Beatriz Simonsen Stolf

Caracterização da região promotora do cistron de RNA
ribossômico em duas linhagens filogenéticas
de *Trypanosoma cruzi*

SÃO PAULO
1999

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO CISTRON
DE RNA RIBOSSÔMICO EM DUAS LINHAGENS FILOGENÉTICAS DE
TRYPANOSOMA CRUZI

BEATRIZ SIMONSEN STOLF
TESE DE MESTRADO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. BIANCA ZINGALES

SÃO PAULO

1999

**“Caracterização da Região Promotora
do Cistron de RNA Ribossômico em
Duas Linhagens Filogenéticas de
Trypanosoma cruzi”.**

BEATRIZ SIMONSEN STOLF

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. BIANCA SILVANA ZINGALES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SUELY LOPES GOMES
IQ - USP

Profa. Dra. SILVIA RENI BORTOLIN ULIANA
ICB - USP

SÃO PAULO
07 DE MAIO DE 1999.

“Todo conhecimento humano é incerto, inexato e parcial”
(Bertrand Russel)

“Crê nos que buscamos a verdade. Duvida dos que a encontraram.”
(André Gide)

A meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Bianca Zingales, pelo espírito crítico, pela cuidadosa revisão deste trabalho, por ter me ensinado a ter autonomia e buscar as informações que me faltavam.

A Ricardo Peres do Souto, a quem devo grande parte desse trabalho. Pela orientação, pelas discussões, pela convivência.

Ao pessoal do laboratório: Fernando, Nancy, Marcia, Marcelo, Arnaldo, Aurélio, pelo companheirismo e pela colaboração em tantos momentos. Mais do que colegas, vocês se tornaram grandes amigos. Ao Fernando, por ouvir tantos desabaços e questionamentos... Ao Arthur, por inúmeros ensinamentos, pela seriedade no trabalho, por vários conselhos e conversas. A Clarita, minha segunda mãe, pelo carinho, preocupação, consideração.

Aos ex-colegas e sempre amigos do bloco 10: Fátima, Luiz, Marinez, Ricardinho, Maga, Jorge, Cynthia, Alessandra, Lucienne, Viviane, Daniela. Pelo convívio, pelas ajudas, pelos congressos em que estivemos juntos. A Marinei, Roberto, Dona Lucinda e Cecília por associarem à atividade profissional o carinho e a descontração.

A Maria Julia pelas tantas conversas e conselhos em diversos assuntos.

A Mari Armelin pelo exemplo de coletividade, disponibilidade e auxílio. Ao pessoal do laboratório da Mari (em especial Fernanda, Roberto e Áurea, Cleber, Lúcia, Renato, Mário, Sandra e Zizi) pelo curso de "Transformação Maligna", pelos empréstimos, pela amizade.

Aos vizinhos do laboratório do Prof. Hugo: Claudimara, Ana Paula, Ivan, Claudia, Telma, Fábio, Alexandre, Gláucia, Miriam e Érico, que sempre foram solícitos e atenciosos quando precisei de materiais e equipamentos.

Aos amigos do Instituto: do lab do Prof. Hernan, do Terra, do Dorry, do Fernando Reinach, do Santelli e outros, pela ajuda em várias ocasiões. Em especial a Cleo, Tamara, Alexandre, Marcelo e Marcia pela amizade e pela torcida.

A Lucile Floeter-Winter pelo plasmídio com o promotor de CL, pelo ensinamento de várias técnicas. Ao pessoal do lab da Lucile (em especial Cris, Wolf, Val) pelos empréstimos e pelas discussões.

A Sérgio Schenkman e Ma. Carolina Elias Sabbaga pelo plasmídio com GFP, por sugestões, pela disponibilidade.

A Marcelo Briones pelo curso de "Evolução Molecular", pelas discussões e colaborações, pela amizade e consideração.

A Roger Chammas pelo incrível curso de "Adesão Celular", pelo exemplo como professor e como pessoa.

Aos membros da banca de qualificação: Walter Colli, Carla Columbano e Chuck, por tornarem descontraída a avaliação, pelas sugestões e pelo incentivo.

A Walter Colli pelo convívio por tantos anos, pelo espírito crítico e pela atenção.

A meus irmãos, avós, tios e outros familiares pelo interesse e admiração que sempre me estimularam.

Aos queridos amigos da Biologia - em especial Dani, Raquel, Luis, Carol, Pira, Axel, Jota e Rubens - pela amizade que atravessa o tempo, pela torcida, pela disponibilidade sempre que precisei.

Aos grandes amigos de fora da faculdade, a maioria dos quais viveu situações tão diferentes da minha durante esse período. A vocês, que acompanharam tantos passos desse processo, obrigada pelo carinho, interesse e amizade.

Ao pessoal do ICB-Parasitologia, em especial Carlos Winter, Martha Teixeira e Marcelo Barcinski pela ajuda e disponibilidade. A Hernando Portillo pelo interesse e atenção.

Ao CNPq, pela bolsa.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
A diversidade do <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Duas linhagens filogenéticas em <i>T. cruzi</i>	3
Genes ribossômicos	8
O cistron ribossômico de tripanossomatídeos	9
Regulação da transcrição	12
Especificidade da transcrição	15
Tradução de transcritos de RNA polimerase I?	17
O processo de <i>trans</i> -splicing	18
Transfecção em tripanossomatídeos	22
A atividade do promotor ribossômico de <i>T. cruzi</i>	25
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Nucleotídeos radioativos	29
3.2. Enzimas	29
3.3. Vetores	29
3.4. Oligonucleotídeos	31
3.5. Meios de cultura	31
3.6. <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.7. <i>Escherichia coli</i>	32
3.8. Extração de ácidos nucleicos de <i>T. cruzi</i>	33
3.8.1. DNA total	33
3.8.2. DNA plasmidial de células transfectadas	33
3.8.3. Extração de RNA	33
3.8.3.1. Com fenol-ácido-tiocianato de guanidina	34
3.8.3.2. Gradiente de césio	34
3.9. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	35
3.9.1. Método rápido (speed-prep)	35
3.9.2. Pequena escala (mini-prep)	35
3.9.3. Média escala (mid-prep)	35
3.9.4. Larga escala	36
3.9.4.1. Gradiente de césio	36
3.9.4.2. Colunas QIAGEN	37
3.10. Digestão de DNA com enzimas de restrição	37

3.11. Eletroforese de DNA	37
3.11.1. Gel de agarose	37
3.11.2. Gel de poliacrilamida	38
3.12. Transferência alcalina	38
3.12.1. Gel de agarose	38
3.12.2. Gel de poliacrilamida	39
3.13. Extração de insertos com membrana DE-81	39
3.14. Reações de ligação	40
3.14.1. Inseto e vetor compatíveis	40
3.14.2. Método "shotgun"	40
3.14.3. Produtos de PCR ou RT-PCR	40
3.14.3.1. No vetor pBluescript-T	40
3.14.3.2. Em pBluescript de extremidades cegas	41
3.15. Transformação de <i>E. coli</i>	41
3.15.1. Bactérias competentes frescas	41
3.15.2. Bactérias competentes armazenadas	41
3.15.2.1. Preparação das bactérias	42
3.15.2.2. Transformação	42
3.16. Marcação de sondas	42
3.16.1. Por incorporação de nucleotídeos marcados	42
3.16.1.1. Por "random primer"	42
3.16.1.2. Por "nick translation"	43
3.16.1.3. Medida da incorporação	43
3.16.2. Por fosforilação de oligonucleotídeos	44
3.16.2.1. Reação de marcação	44
3.16.2.2. Medida da incorporação e purificação	44
3.17. Reações de amplificação de ácidos nucleicos	44
3.17.1. PCR	44
3.17.2. RT-PCR	45
3.18. Mapeamento do ponto de início de transcrição	46
3.18.1. Por nuclease S1	46
3.18.2. Por "primer extension"	46
3.19. Seqüenciamento	47
3.20. Transfecção em <i>T. cruzi</i>	48
3.21. Análise da expressão do gene reporter	48
3.21.1. Atividade de CAT	49

3.21.2. Expressão de GFP	49
3.22. Construções	49
4. RESULTADOS	52
4.1. Clonagem da região promotora	52
4.2. Caracterização da região promotora	52
4.3. Expressão dos promotores endógenos de grupo 1/2	58
4.4 Mapeamento do ponto de início de transcrição	61
4.5. Construção de vetores de expressão contendo o prom. rib.	64
4.6. Experimentos de eletroporação	65
4.7. Mapeamento funcional de regiões do promotor L2	72
4.8. Eficiência de transfecção	74
4.9. Comparação dos sítios aceptores de <i>trans</i> -splicing	76
4.10. Determinação dos pontos de adição do mini-exon	77
4.11. Expressão de GFP dirigida pelo promotor L1	84
4.12. Expressão em Sylviox10 cl1 e Esmeraldo cl3	85
5. DISCUSSÃO	87
5.1. A região promotora do cistron ribossômico de <i>T. cruzi</i>	87
5.2. Conservação do tsp do promotor ribossômico	87
5.3. O cistron ribossômico em isolados de grupo 1/2	88
5.4. Expressão dirigida por promotores de L1 e L2	91
5.5. Os trechos do promotor ribossômico de L2	95
5.6. Eficiência de transfecção	96
5.7. Sítios aceptores de <i>trans</i> -splicing	97
6. CONCLUSÕES	105
7. RESUMO	106
8. ABSTRACT	107
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
CURRICULUM VITAE	123

ABREVIACES

A	absorbância
AMV	vírus da mieloblastose aviária
ATP	trifosfato de adenosina
BLAST	ferramenta básica de busca de alinhamentos locais
BSA	albumina bovina sérica
CAT	cloranfenicol acetil transferase
cpm	contagens por minuto
dATP	trifosfato de 2' desoxiadenosina
ddATP	trifosfato de 2', 5' didesoxiadenosina
ddCTP	trifosfato de 2', 5' didesoxicitidina
ddGTP	trifosfato de 2', 5' didesoxiguanidina
ddTTP	trifosfato de 2', 5' didesoxitimidina
DE	dietil
DEAE	dietilaminoetil
DEP	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	cido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTPs	mistura de 2' desoxinucleosdeos trifosfato
D.O.	densidade ptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
GFP	proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein")
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosdio
kDNA	DNA de cinetolasto
LIT	infusão de fígado e triptose
LSU rRNA	RNA da subunidade grande do ribossomo
mA	miliampre
Mb	megabases (milhões de pares de bases)
ME	mini-exon
MES	cido 2-(N-morfolino) etanossulfnico
mg	miligrama
ml	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio

mRNA	RNA mensageiro
μCi	microcuries
μg	microgramas
μl	microlitros
NaPPi	pirofosfato de sódio
nm	nanômetros
nt	nucleotídeos
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PFGE	eletroforese de campo pulsado
pmol	picomoles
POPOP	1,4, bis 2 (4-metil 5-feniloxazolil) benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
p/v	peso por volume
PVP	polivinilpirrolidona
qsp	quantidade suficiente para
RAPD	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
rDNA	DNA ribossômico
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	PCR precedido de transcrição reversa
SDS	lauril sulfato de sódio
SL	"spliced leader"
SL-RNA	RNA doador do "spliced leader"
SSC	solução salina com citrato de sódio
SSU rRNA	RNA da subunidade pequena do ribossomo
ssDNA	DNA de fita simples
TAE	solução de Tris, acetato e EDTA
TBE	solução de Tris, borato e EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	solução de Tris e EDTA

TEMED	N', N', N', N', tetrametiletilenodiamina
T _m	temperatura de fusão (temp. na qual metade das moléculas estão na forma de fita simples)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade de atividade enzimática
UV	radiação ultravioleta
V	volts
xg	aceleração de gravidade
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídio
W	watts

1. INTRODUÇÃO

A diversidade do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um organismo digenético, cujo ciclo inclui um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros invertebrados, vetores da doença, são hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, entre eles *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. Os hospedeiros vertebrados são extremamente variados, incluindo 100 espécies de mamíferos, entre eles tatus, gambás, roedores e macacos (que participam do ciclo silvestre) e homem (ciclo doméstico) (Brener, 1992).

O *T. cruzi* não consiste de uma população homogênea, mas antes de um grupo de cepas que circulam nos ciclos silvestre e doméstico, envolvendo o homem, vetores e reservatórios do parasita (Brener, 1992). Cada cepa corresponde a um "pool" de parasitas isolados de um dado organismo. Em áreas endêmicas as cepas podem consistir de populações multiclonais, já que os hospedeiros vertebrados podem ter tido vários contatos com triatomíneos contaminados, que por sua vez provavelmente se alimentaram de distintos mamíferos infectados. A multiclonalidade parece ser mais comum em cepas isoladas de insetos vetores, já que a passagem pelo homem reduz a variabilidade da população em virtude de uma sobrevivência diferencial aos mecanismos de defesa do organismo (Oliveira *et al.*, 1998; Macedo & Pena, 1998).

As cepas são muito distintas entre si, e suas características podem ser influenciadas por condições ambientais ou manuseio em laboratório (Brener, 1992). Dentre as diferenças pode-se citar o curso da infecção em camundongos (curva de parasitemia e mortalidade) (Carneiro *et al.*, 1991), o tropismo tecidual (Andrade, 1985) e a suscetibilidade a quimioterápicos (Filardi & Brener, 1987). Duas cepas, Y e CL, foram consideradas polares por suas divergências quanto à cinética de crescimento em meio líquido, morfologia dos tripomastigotas, patogenicidade, constituição antigênica e infectividade (Brener, 1977).

Estudando clones do parasita, obtidos a partir de uma única célula por diluição seriada, foi observado que o tempo de geração ("doubling time") de epimastigotas varia de 22 a 200 hs (a maior diferença já vista entre indivíduos de uma mesma espécie!), o ciclo intracelular de 5 dias a 3 meses e o conteúdo total de DNA 40%, sendo esta última diferença dada pelo DNA nuclear (Dvorak, 1984). Foram encontrados também antígenos específicos de cada isolado, bem como diferenças na infectividade, na manifestação clínica da doença e na inibição da invasão de células de mamífero por compostos como N-acetil glucosamina (Dvorak, 1984).

As diferenças entre as cepas também se refletem numa grande variabilidade genética, identificada por diversos marcadores, um dos quais é o padrão de isoenzimas. As primeiras análises nessa linha, baseadas em seis enzimas, permitiram dividir 60 isolados originados do Brasil em três grupos estáveis em cultura, denominados zimodemas I, II e III (Z I, II e III). Os parasitas de zimodema I parecem estar mais associados ao ambiente silvestre, enquanto que os de zimodema II foram identificados no ambiente domiciliar (Miles *et al.*, 1978). Os isolados de Z III mostraram-se geneticamente mais próximos aos de Z I do que aos de Z II (Miles *et al.*, 1980).

Posteriormente, os estudos foram estendidos para a análise de 15 "loci" codificadores de isoenzimas de 121 isolados de *Trypanosoma cruzi* originários desde os Estados Unidos até o Chile. Esta análise definiu 43 grupos distintos, denominados "clonets", que não puderam ser reunidos em grupos menores (Tibayrenc *et al.*, 1986). O grande desequilíbrio de ligação observado nos 15 "loci" analisados sugeriu que a reprodução sexual em *T. cruzi* é inexistente ou muito rara. Concluiu-se ainda que a estrutura populacional do parasita é clonal, com evolução independente dos indivíduos (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1988).

Outro marcador genético analisado foi o DNA de cinetoplasto (kDNA). O cinetoplasto é uma região especializada da única mitocôndria dos protozoários da ordem Kinetoplastida, onde se concentra o DNA. O kDNA é formado por uma rede de DNAs circulares. Esse DNA consiste de milhares de pequenos minicírculos (10.000 a 30.000 moléculas de 1,4 Kb em *T. cruzi*) e algumas dezenas de maxicírculos (cerca de 30 moléculas de aproximadamente 33 Kb em *T. cruzi*) (Stuart, 1983). A comparação do padrão eletroforético dos fragmentos do DNA de minicírculos digerido com enzimas de restrição ("restriction fragment length polymorphism" - RFLP) permitiu reunir populações com padrões eletroforéticos semelhantes em grupos denominado esquizodemas (Morel *et al.*, 1980). Os esquizodemas apresentam grande variabilidade interna, principalmente quando se consideram isolados de diferentes países e de populações pertencentes aos ciclos silvestre ou doméstico (Solari *et al.*, 1992). Além da tradicional análise por RFLP, outros métodos como amplificação por PCR ("polymerase chain reaction") das regiões variáveis de minicírculos, que apresentam alta taxa de evolução (Avila *et al.*, 1990) e hibridização de sondas de minicírculos (totais ou clonados) ao kDNA total (Macina *et al.*, 1987) ou aos produtos de amplificação (Avila *et al.*, 1990) de diversos isolados foram utilizados para a análise dos mesmos.

A técnica de impressões digitais do DNA ("DNA fingerprinting") é utilizada para discriminar indivíduos de uma mesma espécie e baseia-se na análise do padrão de microssatélites, seqüências contendo repetições consecutivas de 1, 2, 3 ou 4 nucleotídeos. Esta técnica foi aplicada em *Trypanosoma cruzi* utilizando-se uma sonda para microssatélites humanos (Jeffreys *et al.*, 1985). Obteve-se um padrão cepa-específico que

permitiu definir alguns agrupamentos (Macedo *et al.*, 1992). Esses agrupamentos reproduzem aqueles obtidos por kDNA (Macedo *et al.*, 1992).

Outra técnica que utiliza como alvo os microssatélites é o SSR-PCR ("simple sequence repeat anchored primer PCR"), que envolve uma reação de amplificação do DNA genômico utilizando como iniciadores sequências CA_nRY (trechos $(CA)_n$, $(GT)_n$, denominados repetições CA), que são os microssatélites mais comuns em eucariotos. A amplificação é feita em condições estridentes e a diferença de tamanho entre as bandas se deve a inserções/deleções nas regiões entre as repetições CA. Diversas cepas de *T. cruzi* tiveram seu genoma analisado por SSR-PCR e os dados foram utilizados para elaboração de um fenograma, cujo padrão geral é comparável aos obtidos por RAPD ("randomly amplified polymorphic DNA") e "fingerprinting" (Oliveira *et al.*, 1997).

Outra metodologia para análise genética de um organismo é o cariótipo. Em protozoários os cromossomos não condensam durante a divisão celular, impedindo sua visualização por microscopia (Hecker *et al.*, 1994). O estudo dos cromossomos é feito, então, por eletroforese de campo pulsado ("pulsed field gel electrophoresis"-PFGE). A determinação do cariótipo molecular de aproximadamente 45 isolados de *T. cruzi*, cujas bandas cromossômicas foram hibridizadas com quatro genes clonados, mostrou um padrão que se correlaciona com o zimodema do isolado (Henriksson *et al.*, 1993).

A associação entre padrões de isoenzimas e cariótipo molecular reforça a hipótese de população clonal, pois uma reprodução sexuada envolve recombinação genética entre cromossomos, afetando essa correlação (Henriksson *et al.*, 1993; 1995).

Duas linhagens filogenéticas em *T. cruzi*

O alinhamento das sequências do gene de rRNA 24S α (um dos genes que codificam RNA da subunidade grande do ribossomo, ver detalhes adiante) de *C. fasciculata* (Spencer *et al.*, 1987), *T. brucei* (Campbell *et al.*, 1987) e *T. cruzi* (Arruda *et al.*, 1990) mostrou elevada identidade (85-90%), com exceção de algumas regiões discretas. Uma destas regiões, com aproximadamente 100 pb e situada na extremidade 3' do gene, foi utilizada em nosso laboratório para detecção específica do parasita utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e oligonucleotídeos complementares a regiões flangeadoras (Souto & Zingales, 1993). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida. Surpreendentemente, dois tipos de produtos foram observados dependendo da cepa de *Trypanosoma cruzi* empregada: um de 110 pb e um de 125 pb. A maior parte das cepas analisadas apresentava apenas um dos dois tipos de fragmentos, enquanto algumas apresentaram ambos. O DNA foi transferido para membrana e o Southern blot foi então hibridizado com sondas obtidas a partir dos fragmentos amplificados (sonda $\alpha 1$ e $\alpha 2$, derivadas dos fragmentos de 125 e 110 pb,

respectivamente), observando-se que cada sonda só hibridizava com o fragmento de tamanho correspondente (Souto & Zingales, 1993). A ausência de hibridização cruzada (sob condições estridentes) foi explicada pela divergência de 15-25% entre as sequências dos dois fragmentos (Souto *et al.*, 1996).

Foi proposta então a divisão das cepas de *T. cruzi* em três grupos: o Grupo 1, composto pelas cepas que originam fragmentos amplificados de 125 pb; o Grupo 2, formado pelas cepas que originam fragmentos de 110 pb e o Grupo 1/2, que compreende as cepas que originam ambos os tipos de produtos de amplificação. Dos 88 isolados analisados, 41 pertenciam ao Grupo 1; 37 ao Grupo 2 e 10 ao Grupo 1/2 (Souto, 1996; Souto *et al.*, 1996).

Para comparar a organização do cistron ribossômico dos três grupos foi realizado um Southern blot no qual o DNA genômico de várias cepas foi digerido com a enzima *Pst*I (que digere em regiões flangeadoras do gene 24S α) e hibridizado com uma sonda derivada do gene 24S α da cepa Y. Observou-se hibridização com uma banda de 3,8 Kb para cepas de Grupo 1 e 3,6 Kb para cepas de Grupo 2. As cepas de Grupo 1/2 apresentaram ambos os fragmentos, sendo a intensidade da banda de 3,6 Kb aproximadamente dez vezes maior do que a de 3,8 Kb, o que sugere a presença de um número de cópias superior para genes de tipo 2 em relação aos de tipo 1 (Souto *et al.*, 1996).

Tendo em vista evidências de variação de sequência na região intergênica dos genes de mini-exon de diferentes cepas de *T. cruzi* (McCarthy-Burke *et al.*, 1989), buscou-se verificar uma possível correlação entre o dimorfismo dos genes de rRNA e de mini-exon em estoques do parasita. Para tal, isolados classificados quanto ao domínio divergente de rRNA (grupos 1, 2 e 1/2) foram submetidos a PCR visando amplificar um trecho do espaçador intergênico dos genes de mini-exon. As cepas de grupo 1 de rRNA originaram um produto de 300 pb do gene de mini-exon; as cepas de grupo 2 de rRNA originaram um produto de 350 pb de mini-exon. As cepas de grupo 1/2 de rRNA geraram apenas o produto de 300 pb (Souto *et al.*, 1996).

Para analisar a extensão da divergência no cistron de mini-exon foram feitos experimentos de Southern blot de DNA genômico de várias cepas digerido com *Pst*I e hibridizados com sonda de mini-exon. Foram observadas diferenças entre cepas de grupos distintos: enquanto as cepas de rDNA Grupos 1 e 1/2 apresentaram hibridização com DNA de alto peso molecular, as cepas de rDNA Grupo 2 mostraram hibridização com fragmentos de 0,9 e 0,6 Kb. As diferenças observadas nos Southern blots com as sondas de rDNA e mini-exon indicaram que a estrutura de ambos os cistrons difere entre cepas de grupos 1, 2 e 1/2 (Souto *et al.*, 1996). A estrutura do cistron de mini-exon e a tipagem deste gene por PCR sugeriram que as cepas de grupo 1/2 estariam mais relacionadas com as de grupo 1 do que das de grupo 2, sugerindo uma dicotomia na

espécie. Experimentos de PFGE também indicaram maior semelhança entre cariótipos moleculares de cepas de mesmo grupo do que de cepas de grupos distintos (Souto *et al.*, 1996).

Após ter verificado a presença de dimorfismo nas duas famílias multigênicas (rRNA e mini-exon), decidiu-se avaliar a divergência entre cepas com base em regiões anônimas do genoma, através da técnica de RAPD. Experimentos de RAPD com 25 isolados, utilizando três oligonucleotídeos escolhidos randomicamente mostraram que 51% das bandas foram compartilhadas entre todos os isolados, 66% entre isolados pertencentes a grupo 1 de mini-exon e 72% entre isolados de grupo 2 de mini-exon. Uma quantidade de bandas inferior a 35% foi comum a isolados de grupos distintos (Souto *et al.*, 1996). Os dados de RAPD foram utilizados para a elaboração de um fenograma por UPGMA ("unweighted pair group method analysis"). A figura 1 mostra o resultado obtido, bem como a classificação de cada isolado por rDNA e mini-exon. O traçado obtido mostra uma dicotomia no taxon *T. cruzi*, sendo um ramo composto por isolados de grupo 2 de rDNA e mini-exon e outro por isolados de grupo 1 de mini-exon e 1 e 1/2 de rDNA (Souto *et al.*, 1996).

Com base na análise de dois marcadores nucleares independentes e de sequências anônimas foi proposto que o taxon *T. cruzi* é representado por duas linhagens filogenéticas, denominadas linhagem 1 (L1)- que inclui cepas de grupo 1 e 1/2 de rDNA- e linhagem 2 (L2)- que compreende cepas de grupo 2 (Souto *et al.*, 1996).

A expressão dos genes ribossômicos nos três grupos de cepas foi estudada por RT-PCR (reação de amplificação precedida de transcrição reversa) utilizando os mesmos oligonucleotídeos flanqueadores do domínio divergente do gene 24S α . Para cepas de Grupo 1 obteve-se uma banda de 125 pb, para as de Grupo 2 de 110 pb e para as de Grupo 1/2 uma banda de 110 pb. Estes resultados sugerem que os isolados de Grupo 1/2 expressam somente os genes de tipo 2, embora apresentem ambos os tipos de genes em seu genoma (Souto, 1996). Deve ser lembrado que este grupo de cepas possui dez vezes mais genes de grupo 2 do que de grupo 1 (Souto *et al.*, 1996).

Nota: Nesta dissertação serão utilizadas as denominações L1 e L2 para identificar as linhagens filogenéticas de *T. cruzi* e as denominações de grupos 1, 2 e 1/2 para identificar os grupos de cepas definidos a partir da amplificação do gene 24S α .

Figura 1. Fenograma baseado em bandas não compartilhadas em RAPD (Souto *et al.*, 1996)

A presença de duas linhagens filogenéticas em *T. cruzi* também foi confirmada a partir da análise de isoenzimas de 258 "clonets" (clones naturais caracterizados por padrões próprios) (Tibayrenc, 1995). Dois pontos devem ser ressaltados: a) que Tibayrenc reviu conclusões anteriores (Tibayrenc & Ayala, 1988), nas quais postulava-se que as cepas de *T. cruzi* não podiam ser reunidas em grupamentos definidos dada sua enorme heterogeneidade; b) que a linhagem 1 (L1) definida por nosso grupo (Souto *et al.*, 1996) corresponde à linhagem 2 de Tibayrenc (1995) e ao zimodema II de Miles (Miles *et al.*, 1980), e que nossa linhagem 2 (L2) corresponde à linhagem 1 de Tibayrenc e ao zimodema I de Miles.

Um trabalho recente utilizando a técnica de "riboprinting" (amplificação do gene de rDNA 18S por PCR seguido de digestão do produto com enzimas de restrição e análise em gel) também levou à separação de 21 estoques de *T. cruzi* em dois grupos principais, nos quais predominavam isolados de zimodema I ou II, sendo a posição dos de zimodema III intermediária e não coesa (Stothard *et al.*, 1998).

A análise de 30 isolados por PCR usando diversos oligonucleotídeos de microsatélites levou à elaboração de uma árvore, com base no método de parsimônia de Wagner, cuja topologia foi coerente com a divisão de *T. cruzi* em duas linhagens. Os isolados de grupo 1/2 se posicionaram mais próximos aos de grupo 2 (Oliveira *et al.*, 1998), contrariamente ao que havia sido observado a partir da análise por RAPD (Souto *et al.*, 1996).

Estudos epidemiológicos sugerem uma associação de isolados de L1 com o ciclo doméstico e de L2 com o silvestre. Organismos de ambas as linhagens estão presentes em triatomíneos dos dois ciclos (Zingales *et al.*, 1998). A análise de isolados derivados de populações humanas de 12 estados brasileiros sugere que isolados de L1 estão preferencialmente associados à doença de Chagas, sendo encontrados em regiões endêmicas como Minas Gerais, Piauí e Paraíba, enquanto que parasitas de L2 são observados na Amazônia. Os estudos também indicam que a L1 induz parasitemia mais elevada em humanos em relação à L2 (Zingales *et al.*, 1998). A adaptação da L2 ao ciclo silvestre é confirmada pelas observações de que gambás da espécie *Didelphis marsupialis*, reservatório silvestre característico de *T. cruzi*, infectados com parasitas de ambas as linhagens, eliminam cepa de L1, extremamente virulenta para camundongos, e mantêm cepas de L2 indefinidamente, sem lesão tecidual (Jansen *et al.*, 1997).

Tomados em conjunto, os dados citados apoiam a divisão do *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas. Diversas hipóteses podem ser elaboradas para explicar a origem das duas linhagens e do grupo 1/2 -que por análises de RAPD faz parte da L1 (Souto *et al.*, 1996) e por microssatélites está mais próximo da L2 (Oliveira *et al.*, 1998)- bem como de um isolado denominado SC43, que apresenta padrões isoenzimáticos semelhantes aos clones de grupo 1/2, rDNA de tipo 2 e mini-exon de L1 (ver fig. 1). Duas destas hipóteses foram preferencialmente analisadas, e são apresentadas na figura 2 (Souto *et al.*, 1996). Uma delas (A) propõe a existência de ancestrais de tipo 1 (rDNA 1/mini-exon 1) e de tipo 2 (rDNA 2/mini-exon 2) e a ocorrência de uma transferência de rDNA de indivíduo de tipo 2 para um de tipo 1, gerando o ancestral do grupo 1/2. O surgimento da cepa SC43 teria ocorrido por perda do rDNA tipo 1 em um organismo derivado deste ancestral.

Uma segunda hipótese (B) se baseia em um ancestral de tipo 2 (rDNA 2/mini-exon 2) que originaria duas linhagens: uma correspondente aos indivíduos de L2 e outra que sofre troca dos genes de mini-exon de tipo 2 por tipo 1 e aquisição do rDNA de tipo 1. A conservação dos dois tipos de rDNA, associados a genes de mini-exon tipo 1 originaria isolados de grupo 1/2, enquanto que a perda do rDNA de tipo 1 destes caracterizaria o processo que gerou o clone SC43. A perda de rDNA tipo 2, por sua vez, originaria indivíduos de L1 (rDNA 1/mini-exon 1) (Souto *et al.*, 1996).

Figura 2. Hipóteses para explicar o surgimento das duas linhagens filogenéticas de *T. cruzi*, do grupo 1/2 e do isolado SC43 (rDNA2, ME 1) (Souto *et al.*, 1996).

Genes Ribossômicos

Os ribossomos são componentes celulares majoritários, responsáveis pelo processo de tradução. O número de ribossomos é proporcional à atividade de síntese proteica, sendo que os ribossomos ativos estão associados direta ou indiretamente a estruturas celulares. Cada ribossomo é formado por duas subunidades, sendo uma duas vezes o tamanho da outra. Em procariotos a menor subunidade ("small subunit"- SSU) apresenta um tipo de RNA e aproximadamente 20 proteínas, enquanto que a maior subunidade ("large subunit"- LSU) apresenta dois tipos de RNAs e 30 proteínas. Em eucariotos a subunidade pequena é composta de um RNA e 30 proteínas e a maior de 3 RNAs e 40 proteínas. Ribossomos de eucariotos superiores apresentam mais proteínas e RNAs mais longos do que os de bactérias, e sua maior subunidade apresenta um rRNA adicional, o 5,8S, derivado do RNA 23S (RNA da subunidade grande) bacteriano (revisto em Lewin, 1994).

O cistron ribossômico compreende os genes que originam os RNAs das subunidades grande e pequena do ribossomo (com exceção do RNA 5S) e a região intergênica. Os genes de rDNA são adjacentes e separados por espaçadores. Em procariotos há uma ou várias cópias do cistron, tanto concentradas como distribuídas no genoma. Em eucariotos há desde uma cópia (*Tetrahymena*) até vários milhares de cópias da unidade de transcrição, bem como dos espaçadores intergênicos (IGS) adjacentes. Dois espaçadores internos separam os genes 18S, 5,8S e 28S, e um espaçador externo precede o 18S, sendo precedido pelo IGS, que possui de 2 a 30 Kb e

contêm repetições de nucleotídeos que podem atuar como ativadores ("enhancers") (Lewin, 1994; Hillis *et al.*, 1991). As cópias do cistron são organizadas em tandem e encontram-se concentradas em um ou alguns sítios do cromossomo, denominados organizadores de nucléolo. O nucléolo é uma estrutura que se forma na intérfase e que corresponde ao local de transcrição do rDNA, processamento do rRNA e formação do ribossomo (revisto em Sollner-Webb & Tower, 1986)

A formação dos ribossomos citoplasmáticos maduros requer diversas etapas pós-transcricionais: clivagem do precursor, que apresenta 35-45S ou 6-15 Kb (Sollner-Webb & Tower, 1986), gerando os RNAs das subunidades grande e pequena; modificação dos pré-rRNAs por metilação e pseudouridilação e das proteínas ribossômicas por metilação, acetilação e fosforilação; associação dos RNAs e proteínas ribossômicas gerando as subunidades citoplasmáticas maduras (Mataj *et al.*, 1993).

Pequenos RNAs nucleolares, snoRNAs ("small nucleolar RNAs"), participam de diversas etapas deste processo, provavelmente na forma de complexos ribonucleoproteicos (Mataj *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1998). Estes RNAs são identificados pela presença de motivos conservados, associação com proteínas nucleolares, complementaridade com pré-rRNAs e localização específica no nucléolo. Existem dois tipos básicos de snoRNAs: os que apresentam "box" C/D, possuem trechos de complementaridade com rRNA, interagem com fibrilarina (uma proteína nucleolar abundante) e guiam a metilação na posição 2' OH da ribose; e os que possuem "box" H/ACA, responsáveis pela pseudouridilação do rRNA. Alguns snoRNAs que possuem "box" C/D ou H/ACA não estão envolvidos nas modificações de nucleotídeos, mas parecem participar das clivagens e dobramento do rRNA e formação do ribossomo (Roberts *et al.*, 1998).

O cistron ribossômico de tripanossomatídeos

O cistron de RNA ribossômico de tripanossomatídeos apresenta um arranjo bastante complexo quando comparado com o cistron de procariotos e demais eucariotos (fig.3). A maior diferença é verificada no gene de rDNA 28S, que em tripanossomatídeos é fragmentado em genes menores denominados 24S α , S1, 24S β , S2, S4 e S6 (Campbell *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 1988; White *et al.*, 1986). A localização dos genes no cistron de rDNA de tripanossomatídeos foi deduzida a partir de distintas abordagens: a) experimentos de Southern blot de DNA genômico de *T. cruzi* hibridizado com RNA (Hernández & Castañeda, 1983) e de DNA de recombinantes contendo regiões do cistron de *T. brucei* hibridizados com os vários rRNAs (Hasan *et al.*, 1984; White *et al.*, 1986); b) por Northern blots de rRNA de *T. cruzi* hibridizado com clones do cistron (Hernández *et al.*, 1988); c) por dot blots de snRNAs hibridizados

com os clones citados (Hernández et al., 1988) e d) pela comparação de mapas de restrição do cistron de *T. brucei* com os de outros eucariotos (White et al., 1986). A identificação das espécies de rRNA na subunidade maior do ribossomo (LSU) foi feita pela comparação das estruturas primária e secundária dos RNAs encontrados em *Crithidia fasciculata* com os de outros eucariotos e pela localização dos genes no rDNA (Spencer et al., 1987). Os genes de RNA 5,8S e 5S de eucariotos são denominados em tripanossomatídeos, respectivamente, S3 e S5 (White et al., 1986). A correspondência entre 5,8S e S3 foi sugerida pelo fato de ambos formarem pontes de hidrogênio com o rRNA da LSU. Essa característica do RNA S3 foi descoberta pela análise em gel desnaturante (poliacrilamida-uréia 7M) dos RNAs extraídos a partir das regiões acima de 15S de gradientes de SDS-sacarose e EDTA-sacarose (Cordingley et al., 1980). A equivalência entre estas duas espécies de rRNA, bem como entre S5 e 5S, foi confirmada por comparação de sequências (Hasan et al., 1984). O gene de rRNA 5S (S5) está localizado em outra região do genoma tanto em tripanossomatídeos (White et al., 1986) quanto nos demais eucariotos (Fedoroff, 1979), sendo que nos primeiros apresenta maior número de cópias do que os demais genes ribossômicos (Hasan et al., 1984).

Os genes de rRNA de tripanossomatídeos, assim como dos demais eucariotos, formam unidades de repetição em "tandem" que são separadas por espaçadores intergênicos (IGS, "intergenic spacers") (fig.4). Cada unidade de repetição (cistron) é transcrita pela RNA polimerase I em um precursor (pré-RNA), o qual é processado sequencialmente dando origem às espécies de RNA maduras (Long & David, 1980). A síntese do pré-RNA inicia-se no tsp ("transcription start point"), que delimita o início do ETS ("external transcribed spacer"), o qual se estende até o início do gene 18S (fig. 4). O tsp foi mapeado em diversos tripanossomatídeos, e sua distância aproximada em relação ao gene 18S é: 1200 pares de bases em *Trypanosoma brucei* (White et al., 1986);

1050 pares de bases em *Crithidia fasciculata* (Grondal et al, 1990); aproximadamente 1550 pares de bases na cepa CL (Dietrich et al, 1993) e 1768 pares de bases na cepa La Cruz (Martínez-Calvillo, 1994) de *Trypanosoma cruzi*; e 1047 pares de bases em *Leishmania amazonensis* (Uliana et al., 1996). O tamanho do ETS mostrou pequena variação entre as várias espécies estudadas, o que sugere uma organização semelhante neste espaçador (Uliana et al, 1996). O transcrito primário, que em *Crithidia fasciculata* possui aproximadamente 10 Kb (Grondal et al, 1990), contém o ETS, os genes de rRNA e os espaçadores internos que os separam (ITS, "internal transcribed spacers") (fig.4). O processamento deste transcrito, estudado em *Trypanosoma brucei* (White et al, 1986) e em *Crithidia fasciculata* (Grondal et al, 1990), ocorre em duas etapas. A primeira delas origina duas espécies de RNA. Em *Trypanosoma brucei* esse processamento ocorre a 5' do gene S3 e gera uma espécie de RNA de 3,4 Kb (que contém o rRNA 18S) e uma espécie de 5,6 Kb (que contém os rRNAs da subunidade ribossômica maior). Em *Crithidia fasciculata* a primeira clivagem ocorre na extremidade 3' do gene S3 (Grondal et al, 1990). A segunda etapa consiste no processamento da espécie de rRNA de 5,6 Kb nos ITS, gerando os rRNAs S1, S2, S3, S4, S6, 24S α e 24S β (White et al, 1986).

Os RNAs S1, S2, S3, S4, S5 e S6 estão presentes em quantidades equimolares nos ribossomos (Cordingley et al., 1980), bem como os RNAs 24S α e 24S β . Estes últimos são ligados por pontes de hidrogênio e podem ser dissociados por agentes desnaturantes fortes (Castro et al, 1980).

Diversos mecanismos foram propostos para a clivagem específica entre os genes do RNA 5,6 Kb (ver Campbell, 1987). Um desses mecanismos seria o reconhecimento por parte de uma enzima processadora de uma sequência específica. Esta proposta é pouco provável tendo em vista o consenso reduzido entre as sequências das regiões de clivagem. Outro mecanismo propõe o reconhecimento de determinadas estruturas (por exemplo junções entre regiões de DNA de simples fita e de dupla fita). Um terceiro mecanismo prevê a clivagem em regiões onde haja modificação de bases (por exemplo, metilações).

O processo de formação dos ribossomos em tripanossomatídeos parece ser semelhante àquele dos demais eucariotos, sendo o processamento do rRNA feito por snoRNAs (Levitan *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1998). De fato, foi identificado em *Leptomonas collosoma* um snoRNA de 85nt, denominado snoRNA-2, que parece participar da metilação dos RNAs 5,8S e 18S (Levitan *et al.*, 1998). O snoRNA mais abundante nos eucariotos, o U3, também foi encontrado em tripanossomatídeos, mais especificamente em *Trypanosoma brucei*, e deve estar envolvido nas clivagens dos pré-rRNAs (Roberts *et al.*, 1998). Outros snoRNAs foram identificados em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania talentolae*, sendo que um deles (de 75-76 nucleotídeos) participa da metilação do rRNA da subunidade pequena do ribossomo (SSU RNA) e outro (de 92-94 nucleotídeos) parece guiar a metilação do RNA da subunidade grande (LSU RNA) (Roberts *et al.*, 1998).

Regulação da Transcrição

Na maior parte dos eucariotos a RNA polimerase I transcreve apenas genes ribossômicos. Esta enzima, de massa molecular superior a 500kDa, é composta de várias subunidades, algumas similares a subunidades de RNA polimerase II e III. A RNA pol I não é capaz de iniciar a transcrição no ponto correto na ausência de fatores trans-atuantes (Jacob, 1995). Proteínas que agem *in trans* localizam promotores sequência-específicos, iniciam, prosseguem e terminam a transcrição. A transcrição é regulada por quatro tipos de elementos reguladores *cis*-atuantes: o promotor gênico, um ou mais promotores do espaçador, ativadores que estimulam os dois promotores e terminadores. Estes elementos, juntamente com os genes de rDNA, formam um bloco que se repete diversas vezes no genoma. Cada unidade de repetição contém duas unidades de transcrição: a iniciada a partir do promotor gênico, que se estende até o terminador a 3' da região codificante e a iniciada nos promotores do espaçador, que termina a 5' do promotor gênico (Reeder, 1992).

O promotor gênico foi estudado em várias espécies de eucariotos, e seu tamanho mínimo parece depender das condições da reação de transcrição (Sollner-Webb & Tower, 1986). Um modelo geral descreve o domínio promotor proximal como a região entre -40 e +5, que liga os fatores de transcrição necessários e é suficiente para induzir a iniciação. Um outro domínio se estende por mais 120nt no sentido 5' do promotor proximal e é denominado UCE ("upstream control element") ou UPE ("upstream promoter element") (Sollner-Webb & Tower, 1986; Jacob, 1995).

Em vertebrados pelo menos dois fatores proteicos SL1 e UBF são necessários para a localização do promotor gênico e formação de um complexo estável. SL1 parece ser limitante nas células, e a presença de várias cópias dos ativadores ajuda promotores

a competir pela formação de complexos estáveis (Reeder, 1992). UBF interage com UPE, com o promotor proximal e com os ativadores, provavelmente via HMG “boxes” repetidas. Estas “boxes” participam da interação com DNA e com outros fatores. As regiões de ligação são ricas em GC, e a interação é fraca, sendo fortalecida pela interação com SL1 (Reeder, 1992). Estudos realizados em *Xenopus* sugerem que a interação entre UBF e os ativadores aumenta a probabilidade de formar complexos estáveis no promotor, possivelmente através do recrutamento de RibI (SL1) para o mesmo (McStay *et al.*, 1997). Embora tenha sido identificado em vários eucariotos inferiores e superiores, UBF foi purificado em poucas espécies (Jacob, 1995).

O fator iniciador de transcrição recebeu vários nomes: SL1 em humanos e ratos, TIF-IB, fator D ou SL1 em camundongos, RibI em sapos (Jacob, 1995; Reeder, 1992). Esse fator é um complexo multiproteico que contém a proteína ligante de TATA (TBP) associada a proteínas ligantes de DNA sequência-específicas e outros fatores, alguns espécie-específicos (Ashapkin *et al.*, 1995). Sua capacidade de ligação a DNA varia de espécie para espécie: em humanos e sapos não é capaz de se ligar ao DNA na ausência de UBF, já em roedores não depende de outros fatores para sua ligação. Em *Xenopus laevis* RibI é um complexo instável, cuja estabilização depende da ligação de UBF, através de múltiplas interações proteicas (Bodeker *et al.*, 1996). O fator SL1 de diferentes organismos parece idêntico, mas apresenta afinidade seletiva pelo promotor homólogo, sendo possivelmente responsável pela espécie-especificidade do complexo de transcrição (Jacob, 1995).

Os fatores TIF-IA, TFIC ou fator C foram purificados. Eles associam-se a RNA Pol I e estão envolvidos na transcrição dos genes ribossômicos regulada pelo crescimento (Jacob, 1995).

O fator TIF-IC atua na iniciação da transcrição em camundongos. Interage com a RNA polimerase, facilitando sua interação com o promotor e a formação dos complexos de pré-iniciação, e evitando iniciação inespecífica. O fator CPBF, identificado em ratos e homem, parece interagir com o fator E1BF/ Ku e promover o início da transcrição de modo não espécie-específico. A DNA topoisomerase I é necessária para transcrição de rDNA supercoiled *in vitro*, mas não *in vivo*. Os fatores E1BF/ Ku de rato e homem interagem com o promotor proximal e com os ativadores; E1BF não é espécie-específico. A proteína REB-1 (ou Reb 1p) de levedura liga-se ao terminador e induz terminação e liberação da RNA pol I (Jacob, 1995).

Em levedura um complexo multiproteico associa-se com grande afinidade à região UCE do promotor, estimulando a transcrição. Esse complexo ativador inclui as histonas H3 e H4, o que justifica a alta afinidade pelo DNA e permite a transmissão de sinais nucleares para a maquinária de transcrição da RNA polimerase I (Keener *et al.*, 1997).

Situados a 5' do promotor gênico, no IGS, encontram-se os promotores do espaçador. Estes assemelham-se ao promotor gênico, sendo o grau de similaridade entre eles variável de espécie para espécie: em *Xenopus laevis* os promotores tem 90% da sequência comum, enquanto que em camundongo apenas 12 pb são compartilhados.

O padrão de funcionamento desses promotores depende do organismo considerado; em *Xenopus laevis* relacionam-se com a organização e ativação da expressão gênica, sendo dispensáveis após o início da mesma (Reeder, 1992).

Os efeitos estimulatórios de sequências distantes do ponto de início de transcrição (tsp) foram descritos pela primeira vez em *Xenopus laevis*, e posteriormente atribuídos a elementos repetitivos, ativos em ambas as orientações e a vários Kb do tsp. Nesta espécie, as repetições estimulam promotores gênicos e de espaçador e ocorrem em blocos de 6-12 unidades, cada qual situado após um promotor de espaçador. Elas aumentam a atividade de promotores *in cis*, mas competem com promotores *in trans* (Reeder, 1992). Apresentam certa identidade de sequência com a região ligante do fator UBF (upstream binding factor) do promotor gênico e ligam UBF e SL1 (Sollner-Webb, 1991). Um dos fenômenos que apoia a hipótese da ligação dos fatores de transcrição nos ativadores e da competição *in trans* é a dominância nucleolar entre *Xenopus laevis* e *X. borealis*. Os níveis de transcrição em ovócitos e embriões de *Xenopus laevis* e *Xenopus borealis* obtidos a partir de construções contendo o promotor ribossômico de uma das espécies precedido do espaçador homólogo ou heterólogo foram comparados. Observou-se que as construções que continham o espaçador de *X. laevis*, qualquer que fosse o promotor e a célula receptora, apresentavam 20 vezes mais transcrição do que as construções correspondentes que apresentavam o espaçador de *X. borealis*. A região espaçadora de *X. laevis* contém pelo menos 17 cópias dos elementos repetitivos ativadores, enquanto que o espaçador de *X. borealis* possui apenas 4 cópias de um elemento repetitivo similar. Deste modo, o nível de transcrição do gene ribossômico é proporcional ao número de ativadores adjacentes ao promotor (Reeder & Roan, 1984).

Esses ativadores são específicos para RNA polimerase I, e o estímulo parece ser devido ao deslissamento ou cooperatividade entre os fatores ligados nos ativadores e o promotor gênico, situado a 3' (Sollner-Webb & Tower, 1986). Elementos semelhantes foram descritos em levedura (Kang *et al.*, 1995), camundongo (Pikaard *et al.*, 1990), *Drosophila*, humanos (Sollner-Webb & Tower, 1986) e *Acanthamoeba* (Yang *et al.*, 1994).

Elementos repetitivos foram também descritos no IGS de *Trypanosoma cruzi* (Dietrich *et al.*, 1993; Novak *et al.*, 1993; Pulido *et al.*, 1996). No entanto, um trecho de 1,45 Kb contendo o promotor gênico e a região upstream (contendo as repetições) não levou a expressão gênica superior à obtida apenas na presença do promotor (Tyler-Cross *et al.*, 1995).

Além de ativadores, a transcrição dos genes de rDNA pode ser afetada por inibidores, entre eles a DNA topoisomerase II e o fator E1BF obtido a partir de células carenciadas de soro (Jacob, 1995).

Um elemento inibidor, denominado organizador de repetição (RO), foi identificado na região espaçadora do cistron de rRNA de *Xenopus laevis*. Essa sequência situa-se a 5' dos promotores de espaçador (que antecedem os ativadores), separa cópias consecutivas do "cluster" e evita que os ativadores de uma cópia estimulem o promotor a 5' (Robinett *et al.*, 1997).

Elementos terminadores de transcrição são encontrados antes do promotor gênico (após a unidade de transcrição do espaçador, dirigida pelos promotores do espaçador) e após a região codificadora do rRNAs (após a unidade de transcrição gênica, dirigida pelo promotor gênico) (Reeder, 1992; Sollner-Webb & Mougey, 1991). O término do rRNA se dá próximo ao gene 28S em camundongos e próximo ao promotor do gene adjacente em *Drosophila* e sapos (Baker & Platt, 1986).

Os terminadores da unidade de transcrição do espaçador, que em vertebrados situam-se 40-60 pb "upstream" do promotor gênico, têm como principal função evitar que a transcrição iniciada nos promotores do espaçador prossiga ao longo do promotor gênico. É possível que proteínas associadas ao terminador também interajam com o promotor gênico, auxiliando na iniciação (Baker & Platt, 1986; Reeder, 1992). Essa hipótese é sustentada pela observação de que a ligação do fator TTF-I no terminador de camundongo leva a um rearranjo na posição do nucleossomo na região promotora, o que talvez seja o primeiro passo do processo de início de transcrição (Langst *et al.*, 1997). Além disso, a deleção de um elemento terminador de sapo reduziu a quantidade de transcritos do promotor gênico adjacente, provavelmente por diminuir a estabilidade do complexo de pré-iniciação (Baker & Platt, 1986).

Terminadores foram identificados em sapo, camundongos, *Xenopus laevis*, *Drosophila* (Sollner-Webb & Tower, 1986) e *Leishmania infantum* (Requena *et al.* 1997). Esses elementos são específicos de RNA polimerase I e a parada da transcrição pelo fator ligado ao DNA é seguida de clivagem vários nucleotídeos "upstream" do sítio de ligação do fator (Jacob, 1995).

Especificidade da transcrição

Os promotores de RNA polimerase II e III são sequências consenso localizadas a distâncias fixas do tsp. Promotores de polimerase I de espécies distantes parecem não apresentar sequências comuns (Sommerville, 1984). Por outro lado, sua posição em relação ao tsp é conservada, sugerindo manutenção de uma estrutura geral (Sollner-Webb & Mougey, 1991). A grande divergência de sequência é dada pela alta taxa de

fixação de mutações destas regiões. Isso é possível porque a RNA pol I está comprometida apenas com um tipo de gene, o ribossômico, ao contrário do que se observa com RNA pol II e III. Essa variação foi provavelmente determinada pela evolução conjunta da enzima e de fatores de transcrição (Sommerville, 1984), o que provavelmente justifica a maior espécie-especificidade da transcrição pela RNA pol I quando comparada à realizada pelas outras duas polimerases (Sollner-Webb & Tower, 1986).

De modo geral, o reconhecimento do promotor de RNA polimerase I de uma espécie por outra depende do espaçamento entre os domínios do mesmo. A alteração da distância entre os domínios do promotor de sapo, por exemplo, o torna ativo em um extrato de camundongo (Reeder, 1992).

A questão da espécie-especificidade da maquinária de transcrição da pol I é um pouco controversa. Genes de rDNA de camundongo não são transcritos em extratos humanos e de *Acanthamoeba*, e genes de *Acanthamoeba*, *Drosophila* e *Physarum* não são transcritos em extratos de camundongo (Grunt *et al.*, 1982). A ausência de reconhecimento entre maquinárias de espécies pouco relacionadas leva ao fenômeno da dominância nucleolar. Um exemplo são os híbridos de células somáticas humanas e de camundongo, nos quais fatores de transcrição essenciais de uma das espécies são perdidos ou inativados, levando à expressão dos genes da outra espécie (Reeder & Roan, 1984). Mais precisamente, quando o cromossomo contendo o gene SL1 de uma espécie do híbrido é perdido, os genes ribossômicos desta espécie tornam-se silenciosos (Reeder, 1992). Curiosamente, DNA nucleolar de *Dysticus* é transcrito normalmente quando injetado em ovócitos de *Xenopus*, e em um determinado ensaio extratos de camundongo transcrevem rDNA clonado de sapo (Sollner-Webb & Tower, 1986). A maquinária sintética entre espécies mais próximas como *X. laevis*-*X. borealis*; homem-macaco; camundongo-rato; camundongo-hamster também é compatível.

A espécie-especificidade da transcrição pela RNA polimerase I depende da enzima e dos fatores associados. Um mesmo fator de transcrição pode apresentar especificidade distinta quando se considera sua atuação no ativador ("enhancer") e no promotor. Por exemplo, fator UBF humanos não é ativo no promotor de *Xenopus*, embora seja capaz de se ligar a este com alta afinidade. Por outro lado, esse fator é capaz de estimular a transcrição pela interação com o ativador heterólogo, sugerindo que as atuações do UBF no promotor e no ativador sejam distintas (McStay *et al.*, 1997).

Os fatores UBF e SL1 contribuem para a espécie-especificidade da transcrição da RNA polimerase I. Dentre os mamíferos, UBFs de várias espécies são intercambiáveis; já entre organismos mais distantes como mamíferos e anfíbios, o fator UBF se mostra espécie-específico. A maior especificidade parece ser dada pelo fator

SL1, mesmo nas espécies em que este não interage diretamente com o DNA. Nestes casos, a especificidade pode ser dada pelo aumento da seletividade da ligação do complexo que inclui UBF (Reederm, 1992).

Tradução de transcritos de RNA polimerase I?

A transcrição em eucariotos é realizada por três polimerases, que diferem quanto à localização celular, ao tipo de RNA gerado e à inibição por compostos como a α -amanitina. A RNA polimerase I, responsável por 50-70% da transcrição celular, situa-se no nucléolo, é insensível a α -amanitina e, na maioria dos organismos, gera apenas rRNA. A RNA polimerase II produz 20-40% do RNA celular, localiza-se no nucleoplasma, é fortemente inibida por baixas concentrações de α -amanitina e transcreve o hnRNA (precursor do mRNA) e a maior parte dos UsnRNAs (Hamm & Mattaj, 1990). A RNA polimerase III transcreve menos do que 10% do RNA total, sendo este correspondente a tRNAs e pequenos RNAs. Esta enzima situa-se no nucleoplasma e sua inibição por α -amanitina depende da espécie: é praticamente nula em insetos e leveduras, é significativa em altas concentrações da droga em outros animais (Lewin, 1994).

Os RNAs transcritos pela polimerase II, geralmente iniciados em purinas, recebem um "cap" de guanosina invertida m7G (5')ppp(5')N durante a transcrição, por uma ligação 5'-5' fosfato catalisada por fatores (guanidil transferases, metil transferases, etc) associados à enzima. Em seguida ocorre remoção dos introns do mRNA pelo mecanismo de "splicing"; clivagem na extremidade 3' e poliadenilação, e transporte para o citoplasma. O "cap" 5' parece ser essencial para o "splicing", transporte, estabilidade e tradução do mRNA (Hamm & Mattaj, 1990). Os principais fatores que interferem na exportação do RNA do núcleo são o "cap" e a presença de introns, sendo o "cap" dependente da polimerase que efetuou a transcrição. Os mRNAs sofrem tradução no citoplasma; os UsnRNAs transcritos pela polimerase II (U1-U5 e U7) associam-se a proteínas gerando UsnRNPs, sofrem hipermetilação no "cap" e retornam para o núcleo, onde atuam no processo de "splicing" (Hamm & Mattaj, 1990).

Os transcritos da RNA polimerase I não apresentam modificações na extremidade 5', o que impede sua tradução na maioria dos eucariotos. De fato, quando esta enzima é forçada a transcrever genes codificantes de proteínas em células de mamífero (por transfecção com plasmídeo recombinante), o transcrito resultante não é processado em mRNA funcional possivelmente pela ausência de "cap" 5' característico (Sollner-Webb & Mougey 1991).

Em *Trypanosoma brucei*, porém, os genes de PARP ("procyclic acidic repetitive protein") e VSG ("variant surface glycoprotein"), que codificam proteínas das formas

procíclica e sanguínea do parasita, respectivamente, são transcritos por uma RNA polimerase resistente a α -amanitina (Sollner-Webb & Mougey, 1991). Essa observação é bastante surpreendente, já que nos eucariotos em geral os genes codificantes de proteínas são transcritos pela RNA polimerase II, sensível à droga. Uma das hipóteses para explicar esse paradoxo é a de que esta transcrição é dirigida por uma forma modificada de polimerase II. Essa hipótese é reforçada pela presença de dois tipos de RNA polimerase II em *T. brucei* e pelo fato de a transcrição de VSG assemelhar-se à de tubulina quanto ao efeito de fenantrolina, EDTA e magnésio (Grondal, 1989). Outra hipótese é que a transcrição destes genes é dirigida pela polimerase I. Essa hipótese é sustentada por diversas evidências. Uma delas é a de que a transcrição de PARP e VSG não é alterada quando se deletam os primeiros 1800nt dos dois alelos da RNA polimerase IIB. Outra evidência é a similaridade da organização dos promotores de PARP e rDNA em termos de estrutura geral, sequência e dependência de sequências em torno do tsp (Brown *et al.*, 1992). Uma terceira observação que corrobora essa hipótese é a atividade de promotores híbridos de PARP e rDNA (Chung *et al.*, 1992), sugerindo similaridade de sítios de ligação de fatores. Outra evidência ainda é a de que a transcrição (em "nuclear run-on") de rRNA, VSG e PARP, mas não de genes codificantes de proteínas, é resistente a sarcosil (Chung *et al.*, 1992). Estudos funcionais também favorecem esta hipótese: o promotor de rDNA foi utilizado para dirigir a expressão de genes reporter em *T. brucei* transfectados estável ou transitoriamente. Em transfecções transitórias a expressão do gene reporter foi similar à obtida com VSG e PARP (Zomerdijsk *et al.*, 1991). Em transfecções estáveis a expressão do gene reporter se mostrou resistente a α -amanitina e os transcritos se localizavam na região do nucléolo de *T. brucei* (Rudenko *et al.*, 1991).

Os tripanossomatídeos apresentam os três tipos de RNA polimerases, mas transcritos de polimerase II não apresentam estrutura "cap" na extremidade 5'. A adição do cap se dá pelo processo de "trans-splicing", que consiste na ligação de um RNA de 39nt portador de "cap", o mini-exon ou "spliced leader", à extremidade 5' dos mRNAs. A existência deste processo faz com que a transcrição se torne independente da obtenção de mRNAs maduros para tradução, possibilitando que transcritos de diferentes polimerases sejam traduzidos, desde que apresentem mini-exon (Chung *et al.*, 1992).

O processo de "trans-splicing"

O processo de "trans-splicing" ocorre em todos os mRNAs de tripanossomatídeos (incluindo os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*), em mais de 15% dos mRNAs de nematódios (Agabian, 1990), em trematódios e euglenóides (Ullu *et al.*, 1996). Foi identificado pela primeira

vez em *T. brucei*, a partir da observação da presença de um trecho de 35nt na extremidade 5' dos RNAs de VSG, não codificado por regiões adjacentes do genoma (Boothroyd & Cross, 1982). Posteriormente esta sequência foi observada em outros mRNAs e em outros gêneros de tripanossomatídeos (Milhausen *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1984; De Lange *et al.*, 1984). Verificou-se que o RNA adicionado, denominado "spliced leader" ou mini-exon, apresentava 39 e não 35nt, como descrito inicialmente (McCarthy-Burke & Buck, 1989) em todos os tripanossomatídeos com exceção de *Leptomonas collosoma*, na qual possui 41nt (Ullu *et al.*, 1996). Esta sequência provém da extremidade 5' de um RNA de aproximadamente 100nt, o SL-RNA ou med RNA, cujo tamanho varia de espécie para espécie (fig. 5). O med RNA consiste do mini-exon e de um intron. A sequência do mini-exon é bastante semelhante entre organismos distintos (24 dos 39nt são idênticos), enquanto que a do intron é bastante divergente, com exceção do dinucleotídeo GU na extremidade 5' (Milhausen *et al.*, 1984) e de uma sequência de Ts no final do RNA (McCarthy-Burke *et al.*, 1989). Por outro lado, as estruturas secundárias do med RNA são bastante conservadas, sendo caracterizadas por três ramos ("loops") (McCarthy-Burke *et al.*, 1989; Lucke *et al.*, 1996).

Os genes que codificam o med RNA estão dispostos em blocos de aproximadamente 10 cópias, separados por um espaçador, totalizando 200 cópias (De Lange *et al.*, 1983). A transcrição parece ser realizada pela RNA polimerase III (Grondal *et al.* 1989). O transcrito não apresenta cauda poliA e apresenta uma estrutura "cap" na extremidade 5'. Esse "cap" é formado pela adição de um nucleotídeo G invertido (através de uma ligação 5'-5' fosfato) e metilado, e pela metilação dos quatro nucleotídeos seguintes. A estrutura resultante, denominada m⁷Gppp-N⁶, N⁶, 2'-O-trimetilA-p-2'-O-metilA-p-2'-O-metilC-p-N³-2'-O-metilU, difere do "cap" de nematódios e trematódios (2,2,7 trimetilG), e apresenta duas alterações exclusivas de tripanossomatídeos (Ullu *et al.*, 1996). Transcritos com "cap" alterado podem ser tão estáveis quanto os de "cap" normal, mas não participam do "trans-splicing". Por outro lado, med RNAs com cap normal podem não ser capazes de atuar no "trans-splicing", mostrando que este processo apresenta outros requisitos além da estrutura "cap" (Lucke *et al.*, 1996).

Os mRNAs processados por "trans-splicing" apresentam algumas características comuns e outras distintas dos RNAs processados por "cis-splicing". As sequências das imediações do ponto de ramificação ("branch site") e do sítio acceptor não são conservadas quando se comparam diferentes espécies de tripanossomatídeos ou genes de uma mesma espécie. Os pontos de ramificação identificados em *Leishmania* (Ramamoorthy *et al.*, 1996) e *T. brucei* (Patzelt *et al.*, 1989) são nucleotídeos de A situados "upstream" do tsp, mas as sequências que os flanqueiam não são conservadas. As sequências que circundam os pontos de ramificação envolvidos no processo de cis-

splicing, porém, são conservadas entre várias espécies, como mamíferos e leveduras (Patzell, 1989). Os sítios aceptores de "*trans*-splicing" são sequências AG, precedidas por trechos de polipirimidinas (Huan & Van Der Ploeg, 1991), de modo semelhante às sequências aceptoras de *cis*-splicing. O tamanho e composição dos trechos são bastante variáveis, e estes podem ser eficientemente substituídos por trechos sintéticos (Curotto de Lafaille, 1992) ou por trechos de outras espécies (Metzenberg & Agabian, 1996). De modo geral, o sítio aceptor utilizado com maior frequência corresponde ao AG mais próximo à maior ORF do gene (Vassella *et al.*, 1994). O processamento por "*trans*-splicing" deve ser rápido (a meia vida do SLRNA é de 4-6 minutos) e ocorrer logo após a transcrição, já que SL intron e exon são observados 3-4 minutos após o início da mesma. De fato, o "*trans*-splicing" de α -tubulina, β -tubulina e actina ocorrem 1 a 2 minutos após a síntese do sítio aceptor de splicing (Ullu *et al.*, 1993).

O processo de "*trans*-splicing" consiste da clivagem do med RNA, liberando o mini-exon (extremidade 5') e o intron. Este último associa-se ao pré-mRNA na região do ponto de ramificação via ligação 2'-5' fosfodiéster (Sutton & Boothroyd, 1988), dando origem ao intermediário em forma de Y. Este intermediário é então clivado no ponto de junção com o gene, e o mini-exon liga-se à nova extremidade 5' do pré-mRNA, na região denominada sítio aceptor de "*trans*-splicing" (Agabian, 1990; Laird, 1989, Ullu *et al.*, 1996) (fig. 5). O processo de "*cis*-splicing" também se inicia com a clivagem entre o exon 1 e o intron. O nucleotídeo G da extremidade 5' do intron (iniciada por GU, como no "*trans*-splicing") associa-se ao nucleotídeo A do ponto de ramificação por uma ligação 2'-5' fosfodiéster, gerando um intermediário em forma de laço. Ocorre então clivagem entre o intron (após o AG) e o exon 2 e ligação dos dois exons (Ullu *et al.*, 1996).

Ambos os processos são catalisados por pequenos complexos ribonucleoproteicos nucleares, os snRNPs. O mecanismo de "*cis*-splicing" de vários eucariotos é bastante conhecido: o U1 RNP liga-se à região 5' do intron, o U2 associa-se ao ponto de ramificação, provocando um dobramento no mRNA e os fatores U4, U5 e U6 associam-se ao complexo. Em seguida ocorre desestabilização da ligação do U4 ao RNA, ligação dos dois exons e liberação do intron em forma de laço (Mattaj *et al.*, 1993).

O processo de "*trans*-splicing" também requer UsnRNPs. Os UsnRNAs de tripanossomatídeos, com exceção do U6, apresentam "cap" trimetilG típico dos snRNAs. Esses UsnRNPs, ao contrário do que se observa nos demais eucariotos, não mostram reatividade cruzada com anti-corpo anti-Sm (Ullu *et al.*, 1996) e são formados por diversas proteínas, sendo 5 delas comuns a todos os complexos estudados (incluindo o que contém o SL RNA) (Ullu *et al.*, 1996). Já foram identificados em tripanossomatídeos os RNAs U2, U4 e U6, que se encontram próximos no *trans*-

spliceossomo. Os RNAs U4 e U6 são conservados entre nematódios e tripanossomatídeos, enquanto que o U2 deste último grupo apresenta várias alterações (Bonen, 1993). Uma destas diferenças é a ausência da sequência GUAGUA, complementar ao ponto de ramificação (que nestes organismos também não tem sequência consenso), que é substituída por um trecho rico em Us e As (em *T. brucei*, UAUUAA) (Nilsen, 1995). Outra é a inexistência do ramo III (Agabian, 1990).

O SL RNA tem uma função semelhante à do U1 RNA, podendo ser seu análogo/substituto na reação de "trans-splicing" (Bonen, 1993; Nilsen, 1995). O SLA RNA, identificado em *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. seymouri* e *C. fasciculata*, foi estudado em maiores detalhes em *T. brucei*. Neste organismo, esse RNA é estável, não apresenta cap 7metilG (semelhante ao SL RNA) nem 2,2,7 trimetil G (como os U RNAs) e deriva de um gene de múltiplas cópias (Roberts *et al.*, 1996). Em todas as espécies citadas, o transcrito apresenta 7nt conservados na extremidade 5', complementares à região do 5' spliced site do SL RNA, sugerindo homologia com o U5 RNA (Ullu *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1996).

O "trans-splicing" é um processo necessário na produção de mRNAs maduros em tripanossomatídeos. A maior parte dos transcritos nestes organismos são policistrônicos e o mini-exon e a cauda poliA formam as extremidades do RNA maduro. Os trechos utilizados para o reconhecimento do aceptor de "trans-splicing" encontram-se na região intergênica e são também utilizados para poliadenilação do gene situado "upstream" (Schurch *et al.*, 1994; Vassela *et al.*, 1994). Evidências apontam que o "trans-splicing" precede a poliadenilação, uma vez que a maior parte dos mRNAs não processados encontra-se na fração poliA⁻, e o mRNA processado encontra-se igualmente distribuído nas frações poliA⁺ e poliA⁻. Além disso, a inibição do "trans-splicing" (pela inativação do U2 RNA com um oligonucleotídeo complementar) levou à produção de transcritos não processados na extremidade 3' e não poliadenilados (Ullu *et al.*, 1993).

Transfecção em tripanossomatídeos

O estudo dos processos de transcrição e a identificação de possíveis sequências promotoras em tripanossomatídeos foram iniciados a partir do desenvolvimento das técnicas de transfecção.

Os experimentos de transfecção em tripanossomatídeos foram realizados por eletroporação, o único método (além de microinjeção) para introduzir DNA em organismos unicelulares grandes (Potter, 1988).

A eletroporação se baseia em princípios físicos que tratam a membrana celular como um capacitor incapaz de conduzir corrente. A aplicação de um campo elétrico de

alta voltagem causa danos temporários na membrana e formação de poros suficientemente grandes para passagem de macromoléculas. O fechamento destes poros é um processo natural, o qual pode ser adiado mantendo-se as células a 0°C. O DNA exógeno introduzido na célula por esse método permanece livre no citoplasma e no nucleoplasma, não sendo incorporado em vesículas fagocíticas (como ocorre com DNA co-precipitado com fosfato de cálcio ou DEAE-dextrana), o que reduz o nível de mutações (Potter, 1988).

Há essencialmente dois sistemas de transfecção: transitórios e estáveis. Os primeiros baseiam-se na introdução de um plasmídeo e determinação da expressão de um gene reporter (presente no plasmídeo) pouco tempo depois. Os últimos representam alterações permanentes no genoma da célula alvo, seja pela manutenção de um epissomo, seja pela inserção de um plasmídeo ou fragmento de DNA no cromossomo.

Em tripanossomatídeos foram utilizados os dois sistemas de transfecção. Em *Trypanosoma brucei* a formação de epissomos é rara, e a integração se dá por recombinação homóloga, a qual é facilitada pela utilização de DNA linearizado. Em transfecções transitórias é necessária, ao contrário de *Leishmania*, a presença de um promotor de *Trypanosoma* genuíno. Em *Trypanosoma cruzi* a integração também se faz por recombinação homóloga, mas é comum a manutenção de plasmídeo em múltiplas cópias, geralmente como grandes elementos extracromossômicos contendo várias cópias do vetor em tandem (Kelly *et al.*, 1995).

Os primeiros estudos de transfecção em tripanossomatídeos foram feitos em *Leptomonas seymouri* por sua facilidade de cultivo em meio líquido e em placas de ágar. A construção consistiu do promotor de mini-exon, seguido da sequência do mini-exon e do gene reporter CAT (cloranfenicol acetil transferase), por sua vez seguido de um trecho regulatório que pudesse atuar na terminação da transcrição. A transfecção foi transitória e não foi possível detectar RNA de CAT (Bellofatto & Cross, 1989; Cross *et al.*, 1990).

Um dos experimentos de transfecção estável foi obtido com a construção de um vetor contendo um gene de *T. cruzi* cuja região central foi substituída pelo gene neomicina fosfotransferase (NEO^r), que confere resistência à droga G418. Os parasitas resistentes foram selecionados e tiveram seu genoma analisado, confirmando a presença do gene substituído (Otsu *et al.*, 1993). Um outro experimento de transfecção estável consistiu na clonagem do gene NEO^r na região codificante do gene de α tubulina de *Leptomonas seymouri* e sua introdução em células deste parasita. Todas as colônias resistentes a G418 apresentavam o plasmídeo na forma não integrada, circular, multimérica e capaz de replicação autônoma. O aparecimento de células sem plasmídeo indicou sua segregação aleatória e não a ausência de replicação, pois muitas células

continuaram apresentando o vetor mesmo na ausência de seleção pela droga (Bellofatto et al., 1993).

Experimentos de transfecção transitória são utilizados principalmente para identificar ou confirmar regiões promotoras. Embora os níveis de RNA sejam a melhor medida da atividade promotora, sua quantificação é complicada e nem sempre precisa. Como opção, é possível elaborar uma construção plasmidial na qual o promotor é seguido de um gene reporter, cuja expressão é analisada nas células transfectadas. A atividade deste gene deve ser distinguível de qualquer atividade endógena; não deve ser afetada por outras atividades que, por exemplo, possam competir por substrato ou cofatores e deve ter um método de dosagem rápido, sensível, conveniente e reprodutível (Gorman et al., 1982). Um dos genes mais utilizados para este fim é o gene de CAT. Este gene, de origem bacteriana, codifica uma enzima que transfere grupamentos acila de uma molécula doadora (acetil-CoA ou butiril-CoA) para o carbono 1, 3 ou ambos do cloranfenicol. O produto desta reação é separado do cloranfenicol não alterado por sua maior hidrofobicidade em solventes orgânicos (Seed & Sheen, 1988).

Um outro gene reporter que permite analisar a atividade promotora e cujo uso tem aumentado nos últimos tempos é o GFP, "green fluorescent protein". A proteína GFP é comum em celenterados, e a mais estudada é proveniente de *Aequorea victoria*. Esta proteína emite luz verde (pico em 509nm) quando excitada pela luz azul (pico em 395nm) emitida por aequorina quando da ligação de cálcio (Chalfie et al., 1994). O cromóforo da GFP é formado pela ciclização de serina-dehidrotirosina-glicina, presentes num hexapeptídio que se inicia no aminoácido 64, por modificações pós-traducionais exclusivas desta proteína (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al., 1995). As propriedades fluorescentes da GFP dependem da sequência primária não só do hexapeptídio mas também do resto da molécula (Chalfie, 1995), uma vez que a conformação na proteína protege o cromóforo da atenuação da fluorescência por colisão com moléculas de água e oxigênio (Cubitt et al., 1995). A proteína madura é altamente estável, mantendo-se fluorescente até 65°C, pH 11, 1% SDS ou 6M cloreto de guanidina, e é resistente à incubação com a maioria das proteases por várias horas e a tratamentos de fixação com formaldeído, azida ou etanol (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al., 1995; Ha et al., 1996). O gene da GFP foi expresso pela primeira vez em *Escherichia coli* e *Caenorabditis elegans*, sendo utilizado posteriormente como reporter em levedura, plantas, vertebrados e invertebrados, tanto isoladamente quanto em fusão com outro gene, cuja especificidade pelo alvo não foi alterada (Cubitt et al., 1995; Ha et al., 1996). Em sistemas heterólogos, a fluorescência é observada após iluminação com luz azul, mostrando que a formação do cromóforo não é espécie-específica (Chalfie et al., 1994). Vários genes mutados de GFP foram obtidos, alguns dos quais têm sido preferidos em relação ao gene original por gerarem proteínas com maior intensidade de

fluorescência, maior rapidez na formação do cromóforo, picos de emissão e absorção distintos, ausência de fosfoisomerização e lenta atenuação do sinal (Cubitt *et al.*, 1995).

Experimentos de transfecção transitória em *T. brucei* e *Leptomonas seymouri* utilizando o promotor homólogo de mini-exon, seguido da sequência de mini-exon e do gene CAT mostraram expressão significativa do último. O uso de vetores de *T. brucei* em *L. seymouri* e vice-versa, porém, resultou em baixa expressão em ambos os organismos (Cross *et al.*, 1990). Em um outro experimento de transfecção transitória, a análise da atividade promotora de uma sequência a 5' do gene de mini-exon de *T. cruzi* baseou-se na clonagem da região citada em um plasmídeo contendo o gene e sua eletroporação em células do parasita (Lu & Buck, 1991). Outros experimentos basearam-se no estudo das regiões promotoras dos genes VSG (Zomerdijsk *et al.*, 1991) e PARP (Brown *et al.*, 1992) de *T. brucei* através da eletroporação de células do parasita com plasmídeos contendo os respectivos promotores seguidos de um sítio acceptor de "trans splicing" e do gene CAT.

A atividade do promotor ribossômico de *T. cruzi*

O cistron de rRNA de *T. cruzi* foi clonado por alguns grupos, inclusive o nosso. Em nosso laboratório foram obtidos dois recombinantes da cepa Y, cobrindo uma região de 30 Kb, a qual compreende o cistron ribossômico. Foi determinada a localização dos genes 18S, 24S α e 24S β e a sequência completa do gene 24S α e do srRNA S1. Um pseudogene derivado do gene 24S α foi identificado em outra região do genoma (Arruda *et al.*, 1990).

A região promotora de transcrição do cistron ribossômico foi caracterizada independentemente por dois grupos. O primeiro deles, trabalhando com a cepa CL, localizou o tsp+1 por Northern blots utilizando como sondas clones que se estendiam até 4 Kb "upstream" do gene 18S (Dietrich *et al.*, 1993). O clone p66, correspondendo à região mais distante do 18S e que hibridizava com o precursor mas não com o RNA maduro, foi utilizado em ensaios de nuclease S1 os quais, complementados por experimentos de "primer extension", permitiram a localização do tsp+1 como um nucleotídeo G situado a 1550 pares de bases do gene 18S (Dietrich *et al.*, 1993). Outro grupo (Martínez-Calvillo & Hernández, 1994), estudando a cepa La Cruz de *T. cruzi* e utilizando basicamente as mesmas técnicas, encontrou dois sítios de início de transcrição (tsp+1): um deles correspondente a um nucleotídeo G situado a 1768 pares de bases do gene 18S e o outro equivalente ao descrito para a cepa CL (Dietrich *et al.*, 1993).

O estudo da expressão transitória a partir do promotor ribossômico de *T. brucei* mediando a expressão de um gene reporter revelou que esta só é significativa em

vetores contendo um sítio aceptor de "trans splicing" a 3' da região promotora (Rudenko *et al.*, 1991). Estes dados contrastam com aqueles obtidos para *T. cruzi*, nos quais utilizou-se um vetor contendo o promotor ribossômico da cepa CL (o fragmento p66 já citado-Dietrich *et al.*, 1993) e o gene reporter CAT (fig. 6). Diferentes construções levaram à conclusão de que o promotor só é funcional quando disposto na orientação correta e que expressão de CAT é observada mesmo na ausência do sítio aceptor de "trans-splicing". A presença deste sítio, na orientação correta, leva a um aumento de aproximadamente dez vezes na expressão. O fato de haver expressão significativa do gene CAT na ausência do sítio aceptor sugere que haja utilização de um sítio aceptor críptico no interior do promotor. Este sítio seria, no entanto, menos eficiente (Tyler-Cross *et al.*, 1995). O vetor contendo o promotor ribossômico da cepa CL na orientação correta e o gene reporter CAT foi introduzido em *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. conorrhini*, *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas mega*, *Leptomonas seymouri*, *Phytomona serpens* e *Leishmania amazonensis*, observando-se expressão da enzima apenas em *T. cruzi* (Tyler-Cross *et al.*, 1995). Isto reforça evidências da existência de baixa identidade entre promotores ribossômicos de tripanossomatídeos (Dietrich *et al.*, 1993). Quando a construção foi introduzida nas cepas de *T. cruzi* CL, Y e Buriti observou-se forte expressão de CAT, enquanto que nas cepas C91 e Colombiana não se obteve expressão (Tyler-Cross *et al.*, 1995). Essa diferença de comportamento sugere que o promotor da cepa CL não é reconhecido nas cepas C91 e Colombiana.

Surgiu então a hipótese de que haveria uma especificidade/seletividade na atividade do promotor que poderia ser dependente da linhagem à qual pertencia determinada cepa de *T. cruzi*. Investigando esta hipótese, nosso laboratório, em colaboração com os grupos da Dra. Lucile Floeter-Winter (ICB-USP) e do Dr. Gregory Buck (Virginia Commonwealth University), comprovou que a atividade do promotor de CL era linhagem 1-específica, sendo observada nos 7 isolados de L1 mas não nos 7 isolados de L2 analisados (Floeter-Winter *et al.*, 1997).

A partir disso, nosso laboratório (presente trabalho) e o do Dr. Gregory Buck (Nunes *et al.*, 1997b) passaram a investigar o comportamento do promotor de L2 em diversos isolados do parasita. Os resultados obtidos são descritos no texto que segue.

2. OBJETIVOS

Partindo das observações de que o taxon *Trypanosoma cruzi* apresenta duas linhagens filogenéticas principais (Souto *et al.*, 1996); de que o promotor ribossômico da cepa CL (de L1) se mostrou funcional em apenas algumas cepas do parasita (Tyler-Cross *et al.*, 1995) e de que os promotores ribossômicos exibem um controle espécie-específico, surgiu a hipótese de que os promotores de rRNA de *T. cruzi* apresentariam características linhagem-específicas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho, iniciado em 1996, foi analisar a relação entre a classificação das cepas e a atividade do promotor ribossômico. Mais especificamente, analisamos a região promotora do cistron de RNA ribossômico nas duas linhagens de *Trypanosoma cruzi*, comparando seus mapas de restrição, sua sequência nucleotídica e sua atividade funcional.

Para esse estudo foram escolhidos clones representantes das duas linhagens: o clone CL Brener (L1), o clone Dm28c (L2) e o clone NR cl3 (L1, grupo 1/2).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Nucleotídeos radioativos: Amersham

- $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (3000Ci/mmol)
- $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (5000Ci/mmol)
- ^{35}S dATP αS (400Ci/mmol)
- D-threo-(dichloroacetyl-1- ^{14}C) chloramphenicol (55mCi/mmol)

3.2. Enzimas:

- DNA polimerase I (Boehringer Mannheim)
- DNase I (Boehringer Mannheim)
- enzimas de restrição (New England Biolabs)
- fosfatase alcalina (CIAP- Gibco BRL)
- Klenow (Boehringer Mannheim)
- nuclease S1 (Boehringer Mannheim)
- proteinase K (Boehringer Mannheim)
- RNase A (Sigma)
- Superscript II RT (Gibco BRL)
- T4 ligase (New England Biolabs)
- T4 polinucleotídeo quinase (PNK) (New England Biolabs)
- Taq DNA polimerase (Pharmacia)
- transcriptase reversa AMV (Boehringer Mannheim ou Pharmacia)
- TdT (Terminal desoxinucleotidil transferase) (Promega ou Pharmacia)

3.3. Vetores: apresentados na figura 7.

- pBluescript SK[®] (Stratagene)
- pGCAT-C (Frebourg & Brison, 1988)
- pTEX (Kelly *et al.*, 1992)

Figura 7. Plasmídios utilizados neste trabalho
 a. pBluescript II KS +/-
 b. pGCAT-C
 c. pTEX

3.4. Oligonucleotídeos: comerciais (1 a 3) ou elaborados para este trabalho (4 a 15). Comprados da GIBCO ou Promicro ou sintetizados no Oligo1000 DNA synthesizer (Beckman). Sequências apresentadas na tabela I.

Tabela I. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

	oligont.	orientação	sequência
1	M13-20p ^(a)	anti-sense	5'GTAAAACGACGGCCAGT 3'
2	reverse	sense	5'AACAGCTATGACCATG 3'
3	SP6	sense	5'GATTTAGGTGACACTATAG 3'
4	ac1	sense	5'GTTGGGGATCCTGTTTGTG 3'
5	ac2	anti-sense	5'TAGAGGATCCTGCCTGCG 3'
6	Ba	anti-sense	5'TCGAGAAGACTGTTGTTTGGAAAAGAAATTATT 3'
7	Bs	sense	5'GATCAATAATTTCTTTTCCAAACAACAGTCTTC 3'
8	CR	anti-sense	5'CAACGGTGGTATATCCAGTGA 3'
9	in1	sense	5'GCAAGCTTGGCGAGATT 3'
10	lme	sense	5'AACGCTATTATTGATACAGTTTCTG 3'
11	r1	sense	5'TTAGGATCTTTAATTTTCTC 3'
12	r2	sense	5'TCGCAAATGTCATGC 3'
13	s12	sense	5'TCGAATTTTGGGTACCCCT 3'
14	t1	anti-sense	5'CGATACGGCGATGCGAAACAAAAGACC 3'
15	t2	anti-sense	5'AAAAAGAACACGTTGATTCC 3'

(a) primer universal

3.5. Meios de cultura:

3.5.1. Para *Trypanosoma cruzi*:

- LIT modificado (Castellani *et al.*, 1967)

3.5.2. Para *Escherichia coli*

- Meio LB: Bacto triptona 10g/l, Extrato de levedura 5g/l, NaCl 10g/l, pH 7,0
meio LB amp: ampicilina para 100µg/ml em meio LB

- Placas LB: ágar 15g/l em meio LB

placas LB amp: ampicilina para 100µg/ml em meio LB com ágar

- Placas de meio mínimo: Na_2HPO_4 6g/l, KH_2PO_4 3g/l, NH_4Cl 1g/l, NaCl 0,5g/l, MgSO_4 0,2g/l, CaCl_2 0,1 g/l, glicose 2g/l, tiamina 1mg/l, ágar 15 g/l

- Meio SOB: Bacto triptona 20g/l, Extrato de levedura 5g/l, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, pH 7,5

- Meio SOC: Adicionar glicose para 20mM ao meio SOB

3.6. *Trypanosoma cruzi* : foram utilizados os seguintes isolados: Dm28, Dm28c, CL Brener, NR cl3, SO3 cl5, Esmeraldo cl3, Sylvio x10 cl1. Detalhes na tabela II.

Tabela II. Característica dos isolados de *T. cruzi* utilizados neste trabalho

Isolado	Hospedeiro	Origem	Linhagem ^(a)	Grupo ^(b)
CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	1	1
Esmeraldo cl3	humano- fase aguda	Brasil	1	1
NR cl3	humano- fase crônica	Chile	1	1/2
SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	1	1/2
Dm28	<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	2	2
Sylvio x10 cl1	humano-n.d. ^(c)	Brasil	2	2

(a) determinada por tipagem de genes de mini-exon e RAPD (Souto *et al.*, 1996)

(b) determinado por tipagem do gene ribossômico 24Sα (Souto *et al.*, 1996)

(c) não determinado

3.6.1. Cultivos de formas epimastigotas

As formas epimastigotas foram obtidas por cultivo em meio LIT, a 28°C, sem agitação. Diluições da cultura para aproximadamente 2×10^7 parasitas/ml eram feitas a cada três dias, aproximadamente. Foram mantidos estoques de 8×10^7 células em 1ml de LIT+ 10% DMSO em nitrogênio líquido.

3.7. *Escherichia coli*

3.7.1. Cepas: foram utilizadas as cepas DH5α e JM109, cujo genótipo é apresentado a seguir (Sambrook *et al.*, 1989):

- DH5α ® (Bethesda Research Laboratories): *supE44 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

- JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985): *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB)*

3.7.2. Manutenção das bactérias:

Estoques permanentes: em LB com 50% glicerol a -70°C

Estoques temporários: em placas de LBamp (DH5α) ou meio mínimo (JM109).

Antes do uso, tomava-se uma colônia da placa e inoculava-se em meio líquido. A cultura era mantida a 37°C sob agitação durante a noite.

3.8. Extração de ácidos nucleicos de *Trypanosoma cruzi*

3.8.1. Preparação de DNA total de formas epimastigotas

Aproximadamente 2×10^8 células foram centrifugadas a 5000xg por 10 minutos e ressuspensas em 150μl de tampão de lise TELT (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 62,5mM pH 9, LiCl 2,5M, 4% v/v Triton x100) e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 75μl de fenol e 75μl de clorofórmio, agitou-se em Vortex e centrifugou-se por 5 minutos. À fase aquosa acrescentou-se 300μl de etanol, misturou-se por 15 segundos e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Os ácidos nucleicos foram então recuperados por centrifugação de 15 minutos, lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 40μl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM pH 8).

Para remover o RNA da amostra, acrescentou-se RNase A para 20μg/ml e incubou-se a 37°C por 1 hora.

3.8.2. Isolamento de DNA plasmidial de células transfectadas

Foram coletadas 2×10^8 células nos dias 2, 4 e 7 após a eletroporação. As células foram centrifugadas a 5000g por 10 minutos, ressuspensas em PBS (tampão fosfato 10mM pH 7,2, NaCl 150mM), e centrifugadas novamente. Foram então ressuspensas em 1ml de PBS, transferidas para tubo eppendorf e centrifugadas em microcentrífuga por 1 minuto. O sedimento celular foi ressuspenso em 400μl de mistura de reação de DNase (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM pH 7,5, MgCl₂ 10mM, DNase 0,1mg/ml) e incubado a 37°C por 45 minutos.

Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS duas vezes. O sedimento assim obtido foi submetido a preparação de DNA total, como descrito acima (item 3.8.1).

3.8.3. Extração de RNA

Todos os materiais e soluções utilizados para a preparação de RNA foram tratados para remover Rnase. Materiais de vidro foram mantidos a 180°C por 4 horas e materiais de plástico eram novos. À água acrescentou-se dietilpirocarbonato (DEP) para 0,1%, incubou-se a 37°C por pelo menos 4 horas e autoclavou-se.

3.8.3.1. Extração com fenol ácido-tiocianato de guanidina (adaptada de Chomczynski & Sacchi, 1987)

Tomou-se 2×10^8 - 5×10^8 células de formas epimastigotas em meio LIT, centrifugou-se a 6000g por 10 minutos, removeu-se o meio e lavou-se o sedimento com PBS (3.8.2). Centrifugou-se e ressuspendeu-se o precipitado em 1ml de PBS, transferindo-o para tubo eppendorf. Centrifugou-se por 10 segundos em microcentrífuga, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 500µl de solução D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM pH 7, 10% sarcosil, 7,2% v/v β mercaptoetanol). Adicionou-se 50µl de acetato de sódio 2M pH 4. Acrescentou-se 500µl de fenol e 200µl de clorofórmio, agitou-se e centrifugou-se em microcentrífuga por 5 minutos. A fase aquosa foi recuperada e o RNA precipitado com igual volume de isopropanol a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se em microcentrífuga por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com etanol 75%. Centrifugou-se, descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi seco, ressuspensão em 50µl de água e mantido a -70°C.

Rendimento aproximado: 50µg de RNA

3.8.3.2. Gradiente de célio

Aproximadamente 5×10^8 formas epimastigotas foram lavadas três vezes com PBS (item 3.8.2) por centrifugações de 10 minutos a 6000g. O precipitado foi ressuspensão em 2,5ml de solução de lise (isotiocianato de guanidina 4M, β-mercaptoetanol 0,1M, acetato de sódio 50mM pH 7,2, EDTA 10mM) e homogenizado duas ou três vezes em Dounce. O homogenato foi transferido para tubos de centrifuga (rotor SW 50.1) sobre 2ml de CsCl 5,7M-EDTA 10mM e centrifugado em rotor SW 50.1 por 21 horas a 37000rpm, 20°C.

O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o RNA foi ressuspensão em 300µl de acetato de sódio 0,3M pH 6. A amostra foi submetida a extração com 1 volume de fenol-clorofórmio e o RNA foi precipitado com 750µl de etanol a -20°C durante a noite. Seguiu-se lavagem com etanol 80%, secagem e ressuspensão em água.

3.9. Extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

3.9.1. Método rápido (“speed-prep”) (He *et al.*, 1989)

Cada colônia foi semeada em 2ml de meio LB (item 3.5.2.) acrescido de ampicilina para 100µg/ml e mantida a 37°C sob agitação durante a noite. 1,5ml da cultura foram centrifugados por 30 segundos, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado ressuspenso em 100µl de solução A (4% v/v Triton x100, Tris-HCl 50mM pH 8,0, LiCl 2,5M, EDTA 62,5mM). Extraíu-se com 50µl de fenol e 50µl de clorofórmio e transferiu-se a fase aquosa para eppendorf com 200µl de etanol frio. Agitou-se brevemente, centrifugou-se por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de DNA lavado com 1ml de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente aspirado e a amostra foi seca a vácuo e ressuspensa em 10µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM) acrescido de RNaseA para 100µg/ml. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos.

Rendimento: 2 a 4µg de DNA

3.9.2. Preparação em pequena escala (“mini-prep”)

Uma colônia isolada foi inoculada em 4ml de meio LB amp e mantida a 37°C sob agitação durante a noite. Centrifugou-se 1,5ml de cultura em microcentrífuga por 1 minuto. Removeu-se o sobrenadante, acrescentou-se 1,5ml de cultura, repetiu-se o procedimento. O precipitado assim obtido foi ressuspenso em 100µl de solução TEG (glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8) e conservado à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200µl de solução NaOH 0,2N- 1% SDS recém preparada, inverteu-se o tubo 2 a 3 vezes e conservou-se em gelo por 5 minutos. Acrescentou-se 150µl de acetato de potássio 3M pH 4,8 frio, homogeneizou-se por inversões e manteve-se em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf. As proteínas foram extraídas com fenol e com clorofórmio, e à fase aquosa acrescentou-se 2 volumes de etanol. Agitou-se em Vortex, conservou-se à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugou-se por 5 minutos. O precipitado foi lavado com 1ml de etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 50µl de TE pH 8,0 com RNase para 20µg/ml.

Rendimento aproximado: 5µg de DNA

3.9.3. Preparação em média escala (“mid-prep”)

20-25ml da cultura incubada durante a noite foram centrifugados a 5000g por 10 minutos. O meio foi removido e o precipitado ressuspenso em 600µl de tampão TEG (glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8,0). Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos e adicionou-se 1,2ml de solução NaOH 0,2N- 1% SDS, mantendo-se em gelo por 5 minutos. Acrescentou-se 900µl de solução gelada de acetato de potássio 3M e centrifugou-se a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado com igual volume (2,7ml) de isopropanol a -20°C por 15 minutos. Centrifugou-se a 12000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi seco a vácuo e ressuspenso em 1,5ml de TE. Adicionou-se RNase para 50µg/ml finais e incubou-se a 37°C por 20 minutos. As proteínas foram removidas por extrações com fenol e com clorofórmio, e os ácidos nucleicos foram precipitados com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol a -20°C por 2 horas. Centrifugou-se a 12000g por 10 minutos a 4°C e aspirou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 250µl de água deionizada ou TE.

Rendimento: aproximadamente 200ng/µl de DNA

3.9.4. Preparação em larga escala

3.9.4.1. Gradiente de césio

Semeou-se 1 colônia do clone de interesse em 5ml de meio LB contendo antibiótico e manteve-se sob agitação a 37°C durante a noite. Transferiu-se 2ml desta cultura para 500ml de meio LB com antibiótico e incubou-se a 37°C, sob agitação, durante a noite.

Aproximadamente 500ml da cultura foram centrifugados a 7000rpm em rotor Beckman JA-14 ou Sorvall GSA por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 4ml de solução TEG (ver item 3.9.2). Adicionou-se 1ml de solução de lisozima (25mg/ml em solução I), misturou-se bem e manteve-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 10ml de solução NaOH 0,2N-1% SDS recém preparada, misturou-se lentamente por inversões e manteve-se em gelo por 10 minutos. A cada tubo foram adicionados 7,5ml de solução gelada de acetato de potássio 3M pH 4,8, misturou-se por inversões até o desaparecimento das diferentes fases e manteve-se em gelo por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 12000rpm por 10 minutos a 4°C em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34 (sem breque) e o sobrenadante foi filtrado em funil com 4 camadas de gaze. Foram acrescentados 0,6 volumes de isopropanol, misturou-se bem e manteve-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a 11000rpm por 20 minutos em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 4ml de TE.

Adicionou-se então 4,4g de CsCl, misturando-se até a completa dissolução. Acrescentou-se 0,4ml de solução de brometo de etídio (10mg/ml), manteve-se à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos e centrifugou-se a 8000rpm por 5 minutos em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34. O sobrenadante foi recuperado com pipeta ou por filtração em gaze. Ajustou-se o índice de refração da solução para 1,387 (correspondente a 1,55mg/ml de CsCl) e centrifugou-se a 60000rpm por 16-20 h (rotores VTi65 ou VTi80), ou 45000rpm por 48h (rotor Ti50), ou 60000rpm por 24h (rotores Ti65 ou Ti70.1), a 20°C. Coletou-se a banda de DNA.

Remoção do brometo de etídio: Adicionou-se 1 volume de butanol-1 saturado com água, agitou-se e manteve-se em repouso até a separação das fases. A fase alcoólica foi aspirada com trompa de vácuo. Repetiram-se as etapas acima descritas até desaparecimento da cor vermelha de ambas as fases. O CsCl foi removido por diálise contra 1000 volumes de TE por 24-48 horas com 3 a 4 trocas de tampão. Os ácidos nucleicos da amostra proveniente da diálise foram precipitados com acetato de sódio e etanol e ressuspensos em aproximadamente 1ml de TE.

Rendimento aproximado: 0,5 a 1,0mg de DNA/ 500ml de cultura

3.9.4.2. Colunas QIAGEN

Plasmid Mega Kit, utilizado segundo as especificações do fabricante

3.10. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Foram colocados em tubo eppendorf: 0,5-1,0µg de DNA, espermidina para 1mM final, BSA para 100µg/ml final, aproximadamente 10-20U de enzima (geralmente 10% do volume final da reação), 10% do volume total de tampão NEB (10x) e água. Volume final: 10 a 50µl. A reação foi incubada a 37°C por pelo menos 3 horas e interrompida pela adição de tampão de amostra 6x (30% glicerol, 0,25% p/v azul de bromofenol, 0,6% p/v SDS, EDTA 60mM pH 8) para 1x final. A amostra foi aquecida a 65°C por 5 minutos, transferida para gelo e aplicada em gel para análise após eletroforese

3.11. Eletroforese de DNA

3.11.1. Gel de agarose

A amostra de DNA digerida como descrito foi aplicada em gel de agarose (em TBE 1x com brometo de etídio para 0,5µg/ml) e a eletroforese realizada em TBE 1x com brometo de etídio, a uma voltagem constante de 10 V/cm.

Como marcadores de peso molecular utilizou-se DNA de fago λ cl857 digerido com *EcoRI* e *HindIII* ou um marcador de 100 pb (base pair ladder, Pharmacia), dependendo do tamanho dos fragmentos de interesse.

3.11.2. Gel de poliacrilamida

Tomou-se 1/5 do total da amostra amplificada por PCR ou RT-PCR ou o volume total de DNA digerido (no caso de a digestão gerar fragmentos suficientemente pequenos para dificultar sua análise em gel de agarose), acrescentou-se tampão de amostra, aqueceu-se por 5 minutos e transferiu-se para gelo. As amostras assim preparadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5% (acrilamida: bisacrilamida 29:1) (Sambrook *et al.*, 1989) em TBE, juntamente com o marcador de peso molecular (pUC19 digerido com *Sau3AI* ou marcador de 100 pb). A eletroforese foi realizada a 20mA por 90 minutos e o gel foi corado por incubação de 5 minutos em TBE 1x com 0,5 μ g/ml de brometo de etídio.

3.12. Transferência alcalina

3.12.1. Gel de agarose

Neste protocolo utilizou-se a membrana Zeta- Probe (Bio Rad), previamente lavada com água. Antes de iniciar a transferência o gel foi incubado sob agitação em HCl 0,2M por 10 minutos, para depurinação do DNA. Foi então lavado com água e submetido a duas incubações de 20 minutos em NaOH 0,4M/ NaCl 1M para desnaturação do DNA.

O DNA foi transferido para a membrana em NaOH 0,4M/ NaCl 1M por 1 hora utilizando o aparelho Trans-Vac TE-80 (Hoefer Sci. Instr.), sob pressão reduzida (250mmHg). Após a transferência, a membrana foi incubada em Tris-HCl 0,5M pH 7,2/ NaCl 1M por 5 minutos e seca sobre papel de filtro. O DNA foi fixado à membrana por exposição à luz UV por 5 minutos e aquecimento a 80°C por 30 minutos.

As etapas de pré-hibridização, hibridização e lavagens foram realizadas a 67°C, no MidiOven HyBaid.

A pré-hibridização foi realizada em 5% SDS, 3x SSC, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP, EDTA 1mM e esperma de salmão para 0,1mg/ml, por 90 minutos. A hibridização foi conduzida durante a noite, na mesma solução de pré-hibridização, com esperma de salmão 0,03mg/ml e sonda para 10⁶cpm/ml (ver item 3.16).

Após a hibridização, foram realizadas as seguintes lavagens: 30 minutos em 3x SSC-0,1% SDS, 30 minutos em 1x SSC-0,1% SDS e duas lavagens de 30 minutos em 0,1x SSC-0,1% SDS.

Para remover a sonda para reutilização da membrana, esta foi mantida em 0,1x SSC-0,5% SDS a temperatura superior a 90°C por pelo menos 1 hora, e exposta durante a noite para verificar a eficiência de remoção.

3.12.2. Gel de poliacrilamida

Para transferência utilizou-se membrana Zeta Probe (Bio Rad) previamente umedecida em água. Após eletroforese, o gel foi montado (sem tratamento prévio) sobre a membrana no sistema Trans-vac TE80 (Hoefer Sci. Instr.) e coberto com NaOH 0,4M. A transferência foi feita sob pressão reduzida (250mmHg) por 45 minutos.

A membrana foi lavada em 2x SSC e seca ao ar. O DNA foi fixado por exposição à luz UV por 5 minutos e aquecimento a 80°C por 30 minutos.

As etapas de pré-hibridização e hibridização foram realizadas a 5 ou 10°C abaixo da T_m do oligonucleotídeo (int1) (tabela I). A pré-hibridização foi feita em 6x SSC, 5% SDS, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP, EDTA 1mM e esperma de salmão para 0,1mg/ml. Para hibridização utilizou-se a mesma solução da pré-hibridização mas com esperma de salmão para 0,03mg/ml finais. Adicionou-se 0,1 a 1 pmol/ml de sonda (correspondentes a 10^6 cpm/ml de solução) e manteve-se no MidiOven HyBaid por 3 a 4 horas ou durante a noite.

As lavagens foram efetuadas na mesma temperatura da hibridização, por 30 minutos em 3x SSC e 0,1% SDS.

3.13. Extração de insertos de DNA com membrana DE-81

Realizou-se eletroforese em gel de agarose com tampão TAE. Inseriu-se um fragmento de membrana DE-81 aproximadamente da largura do poço próximo à banda de interesse. Realizou-se eletroforese por 5-10 minutos adicionais, verificou-se a transferência do DNA para a membrana sob luz UV. Transferiu-se a membrana para tubo eppendorf com 800µl de tampão de eluição (Tris-HCl 20mM pH 8,0, EDTA 2mM, NaCl 1,5M), manteve-se a 67°C por 30 minutos. A membrana foi retirada e a solução filtrada por passagem em ponteira com lã de vidro (centrifugação rápida).

Para remover o azul de bromofenol da solução, realizaram-se duas extrações com um volume de n-butanol e com butanol saturado com água.

Precipitou-se o DNA com 0,1 volumes de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol a -20°C durante a noite. Após centrifugação, lavou-se com etanol 70%. O DNA foi seco e ressuspenso em TE.

3.14. Reações de ligação

3.14.1. Inseto e vetor com extremidades compatíveis

Adicionou-se em tubo eppendorf quantidade desejada de vetor e de inserto (geralmente na proporção molar 1:5, respectivamente, totalizando 20 a 100ng de DNA), tampão de ligação 5x com PEG (Tris-HCl 250mM pH 7,6; MgCl₂ 50mM; rATP 5mM; DTT 5mM; 25% p/v PEG 8000) para 1x final, 1 a 3U de T4 DNA ligase e H₂O (para 10-30µl finais). Incubou-se a 16°C por pelo menos 16 horas.

3.14.2. Método "shotgun"

O processo baseia-se na ligação entre um inserto digerido com enzimas de restrição e um plasmídeo digerido com enzimas compatíveis, sem purificação prévia do inserto e do plasmídeo. Os DNAs são digeridos, purificados de proteínas por extração com fenol-clorofórmio e precipitados com acetato de sódio e etanol. A ligação é feita com esse material, do modo citado no item 3.14.1, e a seleção dos recombinantes desejados é feita mediante preparação do DNA plasmidial e digestão com enzimas de restrição.

3.14.3. Ligação de produtos de PCR ou RT-PCR

3.14.3.1. No vetor pBluescript-T

Os produtos de várias reações de PCR foram reunidos em tubo eppendorf e submetidos a extração com fenol-clorofórmio. Os ácidos nucleicos foram então precipitados com acetato de sódio 0,3M final e 2,5 volumes de etanol a -20°C durante a noite. O DNA recuperado foi utilizado em reação de ligação com o vetor pBluescript T (pBluescript clivado com *Eco* RV, ao qual foi acrescentado um nucleotídeo T- Marchuk *et al.*, 1990), preparado e gentilmente cedido por Euclides Mateucci Jr (IQ-USP).

Para tal, adicionou-se em tubo eppendorf quantidade desejada de vetor (1/10 do número de moles de inserto, aproximadamente), quantidade desejada de inserto (que com vetor totalize de 20 a 100ng), tampão de ligação com PEG (item 3.14.1), 3U de T4 DNA ligase e H₂O. Incubou-se a 16°C por aproximadamente 16 horas.

3.14.3.2. Em pBluescript de extremidades cegas

Com o intuito de gerar extremidades cegas para clonagem em pBluescript digerido com *EcoRV*, os produtos das reações de PCR foram submetidos ao seguinte tratamento: quantidade desejada de DNA foi extraída com fenol-clorofórmio ou purificada por coluna Microspin S-300 (Pharmacia) e precipitada com acetato de sódio e etanol. O precipitado foi ressuspenso em 7,5µl de água e adicionou-se 1µl de tampão de Klenow polimerase 10x (Tris-HCl 500mM pH 7,5, MgCl₂ 50mM, DTT 50mM). Acrescentou-se 1µl de Klenow 5U/µl e manteve-se a 37°C por 2 minutos. Foi adicionado 1µl de dNTPs 0,125mM e manteve-se a 37°C por 5 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 67°C por 5 minutos. Acrescentou-se 40µl de mistura de ligação (tampão com PEG, vetor, T4 DNA ligase, água-item 3.14.1) e incubou-se a 16°C durante a noite.

3.15. Transformação de *Escherichia coli*

3.15.1. Bactérias competentes frescas

Uma colônia da bactéria a ser utilizada foi semeada em 5ml de LB a 37°C sob agitação forte por 16-18hs. Transferiu-se 0,5ml da cultura para um frasco contendo 50ml de SOB e MgSO₄ para 10mM finais. Manteve-se a 37°C sob agitação por 2 a 4 horas, até obter A_{600nm} 0,4-0,6. Centrifugou-se a 2500rpm por 15 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1/3 do volume inicial de TFB (MES 10mM pH 6,3, MnCl₂.4H₂O 45mM, CaCl₂.2H₂O 10mM, KCl 100mM, cloreto de hexaminocobalto 3mM). Manteve-se em gelo por 10-15 minutos. Centrifugou-se a 2500rpm por 15 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 3,2ml de TFB (1/12,5 volume inicial). Adicionou-se 112µl de DnD (DTT 1M, 90% v/v DMSO, acetato de potássio 10mM pH 7,5) e manteve-se em gelo por 10-20 minutos. Aliquotas de 200µl foram distribuídas, e foram adicionados 6-7µl de DNA a cada uma. Os tubos foram mantidos em gelo por 30-40 minutos, transferidos para 42°C por 90 segundos e mantidos em gelo por no mínimo 2 minutos. O plaqueamento foi feito em placas LB amp, acrescidas de 65µl de XGal (2% em DMSO) e 25µl de IPTG (20% em água) (este apenas para linhagens indutíveis como JM109), as quais foram mantidas a 37°C durante a noite.

3.15.2. Bactérias competentes para armazenamento (Hanahan, 1983; Hanahan *et al.*, 1991)

3.15.2.1. Preparação das bactérias

Uma colônia de bactérias das linhagens DH5 α ou JM109 de *Escherichia coli* foi semeada em 10ml de SOB com MgSO₄ 10mM e mantida a 37°C sob agitação durante a noite. 1ml desta cultura foi então transferido para um frasco de 500ml com 100ml de SOB e MgSO₄ 10mM e incubado a 37°C sob agitação moderada (250 rpm) até atingir A_{600/ml} 0,4-0,6. A cultura foi centrifugada a 1000g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1/3 do volume da cultura inicial em TFB (item 3.15.1). Misturou-se e incubou-se em gelo por 10-15 minutos. Centrifugou-se a 1000g por 15 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1/3 do volume inicial de RF1 (RbCl 100mM, MnCl₂ 4H₂O 50mM, CaCl₂ 2H₂O 10mM, acetato de potássio 30mM, 15% glicerol, pH 5,8). Incubou-se em gelo por 15 minutos. Centrifugou-se a 1000g por 15 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1/12,5 volume inicial de RF2 (MOPS 10mM pH 6,8, RbCl 10mM, CaCl₂ 2H₂O 75mM, 15% glicerol, pH 6,8). Incubou-se em gelo por 15 minutos. Foram distribuídas alíquotas de 200 μ l em tubos eppendorf de 1,5ml pré-resfriados, as quais foram congeladas em banho de gelo seco e álcool e armazenadas a -70°C.

3.15.2.2. Transformação utilizando as células competentes congeladas

Os tubos contendo as bactérias competentes foram retirados do freezer e degelados à temperatura ambiente, sendo prontamente transferidos para gelo. Adicionou-se plasmídeo (até 20 μ l), misturou-se e manteve-se em gelo por 10-60 minutos. Incubou-se a 42°C por 90 segundos e recolocou-se em gelo. Adicionou-se 400 μ l de meio SOC com MgSO₄ 10mM e incubou-se a 37°C sob agitação moderada por 30 a 60 minutos. Foram plaqueados 200 μ l de cada tubo. O plaqueamento foi feito em placas de LB amp acrescidas de XGal e IPTG (apenas para linhagens indutíveis), as quais foram mantidas a 37°C durante a noite.

Frequência de transformação esperada: 10⁷ a 10⁸ transformantes/ μ g de plasmídeo.

3.16. Marcação de sondas

3.16.1. Por incorporação de nucleotídeos marcados

3.16.1.1. Por "random primer" (kit Gibco BRL)

Aproximadamente 200ng de DNA em 23µl de água foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e transferidos para gelo. Adicionou-se 2µl de dTTP, 2µl de dCTP, 2µl de dGTP, 15µl de tampão "random primer", 40µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ dATP e 1µl de Klenow DNA polimerase. A mistura foi mantida 25 °C (temperatura ambiente) por no mínimo 1 hora. Adicionou-se 5µl de Stop solution e 45µl de TE.

3.16.1.2. Por "nick translation" (NT)

Colocou-se em tubo eppendorf: 100ng de DNA, 5µl de tampão NT 10x (Tris-HCl 250mM pH 7,5, MgSO_4 10mM, DTT 1mM, BSA 25µg/ml), 2µl de DNase I (5µg/ml), 5µl de dNTP (-ATP) 0,5mM, 30µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ dATP, 5U de DNA polimerase I, água q.s.p. 50µl. Incubou-se a 16°C por 90 minutos, interrompeu-se a reação com 2µl de EDTA 0,5mM pH 8 e adicionou-se 50µl de TE.

3.16.1.3. Medida da incorporação

A medida da incorporação foi feita por precipitação com TCA ou pela análise da radioatividade presente em 1µl da amostra obtida após passagem pela coluna Sephadex. A seguir são descritos ambos os métodos.

TCA: Tomou-se 1µl de sonda e adicionou-se 89µl de NaPPi 0,2M, 30µg de esperma de salmão e H_2O q.s.p. 100µl. Aplicou-se 10µl em filtro GF/C e mediu-se a radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (radioatividade total). Tomou-se os 90µl restantes e adicionou-se 0,5ml de NaPPi 0,2M e 2,5ml de NaPPi 0,1M-20% TCA. Conservou-se em gelo por 10 minutos. Montou-se o aparato de filtração (Millipore) com filtro GF/C umedecido com 5% TCA. Aplicou-se, segundo a ordem apresentada: amostra; 5ml de NaPPi 0,1M- 5% TCA; 10ml de 5% TCA e 5ml de etanol. O filtro foi retirado, seco e submetido a contagem (radioatividade incorporada).

Coluna Sephadex G50: A coluna foi preparada em seringa de 1ml, e a resina foi empacotada por centrifugações sucessivas de 3 minutos a aproximadamente 1000xg. Antes de aplicar a sonda a coluna foi pré-equilibrada por duas centrifugações com 100µl de sTE (TE com NaCl para 0,1M) e após aplicação da sonda e centrifugação, realizou-se uma centrifugação adicional com 50µl de sTE. Tomou-se 1µl do volume total coletado (aproximadamente 150µl) e aplicou-se em papel de filtro. Foram acrescentados 5ml de líquido de cintilação não miscível (PPO 4g/l, POPOP 0,1g/l, em tolueno) e analisou-se a radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida. Comparou-

se o valor obtido com o correspondente a 1µl de sonda antes da passagem pela coluna para estimar a porcentagem de incorporação.

3.16.2. Por fosforilação de oligonucleotídeos

3.16.2.1. Reação de marcação

Na reação de marcação utilizou-se 10pmol de oligonucleotídeo, 2µl de tampão PNK 10x (Tris-HCl 500mM pH 7,6, MgCl₂ 100mM, espermidina HCl 1mM, EDTA 1mM pH 8,0), 30µCi de [γ ³²P] rATP (10µCi/µl), 1µl de DTT 100mM, 1µl de polinucleotídeo quinase (10U/µl) e H₂O q.s.p. 20µl.

Adicionou-se o oligonucleotídeo e a água em tubo eppendorf, o qual foi aquecido a 67°C por 5 minutos. Os outros componentes da reação foram então adicionados e a mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C. A enzima foi inativada por incubação a 67°C por 5 minutos.

3.16.2.2. Medida da incorporação e purificação

Adicionou-se 30µl de água e 50µl de acetato de amônio 8M. 1µl foi retirado para medir incorporação (1% do total). Ao restante foram acrescentados 250µl de etanol, e manteve-se a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se por 15 minutos, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 100µl de TE.

Medida da incorporação: 1µl da reação foi aplicado em papel Whatmann DE81 (DEAE celulose NA45) e seco. A radioatividade foi medida pelo programa Cerenkov (radioatividade total). O papel foi então lavado: 3 vezes de 20 minutos em Na₂HPO₄ 0,5M pH 7,0 e 2 vezes de 30 segundos em etanol 96%, seco e submetido a contagem como citado (radioatividade incorporada).

3.17. Reações de amplificação de ácidos nucleicos

3.17.1. Amplificação por PCR

3.17.1.1. Para clonar o sítio acceptor do gene 35.2:

Preparou-se a mistura de reação: 25pmol dos oligonucleotídeos ac1 e ac2 (tabela I), 5µl de tampão Taq 10x (KCl 500mM, MgCl₂ 15mM, Tris-HCl 10mM pH 9,0) dNTPs para 0,4mM finais, MgCl₂ para 3,0mM (além dos 1,5mM finais do tampão Taq), 1,25U Taq DNA polimerase, água para 49µl finais. Adicionou-se 10ng de DNA do

plasmídio P1as. Realizou-se a amplificação segundo o programa: 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos. Analisou-se 15µl da reação em gel de poliacrilamida 7,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo (item 3.11.2).

3.17.1.2. Para amplificar o promotor ribossômico endógeno de Dm28c, CL Brener, NR cl3 e SO3 cl5:

Preparou-se a mistura de reação como citado no item 3.17.1.1, utilizando os oligonucleotídeos t2 e r1 ou t2 e r2 (tabela I). Acrescentou-se 10ng de DNA genômico e amplificou-se segundo o programa: 94°C por 4 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; 72 °C por 7 min. 15µl da reação foram analisados em gel de poliacrilamida 7,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

3.17.2. Amplificação por RT-PCR

3.17.2.1. Para o mapeamento dos pontos de inserção do mini-exon:

As reações foram feitas com RNA obtido a partir de 5×10^7 - 2×10^8 epimastigotas dos clones CL Brener, Dm28c e NR cl3, transfectados com as construções P2, P2a e P2as (item 3.8.3.1).

Para cada reação, preparou-se um eppendorf contendo aproximadamente 100ng de RNA em 7µl de água. A amostra foi aquecida a 67°C por 5 minutos. Acrescentou-se 75ng de hexanucleotídeos (Pharmacia), 1µl tampão RT-PCR 10x (Tris-HCl 500mM pH 8,3, MgCl₂ 100mM, KCl 500mM, BSA 1mg/ml), dNTP para 1mM final, 8U de inibidor de RNase (Boehringer-mannheim), 6U de AMV (USB) e água para 10µl totais.

A reação foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos (para pareamento dos hexanucleotídeos com o RNA) e a 42°C por 30 minutos (para extensão).

Acrescentaram-se os reagentes para amplificação: 25pmoles de cada oligonucleotídeo (lme e CR) (tabela I), KCl para 40mM, MgCl₂ para 1,5mM, 1,2U de Taq DNA polimerase (Pharmacia) e água para 50µl totais.

A amplificação foi realizada segundo o programa: 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 1 min, 72°C por 1 min; 72°C por 7 minutos. 15µl das reações foram analisados em gel de poliacrilamida 7,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

3.17.2.2. Para estudar a transcrição da região promotora endógena em Dm28c, CL Brener, NR cl3 e SO3 cl5:

A etapa de transcrição reversa foi feita com 10ng de RNA total e seguiu o protocolo descrito em 3.17.2.1. A reação de amplificação, também semelhante à já descrita, utilizou os pares de oligonucleotídeos t2 e r1 e t2 e r2 (tabela I), e foi feita com o programa: 94°C por 4 min; 30 ciclos de 94° por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; 72°C por 7 min. 15µl das reações foram analisados em gel de poliacrilamida 7,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

3.18. Mapeamento do ponto de início de transcrição (tsp)

3.18.1. Nuclease S1 (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989)

Foram preparados 4 tubos eppendorf. A três deles acrescentou-se aproximadamente 200ng de DNA do inserto do trecho *SacI-HincII* da região promotora de Dm28 (ver resultados), a um destes adicionou-se 50µg de RNA de Dm28 e ao outro 50µg de RNA de CL Brener. No quarto tubo adicionou-se apenas 50µg de RNA de Dm28. Os ácidos nucleicos contidos nos quatro tubos foram precipitados com 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol gelado a 0°C por 30 minutos. Centrifugou-se a 12000g por 15 minutos a 4°C e aspirou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 30µl de tampão de Hibridização (PIPES 40mM pH 6,4, EDTA 1mM pH 8, NaCl 0,4M, 80% v/v formamida). O tubo foi transferido para um banho a 85°C por 10 minutos e em seguida para um banho na temperatura adequada para o pareamento entre o RNA e o fragmento (calculada com base na % CG do inserto, segundo Sambrook *et al.*, 1989) por 12-16 horas. Adicionou-se 300µl de Tampão S1 (NaCl 0,28M, acetato de sódio 0,05M pH 4,5, ZnSO₄ 4,5mM, DNA simples fita (carregador) para 20µg/ml) e 100U de S1, agitou-se e conservou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida por resfriamento para 0°C e adição de 80µl de S1 Stop mix (acetato de amônio 4M, EDTA 50mM pH 8, tRNA (carregador) 50µg/ml). Extraíu-se com fenol: clorofórmio e precipitou-se com 2 volumes de etanol a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se a 4°C por 15 minutos, aspirou-se o sobrenadante cuidadosamente. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 40µl de TE pH 7,4. As amostras foram aplicadas em gel de agarose e transferidas para membrana Zeta Probe segundo o protocolo de transferência alcalina (item 3.12). Como sonda utilizou-se o trecho entre *SacI* e *HincII*.

3.18.2. "Primer extension"

Adicionou-se em tubo eppendorf 10^6 cpm de oligonucleotídeo t1 ou t2 (tabela I) fosforilado (item 3.16.2), 5-10µg de RNA, 2µl de tampão 1st strand 5x (Tris-HCl 250mM pH 8,0, MgCl₂ 15mM, KCl 375mM) e água para 10µl finais. Manteve-se a 80°C por 3 minutos e a 37°C por 1 hora. Acrescentou-se 0,2µl de dNTPs 25mM, 1µl de DTT 100mM e 0,2µl (40U) de Superscript (transcriptase reversa). Manteve-se a 37°C por 30 minutos. Acrescentou-se 0,5µl de dNTPs 2,5mM e 0,2µl de Superscript e manteve-se a 37°C por mais 1 hora.

As proteínas foram extraídas com fenol e clorofórmio e os ácidos nucleicos foram precipitados com acetato de sódio e etanol a -20°C durante a noite. Após centrifugação e lavagem com etanol 70%, o precipitado foi ressuspensão em 4µl de solução stop (0,3% azul de bromofenol, 0,3% xilenocianol FF, EDTA 10mM pH 7,5, 97,5% formamida deionizada), fervido por 5 minutos e aplicado em gel de sequenciamento, juntamente com a sequência correspondente (obtida com o oligonucleotídeo utilizado na reação de primer extension).

3.19. Sequenciamento

Desnaturação alcalina: Prepararam-se 2 eppendorfs (1 para cada iniciador) com aproximadamente 3µg de DNA em um volume total de 15µl (em H₂O deionizada). Adicionou-se 2µl de NaOH 2N- EDTA 2mM em cada (solução preparada na hora) e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram acrescentados 3µl de acetato de sódio 3M pH 5,3, 7µl de água deionizada e 75µl de etanol, misturou-se e manteve-se a -70°C (banho de etanol e gelo seco) por 5 minutos. Centrifugou-se a 10000g a 4°C por 5 minutos, aspirou-se o sobrenadante, lavou-se o precipitado com 200µl de etanol 70% gelado e secou-se a vácuo.

Reação de sequenciamento: Realizada com o T7 Sequencing Kit da Pharmacia. No presente protocolo são apresentadas apenas as soluções não provenientes do Kit

Ao DNA desnaturado e seco, adicionou-se 5,0µl de iniciador 1pmol/µl, 2,0µl de "annealing buffer" e 7µl de água deionizada. Centrifugou-se instantaneamente, incubou-se por 2 minutos a 67°C, 15 minutos a 37°C, 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se em seguida 3µl de "labelling mix", 2µl T7 DNA polimerase diluída 1: 5 e 1µl de dATP ³⁵S (12,5µCi/ µl) e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Enquanto isso, aqueceram-se os tubos eppendorf com 2,5µl do "mix" das bases ("short A", "short T", "short C" e "short G") a 37°C por pelo menos 1 minuto. Após a incubação de 5 minutos, transferiu-se 4,5µl da "labelling reaction" para cada tubo "mix" base pré-aquecido e incubou-se por 5 minutos a 37°C. Adicionou-se 1µl de TdT "mix" (1,5 U TdT, dNTP 1mM, Tris-HCl 40mM pH 7,5, MgCl₂ 20mM, NaCl 50mM) e manteve-se a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se 5µl de "Stop Solution".

Gel de sequenciamento: Montagem do gel no sistema Sequi-Gen Nucleic Acid Sequencing Cell (Bio Rad) segundo instruções do fabricante.

"Gel mix": 6% solução acrilamida: bisacrilamida 1:19, 7M ureia, 1xTBE, azul de bromofenol

Acrescentar 1µl/ml de TEMED e 25% persulfato de amônio e aplicar entre as placas previamente vedadas.

Pré-aqueceu-se o gel a 45W (corrente e voltagem máximas) por 1 hora até a temperatura da placa atingir $\pm 50^{\circ}\text{C}$ antes de aplicar as amostras, pré-aquecidas a 85°C e transferidas para gelo. A eletroforese foi realizada a 40W. Em seguida, o gel foi mantido em solução fixadora (10% ácido acético-10% etanol) por 30-40 minutos e seco a vácuo a 75°C por 30-40 minutos.

3.20. Transfecção em *T. cruzi* (adaptado de Seed & Sheen, 1988)

Para cada ponto foram tomadas 2×10^8 formas epimastigotas. As células foram centrifugadas a 5000g por 7-10 minutos a 4°C , e ressuspensas em 10-15ml de PBS estéril (item 3.8.2). Em seguida, foram novamente centrifugadas e ressuspensas em pequeno volume (inferior ao necessário para a eletroporação) de tampão de eletroporação (sacarose 272mM, tampão fosfato de sódio 7mM pH 7,2 - Kelly *et al.*, 1992- acrescido de MgCl_2 para 1mM final) (ver resultados), sendo mantidas em gelo. Determinou-se a densidade celular da suspensão de células e acrescentou-se o volume de tampão de eletroporação necessário para se obter 5×10^8 céls/ml. Transferiu-se 0,4ml da suspensão para cada cubeta 0,2cm (BioRad). Adicionou-se o DNA plasmidial (de alta qualidade, purificado por Césio ou colunas QIAGEN), para aproximadamente 50µg em até 50µl. Como controle negativo preparou-se uma cubeta com células mas sem plasmídeo. As amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos e eletroporadas usando o BioRad Cell Porator, com 2 pulsos sucessivos de 200V e 250µF para CL Brener, 250V e 250µF para NR cl3 e 300V e 250µF para Dm28c (ver resultados). As células eletroporadas foram mantidas em gelo por 5-10 minutos e transferidas para frascos com 10 ml de meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino. A viabilidade/sobrevivência das células foi monitorada em microscópio de fase. Os parasitas foram incubados a 28°C sem agitação.

3.21. Análise da expressão do gene reporter

3.21.1. Determinação da atividade de cloranfenicol acetil transferase (CAT)

Preparação do extrato: Determinou-se a densidade da cultura de parasitas. Tomou-se 1×10^7 células, as quais foram centrifugadas a 5000g (Sorvall) por 10 minutos a 4°C ou a 12000g por 1 minuto (microcentrifuga), de acordo com o volume tomado. As células foram lavadas em PBS (3.8.2) e novamente centrifugadas. Foram em seguida ressuspensas em 200µl de Tris-HCl 0,25M pH 7,8/ EDTA 0,001M (mantendo-se em gelo durante a ressuspensão), transferidas para tubos eppendorf e lisadas com três ciclos de congelamento e descongelamento em gelo seco com acetona-banho a 37°C. O lisado foi centrifugado por 3 minutos a 12000g e a fase aquosa foi cuidadosamente recuperada. Incubou-se a fase aquosa a 65°C por 6 minutos para inativar desacetilases endógenas, centrifugou-se a 12000g por 2 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo.

Ensaio de CAT: Prepararam-se tubos com 0,5µCi de D-treo (dicloroacetil-1- 14 C) cloranfenicol (Amersham-50-62mCi/nmol) e 10µl de 6mM n-butil-CoA (solução em Tris-HCl 100mM pH 7,8). Adicionou-se o extrato celular. Preparou-se um tubo para controle de extração: 200µl de TE, butiril-coA e 14 C-cloranfenicol, o qual após as extrações deve apresentar contagem basal. Preparou-se um controle positivo seguindo as mesmas etapas e adicionando 2000µl de TE e 1U de cloranfenicol acetil transferase (CAT) de *E. coli* (Promega). Os tubos foram incubados a 37°C por 20-24 horas.

Determinação da quantidade de produto acetilado: Acrescentou-se a cada tubo 500µl de xileno, agitou-se em Vortex por 1 minuto e centrifugou-se a 12000g por 2 minutos. Recuperou-se a fase orgânica (superior), à qual foram acrescentados 100µl de Tris-HCl 100mM pH 7,8- EDTA 1mM. Agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se a 12000g por 2 minutos. Repetiu-se a etapa anterior. Recuperou-se a fase orgânica final, à qual foram acrescentados 500µl de líquido de cintilação miscível com água. A radioatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida.

3.21.2. Análise da expressão de GFP (green fluorescent protrein)

Os parasitas transfectados com o plasmídio pRibH2BA100-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Sérgio Schenkman- EPM/UNIFESP), contendo o gene reporter da GFP sob controle do promotor ribossômico da cepa CL, foram observados ao microscópio (Nikon Fluorphot UFX) diariamente até 5 dias após a eletroporação. Para contagem, colocou-se aproximadamente 20µl da cultura em lâmina e contou-se aproximadamente 500 células por lâmina, analisando a porcentagem de células fluorescentes por análise sob luz UV.

3.22. Construções

Neste trabalho foram utilizadas diversas construções, a maior parte das quais foram elaboradas por nós. Outras nos foram gentilmente cedidas.

Na figura 8 são apresentadas as construções e algumas informações pertinentes. Outros detalhes são especificados em Resultados.

Figura 8. Construções utilizadas neste trabalho

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem da região promotora

O clone H52, obtido previamente em nosso laboratório pelo Dr. R. P. Souto no vetor λ DASH®II (Stratagene), contém um trecho de 16,6 Kb do cistron de rDNA da cepa Dm28 de *Trypanosoma cruzi*. Seu mapa de restrição foi determinado no início deste trabalho (fig. 9).

Tomando como base o mapa de restrição obtido, no qual é mostrada a localização do gene de rRNA 18S (determinada com auxílio de Southern blot e comparação com mapa do cistron ribossômico de outras cepas de *T. cruzi* (Arruda *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1988; Dietrich *et al.*, 1990)), escolhemos o trecho entre os sítios de *SacI* e *PstI* para um estudo mais detalhado, uma vez que este trecho deveria conter o promotor ribossômico (fig. 9). Este fragmento apresenta aproximadamente 4,3 Kb, que incluem o gene 18S (2,2 Kb) e 2,1 Kb da região intergênica a 5' do mesmo. Após tentativas frustradas de clonagem do inserto purificado em gel de baixo ponto de fusão, optamos pelo método de clonagem por "shotgun": digeriu-se DNA do clone H52 e de pBluescript KS⁻ com *SacI* e *PstI*. O DNA, recuperado após extração com fenol-clorofórmio e precipitação com acetato-etanol, foi utilizado na reação de ligação. Os recombinantes foram selecionados por hibridização com sonda do trecho *PstI*-*PstI*, que inclui a região de interesse, e confirmados por digestão com *SacI* e *PstI*. O clone escolhido foi denominado pSS2 (fig. 9).

4.2. Caracterização da região promotora

O mapa de restrição do clone pSS2 foi determinado (fig. 10) e alinhado com mapas de regiões correspondentes das cepas La Cruz e CL, nas quais havia sido identificado o sítio de início de transcrição do cistron ribossômico - tsp - (Martínez-Calvillo & Hernández, 1994; Dietrich *et al.*, 1993, respectivamente) (fig. 10). A análise dos dados sugere que os tsps potenciais de Dm28 deveriam situar-se na região entre *SacI* e *HincII* do clone pSS2, de aproximadamente 800 pb (fig.10). Este trecho foi clonado em pBluescript KS (clone SH).

Para confirmar que o clone SH de Dm28 realmente incluía a região que contém o início de transcrição do cistron ribossômico foram realizadas subclonagens de trechos digeridos com *SacI*-*KpnI*, *KpnI*-*SacII* e *SacII*-*HincII* (ver fig. 10). Os insertos foram recuperados de gel de baixo ponto de fusão e ligados em pBluescript KS⁻ clivado com as mesmas enzimas. Os recombinantes foram selecionados por digestão com as

Figura 9. Mapa de restrição do clone H52, no qual destaca-se o inserto do clone pSS2. Representação esquemática do cistron de RNA ribossômico de *Trypanosoma cruzi*.

respectivas duplas de enzimas e sequenciados com os primers reverso e universal (M13-20) (tabela I).

A sequência da região promotora, obtida pela junção das sequências dos três subclones, foi alinhada com as sequências homólogas das cepas CL (Dietrich *et al.*, 1993-número de acesso GenBank M31432) e La Cruz (Martínez-Calvillo & Hernández, 1994-número de acesso GenBank M88712) com auxílio do programa ALIGN (fig. 11). Os graus de similaridade entre elas foram calculados (tabela III). Como esperado, observa-se maior similaridade entre as sequências das cepas Dm28 e La Cruz, ambas pertencentes à linhagem 2, do que entre elas e a da cepa CL, pertencente à linhagem 1. Esta observação reforça a existência das duas linhagens. Os dados foram apresentados em trabalho publicado (Floeter-Winter *et al.*, 1997).

		SacI
Dm28		GAGCTCGGTGCACCCTGGGATATTTGCGCACCCACCTTTCCCGTCGCAAACGGCGCCGTC
La Cruz		T.....
CL		...GT..C...T.G..A....C.....GT.....
Dm28		CGAACGCGGAAATGTTCCGAGAATAATACGGCTGGACTGCGCCGCGCGTTCCCCGCATGA
La Cruz		G.....G...
CL		...G....TTT...G.....CC.....GT.....GT..G...
Dm28		AACAACTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTGTGGTGCTTTACCGCACACCAGTTTCCT
La Cruz		.C.....
CL		T.....A.....C.G..A..G..C.....G...TG.G.....
Dm28		TGCGGGGCTTATTGGTGTGTTGGATTTTTAATTTTTTGATGATTCGGAGGAATTTTTTG
La Cruz		
CL		..G.....A..T.....T.A.--.....G.....
Dm28		CAATTTTGGGTACCCCTAAAAAATTT-TTGGAGTTTCCGGGGTTCGATCCAACCTTGTG
La Cruz		-.-.....
CL		T....T...C....A.....A.....C.....T..A...AG..G.
Dm28		CTTTTTTAACCGTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTGGCCC
La Cruz		
CL		-G...T.G..TG..T....A.....GG.....T.G.A
Dm28		AGGTGGCGTCGGAAGGAATTGGTGTCCCTCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTTG
La Cruz		C.....
CL		.A.....--...C.-G.T.T...CT..AAT...CTCG.....C.
Dm28		CGGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCG--TGTGCGGCGCGACCTTCTTTTGGCTCATT
La Cruz		
CL		GCAT.....CG.....-AT.....C.....
Dm28		GGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTTCGGCGCACCC
La Cruz		G.....
CL		T....C..T.....T.....T.-..A.....--.....
Dm28		GCG-GAATGGGGGAGGGATTTTCATATAAT-GTAGTGACAA--T-TGTGTG--TGGGTGCG
La Cruz		T.....CA.--.....
CL		..CA....--.....-C.....-GT.....-G.....GT....T.
Dm28		CAAAAT-----GTCATGCCGTGTGCAATGTTTATT-TGCGTGCTGTGCGTGTCTTTTG
La Cruz		
CL		..C...TTGTGT.T.....C.....T.....--...G..
Dm28		TGATTCCACCACTTGTGTGTATTTTACCTT-ATCGTCTCTCCCTGCCG--TTGGCTGTGC
La Cruz		CG.--.....
CL		..-...--...G.....-...G.....CC.....CG.G.....
Dm28		GTGAATTGTGCTTCGCATTTCGTGGGAAATCAAAGGGGAATCAACGTGTTCTTTTTTTT-
La Cruz		CTG.....T
CL		..A....CG.....-A.C.....-...A.....T
Dm28		--CAGAAGGGGAGTCAAAG-CGCCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTAAC
La Cruz		--.....
CL		TT...G.....T.....-..C.....

HincII

Figura 11. Alinhamento das sequências da região promotora, a qual contém os pontos de início de transcrição do cistron ribossômico (assinalados por retângulos) descritos para as cepas La Cruz e CL. Os sítios de restrição de *KpnI* e *SacII*, utilizados para subclonagem, são marcados em vermelho e azul, respectivamente.

Tabela III. Porcentagem de identidade entre as sequências da região promotora (aproximadamente 800 pb) das cepas CL, La Cruz e Dm28

Cepa (Grupo)	CL (1) ^a	La Cruz (2)	Dm28 (2)
CL (1)	100	82,2	82,4
La Cruz (2)	-	100	97,9
Dm28 (2)	-	-	100

^a Entre parênteses indica-se a linhagem à qual pertence a cepa

Para nos certificarmos de que o ponto de início de transcrição da cepa Dm28 situava-se na região delimitada por nós, elaboramos um experimento de nuclease S1 utilizando RNA total da cepa Dm28 (linhagem 2) e do clone CL Brener (linhagem 1) e DNA da região situada entre *SacI* e *HincII* (SH, ver fig. 10). Como sonda (para o Southern blot) adotou-se o DNA do trecho entre *SacI* e *HincII*.

Os dados mostrados na figura 12 indicam que se obteve proteção nas duas cepas. Os fragmentos obtidos apresentam o mesmo tamanho (aproximadamente 650 pb), tamanho este inferior ao do fragmento SH (810 pb), apresentado no mesmo blot (canaleta 4). A redução do tamanho do fragmento SH por ação da nuclease S1 confirmou a hipótese de que havíamos clonado a região promotora da cepa Dm28. Dada a imprecisão envolvida no cálculo do tamanho do fragmento protegido (realizado com auxílio do programa DNASIS, tendo como base as bandas do marcador de peso molecular e a banda do fragmento SH do Southern blot), realizou-se um mapeamento mais preciso por “primer extension” (ver item 4.4).

Figura 12. Ensaio de proteção com nuclease S1 utilizando o inserto *SacI-HincII* (SH) e RNAs de CL Brener (canaleta 1) e de Dm28 (canaleta 2). Controles: canaleta 3: RNA de Dm28 na ausência do inserto SH; canaleta 4: inserto SH na ausência de RNA. O Southern blot foi hibridizado com sonda SH marcada. M= Marcador de peso molecular lambda *Eco RI-Hind III*

4.3. Expressão dos promotores ribossômicos endógenos de tipo 1 e 2 em clones de grupo 1, 2 e 1/2

Conforme citado na introdução, experimentos de RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos que flanqueiam o domínio divergente do gene de rRNA 24S α (base da definição das duas linhagens) mostraram que, embora cepas de grupo 1/2 tenham os dois tipos de genes 24S α encontrados em cepas de grupos 1 e 2, respectivamente, apenas os de tipo 2 são expressos (Souto, 1996).

Para verificar se a região promotora dos dois tipos de genes ribossômicos é transcrita em isolados de grupo 1/2 decidimos realizar experimentos de RT-PCR visando amplificar um trecho da região promotora. Os oligonucleotídeos utilizados neste experimento são apresentados na tabela I e na figura 13.

DNAs dos clones CL Brener, Dm28c, NR cl3 e SO3 cl5 foram submetidos a reações de PCR com os oligonucleotídeos r1 e t2 e com os oligonucleotídeos r2 e t2. A primeira dupla de oligonucleotídeos amplifica o promotor de tipo 1 e a segunda, o de tipo 2. O gel apresentado na figura 14a mostra a presença de sequência de promotor de tipo 1 em CL Brener, NR cl3 e SO3 cl5 e de tipo 2 em Dm28c, NR cl3 e SO3 cl5, confirmando a especificidade das reações de amplificação.

As reações de RT-PCR foram feitas com RNA total dos mesmos clones: a etapa de transcrição reversa utilizou o oligonucleotídeo t2 e cada reação de amplificação utilizou t2 e r1 ou t2 e r2 (fig.13). Os resultados são apresentados na figura 14b. Confirmando os resultados anteriores (Souto, 1996), observamos que clones de grupo 1/2 transcrevem RNA ribossômico apenas a partir da região promotora de tipo 2.

Decidimos isolar a região promotora de tipo 2 dos clones NR cl3 e SO3 cl5 para a determinação de sua sequência. Para tal, elaboramos reações de PCR a partir de DNA genômico de NR cl3 e SO3 cl5, utilizando os oligonucleotídeos t2 e s1/2 (tabela I, fig. 13). Este último é específico para sequência de tipo 2, conforme foi comprovado pela ausência de produto de amplificação para o clone CL Brener (dados não mostrados). O produto da amplificação, de aproximadamente 540 pb, foi purificado com colunas Magic PCR Preps (Promega), tratado com Klenow para reparo das extremidades e clonado em pBluescript digerido com *EcoRV*. Deve-se ressaltar que antes de iniciarmos a clonagem das regiões promotoras dos clones de grupo 1/2 tentamos sequenciar diretamente os produtos de PCR purificados por coluna Magic PCR Preps. Não tendo tido êxito, optamos pela clonagem em pBluescript. Os clones positivos foram selecionados por padrão de restrição e sequenciados (dados não mostrados). A sequência obtida foi comparada com a sequência de tipo 2 do clone SO3 cl5, já publicada (Nunes *et al.*, 1997b), e a elevada identidade mostrou que havíamos clonado os promotores de tipo 2 de NR cl3 e SO3 cl5.

Figura 13. Locais de pareamento dos oligonucleotídeos sintetizados neste trabalho, mostrados em relação ao promotor de Dm28. O oligonucleotídeo r1 não corresponde à sequência de Dm28, mas sim à de CL Brener (Nunes et al., 1997b). s1/2 e r2 correspondem a trechos conservados em promotores de tipo 2 (grupos 2 e 1/2) mas não de tipo 1. t1 e t2 foram sintetizados com base em regiões conservadas de Dm28, CL Brener e SO3 cl5. O ponto de início de transcrição (tsp) é apresentado em negrito.

Nota: Resultados preliminares (dados não mostrados) indicavam que o ponto de início de transcrição em CL Brener e Dm28 se situava a 5' da região de pareamento do oligonucleotídeo r1.

a. PCR

b. RT-PCR

Figura 14. Reações de amplificação de sequências ribossômicas de tipo 1 (r1 e t2- reações 1) e tipo 2 (r 2 e t2- reações 2) dos clones CL Brener (CL Br), Dm28c (Dm), NR cl3 (NR), SO3cl5 (SO3). O controle sem DNA/RNA é denominado 0.

4.4. Mapeamento do ponto de início de transcrição (tsp) do cistron ribossômico

No item 4.2 mostramos experimentos de nuclease S1 para identificar o ponto de início de transcrição (tsp) em Dm28. Visando um mapeamento mais preciso do tsp dos isolados de *T. cruzi* CL Brener, Dm28, NR cl3 e SO3 cl5, realizamos experimentos de “primer extension” com os oligonucleotídeos t1 e t2 (tabela I). O oligonucleotídeo t2 é complementar a uma sequência situada aproximadamente 130 nucleotídeos a 3’ do tsp previamente mapeado para a cepa CL (Dietrich *et al.*, 1993). O oligonucleotídeo t1 é complementar a uma sequência que dista em torno de 85 nucleotídeos do tsp previamente mapeado para a cepa La Cruz (Martínez-Calvillo & Hernández, 1994) (fig. 13).

Em um primeiro experimento de “primer extension” utilizamos o oligonucleotídeo t2 e RNAs de CL Brener e Dm28, bem como de *Blastocladiella emersonii* (controle negativo, RNA gentilmente cedido por Cintia Rocha). As sequências que acompanharam o produto de extensão foram obtidas com o mesmo oligo, tendo como molde os plasmídeos P1as e P2a (fig. 8), que apresentam a região promotora das cepas CL e Dm28, respectivamente. Os produtos de extensão obtidos apresentaram o mesmo tamanho, em torno de 450nt (dados não mostrados), indicando que o ponto de início de transcrição nas duas cepas se situa mais próximo do mapeado para a cepa La Cruz do que o previamente identificado para a cepa CL. O controle não apresentou produto de extensão.

Para um mapeamento mais preciso utilizamos o oligo t1 e os mesmos RNAs. O clone CL Brener e a cepa Dm28 apresentaram um produto de aproximadamente 110nt (fig. 15), e o início de transcrição foi mapeado no nucleotídeo A (fig. 16), localizado a aproximadamente 1800nt do início do gene 18S e próximo ao mapeado para a cepa La Cruz. A cepa Dm28 apresentou uma banda adicional, mais fraca, a qual equivale ao nucleotídeo G mapeado para La Cruz. É possível que esta banda corresponda a uma parada prematura da extensão (transcrição reversa), já que foi encontrado produto de maior tamanho.

Além de analisar o início de transcrição no clone CL Brener e na cepa Dm28, pertencentes às linhagens 1 e 2, respectivamente, procedemos ao mapeamento do tsp dos clones de grupo 1/2, NR cl3 e SO3 cl5. Isolados deste grupo apresentam os dois tipos de cistron ribossômico, sendo que apenas o cistron de tipo 2 é expresso (Souto, 1996 e presente trabalho-item 4.3).

As reações de “primer extension” para NR cl3 e SO3 cl5 foram realizadas com o primer t1. O ponto de início de transcrição identificado coincide com aquele mapeado para Dm28 e CL Brener (fig. 15).

O ponto exato do início de transcrição dos quatro isolados é indicado na figura 16.

É importante salientar que as reações de "primer extension" foram realizadas tanto com RNA de gradiente de cério quanto com RNA de miniprep, obtendo-se os mesmos resultados.

Os experimentos realizados indicam que o ponto de início de transcrição (tsp) do cistron ribossômico é o mesmo para isolados de grupo 1, 2 e 1/2 e que existem diferenças na sequência da região que contém o tsp nos três grupos. Nos dois isolados de grupo 1/2 a sequência apresenta identidade muito elevada (ver discussão).

Figura 15. Mapeamento dos pontos de início de transcrição dos isolados CL Brener, Dm28, NR cl3 e S03 cl5 por "primer extension" utilizando o oligonucleotídeo t1.

```

CL BR  AAAAAATTTATTGGAGCTTCCGGGGTTTGAACCAAAGTGGGCTTTTTTAG
DM28   .....A..T.....T.....C..T....CT..T.....A
NRCL3  .....A..T..T...T.....T..T....C....A
SO3CL5 .....A..T..T...T.....T..T....C....A

CL BR  CCGTTCGTTTTGGTTTAGTAAATCATTGGAGCGGTGGTCTCTCCGGTGGCC
DM28   ....C.A...GT..C.....C...A.....AT.....
NRCL3  ...AC....GG...C.....CG..A.A.....A.....
SO3CL5 ...AC....GG...C.....C...A.....A.....

CL BR  AAG-TGGCGTCGAAGGATGGCGGCTTTAGG
DM28   C..G.....G.A.GAATT...-G.CCC
NRCL3  .G.-.....G.A.GATTT..TGCCTTT
SO3CL5 .G.-.....G.A.GATTT..TGCCTTT

```

Figura 16. Sequência da região flangeadora do ponto de início de transcrição (marcado em vermelho) dos clones CL Brener, NR cl3 e SO3 cl5 e da cepa Dm28.

4.5. Construção de vetores de expressão contendo o promotor ribossômico

O vetor escolhido foi o plasmídeo pGCAT-C (Frebourg & Brison, 1988-ver fig. 7), gentilmente cedido pela Dra. Lucile Floeter-Winter. Este plasmídeo foi digerido com *SacI* e *SmaI* e utilizado em reações de ligação com inserto *SacI-HincII* do clone SH de Dm28 (ver fig.10). Os recombinantes foram identificados por meio de digestões com *HincII* e *PvuII*. Dois clones positivos foram obtidos, cuja identidade foi confirmada por sequenciamento com os primers SP6 (Promega) e CR (complementar à sequência da região 5' do gene CAT, presente no plasmídeo) (tabela I). Um destes clones, denominado P2, foi escolhido para a clonagem do sítio acceptor de mini-exon, onde ocorre a adição do RNA de mini-exon durante o processo de “*trans-splicing*”.

Para que ocorra o mecanismo de “*trans-splicing*”, necessário para expressão de RNAs mensageiros em tripanossomatídeos (Agabian, 1990; Lücke *et al.*, 1996), clonamos a 5' do promotor uma sequência acceptora de “*trans-splicing*”. A sequência adotada como sítio acceptor de mini-exon foi identificada por Arthur Gruber (comunicação pessoal), em nosso laboratório, a partir da clonagem do gene do antígeno B12 da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Gruber, 1994). Foram sintetizados dois oligonucleotídeos complementares, Bs e Ba (tabela I), com a sequência do sítio acceptor citado, apresentando extremidades compatíveis para ligação em *BamHI* e *SalI*. Os oligonucleotídeos foram fosforilados separadamente e pareados, sendo então utilizados para ligação com DNA do clone P2 (fig. 8), digerido com *BamHI* e *SalI*. Os clones recombinantes foram selecionados por dot-blot tendo como sonda os oligonucleotídios do sítio acceptor de mini-exon, e por digestão com *BamHI* (apenas os clones sem acceptor

são digeridos; os recombinantes apresentam as três formas do plasmídio uma vez que o sítio de *Bam*HI não é reconstituído após a clonagem). Três dos clones selecionados foram confirmados por sequenciamento (primers SP6 e CR). O clone escolhido foi denominado P2a (fig. 8).

Em um trabalho anterior estabeleceu-se que o promotor ribossômico da cepa CL só era funcional na orientação correta, e que a expressão era aumentada em aproximadamente dez vezes pela presença do sítio acceptor de mini-exon (Tyler-Cross *et al.*, 1995). Elaboramos as seguintes construções com o promotor ribossômico da cepa Dm28: a) promotor disposto na orientação correta, sem o sítio acceptor; b) promotor disposto na orientação invertida, sem o sítio acceptor; c) promotor disposto na orientação correta, com o sítio acceptor. A construção com o promotor na orientação invertida foi feita no vetor pGCAT-A (Frebourg & Brison, 1988). Em experimento preliminar demonstramos que essa construção não dirigia expressão de CAT tanto em Dm28 quanto em CL Brener (dados não mostrados). Neste trabalho utilizamos apenas a construção com promotor na orientação correta na presença (P2a e derivados) ou ausência (P2) do sítio acceptor (ver fig. 8).

4.6. Experimentos de eletroporação

Antes de iniciar os experimentos de transfecção, padronizamos as condições de eletroporação para que as cepas Dm28 e CL Brener apresentassem o mesmo grau de viabilidade (em torno de 40% a 60%) (dados não mostrados). A partir destes resultados, foram adotadas as seguintes condições para os experimentos subsequentes:

- 2×10^8 células por cubeta de eletroporação (5×10^8 células/ml)
- lavagens com PBS (item 3.8.2)
- eletroporação em tampão com sacarose (Kelly *et al.*, 1992- sacarose 272mM, fosfato de sódio 7mM pH 7,2)
- 50µg de DNA de plasmídeo
- 2 pulsos de 200V e 250µF

Em experimento preliminar, eletroporamos células das cepas CL Brener e Dm28 com as construções P1as e P2a (fig. 8), em triplicatas. A primeira (P1as) consiste de uma construção portando o promotor da cepa CL Brener (Dietrich *et al.*, 1993) seguido do sítio acceptor de mini-exon do gene 35.2 da mesma cepa (Tyler-Cross *et al.*, 1995). Esse plasmídio nos foi fornecido pela Profa. Dra. Lucile Floeter-Winter, sendo originalmente denominado pTcpa (Tyler-Cross *et al.*, 1995). Passamos a chamá-lo P1as neste trabalho para facilitar a comparação com as demais construções. A segunda (P2a) consiste da construção que inclui o promotor ribossômico da cepa Dm28 seguido do sítio acceptor de mini-exon do gene B12 da cepa Y. As células foram coletadas dois dias

após eletroporação para ensaio de CAT (tabela IV). Curiosamente, observou-se expressão de CAT na cepa CL Brener a partir das duas construções, sendo a dirigida pelo promotor ribossômico heterólogo (P2a, de Dm28) superior à dirigida pelo promotor homólogo (Plas). Por outro lado, não se observou expressão significativa em Dm28 com nenhuma das construções.

Tabela IV. Expressão de CAT dirigida pelos promotores ribossômicos L1 (construção Plas) e L2 (construção P2a) nas cepas CL Brener e Dm28, no segundo dia após a eletroporação.

	CL Brener	Dm28
Plas	112.000	0
P2a	138.000	770

1U CAT= 114.000 cpm

Estudando um promotor de polimerase II de *Trypanosoma cruzi*, o Dr John Swindle (Memphis University, USA) observou que só encontrava expressão significativa de um gene reporter aproximadamente 5 dias após a transfecção (comunicação pessoal). Resolvemos tentar, então, uma abordagem semelhante, e passamos a coletar as células 2, 4 e 7 dias após a eletroporação para o ensaio de CAT. Os resultados referentes a dois experimentos independentes são apresentados na figura 17 e na tabela V.

Em primeiro lugar, chama a atenção a variação observada na cinética e intensidade da atividade de CAT nos dois experimentos. Ressalta-se que os valores mostrados são as médias das triplicatas realizadas para cada ponto, sendo que há alta variação no valor das triplicatas (dados não mostrados). Este fenômeno foi observado em trabalhos anteriores (Nunes *et al.*, 1997a; Tyler-Cross *et al.*, 1995).

A análise dos dados obtidos até o momento sugere que o clone CL Brener reconhece os promotores ribossômicos das linhagens 1 e 2, sendo a expressão a partir do promotor heterólogo superior à dirigida pelo homólogo (1,6 a 6 vezes maior, de acordo com o dia e experimento analisados). A cepa Dm28 não apresenta expressão de CAT dirigida pelo promotor heterólogo (promotor de linhagem 1), reforçando a identidade das duas linhagens de *Trypanosoma cruzi*. A cinética de expressão também difere de uma cepa para outra. Para o promotor de linhagem 2 observa-se atividade enzimática em epimastigotas do clone CL Brener desde o segundo dia após a

eletroporação, enquanto que na cepa Dm28 só encontramos expressão significativa a partir do quarto dia (tabela V). Mesmo nos dias de maior expressão, esta sempre se mostrou inferior na cepa Dm28 quando comparada com a do clone CL Brener. Vários experimentos foram realizados e os resultados indicaram que a expressão do promotor de L2 em CL Brener pode ser 10 a 300 vezes maior do que a em Dm28, de acordo com o experimento e o dia de coleta das células.

Algum tempo após a obtenção destes resultados, foi publicado um trabalho onde analisou-se a expressão de distintos promotores (promotor de mini-exon da cepa CL, promotores ribossômicos dos clones CL Brener e Dm28c) em diversos isolados de *T. cruzi* (Nunes *et al.*, 1997b). Os autores concluem que o promotor de mini-exon da cepa CL é funcional em todas as cepas analisadas, embora apresente uma expressão mais elevada (2-3 vezes) em isolados de L1, especialmente nos de grupo 1/2. A divergência entre as seqüências dos promotores das duas linhagens é de aproximadamente 30%. Os promotores ribossômicos mostraram um comportamento diferencial de acordo com a linhagem da cepa analisada: o promotor de CL Brener só foi funcional em isolados de grupo 1, enquanto que o promotor de Dm28c foi funcional em todas as cepas. Estes dados corroboram os resultados obtidos por nós. Salientamos, no entanto, que a construção do promotor ribossômico da cepa Dm28c é distinta daquela que nós utilizamos (ver discussão).

Os dados referentes à expressão de CAT a partir do promotor da cepa CL (plasmídeo P1as) em diversas cepas do parasita foram publicados (Floeter-Winter *et al.*, 1997). Como controle de eletroporação, utilizamos o plasmídeo pTcSL-CAT, que contém o promotor de mini-exon da cepa CL. Esta construção dirigiu expressão semelhante em isolados das duas linhagens, embora um pouco mais elevada em cepas de mesma linhagem. Esse padrão é semelhante ao observado por Nunes *et al.* (1997b).

Experimento 1.

Experimento 2.

Figura 17. Expressão de CAT (em cpm/10⁷ células) dirigida pelos promotores ribossômicos L1 (P1as, de CL) e L2 (P2a, de Dm28) nas cepas Dm28 e CL Brener em diferentes dias após a eletroporação

OBS: Exp 2: prom L1, dia 4= não determinado

Tabela V. Expressão de CAT dirigida pelos promotores ribossômicos L1 (construção P1as) e L2 (construção P2a) nas cepas CL Brener e Dm28 em diferentes dias após a eletroporação. Dados em cpm/ 10^7 células.

	cepa CL Brener			cepa Dm28		
	dia 2	dia 4	dia 7	dia 2	dia 4	dia 7
EXP. 1 ^(a)						
prom L1	69000	96000	56000	nd	230	100
prom L2	420000	490000	231000	3900	36000	22600
EXP. 2 ^(b)						
prom L1	400000	nd	141000	0	40	0
prom L2	620000	335000	260000	1900	6600	13200

(a) 1U de CAT= 900000 cpm

(b) 1U de CAT= 760000 cpm

nd= não determinado

Tendo em vista a heterogeneidade populacional em muitas cepas de *T. cruzi*, e que estamos utilizando como representantes de grupo 1 o clone CL Brener e de grupo 1/2 os clones NR cl3 e SO3 cl5, achamos pertinente usar como representante de linhagem 2 um clone ao invés da cepa Dm28. Desta forma, passamos a cultivar o clone Dm28c (derivado da cepa Dm28 e gentilmente cedido pelo Dr. Samuel Goldenberg, Fiocruz). Em experimentos paralelos foi eletroporada a construção P2a, contendo o promotor da cepa Dm28, na cepa Dm28 e no clone Dm28c. Coletamos as células no quarto dia após a eletroporação e obtivemos valores de expressão de CAT bastante próximos para as duas culturas, da ordem de 1000-1300cpm/ 10^7 células (duplicatas). Desta forma, passamos a utilizar o clone Dm28c nos experimentos subseqüentes. No entanto, como será mostrado a seguir, observamos que no clone Dm28c ocorre uma diminuição da expressão de CAT à medida que o isolado é repicado em meio LIT (ver discussão).

Tendo por objetivo determinar a atividade dos promotores ribossômicos de linhagens 1 e 2 em clones de *T. cruzi* de grupo 1/2, padronizamos as condições de eletroporação do plasmídio P2a no clone NR cl3. A porcentagem de sobrevivência e atividade de CAT foram analisadas em parasitas submetidos a diferentes condições de

eletroporação. Nos experimentos subsequentes adotamos as condições de pulso de 250V-250 μ F, já que estas forneciam atividade máxima e sobrevivência entre 30 e 40%.

Eletroporamos duplicatas de NR cl3 com P1as (L1) e P2a (L2), e coletamos 10^7 células no segundo, quarto e sétimo dias após o choque. Os resultados em termos de expressão de CAT são apresentados na figura 18 e tabela VI.

Figura 18. Expressão de CAT dirigida pelos promotores L1 (P1as) e L2 (P2a) em NR cl3 no segundo, quarto e sétimo dia após a eletroporação.

Tabela VI. Expressão de CAT (cpm/ 10^7 células) dirigida pelos promotores L1 e L2 em NR cl3 em diferentes dias após a eletroporação.

	dia 2	dia 4	dia 7
prom L1	2.400	7.500	15.000
prom L2	4.100	15.500	23.000

Quando comparado com os isolados CL Brener e Dm28 (tabela V) verifica-se que o clone NR cl3 apresenta um comportamento “misto”. Apresenta aproximadamente o mesmo nível de expressão de CAT dirigido pelo promotor de linhagem 2 que Dm28, o qual é uma ou duas ordens de grandeza menor do que o de CL Brener transformado com a mesma construção. Por outro lado, NR cl3 tem comportamento semelhante a CL Brener por apresentar expressão de CAT a partir de ambos os promotores, sendo esta superior quando dirigida pelo promotor de Dm28 (promotor L2, vetor P2a) (tabelas V e VI).

Dados da literatura indicam que a superfície de *T. cruzi* é bastante negativa e que este valor varia de acordo com o estado evolutivo analisado (revisto em De Souza, 1984). Tendo em vista as grandes diferenças nos valores de expressão de CAT promovidos pela mesma construção plasmidial eletroporada nos diferentes clones de *T. cruzi*, decidimos investigar se a adição de íons positivos (que neutralizariam a carga negativa do parasita e do plasmídio) facilitariam o processo de transformação. Desta forma, analisamos o efeito da adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} no tampão de eletroporação utilizado para introdução do plasmídio contendo o promotor de linhagem 2 (P2a) em três clones de *T. cruzi*: CL Brener, Dm28c e NR cl3. Observamos que a presença dos íons não alterou o aspecto das células, mas afetou os níveis de expressão de CAT (tabela VII). A presença de 1mM de $CaCl_2$ reduziu a expressão de CAT em todos os isolados.

Tabela VII. Efeito de íons na expressão de CAT (cpm $\times 10^3/10^7$ células) dirigida pelo promotor L2.

condições	CL Brener	Dm28c	NR cl3
sem íons	641,9	5,8	7,8
1mM $CaCl_2$	166,1	2,4	1,6
1mM $MgCl_2$	493,4	8,7	10,3

Como se pode observar (tabela VII), a presença de $MgCl_2$ aumentou a expressão de CAT mediada pelo promotor ribossômico de linhagem 2 em Dm28c e NR cl3. No entanto, esta continua muito inferior àquela observada em CL Brener. Passamos a utilizar 1mM de $MgCl_2$ no tampão de eletroporação para os três clones.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar as diferenças observadas na expressão de CAT mediada pelo promotor ribossômico de linhagem 2 nos três clones de *T. cruzi*. Uma delas seria a de que os parasitas sofrem de modo distinto o processo de choque por eletroporação. No entanto, a determinação do tempo de geração dos clones medido até 7 dias após eletroporação indica que este valor não se altera (dados não mostrados). Outras possibilidades são:

- Presença de seqüências inibitórias da transcrição no promotor de L2. Estas seqüências teriam uma ação linhagem ou grupo específica.
- Entrada diferencial da construção plasmidial.
- Eficiência do processo de "trans-splicing" para gerar o mRNA de CAT contendo o mini-exon na extremidade 5.

Estas hipóteses foram testadas como apresentado a seguir.

4.7. Mapeamento funcional de regiões do promotor de linhagem 2

Considerando a possibilidade de haver, na região promotora de L2, sequências inibitórias para Dm28c e NR cl3 mas não para CL Brener, elaboramos três construções contendo trechos de diferentes tamanhos da região promotora de L2 (presente na construção P2a), reduzidos a partir da extremidade 5' (fig. 19). Para tal, foram utilizados subclones obtidos previamente em pBluescript. Os insertos correspondentes aos trechos *KpnI-HincII* e *SacII-HincII* (fig. 19) foram purificados com membrana DE-81 e clonados em vetor pGCAT-C (Frebourg & Brison, 1988) com sítio acceptor, clivado com as mesmas enzimas.

Inúmeras colônias foram selecionadas para análise, já que o vetor não apresenta α -complementação. Dentre as que apresentavam padrão de restrição correspondente ao esperado para os recombinantes, algumas foram sequenciadas e um clone de cada construção foi escolhido para preparação de plasmídio em larga escala para eletroporação.

O clone P2aI (fig. 19) contém o trecho *KpnI-HincII* e o tsp mapeado para os isolados CL Brener, Dm28, NR cl3 e SO3 cl5 (fig. 16). Este ponto está ausente no clone P2aII (fig. 19), que contém o trecho *SacII-HincII*.

Realizamos experimentos de eletroporação com os plasmídios P2a, P2aI e P2aII nos clones CL Brener, Dm28c e NR cl3 e analisamos a expressão de CAT no quarto dia após a transfecção (fig. 19). A comparação entre a expressão dirigida pelos trechos contidos nos três vetores permitiu determinar o provável trecho responsável pela atividade promotora.

Como podemos observar, a região *SacII-HincII* não tem atividade promotora. O acréscimo da região *KpnI-SacII*, que contém o tsp, promove a transcrição e expressão de CAT. Não podemos afirmar, porém, que esta região *KpnI-SacII* é a única responsável pela atividade promotora, já que não dispomos de uma construção na qual este trecho esteja diretamente ligado à região do sítio acceptor de "trans-splicing". É possível que a região *SacII-HincII* contribua para a transcrição, mas que seja incapaz de promovê-la sem o trecho situado a 5'. A construção de clones adicionais poderá contribuir para um mapeamento mais preciso da região promotora.

A presença da região *SacI-KpnI* (construção P2a) confere um aumento da expressão de CAT de 2,0 vezes para Dm28c, 1,4 vezes para CL Brener e 1,5 vezes para NR cl3. Esta região contém as repetições descritas para a cepa CL (Dietrich *et al.*, 1993) e La Cruz (Martínez-Calvillo & Hernández, 1994), que seriam análogas aos ativadores do cistron ribossômico de eucariotos (Reeder, 1992) (ver discussão).

Figura 19. Construções contendo diferentes trechos do promotor de linhagem 2 e atividade de CAT em CL Brener, Dm28c e NR cl3. Em vermelho, o ponto de início de transcrição.
Ac= sítio aceptor de *trans*-splicing

4.8. Eficiência de transfecção

4.8.1. Elaboração de um controle interno

Uma de nossas preocupações ao trabalhar com transfecção em diferentes isolados era averiguar a eficiência de transfecção em cada um, visando normalizar os valores de expressão do gene reporter. Inicialmente, buscamos elaborar um plasmídeo para ser utilizado como controle interno. Este deveria conter um promotor de RNA polimerase II (que provavelmente não apresenta expressão diferencial entre as linhagens), seguido de um gene reporter. Optamos pelo promotor de GAPDH, do vetor pTEX (Kelly *et al.*, 1992), após o qual inserimos o gene de β galactosidase, extraído do plasmídeo pSV β galactosidase (Promega). As tentativas de utilização deste controle interno foram infrutíferas, provavelmente pela baixa expressão associada a promotores de RNA polimerase II em tripanossomatídeos. Outros grupos buscaram a elaboração de controles internos, também sem sucesso (ver discussão).

A opção adotada por nós, e apresentada em trabalho publicado (Floeter-Winter *et al.*, 1997), foi determinar a expressão dirigida pelo promotor de mini-exon da cepa CL (plasmídeo pTcSL-CAT), que não é linhagem-específico (item 4.6). Os resultados obtidos sugerem que os níveis de transfecção sejam semelhantes nos diversos isolados, embora a expressão seja mais alta em cepas da mesma linhagem do promotor.

4.8.2. Quantificação do plasmídeo internalizado

Para confirmar os dados obtidos com o promotor de mini-exon, quantificamos o plasmídeo internalizado nos três clones de *T. cruzi* em estudo.

Epimastigotas dos clones CL Brener, Dm28c e NR cl3 foram transfectados com a construção P2a. Para estimar a eficiência de entrada do plasmídeo nos três clones, o DNA total foi extraído a partir de 2×10^8 células nos dias 2, 4 e 7 após a eletroporação. Este DNA foi quantificado e aproximadamente 2 μ g foram digeridos com *Pst*I (que lineariza o plasmídeo) e aplicados em gel. Como controle aplicou-se 5ng de DNA do plasmídeo P2a. As amostras foram submetidas a eletroforese e transferidas para membrana de nylon, que foi hibridizada com sonda preparada a partir do plasmídeo pGCAT-C. A utilização do vetor ao invés do plasmídeo P2a evita a hibridização com o promotor endógeno do parasita, de modo que o sinal obtido corresponde apenas ao plasmídeo P2a introduzido. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria e os valores são apresentados na tabela VIII. Os dados apresentados mostram uma redução no valor da área da banda hibridizada com o plasmídeo em função do tempo após a eletroporação. Este resultado é decorrente da não replicação do

plasmídio, que é diluído na cultura do parasita que se multiplica. Existe ainda a possibilidade de que parte do plasmídio seja degradada. De fato, a análise da autorradiografia hibridizada com pGCAT-C mostra um rastro ("smear") em todas as canaletas (dados não apresentados).

Visando normalizar as quantidades de DNA aplicadas em cada canaleta, a membrana foi hibridizada com sonda do gene de rRNA 24S α (tabela VIII). Observa-se variação no valor desta hibridização, sugerindo que quantidades diferentes de DNA total dos clones tenham sido aplicadas no gel. Desta forma, os dados foram normalizados calculando-se a razão entre as áreas de hibridização do plasmídio e da sonda do gene de rRNA 24S α (tabela VIII). A análise desta razão no dia 2 mostra valores de 1,23 para CL Brener; 0,73 para Dm28c e 1,72 para NR cl3. Estes dados indicariam que a construção P2a é interiorizada em CL Brener com uma eficiência aproximadamente 1,6 vezes maior do que em Dm28c. Por outro lado, observa-se que em NR cl3 a eficiência de transfecção seria 1,4 vezes maior do que em CL Brener.

Este experimento foi repetido, e razões semelhantes foram obtidas.

Esses resultados indicam que diferenças na eficiência de transfecção existem. No entanto, não explicam as diferenças de expressão de CAT observadas entre os clones (ver tabelas V e VI).

Tabela VIII. Áreas das bandas da membrana hibridizada com as sondas pGCAT-C e de rRNA 24S α , calculadas por densitometria

Clone	Dia ^(a)	Área P2a ^(b)	Área 24S α ^(c)	P2a/ 24S α ^(d)
CL Brener	2	180,7	146,9	1,23
	4	61,3	39,8	1,54
	7	14,5	109,7	0,13
Dm28c	2	40,6	55,6	0,73
	4	25,4	69,2	0,37
	7	11,1	72,6	0,15
NR cl3	2	80,4	46,7	1,72
	4	84,1	101,8	0,83
	7	29,4	108,8	0,27

a) Dia de coleta das células, após a eletroporação

b) Área da banda da autorradiografia obtida após hibridização com sonda do plasmídeo pGCAT-C

c) Área da banda da autorradiografia obtida após hibridização com sonda do gene de rRNA 24S α

d) Razão entre os valores das áreas obtidas em (b) e (c)

4.9. Comparação dos sítios aceptores de "trans-splicing"

Visto que as diferenças de eficiência de transfecção não são suficientes para explicar as diferenças na atividade de CAT observada nas duas linhagens, decidimos analisar o processo de "trans-splicing".

O plasmídeo P2a, que contém o promotor de linhagem 2, possui o sítio aceptor de mini-exon (sítio de "trans-splicing") do gene B12 da cepa Y de *T. cruzi* (Gruber, 1994) (fig. 8). O plasmídeo P1as (Tyler- Cross *et al.*, 1995), que contém o promotor de linhagem 1, apresenta o sítio aceptor do gene 35.2 da cepa CL de *T. cruzi* (McCarthy-Burke *et al.*, 1989) (fig. 8). Para verificar se a baixa expressão de CAT dirigida por P2a em Dm28c e NR cl3 se devia a problemas com o sítio aceptor de B12, elaboramos o vetor de expressão P2as. Esta construção (fig. 8) contém o promotor de linhagem 2 e o sítio aceptor do gene 35.2, obtido a partir de PCR do plasmídeo P1as utilizando os primers ac1 e ac2 (tabela I). Eletroporamos epimastigotas dos clones CL Brener, Dm28c

e NR cl3 com o plasmídio P2as e coletamos as células 2, 4 e 7 dias após o choque para análise da atividade de CAT. Os dados são apresentados na tabela IX.

A comparação desses resultados com aqueles obtidos anteriormente com a construção P2a (ver figs. 17 e 18) indica que a troca de sítio acceptor causou um incremento na expressão de CAT em Dm28c de cerca de 8 vezes. Foi observado um incremento de aproximadamente 1,4 vezes para NR cl3. Para CL Brener praticamente não houve alteração da expressão. Os dados sugerem que o sítio acceptor 35.2 aumenta a eficiência de "*trans*-splicing" em Dm28c, e em menor escala em NR cl3, quando comparado com o sítio acceptor de B12.

Embora a troca de sítio acceptor tenha aumentado a expressão dirigida pelo promotor de linhagem 2 em Dm28c e NR cl3, esta continua mais de uma ordem de grandeza inferior à observada em CL Brener.

Tabela IX. Expressão dirigida pelo plasmídio P2as nos clones CL Brener, Dm28c e NR cl3 2, 4 e 7 dias após transfecção. Valores ^(b) em cpm x10³/10⁷ células

	CL Brener			Dm28c			NR cl3		
	Dia ^(a)			Dia			Dia		
	2	4	7	2	4	7	2	4	7
P2as	573,3	648,8	658,4	10,6	23,8	19,1	1,7	16,7	24,3

(a) Dia de coleta das células após eletroporação

(b) Atividade de cloranfenicol acetil transferase, média de dois pontos

Tentamos estimar a abundância de mRNAs de CAT proveniente da construção P2a em Dm28c, NR cl3 e CL Brener por Northern blot e RT-PCR, mas não tivemos êxito. A preparação de RNA pareceu estar contaminada com o plasmídio P2a, e o tratamento com DNase (livre de RNase) resultou em degradação do RNA.

4.10. Determinação dos pontos de adição do mini-exon ("spliced leader")

Para avaliar o uso dos sítios aceptores de mini-exon de B12 e 35.2 nos três clones (CL Brener, Dm28c e NR cl3) analisamos os transcritos gerados a partir das construções P2a (promotor de linhagem 2 seguido do acceptor de B12) e P2as (promotor de linhagem 2 seguido do acceptor de 35.2) (fig. 8). As células foram coletadas no 4º dia após eletroporação com o plasmídio e a atividade de CAT foi determinada (tabela X).

Como controle adicional utilizamos a construção P2 (fig. 8), que não contém sítio acceptor.

Os dados indicam que CL Brener apresenta praticamente a mesma expressão de CAT na presença dos sítios aceptores B12 e 35.2. Na ausência de sítio acceptor, a expressão é cerca de 3,8 vezes menor. NR cl3 apresenta um comportamento semelhante, expressando CAT na presença de ambos os aceptores, embora com uma atividade aproximadamente 50 vezes menor do que CL Brener. A ausência de sítio acceptor reduz a expressão cerca de 1,9 vezes. Para Dm28c, observa-se uma expressão de CAT bastante reduzida tanto na ausência de acceptor quanto na presença do acceptor de B12. O sítio de 35.2 promove um aumento na expressão de aproximadamente 13 vezes (tabela X).

Tabela X. Expressão de CAT a partir das construções P2, P2a e P2as em CL Brener, Dm28c e NR cl3, cujo RNA foi coletado para determinação do ponto de inserção do mini-exon.

	P2	P2a	P2as
CL Brener	158,0	577,0	648,8
Dm28c	1,7	1,9	23,8
NR cl3	7,6	12,0	16,7

Os RNAs totais dos clones foram isolados no quarto dia após a eletroporação, e foram submetidos a RT-PCR. A etapa de transcrição reversa utilizou como iniciadores hexanucleotídeos randômicos (Pharmacia) e a amplificação adotou os oligonucleotídeos CR (complementar à extremidade 5' do gene reporter CAT) e lme (correspondente à sequência do mini-exon) (tabela I). As reações feitas a partir de RNAs dos três clones de *T. cruzi* eletroporados com as três construções são mostradas na figura 20.

Para a construção P2 observou-se, nos três clones de *T. cruzi*, um produto de amplificação ligeiramente maior do que 200 pb (fig. 20, canaletas 5, 6 e 7). Este resultado sugere que o mRNA de CAT sofreu adição da sequência de mini-exon em um ponto na região do promotor ribossômico de Dm28. Embora a reação de PCR não seja quantitativa, a intensidade das bandas indica maior abundância de mRNA de CAT processado em CL Brener em relação aos dois outros clones. Esta diferença poderia ser atribuída a uma maior eficiência dos processos de "trans-splicing" e/ou transcrição, ou ainda a uma maior estabilidade do mRNA em CL Brener. A inspeção do gel indica

ainda a presença de uma banda de baixo peso molecular (correspondente aos “primer-dimers”, comuns em reações de PCR- Gelfand & White, 1990) e alguns produtos de amplificação de mais alto peso molecular. Para verificar a natureza desses produtos, transferimos os DNAs do gel mostrado na figura 20 para uma membrana de nylon (Zeta Probe- ver item 3.12), a qual foi hibridizada com a sonda int1 (tabela I), que reconhece uma sequência da extremidade 5’ do gene de CAT, a 5’ do oligonucleotídeo CR e, portanto, situada a 3’ dos sítios aceptores. Todas as bandas do gel, com exceção da de baixo peso, hibridizaram com a sonda. Isso reforça nossa hipótese de que as bandas de baixo peso correspondem a “primer dimers” e que as de alto peso são específicas, provavelmente representando mRNAs processados em sítios de “*trans*-splicing” alternativos, utilizados com menor frequência (Vassela *et al.*, 1994; Schurch *et al.*, 1994).

Para a construção P2a (canaletas 8, 9 e 10) observou-se uma banda de aproximadamente 250 pb bastante conspícua em CL Brener. Este produto é maior do que o observado para a construção P2, e é maior do que o esperado caso o sítio aceptor de B12 estivesse sendo utilizado. Os resultados sugerem que o mesmo ponto de adição de *trans*- splicing no interior do promotor ribossômico de linhagem 2 está sendo reconhecido nos RNAs gerados pelas construções P2a e P2, e que o sítio aceptor de B12 não é funcional. Para esta construção, também, observam-se bandas de “primer-dimers” e algumas bandas de alto peso. No caso de Dm28c e NR cl3 a banda de 250 pb é muito tênue, sendo as bandas de alto peso mais evidentes. Estes dados sugerem que esta construção gera pouca quantidade de mRNA maduro de CAT nestes clones. Esta observação explicaria os resultados de baixa expressão de CAT nos clones Dm28c e NR cl3 mediada pela construção P2a.

Para a construção P2as observa-se para os três clones um produto de amplificação de aproximadamente 150 pb (canaletas 11, 12 e 13), sendo ele mais intenso em CL Brener. O tamanho do produto amplificado é condizente com a adição do mini-exon no sítio aceptor do gene 35.2.

Figura 20. RT-PCR utilizando RNAs de CL Brener (canaletas 2, 5, 8, 11), Dm28c (3, 6, 9, 12) e NRcl3 (4, 7, 10, 13) não eletroporados (2, 3, 4) ou eletroporados com os plasmídios P2 (5, 6, 7), P2a (8, 9, 10) ou P2as (11, 12, 13). M= marcador de peso molecular de 100pb

P2= prom. linhagem 2 sem sítio acceptor
 P2a= prom. linhagem 2 com acceptor B12
 P2as= prom. linhagem 2 com acceptor 35.2

Visando confirmar as hipóteses acima e determinar os pontos de adição do mini-exon nos RNAs gerados a partir das três construções (P2, P2a e P2as), clonamos os produtos de RT-PCR obtidos a partir do mRNA de CL Brener (uma vez que neste clone os produtos eram abundantes) no vetor pBluescript-T (Marchuk *et al.*, 1990), gentilmente cedido por Euclides Mateucci Jr. Dentre os recombinantes obtidos, selecionamos os que apresentavam inserto de tamanho equivalente ao da banda mais conspícua de cada reação. Os DNAs de três recombinantes de cada procedência foram seqüenciados utilizando os "primers" universal (M13-20) e reverso do vetor (tabela I), e os locais exatos da inserção do mini-exon foram identificados, sendo apresentados na figura 21. A análise das seqüências assim obtidas confirmou nossas hipóteses: nos RNAs provenientes das construções P2 e P2a o mini-exon foi adicionado após um AG no interior da região promotora. Os RNAs provenientes da construção P2as sofreram "*trans-splicing*" após o AG do sítio acceptor 35.2.

A figura 22 mostra em detalhe a seqüência do sítio acceptor críptico no interior do promotor de Dm28c e dos "sítios aceptores" dos genes B12 e 35.2. A localização destas regiões nas seqüências da figura 21 é indicada.

Construção P2

78nt

...GAGCTCGGTGCACCCTGGGATATTTGCGCACCCACCTTTCCCGTCGCAAACGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGT
TCCGAGAATAATACGGCTGGACTGCGCCGCGCGTTCCCGCATGAAACAACCTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTG
TGGTGCTTTACCGCACACCAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTGGATTTTAAATTTTTGATGATTTCGGAGG
AATTTTTTGCAATTTTTGGGTACCCCTAAAAAATTTTTGGAGTTTCCGGGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAAC
CGTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATTGGTGTCCC
TCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTTGGCGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCGTGTGCGGCGCGACCTTCT
TTTTGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTTCGGCGCACCCGCGGAA
TGGGGGAGGGATTTTCATATAATGTAGTGTACATTGTGTGTGGGTGCGAAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTATTT
GCGTGCTGTGCGTGTCTTTTGTGATTCCACCACCTTGTGTGTA [TTTACCTTATCGTCTCTCCCTGCCGTTGGCTGT
GCGTGAATTGTGCTTCGCATTTCGTGGGAAATCAAAAG♦GGGAATCAACGTG] TTCTTTTTTTTTCAGAAGGGGAGTCAA
AGCGCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA...

Construção P2a

...GAGCTCGGTGCACCCTGGGATATTTGCGCACCCACCTTTCCCGTCGCAAACGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGT
TCCGAGAATAATACGGCTGGACTGCGCCGCGCGTTCCCGCATGAAACAACCTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTG
TGGTGCTTTACCGCACACCAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTGGATTTTAAATTTTTGATGATTTCGGAGG
AATTTTTTGCAATTTTTGGGTACCCCTAAAAAATTTTTGGAGTTTCCGGGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAAC
CGTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATTGGTGTCCC
TCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTTGGCGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCGTGTGCGGCGCGACCTTCT
TTTTGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTTCGGCGCACCCGCGGAA
TGGGGGAGGGATTTTCATATAATGTAGTGTACATTGTGTGTGGGTGCGAAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTATTT
GCGTGCTGTGCGTGTCTTTTGTGATTCCACCACCTTGTGTGATTTTACCTTATCGTCTCTCCCTGCCGTTGGCTGTG
CGTGAATTGTGCTTCGCATTTCGTGGGAAATCAAAAG♦GGGAATCAACGTGTCTTTTTTTTTTCAGAAGGGGA [GTCAAA
GCGCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTGGGGATCAATAATTTCTTTTCAAACAACAGTCTTCTCGACCTG]
CAGGCATGCAA...

Construção P2as

...GAGCTCGGTGCACCCTGGGATATTTGCGCACCCACCTTTCCCGTCGCAAACGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGT
TCCGAGAATAATACGGCTGGACTGCGCCGCGCGTTCCCGCATGAAACAACCTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTG
TGGTGCTTTACCGCACACCAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTGGATTTTAAATTTTTGATGATTTCGGAGG
AATTTTTTGCAATTTTTGGGTACCCCTAAAAAATTTTTGGAGTTTCCGGGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAAC
CGTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATTGGTGTCCC
TCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTTGGCGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCGTGTGCGGCGCGACCTTCT
TTTTGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTTCGGCGCACCCGCGGAA
TGGGGGAGGGATTTTCATATAATGTAGTGTACATTGTGTGTGGGTGCGAAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTATTT
GCGTGCTGTGCGTGTCTTTTGTGATTCCACCACCTTGTGTGATTTTACCTTATCGTCTCTCCCTGCCGTTGGCTGTG
CGTGAATTGTGCTTCGCATTTCGTGGGAAATCAAAAGGGGAATCAACGTGTCTTTTTTTTTTCAGAAGGGGAGTCAAAGC
GCCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTGGG [GATCCTGTTTGTGCGGACTCCTCACTCCTCCCGCTTCTCCTG
TTTACTTGCACTTTCTGGGCTGCGGAAG♦AAAACGCAGGCAG] GATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA...

Figura 21. Montagem das sequências resultantes da clonagem dos produtos de RT-PCR de CL Brener transfectado com P2, P2a e P2as. Indica-se a região promotora do cistron ribossômico de Dm28 (em preto), o sítio aceptor de mini-exon (em vermelho) e sequências do vetor pGCAT-C (em azul). A sequência do mini-exon não é apresentada, mas o ponto de sua inserção no mRNA de CAT é indicado(♦) (ver texto). Entre colchetes mostra-se a posição das sequências apresentadas na figura 22.

Aceptor críptico

TTTACCTTATCGTCTCTCCCTGCCGTTGGCTGTGCGTGAATTGTGCTTCGCATTTCGTGGGAAA
TCAAAG♦GGGAATCAACGTG

Aceptor B12

GTCAAAGCGCCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTGGG/GATCAATAATTTCTTTTCCAA
ACAACAGTCTTC/TCGACCTG

Aceptor 35.2

GATCCTGTTTGTGCCGACTCCTCACTCCTCCCCGCTTCTCCTGTTTACTTGCACTTTCTGGGCT
GCGGAAG♦AAAACGCAGGCAG

Figura 22. Comparação entre as regiões flangeadoras dos pontos de adição de mini-exon (♦) utilizados nos mRNAs de CAT das construções P2 e P2a (acceptor críptico) e P2as (acceptor 35.2) e o sítio acceptor do gene B12, que não foi funcional. As pirimidinas são destacadas em azul e os nucleotídeos AG que antecedem o ponto de adição apresentam-se sublinhados. As barras (/) separam a sequência do acceptor de B12 das sequências do plasmídeo pGCAT-C e do promotor.

A partir dos dados apresentados na figura 22 analisamos algumas características das regiões que flanqueiam os sítios de adição de mini-exon (nucleotídeos AG), buscando identificar alguma que explicasse a não utilização do sítio de B12. Estas características são apresentadas na tabela XI. O conteúdo de pirimidinas a 15, 25 e 35 nucleotídeos antes do AG é mais elevado nos sítios dos genes B12 e 35.2, em comparação com o sítio críptico no promotor ribossômico. Esta observação não explica o uso preferencial do sítio de 35.2 e do sítio críptico em relação ao sítio de B12. A distância que separa o sítio acceptor de mini-exon do códon AUG de início de tradução de CAT também não mostrou correlação com a funcionalidade do sítio de "trans-splicing". O único parâmetro que poderia ter alguma correlação com a funcionalidade é o conteúdo de purinas observado na região de 10 nucleotídeos a 3' do sítio AG. Este conteúdo é de 80% para 35.2, 70% para o sítio críptico e 20% para o gene B12. Que seja de nosso conhecimento, esta correlação não foi demonstrada anteriormente em tripanossomatídeos.

Tabela XI. Características das regiões flanqueadoras dos pontos de adição de mini-exon (nucleotídios AG)

Sítio de t-s ^(a)	% pirimidinas ^(b)			% purinas ^(c)	distância AUG ^(d)
	15nt	25nt	35nt		
prom. rib. L2	33	44	42	70	142 ^(e)
gene 35.2	53	60	68	80	79
gene B12	66	60	48	20	59

(a) Sítio de adição de mini-exon

(b) Porcentagem de pirimidinas 15, 25 e 35 nucleotídios antes do AG

(c) Porcentagem de purinas 10 nucleotídeos após AG

(d) Distância do AG ao AUG iniciador

(e) Na construção P2

4.11. Expressão do gene reporter GFP dirigida pelo promotor de linhagem 1

Visando verificar a possibilidade de o produto do gene reporter CAT ser tóxico para os clones Dm28c e NR cl3 de *T. cruzi*, embora estas culturas tenham apresentado um crescimento normal após transfecção, decidimos utilizar outro gene reporter nas construções com o promotor ribossômico. O gene reporter escolhido foi o da GFP ("green fluorescent protein"), dada sua análise simples e a disponibilidade de uma construção, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman. Essa construção, realizada no vetor pTEX (Kelly *et al.*, 1992) e denominada pRibH2BΔ100-GFP, apresenta o promotor ribossômico da cepa CL seguido de uma região intergênica do gene GAPDH, de um trecho de aproximadamente 100 pb (aminoácidos 4 a 40) do gene de histona H2B e do gene reporter de GFP.

Essa construção foi introduzida em epimastigotas dos clones CL Brener e Dm28c, sendo coletadas células para observação 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a eletroporação. As células foram observadas ao microscópio de fase e de fluorescência. Calculou-se a porcentagem de células fluorescentes em um total de 500 observadas. Os resultados são apresentados na tabela XII. Como podemos notar, o promotor de CL (linhagem 1) só foi funcional em CL Brener. Deve-se ressaltar que dentre as células coletadas 96 e 120 horas após o choque, algumas apresentavam fluorescência, como

observado por inspeção geral da lâmina. Este nível de marcação, entretanto, foi inferior a 0,2%, já que nenhuma fluorescência foi identificada nas 500 células analisadas.

Tabela XII. Expressão de GFP em epimastigotas dos clones CL Brener e Dm28c eletroporados com pRibH2BΔ100-GFP

Hs após eletroporação	CL Brener	Dm28c
	% céls marc ^(a)	% céls marc
24	0,94	0
48	2,32	0
72	1,55	0
96	0	0
120	0	0

(a) Porcentagem de células fluorescentes em aproximadamente 500 células contadas

4.12. Expressão dos promotores ribossômicos em dois outros clones: Sylviox10 cl1 e Esmeraldo cl3

Para verificar se os padrões de expressão a partir dos promotores de linhagens 1 e 2 eram específicos dos clones CL Brener e Dm28c ou, se eram realmente característicos das duas linhagens, transfectamos dois outros clones, Esmeraldo cl3 e Sylviox10 cl1, representantes das linhagens 1 e 2, respectivamente, com as construções Plas e P2a. Após experimentos preliminares (dados não mostrados) as condições de eletroporação foram padronizadas como 200V-250μF para Esmeraldo cl3 e 250V-250μF para Sylviox10 cl1. Os dados de expressão de Plas e P2a referentes a dois experimentos distintos são apresentados na tabela XIII. Como observado para Dm28c, o clone Sylviox10 cl1 também não reconhece o promotor de linhagem 1 e apresenta expressão bastante baixa a partir do promotor de linhagem 2. O clone Esmeraldo cl3 apresenta expressão a partir dos dois promotores mas, ao contrário de CL Brener, a expressão é mais alta quando dirigida pelo promotor homólogo. A diferença entre os níveis de expressão dirigida pelo promotor de linhagem 2 (construção P2a) é maior entre CL Brener e Dm28c (duas ordens de grandeza) do que entre Esmeraldo cl3 e Sylviox10 cl1 (uma ordem de grandeza), já que a expressão em Esmeraldo cl3 é bastante inferior àquela de CL Brener.

Tabela XIII. Expressão dirigida pelos promotores de linhagem 1 e 2 em Esmeraldo cl3 e Sylviox10 cl1, nos dias 2, 4 e 7 após a eletroporação Valores em cpm $\times 10^3/10^7$ células

	Esmeraldo cl3			Sylviox10 cl1		
	Dia 2	Dia 4	Dia 7	Dia 2	Dia 4	Dia 7
Plas	60,5	113,8	102,0	0	0	0
	36,4	61,9	62,8	0	0	0
P2a	4,1	10,0	5,5	0,6	2,7	0,5
	6,9	10,1	-	-	-	-

5. DISCUSSÃO

5.1. A região promotora do cistron ribossômico de *T. cruzi*

Tendo em vista que o objetivo do presente trabalho é analisar a estrutura e atividade do promotor ribossômico nas duas linhagens de *T. cruzi*, e que já possuíamos uma construção contendo o promotor da cepa CL (L1) (gentilmente cedida pela Dra. Lucile Floeter-Winter), foi necessário isolar o promotor de uma cepa de linhagem 2 (L2). Para isto foi escolhida a cepa Dm28, isolada de um marsupial na Venezuela. O promotor ribossômico de uma cepa mexicana de L2 -La Cruz- já havia sido isolado (Martínez-Calvillo & Hernandez, 1994), mas não estava disponível.

Os mapas de restrição da região contendo o promotor ribossômico das cepas CL, La Cruz e Dm28 foram alinhados (fig. 10), observando-se grande semelhança entre aqueles das cepas de L2. A sequência nucleotídica da região promotora (aprox. 800 pb) da cepa Dm28 foi determinada (fig. 11) e alinhada com sequências homólogas das outras duas cepas (tabela III). Observou-se uma identidade de cerca 98% com a da cepa La Cruz e de 82% com a da cepa CL.

Análise com o programa BLAST (basic local alignment search tool-Altschul *et al.*, 1990), indica que as regiões promotoras das cepas CL (Dietrich *et al.*, 1993) e La Cruz (Martínez-Calvillo & Hernandez, 1994) não apresentam similaridade significativa com sequências homólogas de nenhum outro organismo. De modo geral, promotores de RNA polimerase I de espécies distintas apresentam pouca semelhança de sequência (Sommerville, 1994). O fato de haver uma identidade de 82% entre o promotor ribossômico de duas "linhagens" de uma mesma espécie, sugere que estas representem taxa distintas. Conforme discutido na Introdução, *T. cruzi* mostra uma enorme diversidade intra-específica, é um organismo que não possui reprodução sexual e apresenta uma estrutura populacional clonal. A estrutura clonal dificulta o uso da nomenclatura taxonômica usual de Lineu, sendo complicado o uso de conceitos de espécie e sub-espécie (Myler, 1993).

5.2. Conservação do ponto de início de transcrição do promotor ribossômico

O ponto de início de transcrição (tsp) dos isolados CL Brener e Dm28 foi estimado a partir de experimentos de proteção com nuclease S1 (fig. 12), que sugeriam uma localização semelhante dos tsps dos dois isolados.

Um mapeamento mais preciso, feito por "primer extension", permitiu localizar o ponto exato do início de transcrição na cepa Dm28 e no clone CL Brener (fig. 15 e 16), confirmando a observação anterior. Embora as sequências em torno do tsp destes

isolados apresentem diferenças (fig. 16), ambos os tsps foram mapeados em nucleotídeo A de uma sequência consenso TCAT, distante aproximadamente 1800nt do início do gene 18S (fig. 16). Nossos resultados coincidem com o mapeamento do tsp principal na cepa La Cruz, embora, neste caso, o início da transcrição tenha sido identificado no nucleotídeo G (Martínez-Calvillo & Hernandez, 1994). Os autores ainda descrevem a presença de outro tsp situado 270 pb a 3' deste (ver fig. 11). Este segundo tsp de La Cruz coincide com o tsp descrito para a cepa CL (Dietrich *et al.*, 1993), que estaria a 1550nt do início do gene 18S (ver fig. 11) e que corresponderia a um nucleotídeo G. Em nossos ensaios, este segundo tsp não foi identificado. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta discrepância. A primeira refere-se ao isolado analisado: no nosso caso o clone CL Brener, no caso de Dietrich *et al.* (1993), a cepa CL. Sabe-se que as cepas correspondem a populações heterogêneas e, desta forma, o clone CL Brener pode ser diferente do conjunto da população. Como exemplo pode-se citar o clone CL14, também derivado da cepa CL, que apresenta termossensibilidade (Zingales, dados não publicados) e não é infectivo para camundongos (Lima *et al.*, 1990). Outra possibilidade é que a transcriptase reversa utilizada por aqueles autores apresentasse dificuldades em transcrever regiões com estrutura secundária, bastante comuns nos promotores ribossômicos, o que geraria paradas prematuras. Em nossos experimentos utilizamos a Superscript II RT, derivada da M-MLV RT que, ao contrário da última, não apresenta atividade RNase H, impedindo a degradação do RNA molde e aumentando sua atuação e processividade. Outra alternativa é que Dietrich *et al.* (1993) tenham utilizado como molde RNAs já processados, de modo que o tsp descrito para a cepa CL corresponda a um sítio de processamento do rRNA, como descrito para *Crithidia fasciculata* (Grondal *et al.*, 1990), *T. brucei* (White *et al.*, 1996) e *L. amazonensis* (Uliana *et al.*, 1996).

Na bactéria *E. coli* os pontos de início de transcrição da maioria dos genes correspondem a purinas (Voet & Voet, 1990). Esta conclusão parece ser também válida para o cistron de rDNA de tripanossomatídeos. Como exemplos citamos a iniciação no nucleotídeo G no cistron ribossômico de *Leishmania chagasi* (Gay *et al.*, 1996), das cepas CL e La Cruz de *T. cruzi*, (Dietrich *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo & Hernández, 1994). Por outro lado, para *L. amazonensis*, o início de transcrição do cistron ribossômico corresponde a um T (Uliana *et al.*, 1996).

5.3. O cistron ribossômico em isolados de grupo 1/2

Conforme apresentado na Introdução, a amplificação do domínio divergente D7a do gene de rRNA 24S α de *T. cruzi* por PCR origina produtos de 125 pb (L1) ou 110 pb (L2). Em alguns isolados clonados observa-se ainda a amplificação de ambos os

produtos, sendo estes isolados classificados como grupo 1/2 (Souto et al., 1996). Experimentos de Southern blot mostraram que estes isolados apresentam dois tipos de genes de rRNA 24S α , sendo que os genes de tipo 2 são cerca de 10 vezes mais abundantes do que os de tipo 1 (Souto et al., 1996). Visando analisar a expressão dos dois tipos de cistron ribossômico nos isolados de grupo 1/2, realizamos experimentos de RT-PCR utilizando RNAs totais de CL Brener, Dm28, NR cl3 e SO3 cl5-estes dois últimos representantes do grupo 1/2-e iniciadores, grupo 1 ou 2 específicos (r1 e r2, respectivamente), complementares a trechos da região promotora. Os experimentos de RT-PCR para amplificar as regiões promotoras de tipo 1 e tipo 2 foram feitos em duas reações distintas para evitar competição entre os oligonucleotídeos r1 e r2 (ver fig. 13). Os produtos da reação apresentam tamanhos distintos: 390 pb e 180 pb para grupo 1 e grupo 2, respectivamente. Os dados obtidos (fig. 14) mostram que enquanto no clone CL Brener obtém-se um produto de 390 pb, para os clones Dm28c, NR cl3 e SO3 cl5, o produto apresenta 180 pb. Este resultado indica que em isolados de grupo 1/2 apenas os cistrons ribossômicos de tipo 2 são expressos, corroborando dados anteriores, obtidos com uso de uma abordagem diferente (Souto, 1996).

O ponto de início de transcrição foi mapeado nos isolados 1/2 por "primer extension", observando-se a mesma localização identificada em CL Brener e Dm28, com início no nucleotídeo A (fig. 15 e 16).

A região flanqueadora do tsp (130 pb) dos quatro isolados foi sequenciada e submetida a alinhamento (fig. 16). Em trabalho recente, Nunes *et al.* (1997b) descreveram a sequência de uma região homóloga dos clones NR cl3 e SO3 cl5. Na figura 23 apresentamos o alinhamento das sequências obtidas por nós para os quatro clones e por Nunes *et al.* (1997b) para os dois clones de grupo 1/2. A porcentagem de identidade foi obtida pelo programa ALIGN e é mostrada na tabela XIV. O primeiro ponto que chama a atenção é que a sequência de NR cl3 obtida por Nunes *et al.* (1997b) é diferente daquela obtida por nós. De fato, a identidade é de 81%. Isto não acontece com a sequência de SO3 cl5 obtida pelos dois laboratórios, que apresenta uma identidade de praticamente 100%. Por outro lado, se compararmos a sequência de NR cl3 de Nunes com a de CL Brener observamos uma identidade de 96%. A comparação das sequências de SO3 cl5 com CL Brener e Dm28 mostra uma identidade de cerca de 85% e 90%, respectivamente. A similaridade entre a sequência que flanqueia o tsp (130 pb) de CL Brener e Dm28 é de 82%. É interessante ressaltar que igual valor de similaridade foi observado quando foram alinhadas sequências de 800 pb da região promotora do cistron ribossômico dos dois isolados (ver item 5.1).

Tomados em seu conjunto, os dados indicam que Nunes *et al.* (1997b) isolaram a região do promotor do cistron ribossômico de tipo 1 de NR cl3 e de tipo 2 de SO3 cl5, ao passo que nós isolamos a região homóloga de tipo 2 de ambos os isolados. Isto deve

ter sido decorrência do fato de que Nunes *et al.* (1997b) amplificaram a região do promotor utilizando três iniciadores simultaneamente: dois grupo-específicos e um conservado. Os produtos foram clonados e sequenciados. O conjunto de dados também sugere que o promotor de cistron de tipo 1 de isolados de grupo 1/2 apresenta maior similaridade com o promotor de CL Brener (L1) -96%- do que o promotor de tipo 2 de isolados 1/2 com o promotor de Dm28 (L2) -90%.

É interessante observar que apesar de haver estas variações na sequência que flanqueia o *tsp*, este apresenta a mesma localização nos quatro isolados analisados.

Figura 23. Alinhamento das seqüências das regiões flanqueadoras do *tsp* (em negrito) de diversos isolados. Os números 1 e 2 referem-se ao tipo de promotor ribossômico, N indica que a seqüência em questão foi obtida por Nunes (Nunes *et al.*, 1997b)

CL Brener	AAAAAATTTATTGGAGCTTCCGGGGTTTGAACCAAAGTGGGCTTTTTTAGC
NR-1 (N)	A.....TT.
NR-2	A..T..T..T.....T..T...C...A.
SO3-2	A..T..T..T.....T..T...C...A.
SO3-2 (N)	-..T..T.....T..T...C...A.
Dm28	A..T.....T.....C..T...CT..T.....A.
CL Brener	CGTTCGTTTTGGTTTAGTAAATCATGGAGCGGTGGTCTCTCCGGTGGCCAA
NR-1 (N)	-.
NR-2	..AC....GG...C....CG....A.....A.....G
SO3-2	..AC....GG...C....C.....A.....G
SO3-2 (N)	..AC....GG...C....C.....A.....G
Dm28	...C.A...GT..C.....C.....AT.....C.
CL Brener	G-TGGCGTCG-AAGGAT--GGCGGCTTT
NR-1 (N)	.-.....G.....-...C..
NR-2	.-.....G.....TT..T.C....
SO3-2	.-.....G.....TT..T.C....
SO3-2 (N)	.-.....G.....TT..T.C....
Dm28	.G.....G.....---ATT.G.G.

Tabela XIV. Porcentagem de identidade entre as seqüências das regiões flanqueadoras do tsp (130 pb) em diferentes isolados

	CL Brener	NR ^(a) -1 (N)	NR-2	SO3 ^(b) -2	SO3-(N) ^(c)	Dm28
CL Brener	-	96	82	83	85	82
NR-1 (N)	-	-	81	82	84	80
NR-2	-	-	-	98	98	89
SO3-2	-	-	-	-	100	90
SO3-2 (N)	-	-	-	-	-	90
Dm28	-	-	-	-	-	-

a) NR= NR cl3

b) N= seqüência publicada por Nunes (Nunes *et al.*, 1997 b), depositada no GenBank

c) SO3= SO3 cl5

Os números 1 ou 2 após NR e SO3 indicam o tipo de promotor correspondente à seqüência

5.4. Expressão de um gene reporter dirigida por promotores de L1 e L2

Diferentes construções plasmidiais foram obtidas (fig. 8) visando determinar a atividade de promotores de L1 e L2.

A padronização das condições de eletroporação mostrou que os isolados em estudo apresentam suscetibilidades distintas ao choque, sendo Dm28c o mais resistente, seguido de NR cl3 e CL Brener. De fato, a voltagem necessária para promover 40-60% de sobrevivência foi 300V para Dm28c, 250V para NR cl3 e 200V para CL Brener. Imaginando que esta diferença se relacionava a características de membrana, e sabendo que esta é bastante negativa em *T. cruzi* (De Souza, 1984), decidimos avaliar o efeito de íons positivos na transfecção, uma vez que eles poderiam neutralizar parte das cargas da superfície, facilitando a entrada do DNA plasmidial. Analisamos o efeito da adição de 1mM de MgCl₂ ou CaCl₂ no tampão de eletroporação na expressão de CAT mediada pelo promotor de L2. A adição de CaCl₂ levou ao decréscimo da expressão (possivelmente por alterações metabólicas, já que o cálcio atua como segundo mensageiro em diversas vias), enquanto que a adição de MgCl₂ aumentou a expressão em 50% em Dm28c e 30% em NR cl3, e reduziu em 25% em CL Brener. Embora desconhecendo a razão do decréscimo em CL Brener, decidimos adotar essa nova condição de eletroporação para os três isolados.

Os experimentos de transfecção em CL Brener e Dm28c com as construções contendo promotores de L1 (P1as) e L2 (P2a) (fig. 8) revelaram uma situação intrigante: enquanto Dm28c (L2) reconhece apenas o promotor homólogo, CL Brener (L1)

reconhece ambos. A ausência de atividade do promotor de L1 em Dm28c sugere que este isolado não apresenta fatores (proteicos) capazes de reconhecer esta região (elemento). Isso reforça a idéia de que o promotor de L2 seja mais semelhante a uma hipotética sequência ancestral que originou os promotores atuais das duas linhagens, ou que este promotor tenha evoluído com uma taxa de mutação inferior à da sequência que originou o atual promotor de L1. Dada a co-evolução entre um elemento e os fatores que a ele se associam, é de se imaginar que os fatores que reconhecem o promotor de L2 sejam mais conservados do que os associados ao promotor de L1, sendo incapazes de se ligar ao último. O reconhecimento do promotor de L2 por cepas de L1 sugere que os fatores de L1 são mais promíscuos (menos específicos) ou que isolados de L1 mantiveram, além de fatores que reconhecem o promotor L1 endógeno, fatores capazes de se associar ao promotor de L2.

Para nos certificarmos de que o fenômeno que estávamos observando não era particular dos clones CL Brener e Dm28c, avaliamos a atividade de CAT dirigida por promotores de L1 e L2 em dois outros clones: Esmeraldo cl3 (L1) e Sylviox10 cl1 (L2) (tabela XII). Do mesmo modo que Dm28c, Sylviox10 cl1 se mostrou mais resistente ao choque do que Esmeraldo cl3. Ainda, Sylviox10 cl1 não apresentou expressão dirigida pelo promotor de L1, mas apenas pelo promotor de L2, sendo essa expressão baixa (níveis semelhantes aos de Dm28c).

Esmeraldo cl3, como CL Brener, reconhece ambos os promotores. No entanto, ao contrário de CL Brener onde o promotor L2 dirige uma expressão de CAT cerca de quatro vezes maior do que aquela dirigida pelo promotor homólogo, Esmeraldo cl3 apresenta expressão cerca de dez vezes maior a partir do promotor homólogo do que a partir de promotor de L2. Estes experimentos indicaram que existe um padrão geral no comportamento dos promotores: o promotor L1 só é expresso em isolados L1, corroborando trabalhos anteriores (Floeter-Winter, 1997; Nunes et al., 1997b), ao passo que o promotor L2 é expresso em ambas as linhagens. As diferenças nos níveis de expressão de CAT parecem ser particulares de cada isolado.

Com o intuito de verificar se o padrão de expressão do gene reporter CAT não era específico desta enzima, (isto é, a enzima poderia ser tóxica para determinados isolados), decidimos analisar a expressão de outro gene reporter, o da Green Fluorescent Protein (GFP). Utilizamos uma construção contendo o promotor ribossômico da cepa CL (de aproximadamente 600 pb), a região intergênica de GAPDH e um trecho do gene de histona H2B, seguidos do gene de GFP (gentilmente cedida pelo Dr. Sérgio Schenkman). Os clones CL Brener e Dm28c foram transfectados com esse plasmídio, observando-se a expressão de GFP apenas em CL Brener. É interessante ressaltar que a fluorescência ficou concentrada na região do núcleo, resultado esperado dada a fusão de GFP com 37 aa de histona.

Face aos resultados obtidos, prosseguimos os experimentos para a análise da atividade dos promotores de L1 e L2 usando como gene reporter CAT. Ao estudar a cinética de expressão de CAT em diferentes dias após eletroporação, observamos grande variação nos resultados obtidos em experimentos distintos e mesmo entre as triplicatas de um mesmo experimento para ambos os promotores (L1 e L2) e para os três isolados de *T. cruzi* (CL Brener, Dm28 e NR cl3). A variabilidade da expressão de CAT em tripanossomatídios também foi observada por outros autores (Nunes *et al.*, 1997a; Tyler-Cross *et al.*, 1995), não havendo nenhuma explicação disponível.

Outra observação intrigante refere-se aos níveis de expressão de CAT no clone Dm28c. Observamos que, à medida que este clone era subcultivado em meio LIT, a expressão de CAT diminuía. Dados da literatura indicam que a infectividade de isolados de *T. cruzi* para camundongos e células em cultura diminui com o número de passagens em meio líquido (Contreras *et al.*, 1998), sendo então recomendada passagem periódica em camundongos. Foi também observado para o clone CL Brener que a capacidade de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos diminui com o tempo de subcultivo em meio LIT (Zingales *et al.*, 1997). A análise da expressão de determinados genes mostrou que algumas proteínas deixam de ser expressas durante a manutenção prolongada em meio líquido (Contreras *et al.*, 1998) e que tripomastigotas obtidos por diferentes métodos (cultura ou passagem por triatomíneos) apresentam perfis de polipeptídios distintos (Goldenberg *et al.*, 1984). Não sabemos qual a relação entre estas observações e o fato de haver diminuição da expressão de CAT em Dm28 após repiques sucessivos.

Em todos os experimentos CL Brener apresentou maior expressão de CAT a partir do promotor heterólogo (L2) em relação ao promotor homólogo. Uma das possíveis explicações seria a presença de um inibidor na sequência do promotor de L1, associada à ausência de tal elemento no promotor de L2. Outra possibilidade seria a existência de ativadores no promotor de L2, mas não de L1. Os experimentos mostrados na figura 19 indicam que a remoção de uma sequência de 250 pb do promotor L2 (construção P2a1) reduz a expressão de CAT de aproximadamente 1,4 vezes em CL Brener e NR cl3 e de 2 vezes em Dm28c. Desta forma, esta sequência poderia ser considerada um possível ativador da transcrição, embora o nível de ativação seja bastante baixo.

Estudos realizados em *Leishmania* indicam que o promotor ribossômico de *L. amazonensis* é expresso com eficiência dez vezes maior em *L. major* e *L. mexicana* em relação à espécie homóloga (Stempliuk *et al.*, 1995). Isto também é verificado com o promotor de *L. tarentolae*, que apresenta expressão uma ordem de grandeza maior em *L. hoogstraali* quando comparado com *L. tarentolae*, *L. amazonensis* e *L. major* (Orlando *et al.*, 1997). A expressão do promotor de *L. chagasi* apresenta a mesma intensidade em

L. chagasi e *L. major*; e aproximadamente o dobro da atividade em *L. donovani* (Gay *et al.*, 1996). Uma das hipóteses apresentadas foi a de que *L. donovani* teria menos cistrons de rRNA em relação a *L. chagasi* e que sua RNA polimerase I reconheceria mais eficientemente o promotor heterólogo; outra foi a de que a construção plasmidial seria mais estável nesta espécie (Gay *et al.*, 1996). Para comprovar as hipóteses seria interessante comparar a expressão dos promotores homólogo e heterólogo em *L. donovani* e quantificar o número de genes de rRNA e dos transcritos correspondentes nas duas espécies.

Realizamos experimentos de eletroporação dos promotores L1 e L2 no clone NR cl3, representante de grupo 1/2. Quando comparado com os isolados CL Brener e Dm28 conclui-se que o clone NR cl3 apresenta um comportamento híbrido. Isto é, comporta-se como CL Brener pois a expressão de CAT ocorre a partir de ambos os promotores, sendo esta superior (aproximadamente 2 vezes) quando dirigida pelo promotor L2 (vetor P2a). É importante salientar, no entanto, que a expressão em NR cl3 a partir de ambos os promotores é muito inferior àquela observada em CL Brener (tabelas V e VI). O clone NR cl3 apresenta comportamento semelhante a Dm28 no que se refere ao nível de expressão de CAT dirigido pelo promotor de L2 (uma ou duas ordens de grandeza menor do que o de CL Brener transformado com a mesma construção).

A observação de que o clone NR cl3 reconhece tanto o promotor de tipo 1 quanto o de tipo 2 na construção plasmidial é bastante surpreendente, tendo em vista que neste clone só ocorre expressão do cistron ribossômico de tipo 2 (ver item 5.3). Algumas hipóteses foram elaboradas para explicar a diferença de comportamento. Dentre elas, poderia-se supor que as características do promotor de tipo 1 do grupo 1/2 são diferentes daquelas do promotor (L1) da cepa CL. Essa hipótese é pouco provável, já que as seqüências destes dois promotores apresentam 96 % de identidade (tabela XIV). Outra hipótese é que nos isolados de grupo 1/2 haveria seqüências dentro do promotor genômico de tipo 1 que ligariam algum repressor (alguns fatores repressores já foram descritos em eucariotos, Jacob, 1995). Estas seqüências estariam ausentes no promotor L1 da cepa CL utilizado na construção plasmidial. É possível ainda que as seqüências genômicas de tipo 1 e 2 das cepas de grupo 1/2 apresentem um fenômeno análogo à dominância nucleolar descrita para o cistron ribossômico de *Xenopus* (Reeder & Roan, 1984), ou seja, que as regiões situadas a 5' dos promotores 1 e 2 disputem fatores de transcrição, e que a de tipo 2 apresente maior afinidade pelos mesmos, sendo portanto a única expressa. Na transfecção transitória, a grande quantidade de plasmídio com promotor de L1 introduzida na célula alteraria a proporção entre as quantidades dos dois tipos de promotor, tornando possível a expressão do promotor de L1. Para responder a esta questão seria necessário isolar as regiões promotoras dos dois tipos de cistron das

cepas de grupo 1/2, buscando comparar “enhancers” e sequências de ligação de fatores. É importante salientar que sequências deste tipo não foram definidas em *T. cruzi*.

A atividade de promotores de genes de PARP (procyclic acidic repetitive protein) e VSG (variant surface glycoprotein) de *T. brucei* foi analisada em experimentos de expressão transitória e estável (Urmenyi & Van der Ploeg, 1995). Os autores concluíram que a eficiência transcricional dos promotores em ensaios de expressão transitória pode ser diferente daquela observada após integração no genoma, sendo em geral maior na forma epissômica. Foi levantada a possibilidade de que as construções não integradas apresentariam um nível de empacotamento diferente (menos compacto) em relação às integradas. Estas últimas estariam sob forma de nucleosomas nos quais os fatores de transcrição e de regulação da expressão gênica teriam acesso mais restrito (Urmenyi & Van der Ploeg, 1995). Esta hipótese também poderia explicar o fato de o promotor L1 da construção plasmidial ser expresso em NR cl3.

Os experimentos realizados mostraram que a expressão de CAT mediada pelo promotor de L2 é muito baixa em Dm28 e NR cl3 quando comparada com CL Brener. Diversas hipóteses foram elaboradas para explicar esta diferença e foram abordadas na seção Resultados. São elas: presença de sequências inibitórias da transcrição em L2; entrada diferencial do plasmídio nos isolados; eficiência do processo de “trans-splicing” (ver discussão a seguir). Uma hipótese que não foi analisada por dificuldades experimentais foi a de haver maior instabilidade do mRNA de CAT em Dm28c e NR cl3. Nossas construções não apresentam nenhuma sequência de *T. cruzi* a 3’ do gene de CAT, o que poderia resultar em baixa estabilidade do RNA. Nunes *et al.* (1997a), utilizando o promotor do gene de mini-exon, mostraram que a adição de um espaçador a 3’ do gene reporter promove uma expressão semelhante àquela promovida pela construção na qual o gene reporter era seguido da sequência de poliadenilação de SV40, sugerindo que o RNA gerado a partir das duas construções tenha a mesma estabilidade. Já que nossas construções também apresentam a sequência de SV40 a 3’ do gene reporter, acreditamos que o RNA de CAT não apresenta problemas de estabilidade.

5.5. Os trechos do promotor ribossômico de L2

Durante a realização dos experimentos desta dissertação foi publicado o trabalho de Nunes *et al.* (1997b) onde o mesmo tema, isto é, a análise da atividade de promotores de rRNA nas duas linhagens de *T. cruzi*, era abordado. Os autores utilizaram como promotor de L2 uma sequência do clone Dm28c que apresenta 160nt a menos (na extremidade 5’) em relação à região utilizada por nós, que deriva da cepa Dm28. Além disto, Nunes *et al.* (1997b) utilizaram como acceptor de mini-exon uma porção do gene 35.2, enquanto nós utilizamos uma região do gene B12. Os resultados daqueles autores

coincidem com os nossos em termos qualitativos, isto é, que promotores de L2 são expressos em ambas as linhagens. No entanto, há grandes discrepâncias a nível quantitativo, tendo em vista que Nunes *et al.* (1997b) observavam expressão da mesma ordem de grandeza do promotor L2 em CL Brener, Dm28c e NR cl3.

Uma das hipóteses levantadas para explicar a baixa expressão do promotor homólogo (presente em nossas construções) em Dm28c e NR cl3 foi a de que este promotor apresentasse alguma sequência inibitória na extremidade 5', que fosse reconhecida por um repressor em Dm28c e NR cl3 mas não em CL Brener. Apoiando esta hipótese havia a comparação de nosso promotor com o promotor utilizado por Nunes *et al.* (1997b), que apresentava 160nt a menos do que o nosso na extremidade 5'.

Desta forma foram obtidas obtidas construções onde a porção 5' do promotor L2 foi reduzida de 250 e 530 pb em relação à região original de 800 pb (fig. 19). Ao retirarmos 250 pb observamos uma redução na expressão de CAT nos três clones (1,4 vezes em CL Brener, 2 vezes em Dm28c e 1,5 vezes em NR cl3). Os resultados obtidos indicam que, ao contrário do esperado, esta região parece ser estimulatória e não inibitória da expressão de CAT. Em experimentos análogos foi observado que a adição de um trecho de 1,45 Kb "upstream" do promotor ribossômico de CL não determina o aumento da expressão do gene reporter (Tyler-Cross *et al.*, 1995). É possível que a região considerada, por ser mais extensa do que a analisada por nós, apresente não só ativadores mas também sequências inibitórias, sendo o efeito resultante nulo.

A remoção de mais 280 pb (construção P2aII, fig. 19) abole a expressão de CAT. Esta construção não contém o tsp mapeado por nós, mas contém a sequência onde havia sido localizado previamente o tsp da cepa CL (Dietrich *et al.*, 1993). Os experimentos com P2aII confirmaram que este tsp não é utilizado nos clones analisados.

5.6. Eficiência de transfecção

Já que não identificamos elementos inibitórios para Dm28 na região 5' do promotor, decidimos avaliar a eficiência de transfecção nos três clones, acreditando que problemas na transfecção pudessem justificar a baixa expressão de CAT em Dm28c e NR cl3. O método adotado foi a quantificação do plasmídeo internalizado em CL Brener, Dm28c e NR cl3.

A abordagem utilizada permite comparar a quantidade de plasmídeo presente no interior de certo número de células, mas não possibilita determinar a distribuição deste plasmídeo na população de células (por exemplo se existem células com muitas cópias do plasmídeo). Experimentos como plaqueamento quantitativo em meio seletivo de células transfectadas com um plasmídeo contendo um gene que confere resistência a uma determinada droga fornece a proporção de células da população que interiorizaram o

plasmídio. Esta metodologia foi aplicada com sucesso em diversos tripanossomatídeos (Coburn *et al.*, 1991), mas não em *T. cruzi*.

Realizamos dois experimentos, e em um deles a quantificação foi feita tanto por densitometria das bandas da autorradiografia quanto por PhosphoImage, com resultados semelhantes. Embora os valores absolutos obtidos nos dois experimentos sejam bastante diferentes (em função da variabilidade metabólica das culturas que não são sincrônicas, da atividade específica das sondas, do tempo de exposição das autorradiografias, etc.), as razões entre os valores são semelhantes. Os dados sugerem que não existe correlação entre a quantidade de plasmídio interiorizado e o nível de expressão do gene reporter. Por exemplo, no clone CL Brener o plasmídio é internalizado com uma eficiência de 1,6-2,0 vezes maior do que em Dm28c, ao passo que a atividade de CAT é de 200 a 300 vezes maior em CL Brener do que em Dm28c. Para NR cl3 observa-se uma eficiência de internalização de 1,4-2,4 vezes a de CL Brener, e a atividade de CAT é aproximadamente 100 vezes menor do que neste último clone. Isso permite concluir que a baixa expressão observada em Dm28c e NR cl3 não se deve apenas a problemas de transfecção.

5.7. Sítios aceptores de "*trans*-splicing"

Uma outra hipótese para a baixa expressão do promotor homólogo em Dm28c seria uma baixa eficiência de "*trans*-splicing". A construção utilizada por Nunes *et al.* (1997b), que continha o promotor L2 e o sítio aceptor do gene 35.2 (de aproximadamente 90 pb), gerava níveis de expressão de mesma ordem de grandeza em CL Brener, Dm28c e NR cl3. Decidimos então elaborar uma construção que contivesse nossa região promotora de Dm28 (com aproximadamente 160 pb a mais do que a de Nunes *et al.*, 1997b) seguida do aceptor do gene 35.2. Este plasmídio foi denominado P2as (fig. 8).

Esta construção foi introduzida em CL Brener, Dm28c e NR cl3, e a expressão do gene reporter CAT foi medida nos dias 2, 4 e 7. Os resultados (tabela IX) mostram que a troca do sítio aceptor causa um incremento de aproximadamente 12 vezes para Dm28c e 1,4 vezes para NR cl3, e praticamente não afeta a expressão de CL Brener (tabela X). Isso reforça a idéia de que o processo de "*trans*-splicing" do transcrito proveniente da construção P2a seja menos eficiente em Dm28c e NR cl3 do que em CL Brener. Por outro lado, mesmo após a troca de sítio aceptor, a expressão do promotor de L2 foi 30-40 vezes maior em CL Brener quando comparado com Dm28c e NR cl3. Nossa construção P2as, contendo o promotor de L2 e o aceptor do gene 35.2 não promove, portanto, expressão de CAT de mesma ordem de grandeza nos três isolados, contrastando com as observações de Nunes *et al.* (1997b). Conclui-se, então, que

problemas de "*trans*-splicing" não são os únicos responsáveis pela baixa expressão nestes dois clones.

Para entender o funcionamento dos diferentes sítios aceptores presentes nas construções estudadas, resolvemos determinar o ponto de inserção do mini-exon nos RNAs derivados das construções P2 (sem sítio acceptor), P2a (com sítio de B12) e P2as (com sítio de 35.2). Para isso, amplificamos, clonamos e sequenciamos a região situada entre o ponto de adição do mini-exon e o início do gene de CAT. Os dados apresentados nas figuras 20 e 21 permitem tirar algumas conclusões:

- Para todas as construções há maior quantidade de mRNA maduro de CAT em CL Brener;
- O sítio acceptor de mini-exon do gene B12 não é utilizado por nenhum dos três clones;
- Para as construções P2 e P2as utiliza-se um sítio acceptor localizado no interior do promotor ribossômico de Dm28 (sítio críptico);
- O sítio acceptor de mini-exon do gene 35.2 é usado preferencialmente em relação ao sítio críptico.

A quantidade de produto processado reflete tanto diferenças na taxa de transcrição quanto na de "*trans*-splicing". Uma vez que não conseguimos determinar a quantidade de RNA de CAT antes e após a adição do mini-exon dos três clones, não sabemos a qual dos dois fatores atribuir a maior quantidade de mRNA de CAT em CL Brener. De qualquer modo, o incremento na expressão ocasionado pela troca de sítio em Dm28c e NR cl3 sugere que o mecanismo de "*trans*-splicing" esteja envolvido nesta questão. É possível que CL Brener seja capaz de realizar "*trans*-splicing" eficientemente utilizando o sítio críptico do interior do promotor, já que altos níveis de expressão são observados quando este clone é eletroporado com a construção P2a, e praticamente nenhum acréscimo é observado quando se troca o sítio acceptor. Já os clones Dm28c e NR cl3, embora utilizem o mesmo sítio críptico, parecem fazê-lo com menor eficiência, já que a troca deste gerou grande incremento na expressão. Assim, os isolados diferem quanto à eficiência de utilização de um sítio, mas não quanto à natureza do sítio utilizado.

O fato de se observar em CL Brener e NR cl3 aumento da expressão na presença do sítio acceptor de B12 em relação à construção sem sítio acceptor (tabela X), sugere que o trecho B12 provavelmente estimula o processo de "*trans*-splicing". Sabendo que o sítio críptico é utilizado tanto na presença do sítio B12 quanto na ausência de sítio acceptor, imaginamos que a presença do sítio B12 altere a conformação do RNA, gerando uma estrutura mais favorável para a entrada do mini-exon.

Uma questão intrigante é o motivo pelo qual ocorre adição de mini-exon no sítio do gene 35.2 e não no de B12. As características do sítio acceptor de mini-exon ("*trans*-splicing") de tripanossomatídios não foram claramente definidas. Em termos gerais, sabe-

se que o mini-exon é adicionado após uma sequência AG, que geralmente dista 30-70nt do início de tradução (AUG). A sequência AG é precedida de um trecho de polipirimidinas de tamanho variável (Agabian, 1990).

Para os genes VSG 78 e VSG I⁷⁸ de *T. equiperdum*, observou-se a utilização de diversos sítios aceptores, sendo mais utilizados aqueles situados a 3' do "med-comp site" (região complementar ao SL-RNA ou med-RNA) e que apresentam conteúdo de pirimidina superior a 30% nos 15nt que antecedem o AG (Layden & Eisen, 1988).

Em *T. cruzi* a interrupção do trecho de polipirimidina pela inserção de um elemento transponível levou ao uso de um novo sítio aceptor localizado no interior deste elemento. Este sítio encontra-se a 62nt do AUG iniciador, sendo precedido de 11 pirimidinas em tandem (Vasquez *et al.*, 1994).

Em *Leishmania* demonstrou-se que um trecho sintético de aproximadamente 30 pirimidinas adjacente ao AG era quase tão eficiente no "trans-splicing" quanto a região integênica inteira, e que o aumento do número destes trechos aumentava a expressão gênica (Curotto de Laffaile *et al.*, 1992).

Em *T. brucei*, tripanossomatídio no qual o processo de "trans-splicing" foi mais estudado, foi descrita a adição do mini-exon após trechos de aproximadamente 10-15 pirimidinas, situados de 5 a 36 nucleotídeos a 5' do AG (Huang & Van der Ploeg, 1991; Vassela *et al.*, 1994). A adição de mini-exon em *T. brucei* pode ainda ocorrer em introns de genes humanos ou de levedura, que possuem trechos de aproximadamente 10 pirimidinas em tandem, seguidas do AG (Metzenberg & Agabian, 1996).

A diversidade de sequências que flanqueiam o sítio aceptor de mini-exon de diferentes tripanossomatídios e em diferentes genes torna difícil a determinação de uma sequência consenso. De modo geral, as regiões aceptoras são identificadas pela análise do cDNA obtido a partir do mRNA processado, sendo então isoladas e inseridas em construções, geralmente utilizadas em experimentos de expressão transitória. Alguns problemas associados a esta metodologia são a seleção da menor região responsável pelo "trans-splicing" e o fato de que a inserção em um epissomo pode alterar as características conformacionais do sítio, reduzindo ou abolindo sua utilização.

Comparamos algumas características dos sítios B12, criptico e 35.2, a fim de tentar entender o que levou à não funcionalidade do primeiro (fig. 22 e tabela XI). Nenhuma das características usuais de sítios aceptores (conteúdo de pirimidinas a 5' do AG, distância do AUG) foi discrepante para B12 a ponto de explicar o fato. Por outro lado, nos chamou atenção o reduzido conteúdo de purinas após o AG o sítio B12 (20%) em comparação aos demais (70 e 80%). Embora essa correlação nunca tenha sido descrita, é possível que seja bastante relevante.

Uma alternativa para a não funcionalidade do sítio aceptor de B12 é que não tenhamos subclonado na construção P2a toda a região necessária para seu

funcionamento. A comparação dos tamanhos dos sítios aceptores de B12 e de 35.2 indica que o primeiro apresenta cerca de 30 pb, enquanto que o segundo possui aproximadamente 90 pb. Outra possibilidade é que a região subclonada não adquira, no plasmídeo, uma conformação adequada para permitir o "*trans-splicing*".

Para que haja interação entre os fatores que atuam no "*trans-splicing*" e o sítio acceptor são necessárias, provavelmente, sequências específicas (polipirimidinas, por exemplo) e conformações adequadas. Tendo analisado os parâmetros relacionados com a sequência primária da região dos sítios aceptores críptico, B12 e 35.2, buscamos comparar as estruturas secundárias dos trechos flangeadores destes sítios, nos RNAs provenientes das construções P2, P2a e P2as. Para tal, selecionamos sequências de diferentes tamanhos, contendo desde 13 até 300nt após o AG e convertimos suas sequências em sequências de RNA. O maior trecho analisado apresenta 602nt, 300nt antes e 300 nt após o AG. Não analisamos regiões maiores por limitações do programa. As sequências foram submetidas à análise pelo programa RNAdraw, a 28°C (temperatura de cultivo das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*). A energia livre, parâmetro inversamente proporcional à estabilidade da molécula (quanto menor a energia, maior a estabilidade), apresentou valores semelhantes para as moléculas das construções P2, P2a e P2as de um mesmo tamanho, e diminuiu conforme aumentou o tamanho das sequências em análise. Concluímos, portanto que as moléculas de 602nt seriam mais estáveis e mais adequadas para o estudo. A figura 24 mostra as estruturas dos RNAs (602nt) provenientes das três construções; nelas destacam-se os "sítios aceptores" críptico, B12 e 35.2.

Como podemos observar, a maior parte (62-69%) de cada molécula está na forma de dupla fita, em hélice, da qual participam pares A-U, C-G e G-U. Essa característica é comum à maioria dos RNAs (Serra & Turner, 1995). O sítio acceptor críptico, utilizado nos RNAs das construções P2 e P2a, situa-se em um ramo com estrutura de dupla fita. O sítio acceptor de B12, não utilizado, situa-se em uma alça ("loop") não pareada. O sítio de 35.2, utilizado no RNA do plasmídeo P2as, encontra-se em um trecho de dupla fita imediatamente antes de uma alça interna (de fato, o nt G faz parte do par de bases de fechamento da alça).

A comparação das estruturas dos três sítios mostra que os sítios utilizados (críptico e de 35.2) encontram-se na forma de dupla fita, enquanto que o sítio não utilizado, B12, situa-se em uma alça. Não sabemos quão relevante é esta observação em termos da relação estrutura-função, já que a análise realizada pode ser muito simplista e pouco consistente. De fato, observamos variação no tipo de estruturas geradas pelo programa em função do tamanho da molécula submetida. Além disto, é bastante provável que a estrutura desta região seja diferente *in vivo*, pois depende de outras porções da molécula de RNA e da interação com fatores proteicos e outros RNAs, como

o medRNA, envolvidos no processo de "*trans-splicing*". Outra informação importante é a de que o processo de "*trans-splicing*" ocorre concomitantemente com o de transcrição. Sendo assim, é provável que apenas parte do RNA tenha sido transcrito no momento da adição do mini-exon na extremidade 5', o que dificulta a escolha dos limites da molécula para elaboração da estrutura secundária do sítio acceptor no momento do "*trans-splicing*".

Figura 24a. Estrutura secundária (-653kJ) do trecho de 602 nt do RNA proveniente da construção P2. Em destaque, a região que contém o sítio aceptor críptico (em vermelho).

Figura 24b. Estrutura secundária (-596kJ) do trecho de 600nt do RNA proveniente da construção P2a. Em destaque, a região que contém o sítio acceptor do gene B12 (em vermelho).

Figura 24c. Estrutura secundária (-637 kJ) do trecho de 602nt do RNA proveniente da construção P2as. Em destaque, a região que contém o sítio aceitor do gene 35.2 (em vermelho).

6. CONCLUSÕES

O alinhamento das seqüências da região promotora dos clones CL Brener (L1) e Dm28 (L2) mostra 82% de identidade. Para o clone NR cl3 (L1, grupo 1/2), a comparação da seqüência do promotor do cistron de tipo 1 mostra 96% de identidade com o de CL Brener, ao passo que o promotor de tipo 2 apresenta 90% de identidade com o de Dm28c. Apesar das diferenças de seqüência, o ponto de início de transcrição nos três clones possui a mesma localização em relação ao início do gene 18S.

No presente trabalho investigou-se também a expressão transitória do gene reporter CAT dirigida pelos promotores ribossômicos das duas linhagens de *T. cruzi*. Observou-se que o promotor de L1 é expresso apenas em isolados de L1, enquanto o promotor de L2 é expresso em isolados das duas linhagens. Para isolados de grupo 1/2, nos quais ocorre expressão a partir de ambos os promotores presentes em construções plasmidiais, esta apresenta maior intensidade quando se utiliza o promotor de L2. *In vivo*, apenas o promotor de L2 dirige a transcrição do cistron ribossômico destes isolados.

Estas observações indicam a existência de diferenças a nível de estrutura e função nos promotores ribossômicos das duas linhagens de *Trypanosoma cruzi*, incluindo o grupo 1/2. A especificidade dos dois tipos de promotor não é mutuamente exclusiva, uma vez que cepas do grupo 1 e 1/2 reconhecem promotores das linhagens 1 e 2, enquanto cepas de grupo 2 só reconhecem o promotor de L2. As razões para estas observações não estão claras, mas podem estar relacionadas a características particulares da maquinária de transcrição nos três grupos de cepas de *T. cruzi*. De qualquer forma, uma vez que foi demonstrado para vários eucariotos que a atividade de promotores de rRNA é espécie-seletiva (Sollner-Webb & Tower, 1986), a observação de que promotores de *T. cruzi* apresentam grupo-especificidade reforça a conclusão de que estes grupos sejam taxa discretas.

O estudo realizado reforça conclusões anteriores de que a análise da atividade de promotores tanto de RNA polimerase I quanto de RNA polimerase II em tripanossomatídios é bastante complexa. Também conclui-se que muito pouco se conhece dos requisitos estruturais de seqüências que determinam o processo de "trans-splicing".

7. RESUMO

Duas linhagens filogenéticas principais (L1 e L2) foram definidas em *Trypanosoma cruzi*, com base em sequências de genes de rDNA e mini-exon e análise por RAPD (Souto *et al.* 1996). Neste trabalho investigamos a estrutura e atividade dos promotores do cistron ribossômico das duas linhagens de *T. cruzi*.

O promotor da cepa Dm28 (L2) foi clonado e sua sequência foi comparada com sequências publicadas da região homóloga de CL (L1) e La Cruz (L2). A identidade entre os dois promotores de L2 foi de 98%, e entre estes e o de L1 foi de 82%. O ponto de início de transcrição foi mapeado, apresentando a mesma localização nas duas linhagens.

A atividade dos promotores de L1 e L2 foi determinada em construções plasmidiais contendo o gene reporter da cloranfenicol acetil transferase (CAT). Experimentos de expressão transitória mostraram que o promotor de L1 foi funcional apenas em isolados de L1, enquanto que o promotor de L2 foi funcional em ambas as linhagens. A expressão do promotor de L2 em isolados de L1 foi maior do que a do promotor homólogo.

Analizamos ainda a atividade dos dois promotores em um grupo de isolados que apresentam dois tipos de cistrons ribossômicos (grupo 1/2). Neste grupo de cepas observamos que ambos os promotores presentes nas construções são funcionais, embora o promotor de L2 induza maior expressão de CAT. Por outro lado, demonstramos que nestes isolados apenas o cistron ribossômico de tipo 2 é expresso *in vivo*.

Neste trabalho analisamos ainda a eficiência de entrada das construções plasmidiais nas cepas de *T. cruzi*; caracterizamos a atividade de regiões do promotor de L2 e a eficiência do processo de "trans-splicing" para gerar mRNA de CAT contendo a sequência de mini-exon na extremidade 5'.

8. ABSTRACT

Two major phylogenetic lineages (L1 and L2) have been defined in *Trypanosoma cruzi* based on rDNA and mini-exon sequences and RAPD analysis (Souto *et al.*, 1996). In the present work we have investigated the structure and activity of ribosomal RNA promoters from the two *T. cruzi* lineages.

The promoter region of Dm28 strain (L2) was cloned and its sequence was compared with the homologous regions from the CL (L1) and La Cruz (L2) strains, whose sequences were previously published. The identity found between promoters of the two L2 strains was 98%, while the identity between L2 and L1 promoters was 82%. The transcription start point mapped in the two Lineages showed the same localization.

The activity of L1 and L2 promoters was investigated through the use of plasmid constructs bearing bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT) as reporter gene. Experiments of transient expression showed that the L1 promoter drove high CAT activity in L1 isolates, but essentially no activity in L2 strains. On the other hand, L2 promoter was functional in both Lineages. The expression driven by L2 promoter in L1 isolates was higher than that driven by the homologous promoter.

We have also analysed the activity of both L1 and L2 promoters in a particular group of *T. cruzi* isolates (group 1/2) which contains two types of rRNA cistrons. It was observed that both promoters were functional in this group of strains, although L2 promoter drove higher CAT activity. This is an interesting result since we have shown that in group 1/2 isolates only the type 2 rRNA cistron is expressed *in vivo*.

In the present study, we have also analysed the transfection efficiency of the plasmid constructs in *T. cruzi* strains; the activity of segments of the L2 promoter; and the efficiency of the "trans-splicing" process involved in the generation of mature CAT mRNA containing the mini-exon sequence at the 5' end.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agabian, N. (1990) *Trans*-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410
- Andrade, S. G. (1985) Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 (supl.), 39-46
- Arruda, M. V., Reinach, F. C., Colli, W. & Zingales, B. (1990) Sequence of the 24S α rRNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 35-42
- Ashapkin, V. V., Antoniv, T. T & Vanyushin, B. F. (1995) Methylation-dependent binding of wheat nuclear proteins to the promoter region of ribosomal RNA genes. *Gene* 157, 273-277
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1989) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates, Inc & John Wiley & Sons, Inc USA
- Avila, H. A., Gonçalves, A. M., Saad, N. N., Morel, C. M. & Simpson, L. (1990) Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 175-188
- Baker, S. M. & Platt, T. (1986) Pol I transcription: which comes first, the end or the begining? *Cell* 47, 839-840
- Bellofatto, V. & Cross, G. A. M. (1989) Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. *Science* 244, 1167-1169
- Bellofatto, V., Hartree, D. E. & Torres-Munoz, J. (1993) *Leptomonas seymouri* as a model system for the analysis of gene expression in trypanosomatids. *J. Parasitol.* 79, 637- 644

- Bonen, L. (1993) *Trans*-splicing of pre-mRNAs in plants, animals and protists. The FASEB J. 7, 40-46
- Boothroyd, J. C. & Cross, G. A. M. (1982) Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. Gene 20, 281-289
- Brener, Z. (1977) Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. PAHO Sci. Publ. 347, 11-21
- Brener, Z. (1992) *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. & Rassi, A. (Eds), Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92, SP, pp. 13-29
- Brown, S. D., Huang, J. & Van Der Ploeg, L. H. T. (1992) The promoter for procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with polymerase I promoter. Mol. Cell. Biol. 12, 2644-2652
- Campbell, D. A., Kubo, K., Clark, C. G. & Boothroyd, J. C. (1987) Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 196, 113-124
- Carneiro, M., Romanha, A. J. & Chiari, E. (1991) Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86, 387-393
- Castellani, O., Ribeiro, L. V. & Ferreira, J. F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozool. 14, 447-451
- Castro, C., Hernández, R. & Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. Mol. Biochem. Parasitol. 2, 219-233
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802-805
- Chalfie, M. (1995) Green fluorescent protein. Photochem. and Photobiol. 62, 651-656

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Chung, H.M., Lee, M. G.-S. & Van der Ploeg, L. H. T. (1992) RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* 8, 414-418
- Coburn, C. M., Otteman, K. M., McNelly, T., Turco, S. J. & Beverley, S. M. (1991) Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 169-180
- Contreras, V. T., Lima, A. R. & Zorrilla, G. (1998) *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 753-760
- Cordingley, J. S. & Turner, M. J. (1980) 6,5S RNA: preliminary characterization of unusual small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 91-96
- Cross, G. A. M., Bellofatto, V., Clayton, C. & Sherman, D. (1990) Using transfection to study gene expression in trypanosomes. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 714-716
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *T. I. B. S.* 20, 448-455
- Curotto De Lafaille, M. A., Laban, A. & Wirth, D. F. (1992) Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2703-2707
- De Lange, T., Michels, P. A., Veerman, H. J. G. M., Cornelissen, A. W. A. & Borst, P. (1984) Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. *Nucleic Acids Res.* 12, 3777-3790
- De Souza, W. (1984) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Ver. Cytol.* 86, 197-283

- Dietrich, P., Soares, M. B., Affonso, M. H. T. & Floeter-Winter, L. M. (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125, 103- 107
- Fedoroff, N. V. (1979) On Spacers. *Cell* 16, 697- 710
- Filardi, L. S. & Brener, Z. (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 755-759
- Floeter-Winter, L. M., Souto, R. P., Stolf, B. S., Zingales, B. & Buck, G. A. (1997) Can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker of speciation? *Exp. Parasitol.* 86, 232-234
- Frebourg, T. & Brison, O. (1988) Plasmid vectors with multiple cloning sites and CAT reporter gene for promoter cloning and analysis in animal cells. *Gene* 65, 315- 318
- Gay, L. S., Wilson, M. E. & Donelson, J. E. (1996) The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 193-200
- Gelfand, D. H. & White, T. J. (1990) Thermostable DNA polymerases. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Eds). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Acad. Press, Inc., San Diego, CA., pp. 129-141
- Goldenberg, S., Contreras, V. T., Salles, J. M., Franco, M. P. A. L., Bonaldo, M. C., Valle, D., Gonçalves, A. M. & Morel, C. M. (1984) Perspectives for vaccination against Chagas' disease through biotechnology-II. Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: Bell, R. & Tonigiani, G. WHO New approaches to vaccine development. Schwabe & Co AG Basel., pp. 442-457
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051
- Grondal, E. J. M., Evers, R., Kosubek, K. & Cornelissen, W. C. A. (1989) Characterization of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*: trypanosomal

mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III. The EMBO J. 8, 3383-3389

Grondal, E. J. M., Evers, R. & Cornelissen, W. C. A. (1990) Identification and sequence analysis of the ribosomal DNA promoter region of *Crithidia fasciculata*. Nucleic Acids Res. 18, 1333-1338

Gruber, A. (1995) Caracterização de dois genes contíguos de *Trypanosoma cruzi* que codificam antígenos com repetições de epitopos imunodominantes. Tese de doutoramento, IQ-USP

Grummt, I., Roth, E. Paule, M. R. (1982) Ribosomal RNA transcription *in vitro* is species specific. Nature 296, 173-174

Ha, D. S., Schwarz, J. K., Turco, S. J. & Beverley, S. M. (1996) Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 57-64

Hamm, J. & Mattaj, I. (1990) Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. Cell 63, 109-118

Hasan, G., Turner, M. J & Corningley, J. S. (1984) Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. Gene 27, 75-86

He, M., Wilde, A. & Kaderbhai, M. A. (1989) A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. Nucleic Acids Res. 18, 1660

Hecker, H., Betschart, B., Bender, K., Burri, M. & Schrimme, W. (1994) The chromatin of trypanosomes. Int. J. Parasitol. 24, 809-819

Henriksson, J., Pettersson, U. & Solari, A. (1993) *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. Exp. Parasitol. 77, 334-348

Henriksson, J., Porcel, B., Rydaker, M., Ruiz, A., Sabaj, V., Galanti, N., Cazzulo, J. J., Frasch, A. C. C. & Petterson, U. (1995) Chromosome specific markers reveal

- conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 73, 63-74
- Hernández, R. & Castañeda, M. (1983) An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 8, 305-315
- Hernández, R., Días De León, F. & Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27, 275-280
- Hernández, R., Rios, P., Valdés, A.M. & Piñero, D. (1990) Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. Mol. Biochem. Parasitol. 41, 207-212
- Hillis, D. M. & Dixon, M. T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66, 411-453
- Huan, J. & Van der Ploeg, L. H. T. (1991) Requirement of a polypirimidine tract for *trans*-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. The EMBO J. 10, 3877-3885
- Jacob, S. T. (1995) Regulation of ribosomal gene transcription. Biochem. J. 306, 617-626
- Jansen, A. M., Madeira, F., Carreira, J. C., Medina-Acosta, E. & Deane, M. P. (1997) *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: A study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infections in naturally and experimentally infected animals. Exp. Parasitol. 86, 37-44
- Jeffreys, A. J., Wilson, V & Thein, S. L. (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature 316, 76-79
- Kang, J. J., Yokoi, T. J. & Holland, M. J. (1995) Binding sites for abundant nuclear factors modulate RNA polymerase I-dependent enhancer function in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 270, 28723-28732

- Keener, J. Dodd, J. A., Lalo, D. & Nomura, M. (1997) Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13458-13462
- Kelly, J. M., Ward, H. M., Miles, M. A. & Kendall, G. (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3963- 3969
- Kelly, J. M., Taylor, M. C., Rudenko, G. & Blundell, P. A. (1995) Transfection of the african and american trypanosomes In: Nickolof, J. A. *Methods in Mol. Biol.* vol XX Humana Press Inc, N. J.,pp. 1-11
- Laird, P. W. (1989) *Trans*-splicing in trypanosomes- archaism or adaptation? *T. I. G.* 5, 204-208
- Langst, G., Chatz, T., Langowsky, J. & Grummt, I. (1997) Structural analysis of mouse rDNA: coincidence between nuclease hypersensitive sites, DNA curvature and regulatory elements in the intergenic spacer. *Nucleic Acids Res.* 25, 511-517
- Layden, R. E. & Eisen, H. (1988) Alternate *trans*-splicing in *Trypanosoma equiperdum*: implications for splice site selection. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1352-1360
- Levitan, A., Xu, Y., Bem-Dov, C., Bem-Shlomo, H., Zhang, Y. & Michaeli, S. (1998) Characterization of a novel trypanosomatid small nucleolar RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 1775-1783
- Lewin, B. (1994) *Genes V.* Oxford Univ. Press NY, USA
- Lima, M. T., Jansen, A. M., Rondinelli, E. & Gattas, C. R. (1990) *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol. Res.* 77, 77-81
- Long, E. O. & Dawid, I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 727- 764
- Lu, H-Y. & Buck, G. A. (1991) Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 109-114

- Lucke, S., Xu, G.-L., Palfi, Z., Cross, M., Bellofatto, V. & Bindereif, A. (1996) Spliced leader RNA of trypanosomes: *in vivo* mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for *trans*-splicing and cap4 formation. *The EMBO J.* 15, 4380-4391
- Macedo, A. M., Martins, M. S., Chiari, E. & Pena, S. D. J. (1992) DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55, 147-154
- Macedo, A. M. & Pena, S. D. J. (1998) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol. Today* 14, 119-124
- Macina, R. A., Arauzo, S., Reyes, M. B., Sanchez, D. O., Basombrio, M. A., Montamat, E. E., Solari, A. & Frasch, A. C. C. (1987) *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 45-53
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. & Collins, F. S. (1990) Constructions of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19, 1154
- Martínez-Calvillo, S. & Hernández, R. (1994) *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243- 247
- Maslov, D. A. & Simpson, L. (1995) Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol. Today* 11, 30-32
- Mattaj, I. W., Tollervey, D. & Séraphin, B. (1993) Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. *The FASEB J.* 7, 47-53
- McCarthy-Burke, C., Taylor, Z. A. & Buck, G. A. (1989) Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 82, 177-189
- McStay, B., Sullivan, G. J. & Cairns, C. (1997) The *Xenopus* RNA polymerase I transcription factor, UBF, has a role in transcriptional enhancement distinct from that at the promoter. *The EMBO J.* 16, 396-405

- Medina-Acosta, G. & Cross, G. A. M. (1993) Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 327-330
- Metzenberg, S. & Agabian, N. (1996) Human and fungal 3' splice sites are used by *Trypanosoma brucei* for *trans*-splicing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 11-23
- Miles, M. A., Lanham, S. M., De Souza, A. A. & Póvoa, M. (1980) Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 221-237
- Milhausen, M., Nelson, R. G., Sather, S., Selkirk, M. & Agabian, N. (1984) Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell* 38, 721-729
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E., Mattei, D., Romanha, A. & Simpson, L. (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprint of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1469-1473
- Myler, P. J. (1993) Molecular variation in trypanosomes. *Acta Tropica* 53, 205-225
- Nelson, R. G., Parsons, M., Selkirk, M., Newport, G., Barr, P. J. & Agabian, N. (1984) Sequences homologous to variant antigen mRNA spliced leader in Trypanosomatidae which do not undergo antigenic variation. *Nature* 308, 665-667
- Nilsen, T. (1995) *Trans*-splicing: an update. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 1-6
- Novak, E. M., Mello, M. P., Gomes, H. B. M., Galindo, I., Guevara, P., Ramirez, J. L. & Silveira, J. F. (1993) repetitive sequences in the ribosomal intergenic spacer of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 273-280
- Nunes, L. R., Carvalho, M. R. C., Shakarian, A. M. & Buck, G. A. (1997a) The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 188, 157-168

- Nunes, L. R., Carvalho, M. R. C. & Buck, G. A. (1997b) *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 211-224
- Oliveira, R. P., Broude, N. E., Macedo, A. M., Cantor, C. R., Smith, C. L. & Pena, S. D. J. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3776-3780
- Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *The FASEB J.* 7, 113-123
- Olsen, G. J., Woese, C. R. & Overbeek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176, 1-6
- Orlando, T. C., Fujikawa, G. Y., Campbell, D. A. & Floeter-Winter, L. M. (1997) Functional analysis of the rRNA promoter of *Leishmania tarentolae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 (supl.), 176
- Otsu, K., Donelson, J.E. & Kirchhoff, L. V. (1993) Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 317-330
- Patzelt, E. Perry, K. & Agabian, N. (1989) Mapping of branch sites in *trans*-spliced pre-mRNAs of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4291-4297
- Pikaard, C. S., Pape, L. K., Henderson, S. L., Ryan, K., Paalman, M. H., Lopata, M. A., Reeder, R. H. & Sollner-Webb, B. (1990) Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4816-4825
- Potter, H. (1988) Electroporation in biology: methods, applications and instrumentation. *Anal. Biochem.* 174, 361-373
- Pulido, M., Martínez-Calvillo, S. & Hernández, R. (1996) *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. *Acta Tropica* 62, 163-170

- Ramamoorthy, R., Donelson, J. E. & Wilson, M. E. (1996) 5' sequences essential for *trans*-splicing of *msg* (gp 63) RNAs in *Leishmania chagasi*. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 65-76
- Reeder, R. H. & Roan, J. G. (1984) The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrids. Cell 38, 39-44
- Reeder, R. H. (1992) Regulation of transcription by RNA polymerase I. In: McNight, S. L. & Yamamoto, K. R. (Eds), Transcriptional regulation. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 315-348
- Requena, J. M., Soto, M., Quijada, L., Carrillo, G. & Alonso, C. (1997) A region containing repeated elements is associated with transcriptional termination of *Leishmania infantum* ribosomal RNA genes. Mol. Biochem. Parasitol. 84, 101-110
- Roberts, T. G., Dungan, J. M., Watkins, K. P. & Agabian, N. (1996) The SLA RNA gene of *Trypanosoma brucei* is organized in a tandem array which encodes several small RNAs. Mol. Biochem. Parasitol. 83, 163-174
- Robinett, C. C., O'Connor, A. & Dunaway, M. (1997) The repeat organizer, a specialized insulator element within the intergenic spacer of the *Xenopus* rRNA genes. Mol. Cell. Biol. 17, 2866-2875
- Rudenko, G., Chung, H-M. M., Pham, V. P. & Van Der Ploeg, L. H. T. (1991) RNA polymerase I can mediate expression of CAT and *neo* protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. The EMBO J. 10, 3387-3397
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491
- Salditt-Georgieff, M., Harpold, M. & Chen-Kiang, S. (1980) The addition of the 5' cap structure occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped. Cell 19, 69-78
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual- 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, USA

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Schürch, N. Hehl, A., Vassela, E., Braun, R. & Roditi, I. (1994) Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3668-3675
- Seed, B. & Sheen, J.-Y. (1988) A simple phase extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67, 271-277
- Serra, M. J. & Turner, D. H. (1995) Predicting thermodynamic properties of RNA. *Methods Enzymol.* 259, 242-261
- Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Apt, W., Brenière, S. F. & Tibayrenc (1992) Characterization of chilean, bolivian and argentinean *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp. Parasitol.* 75, 187-195
- Sollner-Webb, B. & Tower, J. (1986) Transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes. *Ann. Ver. Biochem.* 55, 801-830
- Sollner-Webb, B. & Mougey, E. B. (1991) News from the nucleolus: rRNA gene expression. *T. I. B. S.* 16, 58-62
- Sommerville, J. (1984) RNA polymerase I promoters and transcription factors. *Nature* 310, 189-190
- Souto, R. P. & Zingales, B. (1993) Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 45- 52
- Souto, R. P. (1996) Amplificação de um domínio divergente do rRNA para detecção específica e análise filogenética do *T. cruzi*. Tese de doutoramento IQ-USP
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. & Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141-152

- Spencer, D. F., Collings, J. C., Schnare, M. N. & Gray, M. W. (1987) Multiple spacer sequences in the nuclear large subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. The EMBO J. 6, 1063-1071
- Stempliuk, V. A., Uliana, S. R. B. & Floeter-Winter, L. M. (1995) Ribosomal promoter region of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania mexicana*: a structural and functional comparison. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90 (supl.), 134
- Stothard, J. R., Frame, I. A., Carrasco, H. J. & Miles, M. A. (1998) On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. Parasitol. 117, 243-247
- Stuart, K. (1983) kDNA, mitochondrial DNA with a difference. Mol. Biochem. Parasitol. 9, 93-104
- Sutton, R. E., Boothroyd, J. C. (1988) Trypanosome *trans*-splicing utilizes 2'-5' branches and corresponding debranching activity. EMBO J. 7, 1431-1437
- Swindle, J. & Tait, A. (1996) Trypanosomatid genetics. In: Smith, D. F. & Parsons, M. (Eds), Molecular Biology of Parasitic Protozoa. Oxford Univ. Press Inc., N. Y., pp. 6-34
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. & Ayala, F. J. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 293- 296
- Tibayrenc, M. & Ayala, F. (1988) Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution 42, 277- 292
- Tibayrenc, M. (1995) Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol. 36, 48-115
- Tyler-Cross, R. E., Short, S. L., Floeter-Winter, L. M. & Buck, G. A. (1995) Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. Mol. Biochem. Parasitol. 72, 23- 31

- Uliana, S. R. B., Fischer, W., Stempliuk, V. A. & Floeter-Winter, L. M. (1996) Structural and functional characterization of *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 245-255
- Ullu, E., Matthews, K. R. & Tschudi, C. (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid *trans*-splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 13, 720-725
- Ullu, E., Tschudi, C. & Gunzl, A. (1996) *Trans*-splicing in trypanosomatid protozoa. In: Smith, D. F. & Parsons, M. (Eds), *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Oxford Univ. Press Inc., pp. 115-133
- Ürményi, T. P & Van der Ploeg, L. H. T. (1995) PARP promoter-mediated activation of a VSG expression site promoter in insect form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 23, 1010-1018
- Vassela, E., Braun, R. & Roditi, I. (1994) Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Res.* 22, 1359-1364
- Vazquez, M. P., Schijman, A. G. & Levin, M. J. (1994) A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for *trans*-splicing in certain ribosomal P2 β protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 327-336
- Voet, D. & Voet, J. G. (1990) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, USA
- White, T. C., Rudenko, G. & Borst, P. (1986) Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to Domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14, 9472-9489
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiology Review* 51, 221-271
- Yang, Q., Zwick, M. G. & Paule, M. R. (1994) Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res.* 22, 4798-4805
- Zingales, B., Pereira, M. E. S., Oliveira, R. P., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Souto, R. P., Vargas, N., Cano, M. I., Silveira, J. F., Nehme, N. S., Morel, C. M., Brener,

- Z. & Macedo, A. (1997) *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Tropica* 68, 159-173
- Zingales, B., Souto, R. P., Mangia, R. H., Lisboa, C. V., Campbell, D. A., Coura, J. R., Jansen, A. & Fernandes, O. (1998) Molecular epidemiology of american trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 105-112
- Zomerdijs, J. C. B. M., Kieft, R., Shiels, P. G. & Borst, P. (1991) α -amanitin resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG expression site and for ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 19, 5153-5158

CURRICULUM VITAE

Beatriz Simonsen Stolf

Local e Data de nascimento: São Paulo, 17/ 11/ 1973

EDUCAÇÃO

- Colégio Santa Cruz (1989- 1991)
- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo- Bacharelado em Ciências Biológicas (1992-1995)
- Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo- Licenciatura em Ciências Biológicas (1992-1996)
- Instituto de Química, Universidade de São Paulo- Pós Graduação em Bioquímica, Mestrado (1996-1999)

OCUPAÇÃO

Bolsista CNPq, categoria Mestrado

PUBLICAÇÕES

- Floeter-Winter, L. M., Souto, R. P., Stolf, B. S., Zingales, B. & Buck, G. A. (1997) Can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker of speciation? *Exp. Parasitol.* 86, 232-234
- Zingales, B., Stolf, B. S., Souto, R. P., Fernandes, O. & Briones, M. (1999) Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* No prelo
- Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S. & Zingales, B. (1999) Evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages and its possible correlation with American faunal exchanges in the Cenozoic. *Mol. Biochem. Parasitol.* No prelo