n. 1, p. 35-38, Jan., 2000.
- NEVES, S. N.; RAM, P. T.; IYENGAR, R. G protein pathways. **Science**, v. 296, p. 1636 - 1639, May. 2002.
- NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell**, v. 81, p. 53–62, 1995.

- OKAMOTO, S.; ITOH, M.; OCHI, K. Molecular cloning and characterization of the *obg* gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 170-179, 1997.
- OKAMOTO, S.; OCHI, K. An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. **Mol Microbiol**, v. 30, p. 107-119, 1998.
- OLIVEIRA, M. M.; ROCHA, E. D.; RONDINELLI, E. *et al.* Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*: opposite effects of adenylyl cyclase and phospholipase C systems in growth control. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 124, p. 91-99, 1993.
- OZ, H.S.; HUANG, H.; WITTNER, M. *et al.* Evidence for guanosine triphosphate-binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, p. 620-631, May., 1994.
- PADUCH, M.; JELEŃ, F.; OTLEWSKI, J. Structure of small G protein and their regulators. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 829-850, 2001. (Review)
- PAI, E. F.; KRENGEL, U.; PETSKO, G. A. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. **EMBO J.**, v. 9, p. 2351-2359, 1990.
- PANTÉ, N.; AEBI, U. Towards the molecular dissection of protein import into nuclei. **Curr. Opin. Cell Biol.** 8:397-406. 1996.
- PARK, J.; JENSEN, B., C.; KIFER, C. T. *et al.* A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 173-185, 2000.
- PATERSON, H. F.; SELF, A. J.; GARRETT, M. D. *et al.* Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. **J. Cell Biol.**, v. 111, p. 1001-1007, 1990.
- PEREIRA-LEAL, J. B.; SEABRA, M. C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. **J. Mol. Biol.**, v. 301, n. 4, p. 1077-1087, 2000.
- POWERS, S.; KATAOKA, T.; FASANO, O. *et al.* Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. **Cell**, v. 36, p. 607-612, 1984.
- QUEVILLONA, E.; SPIELMANN, T.; BRAHIMIC, K. *et al.* The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases. **Gene**, v. 306, p. 13-25, 2003.
- RANGEL-ALDAO, R.; ALLENDE, O.; TRIANA, F. *et al.* Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 22, n. 1, p. 39-43, Jan., 1987.

RAPOPORT, T. A.; JUNGnickel, B.; KUTAY, U. Protein transport across the eukariotic endoplasmatic reticulum and the bacterial inner membranes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 271-303, 1996.

REXACH, M.; BLOBEL, G. Protein import into nuclei: association and dissociation reacting involent transpot substrate, transport factors, and nucleoporins. **Cell**, v. 83, p. 683-692, 1995.

RIBEIRO-NETO, F.; URBANI, J.; LEMEE, N. *et al.* On the mitogenic properties of Rap1b: cAMP-induced G(1)/S entry requires activated and phosphorylated Rap1b. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 8, p. 5418-5423, Apr., 2002.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. **EMBO J.**, v. 13, p. 2600–2610, 1994.

_____. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, v. 70, p. 389–399, 1992.

RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. *et al* Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. **J Mol Biol.**, v.113, n. 1, p. 237-251, Jun., 1977.

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R. J.; BOOT, A. J. *et al.* Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. **Cancer Res.**, v. 48, p. 5738–5741, 1988.

RODINA, M. V.; SAVELSBERGH, A.; WINTERMEYER, W. Dynamics of translation on the ribosome:molecular mechanics of translocation. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 317-333, 1999.

RODINA, M. V.; STARK, H.; SAVELSBERGH, A. *et al.* GTPase mechanisms and functions of translation factor on the ribosome. **Biol. Chem.**, v. 381, p. 377-387, 2000.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. London: Gower, 1985.

ROTHMAN, J. E. Mechanisms of intracellular protein transport. **Nature**, v. 372, n. 6501, p. 55–63, 1994.

ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. Molecular dissection of the secretory pathway. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 409-415, 1992.

SALMINEN, A.; NOVICK, P. J. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. **Cell**, v. 49, p. 527–538, 1987.

- SALMON, D.; MONTERO-LOMELÍ, M.; GOLDENBERG, S. A DnaJ-like protein homologous to the yeast co-chaperone Sis1 (TcJ6p) is involved in initiation of translation in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 47, p. 43970-43979, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SAYED, A.; MATSUYAMA, S.; INOUE, M. Era, an essential Escherichia coli small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, p. 51-54, 1999.
- SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science**, v. 271, p. 1519-1926, 1996.
- SCHIMMÖLLER, F.; SIMON, I.; PFEFFER, S. R. Rab GTPases, Directors of Vesicle Docking **J. Biol. Chem.** v. 273, n. 35, p. 22161-22164, Aug., 1998.
- SCHLEIFER, L. S.; KAHN, R. A.; HANSKI, E. *et al.* Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 20-23, 1982.
- SCHURMANN, A. SCHMIDT, M.; ASMUS, M. *et al.* The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 14, p. 9744-9751, 1999.
- SCOTT, J. M.; HALDENWANG, W. G. Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor σ^B . **J. Bacteriol**, v. 181, p. 4653-4660, 1999.
- SCOTT, J. M.; JU, J.; MITCHELL, T.; HALDENWANG, W. G. The *Bacillus subtilis*, GTP binding protein Obg and regulators of the σ^B stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. **J. Bacteriol**, v. 182, p. 2771-2777, 2000.
- SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, p. 43-47, 1993.
- SELUANOV, A.; BIBI, E. FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue is essential for biogenesis of membrane proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 2053-2055, 1997.

- SIGRIST, C.J.A.; CERUTTI L.; HULO N. *et al.* PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Brief Bioinform.**, v. 3, p. 265-274, 2002.
- SIMON, M. I.; STRATHMANN, M. P; GAUTAM, N. Diversity of G proteins in signal transduction. **Science**, v. 252, p. 802 - 808, May., 1991.
- SMELAND, T. E.; SEABRA, M. C.; GOLDSTEIN, J. L. *et al.* Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 10712–10716, 1994.
- SPRANG, S. R. G protein mechanisms: insights from structural analysis. **Ann. Rev. Biochem.** v. 66, p. 639-678, 1997.
- STAMNES, M. A.; ROTHMAN, J. E. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. **Cell**, v. 73, p. 999-1005, 1993.
- STEPHENS, D. J.; PEPPERKOK, R. Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles? **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 1053-1059, 2001
- TAMKUN, J. W.; KAHN, R. A.; KISSINGER, M. *et al.* The arflike gene encodes an essential GTP-binding protein in Drosophila. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 3120-3124, 1991.
- TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. **Physiological Reviews**, v. 81 n. 1, p.153 - 208, Jan. 2001.
- TAKIFF, H. E.; CHEN, S.; COURT. D. L. Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 2581- 2590, 1989.
- TEPLYAKOV, A. ; OBMOLOVA, G. ; CHU, S. Y. *et al.* Crystal structure of the YchF protein reveals binding sites for GTP and nucleic acid. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 14, p. 4031-4037, 2003.
- TODA, T.; UNO, I.; ISHIKAWA, T. *et al.* In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. **Cell**, v. 40, p. 27–36, 1985.
- TOUCHOT, N.; CHARDIN, P.; TAVITIAN, A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 23, p. 8210-8214, Dec., 1987.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

- TRACH, K.; HOCH, J. A. The *Bacillus subtilis* spo0B stage 0 sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 1362-1371, 1989.
- ULBRANDT, N. D.; NEWITT, J. A.; BERNSTEIN, H. D. The *E. coli* signal recognition particle for the insertion of a subset of inner membrane proteins. **Cell**, v. 88, p. 187-196, 1997.
- ULLU, E.; TSCHUDI, C.; GÜNZL, A. *Trans*-splicing in trypanosomatid protozoa. In., SMITH, D. F.; PARSONS, M. **Molecular biology of parasitic protozoa**. New York: Oxford: IRL, 1996. 233 p. (Frontiers in molecular biology v. 13)
- VAN DER PLOEG, L. H. T.; LIU, A. Y. C.; MICHELS, P. A. M. *et al.* RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, p. 3591-3604, 1982.
- VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, p. 1299 - 1304, Nov. 2001.
- VIDWANS, S. J., IRETON, K.; GROSSMAN, A. D. Possible role for the essential GTP-binding protein Obg in regulating the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 3308-3311, 1995.
- VOJTEK A. B.; DER, C. J. Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19925-19928, 1998.
- VOJTEK, A. B.; HOLLENBERG, S. M.; COOPER, J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. **Cell**, v. 74, n. 1, p. 205–214, 1993.
- VRIES, L. de; ZHENG, B.; FISCHER, T. *et al.* The regulator of G protein signaling family. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 235-271, 2000.
- WEBSTER, P.; RUSSEL, D. G. The flageller pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 71, p. 1131-1142, 1993.
- WEIS, K.; MATTAJ, I. W.; LAMOND, A. I. Identification of hSRP1a as a functional receptor for nuclear localization sequences. **Science**, v. 268, p. 1049–1053, 1995.
- WILSON, K. S.; NOLLER, H. F. Molecular movement inside the translation engine. **Cell**, v. 92, p. 337-349, 1998.
- WOLF, Y. I.; ARAVIND, L.; GRISHIN, N. V. *et al.* Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases-analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. **Genome Res.**, v. 9, p. 689-710, 1999.

YAMADA-OGATTA, S. F.; MOTTA, M. C.; TOMA, H. K. *et al* *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. **Acta Trop.**, v. 90, n. 2, p. 171-179, 2004.

YAMOCHI, W.; TANAKA, K.; NONAKA, H. *et al*. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 125, p. 1077–1093, 1994.

ZHAO, L.; HELMS, J. B.; BRUGGER, B. *et al*. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, n. 9, p. 4418–4423, 1997.