UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIA AMÉLIA VILLELA OLIVA DOTTA

Estudos com a poli-A *binding protein* 1 de *Trypanosoma brucei* sugerem nova função nos eventos de *splicing* e exportação nuclear

São Carlos
2011

MARIA AMÉLIA VILLELA OLIVA DOTTA

Estudos com a poli-A *binding protein* 1 de *Trypanosoma brucei* sugerem nova função nos eventos de splicing e exportação nuclear

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otavio H. Thiemann

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Villela Oliva Dotta, Maria Amélia
Estudos com a poli-A binding protein 1 de Trypanosoma brucei sugerem nova função nos eventos de splicing e exportação nuclear / Maria Amélia Villela Oliva Dotta; orientador Otavio Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2011.
175 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

1. Splicing. 2. Poliadenilação. 3. Poli-A binding protein. I. Thiemann, Otavio, orient. II. Título.

Aos meus pais, pelo incentivo, pelo exemplo e pelo amor incondicional durante esses 28 anos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido marido Fabio, pelo seu amor e paciência que me fazem uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais Glaucius e Livia e meu irmão Ciro pelo carinho e pela compreensão em todos os momentos.

Aos meus avós Swami e Aurialda, Apolo e Neyde (em nossos corações) pelo exemplo de perseverança e luta.

Ao Prof. Dr. Otávio Thiemann pela orientação, incentivo e amizade construídos e cultivados ao longo desses anos.

Ao Ney que tanto me ensinou e me ensina desde a Iniciação Científica.

Ao Prof. Dr. Dieter Söll que me recebeu na Universidade de Yale tão calorosa e abertamente.

Aos doutores Marco Tulio e Teresa pelo apoio, pelas ideias e pelo suporte profissional e emocional sem os quais esse trabalho não teria sido concluído.

À Fernanda Costa, minha amiga e irmã, pela ajuda imensurável nesse projeto além da amizade em todos os momentos.

Ás não menos queridas Isabelle e Luara mais duas irmãs escolhidas pelo coração, pela força, paciência e amizade sempre.

Aos meus alunos de iniciação científica Ivan Silva, Jessica Okado e Gustavo Lima que me ensinaram muito mais do que imaginam ao trabalharem comigo.

A todos os amigos do grupo de Cristalografia por tornarem a pesquisa mais leve e divertida todos os dias.

À sala 14 que me recebeu com braços abertos na reta final do trabalho com muito café, bolachinhas e lenços de papel.

Aos técnicos da Cristalografia Augusto, Geraldo, Bianca, Susana, Maria, Livia, Humberto e Simone pela ajuda e amizade.

Às técnicas do grupo de Biofísica Andressa e Bel pelo apoio.

À biblioteca SBI-IFSC e seus funcionários sempre muito prestativos.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC), do qual sou um pouco filha, pela infraestrutura.

Á FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse projeto e minha formação acadêmica.

"A pedra colocada com responsabilidade e dedicação é o agente que te assegura firmeza na construção."

(Emmanuel)

RESUMO

OLIVA-DOTTA, M. A. V. **Estudos com a poli-A *binding protein* 1 de *Trypanosoma brucei* sugerem nova função nos eventos de splicing e exportação nuclear.** 2011 163p Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Protozoários do gênero *Trypanosoma* infectam milhões de pessoas todo ano e coletivamente contribuem muito para as misérias humanas, pois são causa de muitas das doenças negligenciadas tropicais. Várias vias metabólicas essenciais são encontradas nesses parasitas tornando-os particularmente atrativos para investigações moleculares. Mecanismos de controle pós-transcricional tem sido alvo de estudo por sua peculiaridade nesses organismos. Nesse cenário, proteínas da classe das poli-A-binding proteins (PABP) possuem função no início da tradução, turnover do mRNA e interação com o 5'-CAP. Nesse trabalho foi identificada a homóloga poli-A *binding protein* 1 (PABP1) de *Trypanosoma brucei*. O silenciamento do gene *pabp1* revelou que a ausência da proteína é letal ao parasita, comprovando sua essencialidade nesse organismo. Da mesma maneira, na ausência da proteína observou-se erro no processamento do mRNA sugerindo possível função nos eventos de *cis* e *trans splicing*. Sua localização subcelular foi avaliada indicando localização citoplasmática, bem como o são suas homólogas. No citoplasma, a proteína apresenta-se em estrutura reticulada, co-localizada com proteínas de retículo endoplasmático. Porém, sob estresse induzido a proteína relocaliza para o compartimento nuclear, indicando ser uma proteína com trânsito núcleo-citoplasma ainda não demonstrada na literatura. As funções identificadas sugerem a existência de um sub-complexo a 3' do mRNA que acopla poliadenilação e *splicing*. Além disso, a relocalização nuclear parece ocorrer em resposta a estímulo externo, sugerindo que a relocalização do mRNA para o núcleo pode ser uma estratégia da célula para modular sua resposta gênica frente a variações do ambiente.

Palavras-chave: *Splicing*. Poliadenilação. Poli-A *binding protein*

ABSTRACT

OLIVA-DOTTA, M.A.V. **Studies with *Trypanosoma brucei* poly(A)-*binding protein* 1 suggest a novel function in splicing and nuclear export events.** 2011. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Protozoa of the genus Trypanosoma infect millions of people every year and collectively contribute to the human misery by causing several neglected tropical diseases. Several intriguing molecular pathways are found in these parasites also, rendering them particularly attractive for biochemical investigation. This unique eukaryotic cells lack mechanisms to control gene expression at the transcriptional level, they mostly control protein synthesis by posttranscriptional regulation process. Several RNAs and proteins are involved in this process, including poly(A) binding proteins. The poly(A)- binding protein of eukaryotes plays a role in polyadenylation, translation initiation and metabolism of mRNA. In this work the poly(A) binding protein 1 ($PABP_1$) was identified in *Trypanosoma brucei*. Depletion of *Tb*PABP1 showed its essential role in the procyclic form of the parasite. Immunofluorescence assays showed localization in the cytosolic compartment despite of its functions in *cis* and *trans splicing* as shown by RNA analysis of cells free from PABP1. As it was shown in the homologs, PABP1 it's not only a cytosolic protein but it shuttles between the nucleus and the cytoplasm. Together with the literature, these results suggest an active complex in the 3' end of the mRNA which works in synchrony with the splicing and capping machinery implying PABP1 as possible link between these processes.

Key words: *Splicing*. Polyadenilation. Poly(A)-*binding protein*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica do *Tripanosoma brucei* e *Tripanosoma cruzi* evidenciando as regiões endêmicas das doenças..... 36

Figura 2 - Diagrama esquemático de um trypanosomatidae. Representados estão as organelas complexo de Golgi (Golgi body), o núcleo (nucleus), a mitocôndria (mitochondrion) e o cinetoplasto (kinetoplast), organela esta que dá nome a ordem kinetoplastida..... 37

Figura 3 - Formas do *T. cruzi:* A) Epimastigota; B) Amastigota; C) Tripomastigota..... 39

Figura 4 - Formas e ciclo biológico das Leishmanias; destacam-se as forma promastigota (mosquito) e amastigota (homem). Os sintomas diferenciados relacionam-se aos diferentes tipos de leishmanioses causadas pelo gênero Leishmania. Os sintomas de febre causados pela *L. donovani* são conhecidos como Kala-azar; As lesões cutâneas ou lesão oriental é causada pela *L. major*; a espundia, como é conhecida a leishmaniose mucocutânea é causada pela espécie *L. brasiliense*..... 40

Figura 5 - Mapa da África mostrando a epidemiologia dos países considerados endêmicos para a Doença do Sono..... 42

Figura 6 - Ciclo de vida do *T. brucei* no hospedeiro intermediário inseto, do lado esquerdo do ciclo e no hospedeiro definitivo homem, do lado direito do ciclo..... 43

Figura 7 - Representação esquemática da maturação do mRNA em tripanossomatídeos. A transcrição tem início em regiões abertas da cromatina e termina na porção condensada da mesma; *clusters* de genes codificantes de proteínas com diferentes funções são transcritos em trechos policistrônicos e depois processados por diferentes mecanismos..... 46

Figura 8 - Ribonucleoproteínas envolvidas no processamento do mRNA e em sua regulação. Na figura estão representadas as atividades das RNPs nos eucariotos..... 48

Figura 9 - Reação de *cis-splicing*. A) Reconhecimento do 5´SS por U1 snRNP. B) Reconhecimento do BP por U2 snRNP. C) Interação do tri-snRNP, liberação de U1 snRNP e dissociação de U4/U6 snRNP. D) Associação de U6/U2 e primeira reação de transesterificação. E) Se-

gunda reação de transesterificação. F) Liberação do mRNA maduro e íntron na forma de laço. As snRNPs estão representadas pelas estruturas de seus snRNAs. U2AF: fator auxiliar de U2. Trato de polipirimidina em azul..... 49

Figura 10 - Exemplos de *spliced leader* (SL) RNA em diferentes espécies de nemátoda. Na figura estão representadas as sequências bem como a estrutura secundária predita. *C. elegans* tem duas classes, SL1 e SL2. *Ascaris sp* tem uma única molécula de SL RNA e *trichinella spiralis* possui muitas variações do SL RNA e apenas uma está representada na figura..... 51

Figura 11 - *Trans*-splicing do *spliced leader* (SL) adiciona o mini exon especializado vindo da molécula de SL RNA não codificante para diferentes pré-mRNAs..... 52

Figura 12 - Mecanismo de *cis* e *trans splicing;* A) *cis splicing*; B) *trans splicing*. As duas transesterificações estão presentes nos dois casos. Os sítios de *splicing* 5' (GU) e 3' (AG), o *branch point* (BP), traço de polipirimidina (PPT), splice leader (SL) estão representados na figura..... 54

Figura 13 - snRNPs de tripanosoma. As snRNPs estão organizadas ao redor do substrato do *cis* splicing. No pré-mRNA, o 5' e 3' splice sites e o sinal de polipirimidina (Py) estão indicados, em caixas, estão os homólogos de mamífero e fatores propostos como parte da reação também estão indicados..... 56

Figura 14 - A) Modelo do core Sm. B) Variação do core Sm em U2 snRNP de *T. brucei*. C) Variação do core Sm em U4 snRNP em *T. brucei*..... 58

Figura 15- Esquema do processo de poliadenilação em metazoários. No primeiro passo observa-se a RNA polimerase II transcrevendo o fragmento de pré-mRNA policistrônico, nela já se ligam fatores envolvidos na poliadenilação, como o CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) que posteriormente a transcrição se transfere para a sequência sinal de poliadenilação AAUAAA que fica 20nt upstream ao sítio de adição da cauda poli (A). O CPSF também é responsável por estimular a atividade da PAP e recrutar a poly (A) binding protein, que se liga a cauda e exerce diversos papéis posteriormente descritos. A PAP estende então a cauda poly (A) concomitante a adição do cap no N-terminal (não representado na figura), o CPSF se desliga deixando o mRNA maduro e pronto para o início da tradução..... 61

Figura 16 - Representação da estrutura de um domínio RRM canônico..... 64

Figura 17 - Estrutura dos domínios da PABP citoplasmática humana; A. estrutura cristalográfica dos domínios RRM 1 e 2 associados a cauda poli-A; B. o sulco de ligação com RNA presente quando o RRM1 e 2 se associam com a cauda; C. estrutura por NMR das hélices do carboxi-terminal..... 66

Figura 18 - Comparação das sequências de aminoácidos da PABP1 de *T. brucei* (Tb; GenBank número de acesso AF042190), *T. cruzi* (Tc; U06070), *Caenorhabditis elegans* (Ce; U24123), *Xenopus lae*6*is* (Xl; X57483), *Saccharomyces cere*6*isiae* (Sc;P04147), *Homo sapiens* (Hs; U33818), and *Arabidopsis thaliana* (At; Q05196). As sequências foram alinhadas com o programa CLUSTAL W. * indica aminoácidos idênticos, : indica substituições conservadas e . indica substituições semi-conservadas. Os motivos RNP 1 (8-mer) e RNP-2 (6-mer) estão sombreados. O motivo conservado na região C-terminal está presente em mais duas proteínas diferentes..... 67

Figura 19 - Mecanismo de controle do tamanho da cauda poly(A). CPFS se liga ao sinal de poliadenilação e recruta a PAP, a primeira molécula de PABPN1 se une quando a cauda atinge ~12 nucleotídeos. PABPs vão sendo adicionadas cobrindo toda a cauda circularizando-a, estrutura esta necessária para manuter o contato entre CPSF/PAP. Depois a PAP é mantida no complexo de maneira processiva. Quando a cauda chega no seu tamanho crítico, ~250nt, PABPN1 adicionais não são mais acomodadas, o contato entre PAP/CPSF não é mais estabilizado e a elongação se encerra..... 68

Figura 20 - Painel A. Modelo tradicional no qual a PabpN atua na terminação 3' escorando o mRNA até o complexo do poro nuclear (NPC); nesse trajeto a PabpN é removida permitindo a ligação da PabpC na cauda poli-A que alcança o citosol. Nesse compartimento a PabpC estimula a tradução via interação com outras proteínas e fatores de iniciação..... 70

Figura 21 - Painel B. Modelo de trânsito no qual ambas as Pabs transitam entre núcleo e citosol. No núcleo PabpC se associa com o pré-mRNA e contribui com o processamento da terminação 3'. Ainda ligado as duas Pabs, o mRNA transita entre o núcleo/citoplasma e no citosol a PabpN contribui no silenciamento da tradução de transcritos específicos via mecanismo deadenilação-dependentes..... 71

Figura 22- Circularização do mRNA para tradução. PABP se liga a cauda crescente de poly(A) no 3' do mRNA e interage com o fator de elongação elF4G para circularizar o mesmo permitindo o início da síntese proteica. Interações entre PABP e outros polipeptídeos estão representadas com setas..... 72

Figura 23- Destino do mRNA nos tripanosomas; 1) saída do mRNA do núcleo já com ligado com *cap* (esfera azul no 5') *binding protein* e poli-A *binding protein* (PABP); 2) elF4F interage com TbPABP formando o *closed loop*. Em rosa e azul claro outras proteínas hipotéticas envolvidas com a estabilidade do mRNA ativo na tradução; 3) a tradução do mRNA é interrompida e a deadenilação inicia-se como complexo CAF1/NOT e *decapped* por DCPs; 4) RNA é degradado por exossomos e XRNA; 5) alternativamente após (2) o RNA pode ser traduzido e é degradado em um processo iniciado pelo reconhecimento de sequências específicas no 3' UTR (loop verde escuro), que ligam proteínas específicas envolvidas na sinalização da maquinaria de degradação..... 75

Figura 24- Esquema da reação de amplificação utilzada no termociclador..... 81

Figura 25- Mapa do vetor pGEM®-T..... 82

Figura 26- Mapa vetor de expressão com fusão de cauda de 6 histidinas pET28a..... 84

Figura 27- Tabela da massa (g) de saturação com Sulfato de Amônio relativo à 1L de solução (no caso extrato solúvel de proteína) a 4°C..... 88

Figura 28- *a)* aminoácido histidina; *b)* imidazol..... 89

Figura 29- Esquema da maquinaria de RNA de interferência..... 95

Figura 30- Sequência do gene Tb*pabp1*. Sublinhado está representado o fragmento selecionado para a realização do experimento de RNAi..... 96

Figura 31- Ilustração esquemática de um vetor para RNAi em *T. brucei*; vetor *stem-loop*. Este tipo de vetor possibilita a produção de uma dupla fita de RNA (dsRNA) através da formação de uma alça..... 97

Figura 32- Vetor p2T7..... 98

Figura 33- Representação estrutural da ligação entre o DAPI e a molécula de DNA. Quando ligado a fita dupla do DNA a molécula absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta (358nm) e emite em 461 nm, detectado com filtro azul..... 101

Figura 34- Três exemplos de hexâmetros da amostra dentre todos os possíveis. Eles se ligam a regiões sobrepostas do mRNA para iniciar a síntese do cDNA..... 104

Figura 35- Condições de amplificação por PCR..... 105

Figura 36- Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e *trans-splicing*. CS1 e CS2 ligam-se ao éxon do transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pré-PAP) e processado (PAP); TS1 e TS2 anelam-se no exón e íntron, ainda não processados do transcrito de α-tubulina (Pré- α-tub). Para avaliação do processamento do de α-tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α-tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α-tubulina (α-tub). E,éxon; I, íntron..... 106

Figura 37- A célula passa pelo feixe de laser e é monitorada pela fluorescência emitida. As gotículas contendo células únicas são carregadas negativa ou positivamente, dependendo da fluorescência acoplada a ela. As gotículas são então defletidas por um campo elétrico para tubos coletores de acordo com a carga inerente a elas. A concentração precisa ser ajustada de maneira que a maioria das gotículas não contenha células e seja descartada em um recipiente de resíduos, juntamente com qualquer conglomerado celular..... 107

Figura 38- Esquema da Tandem affinity purification com a PTP-tag. No topo da figura está representada a fusão fora de escala contendo o epítopo ProtC, o sítio de clivagem da TEV, o domínioProtA e as regiões espaçadoras. A proteína alvo está representada pelo retângulo listado..... 109

Figura 39- Mapa dos vetores e pN-PURO-PTP..... 111

Figura 40- Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM, Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Gene pabp1 amplificado do DNA genômico de *T. brucei*; Painel B: MM, Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Teste de clivagem da colônia 1; 2, teste de clivagem colônia 2, mostrando a banda clivada na altura esperada do gene pabp1..... 117

Figura 41- Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1. vetor pET28a linearizado com as enzimas XhoI e BamHI; Painel B: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1. Produto de PCR amplificados com iniciadores específicos e clivado com as enzimas XhoI e BamHI. Painel C: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1-7. Amplificação do DNA extraído das colônias transformadas, apenas colônia 4 foi positiva..... 118

Figura 42- Eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Brilhante R-250. Expressão de *pabp1* recombinante. 1. MM. Massa Molecular; 2.amostra não induzida (sem IPTG); 3. indução por 4 horas com 0,1 mM de IPTG; 4. Fração insolúvel; 5. Fração solúvel.... 119

Figura 43- Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de PABP1 recombinante por precipitação com sulfato de amônio; MM. Massa Molecular; 1. Fração insolúvel após adição de 60% de sulfato de amônio; 2. Fração solúvel com 60% de SA ; 3. Fração insolúvel com 50% de AS; 4. Fração solúvel com 50% de sulfato de amônio..... 120

Figura 44- Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de PABP1 recombinante, a partir da fração solúvel. 1, Massa molecular em kDa; 1. Pré-coluna (fração solúvel da lise); 2. *Flow through*; 3. Lavagem com 10mM de imidazol; 4. lavagem com 50mM de imidazol; 5. Eluição com 100mM de imidazol; 6. Eluição com 250mM de imidazol..... 121

Figura 45- *Western Blotting* da proteína PABP1 recombinante revelado com anticorpo policlonal antiPABP1 obtido em camundongo. 1. Massa Molecular; 2. soro de camundongo contendo anti-PABP1 diluído 1:100; 3. 1:200; 4. 1:500. A seta indica a reação contra a proteína PABP1..... 121

Figura 46- Detecção da proteína nativa em tripanosomatídeos com anticorpo anti-PABP1 por *Western Blotting* com diluições do soro 1:200, 1:500, 1:800 E 1:1000, respectivamente..... 122

Figura 47- Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Fragmento de 718pb do gene pabp1 amplificado; Painel B: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, vetor p2T7 linearizado; Painel C: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1,3,5,7,9. DNA extraídos das colônias crescidas após ligação; 2,4,6,8,10. Reação de amplificação com iniciadores específicos do fragmento Tbpabp1*b*/p2T7..... 123

Figura 48- Gráfico representativo da curva de crescimento obtida para o clone Tbpabp1*b* das amostras induzidas (+Tet) e não induzidas (-Tet). A escala logarítmica do numero de células auxilia na padronização da curva de crescimento após as diluições realizadas nos dias 4 e 8..... 124

Figura 49- Imagens de microscopia de contraste de fase (CF), marcada com DAPI e a sobreposição das duas imagens (MERGE). Painel A: Célula selvagem da cepa 29-13 ; Painel B: controle –Tet (célula transfectada mas não onduzida); Painel C: +Tet após 24h de indução; Painel D: +Tet após 48h de indução..... 125

Figura 50- RT PCR semi-quantitativa para análise da abundância da proteína TbPABP1; Utilizou-se ainda a molécula de 7 SL RNA (como controle positivo da reação) e TbPABP2 para assegurar a especificidade da técnica empregada..... 126

Figura 51- Duas representações dos Gráficos da Citometria de fluxo; parasitos corados com DAPI (DNA) foram separados pela diferença na quantidade de fluorescência emitida. Como cada fase do ciclo celular apresenta uma quantidade de DNA o numero de parasitos em casa fase pode ser estimado. Células –Tet (Não induzidas, NI) foram comparadas com células +Tet (Induzidas, I) por 4 dias..... 127

Figura 52- PCR semiquantitativo para análise do envolvimento da proteína PABP1 com processo de splicing; 7SL RNA (como controle positivo quantitativo de reação), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP) e transcrito de Poli A Polimerase processado; transcrito de tubulina não processado (Pré α- tubulina), transcrito de α-tubulina processado durante 0, 24, 48 e 72 horas de indução com tetraciclina..... 129

Figura 53- Painel representando a imunolocalização da proteína *Tb*PABP1. Imagens de microscopia de contraste de fase do parasito marcado com DAPI (DNA), com anticorpo α-*Tb*PABP1 e sobreposição das imagens (Merge). O contraste de fase está representado em CF..... 130

Figura 54- Painel de marcação dupla utilizando os anticorpos *Tb*PABP1 e o marcador de retículo endoplasmático *Tb*BiP incubados com parasitas da cepa *Tb*427 selvagem. Também estão representadas as marcações com DAPI (DNA) e o contraste de fase (CF). A sobreposição das imagens (Merge) indica localização reticular da proteína de interesse *Tb*PABP1..... 131

Figura 55- Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo α-*Tb*PABP1 em parasitos da cepa *Tb*427 com diferentes tratamentos; A. *Tb*427 sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga..... 133

Figura 56- Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo α-ProtA em parasitos da cepa transfectada *Tb*PABP1/ptp-tag com diferentes tratamentos; A. *Tb*PABP1/ptp-tag sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga..... 134

Figura 57- Eletroforese em gel de agarose (1 %) corado por brometo de etídio. Painel A: Produto de PCR amplificado com iniciadores pabp1-PTP específicos. PM, Peso Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, amplificação de pabp1-PTP; Painel B: PM, Peso Molecular 1 kb *plus;* 1-6, colônias positivas testadas; Painel C: Digestão de um clone positivo de pabp1-PTP. PM, Peso Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, Produto da digestão; 2, plasmídeo não digerido. A seta indica a banda de 1020pb desejada; Painel D: linearização do plasmídeo para transfecção em célula de *T. brucei* 427. PM, Peso Molecular 1kb *plus*. 1, plasmídeo não linearizado; 2, plasmídeo linearizado com enzima *Nsi*I..... 135

Figura 58- Painel A: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio dos produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos: 1, *T. brucei* cepa 427, controle negativo; 2, *T. brucei* transfectado com PABP1; Painel B: *Western Blotting* do extrato nuclear revelado com o anticorpo anti-Proteína A (diluição ½.000): 1, *T. brucei* cepa 427 (não transfectada); 2, *T. brucei* transfectado com PSTK-PTP tag (controle positivo); 3-5, Três clones selecionados transfectados com PABP1-PTP tag. As setas indicam as bandas de interesse..... 136

Figura 59- *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose com anticorpo anti-Prot A (diluição 1:2.000); 1, *Input*, extrato protéico de *T. brucei* transfectado; 2, Sobrenadante (não ligado); 3, Controle negativo, apenas IgG-Sepharose.; 4, Imunoprecipitação (proteína ligada a IgG-Sepharose). A seta indica a banda da proteína de interesse..... 137

Figura 60- Eletroforese em SDS-Page 12,5% da purificação em tandem do PTP-tag corado com reagente Sypro Ruby; 1. Padrão de massa molecular; 2. *Input* y4; 3. *Flow through* beeds de anti-ProtA; 4. TEV eluato; 5. Eluído com Ca^{+2} da IgG sepharose anti-ProtC (proteína alvo mais os seus ligantes). Em destaque pela seta a banda correspondente a proteína *Tb*PABP1..... 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de cultura “Cunninghams” para *Trypanosoma brucei*..... 79

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a clonagem e subclonagem do gene Tb*pabp1*..... 81

Tabela 3 - Reação de amplificação do gene Tb*pabp1*..... 81

Tabela 4 - Reação de adenilação do inserto Tb*pabp1*..... 82

Tabela 5 - Reação de ligação do inserto Tb*pabp1* e vetor pGEM®-T..... 82

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para a clonagem do fragmento do gene Tb*pabp1*..... 97

Tabela 7- Oligonucleotídeos do vetor p2T7..... 98

Tabela 8 - Reação de linearização do vetor recombinante p2T7/Tb*pabp1b*..... 99

Tabela 9- - Reação com DNAse..... 102

Tabela 10- - Reação para desestruturação de dobramentos do RNA..... 103

Tabela 11- - Iniciadores utilizadas nas reações de RT-PCR..... 105

Tabela 12- - Primers utilizados na técnica de PTP-tag de PABP1 de *T. brucei*..... 110

Tabela 13- - Reação de amplificação do gene pabp1 para clonagem no vetor pN-PTP PURO..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dATP	desoxiriboadenosina trifosfatada
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfatados
EtOH	alcool etílico
IFI	imunofluorescência indireta
LB	Luria-Bertani
2-Me	2-mercaptoetanol
NaAc	Acetato de sódio
nt	nucleotídeo
Oligos S	oligonucleotídeo (*primer*) sense
Oligo AS	oligonucleotídeo (*primer*) antisense
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (*Small Angle X-Ray Scatter-ring)*
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida com SDS
PCR	reação de polimerase em cadeia
PSTK	O – fosforil tRNA ^{sec} Kinase
PTP	**P**roteína C, sítio de clivagem **T**EV protease, **P**roteína A
q.s.p.	quantidade suficiente para
TA	temperatura ambiente
WB	*western blot*

LISTA DE SÍMBOLOS

kDA	Quilodalton (10^3 G/Mol)
L	Litro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 Introdução 35

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas 35

1.1.1 Tripanossomíase: gênero Trypanosoma 36

1.1.2 Doença de Chagas 38

1.1.3 Leishmanioses 39

1.1.4 Doenças do Sono 41

1.1.5 Ciclo Biológico e Transmissão 42

1.1.6 Diagnóstico e Terapêutica 44

1.2 Estudos Bioquímicos e moleculares em *T. brucei* 44

1.3 Processamento do mRNA 45

1.3.1 *Capping* do 5' 46

1.3.2 *Splicing* 47

1.3.3 *Cis- splicing* 48

1.3.4 *Trans-splicing* e o SL 50

1.3.5 Diferenças entre *cis* e *trans-splicing* 53

1.4 Maquinaria celular envolvida no *splicing* 54

1.4.1 Spliceossomo 54

1.4.2 Ribonucleoproteínas 55

1.4.3 snRNA 57

1.4.4 Proteínas Sm 57

1.5 Poliadenilação 60

1.6 Regulação do processamento do mRNA 62

1.7 Proteínas com domínio de reconhecimento de RNA 64

1.8 Poli-A *binding protein* (PABP) 65

1.8.1 Poli-A *binding protein* de *Trypanosoma brucei* 66

1.8.2 Função da PABP na poliadenilação 68

1.8.3 Exportação do mRNA do núcleo para citoplasma 69

1.8.4 Início da tradução 71

1.8.5 Metabolismo do mRNA 72

1.8.6 Degradação do mRNA 73

2 Objetivos e Justificativa 77

3 Materiais e Métodos 79

3.1 Clonagem, expressão e purificação da proteína Tb*PABP1* 79

3.1.1 Cultivo das formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* 79

3.1.2 Extração do DNA genômico de *Trypanosoma brucei* 80

3.1.3 Clonagem do gene *pabp1* de *Trypanosoma brucei* 80

3.1.4 Subclonagem no vetor pET28a(+) 83

3.2 Produção de proteína recombinante 84

3.2.1 Preparação de bactérias *E. coli* competentes 84

3.2.2 Reação de transformação 85

3.2.3 Expressão da proteína *PABP1* 86

3.3 Obtenção da proteína *PABP1* purificada 87

3.3.1 Precipitação com Sulfato de amônio 87

3.3.2 Cromatografia por afinidade 88

3.4 Produção de anticorpos policlonais em camundongos 89

3.5 *Western Blotting* 90

3.5.1 Obtenção de extrato proteico 90

3.5.2 Imunoblotting 91

3.6 Imunolocalização 91

3.6.1 Imunofluorescência 92

3.6.2 Ensaio de marcação dupla 93

3.6.3 Tratamento com Actinomicina D 94

3.7 RNA de interferência 94

3.7.1 Cultivo de *Trypanosoma brucei* forma procíclica linhagem 2913 95

3.7.2 Clonagem do fragmento de Tb*pabp1* no vetor p2T7 96

3.7.3 Transfecção e seleção do clone Tb*pabp1b* 99

3.7.4 Indução do silenciamento pela construção p2T7/Tb*pabp1b* 100

3.7.5 Curva de Crescimento celular 101

3.7.6 Análise do efeito do silenciamento: morfologia celular 101

Extração do RNA total 102

Síntese do cDNA 102

Amplificação do cDNA 104

Avaliação do conteúdo de mRNA na cepa *deficiente em Tbpabp1* 104
3.8 Separação de células ativadas por fluorescência (FACS) 106
3.9 PTP-tag 108
3.9.1 Construção dos oligonucleotídeos para clonagem da *pabp1* no vetor pN-PURO-PTP 110
3.9.2 Transfecção e seleção de clones Tbpabp1/pN-PTP 112
3.9.3 Extrato para a purificação das proteínas PTP-tag 113
3.9.4 Imunoprecipitação com IgG-sepharose 113
3.9.5 Produção do extrato protéico em larga escala 114
3.9.6 Purificação em tandem da proteína Tbpabp1/pN-PTP 114
4 Resultados 117
4.1 Clonagem do gene Tb*pabp1* 117
4.1.1 Clonagem no vetor pGEM-T e sequenciamento 117
4.1.2 Subclonagem no vetor pET28a 118
4.2 Expressão de proteína recombinante 119
4.3 Purificação da proteína recombinante PABP1 119
4.3.1 Precipitação com sulfato de amônio 119
4.3.2 Cromatografia de afinidade ao Níquel 120
4.4 *Western Blot* 121
4.4.1 Detecção da proteína PABP1 recombinante 121
4.4.2 Detecção da proteína PABP1 em tripanosomatídeos 122
4.5 RNA de interferência 122
4.5.1 Clonagem do fragmento do gene pabp1 no vetor p2T7 122
4.5.2 Indução do silenciamento 123
4.5.3 Efeitos da diminuição da expressão de PABP1 no parasito 124
4.5.4 Reações de RT-PCR para avaliação do efeito do silenciamento 126
4.5.5 Citômetro de fluxo 126
4.5.6 Avaliação da participação de PABP1 na reação de *cis* e *trans-splicing* 127
4.6 Imunofluorescência 129
4.6.1 Imunolocalização 129
4.6.2 Ensaio de marcação dupla 130

4.6.3 Detecção Tbpabp1 citoplasmática no núcleo sob estresse com actinomicina D 131
4.7 PTP-tag 134
4.7.1 Clonagem no vetor pN-PURO/PTP 134
4.7.2 Verificação de três clones positivos por *Western blotting* 135
4.7.3 Imunoprecipitação com IgG Sepharose 136
4.7.4 PTP-tag 137
5 Discussão 139
6 Conclusões e Perspectivas 145
Referências 147

1 Introdução

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas possuem usualmente origem infecciosa e se desenvolvem em ambiente de pobreza agravado pelo calor e pela umidade do clima tropical. São, em sua maioria, doenças parasitárias propagadas por insetos vetores ou pela água contaminada e solo infestado por ovos ou vermes. Os ciclos de transmissão ocorrem livremente e é perpetuado pelas condições subumanas de moradia e higiene. Uma vez dispersa, as epidemias se concentram em locais de extrema pobreza onde os recursos são escassos e a prevenção inexiste. Por outro lado, em regiões mais desenvolvidas do mundo, essas doenças desapareceram gradualmente com melhores padrões de vida e de higiene [5].

Parasitoses diminuem a expectativa de vida, debilitando mais de 1bilhão de pessoas, causando um enorme prejuízo econômico e social nos países endêmicos. Outras consequências são a diminuição da produtividade de jovens adultos e atraso no crescimento e desenvolvimento cognitivo de crianças, causando mais miséria e discriminação social entre outros problemas políticos e socioeconômicos. Em alguns casos as doenças cegam, debilitam, deformam e mutilam. Graves danos ocorrem, frequentemente, após anos de infecção assintomática, deixando os pacientes sem conhecimento da necessidade de buscar tratamento. Não se tratando a tempo, a parasitose pode causar danos irreversíveis e até matar rapidamente [5].

A Figura 1 apresenta dados de 2003 sobre a distribuição geográfica das doenças do Sono e de Chagas. Pode-se observar a devastadora incidências das mesmas em países subdesenvolvidos ou considerados em desenvolvimento.

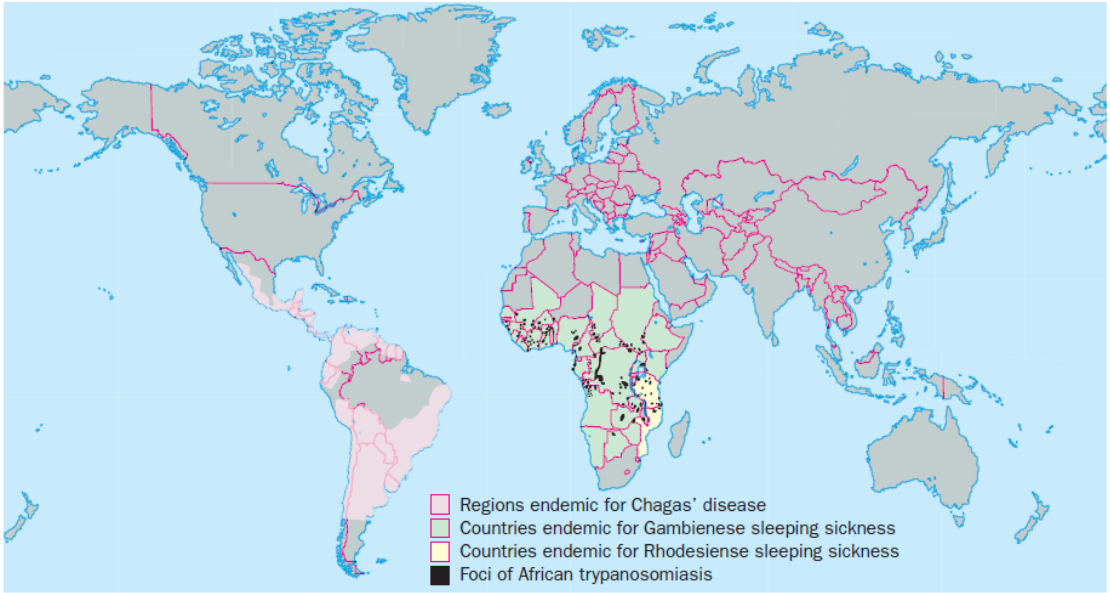


Figura 1 - Distribuição geográfica do *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* evidenciando as regiões endêmicas de ambas as doenças [5].

1.1.1 Tripanossomíase: gênero Trypanosoma

A família Trypanosomatidae é considerada de grande importância médica e econômica, uma vez que espécies dessa família são capazes de provocar doenças mutilantes, incapacitantes ou mortais [26]. As parasitoses humanas mais comuns causadas por essa família incluem i) Tripanossomíase Africana humana (também conhecida como doença do sono), causada por infecção por duas subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T.b. rhodesiensis e T.b. gambiensis)*; *ii)* Doença de Chagas, causada pela infecção com *Trypanosoma cruzi* e *iii)* Leishmanioses, causadas por infecção com diferentes espécies de *Leishmania*. Essas doenças estão intimamente relacionadas ao nível de desenvolvimento do país ou de uma região, por exemplo, a tripanossomíase Africana humana causa 50.000 mortes por ano, leishmanioses causam 59.000 mortes por ano e a doença de Chagas, 13.000 mortes por ano [27].

Os parasitas desta família (Figura 2) destacam-se por possuir, além das organelas características dos eucariotos, uma única mitocôndria, que se ramifica por toda a célula e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário assume. A mitocôndria apresenta um DNA que se organiza na forma de mini círculos (30% do DNA total da célula) e maxi círculos. Esse DNA se concentra em uma de-

terminada região da mitocôndria, denominada de cinetoplasto. A localização do cinetoplasto é importante na especificação das formas em que os parasitas podem ser encontrados durante o ciclo biológico [26].

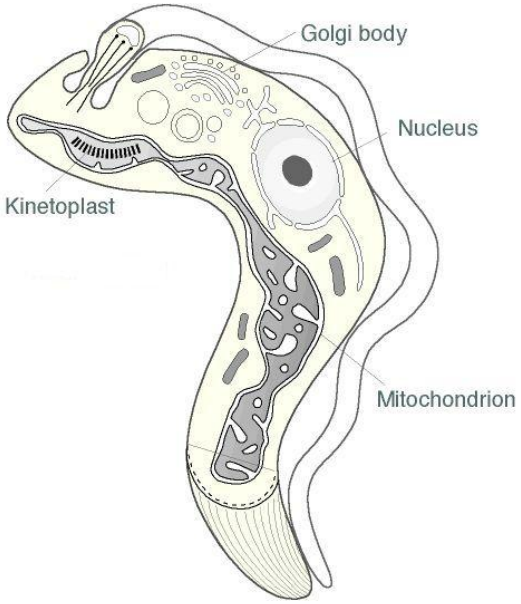


Figura 2 - Diagrama esquemático de um tripanossomatídeo. Representadas estão as organelas complexo de Golgi (Golgi body), o núcleo (nucleus), a mitocôndria (mitochondrion) e o cinetoplasto (kinetoplast) organela esta que dá nome a ordem kinetoplastida (http://protist.i.hosei.ac.jp)

Os parasitas possuem ciclos de vida digenéticos envolvendo insetos como hospedeiro intermediário e humano ou mamífero como hospedeiros definitivos. Além disso, cada hospedeiro abriga um estágio do ciclo de vida dos parasitas que se diferenciam por suas capacidades catabólicas e biossintéticas como adaptação ao ambiente do hospedeiro [28].

Um passo crítico para interação parasita-hospedeiro é a evasão diante do sistema imune do hospedeiro. A habilidade de evitar os mecanismos de ataque humorais é particularmente vital para os parasitas extracelulares enquanto que os intracelulares têm que resistir a ataques lisossomais e metabólitos tóxicos. Eles fazem isso remodelando os compartimentos fagossomais nos quais estão e interferindo nos mecanismos de sinalização para ativação celular [29].

1.1.2 Doença de Chagas

A tripanosomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909 é uma zoonose causada pelo hemoflagelado denominado *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e transmitido pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família Reduviidae). Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* [30 31 26].

Dados demonstram a presença de imigrantes provenientes da América Latina infectados pelo *T. cruzi* em diferentes países, com estimativas de 1.067 casos na Austrália entre 2005-2006; 1218, no Canadá; 5.125 na Espanha; e de 56 a 357 mil casos nos Estados Unidos [32].

A transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Além da transmissão vetorial, outro mecanismo responsável por aproximadamente 10% dos casos é a transfusão sanguínea. Este é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. O terceiro mais importante mecanismo de transmissão é a congênita, com aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano e pode ocorrer fora das áreas endêmicas. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem acidentes de laboratório e transplantes de órgãos [33].

O *T. cruzi* apresenta as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 3A). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior sendo a responsável pela replicação no hospedeiro invertebrado (triatomíneo), ela se encontra na porção posterior do intestino do inseto e a forma utilizada em cultura em meio líquido.

A forma tripomastigota (Figura 3C) é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, próximo da extremidade posterior, com flagelo que se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, no líquido cefalorraquidiano, leite, esperma e em cultura de células. Os tripomastigotas metacíclicos são morfologicamente semelhantes às formas tripomastigotas sanguíneas, sendo as formas infectantes liberadas nas fezes do vetor. A forma amastigota (Figura 3B) é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. É a forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear e em cultura de células [30 26].

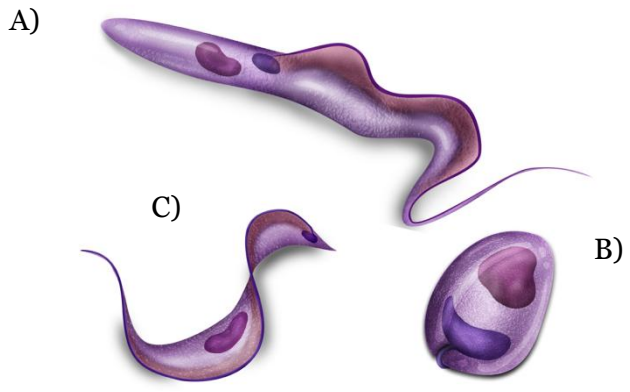


Figura 3 - Formas do *T. cruzi:* A) Epimastigota; B) Amastigota; C) Tripomastigota [4]

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica, podendo ser sintomática ou assintomática, sendo a última a mais freqüente (90-98% dos pacientes). A fase aguda inicia-se através de manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romaña) ou na pele (chagoma de inoculação), aparecendo dentro de 4 a 10 dias após a picada do triatomíneo, regredindo em 1 ou 2 meses. Na fase crônica, os pacientes podem apresentar uma forma cardíaca (13%), digestiva (10%) ou formas mistas (8%) [26].

A terapêutica da doença de Chagas continua ineficaz, apesar dos esforços realizados pelos vários laboratórios e pesquisadores. Diversas substâncias estão sendo testadas em animais e, algumas delas têm sido usadas no homem, mas nenhuma consegue suprimir a infecção pelo *T. cruzi* e promover uma cura definitiva em todos os pacientes tratados [34].

1.1.3 Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por pelo menos 20 diferentes espécies de *Leishmania*, transmitidas por insetos dos gêneros *Phleobotomus* e *Lutzomyia*. *Leishmania donovani* foi observada em pacientes sofrendo de Kala-azar e foi descrita em 1903 por Leishman e Donovan, simultaneamente, e assim esses parasitos foram classificados como pertencentes ao gênero *Leishmania*. Mais tarde, entre 1904 e 1908, foi observado um parasita semelhante em crianças da região do Mediterrâneo que foi denominado de *Leishmania infantum*. Somente em

1941 foi demonstrada, por Adler e Ber, a transmissão da leishmaniose por flebotomíneos. A Figura 4 descreve as formas de Leishmanias obeservadas durante o ciclo biológico.

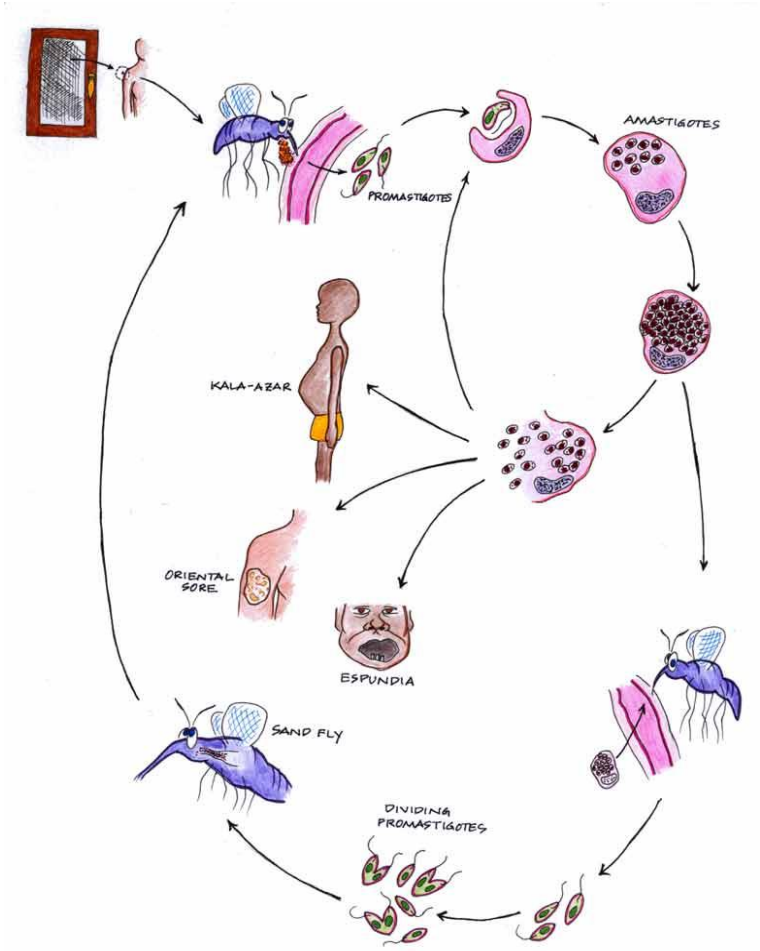


Figura 4 - Formas e ciclo biológico das Leishmanias; destacam-se as forma promastigota (mosquito) e amastigota (homem). Os sintomas diferenciados relacionam-se aos diferentes tipos de leishmanioses causadas pelo gênero Leishmania. Os sintomas de febre causados pela *L. donovani* são conhecidos como Kala-azar; As lesões cutâneas ou lesão oriental é causada pela *L. major*; a espundia, como é conhecida a leishmaniose mucocutânea é causada pela espécie *L. brasiliense* [14].

Durante o ciclo da doença (Figura 4), o flebotomíneo inocula formas promastigotas de leishmania no hospedeiro vertebrado ao picá-lo. Essas formas invadem o sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em amastigotas, capazes de proliferação no interior dessas células. Após o rompimento da célula, as formas amastigotas são liberadas e parasitam outras células. Outro flebotomíneo infecta-se durante a picada do hospedeiro vertebrado contaminado ao ingerir macrófagos parasitados. As formas amastigotas são liberadas após o rompimento dos macrófagos no estômago do vetor, se diferenciam em promastigotas e multiplicam-se.

O tratamento da leishmaniose visceral é baseado nos antimoniais pentavalentes, mas que possuem efeitos colaterais e observa-se resistência em vários casos. Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da leishmânia, através de gllcólise e beta-oxidação que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários [35]. Para o tratamento sistêmico podem ser utilizadas pentamidina, fluconazol, cetoconazol, miltefosina e alopurinol [14].

1.1.4 Doenças do Sono

A Tripanossomíase Africana ou Doença do Sono é uma doença parasitária fatal se permanecer sem tratamento, causada pelo protozoário unicelular pertencente ao gênero *Trypanosoma* [13]. A doença foi descoberta em 1894 por David Bruce (1855–1931), ao analisar os parasitas de gado infectado com nagana e associou o tripanosoma com essa doença. Observou-se ainda a veiculação da doença pela mosca tsé-tsé (*Glossina sp*). Mais tarde Bruce envolveu-se com a descoberta do *Trypanosoma brucei gambiense* e *Tb rhodesiense* como causadores da doença do sono e *Glossina palpalis* e *Glossina morsitans* com sua respectiva transmissão.

Os parasitas são transmitidos aos humanos quando o vetor infectado faz seu repasto sanguíneo no homem. A mosca tsé-tsé e a tripanossomíase africana são usualmente encontradas nas áreas do sub-Sahara onde o sistema de saúde é bastante precário. Tanto a doença no homem, quanto nos animais, dificultam imensamente o desenvolvimento dessa região [13]. A distribuição da HAT (*Human African Trypanosomiasis*) na África está representada na Figura 5.

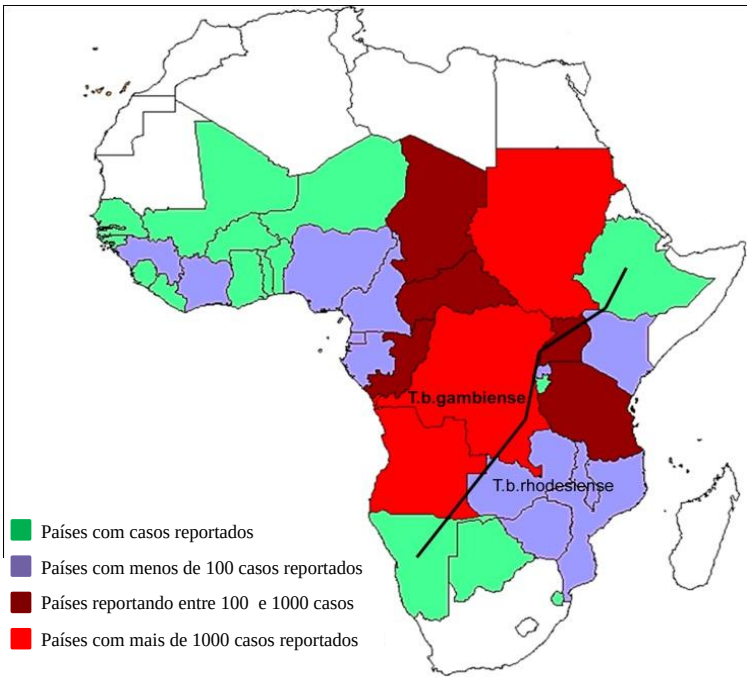


Figura 5 - Mapa da África mostrando a epidemiologia dos países considerados endêmicos para a Doença do Sono [13].

1.1.5 Ciclo Biológico e Transmissão

O ciclo completo da doença foi descrito por David Bruce em 1914 (Figura 6). O parasita se instala nas glândulas salivares da mosca *tsé-tsé* (gênero *Glossina*) e é injetado no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. A forma tripomastigota do *T. brucei* não invade as células (nem assume forma de amastigota), alimentando-se e multiplicando-se nos fluidos corporais incluindo sangue e fluido extracelular nos tecidos [27].

Após a picada, o parasita multiplica-se localmente durante três dias podendo apresentar então o inchaço edematoso chamado de *cancro* tripanosomico, que desaparece em média, após três semanas. O inchaço não surge na grande maioria dos casos de infecção pelo *Tb. gambiense* e apenas em 50% dos casos de infecção com *Tb. rodesiense*. Os parasitas multiplicam-se no sangue, evadindo o sistema imune do hospedeiro pelo processo de variação antigênica. Os sintomas iniciais cessam, mas os parasitas adaptados não são afetados pelos anticorpos produzidos e multiplicam-se, gerando nova onda de parasitas e sintomas. [36].

O resultado do processo de multiplicaçao, variação antigênica e seleção são ondas de multiplicação e esses sintomas agudos podem evoluir para os sintomas crônicos. A grande

quantidade de anticorpos produzidos leva à formação de complexos imunes, que ativam o sistema complemento e causam danos no endotélio dos vasos e rins. Os danos nos vasos geram edemas e microenfartes no cérebro, e a destruição acidental dos eritrócitos causada pelo sistema complemento, gera anemia. [36].

Na Figura 6 vemos em (1) a forma metacíclica durante a picada; (2) parasitos se espalham atingindo o sistema nervoso central, pela alta parasitemia, essas formas se tornam mais curtas e largas; (5) outra mosca ingere as formas tripomastigotas, contaminando-se. (7) As formas tripomastigotas diferenciam-se em formas procíclicas; (8) procíclicos se tornam epimastigotas que se multiplicam na glândula salivar do inseto; (8-1) epimastigotos diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos reiniciando o ciclo [37].

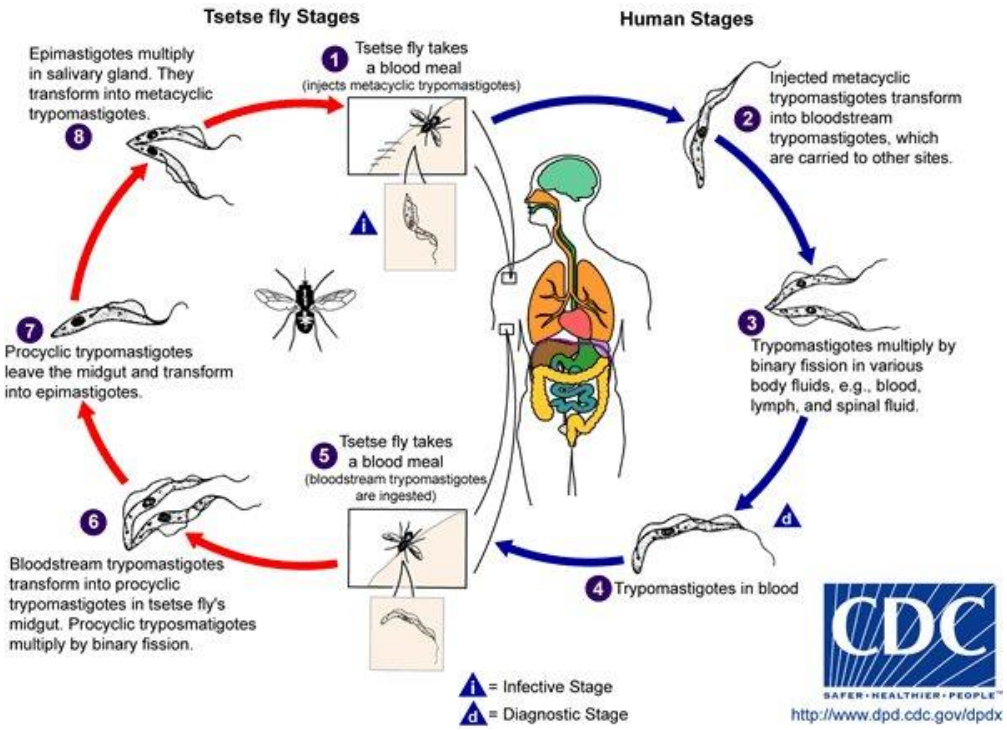


Figura 6 - Ciclo de vida do *T. brucei* no hospedeiro intermediário inseto, do lado esquerdo do ciclo e no hospedeiro definitivo homem, do lado direito do ciclo [6]

1.1.6 Diagnóstico e Terapêutica

A sintomatologia da doença do sono pode ser variada, mas existem dois estágios clínicos que podem ser reconhecidos durante a infecção; o estágio hemolinfático inicial e o estágio encefálico tardio. O primeiro ocorre após 1-3 semanas após o repasto, com episódios de febre e linfadenopatia generalizada, seguidos de sintomas não específicos como vertigens, dores de cabeça, fraqueza e perda de peso. Órgãos vitais podem ser atacados como fígado, rins, coração, pele, sistema endócrino e olhos. Já no estágio encefálico tardio, observam-se sintomas neurológicos que envolvem anormalidades psiquiátricas, motoras, sensoriais e distúrbios do sono, podendo causar morte [38].

O diagnóstico da doença do sono é feito pela observação dos sinais clínicos, inspeção da localização geográfica do paciente e exames laboratoriais. O diagnóstico laboratorial compreende os métodos parasitológicos: lâmina corada de sangue, em especial para *T. b. rhodesiense*; lâmina corada de punção do gânglio, para *T. b. gambiense*; exame do líquor para a fase crônica; testes imunológicos como hemaglutinação,IFI e ELISA e moleculares como PCR [38].

O tratamento do estágio inicial é feito com pentamidina (introduzida em 1940), para *T.b. gambiense* e, suramina (introduzida em 1920), para *T. b. rhodesiense*. O mecanismo de ação da pentamidina ainda não está totalmente esclarecido, embora tenham sido descritos pelo menos três transportadores do fármaco que levam a um acúmulo na ordem de milimolar do mesmo no interior da célula [39].

Evidências demonstram que a pentamidina se liga a componentes celulares carregados negativamente, como fosfolipídios e ácidos nucléicos, ocasionando perturbação na estrutura do DNA do cinetoplasto (kDNA) e consequente inibição da topoisomerase II. O mecanismo de ação da suramina permanece um mistério, embora relatos na literatura descrevam este fármaco como inibidor não específico, podendo causar reação cruzada com outras enzimas vitais à célula [39].

1.2 Estudos Bioquímicos e moleculares em *T. brucei*

A caracterização molecular e funcional de fatores de virulência melhorou a compreensão da regulação de funções imunes efetoras, fornecendo não somente uma visão mais deta-

lhada das relações parasita-hospedeiro, mas também indicando caminhos na identificação de novos alvos para intervenção terapêutica [40].

A prevenção de doenças parasitárias depende da associação de diversos fatores, tais como medidas ecológicas, sanitárias e emprego de fármacos eficazes e seguros [41]. A eficácia da prevenção depende, por sua vez, do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitos. Com os avanços tecnológicos e do conhecimento científico para o entendimento dos ciclos de vida dos principais parasitos do homem, tornou-se possível à realização do processo de planejamento racional de fármacos, enfatizando o mecanismo de ação dos mesmos, com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais dos parasitos, minimizando os efeitos deletérios para o homem.

Desse modo, o desenvolvimento de trabalhos nessa área de pesquisa poderá auxiliar na atenuação ou na destruição dos parasitos, visando alvos de ação imunológica e/ou farmacológica ausentes nas células humanas e, também, na verificação de eventual expressão diferencial de proteínas nos parasitos estudos.

1.3 Processamento do mRNA

O processamento do mRNA em tripanossomatídeos difere dos mecanismos encontrados na maioria dos eucariotos principalmente porque os genes que codificam proteínas são transcritos em uma longa fita de RNA policistrônico [42] e estudos posteriores a publicação do genoma completo de *T. brucei* sugerem que o cromossomo todo deve ser transcrito em longos trechos que precisam de posterior metabolismo [43].

Esses grandes blocos policistrônicos de genes são transcritos pela RNA polimerase II e alguns dos seus fatores de transcrição já foram identificados. Em *T. brucei* a RNA polimerase I transcreve o *cluster* de genes do rRNA e, surpreendentemente, os mRNAs específicos dos estágios sanguíneos (bloodstream) e procíclico, VSGs e prociclinas respectivamente [44].

A maturação do mRNA envolve três processos bastante estudados; *i) capping* na terminação 5'; *ii) splicing* e *iii)* poliadenilação da terminação 3'.

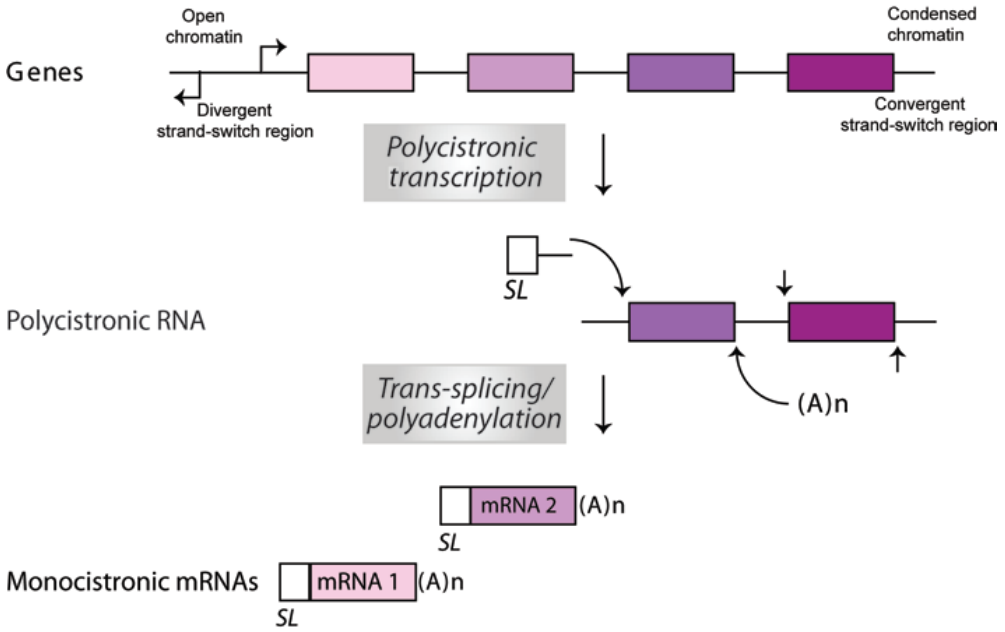


Figura 7 - Representação esquemática da maturação do mRNA em tripanossomatídeos. A transcrição tem início em regiões abertas da cromatina e termina na porção condensada da mesma; *clusters* de genes codificantes de proteínas com diferentes funções são transcritos em trechos policistrônicos e depois processados por diferentes mecanismos [15].

Em tripanosomas e leishmanias, os RNAs são processados por um mecanismo não usual denominado *trans*-splicing, que requer a adição de uma sequência nomeada SL ou *spliced leader* e pequenas ribonucleoproteínas (snRNPs) como U2, U4/U6 e U5 [45] que serão discutidos em detalhes posteriormente.

Estudos demonstraram o mesmo mecanismo de *trans*-splicing ocorrendo em euglenóides [46], nematoides [47], trematodas [48] entre outros cordatas ancestrais [49]. Por outro lado esta via nunca foi identificada em vertebrados ou artrópodes, hospedeiros do parasita em estudo, sendo então uma via exclusiva do parasita. Essa característica torna-a particularmente atrativa para pesquisa, pois pode representar um alvo em potencial para desenvolvimento de fármacos, além de esclarescer detalhes da biologia celular do *Trypanosoma brucei*, um organismo modelo de eucariotos.

1.3.1 *Capping* do 5'

A adição do cap m^7G na terminação 5' do mRNA é o primeiro evento de modificação dos transcritos da RNA polimerase II [50] e ocorre co-transcricionalmente quando o RNA atinge aproximadamente 30 nucleotídeos. Essa modificação guia o mRNA para sua maturação e vias de transporte além de atuar no *turnover* e na tradução [51]. A formação do cap envolve 3 reações enzimáticas em cadeia; primeiro a terminação 5' trifosfato é hidrolisada pela RNA 5'-trifosfatase em 5'-difosfato que receberá então o cap com GMP pela enzima RNA guanilil-transferase. Por fim, a porção guanosina do capacete (GpppN) é metilada pela RNA (guanina-N7) metiltransferase [52]. Essa reação resulta em uma estrutura m^7GpppN ou cap 0 que normalmente sofre nova modificação adicionando-se grupos 2'-*O*-metil para os dois primeiros nucleotídeos transcritos formando as estruturas de cap 1 e 2 [50].

A analise do 5' dos genes de *Trypanosoma brucei* e *Crithidia fasciculata* revelaram que o resíduo m^7G é seguido por 4 nucleotídeos metilados que formam uma estrutura de cap 4 não usual: 7-metilguanosina-ppp-*N*6,*N*6,29-*O*-trimetiladenosina-*p*-29 -*O*-metil-adenosina- p-29-O-metilcitosina-*p*-*N*3,29-*O*-dimetiluridina [53].

1.3.2 *Splicing*

Muitas das moléculas de RNA de bactérias e praticamente todas as moléculas de RNA de eucariotos são modificadas após a sua síntese e alguns dos eventos moleculares mais interessantes no metabolismo do RNA ocorrem devido a esse processamento pós-transcricional. Uma molécula de RNA recém sintetizada (pré-mRNA) contém regiões traduzidas (éxons) e não-traduzidas (introns) em sua sequência. Em um processo chamado *splicing*, introns são removidos do transcrito primário e os éxons são unidos para formação do mRNA maduro, pronto para ser traduzido [54].

O pré-mRNA é transcrito no núcleo da célula, depois sofre uma série de reações e processamentos antes de ser transportado para o citoplasma e posteriormente traduzido em proteínas Figura 8. O mRNA invariavelmente existe ligado a proteínas uma vez que essas duas moléculas cooperam funcionalmente para possibilitar mecanismos moleculares de extrema importância para a viabilidade celular. O repertório específico de proteínas presente em cada estágio da meia vida do mRNA ou do pré-mRNA determinará o destino e a função das mesmas [11].

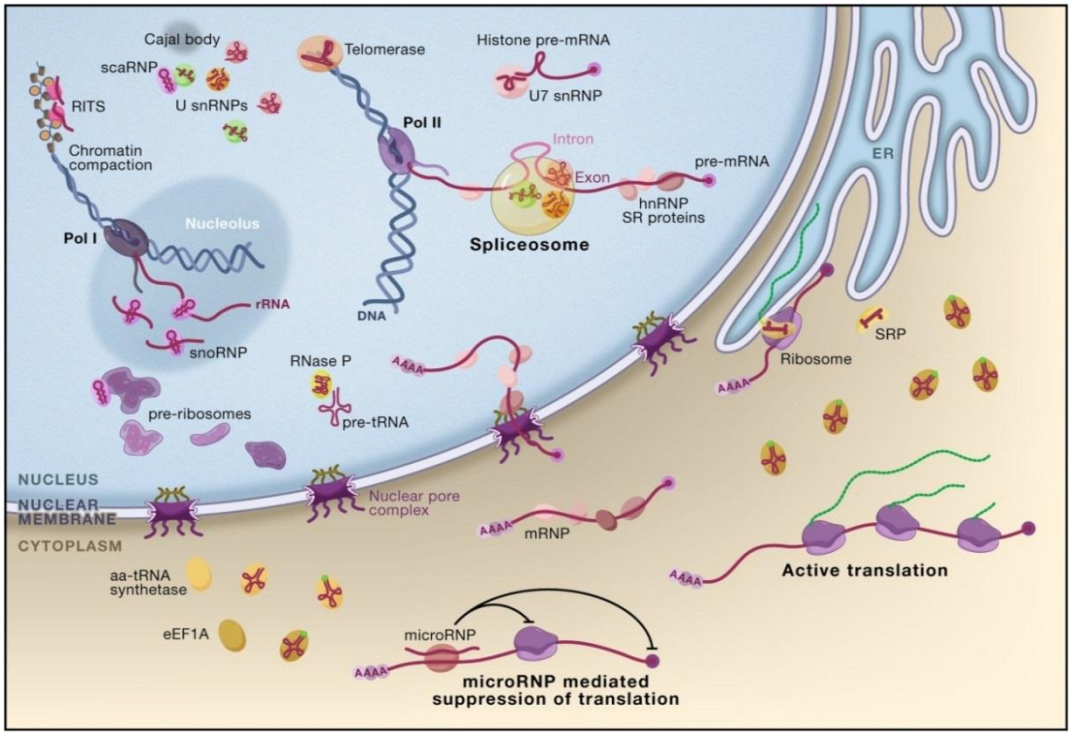


Figura 8 - Ribonucleoproteínas envolvidas no processamento do mRNA e em sua regulação. Na figura estão representadas as atividades das RNPs nos eucariotos [11].

Como representado na Figura 8, a maior ribonucleoproteína (RNP) responsável pelo *splicing* do pré-mRNA é o spliceossomo. A síntese protéica é também realizada por outra importante ribonucleoproteína, chamada ribossomo, que traduz o código trazido pelo mRNA diretamente pela ação combinada de suas subunidades [55]. Os complexos RNA - proteínas estão também envolvidos na biogênese de RNAs, inclusive a componente de RNA das próprias ribonucleoproteínas. A maturação do RNA transportador (tRNA) também requer a ação da RNP RNAse P para retirar íntrons em sua estrutura [56].

1.3.3 *Cis- splicing*

Em mamíferos, o processamento dos mRNAs é feito por *cis*-splicing, que ocorre em uma única molécula de pré-mRNA . As proteínas do spliceosomo envolvidas fazem parte de

uma grande família na qual estão incluídas as proteínas Sm e Sm-*like* (LSm); definidas pela presença da região Sm conservada [57].

O *cis splicing* ocorre em duas etapas como mostra a Figura 9, e, em cada passo, observa-se uma reação de transesterificação, executadas pelo spliceosomo com cerca de 300 proteínas associadas. A reação tem início com a formação do complexo A, resultado da interação entre as snRNP U1 e U2 por pareamento com o *splice site* 5' do íntron e com a sequência *branch point* (BP), respectivamente. São adicionados ao complexo A U4/U6 e U5 como um tri-snRNP, formando o complexo B. Este é ainda um complexo catalítico inativo que requer rearranjos conformacionais e de composição para se tornar biologicamente ativo e facilitar à primeira transesterificação do *splicing*. Assim, através da saída de U1 e U4 snRNP e incorporação do complexo *NTC* (*Prp19-associated complex* ou *Nineteen complex*); forma-se um spliceossomo catalítico, nomeado de complexo B*.

O complexo B* sofre novo rearranjo na sua rede de RNPs e agora o complexo C realiza a segunda transesterificação,que em seguida, é completamente dissociado [58] liberando o mRNA maduro e também U2, U5 e U6 para serem reciclados em uma nova via.

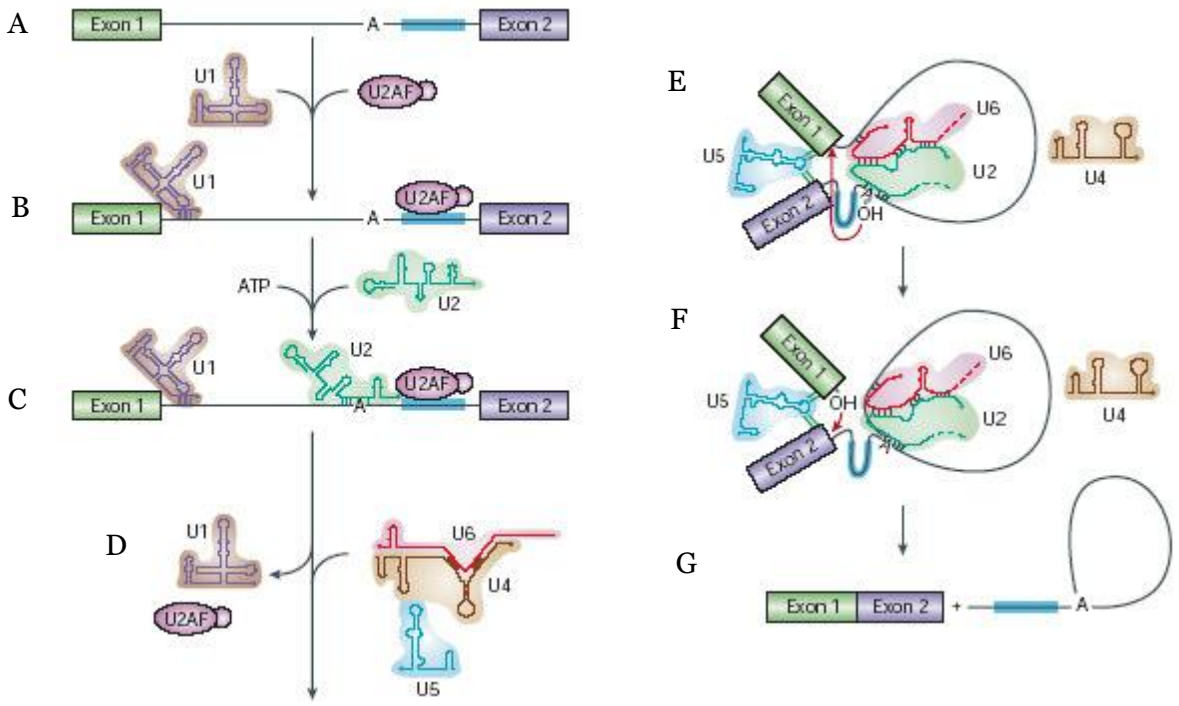


Figura 9 - Reação de *cis-splicing*. A) Reconhecimento do 5´SS por U1 snRNP. B) Reconhecimento do BP por U2 snRNP. C) Interação do tri-snRNP, liberação de U1 snRNP e dissociação de U4/U6 snRNP. D) Associação de U6/U2 e primeira reação de transesterificação. E) Segunda reação de transesterificação. F) Liberação do mRNA maduro e íntron na forma de laço. As snRNPs estão representadas pelas estruturas de seus snRNAs. U2AF: fator auxiliar de U2. Trato de polipirimidina em azul [21].

Apesar do *trans*-splicing ser o único mecanismo de processamento de pré-mRNA descrito em tripanossomatídeos desde 1982 [59], estudos com o gene PAP (poly (A) polimerase) de *T brucei* e *T cruzi* revelaram que os mesmo tinham características que claramente indicavam a presença do mecanismo de *cis*-splicing [60]. Depois disso, apenas mais um gene de *T. brucei* que sofre *cis*-splicing foi encontrado (Tb927.8.1510) e codifica uma possível RNA helicase [61].

A hipótese de ausência de *cis- splicing* estava baseada na aparente falta de sequências intragênicas (íntrons) e de U1 snRNA, que no *cis-splicing* promove interações de pares de bases na região 5' *splice site* durante a formação do spliceosomo inicial.

Mais recentemente, a seqüência de U1 snRNA também foi identificada em *Chritidia fasciculata, Leishmania tarentolae e Trypanosoma brucei*, apresentando alta similaridade entre si, além de possuir uma estrutura cap de trimetilguanosina (TMG) e estar complexada a proteínas *core* comuns, semelhante às outras U1 já estudadas [62]. A sequência de U1 snRNA encontrada em *T. brucei* é muito pequena (aproximadamente 70 nucleotídeos) se comparada as outras U1 snRNAs (139 a 568 nucleotídeos) [63] e sua participação nas reações de *cis-splicing* em tripanosomatídeos ainda está em estudo.

1.3.4 *Trans-splicing* e o SL

Uma das primeiras descobertas em relação à expressão gênica de tripanossomatideos a descrição do *spliced leader* (SL) que posteriormente foi considerado essencial para o processo de maturação dos pré-mRNAs nucleares nesses organismos [64]. A Figura 10 apresenta a sequência de nucleotídeos e a estrutura secundária do SL RNA de alguns organismos do Filo Nemátoda como *C. elegans*, *Ascaris sp* e *Trichinella spiralis* [7].

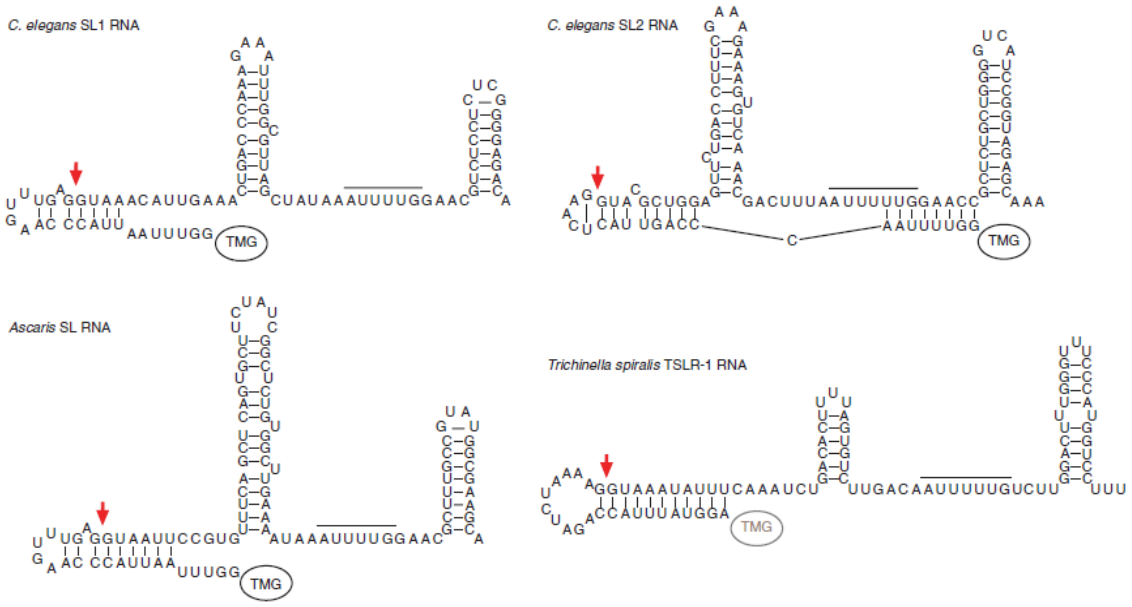


Figura 10 - Exemplos de *spliced leader* (SL) RNA em diferentes espécies de nemátoda. Na figura estão representadas as sequências bem como a estrutura secundária predita. *C. elegans* tem duas classes, SL1 e SL2. *Ascaris sp* tem uma única molécula de SL RNA e *trichinella spiralis* possui muitas variações do SL RNA e apenas uma está representada na figura [22].

O conjunto de genes conhecido como *VSG* (*Variant Surface Glycoprotein)* foi o primeiro estudado em *T brucei*, tais genes permitem que o parasita evite o sistema imune do hospedeiro pela variação antigênica da sua proteína de superfície. Os genes tiveram sua expressão analisada e foi encontrada uma sequência não codificante na terminação 5' [59]. Analises posteriores mostraram que a sequência encontrada possuía 39 nucleotídeos e vinha de outra molécula de RNA , nomeada de SL RNA ou miniexon [65]. Observa-se a formação de uma estrutura intermediária em Y (Figura 12) que corresponde à estrutura de laço formada entre os introns no *cis*-splicing, demonstrando que a transferência do SL é análoga a remoção do íntrons e união dos exons, implicando-o nas mesmas duas transesterificações observadas no *cis* splicing [66].

O *trans* splicing não se restringe ao *VSG* mRNA e é um passo essencial na maturação do mRNA em todos os tripanossomatídeos [61]. Além do *trans* splicing, a poliadenilação na extremidade 3' ocorre simultaneamente e são mecanisticamente necessários para maturar o mRNA [64].

A Figura 11 representa o processo de *trans*-splicing da molécula SL RNA na posição exata denominada *spliced site*.

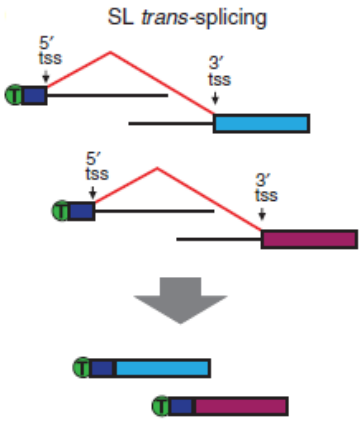


Figura 11 - *Trans*-splicing do *spliced leader* (SL) adiciona o mini exon especializado vindo da molécula de SL RNA não codificante para diferentes pré-mRNAs [7]

A molécula de SL RNA é similar aos snRNAs (U1, U2, U4 e U5 detalhados posteriormente) que participam no spliceossomo; elas formam as snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein complexes) que também se ligam a rede de proteínas Sm e suportam o *cap* 5', formando estruturas de *stem loops* intramoleculares [11]. A primeira diferença do SL para as snRNAs do spliceossomo é que ele mesmo contém um *5' splice site* (doador) que juntamente com o cap marcam os limites do SL exon; a segunda é o fato do SL ser "consumido" durante a reação, pois ele se torna parte do mRNA maduro enquanto U snRNAs são recicladas por várias reações de splicing [7].

Além disso, o SL carrega um cap de 7-metilguanosina e seus 4 primeiros nucleotídeos são metilados, assim o *trans* splicing gera um mRNA com *capping* pós-transcricional sem que haja a necessidade de uma nova reação de *capping* no 5' do mRNA [53]. Esse cap 5' funciona como os outros *cappings* protegendo o mRNA da ação das exorribonucleases 5', além de ter papel importante na tradução e processamento dos mRNAs, sendo também necessário para que ocorram interações eficientes da U6 snRNA ao 5' *splice site* [67].

A escolha do local em que o SL será adicionado é altamente regulada não apenas pela sequência, mas também por fatores protéicos ligados a molécula de pré-mRNA. Esse mecanismo é usado tanto no *cis* quanto no *trans splicing*, obviamente que a sequência consenso exata varia de organismo para organismo, porém o *cis-splice site* e o *trans-splice site* são idênticos, porém a origem dos dois processos e relação de ancestralidade continua uma incógnita [7]. O sítio aceptor do SL é um dinucleotídeo AG localizado imediatamente a downstream do trato de polipirimidinas enquanto o processo de poliadenilação tem uma marcação mais uniforme e ocorre em sítios a 100-300 nucleotídeos *upstream* do sinal de *trans splicing* [68].

A respeito da variação na sequência e no tamanho do SL de tripanosomatídeos, estes podem formar uma estrutura secundária (como mostra a Figura 10) na qual estão presentes três *stem-loops*. Os *stem-loops* II e III são separados por uma região contendo um motivo Sm-*like* já o *stem-loop* I possui duas conformações e proteínas específicas são cruciais para obtenção desta estrutura [69].

Em nematóides, sequências relevantes estão presentes no SL íntron e ao redor do sítio de ligação a Sm e são capazes de interagir com U6 snRNA. Esta interação é importante para trazer o SL 5'*splice site* para o centro catalítico do *trans*-spliceosomo. Em tripanosomatídeos, entretanto, não há aparente complementaridade entre regiões do SL e U6 snRNAs e esta interação *in vivo* ainda não foi demonstrada. Experimentos com células de *T. brucei* mostraram duas regiões importantes para o SL RNA no *trans-splicing*: a primeira, do nucleotídeo 7-19, cujo mascaramento inibe a metilação na extremidade 5' do SL; e a segunda região está compreendida entre as posições 40-43 *downstream* do 5' *splice site* [69]. Sobre a regulação da expressão do SL RNA pouco se conhece, no entanto sabe-se que os genes SL RNA em tripanossomatídeos não estão sob regulação de um promotor interno [70]

1.3.5 Diferenças entre *cis* e *trans-splicing*

Exceto pela natureza intermolecular, o *trans-splicing* apresenta as mesmas etapas do *cis splicing* (reação em dois passos); na primeira etapa, ocorre clivagem no sítio doador do SL gerando 5' SL éxon; o SL remanescente liga-se à adenosina do íntron no pré-mRNA aceptor para formar o Y intermediário. Na segunda etapa, a clivagem no sítio 3' e ligação do éxon geram os éxon processados e um Y-íntron excisado [69].

Em tripanossomatídeos a presença do SL mini-exon é bastante relevante para genes transcritos pela RNA polimerase I, pois essa não se associa com a maquinaria de *capping* do 5' e assim a presença do SL que já contém o cap 4 garante a atuação do mesmo na formação do mRNA maduro [71].

As principais diferenças entre os dois processos de *splicing* citados estão representadas na Figura 12.

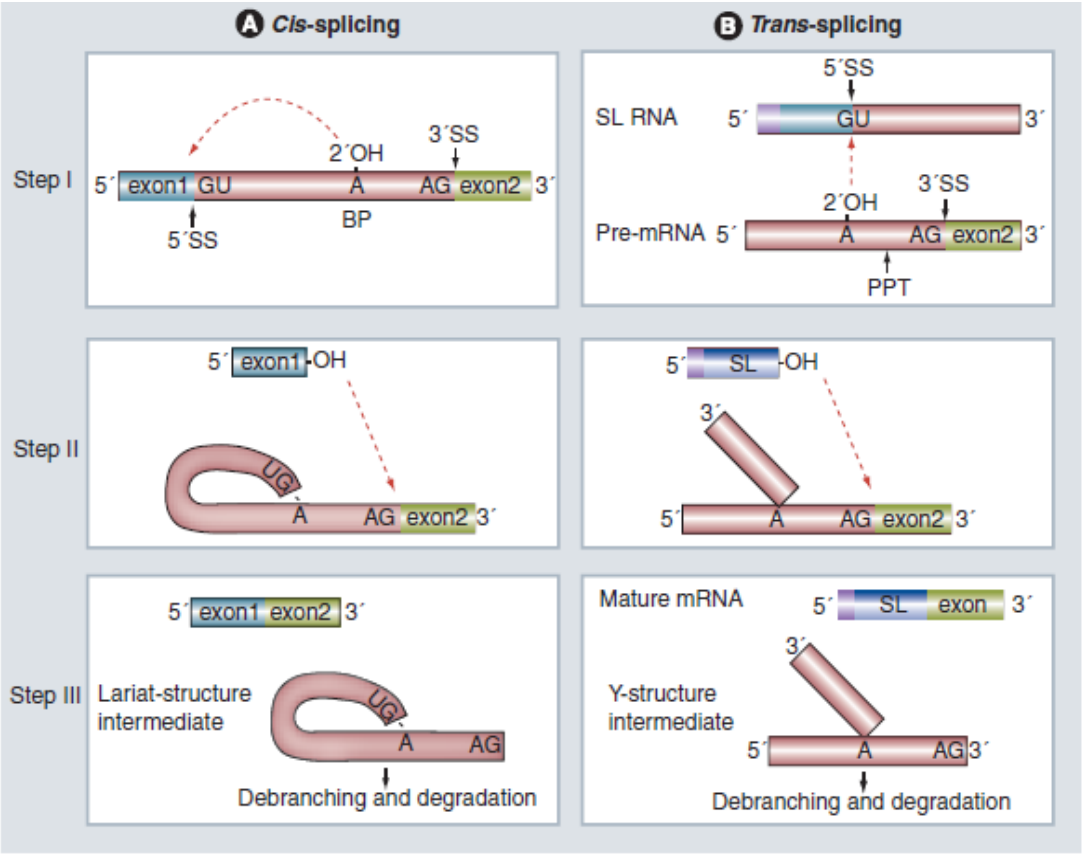


Figura 12 - Mecanismo de *cis* e *trans splicing;* A) *cis splicing*; B) *trans splicing*. As duas transesterificações estão presentes nos dois casos. Os sítios de *splicing* 5' (GU) e 3' (AG), o *branch point* (BP), traço de polipirimidina (PPT), splice leader (SL) estão representados na figura [16]

1.4 Maquinaria celular envolvida no *splicing*

1.4.1 Spliceossomo

Diferentemente do grupo II de íntrons que sofrem *self-splicing* (sua própria estrutura adota uma conformação com sítio ativo e catalisa a retirada do íntron) [72], a retirada da sequência não traduzida no pré-mRNA nos eucariotos é realizada por um complexo de ribonucleoproteínas extremamente dinâmico, chamado spliceossomo.

Durante o processo de *splicing*, o spliceossomo precisa primeiro identificar e parear corretamente no sítio de clivagem com a exata distância atômica para que as reações de tran-

sesterificações ocorram adequadamente. Para tanto, ele possui diversas subunidades com proteínas e RNAs que fazem esse reconhecimento refinado [73].

Nos eucariotos superiores o spliceossomo realiza ainda o *splicing* alternativo. Nessa reação o mesmo pré-mRNA pode ser diferentemente clivado para gerar mRNAs maduros com funções celulares diferentes. Essa modalidade de *splicing* aumenta muito a complexidade do proteoma. Assim, para regular a expressão gênica o spliceossomo precisa não só catalisar a clivagem de íntrons com extrema precisão, mas também possuir uma grande flexibilidade que permita que ele se adapte rapidamente em resposta à sinalização celular para a regulação gênica [74 75].

O spliceossomo e constituído principalmente por estruturas conhecidas como snRNPs *(small nuclear ribonucleoproteins*). Trata-se de complexos formados por pequenos RNAs ricos em uridina (U snRNAs) unidos fortemente às proteínas e essenciais no funcionamento das células eucarióticas. São conhecidos como U1, U2, U4/U6 e U5 snRNPs.

As snRNPs apresentam diferentes tamanhos e formas, podendo ser muito abundantes (cerca de 10 cópias por célula de mamífero, tanto quanto os ribossomos) e altamente conservadas [76]. Cada snRNP possui ainda uma rede de proteínas específicas ligadas a elas complementando suas funções como, por exemplo, as proteínas Sm comuns a todas as particulos, e proteínas específicas de cada snRNP. Diferentemente do ribossomo, nenhuma dessas unidades possuem um sítio ativo pré-formado sendo constantemente remodeladas durante o curso da reação de *splicing*. Além disso, flanqueando a região do íntron encontram-se sequências potenciadoras intrônicas e exônicas que afetam positiva ou negativamente o processo [21].

1.4.2 Ribonucleoproteínas

As snRNPs dos tripanossomatídeos possuem características únicas quando comparadas a outros eucariotos [17]. Dentro das principais U snRNPs pode-se destacar U2, U4, U5, U6, além de U1, específica do *cis splicing*. A seguir destacam-se algumas das principais diferenças entre as snRNPs de tripanosomatídeos e metazoários.

O homólogo de U2 snRNA de *Trypanosoma brucei* é mais curto e não possui o stem-loop III e a região de reconhecimento do BP (*branch point*) não apresenta a sequência conservada GUAGUA, sugerindo que outros fatores precisam atuar para trazer U2 snRNP para o spliceossomo [77]. Durante muitos anos o homólogo de U5 snRNA não foi encontrado em

Trypanosoma tendo sido identificado apenas em 1999. Ele possui muitas propriedades únicas como o menor snRNA identificado até então, além de não apresentar inúmeras características conservadas entre seus homólogos [78]. U1 snRNA foi o último identificado em tripanossomatídeos [63] e é menor que seus homólogos, não sendo identificado o o stem-loop II e III [79].

Como nos nematodes, U1 snRNP participa apenas do *cis splicing*, pois não há interação entre ela e o 5' *splice site* do SL RNA e sim com o 5' *splice site* do gene PAP (poly (A) polimerase), que por sua vez sofre *cis splicing* [60]. Como apenas dois genes sofrem *cis splicing*, outras funções de U1 estão sendo investigadas, como sua ligação a uma poly (A) *binding protein* de *T. brucei* que sugere seu envolvimento no acoplamento de *cis splicing* e poliadenilação, como ocorre no *trans splicing* [62]. Abaixo na Figura 13, um panorama geral do repertório de snRNPs envolvidas no *splicing* em tripanossomatídeos.

Cada snRNP apresenta três componentes conservados: o RNA estrutrual, snRNA; o *core* de proteínas Sm, comum a todas as partículas; e um conjunto de proteínas específicas de cada snRNP. A seguir são apresentados detalhes de cada componentes das snRNPs.

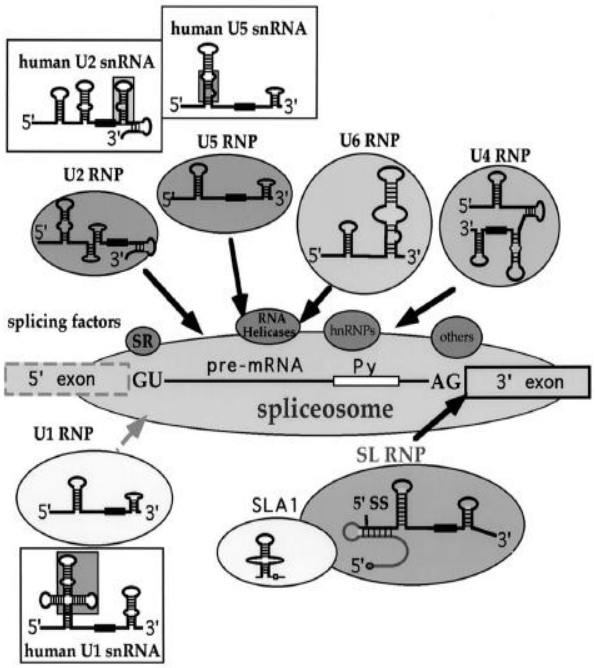


Figura 13 - snRNPs de tripanosoma. As snRNPs estão organizadas ao redor do substrato do *cis* splicing. No pré-mRNA, o 5' e 3' splice sites e o sinal de polipirimidina (Py) estão indicados, em caixas, estão os homólogos de mamífero e fatores propostos como parte da reação também estão indicados [17].

1.4.3 snRNA

Em tripanosomatídeos, os U snRNAs são transcritos pela RNA polimerase III e recebem um cap de 7-metilguanosina (m^7G) na extremidade 5' adicionado pela enzima guanil-transferase que, associada à RNA polimerase, transfere GMP a partir de GTP para um grupamento difosfato na extremidade 5' promovendo uma ligação 5' [80]. Os snRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma, associando-se a sete proteínas Sm, gerando o snRNP core com estrutura semelhante a um anel em torno do sítio Sm, essencial para a estabilidade metabólica do snRNP, importação da partícula para o núcleo e ligação às proteínas específicas (Will, 2001). A U6 snRNP interage com U4 snRNP pelo pareamento dos snRNAs, formando U4/U6 snRNP; proteínas Sm-*like* (LSm) facilitam a interação *in vitro* [81]. Já os pré-mRNAs recebem o cap 5' durante o *trans-splicing*, quando a sequência SL *capped* de 39 nucleotídeos é transferida, a partir de um SL RNA, para a extremidade 5' de cada RNA mensageiro [82].

1.4.4 Proteínas Sm

Proteínas Sm estão associadas aos snRNAs sendo que e sete proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F e G) foram isoladas do extrato nuclear de células HeLa, apresentando pesos moleculares de 28,0/29,0; 16,0; 16,5; 18,0; 12,0; 11,0; 9,0 kDa e pI de 10,6/10,7; 10,5; 8,0; 8,0; 10,3; 3,3; 8,8; respectivamente que são comuns para todas as partículas [83] [84].

As sete proteínas Sm apresentam-se interligadas, organizando-se em uma estrutura em forma de anel, na região do sítio Sm (AAUUUUUGA) [85] [86]. As proteínas Sm são denominadas de Sm-B, -D1, -D2, -D3, -E, -F e –G, apresentando em *T. brucei* pesos moleculares de 12,3; 11,7; 12,5; 12,4; 9,6; 8,4 e 8,9 kDa, respectivamente [87] o core Sm, U2 e U4 estão representados na Figura 14.

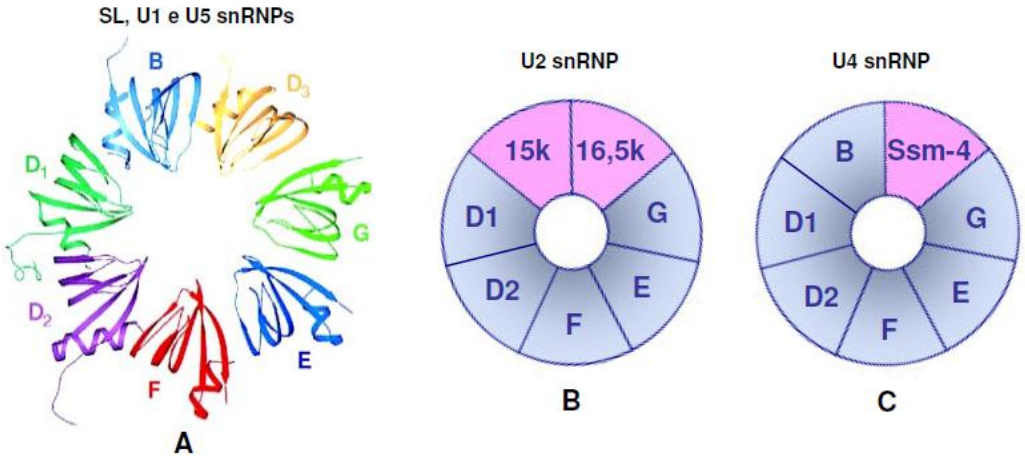


Figura 14 - A) Modelo do core Sm. B) Variação do core Sm em U2 snRNP de *T. brucei*. C) Variação do core Sm em U4 snRNP em *T. brucei* [1]

Uma exceção é a partícula de U6 snRNP, onde o U6 snRNA não apresenta a região Sm e as proteínas Sm, mas contém um trato de uridina próximo da extremidade 3´, no qual se liga um conjunto de proteínas Sm-*like* (LSm), que também formam uma estrutura em anel [88]. Recentemente foram observadas algumas variações em tripanosomas no core Sm da partícula de U2 snRNP (Figura 14, B), que apresenta as proteínas U2-15k/ Ssm 2-1 e U2-16,5k/ Ssm 2-2, ao invés de Sm-B e D3, respectivamente [1] e U4 snRNP (Figura 14 , C) que apresenta a proteína Ssm-4 substituindo Sm-D3 [89].

Embora bem definidos em mamíferos, as proteínas específicas das ribonucleoproteínas não estão bem caracterizadas em tripanosomatídeos, embora a técnica de purificação de complexo tenha contribuído muito com a descrição de novas proteínas específicas.

Entre as snRNPs, U1 representa a partícula mais bem caracterizada, tanto estruturalmente quanto em relação a sua função no *splicing*. Em *T.brucei* é formada pelo U1 snRNA e dez proteínas altamente conservados desde levedura até o homem: complexo heteroheptamérico de proteínas Sm se liga ao sítio Sm e três proteínas específicas, U1-70K, U1A e U1C e uma proteína chamada U1-24K, descrita como exclusiva de tripanosomatídeos [62 64]. Em mamíferos, tanto U1-70K e U1A se ligam diretamente ao U1 snRNA através de domínios de reconhecimento de RNA, em regiões conservadas presente nos *stem-loops* I e II, respectivamente, regiões ausentes no U1 snRNA de tripanosomatideos. U1C interage indiretamente com o RNA estrutural, via proteína-proteína, requerendo tanto U1-70K quanto o complexo Sm [90]. Recentemente foi demonstrado que U1A de *T.brucei* é essencial tanto para o *cis* quanto o *trans-splicing*, e o silenciamento deste gene também afeta a poliadenilação, enquanto o

RNAi de U1-70K não [91]. Soma-se a isso, o fato que técnicas de purificação de complexo utilizando U1A como isca co-purifica o fator de poliadenilação CPSF73 e mais 25 diferentes proteínas. O contrário também é verdadeiro, sendo observada a purificação de U1A quando CPSF73 é empregado com isca. Portanto, não se observa a influência de U1 snRNP nos processos de *trans-splicing* e poliadenilação, somente no *cis-splicing*, enquanto foi demonstrado o papel de U1A na poliadenilação, *cis* e *trans-splicing*, sugerindo novas funções para esta proteína [91].

Para a partícula U2 snRNP até recentemente somente a proteína U2-40K, homóloga a U2A' de mamíferos era descrita. Em humanos demonstra a capacidade de se ligar ao U2 snRNA através de domínios ricos em leucina [92]. Atualmente é conhecida proteína específica de U2 snRNP, U2B'' e os fatores de *splicing* SF3a e SF3b. No primeiro passo do *cis-splicing* ocorre o reconhecimento do sítio 5' *splice site* pela partícula U1 snRNP, seguido pela detecção dos sítios de polipirimidina e 3' *splice site* pelas proteínas U2AF65/35. O *branch point* é reconhecido pela U2 snRNP, associado a dois fatores de *splicing* multiméricos, Sf3a e Sf3b. Sf3a apresenta três subunidades de 60, 66 e 120 kDa em mamíferos, entretanto em tripanosomatídeos somente Sf3a60 é conhecida. Para Sf3b de mamíferos e leveduras são descritas sete proteínas; p14 ou SF3b14, SF3b10, SAP14b, SAP49, SAP130, SAP145 e SAP155. Através de técnicas de purificação de complexos, utilizando o homólogo de SAP49 em tripanosomatídeos como isca, foi possível identificar os membros SAP155, SAP145, SAP130, SAP14b, SAP10 e Sf3b14 [64].

São conhecidas oito proteínas específicas de U5 snRNP em humanos, e suas respectivos homólogos em *S. cerevisiae* (entre parênteses): 220K (PRP8), 200K (BRR2), 116K (SNU114), 102K (PRP6), 100K (PRP28), 52K (LIN1 ou SNU40), 40K e 15K (DIB1). Em tripanosomas já foram descritas as proteínas especificas PRP8 ou U5-220K, -116K, -102K, -40K e -15K , além de uma proteínas exclusiva de tripanosomatídeos chamada de U5-Cwc21 [93]. Em um dos maiores e mais conservados fatores de splicing, PRP8, tem sido observado interação física e funcional com o dinucleotídeo GU do 5' splice site antes do primeiro passo catalítico do *splicing* e com sítio 3' splice site após esta etapa. Além disso, PRP8 também também interage com o branch point, e a interação comtres importantes sítios de splicing sugere uma função central no processamento [81]. U5-200K apresenta o domínio DEAD/DEAH *box helicase* responsável pela destabilização da interação de dois RNAs e U5-116K está relacionada com a separação do duplex U4/U6 durante a ativação do spliceosomo [94]. Experimentos utilizando RNA de interferência em *T.brucei* demonstraram que U5-Cwc21 é essencial para viabilidade celular, e seu silenciamento causa defeitos tanto na reação de *cis*- quanto de

trans-splicing. Ensaios de imunofluorescência indireta demonstraram localização predominantemente nuclear [93], e experimentos de purificação de complexos utilizando U5-Cwc21 como isca, co-purificaram quatro proteínas específicas do complexo U5 snRNP, o U5 snRNA, além do anel de proteínas Sm e a própria Cwc21 nativa [95] sugerindo a presença de um sub-complexo pertencente ao U5 snRNP. Corrobora a este fato, experimentos que demonstram que a proteina conservada U5-15K de *T.brucei*, quando utilizando como isca, co-purifica apenas U5-102K, demonstrando a presença de sub-complexos [95].

In vivo, U4 e U6 snRNPs não existem na forma de mono-snRNP, mas formam um complexo U4/U6 pelo pareamento de seus snRNAs e adição de proteínas específicas dessas di-snRNP. Acredita-se que a proteína SART3 (p110, ortólogo de Prp24 em leveduras) esteja envolvida na união de U4 e U6 snRNPs em humanos [96]. A forma de tri-snRNP, U4/U6.U5, foi observada em maior quantidade por ser a forma funcional. No tri-snRNP humano, além de U4, U6 e U5, são observadas mais 30 proteínas que compõem esse complexo, entre elas a proteína Prp31, responsável pela ligação de U5 a U4/U6 [97]. Em tripanosomatídeos, até 2009 não se conhecia nenhuma proteína específica de U4 snRNP, entretanto Luz AMBRÓSIO e colaboradores descreveram a presença de PRP4, homóloga a U4/U6-60K de humanos. Esta proteína possui aproximadamente 65 kDa e apresenta o domínio PRP4 conservado, além de sete domínios WD40 na região C-terminal. Em humanos, PRP4 é requerida para o primeiro passo do *splicing*, se liga a U4 snRNA e forma um complexo com duas outras proteínas, PRP3 e ciclofilina [96].

1.5 Poliadenilação

A cauda poli-A não é codificada junto com o gene e é adicionada ao pré-mRNA nascente em um processo de dois passos que envolvem uma clivagem sítio-específica e a subsequente poliadenilação upstream do produto da clivagem [98]. Tanto a clivagem quanto a poliadenilação ocorrem em um grande complexo (500-1000 kDa) que inclui a enzima poliA polimerase (PAP) e fatores adicionais que modulam a ação da PAP e assim regulam o processo de poliadenilação e determinam o tamanho final da cauda poli-A [99]. A Figura 15 apresenta um esquema geral das moléculas envolvidas no processo de poliadenilação.

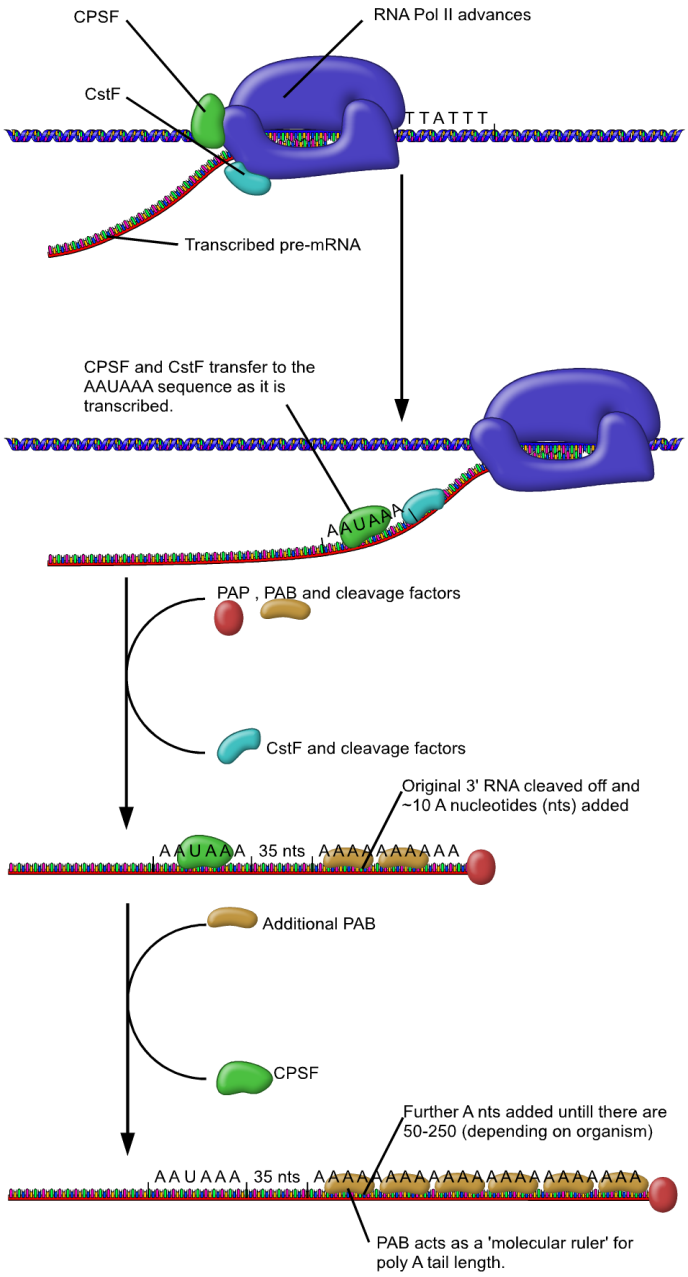


Figura 15 - Esquema do processo de poliadenilação em metazoários. No primeiro passo observa-se a RNA polimerase II transcrevendo o fragmento de pré-mRNA policistrônico, nela já se ligam fatores envolvidos na poliadenilação, como o CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) que posteriormente a transcrição se transfere para a sequência sinal de poliadenilação AAUAAA que fica 20nt upstream ao sítio de adição da cauda poli (A). O CPSF também é responsável por estimular a atividade da PAP e recrutar a poly (A) binding protein, que se liga a cauda e exerce diversos papéis posteriormente descritos. A PAP estende então a cauda poly (A) concomitante a adição do cap no N-terminal (não representado na figura), o CPSF se desliga deixando o mRNA maduro e pronto para o início da tradução [9].

Nenhuma sequência sinal conservada, como o sinal de poliadenilação AAUAAA nos eucariotos superiores, parece estar presente no mRNA dos tripanossomatídeos [100] e até o presente momento pouco se sabe sobre o processo de formação do mRNA nesses organismos. Supõe-se que o mecanismo seja similar ao que ocorre nos eucariotos superiores, ou seja, ocorre a clivagem do pré-mRNA no sítio de poliadenilação e posteriormente a adição da cauda poli-A [101].

Sabe-se que o trato de poli-pirimidinas desempenha papel crucial no acoplamento entre *trans-splicing* e a poliadenilação, uma vez que mutações nessa sequência gera adição anormal de poli-A no mRNA [102]. Estudos também têm mostrado que fatores importantes para a clivagem do 3'UTR e poliadenilação se associam ao pré-mRNA depois que o sítio de *splicing* 3' é marcado pela maquinaria do spliceossomo [103].

Ensaios envolvendo buscas por proteínas regulatórias por análise gênica de motivos funcionais de ligação ao RNA, como o motivo RRM (RNA *Recognition Motif*), mostraram 75 genes promissores em Leishmanias e Tripanosomas [104] estão sendo extensivamente estudados. Análogas às proteínas ligantes do RNA, outras proteínas específicas devem coordenar a interação entre as maquinarias de *trans-splicing* e poliadenilação [17]. A cauda poli-A está diretamente ligada a estabilidade do mRNA e seus ligantes têm sido estudados pois atuam como moduladores do mRNA e consequentemente podem atuar indiretamente na regulação da expressão gênica dos tripanossomatideos.

1.6 Regulação do processamento do mRNA

As ORFs (*Open Reading Frames*) de kinetoplastidas são arranjadas em longos trechos de genes em *tandem* transcritos como precursores policistrônicos que posteriormente serão processados em mRNA individuais por *trans* splicing e a poliadenilação [105]. Até o momento além da regulação da RNA polimerase II na transcrição do SL RNA, não se encontrou evidências para a regulação diferencial da transcrição por essa enzima. Além disso, existem poucos indícios no genoma desses parasitas de fatores de regulação de transcrição [44]. Assim, a regulação da expressão gênica nesses organismos precisa ocorrer no nível pós-transcricional [23].

Em mamíferos uma série de fatores protéicos que se ligam ao 3'-UTR (*untranslated reagions*) foram identificados com potencial regulatório porém as mesmas informações não

foram encontradas em kinetoplastideos [105]. Sequências específicas de ligação ao 3'-UTR foram propostas em *T. cruzi* porém a identidade dos fatores ainda não foi esclarecida [106].

O arranjo em *tandem* dos genes opõe-se ao processo de regulação independente entre os genes adjacentes, uma vez que um erro no *trans splicing* de um gene pode causar um defeito na poliadenilação do gene upstream. Por outro lado, pode-se encontrar regulação coordenada de um lote gênico como um todo como é o caso de algumas cisteíno proteases de *Leishmania* [107]. A regulação independente de genes é possível para mRNAs (cerca de um quarto do total) nos quais a poliadenilação é ditada pelos sinais de *trans splicing* que não possuem ORFs *downstream* [68]. Assim, a poliadenilação e o *capping* tornam-se então elementos essenciais na estabilidade, manutenção e meia vida do mRNA e indiretamente funcionais na regulação da expressão pós-transcricional.

Ainda tratando da regulação da expressão gênica em kinetoplastidas, esses organismos possuem um ciclo de vida bastante complexo, alternando entre hospedeiro vertebrado e invertebrado nos quais são expostos a diferentes microambientes celulares que mudam abruptamente. [108]. Nesse contexto, rápidas modificações na expressão gênica devem ser realizadas para que o parasito se readapte as novas condições de nicho encontradas [109]. Essas modificações envolvem, por exemplo, formação de grânulos de estresse em resposta a falta de nutrientes [110] ou brusco choque térmico [111] e também a relocalização de certas RBPs (RNA *Binding Proteins*) juntamente com o mRNA para o nucléolo e núcleo respectivamente induzidos por condições específicas, [112] eventos esses que podem ser relacionados a um tipo de regulação pós-transcricional nesses organismos.

Estudos de proteômica com RBPs de *Arabidopsis. sp* e humanos tem mostrado um curioso número dessas proteínas com localização nuclear e nucleolar, envolvidas com diferentes passos do metabolismo do mRNA [113]. No caso específico de tripanossomatídeos, foi recentemente demonstrado em *T. cruzi* [112] que o estresse causado pela droga Actinomicina D, um potente inibidor da RNA polimerase e consequentemente da transcrição, provoca a relocalização de RBPs para núcleo e nucléolo, sugerindo que em situações específicas, o nucléolo sequestra RBPs envolvidas no metabolismo do mRNA com a finalidade de modular o repertório de gênico da célula.

1.7 Proteínas com domínio de reconhecimento de RNA (RRM)

Fatores envolvidos no *splicing*/poliadenilção de tripanosomas têm sido identificados em proteínas cujo motivo RRM está presente. Esse motivo contém aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos e frequentemente possui uma sequência assinatura RNP1 (K/R)G(F/Y)(G/A) FVX (F/Y), envolvida em um grande número de processos que requerem interação específica com RNA [114] e com outras proteínas [115].

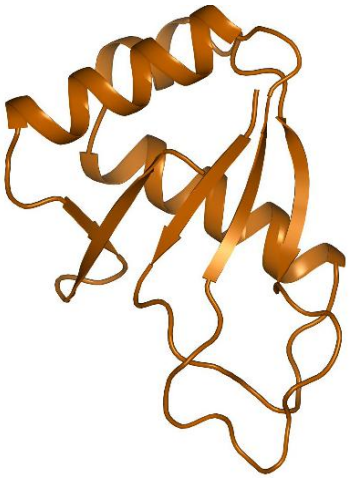


Figura 16 - Representação da estrutura de um domínio RRM canônico [12].

O RRM é o principal domínio utilizado no reconhecimento de RNAs pela célula, visto que ele está presente em centenas de proteínas [116] em diferentes organismos com finalidades diferentes, sugerindo ser um motivo ancestral.

Uma vez que a transcrição ocorre sem aparente controle de promotores na maioria dos genes, a regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos fica limitada a processos pós-transcricionais como por exemplo, a estabilidade do mRNA [64]. Muitas proteínas que afetam esta estabilidade se ligam ao mRNA diretamente através do motivo RRM e portanto, atuam junto à regulação da expressão gênica [104].

1.8 Poli-A *binding protein* (PABP)

A poli-A *binding protein* foi identificada como uma proteína ligante de mRNA de coelho quando se buscava purificar mRNAs polissomais [117] mas ainda sem função definida. Posteriormente, verificou-se que a mesma era essencial para a viabilidade de *S. cerevisiae* [118] além de esclarecer que sua ligação com a cauda poli-A interferia com o metabolismo e biogênese de mRNA, e afetava a ligação com outras proteínas e com o o ribossomo [119].

A cauda poli-A possui uma estrutura única de homopolímero que permite que a mesma seja inteiramente coberta por poli-A *binding proteins* (PABP) que desempenham papel tanto na síntese da cauda quanto na modulação de suas funções biológicas [120]. Dois tipos de PABPs com sequências conservadas em eucariotos foram descritas em detalhes [117], uma citoplasmática e a outra nuclear [121].

A divisão de funções entre as PABPs atribui à homóloga citoplasmática a atuação em pelo menos dois processos em eucariotos; meia vida e degradação do mRNA e auxilio no início da tradução [122]. Já a PABP nuclear atuaria principalmente na poliadenilação do pré-mRNA [123]. Essa divisão de funções foi muito discutida e será tratada em detalhes mais adiante.

A estrutura da PABP citoplasmática é bastante conservada e consiste em quatro domínios RRM conectados a um domínio C-terminal helical por *linker* rico em resíduos prolina e metionina [124]. Os primeiros dois domínios RRM formam uma unidade funcional bem como os dois últimos (RRM_3 e RRM_4), sendo o domínio RRM_1 similar ao RRM_3, assim como observa-se semelhanças entre RRM_2 e RRM_4. Este fato sugere eventos de duplicação gênica no ancestral [125] (Figura 17a e b). Apesar das unidades funcionais, cada domínio é capaz de ligar RNA mesmo não sendo funcionalmente equivalentes, com afinidades diferentes pela cauda poli-A [126].

O carboxi-terminal com domínio helical é altamente conservado na PABP humana, sendo composto por 5 hélices (Figura 17), embora não participe do reconhecimento do RNA. Sabe-se que este domínio é o responsável por interagir com fatores de regulação de poliadenilação, deadenilação e sinais iniciadores e terminadores de tradução [25].

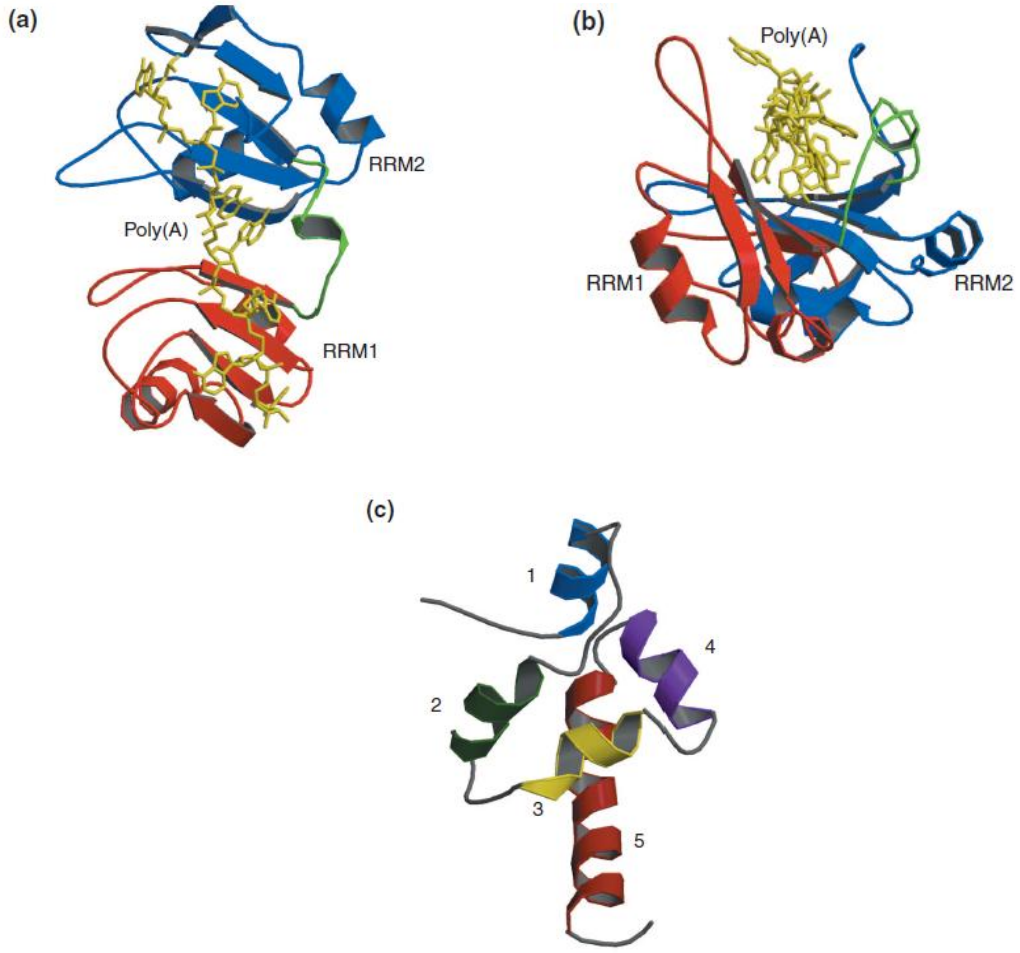


Figura 17 - Estrutura dos domínios da PABP citoplasmática humana; **A.** estrutura cristalográfica dos domínios RRM 1 e 2 associados a cauda poly (A) [19]; **B.** o sulco de ligação com RNA presente quando o RRM1 e 2 se associam com a cauda; **C.** estrutura por NMR das hélices do carboxi-terminal [25].

1.8.1 Poli-A *binding protein* de *Trypanosoma brucei*

O sequencia que codifica a PABP1 de *T. brucei* possui grande similaridade de com os homólogos de outros kinetoplastidas, mas divergem dos encontrados em *S. cerevisiae* e mamíferos. Apresenta características comuns a família de proteínas ligadoras de RNA, incluindo os domínios de ligação ao mRNA (do N-terminal até 2/3 da proteína), uma região de *linker* sem estrutura secundária ou funções associadas e um C-terminal bastante variável quando comparada aos homólogos (região mais divergente em relação a sequência de *T. cruzi*) [127]. Possui 50,3% e 40,6% de identidade sequencial com a homóloga de *Caenorhabditis elegans*.

Observa-se ainda regiões ricas em A e repetições AU no 5' UTR, propriedade comum às demais PABPs. Entretanto, o 3' UTR é mais longo, aproximadamente 3 kpb maior do que os demais [2]. A essa região foi atribuída a função de ligar a própria proteína PABP1, que autorregula a tradução do seu mRNA*pabp1* [20; 128].

```
Tb  --------MAAFAAASP----------------------------SIWVGGLDPNLNEQKLYDHFVRVGPVASVRVCVDSVTQKSLGYGYVNFQNPADAEKALDQAGVK-LGTKHIRIAK 83
Tc  --------MSNFPAASP----------------------------SIWVGGLDPNLNEQKLYDHFVRLGPVASVRVCVDSVTQKSLGYGYVNFQNPADAEKALDQAGVK-LGSKHIRIAK 83
Ce  ---------MEMNVAAPAAAVAGAAAPQP----GQNQTGSSYTMASLYVGDLHPDVNESILFEKFSAAGPVLSIRVCRDNATRLSLGYAYVNFQQPADAERAMDTMNFEALHGKPMRIMW 107
Xl  -----------MNPSAP-----------------------SYPMASLYVGDLHQDVTEAMLYEKFSPAGPILSIRVCRDMITRRSLGYAYVNFQQPADAERALDTMNFDVIKGRPVRIMW 86
Sc  --------ADITDKTAEQLENLNIQDDQKQAATGSESQSVENSSASLYVGDLEPSVSEAHLYDIFSPIGSVSSIRVCRDAITKTSLGYAYVNENDHEAGRKAIEQLNYTPIKGRLCRIMW 112
Hs  -----------MNAAAS----------------------SYPMASLYVGDLHSDVTEAMLYEKFSPAGPVLSIRVCRDMITRRSLGYAYVNFQQPADAERALDTMNFDVIKGKPIRIMW 86
At  MVDQVIPNQPTVAAAAPPPFPAVSQVAAVAAAAAAAEALQTHPNSSLYVGDLDPSVNESHLLDLFNQVAPVHNLRVCRD-LTHRSLGYAYVNFANPEDASRAMESLNYAPIRDRPIRIML 119
                 ::                              *::**.*. .:.*  * : *   ..: .:*** *  *: ****.**** :   . :*::  .   :  :  **

Tb  IQRDPSKRRSGVTNIIVKKLPPTVDTYALKEMFSKYGRLTAIGLATDEKGESRGYARISYEKEESAVDAVRELNGVSIDDCAITVERYQP-HHREEQL----KQYTNLYVKNLDPSVDDE 198
Tc  IQRDPSKRRSGVTNIVVKKLPPSVDTYALKEMFSKYGRLTAIGLATNENGESRGYARISYEKEESAIQAVQEVNGMVIDDCAITVERYQP-HHREEQL----KQFTNLYVKNLDPSVNDE 198
Ce  SQRDPAMRRSGAGNIFIKNLDKVIDNKSIYDTFSLFGNILSCKVAIDEDGFSKGYGFVHFETEEAAQNAIQKVNGMLLAGKKVFVGKFQPRAQRNRELGETAKQFTNVYVKNFGDHYNKE 227
Xl  SQRDPSLRKSGVGNIFIKNLDKSIDNKALYDTFSAFGNILSCKVVCDENG-SKGYGFVHFETQEAAERAIDKMNGMLLNDRKVFVGRFKSRKEREAELGARAKEFTNVYIKNFGDDMNDE 205
Sc  SQRDPSLRKKGSGNIFIKNLHPDIDNKALYDTFSVFGDILSSKIATDENGKSKGFGFVHFEEEGAAKEAIDALNGMLLNGQEIYVAPHLSRKERDSQLEETKAHYTNLYVKNINSETTDE 232
Hs  SQRDPSLRKSGVGNVFIKNLDKSIDNKALYDTFSAFGNILSCKVVCDENG-SKGYAFVHFETQEAADKAIEKMNGMLLNDRKVFVGRFKSRKEREAELGAKAKEFTNVYIKNFGEEVDDE 205
At  SNRDPSTRLSGKGNVFIKNLDASIDNKALYETFSSFGTILSCKVAMDVVGRSKGYGFVQFEKEETAQAAIDKLNGMLLNDKQVFVGHFVRRQDRARSESGAVPSFTNVYVKNLPKEITDD 239
     :***: * .*  *:.:*:*   :*. :: : ** :* : :  :. :  * *:*:. : :* : :*  *:  :**: : .  : *  .    .*  .       :**:*:**:    .:

Tb  KLKEVFSPFGEVTSAKVRDLAGRPTVGFGYVAYATHEAAAKAVEELDDKESPLAKEGMKLSVCRFRSREERKRE-RERLRRERQQQHSKYP--NLYVKNFDDTVTSERLKALFDPFGETV 315
Tc  KLKEVFSAFGEVTSAKVRDLGANQTVGFAYVAYATHEAAAKAVEELDEKESPLAKEGMKLSVCRFRSRDERQRE-RERLRRERQQQHSKYP--NLYVKNFDDTVTSERLKELFERCGETV 315
Ce  TLEKVFAKFGNITSCEVMTVE-GKSKGFGFVAFANPEEAETAVQALHDST--IEGTDLKLHVCRAQKKSERHAELKKKHEQHKAERMQKYQGVNLYVKNLDETVDDDGLKKQFESYGNIT 344
Xl  RLKEMFGKYGPALSVKVMTDDNGKSKGFGFVSFERHEDAQKAVDEMNGKD--MNGK--SMFVGRAQKKVERQTELKRKFEQMKQDRITRYQGVNLYVKNLDDGIDDERLRKEFLPFGTIT 321
Sc  QFQELFAKFGPIVSASLEKDADGKLKGFGFVNYEKHEDAVKAVEALNDSE--LNGE--KLYVGRAQKKNERMHVLKKQYEAYRLEKMAKYQGVNLFVKNLDDSVDDEKLEEEFAPYGTIT 348
Hs  SLKELFSQFGKTLSVKVMRDPNGKSKGFGFVSYEKHEDANKAVEEMNGKE--ISGK--IIFVGRAQKKVERQAELKRKFEQLKQERISRYQGVNLYIKNLDDTIDDEKLRKEFSPFGSIT 321
At  ELKKTFGKYGDISSAVVMKDQSGNSRSFGFVNFVSPEAAAVAVEKMNGIS--LGED--VLYVGRAQKKSDREEELRRKFEQERISRFEKLQGSNLYLKNLDDSVNDEKLKEMFSEYGNVT 355
     ::: *. :*   *  :         .*.:* :   * *  **: :.     :      : * * :.: :*    :.: .  : .:  :   **::**:*: : .: *.  *   *  .

Tb  SVSVMMDKATKVSRCFGFVSFKEQSSAAQAIQELHGSTALGPRPLFVSYALRKDARRQTLEDMRNKQ------------PRMR---QPPMG-------GLMGG----MMGPQLSFMNPPA 409
Tc  SVSVMMDRATRVSRCFGFVSFKEQSAASRAIQELHGSTALGPRPLFVTYALRKDARRQTLEDMRNKQ------------PRMR---QPPMG-------SLMGG----MMGPQLGFMGPQA 409
Ce  SAKVMTDENGR-SKGFGFVCFEKPEEATSAVTEMNS-KMVCSKPLYVAIGQRKEDRRAQLASQYMQRVASMRMHGNVPGAAMYNPTQPGPG--YYVANPMQQQRN--FAGGQQ-MVRPGG 457
Xl  SAKVMME-GGR-SKGFGFVCFSSPEEATKAVTEMNG-RIVATKPLYVALAQRKEERQAHLTNQYMQRMASVRVP-----NPVINPYQPPPSSYFMAAIPPAQNRAAYYPPGQIAQLSPSP 433
Sc  SAKVMRTENGK-SKGFGFVCFSTPEEATKAITEKNQ-QIVAGKPLYVAIAQRKDVRRSQLAQQIQAR------------NQMR--YQQATA----AAAAAAAG----MP-G---QFMPPM 440
Hs  SAKVMLE-DGR-SKGFGFVCFSSPEEATKAVTEMNG-RIVGSKPLYVALAQRKEERKAHLTNQYMQRVAGMRALP---ANAILNQFQPAAGGYFVPAVPQAQGRPPYYTPNQLAQMRPNP 435
At  SCKVMMNSQGL-SRGFGFVAYSNPEEALLAMKEMNG-KMIGRKPLYVALAQRKEERQAHLQSLFTQIRSPGTMSP--VPSPMSGFHHHPPG------GPMSGPHHPMFIGHNGQGLVPSQ 465
    * .**       *: ****.:.  . *  *: * :    :  :**:*: . **: *:  *.                    :    :   .                          . *

Tb  MFN---GMHFMN-TR----MPMMPSTMGMG---GPMRPMG---PT-----------------------------PMNQVRARPGPQRPPMQSMMAPQQQSH---PQIPQPPVAQ---- 477
Tc  MFN---GVPFVN-PR----MSMMPTPMGMG---GQLRPMG---PT-----------------------------PMNQVRARPMPQRPPMQPIMAP--------PPQPQSLASQ---- 472
Ce  RWGMQNQYPVQNQYMMAQGPGVYQNRMGRP-QNQQGGPRG---PP---------QQYNQVAQGGVRMQGPP----RTQNPGVQQQNVPRPPQQQQQQRPAPTGPKAPPQPYQAYQQRPQG 560
Xl  RWTAQGARPHPFQNM----PGAIRPTAPRPPTFSTMRPASNQVPR--------VMSAQRVANTSTQTMGP-----RPTTAAAAAASAVRAVPQYKYAAGVRNQQHLNTQPQVAMQQP--A 534
Sc  FYG---VMP----------PRGVPFNGPNP---QQMNPMG-----------------------------------------------GMPKNGMPPQFRNGPVYG----VPP-----Q---- 486
Hs  RWQ-QGGRPQGFQGM----PSAIRQSGPRP-TLRHLAPTGSECPDRLAMDFGGAGAAQQGLTDSCQSGGVPTAVQNLAPRAAVAAAAPRAVAPYKYASSVRSP-HPAIQP-LQAPQP--A 545
At  PMG--YGYQVQFMPG--MRPGAGPPNFMMPFPLQRQTQPG---PR---------VGFRRGANNMQQQFQQQQMLQQNASRFMGGAGNRRNGMEASAPQGIIPLPLNASANSHNAPQR--- 566
                                                                                                  . :                        *

Tb  ----GQN-LS-----TVLASMTPDQQKNVLGERLYNYIVRNNP--SFAAKVTGMLLEMDNSEILNLLDNHSLLDTKVQEALDVLNRHIGM---------------- 555
Tc  ----GQN-LS-----TVLANLTPEQQKNVLGERLYNHIVAINP--AAAAKVTGMLLEMDNGEILNLLDTPGLLDAKVQEALEVLNRHMNV---------------- 550
Ce  IVIGGQEPLT----SAMLAAAAPQEQKQLLGERIYALIEKLYPGHKDAGKITGMMLEIDNSELIMMLQDSELFRSKVDEAASVLVSAQKQ---------------- 646
Xl  VHVQGQEPLT----ASMLAAAPPQEQKQMLGERLFPLIQAMHP--TLAGKITGMLLEIDNSELLHMLESPESLRSKVDEAVAVLQAHQAKEAAQKVVNATGVPTA- 633
Sc  ----GGFPRN----ANDNNQFYQQKQRQALGEQLYKKVSAKTSNEEAAGKITGMILDLPPQEVFPLLESDELFEQHYKEASAAYESFKKEQEQQTEQA-------- 576
Hs  VHVQGQEPLT----ASMLAAAPPQEQKQMLGERLFPLIQTMHS--NLAGKITGMLLEIDNSELLHMLESPESLRSKVDEAVAVLQAHHAKKEAAQKVGAVAAATS- 644
At  --SHKPTPLTISKLASDLALASPDKHPRMLGDHLYPLVEQQEP--ANPAKVTGMLLEMDQAEILHLLESPEALKAKVSEALDVLRRSADPAAVSSVDDQFALSSSE 668
          .            ::: . **::::  :    .    ..*:***:*::   *:: :*:    :  : .**  .
```

Figura 18: Comparação das sequências de aminoácidos da PABP1 de *T. brucei* (Tb; GenBank número de acesso AF042190), *T. cruzi* (Tc; U06070), *Caenorhabditis elegans* (Ce; U24123), *Xenopus lae6is* (Xl; X57483), *Saccharomyces cere6isiae* (Sc;P04147), *Homo sapiens* (Hs; U33818), and *Arabidopsis thaliana* (At; Q05196). As sequências foram alinhadas com o programa CLUSTAL W. * indica aminoácidos idênticos, : indica substituições conservadas e . indica substituições semi-conservadas. Os motivos RNP 1 (8-mer) e RNP-2 (6-mer) estão sombreados. O motivo conservado na região C-terminal está presente em mais duas proteínas diferentes [2].

Recentemente, um estudo com proteínas ligantes de U1 snRNP de *T. brucei* por imunoprecipitação e espectrometria de massa [62] identificou uma proteína com massa de 65kDa, descrita como poli-A) *binding protein* I (PABPI) sugerindo que essa interação pode indicar uma função ainda não relatada na maquinaria de *cis splicing* e poliadenilação [103 64].

1.8.2 Função da PABP na poliadenilação

Em células de mamíferos, a PABPN1 (Poli-A *binding protein* nuclear) é ativada por ação alostérica do RNA ao se ligar na cauda poli-A nascente contendo de 11 a 14 resíduos de adenosina. Em seguida, restringe a ligação do fator específico de poliadenilação e clivagem, CPSF, (*Cleavage and Polyadenilation Specificity Factor*) ao sinal de poliadenilação AAUAAA [129]. Além disso, estimula a mudança de atividade da enzima poli-A polimerase (PAP) de síntese distributiva para síntese processiva (alta atividade polimerase), mantendo-aligada durante toda reação de elongação da cauda poli-A. O estímulo do CPSF é então interrompido quando a cauda alcança aproximadamente 250 nucleotídeos e sendo esse é o sinal para termino da elongação da cauda, a PABPN1 avalia assim o comprimento da cauda e é responsável por interromper a interação CPSF/PAP [24].

No modelo apresentado abaixo, o CPSF e a PABPN1 cooperam no recrutamento e estabilização da PAP ao substrato de pré-mRNA.

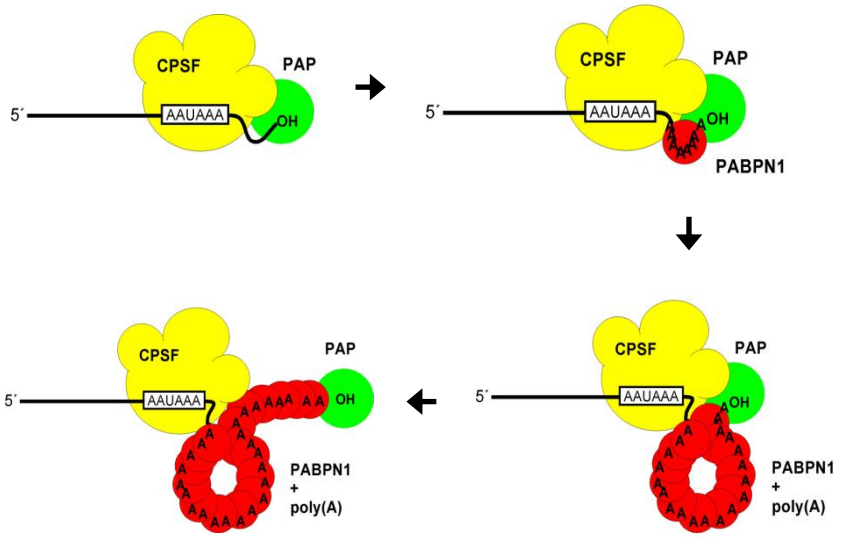


Figura 19 - Mecanismo de controle do tamanho da cauda poly(A). CPFS se liga ao sinal de poliadenilação e recruta a PAP, a primeira molécula de PABPN1 se une quando a cauda atinge ~12 nucleotídeos. PABPs vão sendo adicionadas cobrindo toda a cauda circularizando-a, estrutura esta necessária para manuter o contato entre CPSF/PAP. Depois a PAP é mantida no complexo de maneira processiva. Quando a cauda chega no seu tamanho crítico, ~250nt, PABPN1 adicionais não são mais acomodadas, o contato entre PAP/CPSF não é mais estabilizado e a elongação se encerra [24].

1.8.3 Exportação do mRNA do núcleo para citoplasma

Uma segunda função conhecida da PABP na maturação do mRNA nuclear é seu papel no transporte do mRNA maduro do núcleo, onde é transcrito, para o citoplasma, onde atuará na tradução de proteínas. Todo mRNA para sair do núcleo precisa apresentar uma cauda poli-A e consequentemente apresentar PABP ligada a ela, sendo o processamento do 3' um passo essencial para a exportação da molécula para o citoplasma [130]. Ensaios com leveduras mostraram interação direta da PABP com nucleoporinas específicas bem como com o receptor do sinal de exportação nuclear Xpo1p [131]. Esse cenário é consistente com o transporte núcleo-citoplasma da própria PABP e com os efeitos inibitórios da exportação do mRNA quando a PABP está inativa [132]. No entanto, pouco se sabe sobre os detalhes desse mecanismo, e mais estudos são necessários para esclarecê-lo.

A idéia inicialmente proposta de uma PABP exclusivamente citoplasmática [99] (PABP1C) e outra nuclear [120] (PABP1N) cria um modelo de *steady state* no qual a PABPN1 interage com o mRNA durante ou depois do transito núcleo-citoplasma e então a PABP1C a substitui, permitindo assim uma tradução *cap*-dependente [18]. Estudos posteriores demonstraram a entrada e saída ativa (dependente de ATP) da PABPC1 no núcleo da célula, dependente e independente do mRNA [133]. Experimentos de fracionamento celular utilizando células *HeLa* comprovaram a presença da PABPC1 no núcleo da célula [134], corroborando uma hipótese de trânsito da proteína entre núcleo e citoplasma.

Tanto em *S. cerevisiae* [135] quando em mamíferos [136] a função biológica da PABPC1 no núcleo tem sido exaustivamente buscada e sugere uma relação evolutivamente conservada desta proteína na biogênese do mRNA, envolvida no processamento da terminação 3' do mRNA e sua exportação para o núcleo. Assim, o cenário atual caracteriza o tráfico núcleo/citoplasma da proteína PABP1, desafiando os limites propostos anteriormente. A figura abaixo esquematiza o modelo canônico de divisão de funções entre as PABs.

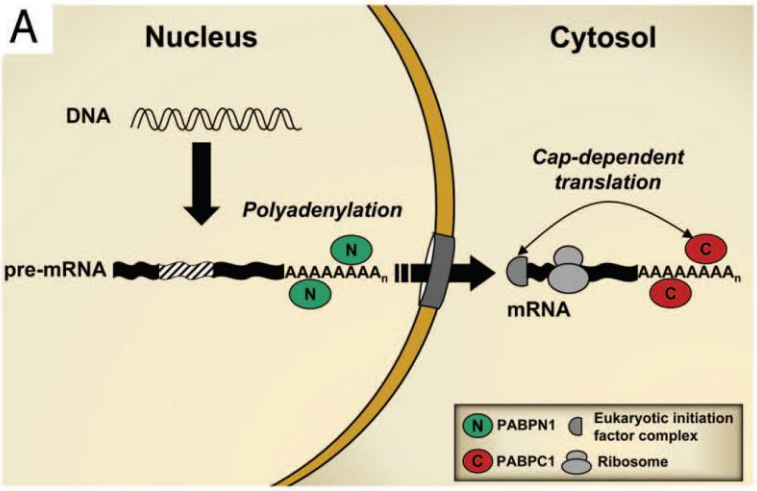


Figura 20 - Painel A. Modelo tradicional no qual a PabpN atua na terminação 3' escorando o mRNA até o complexo do poro nuclear (NPC); nesse trajeto a PabpN é removida permitindo a ligação da PabpC na cauda poli-A que alcança o citosol. Nesse compartimento a PabpC estimula a tradução via interação com outras proteínas e fatores de iniciação [18].

Por outro lado, estudos com a PABP de levedura demonstraram que a mesma é recrutada no citoplasma e se associa com fatores de tradução e proteínas ribossomais [137]. Reciprocamente, essas evidência não foram encontradas em células de mamíferos e a PABPN1 parece estar relacionada apenas com um tipo específico de tradução que detecta mRNAs com mutações aberrantes [138]. Talvez a maior evidência da função citoplasmática da PABPN1 venha de um estudo realizado em *Drosophila melanogaster* no qual mRNA específicos do início do desenvolvimento do inseto, tem sua tradução regulada via poliadenilação citoplasmática envolvendo a enzima PABPN1 [139].

Um modelo plausível foi então proposto em 2010 [18], consistente com a literatura atual demonstra que PABPC1 e PABPN1 estão ligadas ao mesmo mRNA, embora a estequiometria pode não ser a mesma em cada compartimento celular.

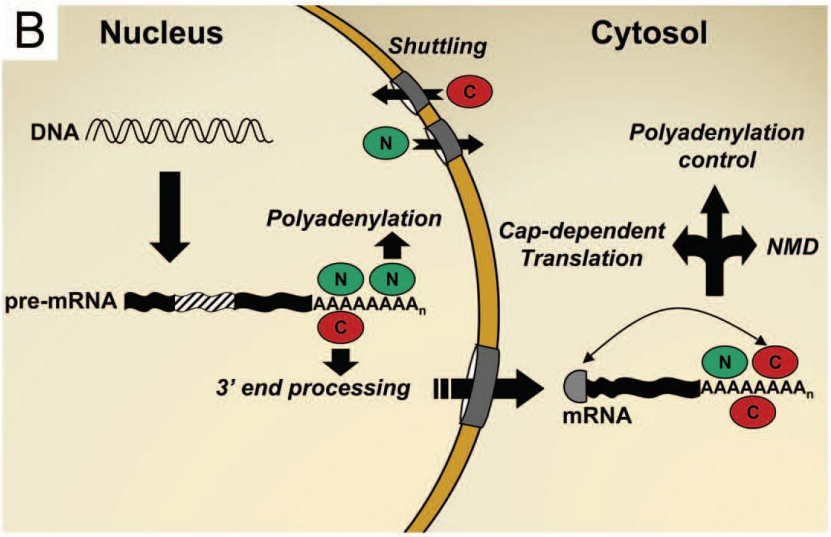


Figura 21 - Painel B. Modelo de trânsito no qual ambas as Pabs transitam entre núcleo e citosol. No núcleo PabpC se associa com o pré-mRNA e contribui com o processamento da terminação 3'. Ainda ligado as duas Pabs, o mRNA transita entre o núcleo/citoplasma e no citosol a PabpN contribui no silenciamento da tradução de transcritos específicos via mecanismo deadenilação-dependentes [18]

1.8.4 Início da tradução

A cauda poli-A não é essencial para a tradução, embora RNAs com cauda sejam mais eficientemente traduzidos do que os RNA sem cauda [140]. Esses resultados asssociados com estudos mostrando a tradução em cepas de levedura deficientes em PABP1 [141] revelam que os efeitos da cauda poli-A na tradução parecem ser mediados principalmente (mas não exclusivamente) pela PABPI [120].

Depois que o mRNA entra no citoplasma, sua associação com a PABP promove interações entre a extremidades 5'-3', formando um *loop* fechado (*closed loop*), recrutando a subunidade ribossomal 40S. Com o ribossomo ligado, a PABP exerce um segundo papel interagindo com o elF4G enquanto o *cap* interage com o elF4E, demonstrando a sinergia existente entre cap e cauda poli-A.As duas interações segurando uma mesma molécula (mRNA) em um complexo terão um efeito aditivo na constante de associação, facilitando o início da tradução [142].

A cooperatividade das interações aumenta a afinidade entre o *cap* e elF4E, estimula a ligação RNA/PABP [143] e aumenta atividade ATPase e helicase do elF4A, elF4B e elF4F [144]. Além disso, sabe-se que a ligação entre PABP1p e elF4G envolve os domínios RRM 1 e 2,

bem como o domínio C-terminal [145]. A combinação desses efeitos possibilita que o aparato de síntese protéica realize a tradução preferencial de mRNA que contenham *cap* e cauda poli-A e podem também criar a oportunidade para que o ribossomo se recicle do 3' para o 5' do mesmo mRNA [146]. A função da PABP na tradução também pode ser regulada indiretamente por variações no comprimento da cauda poliA, pois quanto maior a cauda, maior o número de PABPs ligadas a ela e mais eficiente é a tradução [147].

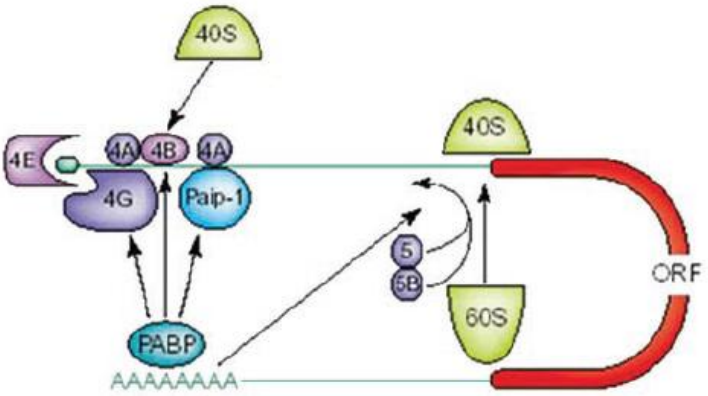


Figura 22 - Circularização do mRNA para tradução. PABP se liga a cauda crescente de poly(A) no 3' do mRNA e interage com o fator de elongação elF4G para circularizar o mesmo permitindo o início da síntese proteica. Interações entre PABP e outros polipeptídeos estão representadas com setas [20].

1.8.5 Metabolismo do mRNA

O mRNA é uma molécula bastante versátil e seu tempo de meia vida é fundamental como ferramenta associada a regulação da expressão gênica. O mecanismo de inativação do mRNA é conhecido como *turnover* e envolve dois passos previamente descritos em levedura [148]: *i)* inicia-se com um encurtamento exonucleolítico da cauda poli-A para até 10 nucleotídeos em seguida ocorre a hidrólise do *cap* e digestão do corpo do RNA por uma 5' exoribonuclease; *ii)* o mRNA é degradado a partir da terminação 3', após remoção da cauda poli-A [120].

Ambos os processos eliminam o estado de *closed loop* do mRNA/PABP pois removem os sítios de ligação tanto no 5' quanto no 3', deixando os fragmentos de mRNA para serem posteriormente degradados. O decaimento do mRNA ocorre em associação com a conversão do mRNP de uma forma sujeita a tradução (*translatable*) para uma forma inativa, paralelamente, ocorre também a dissociação da PABP do complexo de tradução [149].

O papel da PABP na manutenção da estabilidade do mRNA é mais complexa do que meramente aumentar a eficiência da tradução. Ensaios sugerem que ao perder o sítio de ligação com a PABP, a estrutura do *closed loop* se quebra mas nem sempre o mRNA é eliminado, sendo esse um evento obrigatório na degradação mas não o gatilho para que aconteça [150]. Outro indício da complexidade do processo vieram de experimentos realizados com a PABP mutada que demonstraram que o decaimento não é acelerado em todas as moléculas de mRNA [151]. Além disso, o domínio responsável pela associação de PABP ao mRNA, para promover sua estabilidade, é diferente do domínio ligado às suas funções na tradução [152], comprovando a polivalência da proteína em questão. Deleções da proteína realizadas em *S. cerevisae* resultam num *decapping* prematuro do mRNA, anterior a deadenilação, indicando que a PABP1 atua também na inibição do *decapping* [153; 154].

A hipótese mais aceita é que PABP influencia na meia vida do mRNA por suas interações com proteínas regulatórias, influenciando na sua atividade e função [99]. Os esforços nessa ultima década foram dirigidos para a conservação evolutiva dos sistemas de controle de qualidade que monitoram a acurácia dos eventos de maturação do mRNA antes destes serem exportados para o citoplasma [155], melhorando assim a fidelidade da expressão gênica. Evidências convergem para a natureza da cauda poli-A como um ponto importante de checagem entre mRNA normais e aberrantes [156]. Estudos de poliadenilação, ultilizando caudas maiores que 250 resíduos de adenosina, demonstraram que as PABPN1 adicionadas não poderão ser acomodadas na estrutura esférica Figura 19, resultando na perda de interação entre CPSF e a PAP, prejudicando a processividade da polimerase [24].

1.8.6 Degradação do mRNA

Em levedura e metazoários a degradação do mRNA inicia-se com a deadenilação da cauda poli-A por uma poli-A-nuclease chamada deadenilase, em seguida, a degradação ocorre do 3'→ 5' pelo exossomo complexado a mais 11 proteínas com funções diversas [157]. A regulação é feita pelos elementos ricos em AU (AREs) no mRNA que são reconhecidos por proteínas moduladoras que estabilizam/desestabilizam a molécula, inibindo ou promovendo a deadenilação [158]. Os mRNAs que não estão sendo traduzidos, mas que também não podem ser degradados, ficam compartimentalizados no citoplasma em domínios chamados de *processing bodies* ou P-bodies [159]. Essa é a razão pela qual foi identificada a presença da *Tc*PABP1 nes-

ses grânulos celulares, sendo considerada mais uma maneira de regulação da expressão gênica [160].

Em tripanossomatídeos tanto a deadenilação quanto o *decaping* foram descritos, embora as proteínas envolvidas no processo variem em relação a leveduras e metazoários. Após deixar o núcleo, o mRNA se encontra ligado ao complexo *cap* nuclear constituído da poli-A-*binding protein* (PABP) [161] e possivelmente outras RBPs. Após esse estágio inicia-se a síntese protéica pela formação de complexos de iniciação de tradução. Tais complexos são reprimidos pelas RBPs que competem pela ligação ao *cap* [162]. Após aproximadamente 0,2-4h o RNA é deadenilado pelo complexo CAF1/NOT, o *cap* é removido por DCPs e degradado pelo exossomo [105].

É provável que a regulação pós-transcricional coordenada nos kinetoplastidas dependa de um número pequeno de motivos de RNA, específicos para os padrões de expressão gênica de casa estágio do ciclo celular dos parasitos [163]. A Figura 23 apresenta um modelo para a degradação do mRNA nos tripanossomatídeos citada anteriormente, evidenciando o papel da *Tb*PABP1 nesse processo.

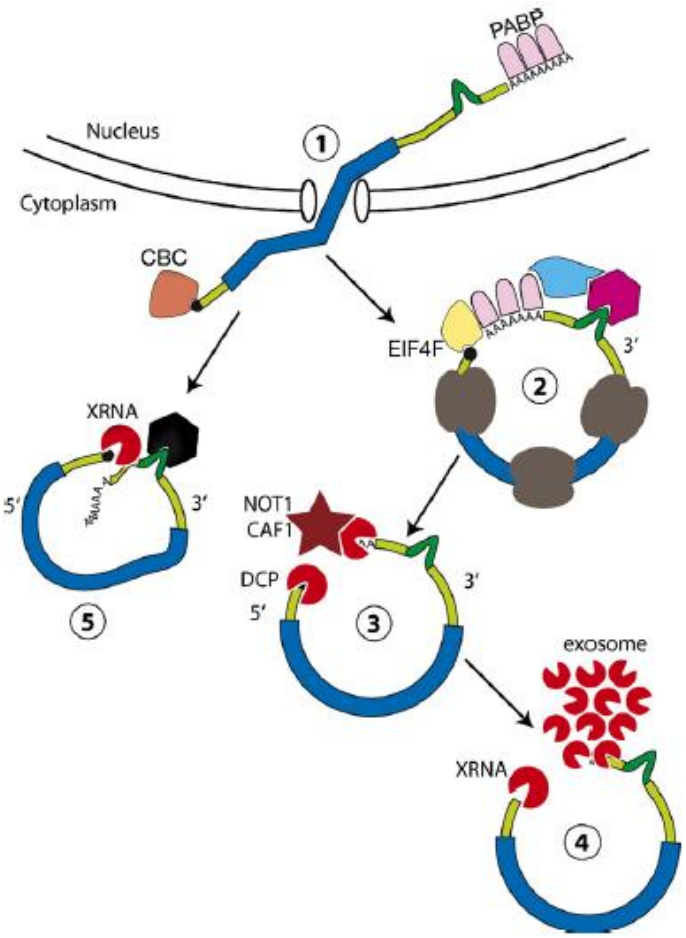


Figura 23 - Destino do mRNA nos tripanosomas; 1) saída do mRNA do núcleo já com ligado com *cap* (esfera azul no 5') *binding protein* e poli-A *binding protein* (PABP); 2) elF4F interage com TbPABP formando o *closed loop*. Em rosa e azul claro outras proteínas hipotéticas envolvidas com a estabilidade do mRNA ativo na tradução; 3) a tradução do mRNA é interrompida e a deadenilação inicia-se como complexo CAF1/NOT e *decapped* por DCPs; 4) RNA é degradado por exossomos e XRNA; 5) alternativamente após (2) o RNA pode ser traduzido e é degradado em um processo iniciado pelo reconhecimento de sequências específicas no 3' UTR (loop verde escuro), que ligam proteínas específicas envolvidas na sinalização da maquinaria de degradação [23]

2 Objetivos e Justificativa

O objetivo geral desse projeto visa o entendimento do papel da proteína poliA-*binding protein* 1 (PABP1) em kinetoplastidas, mais especificamente *Trypanosoma brucei*.

Objetivos Específicos

1. Produzir a proteína PABP1 de *T. brucei* recombinante para análise estrutural;

2. Determinar a localização celular da proteína sob condições normais e de estresse induzido;

3. Caracterizar funcionalmente a proteína analisando o efeito da depleção da mesma;

4. Avaliar do complexo protéico associado a PABP1 *in vivo*;

3 Materiais e Métodos

3.1 Clonagem, expressão e purificação da proteína Tb*PABP1*

3.1.1 Cultivo das formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* (cepa 2913) foram crescidas durante 5 dias em garrafas de cultura a 26°C, contendo 10mL de meio *Cunningham* suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 50µg/mL de higromicina (Sigma) e 15µg/mL de G418 (Sigma).

Tabela 1 - Meio de cultura "Cunningham" para *Trypanosoma brucei*

Reagente	Massa	Reagente	Massa
B-Alanina	8000mg	L-Tirosina	800mg
DL-Alanina	4360mg	DL-Valina	840mg
L-Asparagina	960mg	NaH_2PO_4	2120mg
L-Ácido aspártico	440mg	$MgCl_2$	12160mg
L-Cisteína-HCl	320mg	$MgSO_4$	14800mg
L-Cistina	120mg	KCl	11920mg
L-Ácido Glutâmico	1000mg	$CaCl_2$	600mg
L-Glutamina	6560mg	D-Glucose	2800mg
Glicina	480mg	D-Frutose	1600mg
L-Histidina	640mg	Sucrose	1600mg
DL-Isoleucina	360mg	L-Málico	2680mg
L-Leucina	360mg	α-Cetoglutarato	1480mg
L-Lisina	600mg	Fumárico	220mg
DL-Metionina	800mg	Succínico	240mg
L-Fenilalanina	800mg	cis-Aconitato (3mM)	2088mg
L-Prolina	27600mg	Na-Piruvato (100mM)	40mL
DL-Serina	800mg	vitamina BME 100x	8mL
L-Taurina	1080mg	Penicilina-Streptomicina	40mL
DL-Treonina	400mg	Phenol Red 0,5%	16mL
L-Triptofano	400mg	*Água milli-Q q.s.p.*	*4L*
pH 7,4 ajustado com NaOH 10M			

3.1.2 Extração do DNA genômico de *Trypanosoma brucei*

Culturas de *T.brucei* foram repicadas a cada 4 dias em 50mL de meio *Cunningham* até atingirem a concentração $5x10^8$ células/mL . Centrifugou-se as células por 15 minutos a 1500g, a 4ºC, desprezando-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 20mL de PBS (NaCl 140mM; KCl 3mM; Na_2HPO_4 10mM; KH_2PO_4 2mM; pH 7,4) e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi desprezado e as células homogeneizadas em 4mL de tampão PBS [1x]

Adicionou-se Proteinase K a uma concentração final de 50µg/mL e SDS 0,5% (v/v). Os tubos foram invertidos gentilmente e incubados a 37ºC durante aproximadamente 16 horas. Para a retirada de proteínas, purificação e concentração da amostra realizou-se extração com fenol/clorofórmio e uma precipitação com etanol. Para tanto, adicionou-se 1:1 v/v de fenol ácido (pH4,5), invertendo o tubo 3 vezes, seguindo com a centrifugação da amostra a 17000g/2min a 4°C. Transfereiu-se a fração aquosa (fração superior) para novo tubo e acrescentou-se 1:1 v/v de clorofórmio. Apos centrifugação a 17000g/2min a 4°C, a fase superior foi novamente transferida para novo tubo e adicionou-se 1:10 v/v de Acetato de Sódio 3M e 2,5v de etanol absoluto previamente resfriado, com intuito de precipitar o DNA de interesse. Incubou-se a amostra por 30min a -80°C, centrifugou-se a 17000g/30min a 4° e retirou-se o sobrenadante. Ao sedimento acrescentou-se 1mL de etanol 70% resfriado, centrifugou-se a 17000g/5mim a 4°C, descartou-se o sobrenadante e DNA foi seco a temperatura ambiente. A amostra foi ressupensa em 50µL de água deionizada e aramazenda a 4ºC.

3.1.3 Clonagem do gene *pabp1* de *Trypanosoma brucei*

Para a amplificação do gene *Tbpabp1* oligonucleotídeos foram desenhados baseados na sequência genômica depositada no TriTrypDB (Tb09.211.0930 - *Polyadenylate-binding protein* 1), com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Xho*I . A sequência dos iniciadores está representada abaixo e com auxílio do programa Gene Runner, foi calculada a temperatura de associação de cada oligonucleotídeo.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a clonagem e subclonagem do gene Tb*pabp1*

Primer	Sequência	enzima
Tb*pabp1* For	5'-CCG GGA TCC ATG ACA ATC GCT GCA CAG GGG- 3'	BamHI
Tb*pabp1* Rev	5' –CCG ACT CGA GTT AAG CAC TTG AGG CGT GTA CC– 3'	XhoI

Os oligonucleotídeos foram diluídos para a concentração de 100pmol/µL e a reação de amplificação a partir do DNA genômico de *T.* brucei foi realizada como descrito na Tabela 3 e Figura 24 abaixo.

Tabela 3 - Reação de amplificação do gene Tb*pabp1*

Reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão da Taq (10x)	5
dNTP (n=A,G,C,T)	1
Primer 5' (10µM)	1
Primer 3' (10µM)	1
DNA genômico *Tbrucei* 50ng/µL	2
Taq DNA polimerase (50u/µL)	1
H_2O q.s.p	50

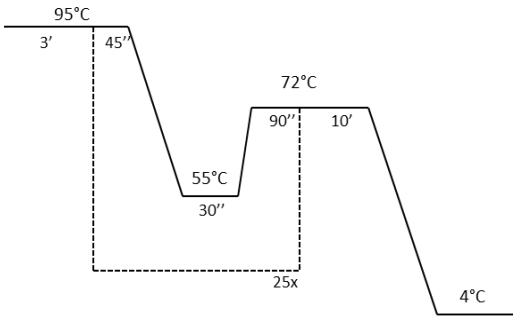


Figura 24 - Esquema da reação de amplificação utilzada no termociclador.

As reações de amplificação foram purificadas a partir do gel de agarose 1% utilizando o *Kit Perfectprep Gel Cleanup* (Eppendorf), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas utilizando NanoDrop (Thermo) e procedeu-se com a

reação de adenilação, com intuído de adicionar adeninas nas terminações 3' e 5' do inserto, facilitando a clonagem em vetor comericais que apresenta timina nas extremidades.

Tabela 4 - Reação de adenilação do inserto Tb*pabp1*

Reação de adenilação	Volume (µL)
Tampão da Taq (10x)	5
dATP [10mM]	5
$MgCl_2$ [50mM]	1,5
DNA genômico *Tbrucei* 100ng/µL	15
Taq DNA polimerase (50u/µL)	1
H_2O q.s.p	50

A reação permaneceu a 70ºC por 30 minutos. Em seguida, fez-se a extração com fenol/clorofórmio para retirada da enzima e precipitação com 2 volumes de etanol absoluto. Esse DNA foi então quantificado e a reação de ligação preparada. O vetor de clonagem escolhido foi o pGEM®-T (Promega), cujo mapa esta descrito na Figura 25.

Tabela 5 - Reação de ligação do inserto Tb*pabp1* e vetor pGEM®-T

Reação de ligação	Volume (µL)
Tampão da Taq (10x)	5
dATP [10mM]	5
$MgCl_2$ [50mM]	1,5
DNA genômico *T.brucei* 100ng/µL	15
Taq rec DNA polimerase (Fermentas)	2
H_2O q.s.p	50

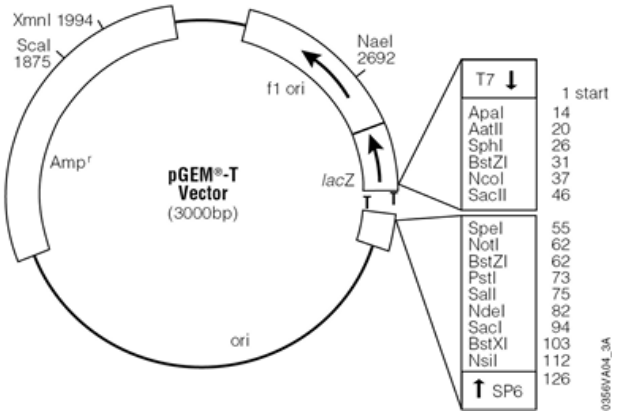


Figura 25 - Mapa do vetor pGEM®-T (Promega)

Adicionou-se a 3µL do DNA adenilado, 1µL do vetor pGEM-T, 5µL Tampão [2x] da enzima T_4 DNA ligase e 1µL T_4 DNA ligase em um volume final de 10µL na reação de ligação inserto Tb*PABP1*/pGEM-T. A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e em seguida realizou-se a transformação do produto da ligação em células competentes de *Escherichia coli* DH5α pelo método de cloreto de cálcio. A manipulação de bactérias para a produção das células competentes e protocolo de transformação serão descritas no item 3.2.

Depois do período de crescimento na placa, as colônias foram submetidas a uma primeira seleção através da sua coloração. Colônias azuis caracterizam-se como não recombinantes, enquanto as brancas, como recombinantes. Essa análise se mostra efetiva, pois o inserto ligado ao vetor pGEM®-T altera a fase aberta de leitura do gene que codifica a enzima β-Galactosidase, impedindo assim sua tradução e evitando a degradação do substrato X-Gal, resultando na coloração branca das colônias recombinantes. Já as colônias sem o inserto, possuem a enzima β-Galactosidase ativa, que hidrolisa o X-Gal gerando o produto 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, que gerando coloração azulada.

Colônias brancas selecionadas foram transferidas para meio LB líquido contendo o antibiótico de seleção e procedeu-se com extração do DNA plasmidial utilizando-se o kit Minipreps Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). O DNA recombinante foi sequenciado utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor pGEM-T T7 Promoter primer e SP6 primer.

3.1.4 Subclonagem no vetor pET28a(+)

O vetor pET28a(+) (Novagen) possui marcador seletivo de resistência ao antibiótico kanamicina, uma origem de replicação, um sítio de clonagem múltipla e, diferentes seqüências adjacentes que codificam para uma variedade de peptídeos acessórios utilizados na purificação da proteína alvo. Os plasmídeos do sistema pET foram desenvolvidos especificamente para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresentam alto grau de eficiência. Genes clonados em plasmídeos do sistema pET estão sob o forte controle dos sinais de transcrição do fago T7. Assim, a expressão da proteína de interesse depende da presença da enzima T7 RNA polimerase (pET System Manual 2001. http://www.novagen.com).

As seqüências nucleotídicas dos primers específicos da Tabela 2 contém na extremidade 5' sítios de restrição para enzimas, os quais foram importantes para subclonagem do gene

Tbpabp1 em fase (*in frame*) com a sequência que codifica a cauda de poli-Histidina (poli-His) presente no vetor pET28a (Figura 26).

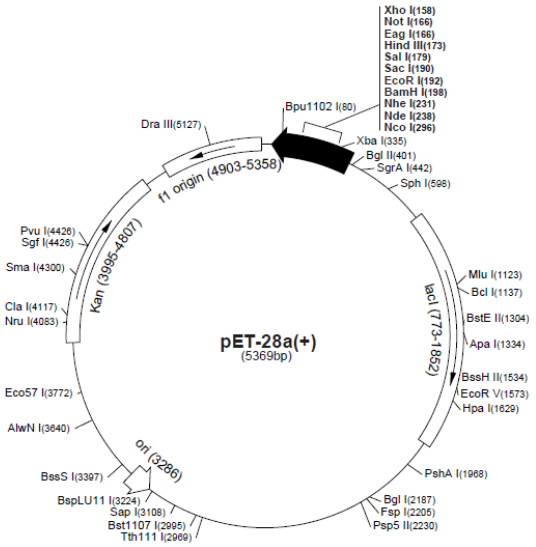


Figura 26 - Mapa vetor de expressão com fusão de cauda de 6 histidinas pET28a (Novagen)

Para a ligação do inserto amplificado ao vetor de expressão, adicionou-se os seguintes reagentes: 1µL de pET28a(+) digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I (~50 ng), 1µL de inserto digerido com as mesmas enzimas de restrição (~50 ng), 2µL Tampão T_4 DNA ligase [10X], 5µL água deionizada e 1µL de T_4 DNA ligase (2 Unidades - USB). A reação foi incubada por 4°C por 16h e o produto de ligação transformado *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* competente, como descrito no item 3.2. O *pLysS* é um vetor adicional da cepa que suprime a expressão basal do promotor T7 pois produz uma T7 lisozima que é um inibidor natural da T7 RNA polimerase.

A confirmação da clonagem foi realizando tanto por sequenciamento quanto por PCR de colônia, que consiste em picar colônias isoladas com palitos estéreis e misturar diretamente na reação de amplificação utilizando os primers específicos descritos na Tabela 2.

3.2 Produção de proteína recombinante

3.2.1 Preparação de bactérias *E. coli* competentes

Preparou-se um pré-inóculo de 5 mL de meio Meio Luria-Bertani (LB – 1g Triptona, 0,5g Extrato de Levedura, 1g de NaCl em 100mL de água, pH 7,5 ajustado com NaOH 5M) contendo contendo o clone especifico de PABP1 em pET28a. Após crescimento por aproximadamente 16h (*overnight*), 1mL foi transferido para 50 ml de meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 10mM, $MgSO_4.7H_20$ 10mM, esterilizado por filtração) incubando-se a 37ºC em estufa sob agitação até atingida uma densidade ótica de 0,6 medindo-se com comprimento de onda 600nm. Centrifugou-se a cultura por 10 min a 4ºC a 2.500g e ressupendeu-se o sedimento em 16 ml de solução de TB (Pipes pH 7,0 10mM, $MnCl_2.4H_2O$ 55mM, $CaCl_2.2H_2O$, KCl 250mM, esterilizado por filtração).Em seguinda as bactérias foram mantidasem gelo por 10 minutos e centrifugou-se novamente por 10 min a 4 ºC e 2.500g e o sedimento foi ressuspenso em 4 mL da solução TB contendo 30 µL de DMSO. Após incubação em geleo por 10 minutos, as bactérias foram aliquotadas em frações de 200µL cada, congelando-se imediatamente com Nitrogênio líquido. O mesmo procedimento foi empregado para preparação de *E.coli* BL21 (DE3).

3.2.2 Reação de transformação

À reação de ligação adicionou-se 200µL de *E. coli* DH5α competentes e incubou-se em gelo por 30 min.Seguiu-se com o choque térmico, para entrada do plasmídeo na bactéria, a 42ºC por 90 seg, retornando o tubo ao gelo por 2 min e à TA por mais 2 min. Adicionou-se 600µL de meio SOB (Triptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 8,5mM, KCl 2,5mM, glicose 10mM, $MgCl_2$ 20mM) incubando-se a 37ºC por 1 hora e 30 min sob agitação suave (150 rpm). Decorrido esse tempo, 100µL da reação foram cultivadas em placa de Petri contendo meio LB ágar (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, agar 2%) mais o antibiótico de seleção específico de cada vetor, os 200µL de material restante foram cultivados em outra placa nas mesmas condições. As placas permaneceram por 14 horas na estufa a 37°C.

Na transformação de *E. coli* DH5α/pGEM-t/Tb*pabp1*adicionou-se na placa 100µg/mL de ampicilina, 0,5mM de IPTG (Isopropílico β-D-1 thiogalactopyranoside) e 80µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) e na transformação de *E. coli* BL21 (DE3)/pET- 28a(+)/Tb*pabp1* adicionou-se 50µg/mL de kanamicina.

3.2.3 Expressão da proteína *PABP1*

Uma colônia recombinante PABP1-pET28a foi inoculada em 5mL de meio LB líquido em tubo de ensaio contendo o antibiótico determinante da seleção kanamicina a uma concentração final de 50µg/ml. Incubou-se a 37˚C por 12 a 14 horas sob agitação de 250 rpm. Aproximadamente 50µL desta cultura foi inoculada em 5mL de LB estéril e incubou-se por por 2 horas a 37˚C até alcançar a fase exponencial de crescimento bacteriano (D.O 600nm de 0,6). Adicionou-se IPTG a uma concentração final de 1mM para induzir a expressão da proteína de interesse e incubou-se a cultura durante 3 horas sob a mesma temperatura e agitação.

Centrifugou-se a amostra a 17000g por 3 minutos e as células foram homogeneizadas com tampão de lise (0,1mM de NaCl e 0,01mM de Tris Base com pH 7,5). A lise das células foi feita deixando-as por 30 minutos com 10µg/mL de lisozima e depois causando a ruptura celular por ultrasonicação pulsada no aparelho 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Utilizou-se 3 pulsos de 30 segundo intercalados com 1 minuto de descanso sempre com a amostra no gelo para evitar aquecimento. Para separar a parte solúvel, a amostra foi clarificada por centrifugação a 17000g por 10 minutos e estocada a 4˚C. A expressão e solubilidade das proteínas foram observadas por SDS-PAGE 15% revelado com 0,010% de Comassie Brilhant Blue R-250.

Após verificar que a proteína de interesse ficou insolúvel realizou-se testes variando-se a temperatura e tempo de incubação bem como a concentração do indutor. A temperatura baixa visa diminuir a velocidade da expressão e assim produzir a proteína melhor enovelada e consequentemente solúvel.

O protocolo otimizado então segue igual ao descrito anteriormente até transferir 1mL do pré-inóculo para um erlemeyer de 2 litros contendo 500mL de meio LB líquido. Incubou-se os frascos sob agitação de 220rpm a 37ºC acompanhando a concentração celular no meio através da densidade ótica, ate atingir $D.O_{600nm}$ de 0,3. A temperatura foi reduzida para 22˚C durante 1 hora para aclimatar o meio e chegar a D.O de 0,6 (fase exponencial) e em seguida adicionou-se 0,1mM do IPTG. O tempo de indução foi testado de 3 até 16 horas e o tempo ideal foi de 5 horas. Terminado o período de indução, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g na temperatura de 4ºC. A lise das células foi realizada da mesma maneira descrita no procedimento piloto.

3.3 Obtenção da proteína *PABP1* purificada

3.3.1 Precipitação com Sulfato de amônio

Quando adicionados sais neutros a uma solução, ocorre um aumento da força iônica do sistema. Ao adicionar pequenas quantidades de sal a uma solução contendo proteínas, as cargas provenientes da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas protéicas, diminuindo a interação entre elas e, consequentemente, ocorre um aumento da solubilidade da proteína no meio aquoso. A esse fenômeno dá-se o nome de *"salting-in"*, lembrando apenas que esse efeito, porém, não se estende indefinidamente.

No *salting in* a água com seu grande poder de solvatação, passa a interagir com as duas espécies presentes na solução: as proteínas e os íons provenientes da dissociação do sal. As moléculas de água por sua vez apresentam maior tendência de solvatação de partículas menores (nesse caso, os íons). Assim, ocupadas em sua interação com os íons (quanto mais sal se adiciona, mais íons são dissociados), as moléculas de água abandonam a estrutura protéica possibilitando maior interação proteína-proteína, diminuindo a solubilidade e, consequentemente, precipitação da proteína. A esse fenômeno de insolubilização da proteína em decorrência de um considerável aumento da força iônica do meio dá-se o nome de *"salting-out"*.

Esse processo é interessante para separar proteínas, pois nem todas elas precipitam com a mesma quantidade de sal e também porque a proteína precipitada não é desnaturada e pode facilmente ser ressolubilizada retirando-se o sal. Assim, realizou-se um teste de precipitação com o sulfato de amônio para avaliar em qual concentração a proteína alvo precipitava.

Para tanto se utilizou o Tampão A (300mM NaCl, 50mM NaH_2PO_4, pH8,0) para a homogeneização e lise das células, em seguida, colocou-se o extrato clarificado de proteína total em um Becker no gelo, sob leve agitação. Posteriormente, adicionou-se pouco a pouco o sulfato de amônio previamente macerado na concentração indicada na tabela abaixo (Figura 27), correspondente a 30% de de sal. Após total dissolução do agente precipitante, centrifugou-se a amostra por 15min a 17000g, separando pellet e sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com o mesmo tampão A. Foram coletadas amostras de ambas as frações.

Ao sobrenadante, ou seja, porção proteica ainda solúvel com 30% de sulfato de amônio, adicionou-se a quantidade relativa a 50% de SA (partindo de 30% na primeira coluna da tabe-

la abaixo adiciona-se o valor correspondente a 50%). Repetiu-se o procedimento descrito acima até concentrações de sulfato de amônio de 30%, 40%, 50%, 70% e 90%.

O melhor resultado foi obtido com 50% de sulfato de amônio, concentração na qual a maior parte da proteína encontra-se na fração solúvel da amostra.

Final Percent Saturation (S_2)

Initial Percent Saturation (S_1)	*10*	*15*	*20*	*25*	*30*	*33*	*35*	*40*	*45*	*50*	*55*	*60*	*65*	*67*	*70*	*75*	*80*	*85*	*90*	*95*	*100*
0	53	80	106	134	164	187	194	226	258	291	326	361	398	421	436	476	516	559	603	650	697
5	27	56	79	108	137	162	166	197	229	262	296	331	368	390	405	444	484	526	570	615	662
10		28	53	81	109	133	139	169	200	233	266	301	337	358	374	412	452	493	536	581	627
15			26	54	82	87	111	141	172	204	237	271	316	327	343	381	420	460	503	547	592
20				27	55	75	83	113	143	175	207	241	276	296	312	349	387	427	469	512	557
25					27	46	56	84	115	146	179	211	245	264	280	317	355	395	436	488	522
30							28	56	86	117	148	181	214	233	249	285	323	362	402	445	488
33								40	70	101	133	166	200	214	235	271	309	347	387	429	472
35								28	57	87	118	151	184	201	218	254	291	329	369	410	453
40									29	58	89	120	153	170	182	212	258	296	335	376	418
45										29	59	90	123	138	156	190	226	263	302	342	383
50											30	60	92	107	125	159	194	230	268	308	348
55												30	61	76	93	127	161	197	235	273	313
60													31	44	62	95	129	164	201	239	279
65															31	63	97	132	168	205	244
67																52	85	120	156	194	233
70																32	65	99	134	171	209
75																	32	66	101	137	174
80																		33	67	103	139
85																			34	68	105
90																				34	70
95																					35

Figura 27 - Tabela da massa (g) de saturação com Sulfato de Amônio relativo à 1L de solução (no caso extrato solúvel de proteína) a 4°C.

3.3.2 Cromatografia por afinidade

Em 1975 Porath e colaboradores [164] apresentaram uma técnica de separação e purificação de proteínas baseada na afinidade destas por metais de transição. Esta técnica foi denominada cromatografia de afinidade com metal imobilizado, do inglês, Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). O princípio fundamental do IMAC consiste na interação entre as proteínas em solução e os íons metálicos imobilizados num suporte sólido. Estes suportes contendo íons de Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} ou Co^{2+} são usados para o fracionamento de proteínas com base no seu conteúdo relativo de resíduos de histidina, cisteína, cadeias laterais aromáticas de aminoácidos e de grupos N-terminal acessíveis de aminoácidos [165]. Estes resíduos devem estar disponíveis à superfície das proteínas para que haja a formação de interações com os metais

de transição. Estes irão coordenar com o resíduo de histidina que se liga ao metal quelado com grande afinidade. Assim, ao passar o extrato solúvel de proteínas, somente a proteína alvo possui seis histidinas livres para interagir com o Ni^{2+} da resina e só ela irá se ligar no metal imobilizado. Para eluir a proteína da coluna utiliza-se um competidor do sítio de ligação com o metal, no caso o imidazol, que em alta concentração irá retirar dos sítios todas as proteínas neles ligadas.

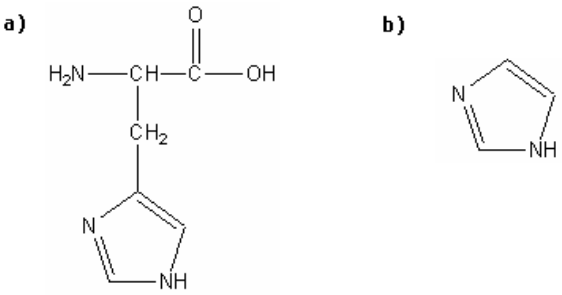


Figura 28 - *a)* aminoácido histidina; *b)* imidazol

A primeira tentativa de purificação foi com a proteína desnaturada com o tampão A adicionado de 8M de uréia, utilizando a mesma concentração de uréia em todos os tampões de eluição. Essa abordagem permitiu purificar uma grande quantidade de proteína para posterior produção de anticorpos.

Após a otimização dos testes de expressão, seguiu-se com a purificação equilibrando a 2mL de resina com 5 volumes de coluna (10mL) com o tampão de lise da proteína. Depois, passou-se o extrato bruto solúvel da expressão, que continha *PABP1*, lavou-se com 10mL de tampão A (tampão de lise mais 20mM de imidazol) para desligar as proteínas inespecíficas da resina e em seguida procedeu-se com a eluição com gradiente não-liner utilizando 50mM, 100mM e 250mM e 500mM de imidazol, sempre com 2 volumes de coluna de cada fração em cada passo.

3.4 Produção de anticorpos policlonais em camundongos

Para a produção de anticorpos policlonais, a proteína purificada foi concentrada para 2mg/mL e enviada ao grupo da Profa Dra.Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo do Departa-

mento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. Foram realizadas 3 inoculações com intervalos de 15 dias utilizando-se 100µg/mL de proteína em cada uma delas em camundongo Balb/C.

3.5 *Western Blotting*

Para a análise dos anticorpos policlonais produzidos a partir da proteína de interesse foi escolhida a técnica de *"Imunoblotting"* (frequentemente nomeada de *Western Blotting*). Esta é uma técnica utilizada para identificar antígenos específicos reconhecidos por anticorpos mono ou policlonais. Amostras de proteínas são solubilizadas, usualmente com SDS e reduzidas por agentes redutores como o Dithiothreitol (DTT) ou β-mercaptoetanol. O material é separado por SDS-PAGE e os antígenos são transferidos por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, sendo o processo monitorado pela coloração da membrana com solução Ponceau S.

As proteínas transferidas ficam ligadas à superfície da membrana, oferecendo acesso para a reação com reagentes imunodetectores. Os sítios de ligações, não específico, são bloqueados deixando a membrana imersa em uma solução diluída de uma proteína – tipicamente albumina de soro bovino (BSA) ou leite seco desnatado, com uma pequena quantidade de detergente como Tween 20. As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo da proteína de interesse (anticorpo primário), em seguida a membrana é lavada e o complexo antígeno-anticorpo reage com um anticorpo secundário, neste caso, anti-IgG de camundongo, que será identificado através da enzima peroxidase que reage com peróxido de hidrogênio emitindo luz ou cor [166].

3.5.1 Obtenção de extrato proteico

Centifigou-se 5 x 10^7 de cultura dos parasitas na fase logarítmica de crescimento, o sedimento foi ressuspenso em 150µl de tampão de amostra, ferveu-se por 10 minutos, e uma

aliquota de 15µl foi aplicada em gel SDS-page 10% para realização da técnica de *Imunoblotting.*

3.5.2 Imunoblotting

As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE) no equipamento "*Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*" (BioRad) por 1 hora a 40 mA em tampão de transferência (25 mM Tris base (USB); 192 mM glicina (Amresco); 20% metanol(Synth) gelado, montado como segue: 2 camadas de papel de filtro embebido em tampão, membrana embebida em tampão, gel e novamente 2 camadas de filtro. Após transferência, a membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado *overnight*.

Em seguida a membrana foi lavada 3X com PBS/Tween-20 (0,1% Tween-20; PBS [1X] q.s.p.) e incubada à 4ºC durante 18 h sob leve agitação com anticorpo primário anti-Tbpabp1 (anti-PABP1 produzido em camundongo) em uma diluição seriada de 1:100, 1:200, 1:500, 1:800, 1:1000 e 1:5000 em solução de leite 2% . A membrana foi novamente lavada 3X com PBS/Tween-20 e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (KPL), por 1 hora a 4°C sob leve agitação. A membrana foi lavada 2X com PBS/ Tween-20 e 1X com Tris 0,05M, pH 7,6. A revelação da reação foi realizada primeiramente com *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit* (BioRad) para a proteína recombinante e depois com o reagente ECL *("ECL™ Western Blotting Analysis System"*, Amersham Biosciences) em sala escura para os extratos celulares de *T. brucei* que exigiam maior sensibilidade na detecção. Foi possível observar bandas após a exposição por 3min em filme "*Hyperfilm™ MP*", Amersham Biosciences.

3.6 Imunolocalização

De posse do anticorpo anti-Tbpabp1 testado por *Western blotting*, utilizou-se o mesmo para a realização de experimentos de imunofluorescência. A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando

corantes fluorescentes, que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda λ.

Quando o corante está ligado ou conjugado com um anticorpo, os locais de reação entre o antígeno e o anticorpo conjugado podem facilmente ser visualizados. O fluorocromo mais utilizado nessa técnica é a fluoresceína isocianetada (FITC). Os fluoróforos, depois de exicitados por um comprimento de onda específico (espectro de absorção), emitem fluorescência (fótons de luz) a um comprimento de onda superior (espectro de emissão). Por exemplo, o FITC tem um λ máximo de excitação de 496 nm (azul) e uma emissão de fluorescência máxima a 520 (o chamado verde fluorescente). O uso combinado de filtros que barram a luz para os comprimentos de onda previamente determinados permite visualizar estas moléculas. Virtualmente, alguns antígenos podem ser detectados pela imunofluorescência. A combinação de sensibilidade, especificidade e simplicidade torna este método muito útil. Em muitos laboratórios de histopatologia, biópsias de rim e de pele são examinadas com técnicas de imunofluorescência para diferenciação de tumores com técnicas imunoenzimáticas para observação em microscopia de luz [167].

3.6.1 Imunofluorescência

Aproximadamente $5x10^6$ células de *Trypanosoma brucei* (linhagem 427) foram centrifugadas por 2min a 2000g, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas com 1mL de tampão PBS 1x e novamente centrifugadas por 2min a 2000g. As células foram ressuspensas em 1mL do mesmo tampão e 50µL da suspensão de parasitas foi colocada em 1 poço de uma lâmina (foram utilizadas lâminas com 8 poços). Incubou-se por 3 minutos para que as células aderissem à lâmina. Posteriormente a solução foi retirada e 50µL de formoldeído 4% foi adicionado ao poço e a mistura incubada por 20 minutos para fixação dos parasitas. A solução de fixação foi retirada e o poço foi lavado 3x com PBS. Adicionou-se uma solução de Triton x100 0,1% em PBS 1x para a permeabilização das células para permitir a entrada dos anticorpos. A lâmina foi incubada por 4 minutos e rapidamente lavada com PBS 1x (por 3 vezes). Uma solução com o anticorpo primário (anti-Tbpabp1) em uma concentração de 1:250 diluído em PBS 1x foi adicionada e a reação foi incubada por 1 hora protegida da luz. Em seguida, a lâmina foi novamente lavada 3 vezes com PBS e uma solução do marcador de DNA, DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) na diluição de 1:400, bem como o 1:400 do anticorpo

secundário anti-IgG de camundongo com fluorescência conjugada Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) foram adicionados no poço e incubados por 40min. Lavou-se novamente para retirar os anticorpos e adicionou-se 7µL de "*Vectashield Mounting Medium"* para proteger as células do ressecamento e manter a fluorescência. A lâmina foi fechada com lamínula e vedada com esmalte.

A morfologia das células, as marcações de núcleo e cinetoplasto e a proteína de interesse PABP1 foram observados usando um microscópio de fluorescência Nikon ACLIPSE E600 (Nikon) em contraste de fase e em filtro ultravioleta.

3.6.2 Ensaio de marcação dupla

Para confirmar a sublocalização celular da proteína TbPABP1, realizou-se uma imunofluorescência com marcação dupla na lâmina. Para tanto os parasitas foram então incubados com os seguintes anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 3% por 1 h a temperatura ambiente: anti-TbPABP1 produzido em camundongos e anti-BIP (cedidos pelo Dr. James D. Bangs, da University of Winsconsin-Madison Medical School, USA, ao Prof. Dr. Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo) produzido em coelhos. Essa proteína está localizada no citoplasma celular, mais especificamente no retículo endoplasmático assim, a marcação dupla nos permite observar uma colocalização das duas proteínas em uma região celular conhecida. Esse ensaio foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Sérgio Schenkman, UNIFESP com o auxilio da aluna de doutorado Fernanda Cristina Costa e da Dra. Teresa de Jesus.

A metodologia empregada foi a mesma descrita na seção 3.6.1 incubando-se os anticorpos anti-PABP1 (1:200) e anti-BIP (1:5000) por 1h, lavou-se 3x com PBS 1x e em seguida incubou-se com o anticorpo secundário o Alexa-Fluor 488 (verde) conjugado com IgG de camundongo e Alexa-Fluor 594 (vermelho) conjugado com IgG de coelho, para obtermos uma marcação de cada cor. A visualização das lâminas foi realizada da mesma maneira descria acima.

3.6.3 Tratamento com Actinomicina D

Experimentos de imunofluorescencia utilizando parasitas tratados com actinomicina D foram planejados para verificar possível transito núcleo-citoplasma de PABP1 de *T.brucei*. Para tanto, culturas de *T.brucei* em fase logarítmica de crescimento foram tratadas com 10, 20 e 50µg/mL de actinomicina D (Sigma) por 24h. Em seguida incubou-se o anticorpo anti-PABP1 na cepa 2913 tratada (+actD) e não tratada (-actD). Como controle da especificidade do anticorpo, tratou-se uma cultura transfectada com Tbpabp1/PTP-tag (procedimentos de obtenção descritos a seguir) com a droga e realizou-se o ensaio de imunofluorescência com o anticorpo comercial anti-ProtA (Sigma), que reconhece epítopo de proteína A presente na *tag* utilizada. A montagem das lâminas foi realizada como descrito anteriormente [161].

3.7 RNA de interferência

Interferência do RNA ou RNAi é um processo de "silenciamento" gênico pós-transcricional (PTGS) iniciado pela presença de um RNA dupla fita (dsRNA) cuja sequência é específica ao RNA mensageiro alvo que será degradado [168]. Uma endoribonuclease chamada DICER [169], similar a RNase III, reconhece o dsRNA e efetua a clivagem desta longa fita em pequenos fragmentos de RNA conhecidos como siRNAs (*small interfering RNAs*) [170]. Cada siRNA, por sua vez, é englobado por um complexo de proteínas conhecido como RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)

O próximo passo é a remoção da fita senso (idêntica ao RNA mensageiro alvo) do siR-NA, deixando a fita anti-senso pronta para identificar sua complementar, ou seja, o mRNA alvo e degradá-lo, suprimindo assim sua expressão.

O mecanismo de PTGS foi descoberto ao acaso em um estudo em que buscava intensificar a cor púrpura de pétalas em Petúnias [171]. No entanto, RNAi foi primeiramente apresentado em 1998 [172], pela descrição dos efeitos inesperados da injeção de moléculas de RNA dupla fita no nematódeo *Caenorhabditis elegans* como a indução do silenciamento gênico. Desde então, o termo RNAi vem sendo utilizado para indicar interferência genética por dsRNA. Duas vantagens principais do mecanismo de RNAi versus *knockout* e RNA anti-senso podem ser ressaltadas: *i)* RNAi não interfere no DNA, como ocorre em *knockout*, uma vez que RNAi

atua numa etapa pós-transcrição; *ii)* siRNAs apresentam maior facilidade para atingir o alvo, devido sua maior estabilidade, quando comparados com RNAs anti-senso que são fita simples, e portanto, facilmente degradados dentro da célula. A Figura 29 abaixo representa o mecanismo do RNAi.

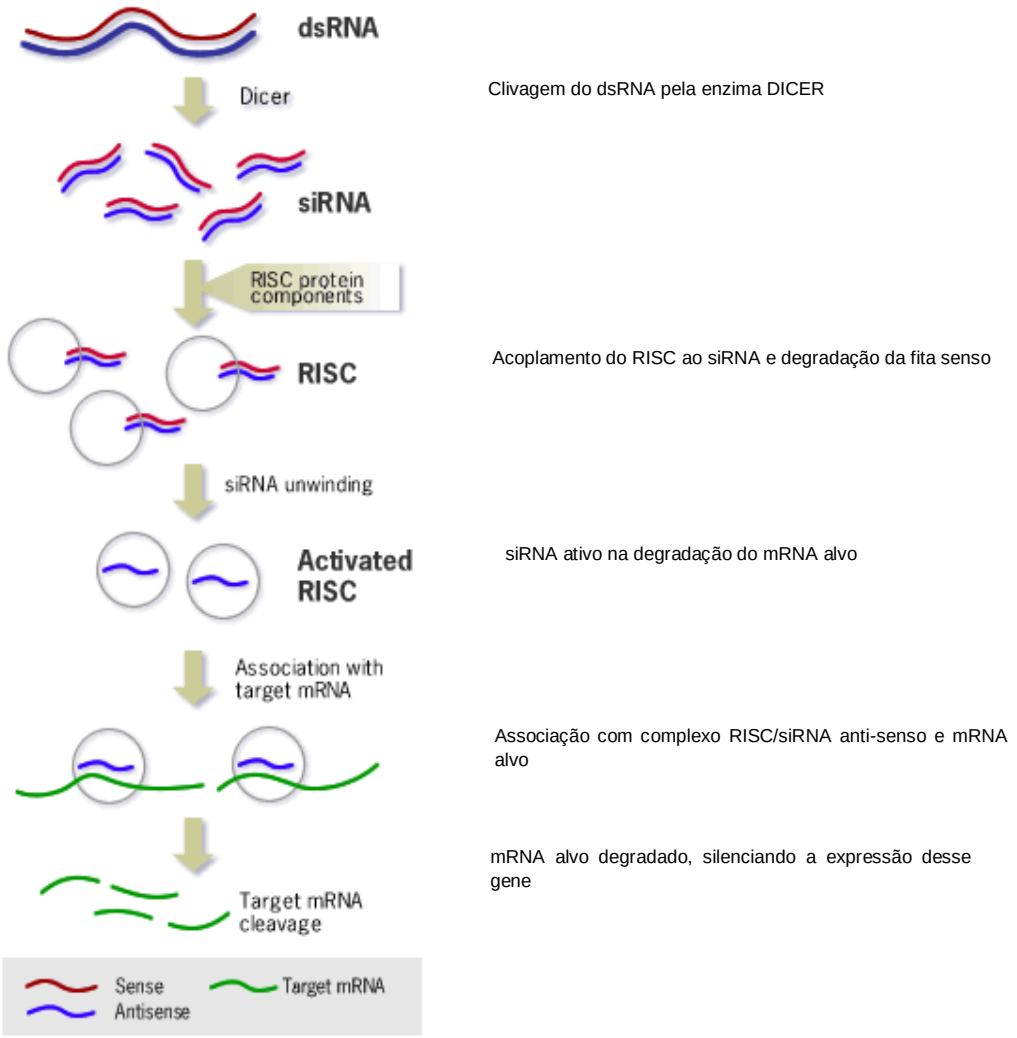


Figura 29 - Esquema da maquinaria de RNA de interferência [3]

3.7.1 Cultivo de *Trypanosoma brucei* forma procíclica linhagem 29-13

Em células 29-13, a T7 RNA polimerase e a proteína repressora de tetraciclina (TetR) são constitutivamente sintetizadas em um nível basal, que não é prejudicial às células, porém a quantidade de TetR produzida é suficiente para atuar na região operadora de tetraciclina

(Otet). Assim, células de *T. brucei* 29-13 podem ser transfectadas com plasmídeo contendo a sequência do gene de interesse sob regulação do promotor T7 e Otet, e a expressão da mesma pode ser modulada pela adição de tetraciclina no meio de cultura.

A linhagem celular *T. brucei* 29-13, portadora de um sistema de promotor tetraciclina/T7 (essencial nos experimentos de RNAi) foi cultivada em meio Cunninghams [173] suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino inativado (Gibco), 50µg/mL de higromicina e 15µg/mL de G418 em estufa a 28ºC, realizando-se repiques a cada 4 dias.

3.7.2 Clonagem do fragmento de Tb*pabp1* no vetor p2T7

Em experimentos de RNAi, pode se utilizar apenas um fragmento do gene para produzir um dsRNA capaz de iniciar a maquinaria de interferência, sendo necessario a presença de promotores de T7 RNA polimerase flanqueando o inserto em questão. Assim, um fragmento de 718pb com início na posição 911 do gene (representado na figura 17), foi amplificado sob as condições descritas no item 3.1.3 a partir da sequência genômica depositada no TriTrypDB (Tb09.211.0930 - *Polyadenylate-binding protein* 1), utilizando iniciadores contendo sítios de restrição para as enzimas *Hind*III e *Xho*I (New England Biolabs®) na extremidade 5', visando posterior clonagem. A sequência dos oligonucleotídeos está representada Tabela 6.

1

ATGACAATCGCTGCACAGGGGGTTCCCTCCGGTCCCTCCGCCACGAAGCCGCTACAAGTGGCTTCA
TTGTACGTTGGCGACCTCGATCCTGCTATTAATGAGCCACAGTTGGTGGACATCTTTAAACCGTAT
GGAACTATTCTCAACGTCCGCGTCTGCCGTGACATCATCACGCAGCGCTCATTGGGATACGGTTAT
GTGAACTATGACGATGTGAATAGCGCGTCGAAAGCCATGGAGGAACTCAATTTCAAGCGAGTGGGT
GAAAAGTGTATCCGAATCATGTGGCAGCAGCGTGACCCAGCACTGCGGTACAGCGGAAGTGGTAAT
ATATTCGTCAAAAACCTTAAGGAGGAGGTAGACAGTCGGGAATTGAGTTTGATATTCAAGAAGTTT
GGTGAGATCCTTTCCTGCAAGGTGATGGACGATGAGAGCGGGAAAAGTCGCGGTTACGGCTTTGTC
CACTTCAAGGACGACGATGCAGCCAAAGCCGCCATCGAGAAAATGAACGGTGACGAACACGCCGAT
GCGGATAAGGCAGCACTGTATGTTGCCAATTTCATTCGTCGTAATGCCCGTCTTGCCGCACTTGTG
GCGAACTTCACGAACGTGTACATAAAGCAGCTCCTTCCCACAGTTGATAAAGACGTTATCGAAAAA
TTCTTTTCGAAGTTTGGCGGCATCACGAGCGCAGCGATATGCAAAGACAAGAACGGTCGTGCATTC
GCCTTCTGTAACTTTGAAAAACACGATGACGCAGTTAAAGCCATTGAGGCGTCACATGATCAAGAG
GTGGAAGGTGTTACGCAGCCTGGGGAGAAGTTGTACGTGCAGCGAGCTCAACCGAGAAGTGAGCGG
CTTATTGCACTCCGCCAAAAATACATGCAGTGCCAGTCACTTGGAAACAACTTATACGTCCGTAAC
TTTGACGCTGAGTTCACGGAAAAAGACCTCAATGAACTGTTCAAAGAGTACGGTGTTATTCGCAGC
TGCCGTGTGATGACCGATGCCAATGGCATAAGTCGCGGTTTCGGCTTTGTAAGTTTCGAAAATGCG
GATCAGGCAAACGCCGCACTCCGTGAAATGAATGGTCGTATGCTGAACGGGAAACCTCTCGTTGTC
AACATTGCGCAGCGCCGTGACCAGCGCCTCACCATGCTGAAGTTACAGCTCCAGCAACGCCTGCAA
ATGATGATGCACCATATGCATCCTCCTCCGTTCGGTATGCCGGGGCATCCACTGCAGAGACGCAAT
GCCCGCAGTGGCGGCCGGGGCAACCGTCCGCACCCACGTCAACAACAGCCACAACCTCAACCTGAG
CCGCAACCACCACTCGCCACTACGGTGCCACCAGCAGCGGCTCACAGCGTTATGTTTACCGCACCC
TCAATGGGTTTCTCCGCCGTACCCCGTACTCCTCAGGCATCACCTGCCATCGCTCCCGATACACCA
CCGCTGCCGCCCATCTCAGCTGAAGATCTGCAACAAATGTCGGTGGACGAACAACGCGCCGCTCTG
GGTGACAGGCTCTACATTAAGGTGCATGAGCTTGCTCCGGATCACGCACCGAAAATTACTGGCATG
TTCCTTGAGATGAACCCTAAGGAGGCGTTAGCCCTCCTTTCCAACCCTAAACTAATGCACGAGAAG
GTTACAGAAGCCCTCTGTGTGCTAAAGGTACACGCCTCAAGCGCTTAA

1629

Figura 30 - Sequência do gene Tb*pabp1*. Sublinhado está representado o fragmento selecionado para a realização do experimento de RNAi.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para a clonagem do fragmento do gene Tb*pabp1*.

Nome do oligo	Sequência	Enzima
Tb*pabp*911 For	5' – CGC CTC GAG ACT TAT ACG TCC GTA ACT TTG - 3'	*XhoI*
Tb*pabp*1629 Rev	5' – GCC AAG CTT CTA CTC GTG CAT TAG TTT AGG GTT G - 3'	*HindIII*

O vetor responsável pela produção do dsRNA utilizado na técnica de RNAi em *T brucei*, permite a transcrição e formação de uma estrutura tipo grampo de cabelo (*hairpin*) do inserto de interesse [168]. O vetor se integra nas regiões espaçadoras de rDNA (DNA ribossômico), pois possui um promotor forte induzido por Tetraciclina (Tet) (Figura 31). A integração do vetor numa região não transcrita do genoma de *T. brucei* resulta no estabelecimento de uma linhagem celular estável e a indução por tetraciclina, sendo observada a produção de dupla fita de RNA (dsRNA) com concomitante degradação do RNA mensageiro alvo.

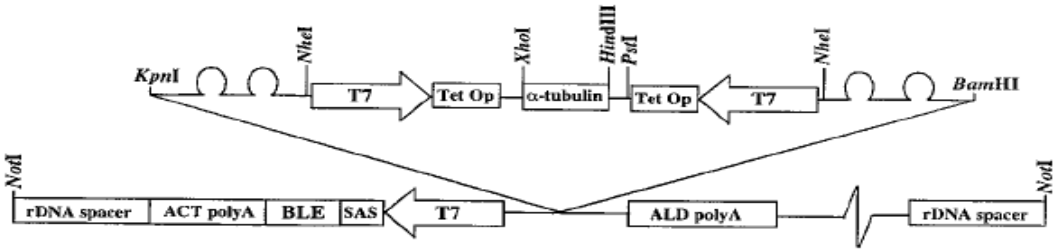


Figura 31 - Ilustração esquemática de um vetor para RNAi em *T. brucei*; vetor *stem-loop*. Este tipo de vetor possibilita a produção de uma dupla fita de RNA (dsRNA) através da formação de uma alça.

O vetor utilizado foi o *p2T7* (Figura 32) gentilmente cedido pelo laboratório do Prof Dr Sérgio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo. Este vetor tem a expressão da T7 RNA polimerase induzida, o que resolve o problema do transcrição do inserto sem a indução com tetraciclina (vazamento do vetor), além disso, podemos clonar diretamente o produto amplificado do fragmento do gene de interesse no vetor, pois o gene LacZ de preenchimento possui um sítio da enzima de restrição *Eam*1105I (Fermentas), que forma produtos de digestão contento nucleotídeos T protuberante. Desta forma, é possível clonar o produto de interesse, amplificando com alguma Taq DNA polimerase, que gera A nas extremidades 3', procedendo com a ligação diretamente.

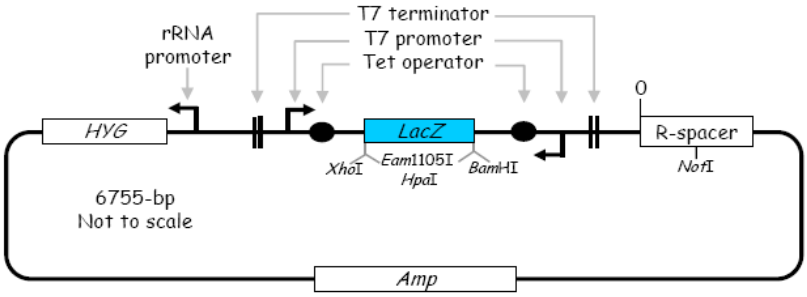


Figura 32 - Vetor p2T7

O fragmento amplificado, chamado de Tb*pabp1b*, foi previamente adenilado como descrito no item 3.3.1, Tabela 4, para posterior ligação no vetor p2T7. O vetor foi linearizado com a enzima *Eam*1105I seguindo com a reação de ligação descrita no item 3.3.1,Tabela 5. O produto ligado foi diretamente transformado em DH5α pelo método descrito no item 3.2.2 usando contendo 100µg/mL de ampicilina. Utilizou-se cinco colônias crescidas para extração do DNA realizada com o KIT *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* para avaliação de clones positivos.

A avaliação dos clones positivos foi realizada pela clivagem do fragmento Tb*pabp1b* utilizando-se os sítios de restrição para as enzimas *Xho*I e *Hind*III, utilizadas na clonagem do inserto. Como ambas possuem o mesmo tampão para atividade ótima, adicionou-se 5µL do DNA extraído das colônias, 0,5µL de cada enzima (*Xho*I e *Hind*III), 1µL de BSA e 2µL de NEB *buffer* 2 em um volume final de 10µL. A reação foi incubada por 2h a 37°C, e todo o volume foi aplicado em gel de agarose 1% para análise. Realizou-se também sequenciamento do plasmídeo recombinante utilizando-se os primers do próprio vetor, localizados anteriormente ao local da inserção do fragmento. Os oligos estão representados abaixo na

Tabela 7.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos do vetor p2T7

Nome do oligo	Sequência
p2T7For	5’ – CGC TCT AGA ACT AGT GGA - 3’
p2T7Rev	5’ –CAG TGA TAG AGA TCT CCC C- 3’

3.7.3 Transfecção e seleção do clone Tb*pabp1b*

Para prosseguir com a transfecção do vetor recombinante nas células de *T.brucei* foi necessário linearizá-lo com a enzima de restrição *Not* I. Para garantir sucesso na transfecção, utilizou-se de 10 a 20µg de DNA linearizado em no máximo 20µL de volume. Para tanto, partiu-se de uma concentração de 30µg de DNA para que, mesmo com as perdas no processo de precipitação pós clivagem, a concentração final de DNA esteja dentro da desejada.

Assim, utilizou-se o sistema *PureYield*™ *Plasmid* Maxiprep *System* (PROMEGA) para se obter essa quantidade de DNA plasmidial seguindo com a reação de linearização descita na Tabela 8.

Tabela 8 - Reação de linearização do vetor recombinante p2T7/Tb*pabp1b*

Reação de linearização	Volume (µL)
Tampão da NEB buffer 3 (10x)	5
BSA	2
DNA p2T7/Tb*pabp1b*	8
Not I	5

Incubou-se a reação por 4h a 37°C e em seguida realizou-se uma extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, o DNA plasmidial foi concentrado como descrito na seção 3.1.2 acima. Ao final do processo o DNA foi reidratado com água deionizada estéril e quantificado utilizando-se o NanoDrop *2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) estabelecendo-se o valor de 10-20µg de DNA. Para acompanhamento do sucesso da transfecção utilizou-se uma cultura transfectada com o DNA plasmidial de interesse e outra apenas com água (controle negativa) e para cada transfecção utilizou-se um total de $2,5x10^7$ células.

Na preparação das células de *T. brucei* contou-se o número de células por mL de cultura utilizando-se uma câmara de Neubauer seguido por centrifugação por 10min a 2200g de uma alíquota de cultura contendo as $2,5x10^7$ necessárias para o experimento, O sobrenadante foi retirado, filtrado e reservado em geladeira (meio condicionado). Lavou-se as células com 7mL de tampão *Cytomix* (120mM KCl, 0,15mM $CaCl_2$, 10mM K_2HPO_4, 25mM HEPES, 2mM EDTA, 5mM $MgCl_2$), centrifugou-se novamente por 10min/2200g, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular com 400µL de *Cytomix*. Delicadamente então, o conteúdo foi depositado em uma cubeta de eletroporação.

Utilizou-se uma cubeta para cada transfecção (controle e Tb*pabp1b*) e utilizou-se 2 pulsos na configuração 1,6KV e 25µF com duração de aproximadamente 0,6mseg, intercalados porcom 1min em gelo para cada cubeta. Transferiu-se rapidamente todo o conteúdo eletroporado para um garrafa ("garrafa mãe") contendo meio SDM-79 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 15µg/mL de G418 e 50µg/mL de hygromicina e 2,5µg/mL de fleomicina (antibiótico de seleção).

Em uma placa de 24 poços, adicionou-se 1mL do meio da "garrafa mãe", e nos demais poços, 0,5mL do meio condicionado armazenado. Transferiu-se 0,5mL do primeiro poço da coluna para o segundo (poço logo abaixo), homogeneizando seu conteúdo delicadamente; procedeu-se da mesma maneira do segundo para o terceiro, realizando uma diluição seriada da cultura transfectada de ordem dois, buscando se isolar clones recombinantes.

Vedou-se a placa com plástico aderente e incubou-se em estufa a 24°C em câmara úmida, para evitar que os poços sequem. Acompanhou-se as placas diariamente para observar a morte das células não transfectadas e crescimento dos clones resistentes a fleomicina. Os poços que apresentaram bom crescimento celular foram repicados em uma nova garrafa contendo 10mL de meio seletivo para posterior congelamento de alíquotas dos clones e preparação para realização das curvas de crescimento.

3.7.4 Indução do silenciamento pela construção p2T7/Tb*pabp1b*

Monitorou-se o crescimento diário de alguns clones com o intuito de se obter células saudáveis e na fase de crescimento logarítmico. Uma vez atingida esta fase (~ $5x10^6$ células/ml), uma das garrafas foi identificada como **+ Tet**, na qual foi adicionada tetraciclina em uma concentração final de 1µg/ml, indutor do processo de RNAi, durante todo o experimento. A outra garrafa foi identificada como **-Tet**, isto é, não induzida e utilizada como controle negativo.

Após indução de RNAi, células viáveis de ambas culturas (+Tet e -Tet) foram contadas diariamente com uma Câmara de Neubauer (durante período de 10 dias) para monitoramento e comparação do crescimento. Durante esse período tanto a cultura **+Tet** como a **-Tet** foram diluídas ao atingir uma alta densidade celular, no caso aproximadamente $2x10^7$ células/mL. Mesmo não tendo atingida a densidade limite a cultura **+Tet** também foi diluída, garantindo o mesmo tratamento para todas as culturas.

3.7.5 Curva de Crescimento celular

Com o clone estável estabelecido, procedeu-se com o acompanhamento diário do crescimento da cultura. A contagem do número de células foi feito sempre no mesmo período do dia, retirando-se 10µL da cultura e diluindo 10x em meio novo. Dessa mistura, retirou-se 10µL para contagem na câmara de Neubauer. Cada quadrante representa 1 x 10^4 células /mL de cultura e a contagem foi realizada sempre em triplicata. Todos os clones e a cultura selvagem (Tb2913) tiveram suas curvas estabelecidas antes de iniciar o experimento de silenciamento para ser avaliado o vazamento do vetor, ou seja, se o dsRNA de interesse estava sendo expresso mesmo sem a indução por tetraciclina e quanto desse vazamento comprometeria o experimento.

3.7.6 Análise do efeito do silenciamento: morfologia celular

Para a análise da morfologia celular do clone Tb*pabp1b*/p2T7, as culturas **–Tet** e **+Tet** foram examinadas em diferentes intervalos de tempo após a indução por microscopia de contraste de fase e por fluorescência utilizando células fixadas e coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Este corante permite a observação do DNA mitocondrial (kinetoplasto) e nuclear uma vez que forma um complexo fluorescente com DNA (Figura 33).

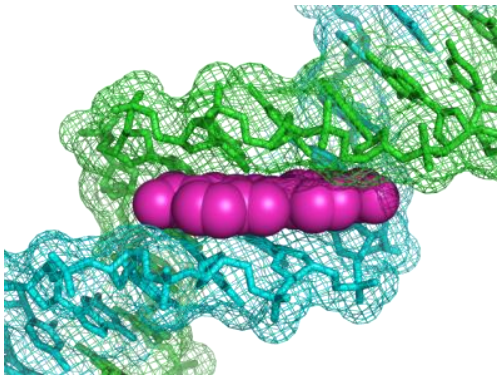


Figura 33 - Representação estrutural da ligação entre o DAPI e a molécula de DNA. Quando ligado a fita dupla do DNA a molécula absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta (358nm) e emite em 461 nm, detectado com filtro azul [10].

3.7.7 Análise do efeito do silenciamento : RT-PCR

Extração do RNA total

Para avaliar o silenciamento efetivo do gene Tb*pabp1* analizou-se o mRNA correspondente por RT-PCR, para tanto, fez-se a contagem de células para análise mais precisa, sempre utilizando o mesmo número de células em todas as extrações de RNA total ($1x10^8$cel/mL).

Após contagem, o volume de cultura selecionado foi centrifugado por 15min a 2200g, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de Trizol, homogeneizando o sedimento para permitir a lise das células. Transferiu-se para um novo tubo e acrescentou-se 200µL de clorofórmio, agitou-se no vórtex por 15 seg e centrifugou-se por 15min a 20000g a 4˚C . A fração superiorfoi transferida para um novo tubo RNAse-free, adicionou-se 500 µL de isopropanol) e incubou-se a -80˚C por 1h ou a -20˚C por 16 horas. Na manhã seguinte, centrifugou-se por 30min a 20000g a 4˚C e em seguida lavou-se com álcool 70%,centrifugando-se por 7min a 20000g a 4˚C. Retirou-se o excesso de álcool com auxílio de uma pipeta e o tubo foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos. O RNA foi reidratado com 30µL de H_2O deionizada RNAse-free, quantificado em *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e armazenado a -80˚C para evitar degradação do RNA.

Síntese do cDNA

Para iniciarmos a reação com a enzima transcriptase reversa a amostra não pode conter DNA, pois comprometeria a análise qualitativa do resultado do experimento. Assim, o RNA total extraído foi tratado com DNAse, cuja reação está representada na Tabela 9.

Tabela 9 - Reação com DNAse

Reação DNAse	Volume (µL)
Todo volume RNA total	30
DNAse	3
DNAse buffer 10x	5
H_2O RNAse-Free	12

Incubou-se a reação a 37°C por 1h e depois por 15min a 75°C para inativação da enzima. Mediu-se novamente a concentração do RNA e diluiu-se todas as amostras (selvagem, +Tet 24h, 48h e 72h, -Tet) para a mesma concentração de RNA, (8µg). Em seguida, para assegurar que o RNA da amostra está livre de conformações ou estrutura secundária, procedeu-se com a reação descrita na Tabela 10 sob a temperatura de 65°C por 5min seguido de incubação no gelo por 1min.

Tabela 10 - Reação para desestruturação de dobramentos do RNA

Reação Pré RT-PCR	Volume (µL)
8µg RNA	x
Oligo(dT) ou randômico	1
dNTP mix	1
q.s.p 20µL H_2O RNAse-Free	

Para a avaliação da redução da molécula PABP1/mRNA na célula silenciada, utilizou-se o primer Oligo(dT) (Promega). Esse iniciador se liga à cauda poli-A das moléculas de mRNA deixando uma extremidade 3'-OH livre que pode ser extendida pela enzima transcriotase reversa, sintetizando assim cDNA *in vitro* [174]. Esse oligonucleotídeo foi utilizado apenas nos experimentos de avaliação do silenciamento do gene PABP1, pois sintetiza apenas cDNA de moléculas já processadas. Para os experimentos de avaliação de *splicing*, utilizou-se o *random primer*.

O oligonucleotídeo randômico (*random primer*) foi descrito em 1983 [175] e é uma ferramenta fundamental na biologia molecular, pois permite construir uma fita complementar de DNA de sequência desconhecida ou quando se deseja sintetizar cópias de cada seção de DNA proveniente uma mistura complexa. Esses oligonucleotídeos são segmentos de DNA fita simples com apenas seis nucleotídeos (conhecido como hexâmero) e possuem todas as combinações possíveis de bases, ou seja, como todo hexâmetro está representado, qualquer seção de DNA será complementada por esse primers e que consequentemente será amplificado. Assim ele foi usado com o intuito de amplificar os mRNAs ainda não processados, para testá-los posteriormente com iniciadores específicos para genes processados ou não. A Figura 34 abaixo representa o funcionamento do *random primer*.

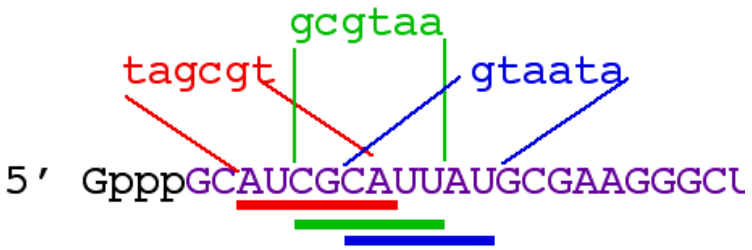


Figura 34 - Três exemplos de hexâmetros da amostra dentre todos os possíveis. Eles se ligam a regiões sobrepostas do mRNA para iniciar a síntese do cDNA.

Adicionou-se 4µL de tampão *First Strand buffer* [5x], 1µL de DTT 0,1M e 1µL de transcriptase reversa superscript II (200u/µL, Invitrogen). Misturou-se delicadamente com a pipeta deixando descansar por 5min a 25°C e incubou-se a reação a 50°C por 1 hora e 70°C por 5min para inativação da transcriptase reversa. Obtendo-se o cDNA que foi empregado nas etapas seguintes.

Amplificação do cDNA

A partir do cDNA sintetizado, realizou-se a reação de PCR semiquantitativa (25 ciclos) com os oligos descritos na Tabela 6. Para verificar a ausência do transcrito específco de PABP1, utilizou-se oligo que amplificam um fragmento de 718pb da PABP1 e como controle de todas as reações utilizou-se o transcrito de 7 SL RNA, utilizando os inciadores 7SL1 e 7SL2 [93] apresentados na Tabela 11. A molécula de 7SL RNA se mostrou um controle adequado, pois não sofre processamento por *splicing*, e já havia sido utilizado em experimentos dessa natureza [93]. Além disso, utilizou-se oligos específicos da homóloga TbPABP2 (*Tbpabp2 RT For* - CCAGAACCCTGCCGATGCTGAGA e *Tbpabp2 RT Rev* - TGGCACAGTCGTCAATGGAAACCC) para verificar a especificidade do silenciamento.

3.7.8 Avaliação do conteúdo de mRNA na cepa deficiente em *Tbpabp1*

Valendo-se da cepa *ΔTbpabp1*, avaliou-se o efeito do silenciamento do gene Tbpabp1 nos processos de *cis* e *trans-splicing*. Diferentes condições foram empregadas para análise funcional das alterações nas reações de *cis* e *trans-splicing* ao longo dos tempos de indução

com tetraciclina. Para avaliação da reação de *cis splicing* foram utilizados os iniciadores CS1 e CS2, e para o *trans-splicing* foram empregados os iniciadores TS1 e TS2 para formas não processadas, e TS3 e TS4 (todos representados na Tabela 11) para formas processadas do gene de α-tubulina, utilizando cDNA obtido com *Random Hexamer Primer*.

Tabela 11 - Iniciadores utilizadas nas reações de RT-PCR

Nome do iniciador	Sequência
7SL1	5' – TTG CTC TGT AAC CTT C – 3'
7SL2	5' – TCT ACA GTG GCG ACC TCA AC – 3'
CS1	5' - GTG CAG CGG CAC TCC CAA AAC – 3'
CS2	5' - CGT TAA AAC AGA TGG ACA AAT C – 3'
TS1	5' - GTA AGT GGT GGT GGC GTA AG – 3'
TS2	5' – GGC TAT CTG CAT CCA CAT TG – 3'
TS3	5' – GCC TAC CAC GAG CAA CTC TC – 3'
TS4	5' GTA CTA TAT TGA TGC GTG ACG C – 3'

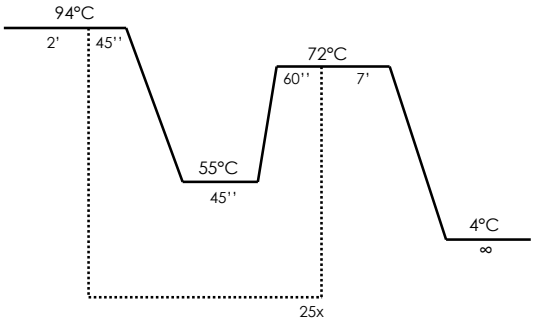


Figura 35 - Condições de amplificação por PCR

O diagrama a seguir demonstra esquematicamente os locais de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e *trans-splcing* (Figura 36).

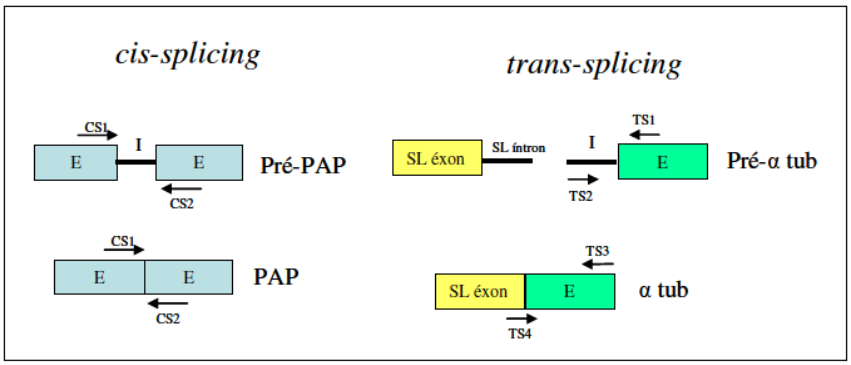


Figura 36 - Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e *trans-splicing*. CS1 e CS2 ligam-se ao éxon do transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pré-PAP) e processado (PAP); TS1 e TS2 anelam-se no exón e íntron, ainda não processados do transcrito de α-tubulina (Pré- α-tub). Para avaliação do processamento do de α-tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α-tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α-tubulina (α-tub). E,éxon; I, íntron.

3.8 Separação de células ativadas por fluorescência (FACS)

A técnica de FACS é utilizada para separar eficientemente uma mistura heterogênea de células baseado em suas características de diâmetro, espalhamento de luz ou de maneira mais sofisticada utilizando marcador celular fluorescente específico [176]. As células marcadas são separadas das não marcadas por um separador eletrônico de células ativado por fluorescência, um citômetro de fluxo, no qual as células individuais deslocam-se em fileira única com fluxo preciso e atravessam um feixe de laser; a fluorescência de cada célula é medida de forma exata [8]. A Figura 37 abaixo demostra brevemente o principio da técnica em questão.

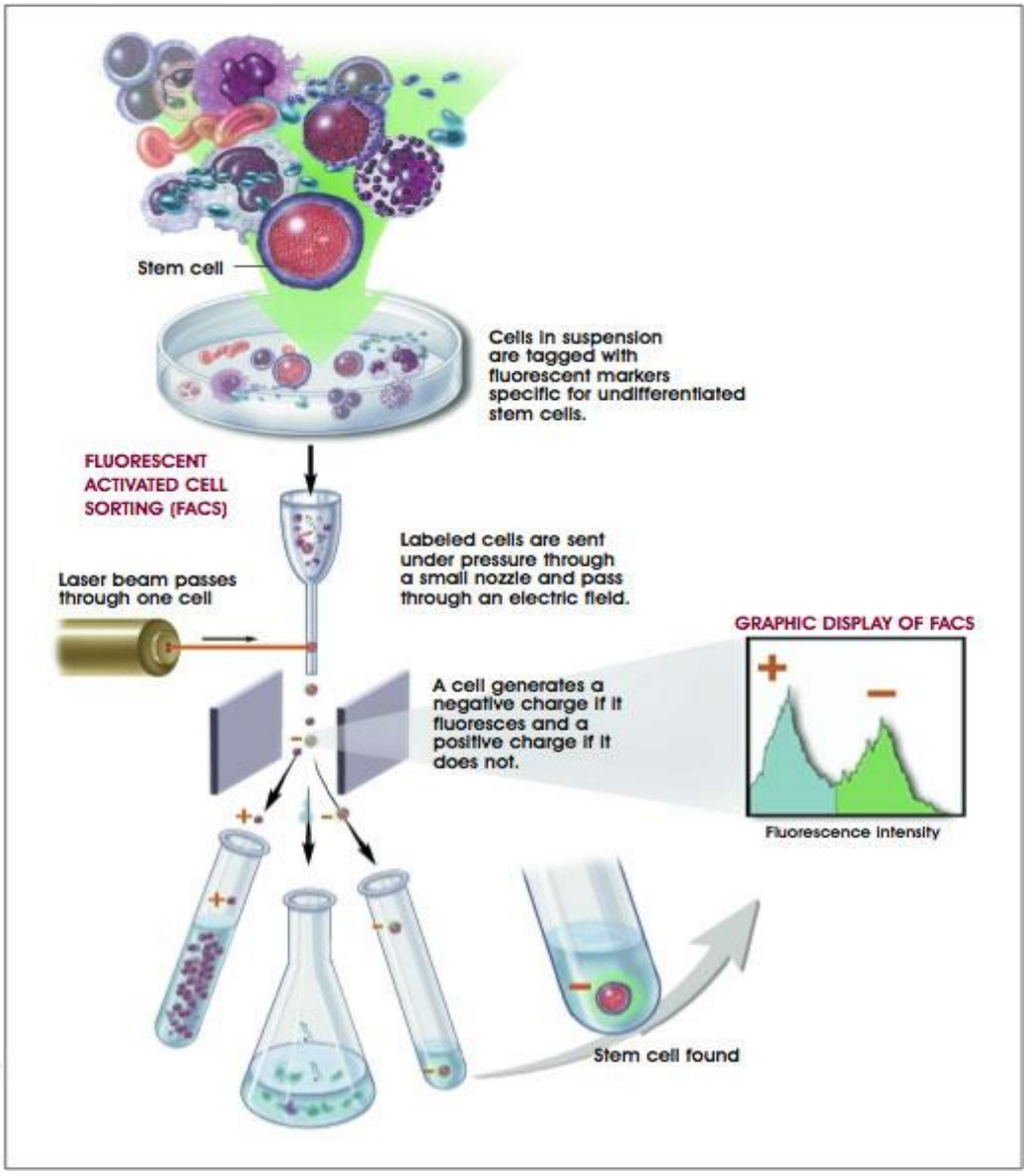


Figura 37 - A célula passa pelo feixe de laser e é monitorada pela fluorescência emitida. As gotículas contendo células únicas são carregadas negativa ou positivamente, dependendo da fluorescência acoplada a ela. As gotículas são então defletidas por um campo elétrico para tubos coletores de acordo com a carga inerente a elas. A concentração precisa ser ajustada de maneira que a maioria das gotículas não contenha células e seja descartada em um recipiente de resíduos, juntamente com qualquer conglomerado celular [8]

A análise do efeito do silenciamento do gene PABP1 sobre o ciclo celular foi avaliada com a técnica de FACS. Utilizando-se células com seu DNA marcado com iodeto de propídeo foi possível separa-las por sua fase do ciclo celular, pois as diferentes fases apresentam diferentes quantidades de material genético, estimando o numero de células em cada uma. Portanto, comparando-se os padrões e porcentagens de células observados nas culturas transfectadas

com Tbpabp1*b* (–Tet e +Tet) foi possível verificar se havia alguma diferença entre as culturas.

Para as análises de ciclo celular no citômetro de fluxo, as amostras foram preparadas como previamente descrito [177]. Aproximadamente 1 x 10^6 formas procíclicas de *T.brucei* foram centrifugadas a 1500g por 10 min, lavadas uma vez em PBS e novamente centrifugadas a 1500g por 10 min. O sedimento foi ressuspenso em 70% metanol/30% PBS e incubou-se a 4°C durante a noite. No dia seguinte as células foram novamente centrifugadas, lavadas uma vez em PBS e ressupensas em 1 ml de PBS contendo 10 µg/ml de iodeto de propídeo e 10 µg/ml de RNAse A. Incubou-se a 37°C por 45 min e asamostras foram processadas no citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD) usando o detector FL2. Os dados foram analisados com o auxílio do programa *CellQuest*.

Para análise do ciclo celular por fluorescência, as células foram fixadas, aderidas e permeabilizadas como descrito no item 3.6.1, coradas com 10 µg/ml de DAPI e visualizadas em ao microscópio de fluorescência. Todo esse procedimento foi realizado no laboratório do Prof. Dr Sergio Schenkman com auxílio da aluna Fernanda Costa e Dra Teresa de Jesus.

3.9 PTP-tag

A técnica de *Tandem affinity purification* (TAP) tem se mostrado uma ferramenta muito eficiente para purificação de complexos protéicos em condições não desnaturantes [178; 179]. Para tanto, a proteína de interesse deve ser fusionada a uma *tag*, expressa no organismo ou linhagem celular alvo de estudo. Essa *tag* contém dois domínios proteína A proveninentes de *Staphylococcus aureus* e a um domínio proteína C derivada da vitamina K humana em substituição do peptídeo calmodulina (CBP), presentes nos vetores tradicionais de TAP-tag. Ambos os epítopos são separados por regiões espaçadoras e por um sítio de clivagem para uma protease viral (Tabacco etch vírus-TEV) essencial no primeiro passo de purificação. Por esse motivo a técnica utilizada é chamada PTP-tag (**P**rotC - **T**EV **- P**rotA) [180].

Nessa técnica, a proteína com a fusão é primeiramente imobilizada em uma matriz que promove uma interação de alta afinidade entre epítopos de proteína A e as esferas contendo IgG . Realiza-se diversas etapas de lavagem antes da clivagem com a protease TEV. Após clivagem, a proteína de interesse funidida ao epítopo de Proteína C é submetida a novo passo de purificação, onde ocorre a interação da proteína alvo em uma coluna contendo anticorpo

monoclonal HPC4 imobilizado. A interação é dependente de íons cálcio, e após uma série de lavagens, a proteína é finalmente eluída ao romper-se a interação epítopo-matriz, quelando o cálcio do sistema com EGTA/EDTA [181]. A Figura 38 esquematiza a técnica acima descrita.

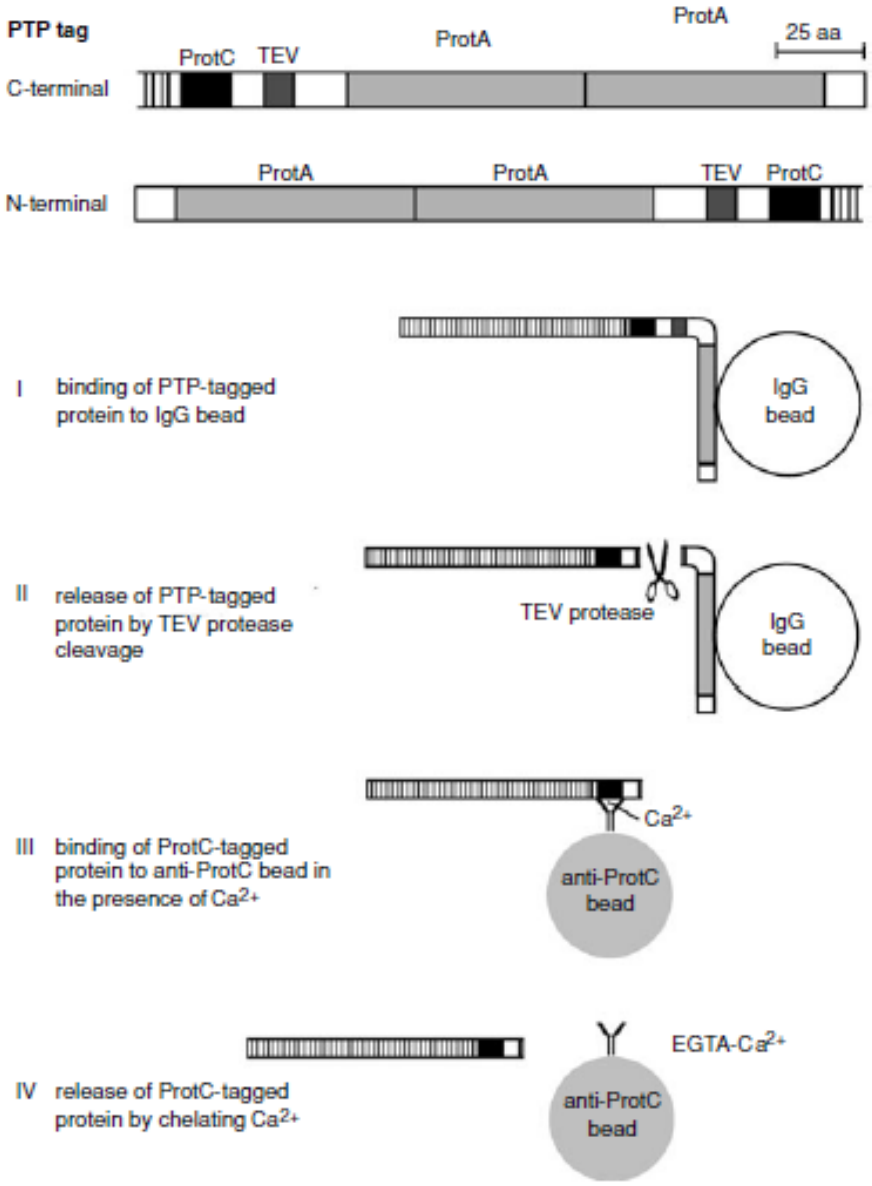


Figura 38 - Esquema da Tandem affinity purification com a PTP-tag. No topo da figura está representada a fusão fora de escala contendo o epítopo ProtC, o sítio de clivagem da TEV, o domínioProtA e as regiões espaçadoras. A proteína alvo está representada pelo retângulo listado.

3.9.1 Construção dos oligonucleotídeos para clonagem da *pabp1* no vetor pN-PURO-PTP

Os oligonucleotídeos para o PTP-*tag* foram construídos para a adição do *tag* na porção N-terminal de cada proteína alvo. Para isso, o oligonucleotídeo antisense (AS) sempre foi complementar à porção terminal da região 5' da seqüência de DNA que codifica para a proteína alvo, sem a trinca de bases para o *stop* códon, e contendo o sítio de restrição para *Eag* I. Em seguida foi necessário localizar um sítio de restrição único na seqüência da proteína alvo e que não estivesse presente no vetor pN-PTP, para ser utilizado na linearização do plasmídio recombinado. Este sítio deveria estar numa posição de no mínimo 150 pb do *stop* códon, em direção à extremidade 3'. O oligonucleotídeo antisense (AS) foi então construído com numa região de, no mínimo, 150 pb do sítio de restrição em direção à extremidade 3', e contendo o sítio de restrição de *Apa* I.

Para a confirmação dos parasitas transfectados, um oligonucleotídeo S 5'*out* foi construído fora da sequência amplificada, em direção à extremidade 3'. Esse oligonucleotídeo, juntamente com o oligonucleotídeo Tbpabp1 PTP inverso permitiram a verificação da inserção do vetor na posição correta no genoma do parasita.

Iniciadores específicos foram desenhados (Tabela 13) para clonagem em fase de leitura do gene PABP1 de *T.brucei* no vetor pN-PURO-PTP, permitindo que esta proteína seja produzida fusionada ao PTP-tag, de acordo com a Figura 39. Os iniciadores específicos e a reação de amplificação estão descritos nas tabelas 13 e 14 respectivamente.

Tabela 12 - Primers utilizados na técnica de PTP-tag de PABP1 de *T. brucei.*

Primer	Sequência	Enzima
Tbpabp1 PTP direto	5'-GCGGCCGCTGGCGGCATCACGAGCGCAGCGATATGCAAAGAC-3'	*NotI*
Tbpabp1 PTP inverso	5'- TCTTCCAGGGCCCTTAAGCGCTTGAGGCGTGTACCTTTAGCAC-3'	*ApaI*

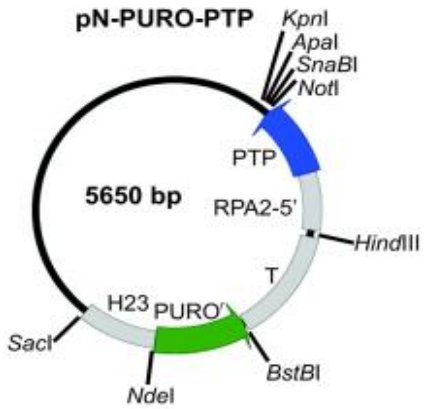


Figura 39 - Mapa dos vetores e pN-PURO-PTP.

Tabela 13 - Reação de amplificação do gene pabp1 para clonagem no vetor pN-PTP PURO

Reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão da Taq (10x)	5
dNTP (n=A,G,C,T)	1
Primer 5' (10µM)	1
Primer 3' (10µM)	1
DNA genômico *Tbrucei* 50ng/µL	2
Taq DNA polimerase (50u/µL)	1
H_2O q.s.p	50

Após a amplificação, o produto de PCR foi separado em gel de agarose 1%, visualizado por coloração de brometo de etídeo e iluminação ultravioleta. O fragmento de interesse foi cortado do gel e purificado utilizando o Kit *Perfectprep Gel Cleanup* (Eppendorf), de acordo com especificações do fabricante.

Procedeu-se com a reação de digestão do vetor pN-PURO-PTP com as enzimas *Not*I e *Apa*I contendo 5µg de vetor, 2µL de cada enzima, 5µL de tampão *NEB* buffer 4, 5µL de BSA e 18µL de H_2O. Incubou-se a reação por 3h a 25°C e 20min a 65°C para inativação das enzimas, e os produtos de digestão foram purificados a partir do gel.

Para reação de ligação utilizou-se 175ng do vetor digerido, 175ng de inserto TbPABP1/PTP amplificado, sendo produção de ligação transformado em *E. coli* DH5α competente. Cinco colônias recombinantes foram selencionadas para confirmação da clonagem por PCR de colônia, utilizando-se os iniciadores listados na tabela 13. Também se empregou digestão com as enzimas *Not*I e *Apa*I para confirmação da clonagem.

Para transfecção o plasmídeo recombinante foi linearização com a enzima *Nsi*I (corta o gene PABP1 em apenas 1 ponto). Para tanto, adicionou-se 5µL do DNA recombinante pN-

PTP/PABP1 (10 - 20µg), 1µL da enzima *Nsi*I, 1µL de buffer R 10x e 3µL de H_2O e incubou-se a reação por 2h a 37°C. Utilizou-se gel de agarose 1% para confirmar a linearização e o produto foi purificado do gel utilizando o *Kit Perfectprep Gel Cleanup* (Eppendorf), de acordo com especificações do fabricante.

3.9.2 Transfecção e seleção de clones Tbpabp1/pN-PTP

Para transfecção do plasmídeo utilizamos uma concentração final de 10µg de plasmídeo pN-PTP/PABP1. Culturas de 10 ml de formas procíclicas ($1x10^6$-10^7 parasitas/mL) de *T. brucei* (cepa 427) foram centrifugadas por 7 min/3.000g/TA. O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados com 2 ml de tampão ZPMF 1X (132mM NaCl; 8mM KCl; 8mM Na_2HPO_4 (Merck); 1,5mM KH_2PO_4 (Merck); 1,5mM MgOAc.4 água (Sigma); 90µM $CaOAc_2$ (Sigma), 7 min/ 3.000xg/TA e ressuspensos em 390µl de ZPMF 1X.

Para a tranfecção, os DNAs e parasitas foram colocados em cubeta de eletroporação (*Gene Pulser Cuvette* - BioRad) e eletroporados ultilizando pulso de 1,5 kV, 25 µF, 50 Ohms (*Gene Pulser II* - BioRad). Após a eletroporação os parasitos foram transferidos para uma garrafa contendo 10ml de meio sintético SDM-79 [173] e 20µg/ml de puromicina (Sigma), marcador de seleção do vetor pN-PURO-PTP.

Em um tubo de 50 mL, foram misturados 2,5 ml dos parasitos da garrafa anterior (parasitos transfectados), 2,5mL de parasitos 427 não transfectados, 7,5mL de meio de cultura e, distribui-se 250µL dessa mistura em 48 poços de uma placa de poliestireno de 96 poços estéril, incubada em câmara úmida a 28ºC, para o isolamento de clones transfectados. Após 10 dias de seleção dos clones, foram utilizados 40µg/ml de puromicina (Sigma) para garantir a presença somente de parasitas transfectados.

Para confirmação dos clones positivos por *Western Blotting*, foram cultivados 5 x 10^7cel/mL que foram centrifugadas por 7min a 2200rpm, lavadas com PBS 1x estéril e ressuspensas em vortex com 150µL de tampão de amostra 3x. Aplicou-se 15µL desse extrato de proteína total em gel SDS-page 10%, transferiu-se as proteínas para membrana de nitrocelulose e utlizou-se o anticorpo comercial anti-ProtA (Sigma) como descrito no item 3.5.2.

3.9.3 Extrato para a purificação das proteínas PTP-tag

Um litro de cultura (fase log - $1x10^7$ parasitas/ml) foi centrifugado por 10 min/2.700xg/2ºC, o sobrenadante descartado e os parasitas lavados 2 vezes com 40mL de tampão *tryps wash* (tabela 2) gelado, ressuspendendo no vórtex e centrifugando por 7 min/2.700xg/2ºC. Determinou-se o volume do sedimento (aproximadamente 0,5mL), que foi lavado com 30mL de tampão de transcrição gelado (150 mM sucrose - Sigma; 20 mM ácido glutâmico - Sigma; 20 mM HEPES-KOH – Sigma, pH 7,7; 3 mM $MgCl_2$), centrifugou-se por 10 min/3300g/2ºC e o sedimento foi ressuspenso no mesmo volume de tampão de transcrição gelado, incubando-se em gelo por 20-30 min.

A ruptura da célula e liberação da fração protéica solúvel foi realizada com o equipamento *French Press* com seis ciclos com pressão de 2000 *high*. Os ciclos foram executados até a quebra de aproximadamente 70% dos parasitas (observado em microscópio ótico comum). O extrato foi aliquotado em frações de 1 ml, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Cada fração foi chamada de Y4. Para determinação da concentração protéica dos extratos celulares e proteínas purificadas foi utilizado o reagente de Bradford (BioRad), de acordo com instruções do fabricante.

3.9.4 Imunoprecipitação com IgG-sepharose

Essa etapa é necessária para averiguar a ligação do domínio ProtA às contas de IgG sepharose. Para tanto, uma alíquota de 1ml de extrato do parasita (Y4), correspondente a 2-$4x10^9$ células, foi descongelada e colocada imediatamente em gelo. Adicionou-se 100µl do tampão de extração gelado (1,5M KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM DTT; 1% Tween 20) em tubo previamente gelado. Cada alíquota do extrato foi adicionada a um tubo contendo o tampão de extração, misturando-se rapidamente (invertendo o tubo 3 vezes) e incubando por 20 min em gelo. Enquanto isso, 60µL de IgG sepharose (*Fast Flow*, GE) foram equilibradas em 800µL de tampão PA-150 (150mM KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM DTT e 1% Tween 20), centrifugando-se por 30 segundos a 3.000xg e mantendo-se o tubo em gelo.

O tubo com extrato foi centrifugado por 15 min/21.000xg/2°C e o sobrenadante transferido para outro previamente colocado em gelo, centrifugando-se novamente por 3 min e o sobrenadante adicionado a outro tubo gelado, correspondente ao extrato nuclear de *T. brucei* transfectado. A 20µl desta amostra adicionou-se 25µl tampão de amostra para realização do *Western Blotting* (esta fração foi denominada de *input*). Adicionou-se 100µL de extrato nuclear ao tubo contendo IgG-sepharose previamente equilibrada, juntamente com 300µL de tampão PA-150, mantendo-o sob agitação leve a 4ºC por 1 hora. Após centrifugação a 3.000xg por 30 segundos, este sobrenadante foi denominado de fração não ligada, e IgG-sepharose (fração ligada) foi lavada cinco vezes com 800µL de PA-150. Amostra do sobrenadante e das contas foram separadas para realização do *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-proteína A (Sigma).

3.9.5 Produção do extrato protéico em larga escala

Após verificação da primeira etapa da purificação do epítopo ProtA, realizou-se o mesmo experimento de extração da fração protéica do clone PTP/ PABP1 porém em uma escala maior, visando uma maior quantidade de proteína purificada com seus ligantes ao final da etapa. Assim sendo, foram utilizados 4L da cultura PTP/ PABP1 na fase logarítmica de crescimento (1 x 10^{7}cel/mL de cultura). O crescimento foi feito gradualmente, iniciando com 10mL, passadas 24 horas o volume foi aumentado para 100mL, 500mL, 1L, 2,5L e 3L sempre em intervalos de 24 horas de crescimento em balão volumétrico sob leve agitação e a 24°C; as demais etapas de lise e congelamento do Y4 foram realizadas da mesma maneira descrita anteriormente no item 3.8.4.

3.9.6 Purificação em tandem da proteína Tbpabp1/pN-PTP

Para a purificação utilizou-se 15mL do Y4 extraído anteriormente (15 eppendorfs congelados). Como na imunoprecipitação, adicionou-se 100µl do tampão de extração gelado (1,5M KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM DTT; 1% Tween 20) em tubo previamente gelado. Cada alíquota do extrato foi adicionada a um tubo contendo o tampão de

extração, misturando-se rapidamente (invertendo o tubo 3 vezes) e incubando por 20 min em gelo. Nesse intervalo, preparou-se a coluna de IgG (*poly-prep chromatography columns* 0,8 x 4cm – BioRad 731-1550) com 260µL de IgG sepharose (*IgG fast flow* – Amersham) obtendo 300µL de volume empacotado. Lavou-se a resina empacotada com 50mL do tampão PA-150 (150mM KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM DTT e 1% Tween 20).

Centrifugou-se os tubos com o extrato protéico por 15min a 2°C/2000g transferindo cuidadosamente a fração solúvel para um tubo eppendorf previamente refrigerado. Os tubos foram novamente centrifugados por 3min/2°C/2000g reunindo todo o conteúdo em um tubo de 15mL (aproximadamente 6mL) e uma amostra foi retirada para posterior análise em gel SDS-PAGE. Para proteção do conteúdo de proteínas da amostra, 500µL de inibidor de protease (Roche- *complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) previamente dissolvido no tampão PA-150.

A resina foi incubada com o extrato celular por 2h a 4°C sob leve agitação, e após a resina decantar, coletou-se o material que passou pela resina (*flow through*) retirando uma amostra para análise em gel SDS-PAGE. A resina foi novamente incubada com 10mL de tampão PA-150 por 10min a 4°C sob leve agitação, deixando drenar por gravidade. Esse passo foi repetido mais duas vezes até para lavar quaisquer ligações inespecíficas na resina. Para a eluição, incubou-se as contas de IgG com 2mL do tampão TEV (150mM KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM EDTA pH8,0; 1mM DTT e 1% Tween 20) e 300u de TEV protease (*AcTev*-Invitrogen) por 16h a 4°C sob leve agitação.

Após as 16h, a coluna contendo 260µL de *Anti-protC Affinity Matrix* (Roche) foi montada e lavada com 50mL de tampão PC-150 (150mM KCl; 20mM Tris-HCl pH 7,7; 3mM $MgCl_2$; 0,5mM DTT, 1% Tween 20 e 1mM de $CaCl_2$). O eluído da Tev foi coletado e lavado com mais 4mL de PC-150. Todo esse volume foi reunido e acrescido de 7,5µL de $CaCl_2$ (1M) e 500µL de inibidor de protease (Roche) e incubado com a matriz anti-protC para o segundo passo de purificação, ficando por 2h a 4°C sob leve agitação.

A matriz foi lavada 3 vezes com tampão PC-150 e a proteína eluída com 600µL de tampão EGTA/EDTA preparado no momento do uso (5mM Tris-HCl pH 7,7; 10mM EGTA; 5mM EDTA e 20µg de Leupeptina), mantendo-se agitação moderada por 5min a temperatura ambiente. Uma amostra foi retirada para análise em gel SDS-PAGE.

4 Resultados

4.1 Clonagem do gene Tb*pabp1*

4.1.1 Clonagem no vetor pGEM-T e sequenciamento

Para obtenção do produto de PCR utilizado na clonagem utilizou-se DNA genômico de *T. brucei* recém extraído. Após a padronização da reação, o produto da amplificação foi purificado para retirada de bases não incorporadas e iniciadores e, quantificado (Figura 40, painel A). Procedeu-se com a reação de ligação no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) e transformação em célula de *E.* coli DH5α competente. Dentre as colônias brancas escolheram-se duas para realização de uma reação de clivagem do inserto com as respectivas enzimas de restrição que flanqueiam o gene de interesse (Figura 40, painel B) para analise de clones. Após sequenciamento dos clones positivos, os mesmos foram utilizados para subclonagem do gene PABP1 em vetor de expressão.

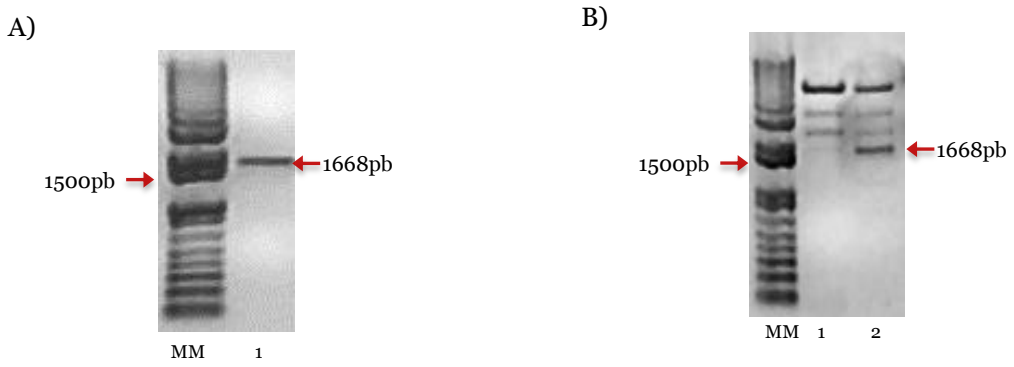


Figura 40 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM, Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Gene pabp1 amplificado do DNA genômico de *T. brucei*; Painel B: MM, Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Teste de clivagem da colônia 1; 2, teste de clivagem colônia 2, mostrando a banda clivada na altura esperada do gene pabp1.

4.1.2 Subclonagem no vetor pET28a

O clone 1, apresentado na figura 28, obtido na clonagem em pGEM-T foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Xho*I, cujos sítios de clivagem foram inseridos nos iniciadores específicos. O produto da digestão (Figura 41, painel A) foi purificado e ligado ao vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 41, painel B). O produto da ligação foi transformado em *E.coli* DH5α, e o DNA plasmidial das colônias positivas submetido a uma reação de PCR utilizando os iniciadores do vetor pET28a, T7 e T7 *terminator* para verificação. Observou-se a amplificação de um fragmento em torno de 1600 bp,considerado positivo (Figura 41, painel C), prosseguindo-se com os experimentos de expressão.

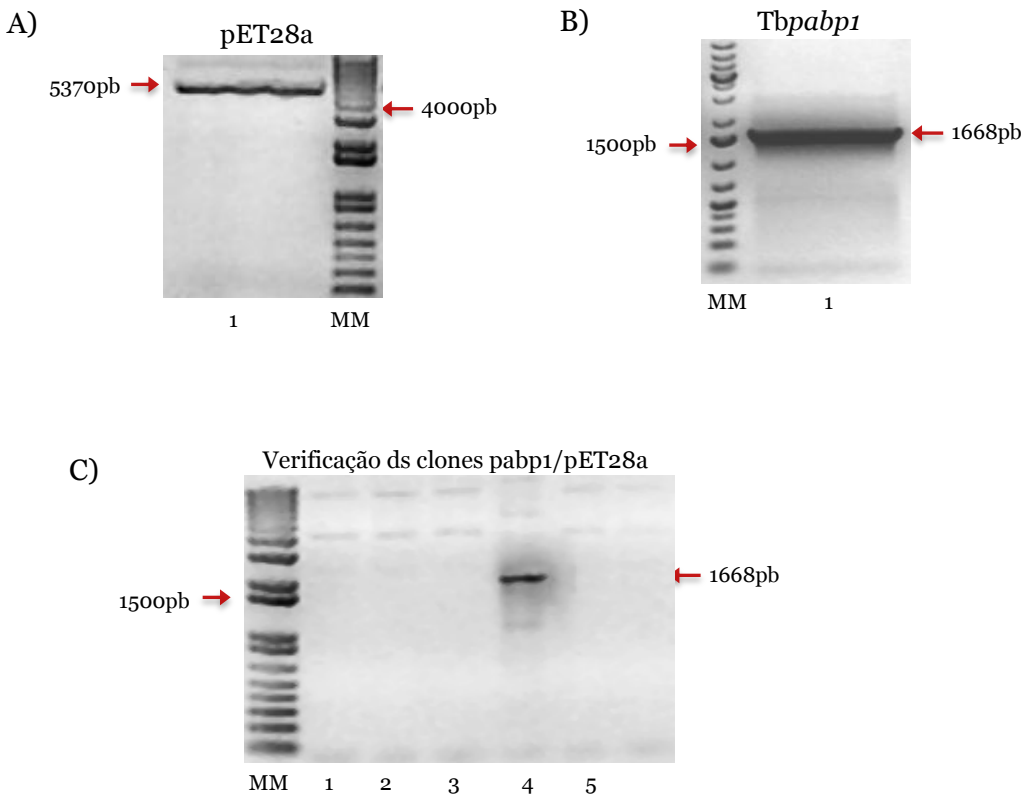


Figura 41 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1. vetor pET28a linearizado com as enzimas XhoI e BamHI; Painel B: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1. Produto de PCR amplificados com iniciadores específicos e clivado com as enzimas XhoI e BamHI. Painel C: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1-7. Amplificação do DNA extraído das colônias transformadas, apenas colônia 4 foi positiva.

4.2 Expressão de proteína recombinante

O clone positivo foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* competente e a superexpressão foi confirmada com um ensaio piloto de expressão (utilizando apenas 5mL de cultura de célula). Observou-se uma banda de aproximadamente 63KDa corresponde a predição de massa da PABP1 (dado não apresentado). Apesar da expressão heteróloga do gene PABP1 de *T. brucei* ter ocorrido de forma satisfatória, a proteína permaneceu insolúvel após a lise da célula.

Após diversas tentativas variando-se a concentração do agente indutor IPTG, temperadura, tempo e volume de expressão, padronizou-se a expressão como descrito na seção 3.3.2 resultando em uma concentração de proteína solúvel suficente para prosseguir com os ensaios de purificação por afinidade. O teste de solubilidade está apresentado na Figura 42.

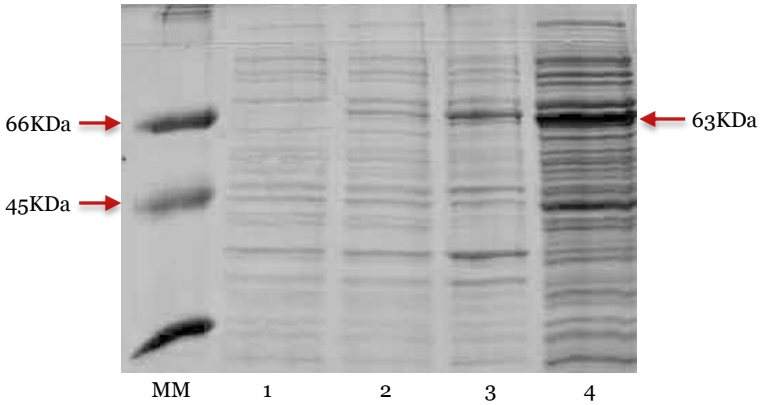


Figura 42 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Brilhante R-250. Expressão de *pabp1* recombinante. **1.** MM. Massa Molecular; **2.**amostra não induzida (sem IPTG); **3.** indução por 4 horas com 0,1 mM de IPTG; **4.** Fração insolúvel; **5.** Fração solúvel.

4.3 Purificação da proteína recombinante PABP1

4.3.1 Precipitação com sulfato de amônio

A proteína PABP1 recombinante foi induzida em grande volume de meio de cultura (2L), as bactérias tiveram suas membranas lisadas por ultrasonicação e a fração solúvel obtida foi submetida *screening* inicial, variando se a concentração de sulfato de amônio de 10 a 80% (dado não apresentado). Definiu-se que a condição de trabalho mais satisfatória seria a fração solúvel após precipitação com 50% de sal (Figura 43).

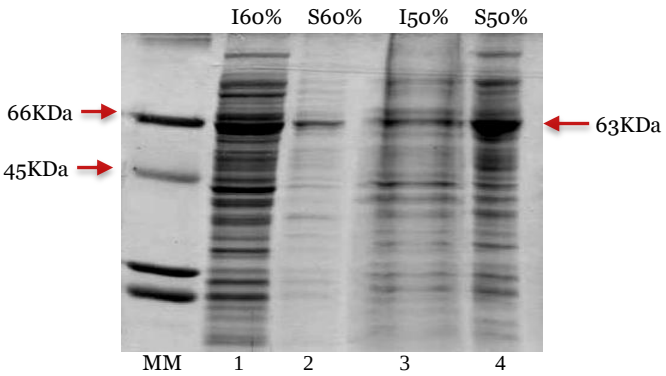


Figura 43 - Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de PABP1 recombinante por precipitação com sulfato de amônio; **MM.** Massa Molecular; **1.** Fração insolúvel após adição de 60% de sulfato de amônio; **2.** Fração solúvel com 60% de SA ; **3.** Fração insolúvel com 50% de AS; **4.** Fração solúvel com 50% de sulfato de amônio.

4.3.2 Cromatografia de afinidade ao Níquel

Após precipitação com sulfato de amônio, a proteína passou por uma cromatografia de afinidade utilizando resina de sulfato de níquel imobilizado. Com o resultado obteve-se uma fração de aproximadamente 2mg/mL de proteína solúvel, representada na Figura 44. Apesar dos passos de purificação empregados, a pureza da proteína não atingiu os patamares necessários para prosseguir com os experimentos de SAXS, além disso, a proteína se mostrou bastante instável em solução, impedindo os experimentos de cristalização inicialmente propostos.

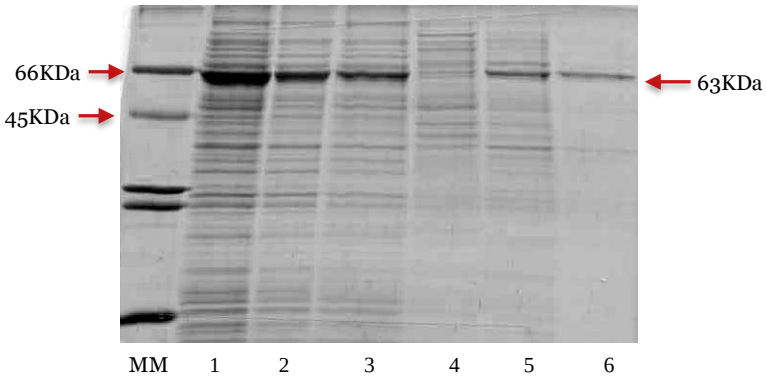


Figura 44 - Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de PABP1 recombinante, a partir da fração solúvel. MM, Massa molecular em kDa; 1. Pré-coluna (fração solúvel da lise); 2. *Flow through*; 3. Lavagem com 10mM de imidazol; 4. lavagem com 50mM de imidazol; 5. Eluição com 100mM de imidazol; 6. Eluição com 250mM de imidazol.

4.4 *Western Blot*

4.4.1 Detecção da proteína PABP1 recombinante

A proteína purificada foi quantificada, concentrada a 2mg/mL e enviada ao laboratório da professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos para injeção em camundongo Balb/C. Observou-se que o soro coletado apresentou reatividade até o título de 1:500, como demonstrado na Figura 45 abaixo.

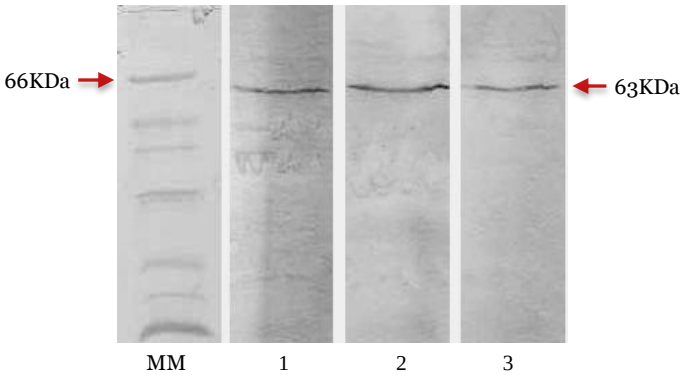


Figura 45 - *Western Blotting* da proteína PABP1 recombinante revelado com anticorpo policlonal anti-PABP1 obtido em camundongo. **1.** Massa Molecular; **2.** soro de camundongo contendo anti-PABP1 diluído 1:100; **3.** 1:200; **4.** 1:500. A seta indica a reação contra a proteína PABP1.

4.4.2 Detecção da proteína PABP1 em tripanosomatídeos

Para detectar a presença de PABP1 nativa, o extrato protéico total de *T. brucei* foi obtido para a realização da técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-PABP1. Os resultados apresentados na Figura 46 permitiram observar a presença de banda em torno de 60kDa, indicativa da presença da proteína PABP1 no extrato protéico de *T. brucei* até diluição 1:1000 do soro. Além disso, estes dados indicavam que o anticorpo obtido poderia ser utilizado na técnica de imunofluorescência, na tentativa avaliar a localização celular da proteína PABP1, e relacioná-la com sua função.

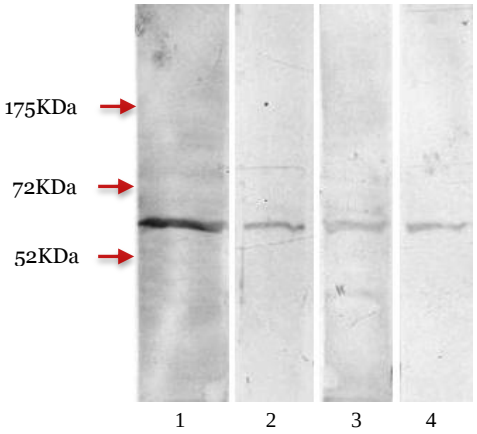


Figura 46 - Detecção da proteína nativa em tripanosomatídeos com anticorpo anti-PABP1 por *Western Blotting* com diluições do soro 1:200, 1:500, 1:800 E 1:1000, respectivamente.

4.5 RNA de interferência

4.5.1 Clonagem do fragmento do gene pabp1 no vetor p2T7

Primeiramente, realizou-se a amplificação do fragmento do gene PABP1 a partir de DNA genômico extraído de *T. brucei*. O produto (apresentado na Figura 47, painel A) foi diretamente ligado ao vetor p2T7 previamente linearizado (Figura 47, painel B). As colônias foram então testadas por PCR de colônia (Figura 47, painel C).

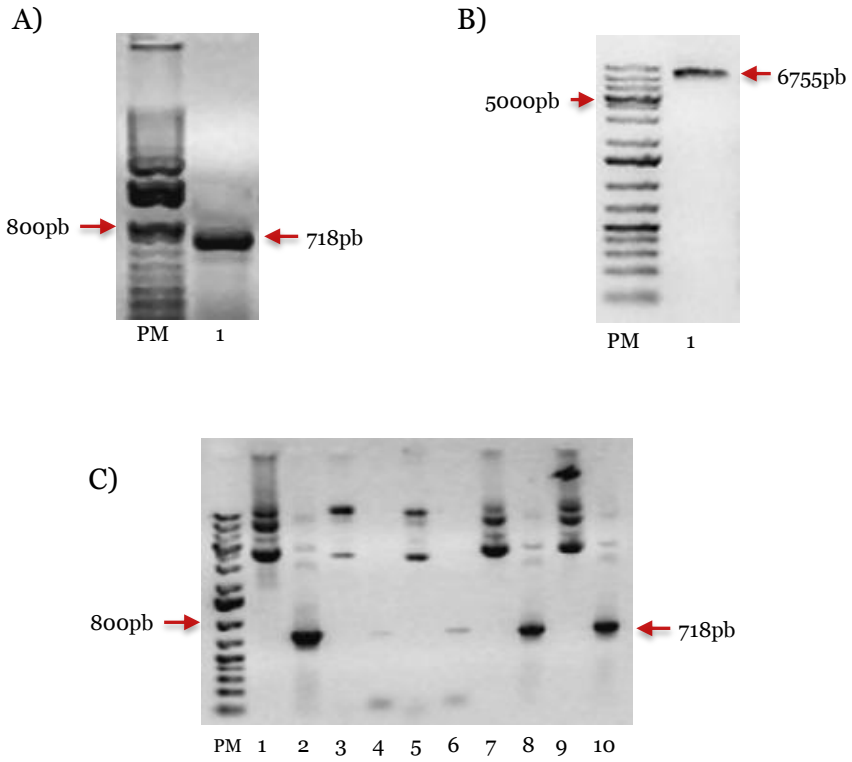


Figura 47 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado por brometo de etídio. Painel A: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, Fragmento de 718pb do gene pabp1 amplificado; Painel B: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1, vetor p2T7 linearizado; Painel C: MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 1,3,5,7,9. DNA extraídos das colônias crescidas após ligação; 2,4,6,8,10. Reação de amplificação com iniciadores específicos do fragmento Tbpabp1*b*/p2T7.

4.5.2 Indução do silenciamento

Escolheu-se assim o clone referente a colônia 1 da Figura 47 para linearização com a enzima de restrição *Not*I e posterior transfecção, por eletroporação, em céulas de *T. brucei* 2913 com a construção Tbpabp1*b*/p2T7. A seleção clonal foi feita utilizando 2,5µg/µL fleomicina (seleção por resistência do vetor p2T7) e diluição seriada de ordem 2. Os clones obtidos foram cultivados em maior escala e posteriormente congelados a -80°C para preservação antes da indução do RNAi.

O crescimento celular tanto da cultura induzida **(+Tet)**, quanto da não induzida **(-Tet)** foi monitorado diariamente, através de contagem do número de células em câmara de Neubauer. O acompanhamento foi realizado por aproximadamente 10 dias, e mostrou que as cul-

turas **+Tet** e **-Tet** apresentavam crescimento diferenciado. Após 72 horas de indução, as células da amostra **+Tet** apresentaram um crescimento aproximadamente 55% menor do que o crescimento da amostra **-Tet**, como pode ser visualizado no gráfico que expressa a curva de crescimento (Figura 48).

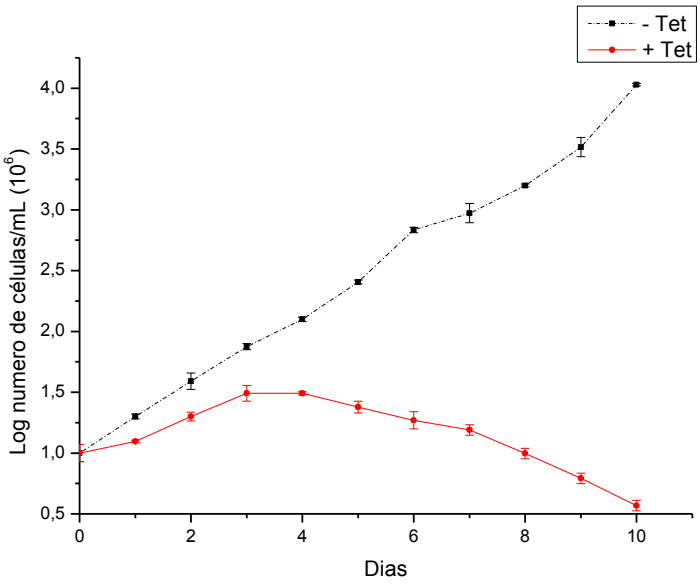


Figura 48 - Gráfico representativo da curva de crescimento obtida para o clone Tbpabp1*b* das amostras induzidas (+Tet) e não induzidas (-Tet). A escala logarítmica do numero de células auxilia na padronização da curva de crescimento após as diluições realizadas nos dias 4 e 8.

4.5.3 Efeitos da diminuição da expressão de PABP1 no parasito

Com o propósito de descrever o fenótipo e avaliar as alterações morfológicas decorrentes da interrupção da expressão do gene PABP1 a cultura celular induzida foi observada por microscopia de contraste de fase e fluorescência. Para a análise da integridade do DNA nuclear e mitocondrial (kinetoplasto), e determinação das estruturas presentes na célula, o corante DAPI, específico para DNA, foi utilizado. Tais experimentos foram realizados em células com 1 e 2 dias de indução do RNAi, e é possível observar que após 24h diferenças morfologias já podem ser observadas. Como controle, foram utilizadas células selvagens da linhagem de T.bruci 29-13 e células da cultura -Tet (transfectadas, mas com a maquinaria de RNAi não-induzida).

Nas imagens da Figura 49 é possível notar que não apenas a relação numérica (1:1) entre núcleo e kinetoplasto foi alterada com a indução do RNA de interferência, mas que as células estaõ com seus ciclos celulares desorganizados. Nas figuras C e D após 24 e 48h de indução respectivamente é possível observar alterações no formato da célula bem como na divisão celular que, descontrolada, acumula núcleos e kinetoplastos. Esse resultado demonstra uma dependência clara da proteína PABP1. A alteração no ciclo celular e a característica apoptótica da célula interferida foram uma constante nas células com mais de 36h de indução*.

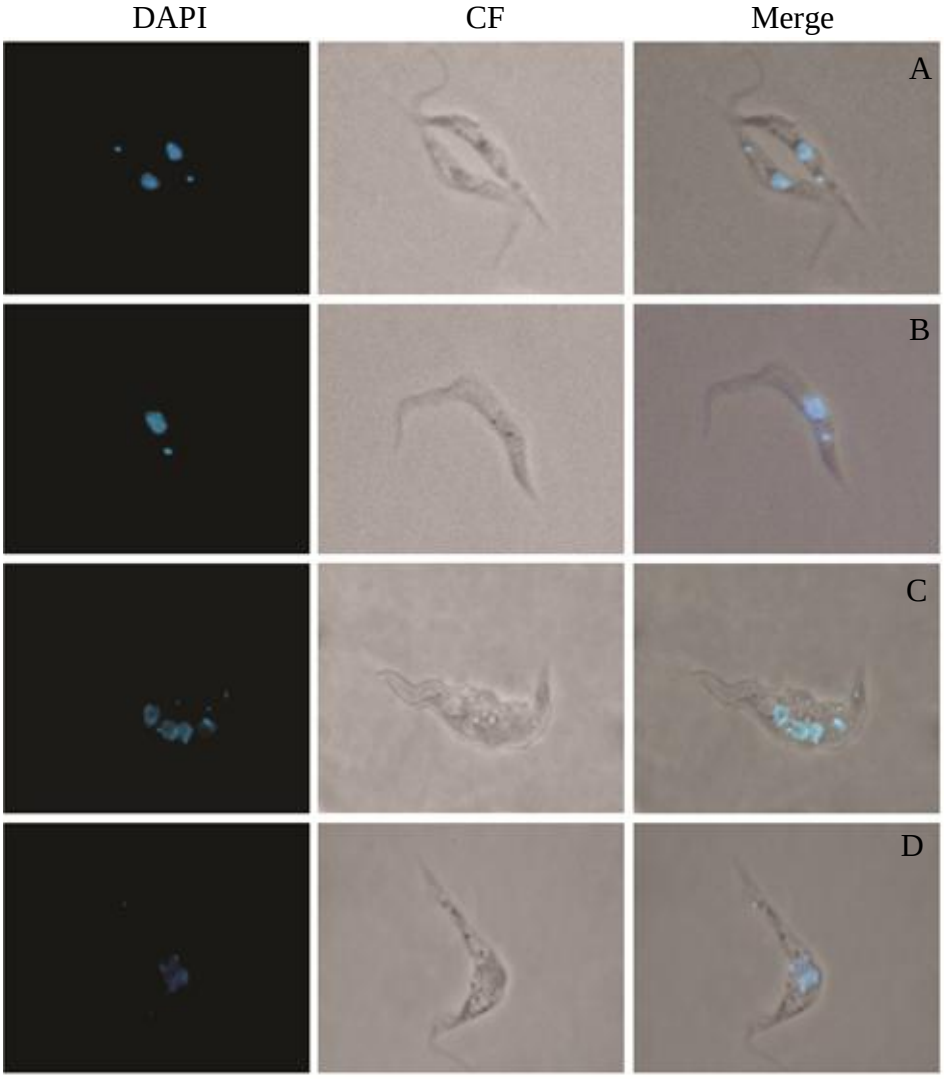


Figura 49 - Imagens de microscopia de contraste de fase (CF), marcada com DAPI e a sobreposição das duas imagens (MERGE). Painel **A:** Célula selvagem da cepa 29-13 ; Painel **B:** controle –Tet (célula transfectada mas não onduzida); Painel **C:** +Tet após 24h de indução; Painel **D:** +Tet após 48h de indução

* A prancha 49 está apresentada em melhor resolução em papel de foto na sessão anexo.

4.5.4 Reações de RT-PCR para avaliação do efeito do silenciamento

Análises da transcrição do gene de PABP1, após indução (clone C1 com tetraciclina), demostraram redução no nível de mRNA específico a partir de 24 horas e atingindo o máximo de inibição após 72 horas (Figura 50). Estes dados sugerem que o gene PABP1 é essencial para parasita, uma vez que sua ausência causa forte redução no crescimento normal do parasito. O efeito do silenciamento do gene PABP1 em célula de mamíferos (HeLa) foi recentemente testado e também se mostra essencial para esse tipo de célula [182].

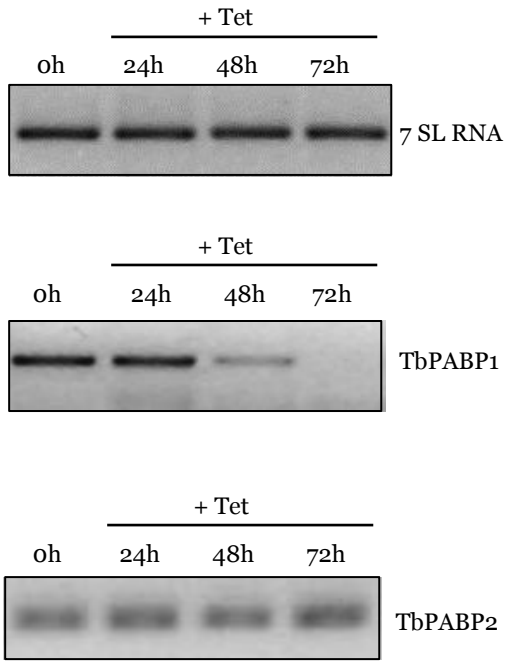


Figura 50 - RT PCR semi-quantitativa para análise da abundância da proteína TbPABP1; Utilizou-se ainda a molécula de 7 SL RNA (como controle positivo da reação) e TbPABP2 para assegurar a especificidade da técnica empregada.

4.5.5 Citômetro de fluxo

A análise realizada por FACS indicou que após quatro dias de indução houve um acúmulo de células na fase $<G_1$ do ciclo celular (Figura 51, painel B). Nessa fase a célula permanece indefinidamente na intérfase, ou seja, a célula aumenta o seu volume, tamanho e núme-

rode organelas cumprindo assim suas atividades vitais e reunindo condições para se dividir novamente, divisão essa que nas células induzidas não acontece. No painel A da Figura 51 observa-se um gráfico de barras que indica o número de parasitas em cada fase do ciclo celular (ciclo mitótico), o gráfico resultante do programa *CellQuest* está apresentado no painel B.

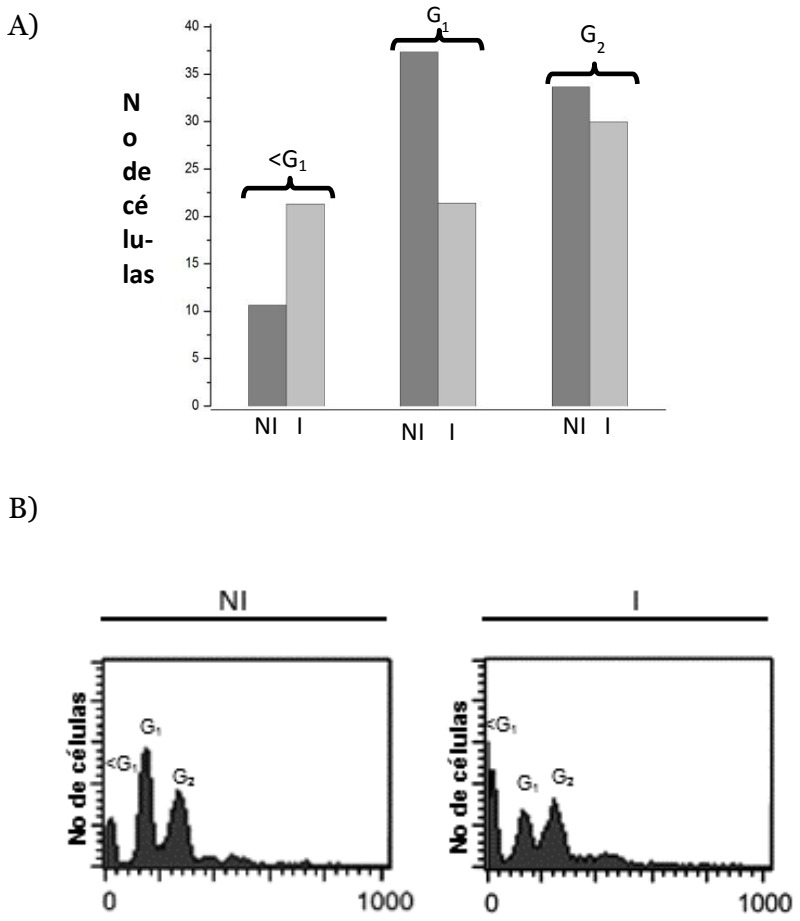


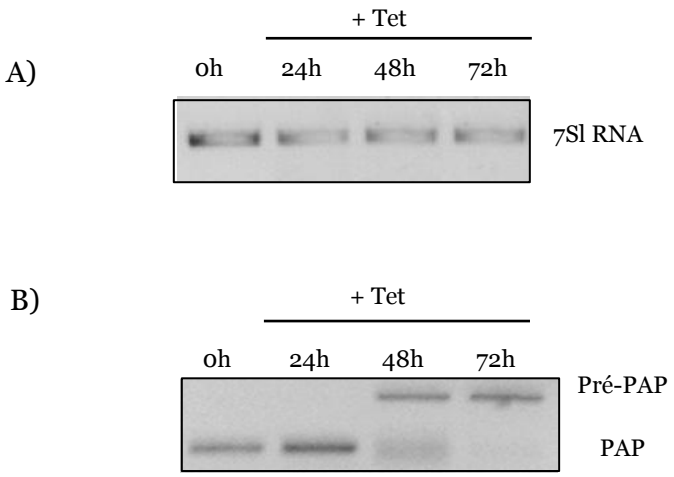
Figura 51 - Duas representações dos Gráficos da Citometria de fluxo; parasitos corados com DAPI (DNA) foram separados pela diferença na quantidade de fluorescência emitida. Como cada fase do ciclo celular apresenta uma quantidade de DNA o numero de parasitos em casa fase pode ser estimado. Células –Tet (Não induzidas, NI) foram comparadas com células +Tet (Induzidas, I) por 4 dias.

4.5.6 Avaliação da participação de PABP1 na reação de *cis* e *trans-splicing*

Após confirmação da redução do número de transcritos específicos de PABP1 no experimento de RNAi, as mesmas células induzidas com tetraciclina foram empregadas na avaliação da função da proteína nas reações de *cis* e *trans-splicing*.

Uma reação de RT-PCR semi-quantitativa (25 ciclos) demostrou que ao longo do tempo de indução observa-se redução no nível de trancrito processado de α-tubulina (banda de aproximadamente 750 pb) e acúmulo da forma não-processada (banda de aproximadamente 150 pb referente a pré- α-tub), confirmando a participação de PABP1 na reação de *trans-splicing* (Figura 52, painel C e D).

Em relação ao *cis-splicing*, a participação da PABP1 foi verificada utilizando uma reação de RT-PCR, cujos iniciadores foram direcionados para o gene da enzima Poli-A polimerase (PAP), previamente descrito [60] como sendo processado por *cis-splicing*. Os iniciadores sintetizados para esta reação foram capazes de se ligar nos exóns, flanqueando o único intron encontrado neste gene (Figura 36). Ao longo do tempo de indução com tetraciclina foi possível observar acúmulo de transcritos não processados de PAP (banda de aproximadamente 780 bp), e redução no nível de transcritos maduros (banda de aproximadamente 130 bp), confirmando que PABP1 também participa na reação de *cis-splicing* em tripanosomatídeos (Figura 52, Painel B). Estes resultados demonstram que a proteína PABP1 é essencial também em tripanossomatídeos para a correta execução das reações de *cis* e *trans-splicing* resultado até então inédito para suas homólogas em outros organismos.



continua

continuação

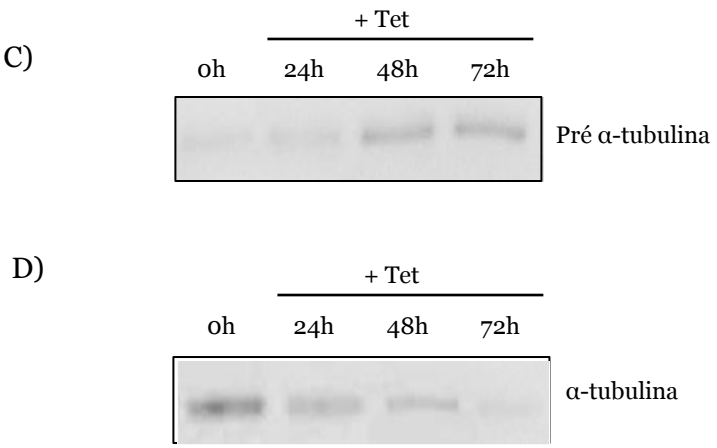


Figura 52 - PCR semiquantitativo para análise do envolvimento da proteína PABP1 com processo de splicing; 7SL RNA (como controle positivo quantitativo de reação), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP) e transcrito de Poli A Polimerase processado; transcrito de tubulina não processado (Pré α- tubulina), transcrito de α-tubulina processado durante 0, 24, 48 e 72 horas de indução com tetraciclina.

4.6 Imunofluorescência

4.6.1 Imunolocalização

Com o anticorpo policlonal produzido em camundongos foi possível realizar experimentos de localização celular valendo-se da fluorescência emitida pelo anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 Green (Invitrogen). O resultado está apresentado na Figura 53 e mostra localização citoplasmática da proteína *Tb*PABP1[†], verificada em seguida por ensaio de marcação dupla.

[†] A prancha da figura 53 está apresentada em melhor resolução em papel de foto na sessão anexo

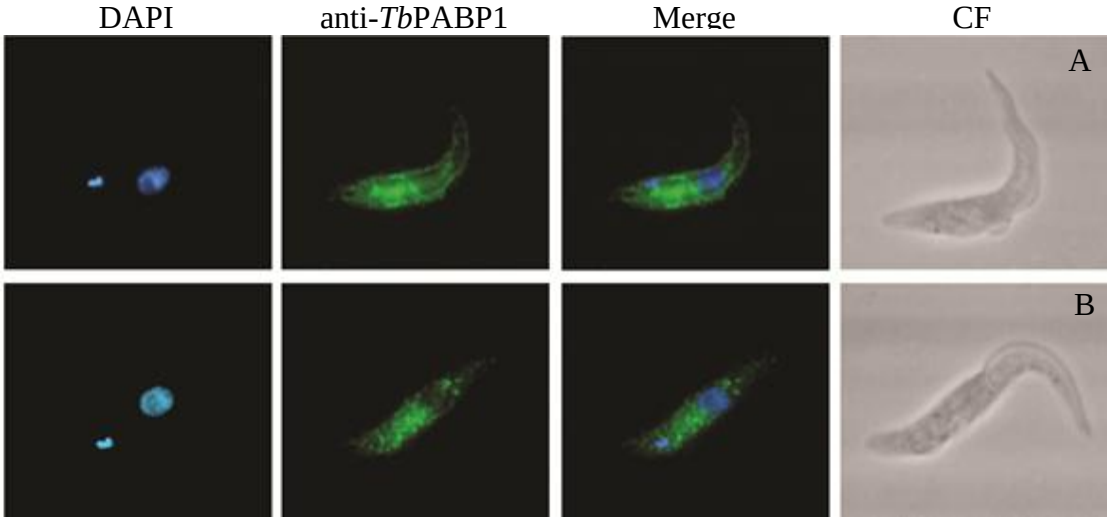


Figura 53 - Painel A e B representando a imunolocalização da proteína *Tb*PABP1. Imagens de microscopia de contraste de fase do parasito marcado com DAPI (DNA), com anticorpo anti-*Tb*PABP1 e sobreposição das imagens (Merge). O contraste de fase está representado em CF.

4.6.2 Ensaio de marcação dupla

Nos ensaios de imunofluorescência foi possível observar, em parasitas procíclicos, um padrão de marcação organizado com estruturas interconectadas no citoplasma semelhante a localização de proteínas do retículo endoplasmático (Figura 53). Para investigarmos a que estrutura celular a proteína alvo poderia estar associada, realizou-se um ensaio de dupla marcação utilizando-se o anticorpo anti-PABP1 e o anticorpo anti-proteína BiP (*binding protein*) da família da hsp70 (*heat shock protein*) residente específico do retículo endoplasmático. O resultado mostra visível sobreposição das imagens de fluorescência (Figura 54), indicando que a proteína de fato co-localiza com a BiP, tendo assim uma localização reticular na célula[‡].

[‡] A prancha da figura 54está apresentada em melhor resolução em papel de foto na sessão anexo.

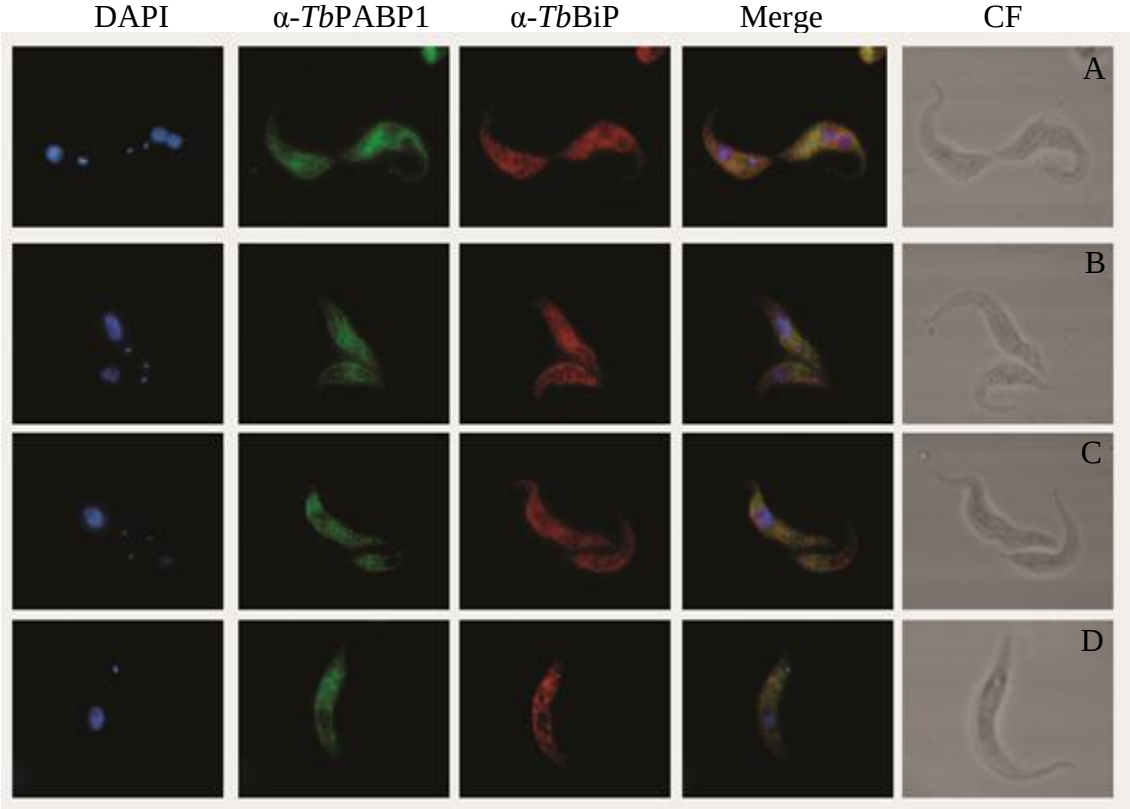


Figura 54 - Painel de marcação dupla utilizando os anticorpos *Tb*PABP1 e o marcador de retículo endoplasmático *Tb*BiP incubados com parasitas da cepa *Tb*427 selvagem. Também estão representadas as marcações com DAPI (DNA) e o contraste de fase (CF). A sobreposição das imagens (Merge) indica localização reticular da proteína de interesse *Tb*PABP1.

4.6.3 Detecção Tbpabp1 citoplasmática no núcleo sob estresse com actinomicina D

Com o experimento de imunolocalização caracterizamos a PABP1 como uma proteína preferencialmente citoplasmática, de acordo com o que se encontra na literatura em relação às suas homólogas em *Leishmania major* [161] e humanos [183] e diferente da Pab1 de *S. cerevisiae* que apresenta apenas uma homóloga atuando nos dois compartimentos [122]. Porém nos experimentos realizados com o gene pabp1 silenciado indicaram um possível envolvimento da proteína PABP1 no mecanismo de *splicing*, via essa que se processa no núcleo da célula.

Um estudo de 1998 mostrou que a PABP1 humana está constantemente em trânsito entre núcleo e citoplasma [184] (revisado em 2010 [18]). No caso dos kinetoplastidas, foi descrito

recentemente em estudo com *Trypanosoma cruzi*, um subconjunto de proteínas ligantes de RNA (RNA binding proteins-RBPs) envolvidas particularmente com o metabolismo do mRNA e que se acumulam no nucléolo como resposta específica ao estresse celular iniciado por condições externas específicas, como *heat shock* ou ação de inibidores. Além disso, foi observado no mesmo trabalho utilizando RNA-FISH, o acúmulo do RNA poliadenilado no núcleo em resposta as mesmas condições adversas à célula. Como a cauda poli-A tem a PABP ligada a ela, a retenção do mensageiro poderia também reter a proteína PABP1 no núcleo, esclarecendo se esta tem também uma etapa nuclear.

Para observação desse fenótipo, que explicaria o efeito no *splicing* obtido com o experimento de interferência, foi utilizada a droga actinomicina D como descrito nos experimentos referenciados acima. Essa droga tem sido utilizada para análise das modificações pós-transcricionais em tripanossomatídeos [185] pelo seu efeito inibitório da transcrição.

Após incubar a cultura de células *T brucei*, cepa 427, com concentrações crescentes da droga actinomicina D, as lâminas foram observadas para verificar a provável relocalização nuclear a *Tb*PABP1 . A prancha apresetada na Figura 55 apresenta em A um controle com células da linhagem 427 não expostas a droga por 24h, em seguida (B, C e D) estão as imagens dos parasitas tratados com 10, 20 e 50µg de ActD respectivamente. O resultado demonstra a migração parcial da proteína para o compartimento nuclear sob condição de estresse celular causado pela droga [§].

[§] A prancha da figura 55 está apresentada em melhor resolução em papel de foto na sessão anexo.

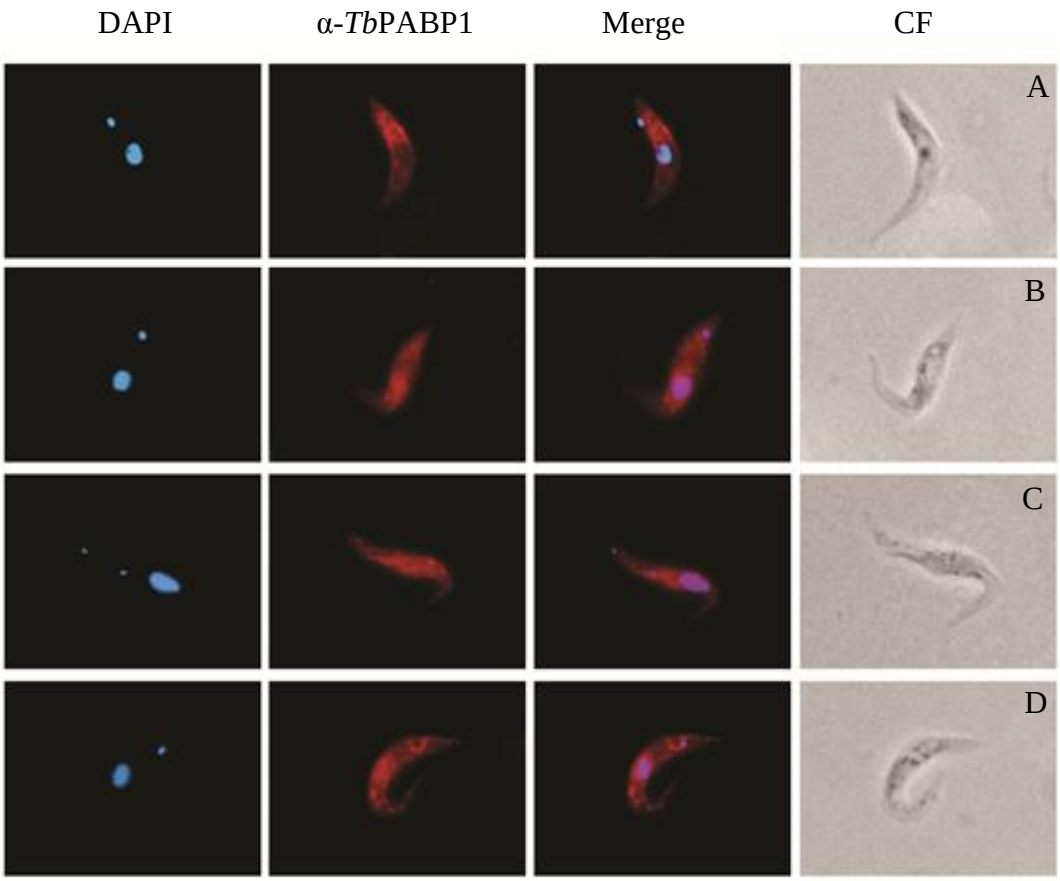


Figura 55 - Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo α-TbPABP1 em parasitos da cepa Tb427 com diferentes tratamentos; A. Tb427 sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga.

Para validar o resultado obtido, o mesmo procedimento foi realizado com a cultura transfectada com a *Tb*PABP1/PTP-tag, contendo cauda com dois domínios de proteina A Essa característica possibilita a detecção da proteína através do anticorpo policlonal comercial anti-ProtA. O resultado obtido confirmou o que se observou anteriormente, validando não apenas a especificidade do anticorpo anti-*Tb*PABP1 produzido, mas também o resultado do experimento, corroborando a hipótese da presença da proteína *Tb*PABP1 no compartimento nuclear sob condições específicas (Figura 56)[**].

[**] A prancha da figura 56 está apresentada em melhor resolução em papel de foto na sessão anexo.

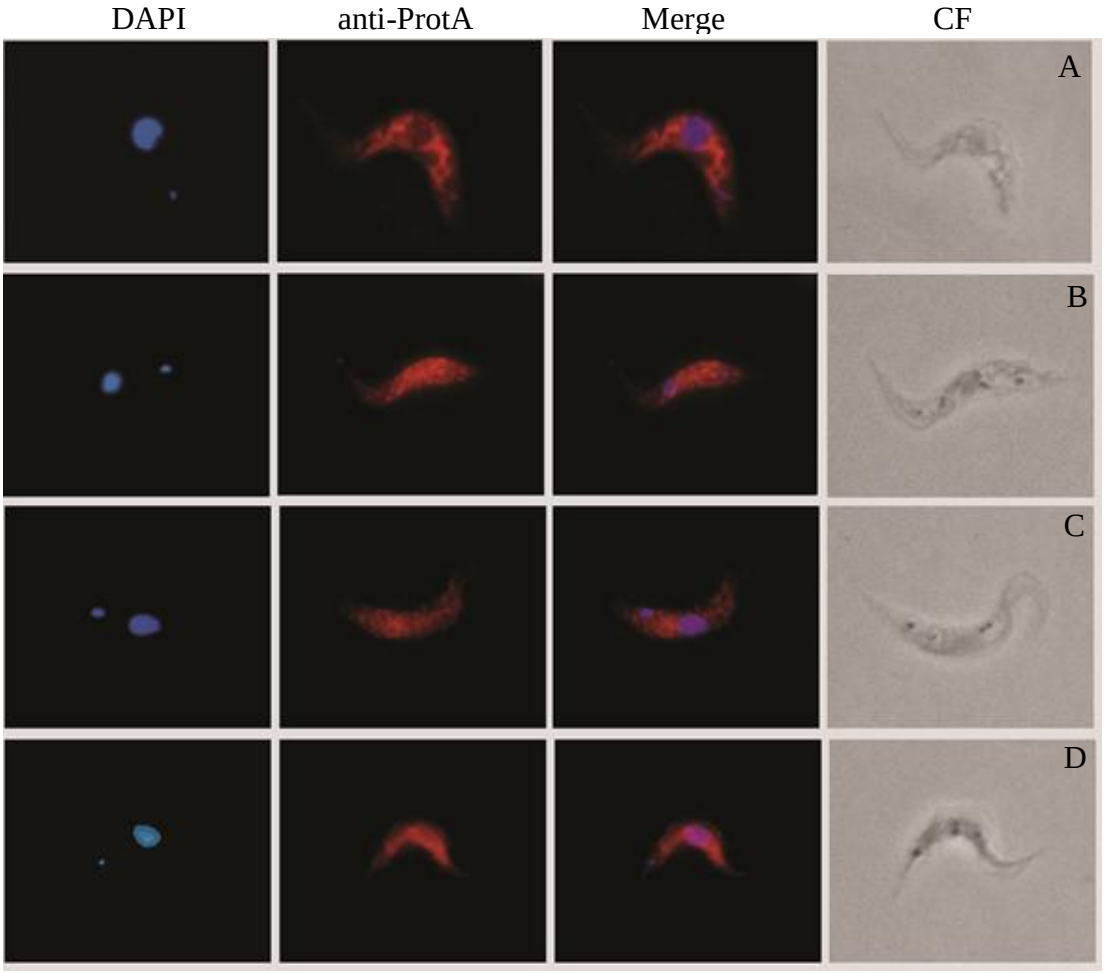


Figura 56 - Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo α-ProtA em parasitos da cepa transfectada *Tb*PABP1/ptp-tag com diferentes tratamentos; A. *Tb*PABP1/ptp-tag sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h marcado com o anticorpo anti-Proteína A; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga.

4.7 PTP-tag

4.7.1 Clonagem no vetor pN-PURO/PTP

A reação de amplificação do gene PaBP 1 gerou um fragmento de aproximadamente 1000pb (Figura 57, painel A). Em seguida, digeriu-se o vetor pN-PURO-PTP com as enzimas cujo sítio flanqueiam o gene de interesse, *Not*I e *Apa*I, e realizou-se a reação de ligação. Fo-

ram selecionadas 6 colônias positivas que foram testadas por PCR de colônia (Figura 57, painel B), sendo que delas duas foram testadas por digestão com as enzimas citadas acima (Figura 57, painel C). Por fim, o plasmídeo foi linearizado com a enzima *Nsi*I para ser transfectado (Figura 57, painel D).

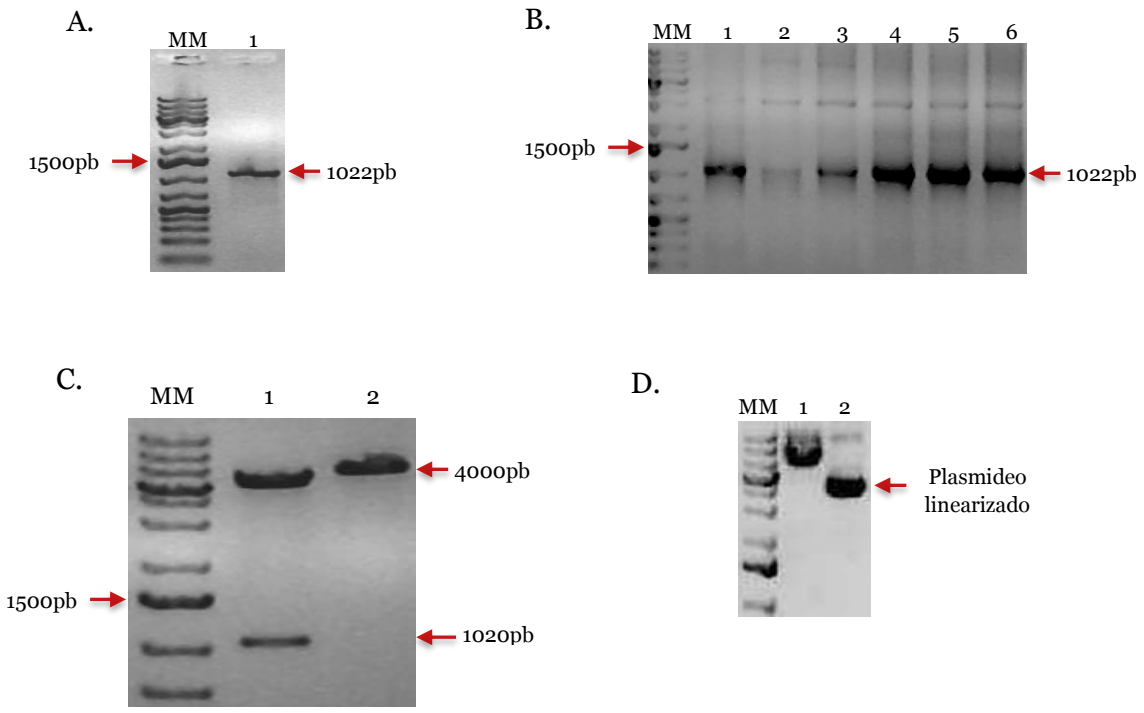


Figura 57 - Eletroforese em gel de agarose (1 %) corado por brometo de etídio. Painel A: Produto de PCR amplificado com iniciadores pabp1-PTP específicos. MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, amplificação de pabp1-PTP; Painel B: MM. Massa Molecular 1 kb *plus;* 1-6, colônias positivas testadas; Painel C: Digestão de um clone positivo de pabp1-PTP. MM. Massa Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, Produto da digestão; 2, plasmídeo não digerido. A seta indica a banda de 1020pb desejada; Painel D: linearização do plasmídeo para transfecção em célula de *T. brucei* 427. MM. Massa Molecular 1kb *plus*. 1, plasmídeo não linearizado; 2, plasmídeo linearizado com enzima *Nsi*I.

4.7.2 Verificação de três clones positivos por *Western blotting*

O vetor pN-PURO-PTP contendo a sequência que codifica para PABP1 (do ATG ao *stop códon*) fusionada ao PTP na porção N-terminal inseriu-se no genoma do parasita para a produção da proteína e, após diluições seriadas, alguns clones foram isolados. Para verificação da inserção correta da seqüência alvo no genoma, realizou-se a reação de PCR com oligo-

nucleotídeos Tb*pabp*911 For (out) e TbPABP1 PTP inverso, que resultou na presença de uma banda de ~720 pb, como esperado (Figura 58, Painel A). O mesmo clone também foi analisado para a produção da proteína fusionada ao PTP-tag utilizando *Western Blotting* revelado com o anticorpo anti-proteína A (Figura 58, Painel B). Na figura, a canaleta 1 representa um extrato de proteína de uma cultura de *T. brucei* cepa 427 não transfectada (controle negativo), na canaleta 2 foi utilizada uma cepa transfectada com o vetor pC-PTP/PSTK como controle positivo do experimento. Os três clones testados apresentam uma banda de aproximadamente 80kDa (60kDa da PABP1 + 19 kDa do tag PTP), demonstrando que o parasita incorporou o vetor e foi capaz de expressão a proteína alvo com a etiqueta como esperado.

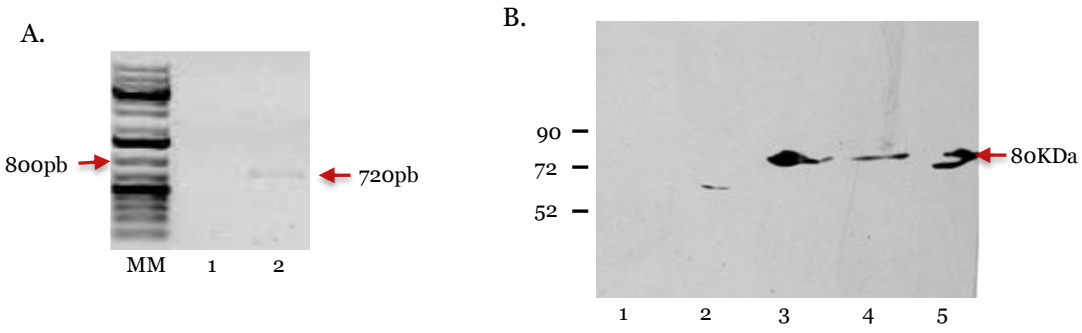


Figura 58 - Painel A Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio dos produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos: 1, *T. brucei* cepa 427, controle negativo; 2, *T. brucei* transfectado com PABP1; Painel B - *Western Blotting* do extrato nuclear revelado com o anticorpo anti-Proteína A (diluição ½.000): 1, *T. brucei* cepa 427 (não transfectada); 2, *T. brucei* transfectado com PSTK-PTP tag (controle positivo); 3-5, Três clones selecionados transfectados com PABP1-PTP tag. As setas indicam as bandas de interesse.

4.7.3 Imunoprecipitação com IgG Sepharose

Após confirmação da expressão da proteína de fusão, o extrato nuclear proveniente de uma cultura de *T. brucei* transfectado (Y4), foi testado em relação à capacidade da proteína A presente na fusão de ligar-se à resina de IgG-Sepharose. Este teste foi importante, pois a especificidade dessa ligação é determinante para o sucesso da técnica de PTP-tag. PABP1 fusionada à cauda do PTP-tag demonstrou alto grau de ligação à resina contendo IgG, como apresentado na Figura 59. O controle negativo desta reação indicou a incapacidade do anticorpo secundário anti-IgG de coelhos em reconhecer a IgG imobilizada na resina.

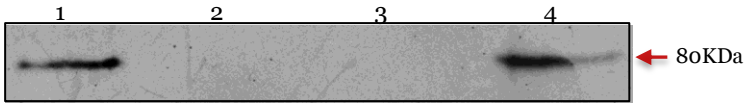


Figura 59 - *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose com anticorpo anti-Prot A (diluição 1:2.000); 1, *Input*, extrato protéico de *T. brucei* transfectado; 2, Sobrenadante (não ligado); 3, Controle negativo, apenas IgG-Sepharose.; 4, Imunoprecipitação (proteína ligada a IgG-Sepharose). A seta indica a banda da proteína de interesse.

4.7.4 PTP-tag

Após realizar as verificações necessária, o experimento de PTP-tag foi realizado em maior escala utilizando-se 4L de cultura de *T. brucei* transfectado com pN-PURO PTP/PABP1. Primeiramente realizou-se a purificação utilizando a matriz de IgG Sepharose valendo da interação da mesma com o epítopo de Proteína A fusionada a proteína, seguiu-se com a clivagem de parte da cauda no sítio da protease TEV. O material eluido foi então submetido a uma segunda purificação na qual a proteína C tem afinidade pela matriz imobilizada com anticorpo anti-proteína C na precensa de íons Ca^{+2}. A eluição foi realizada quelando o Ca^{+2} e consequentemente interrompendo a afinidade entre proteína e matriz. O resultado apresentado no gel SDS-page da Figura 60 demonstra que ao final do processo foi possível observar até 4 bandas de proteínas indicando possíveis ligantes naturais da PABP1. Não foi possível verificar a identidade dessas proteínas devido a sua baixa concentração. Após repetição do experimento aumentando o volume de cultura, as amostras serão analisadas por espectrometria de massa para identificação das mesmas.

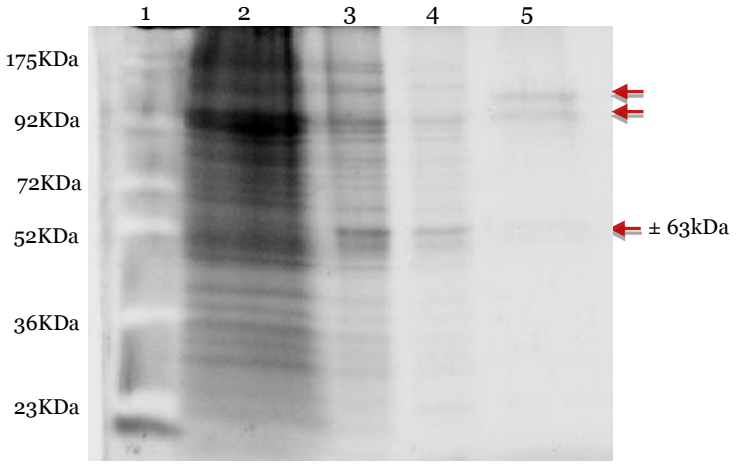


Figura 60 - Eletroforese em SDS-Page 12,5% da purificação em tandem do PTP-tag corado com reagente Sypro Ruby; 1. Padrão de massa molecular; 2. *Input* y4; 3. *Flow through* beeds de anti-ProtA; 4. TEV eluato; 5. Eluído com Ca^{+2} da IgG sepharose anti-ProtC (proteína alvo mais os seus ligantes). Em destaque pela seta a banda correspondente a proteína *Tb*PABP1

5 Discussão

Considerando o número de funções associadas com a poli-A*binding protein* e suas interações tanto com o RNA quanto com outras proteínas, as questões não respondidas estão em maior número do que evidências que possuímos sobre ela. Atualmente a buscar é por entender em quais dentre tantas funções a PABP é essencial para a célula. O consenso mostra que a sua habilidade em reconhecer o mRNA e combinar funções recrutando outros elementos celulares são os fatores essenciais de sua atuação.

Kinetoplastidas são considerados bons modelos celulares para entendimento de funções e processos bioquímicos e celulares, pois são um grupo divergente dos eucariotos bastante distante evolutivamente dos animais, plantas e fungos [186].

Até então, os homólogos da poli-A *binding protein* 1 tem sido descritos em diversos tripanosomatideos; o primeiro a ser identificado foi o gene de *T. cruzi* (*Tc*PABP1) [187], em seguida o homólogo em *T. brucei* (*Tb*PABP1), [127] apresentando 88,7% de similaridade com *Tc*PABP1. Já em *Leishmania major* foram descritas 3 PABPs e a *Lm*PABP1 apresenta apenas 35% de identidade de sequência com suas homólogas *T. cruzi e T. brucei* e a relação de homologia entre elas está sendo reavaliada diante da baixa identidade verificada [188].

O envolvimento de PABP1 na tradução tem sido bastante investigado [189] [188] [99], bem como sua atuação no processo de poliadenilação/deadenilação [24] e exportação do mRNA do núcleo [99]. Porém, algumas publicações recentes que tratam de proteínas envolvidas no processamento do mRNA, especificamente por *splicing* [91], utilizando proteínas Sm [93] e proteínas ligantes de U1 snRNP como isca [91], apresentam a PABP1 como um ligante natural desses complexos .

A dúvida ainda não esclarecida aponta para a possibilidade da PABP ser um dos elos entre as maquinarias de *splicing* e poliadenilação via U1 snRNP em eucariotos [62]. Sua ligação ao complexo de U1 é bastante interessante, uma vez que a função de U1 snRNP em tripanossomas sempre foi uma questão intrigante pois era atribuída exclusivamente ao processo de *cis-splicing* [190]. Por sua vez em outros eucariotos, U1 snRNP (principalmente sua proteína U1A) parece ter função na poliadenilação por associação com a PAP (poli-A polimerase) [191] evento esse que é dependente da PABP1.

A relação entre *trans-splicing* e poliadenilação em tripanossomatideos já havia sido sugerida,[103, 192 - 193] propondo que esse acoplamento permite que durante o processo de *splicing*/poliadenilação sequências sinalizadoras no pré-mRNA são mascaradas, gerando transcri-

tos intermediários (processamento incompleto) que não podem ser traduzidos e precisaram sofrer nova clivagem para gerar mRNAs monocistrônicos [194], uma maneira elegante do parasita realizar um controle da expressão gênica.

Nossos resultados nesse sentido mostram clara influencia da *Tb*PABP1 nos processos de *cis* e *trans splicing* do mRNA, sustentando a hipótese anteriormente proposta de acoplamento dos dois processos uma vez que PABP1 é a primeira proteína ligante da cauda poli-A gerada pela poliadenilação. A idéia de uma regulação gênica mediada pelo processo de *splicing*/poliadenilação é comum em metazoários, mas pouco explorada em organismos unicelulares [195]. No entanto, os sinais celulares que determinam qual gene e quando seu transcrito será "ativado" permanece uma incógnita. Nesse sentido os resultados apresentados aqui podem contribuir para a discussão de quais elementos celulares estão envolvidos na regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos, na busca dos fatores celulares aos quais se ligam as proteínas chave para os processos determinantes na viabilidade do mRNA, na sua maturação e processamento pos transcricional.

Outro questionamento levantado foi a relação entre o estresse induzido pela variação de microambiente entre os estágios de vida do parasita e sua resposta mediante a essa mudança e qual a relação dessa variação com a plasticidade fisiológica dos kinetoplastidas.

Esses organismos unicelulares são capazes de rearranjar sua expressão gênica principalmente com duas finalidades: *i)* otimizar sua sobrevivência em resposta a mudanças ambientais; *ii)* para dar início a uma cascata de alterações bioquímicas e moleculares que alteram seu estágio no ciclo celular para adaptar-se a novas condições do hospedeiro. Nos dois casos, a alteração da expressão do seu arsenal gênico está relacionada com mudanças transcricionais (sua frequência) e/ou variações pós-transcricionais como maturação do pré-mRNA, exportação do mRNA do núcleo, meia vida do mRNA e eficiência de tradução [196], eventos nos quais, sem exceção, a poli-A-*binding protein* está envolvida.

Sob esse panorama, nossos resultados, juntamente com a literatura, nos permitem propor que a *Tb*PABP1 pode ser uma das proteínas na interface desse processo de regulação da expressão gênica, figurando como uma proteína ligante do mRNA e também com capacidade de se ligar a outras proteínas envolvidas no metabolismo do mRNA como ferramenta para a modulação da expressão gênica nos kinetoplastidas. Essa hipótese é corroborada pelo resultado do experimento de RNA de interferência que indica dependência do parasita pela proteína PABP1; se ela de fato media a ligação do mRNA com fatores de transcrição, sua ausência seria realmente letal ao parasito, como foi observado.

A separação das funções associadas às PABPs nuclear e citoplasmática também mereceu destaque. Em mamíferos, o compartilhamento das funções, na qual ambas as PABs se ligam ao mesmo mRNA tem sido fortemente suportado por resultados experimentais [184, 18]. Em kinetoplastidas, o estudo das PABPs de *Leishmania major* sustenta a idéia de funções não redundantes entre as homólogas citoplasmática e nuclear; PABP1 participa essencialmente no início da tradução no citoplasma e a PABP2 atua no metabolismo do mRNA no núcleo. Ainda mais intrigante é a presença de uma terceira PABP nesse organismo com função similar a da PABP2, mas que não apresenta homólogos em *T. cruzi* nem em *T. brucei* [188].

Em contradição com essa hipótese, outras RNA-*binding proteins* (RBPs) como a *Tc*UBP, um conhecido ligante da *Tc*PABP1, tem papel na estabilização/degradação do mRNA no citoplasma. Essa proteína apresenta-se parcialmente localizada no núcleo em condições celulares normais e um grande acúmulo no mesmo compartimento sob condições de estresse causado por arsenito [197]. Esses dados sugerem que algumas RBPs podem fazer a ligação entre os processos de metabolismo do mRNA dentro e fora do núcleo, mesmo tendo diferentes mecanismos de trânsito entre os compartimentos. Os resultados obtidos com a *Tb*PABP1 de relocalização nuclear também contradiz a hipótese de não redundância de funções citoplasmáticas e nucleares da PABP1 em *L. major*. Nossa hipótese é que seu trânsito núcleo-citoplasma sob condições específicas pode indicar uma função na reorganização dos genes ativos mediante as mudanças no microambiente em que o parasita está exposto. Ligada a mRNAs específicos, sua relocalização parcial observada nos nossos experimentos podem representar a entrada de genes específicos que precisam ser desativados no núcleo em resposta a condições do ambiente e manutenção de outros genes ativos na tradução no citoplasma, uma vez que também observamos sua presença no citoplasma sob as mesmas condições. A PABP1 então apresenta função nos dois compartimentos, diferente do que se propunha anteriormente.

Um trabalho recente utilizando a droga Actinomicina D, potente inibidor de transcrição, mostrou um panorama das PABPs em kinetoplastidas. Os resultados mostraram que tanto a PABP1 de *T. cruzi* quanto PABP2 de *L. mexicana*, migram para o núcleo celular sob ação da droga, mais especificamente para o nucléolo celular, resultado não observado com a PABP2 de *T. brucei*. Diferentemente do que se imaginava, a proteína *Tb*PABP2 está localizada no citoplasma sob condições normais e não sofre relocalização ou migração para o núcleo quando exposta ao inibidor [112, 198]. Nossos resultados juntamente com os apresentados na literatura criam um impasse sobre as funções das PABPs entre os kinetoplastidas e mais ainda entre as homólogas de *T. brucei*.

Os resultados obtidos nesse trabalham respondem algumas questões e também adicionam variantes a esse cenário. Sob condições padrão a *Tb*PABP1 é observada no citoplasma celular, como previsto entre os homólogos em kinetoplastidas, apesar disso, sua ausência implicou em alterações significativas nos eventos de *splicing* que são essencialmente nucleares. Onde então atuam as duas homólogas PABP1 e PABP2 em *T. brucei*? Por que Leishmania possuem 3 homólogos de PABP com funções não redundantes nos compartimentos e *T. brucei* e *T. cruzi* possuem apenas duas homólogas e com funções semelhantes?

Nossos experimentos de *dry lab* em parceria com o aluno José Fernando Bachega estão sendo realizados para tentarmos usar a técnica de modelagem por homologia comparando os modelos dentro e fora do grupo dos kinetoplastidas na busca de respostas filogenéticas para essas perguntas.

Sabe-se também que a importação da *Tc*PABP1 para o núcleo é um processo ativo, energia dependente [112], assim pode-se assumir ser esta uma resposta celular específica e não uma consequência da desorganização da maquinaria da célula frente a presença do inibidor. Extrapolando o resultado para a homóloga em *T. brucei*, a relocalização da proteína foi considerada um evento celular valido para a reorganização da célula diante do agente externo, uma vez que ao cessar a adição do inibidor, a condição citoplasmática da *Tb*PABP1 era recuperada.

Juntos, esses dados levam a uma reflexão sobre as funções da proteína de interesse no parasita: *i)* em *T. brucei* a separação de funções e compartimentos entre PABP1 e PABP2 não acontece tão definidamente quanto em *L. major* uma vez que *Tb*PABP1 está envolvida com *splicing* no núcleo e relocaliza para esse comportamento sob condições específicas e *Tb*PABP2 não possui localização nuclear em condições normais; *ii)* a presença dos homólogos com funções mas abrangentes pode ser uma forma do parasito modular a expressão gênica e consequentemente a síntese protéica mediante a diferenciação celular do mesmo nos seus estágios de vida; *iii)* a sequência da *Tb*PABP1 possui sinalização para entrada no núcleo e a mesma pode ser umas das proteínas envolvidas no transporte do mRNA através da membrana nuclear sem necessariamente haver troca do sítio de ligação das PABPs 1 e 2 na cauda poli-A do mRNA durante o transito núcleo-citoplasma.

Sendo assim, a relocalização pode ser explicada de duas formas que não são mutuamente excludentes. A primeira é que sob condições normais a PABP1 tenha uma fase nuclear que é evidenciada pela inibição da transcrição e a segunda é que a relocalização nuclear pode ser um sensor de estresse, uma resposta celular mediadora que sequestra mRNAs específicos para mudar os padrões de expressão gênica diante do novo cenário. Essa hipótese também foi utili-

zada para explicar alguns fenômenos de relocalização nucleolar de outras RBPs [198], e que podem ser extrapolados na nossa argumentação.

Reunidos, nossos dados expandem para os tripanossomatideos a idéia já existente entre os metazoários de PABPs com funções não limitadas a compartimentos. Nossos resultados suportam essa hipótese tanto pela observação da participação da PABP1 no *splicing* quanto pela sua migração para o núcleo em ambientes adversos ao parasita. Sendo os kinetoplastidas um ramo ancestral na divergência dos eucariotos, analisar as relações entre elas pode ser bastante útil no entendimento da filogenia das PABPs bem como no entendimento dessa via bioquímica no parasita e identificação de possíveis alvos bioquímicos promissores para inibição.

6 Conclusões e Perspectivas

- A produção da proteína recombinante ocorreu de maneira satisfatória e anticorpos específicos foram produzidos. Apesar disso a mesma se mostrou muito instável para prosseguir com os experimentos estruturais. Para tanto, modificações nos protocolos de expressão e purificação estão sendo realizadas pelo aluno de mestrado Gustavo Lima que seguirá com os estudos estruturais das homólogas *Tb*PABP1 e *Tb*PABP2
- O experimento de RNAi mostrou que a *Tb*PABP1 é vital para o parasita e que na sua ausência as células ficam estacionadas na fase < G_1 do ciclo mitótico, acumulando núcleos e kinetoplastos. Esse experimento ainda possibilitou que usássemos a cepa recombinante *Tb*PABP1/p2T7 para realizar as análises do conteúdo de mRNA na ausência da proteína em estudo
- O anticorpo anti-PABP1 foi utilizado para detectar tanto a proteína recombinante quanto a proteína nativa no parasito. Além disso, possibilitou a avaliação da localização celular da proteína PABP1 sob condições normais e com tratamento com o inibidor de transcrição Actinomicina D
- O experimento de PTP-tag está sendo repetido em maior escala para que a amostra final possa ser detectada por espectometria de massa em colaboração com o Instituto Carlos Chagas em Curitiba.
- Estudos de modelagem molecular estão sendo realizados com o auxílio dos alunos de doutorado José Fernando Bachega e Victor Caldas e o aluno de mestrado Gustavo Lima em busca de aperfeiçoar a construção da proteína recombinante visando os experimentos de cristalização além de buscar um enfoque filogéntico no estudo da proteína, comparando-a com seus homólogos entre os tripanossomatídeos e em grupos externos.

Referências

1 WANG, P. et al. Sm core variation in spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins from Trypanosoma brucei. **EMBO Journal,** v. 25, n. 19, p. 4513-23, Oct 2006. ISSN 0261-4189..

2 HOTCHKISS, T. L. et al. Trypanosoma brucei poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 98, n. 1, p. 117-29, Jan 1999. ISSN 0166-6851.

3 MELLO, C. C. **RNA interference**. 2008. Disponível em: http://integratedhealthcare.eu/1/en/rna_interference/1498/. Acesso em: 10/10/2011.

4 ESCHENAZI, B. ***Trypanosoma cruzi* forms**. 2009. Disponível em: http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical/5 . Acesso em: 20/10/2011.

5 ORGANIZATION, W. H. ***Neglected tropical diseases*.** 2011. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index2.html . Acesso em: 10/09/2011.

6 CONCERN, L. I. O. P. O. P. H. **African Trypanosomiasis.** 2009. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm. Acesso em: 10/09/2011.

7 LASDA, E. L.; KUERSTEN, S.; BLUMENTHAL, T. SL trans-splicing in a Caenorhabditis elegans in vitro extract. **Cold Spring Harbor Protocols,** v. 10, protocolo 5574, 2011. ISSN 1559-6095.

8 ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2004.

9 LIMA, M. A. C. Genética Online **Processamento do mRNA: poliadenilação.** 2011. Disponível em: http://aprendendogenetica.blogspot.com/2011/04/aula-4-biologia-processamento.html. Acesso em: 10/09/2011.

10 KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotechnic Histochemistry,** v. 70, n. 5, p. 220-33, Sept. 1995. ISSN 1052-0295.

11 WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. **The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine**. **Cell,** v. 136, n. 4, p. 701-18, Feb. 2009. ISSN 1097-4172.

12 KHAZINA, E.; WEICHENRIEDER, O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 106, n. 3, p. 731-6, Jan. 2009. ISSN 1091-6490.

13 SIMARRO, P. P.; JANNIN, J.; CATTAND, P. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? **PLoS Medicine,** v. 5, n. 2, p. e55, Feb. 2008. ISSN 1549-1676.

14 PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal,** v. 82, n. 972, p. 649-57, Oct. 2006. ISSN 1469-0756.

15 WOOD, M.; YIN, H.; MCCLOREY, G. Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. **PLoS Genetics,** v. 3, n. 6, p. e109, June 2007. ISSN 1553-7404.

16 MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology,** v. 6, n. 4, p. 459-74, Apr. 2011. ISSN 1746-0921.

17 LIANG, X. H. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell,** v. 2, n. 5, p. 830-40, Oct. 2003. ISSN 1535-9778.

18 LEMAY, J. F. et al. Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. **RNA Biology,** v. 7, n. 3, p. 291-5, 2010 June 2010. ISSN 1555-8584.

19 DEO, R. C. et al. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. **Cell,** v. 98, n. 6, p. 835-45, Sept. 1999. ISSN 0092-8674.

20 BAG, J.; BHATTACHARJEE, R. B. Multiple levels of post-transcriptional control of expression of the poly (A)-binding protein. **RNA Biology,** v. 7, n. 1, p. 5-12, 2010 Jan-Feb. 2010. ISSN 1555-8584.

21 PATEL, A. A.; STEITZ, J. A. Splicing double: insights from the second spliceosome. **Nature Reviews Molecula Cell Biology,** v. 4, n. 12, p. 960-70, Dec. 2003. ISSN 1471-0072.

22 PETTITT, J. et al. Spliced leader trans-splicing in the nematode Trichinella spiralis uses highly polymorphic, noncanonical spliced leaders. **RNA,** v. 14, n. 4, p. 760-70, Apr. 2008. ISSN 1469-9001.

23 CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO Journal,** v. 21, n. 8, p. 1881-8, Apr. 2002. ISSN 0261-4189.

24 KÜHN, U. et al. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. **Journal of Biological Chemistry,** v. 284, n. 34, p. 22803-14, Aug. 2009. ISSN 1083-351X.

25 KOZLOV, G. et al. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 98, n. 8, p. 4409-13, Apr. 2001. ISSN 0027-8424.

26 REY, L. **Parasitologia:** parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**.** 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

27 BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiases. **Lancet,** v. 362, n. 9394, p. 1469-80, Nov. 2003. ISSN 1474-547X.

28 BRENNAND, A. et al. Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. **Molecular Biochemical Parasitology**, Feb. 2011. ISSN 1872-9428.

29 SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology,** v. 3, n. 11, p. 1041-7, Nov. 2002. ISSN 1529-2908.

30 CHAGAS, C. Nova tripanosomaze humana. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 1, p. (159-218), 1909.

31 BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

32 SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct. 2007. ISSN 0074-0276.

33 PRATA, A. Chagas' disease. **Infectious Disease Clinics North America,** v. 8, n. 1, p. 61-76, Mar. 1994. ISSN 0891-5520.

34 NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2000.

35 BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy,** v. 27, n. 6, p. 916-20, June 1985. ISSN 0066-4804.

36 BARRETT, M. P. et al. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. **British Journal Pharmacololy,** v. 152, n. 8, p. 1155-71, Dec. 2007. ISSN 0007-1188.

37 LAXMAN, S.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. **Molecular Interventions,** v. 7, n. 4, p. 203-15, Aug. 2007. ISSN 1534-0384.

38 KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation,** v. 113, n. 4, p. 496-504, 2004. ISSN 0021-9738.

39 FAIRLAMB, A. H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. **Trends in Parasitology,** v. 19, n. 11, p. 488-494, 2003. ISSN 1471-4922.

40 OUAISSI, A.; OUAISSI, M. Molecular basis of Trypanosoma cruzi and Leishmania interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. **Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis (Warsz),,** v. 53, n. 2, p. 102-14, 2005 Mar-Apr. 2005. ISSN 0004-069X.

41 FRAYHA, G. J. et al. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **Gen Pharmacol,** v. 28, n. 2, p. 273-99, Feb 1997. ISSN 0306-3623.

42 SATHER, S.; AGABIAN, N. A 5' spliced leader is added in trans to both alpha- and beta-tubulin transcripts in Trypanosoma brucei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 82, n. 17, p. 5695-9, Sept. 1985. ISSN 0027-8424.

43 ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research,** v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan. 2010. ISSN 1362-4962.

44 PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 146, n. 2, p. 135-41, Apr. 2006. ISSN 0166-6851.

45 PALFI, Z.; BINDEREIF, A. Immunological characterization and intracellular localization of trans-spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins in Trypanosoma brucei. **Journal Biological Chemistry,** v. 267, n. 28, p. 20159-63, Oct. 1992. ISSN 0021-9258.

46 TESSIER, L. H. et al. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to premature mRNAs by trans-splicing in Euglena. **EMBO Journal,** v. 10, n. 9, p. 2621-5, Sep 1991. ISSN 0261-4189.

47 KRAUSE, M.; HIRSH, D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in C. elegans. **Cell,** v. 49, n. 6, p. 753-61, June 1987. ISSN 0092-8674.

48 RAJKOVIC, A. et al. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite Schistosoma mansoni. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 87, n. 22, p. 8879-83, Nov. 1990. ISSN 0027-8424.

49 VANDENBERGHE, A. E.; MEEDEL, T. H.; HASTINGS, K. E. mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. **Genes Development,** v. 15, n. 3, p. 294-303, Feb. 2001. ISSN 0890-9369.

50MAIR, G.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. Cotranscriptional cap 4 formation on the Trypanosoma brucei spliced leader RNA. **Journal Biological Chemistry,** v. 275, n. 37, p. 28994-9, Sept. 2000. ISSN 0021-9258.

51 VARANI, G. A cap for all occasions. **Structure,** v. 5, n. 7, p. 855-8, July 1997. ISSN 0969-2126.

52 SHUMAN, S. The mRNA capping apparatus as drug target and guide to eukaryotic phylogeny. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology,** v. 66, p. 301-12, 2001. ISSN 0091-7451.

53 BANGS, J. D. et al. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **Journal Biological Chemistry,** v. 267, n. 14, p. 9805-15, May 1992. ISSN 0021-9258.

54 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. New York: W. H Freeman and Company, 2010. 1158

55 HOOGSTRATEN, C. G.; SUMITA, M. Structure-function relationships in RNA and RNP enzymes: recent advances. **Biopolymers,** v. 87, n. 5-6, p. 317-28, 2007 Dec. 5-15 2007. ISSN 0006-3525.

56 ENGLERT, M. et al. Branchiostoma floridae has separate healing and sealing enzymes for 5'-phosphate RNA ligation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 107, n. 39, p. 16834-9, Sept. 2010. ISSN 1091-6490.

57 MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** v. 100, n. 5, p. 501-13, Aug. 2005. ISSN 0074-0276.

58 KONARSKA, M. M.; VILARDELL, J.; QUERY, C. C. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. **Molecular Cell,** v. 21, n. 4, p. 543-53, Feb. 2006. ISSN 1097-2765.

59 BOOTHROYD, J. C.; CROSS, G. A. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei have a short, identical exon at their 5' end. **Gene,** v. 20, n. 2, p. 281-9, Dec. 1982. ISSN 0378-1119.

60 MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA,** v. 6, n. 2, p. 163-9, Feb. 2000. ISSN 1355-8382.

61 BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 416-22, July 2005. ISSN 1095-9203.

62 PALFI, Z.; LANE, W. S.; BINDEREIF, A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from Trypanosoma brucei. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 121, n. 2, p. 233-43, May 2002. ISSN 0166-6851.

63 DJIKENG, A. et al. Characterization of a candidate Trypanosoma brucei U1 small nuclear RNA gene. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 113, n. 1, p. 109-15, Mar. 2001. ISSN 0166-6851.

64 GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryotic Cell,** v. 9, n. 8, p. 1159-70, Aug. 2010. ISSN 1535-9786.

65 CAMPBELL, D. A.; THORNTON, D. A.; BOOTHROYD, J. C. Apparent discontinuous transcription of Trypanosoma brucei variant surface antigen genes. **Nature,** v. 311, n. 5984, p. 350-5, 1984 Sept. 27-Oct 3 1984. ISSN 0028-0836.

66 SUTTON, R. E.; BOOTHROYD, J. C. Evidence for trans splicing in trypanosomes. **Cell,** v. 47, n. 4, p. 527-35, Nov. 1986. ISSN 0092-8674.

67 O'MULLANE, L.; EPERON, I. C. The pre-mRNA 5' cap determines whether U6 small nuclear RNA succeeds U1 small nuclear ribonucleoprotein particle at 5' splice sites. **Molecular Cellular Biology,** v. 18, n. 12, p. 7510-20, Dec. 1998. ISSN 0270-7306.

68 BENZ, C. et al. Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 143, n. 2, p. 125-34, Oct. 2005. ISSN 0166-6851.

69 ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **Journal Biological Chemistry,** v. 270, n. 35, p. 20365-9, Sept. 1995. ISSN 0021-9258.

70 CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R.; YU, M. C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. **Parasitology Today,** v. 16, n. 2, p. 78-82, Feb. 2000. ISSN 0169-4758.

71 GÜNZL, A. et al. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in Trypanosoma brucei. **Eukaryot Cell,** v. 2, n. 3, p. 542-51, June 2003. ISSN 1535-9778.

72 TOOR, N. et al. Crystal structure of a self-spliced group II intron. **Science,** v. 320, n. 5872, p. 77-82, Apr. 2008. ISSN 1095-9203.

73 BLENCOWE, B. J. Alternative splicing: new insights from global analyses. **Cell,** v. 126, n. 1, p. 37-47, July 2006. ISSN 0092-8674.

74 BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annual Review Biochemistry,** v. 72, p. 291-336, 2003. ISSN 0066-4154.

75 JIA, Y.; MU, J. C.; ACKERMAN, S. L. Mutation of a U2 snRNA Gene Causes Global Disruption of Alternative Splicing and Neurodegeneration. **Cell,** v. 148, n. 1-2, p. 296-308, Jan. 2012. ISSN 1097-4172.

76 HERMANN, H. et al. snRNP SM proteins share 2 evolutionarily conserved sequence motifs which are involved insm protein-protein interactions. **EMBO Journal,** v. 14, n. 9, p. 2076-2088, 1995. ISSN 0261-4189.

77 HARTSHORNE, T.; AGABIAN, N. A new U2 RNA secondary structure provided by phylogenetic analysis of trypanosomatid U2 RNAs. **Genes Development,** v. 4, n. 12A, p. 2121-31, Dec. 1990. ISSN 0890-9369.

78 BELL, M.; BINDEREIF, A. Cloning and mutational analysis of the Leptomonas seymouri U5 snRNA gene: function of the Sm site in core RNP formation and nuclear localization. **Nucleic Acids Research,** v. 27, n. 20, p. 3986-94, Oct. 1999. ISSN 1362-4962.

79 DENKER, J. A. et al. Multiple requirements for nematode spliced leader RNP function in trans-splicing. **RNA,** v. 2, n. 8, p. 746-55, Aug. 1996. ISSN 1355-8382.

80 LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 4th. New York: W. H. Freeman, 2000. 1084

81 ACHSEL, T. et al. The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein. **Molecular Biochemical Parasitology,,** v. 18, n. 11, p. 6756-66, Nov. 1998. ISSN 0270-7306.

82 MARCHETTI, M. A. et al. Physical and transcriptional analysis of the Trypanosoma brucei genome reveals a typical eukaryotic arrangement with close interspersionof RNA polymerase II- and III-transcribed genes. **Nucleic Acids Research,** v. 26, n. 15, p. 3591-8, Aug. 1998. ISSN 0305-1048.

83 LÜHRMANN, R.; KASTNER, B.; BACH, M. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. **Biochimica Biophysica Acta,** v. 1087, n. 3, p. 265-92, Nov. 1990. ISSN 0006-3002.

84 STARK, H. et al. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. **Nature,** v. 409, n. 6819, p. 539-42, Jan. 2001. ISSN 0028-0836.

85 SÉRAPHIN, B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. **EMBO Journal,** v. 14, n. 9, p. 2089-98, May 1995. ISSN 0261-4189.

86 KAMBACH, C.; WALKE, S.; NAGAI, K. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. **Current Opinion Structural Biology,** v. 9, n. 2, p. 222-30, Apr. 1999. ISSN 0959-440X.

87 PALFI, Z. et al. The spliceosomal snRNP core complex of Trypanosoma brucei: cloning and functional analysis reveals seven Sm protein constituents. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 16, p. 8967-72, Aug. 2000. ISSN 0027-8424.

88 TKACZ, I. D. et al. Identification of the heptameric Lsm complex that binds U6 snRNA in Trypanosoma brucei. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 160, n. 1, p. 22-31, July 2008. ISSN 0166-6851.

89 TKACZ, I. D. et al. Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in Trypanosoma brucei. **RNA,** v. 13, n. 1, p. 30-43, Jan. 2007. ISSN 1355-8382.

90 PALFI, Z. et al. U1 small nuclear RNP from Trypanosoma brucei: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. **Nucleic Acids Research,** v. 33, n. 8, p. 2493-503, 2005. ISSN 1362-4962..

91 TKACZ, I. D. et al. Analysis of spliceosomal proteins in Trypanosomatids reveals novel functions in mRNA processing. **Journal Biological Chemistry,** v. 285, n. 36, p. 27982-99, Sept. 2010. ISSN 1083-351X.

92 CROSS, M. et al. The trans-spliceosomal U2 snRNP protein 40K of Trypanosoma brucei: cloning and analysis of functional domains reveals homology to a mammalian snRNP protein. **EMBO Journal,** v. 12, n. 3, p. 1239-48, Mar. 1993. ISSN 0261-4189.

93 LUZ AMBRÓSIO, D. et al. Spliceosomal proteomics in Trypanosoma brucei reveal new RNA splicing factors. **Eukaryotic Cell,** v. 8, n. 7, p. 990-1000, July 2009. ISSN 1535-9786.

94 BARTELS, C. et al. The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. **EMBO Reports,** v. 3, n. 9, p. 875-80, Sept. 2002. ISSN 1469-221X.

95 SILVA, M. T. et al. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** v. 106, n. 2, p. 130-8, Mar. 2011. ISSN 1678-8060.

96 NOTTROTT, S.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. **EMBO Journal,** v. 21, n. 20, p. 5527-38, Oct. 2002. ISSN 0261-4189.

97 LIU, S. et al. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. **RNA,** v. 12, n. 7, p. 1418-30, July 2006. ISSN 1355-8382.

98 EDMONDS, M. A history of poly A sequences: from formation to factors to function. **Progress Nucleic Acid Research Molecular Biology,** v. 71, p. 285-389, 2002. ISSN 0079-6603.

99 MANGUS, D. A.; EVANS, M. C.; JACOBSON, A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. **Genome Biology,** v. 4, n. 7, p. 223, 2003. ISSN 1465-6914.

100 AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell,** v. 61, n. 7, p. 1157-60, June 1990. ISSN 0092-8674.

101 WAHLE, E.; KELLER, W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. **Annual Review Biochemistry,** v. 61, p. 419-40, 1992. ISSN 0066-4154.

102 ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular Cellular Biology,** v. 13, n. 1, p. 720-5, Jan. 1993. ISSN 0270-7306.

103 MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Development,** v. 8, n. 4, p. 491-501, Feb. 1994. ISSN 0890-9369.

104 DE GAUDENZI, J.; FRASCH, A. C.; CLAYTON, C. RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryotic Cell,** v. 4, n. 12, p. 2106-14, Dec. 2005. ISSN 1535-9778.

105 CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 156, n. 2, p. 93-101, Dec. 2007. ISSN 0166-6851.

106 COUGHLIN, B. C. et al. Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. **Journal Biological Chemistry,** v. 275, n. 16, p. 12051-60, Apr. 2000. ISSN 0021-9258.

107 BROOKS, D. R. et al. The stage-regulated expression of Leishmania mexicana CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. **Journal Biological Chemistry,** v. 276, n. 50, p. 47061-9, Dec. 2001. ISSN 0021-9258.

108 ROLIN, S. et al. Mild acid stress as a differentiation trigger in Trypanosoma brucei. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 93, n. 2, p. 251-62, June 1998. ISSN 0166-6851.

109 KRIEGER, M. A. et al. Differential gene expression during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** v. 94 Suppl 1, p. 165-8, 1999. ISSN 0074-0276.

110 CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Molecular Microbiology,** v. 65, n. 3, p. 655-70, Aug. 2007. ISSN 0950-382X.

111 KRAMER, S. et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. **Journal Cell Science,** v. 121, n. Pt 18, p. 3002-14, Sept. 2008. ISSN 0021-9533.

112 NÁZER, E.; VERDÚN, R. E.; SÁNCHEZ, D. O. Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in Trypanosoma cruzi. **PLoS One,** v. 6, n. 5, p. e19920, 2011. ISSN 1932-6203.

113 ANDERSEN, J. S. et al. Nucleolar proteome dynamics. **Nature,** v. 433, n. 7021, p. 77-83, Jan. 2005. ISSN 1476-4687.

114 DREYFUSS, G.; KIM, V. N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 3, n. 3, p. 195-205, Mar. 2002. ISSN 1471-0072.

115 KIELKOPF, C. L.; LÜCKE, S.; GREEN, M. R. U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. **Genes Development,** v. 18, n. 13, p. 1513-26, July 2004. ISSN 0890-9369.

116 BURD, C. G.; DREYFUSS, G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. **Science,** v. 265, n. 5172, p. 615-21, July 1994. ISSN 0036-8075.

117 BLOBEL, G. A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 70, n. 3, p. 924-8, Mar. 1973. ISSN 0027-8424.

118 SACHS, A. B.; DAVIS, R. W.; KORNBERG, R. D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. **Molecular Cell Biology,** v. 7, n. 9, p. 3268-76, Sept. 1987. ISSN 0270-7306.

119 SACHS, A. B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. **Cell,** v. 74, n. 3, p. 413-21, Aug. 1993. ISSN 0092-8674.

120 KÜHN, U.; WAHLE, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. **Biochimica Biophysica Acta,** v. 1678, n. 2-3, p. 67-84, May 2004. ISSN 0006-3002.

121 KRAUSE, S. et al. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. **Experimental Cell Research,** v. 214, n. 1, p. 75-82, Sept. 1994. ISSN 0014-4827.

122 SACHS, A. B.; BOND, M. W.; KORNBERG, R. D. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. **Cell,** v. 45, n. 6, p. 827-35, June 1986. ISSN 0092-8674.

123 WAHLE, E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. **Cell,** v. 66, n. 4, p. 759-68, Aug. 1991. ISSN 0092-8674.

124 ADAM, S. A. et al. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. **Molecular Cell Biology,** v. 6, n. 8, p. 2932-43, Aug. 1986. ISSN 0270-7306.

125 FUKAMI-KOBAYASHI, K.; TOMODA, S.; GO, M. Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. **FEBS Letters,** v. 335, n. 2, p. 289-93, Dec. 1993. ISSN 0014-5793.

126 KÜHN, U.; PIELER, T. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. **Journal Molecular Biology,** v. 256, n. 1, p. 20-30, Feb. 1996. ISSN 0022-2836.

127 PITULA, J.; RUYECHAN, W. T.; WILLIAMS, N. Trypanosoma brucei: identification and purification of a poly(A)-binding protein. **Experimental Parasitology,** v. 88, n. 2, p. 157-60, Feb. 1998. ISSN 0014-4894.

128 DE MELO NETO, O. P.; STANDART, N.; MARTINS DE SA, C. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. **Nucleic Acids Research,** v. 23, n. 12, p. 2198-205, June 1995. ISSN 0305-1048.

129 WAHLE, E. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. **Journal Biologycal Chemistry,** v. 270, n. 6, p. 2800-8, Feb. 1995. ISSN 0021-9258.

130 HAMMELL, C. M. et al. Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. **Molecular Cellular Biology,** v. 22, n. 18, p. 6441-57, Sept. 2002. ISSN 0270-7306.

131 ALLEN, N. P. et al. Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. **Journal Biological Chemistry,** v. 276, n. 31, p. 29268-74, Aug. 2001. ISSN 0021-9258.

132 THAKURTA, A. G.; HO YOON, J.; DHAR, R. Schizosaccharomyces pombe spPABP, a homologue of Saccharomyces cerevisiae Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. **Yeast,** v. 19, n. 9, p. 803-10, June 2002. ISSN 0749-503X.

133 BRUNE, C. et al. Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. **RNA,** v. 11, n. 4, p. 517-31, Apr. 2005. ISSN 1355-8382.

134 HOSODA, N.; LEJEUNE, F.; MAQUAT, L. E. Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. **Molecular Cellular Biology,** v. 26, n. 8, p. 3085-97, Apr. 2006. ISSN 0270-7306.

135 DUNN, E. F. et al. Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. **Genes Development,** v. 19, n. 1, p. 90-103, Jan. 2005. ISSN 0890-9369.

136 SHI, Y. et al. Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. **Molecular Cell,** v. 33, n. 3, p. 365-76, Feb. 2009. ISSN 1097-4164.

137 LEMIEUX, C.; BACHAND, F. Cotranscriptional recruitment of the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 to nascent transcripts and association with translating mRNPs. **Nucleic Acids Research,** v. 37, n. 10, p. 3418-30, June 2009. ISSN 1362-4962.

138 ISHIGAKI, Y. et al. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. **Cell,** v. 106, n. 5, p. 607-17, Sept. 2001. ISSN 0092-8674.

139 BENOIT, B. et al. An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in Drosophila. **Developmental Cell,** v. 9, n. 4, p. 511-22, Oct. 2005. ISSN 1534-5807.

140 PROWELLER, A.; BUTLER, J. S. Ribosome concentration contributes to discrimination against poly(A)- mRNA during translation initiation in Saccharomyces cerevisiae. **Journal Biological Chemistry,** v. 272, n. 9, p. 6004-10, Feb. 1997. ISSN 0021-9258.

141 SACHS, A. B.; DAVIS, R. W. Translation initiation and ribosomal biogenesis: involvement of a putative rRNA helicase and RPL46. **Science,** v. 247, n. 4946, p. 1077-9, Mar. 1990. ISSN 0036-8075.

142 TARUN, S. Z. et al. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 94, n. 17, p. 9046-51, Aug. 1997. ISSN 0027-8424.

143 LE, H. et al. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. **Journal Biological Chemistry,** v. 272, n. 26, p. 16247-55, June 1997. ISSN 0021-9258.

144 BI, X.; REN, J.; GOSS, D. J. Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and eIFiso4F helicase activity by increasing the ATP binding affinity of eIF4A. **Biochemistry,** v. 39, n. 19, p. 5758-65, May 2000. ISSN 0006-2960.

145 ROY, G. et al. Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. **Molecular Cellular Biology,** v. 22, n. 11, p. 3769-82, June 2002. ISSN 0270-7306.

146 SACHS, A. B.; VARANI, G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. **Nature Structure Molecular Biology,** v. 7, n. 5, p. 356-61, May 2000. ISSN 1072-8368.

147 PREISS, T.; MUCKENTHALER, M.; HENTZE, M. W. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. **RNA,** v. 4, n. 11, p. 1321-31, Nov. 1998. ISSN 1355-8382.

148 PARKER, R.; SONG, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. **Nature Structure Molecular Biology,** v. 11, n. 2, p. 121-7, Feb. 2004. ISSN 1545-9993.

149 JACOBSON, A.; PELTZ, S. W. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. **Annual Review Biochemistry,** v. 65, p. 693-739, 1996. ISSN 0066-4154.

150 MUHLRAD, D.; DECKER, C. J.; PARKER, R. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. **Molecular Cellular Biology,** v. 15, n. 4, p. 2145-56, Apr. 1995. ISSN 0270-7306.

151 MORRISSEY, J. P. et al. Decapping of stabilized, polyadenylated mRNA in yeast pab1 mutants. **Yeast,** v. 15, n. 8, p. 687-702, June 1999. ISSN 0749-503X.

152 COLLER, J. M.; GRAY, N. K.; WICKENS, M. P. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. **Genes Development,** v. 12, n. 20, p. 3226-35, Oct. 1998. ISSN 0890-9369.

153 CAPONIGRO, G.; PARKER, R. Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. **Genes Development,** v. 9, n. 19, p. 2421-32, Oct. 1995. ISSN 0890-9369.

154 WILUSZ, C. J. et al. Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. **RNA,** v. 7, n. 10, p. 1416-24, Oct. 2001. ISSN 1355-8382.

155 FASKEN, M. B.; CORBETT, A. H. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. **RNA Biology,** v. 6, n. 3, p. 237-41, 2009 July-Aug. 2009. ISSN 1555-8584. .

156 HILLEREN, P. et al. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. **Nature,** v. 413, n. 6855, p. 538-42, Oct. 2001. ISSN 0028-0836.

157 BÜTTNER, K.; WENIG, K.; HOPFNER, K. P. The exosome: a macromolecular cage for controlled RNA degradation. **Molecular Microbiology,** v. 61, n. 6, p. 1372-9, Sept. 2006. ISSN 0950-382X.

158 STOECKLIN, G.; MAYO, T.; ANDERSON, P. ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. **EMBO Reports,** v. 7, n. 1, p. 72-7, Jan. 2006. ISSN 1469-221X.

159 PARKER, R.; SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Molecular Cell,** v. 25, n. 5, p. 635-46, Mar. 2007. ISSN 1097-2765.

160 HOLETZ, F. B. et al. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in Trypanosoma cruzi. **FEBS Journal,** v. 277, n. 16, p. 3415-26, Aug. 2010. ISSN 1742-4658.

161 BATES, E. J.; KNUEPFER, E.; SMITH, D. F. Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids Research,** v. 28, n. 5, p. 1211-20, Mar. 2000. ISSN 1362-4962.

162 CHO, P. F. et al. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. **Cell,** v. 121, n. 3, p. 411-23, May 2005. ISSN 0092-8674.

163 MAYHO, M. et al. Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in Trypanosoma brucei: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. **Nucleic Acids Research,** v. 34, n. 18, p. 5312-24, 2006. ISSN 1362-4962.

164 PORATH, J. et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature,** v. 258, n. 5536, p. 598-9, Dec. 1975. ISSN 0028-0836.

165 PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression Purification,** v. 3, n. 4, p. 263-81, Aug. 1992. ISSN 1046-5928.

166 SAMBROOK, D. W. R. **Molecular Cloning:** a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

167 VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin World Health Organization,** v. 53, n. 1, p. 55-65, 1976. ISSN 0042-9686.

168 BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature,** v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan. 2001. ISSN 0028-0836.

169 ELBASHIR, S. M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. **EMBO Journal,** v. 20, n. 23, p. 6877-88, Dec. 2001. ISSN 0261-4189.

170 KERSCHEN, A. et al. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. **Febs Letters,** v. 566, n. 1-3, p. 223-228, 2004. ISSN 0014-5793.

171 JORGENSEN, R. A. et al. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology,** v. 31, n. 5, p. 957-973, 1996. ISSN 0167-4412.

172 NGÔ, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 95, n. 25, p. 14687-92, Dec. 1998. ISSN 0027-8424.

173 BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms os *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Tropica,** v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979. ISSN 0001-706X.

174 NAM, D. K. et al. Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 99, n. 9, p. 6152-6, Apr. 2002. ISSN 0027-8424.

175 FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry,** v. 132, n. 1, p. 6-13, July 1983. ISSN 0003-2697.

176 BASU, S. et al. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). **Journal Visualized Experiments**, v. 10, n. 41, p. 1-4 2010. ISSN 1940-087X.

177 HAMMARTON, T. C. et al. Stage-specific differences in cell cycle control in Trypanosoma brucei revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. **Journal Biological Chemistry,** v. 278, n. 25, p. 22877-86, June 2003. ISSN 0021-9258.

178 PUIG, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. **Methods,** v. 24, n. 3, p. 218-29, July 2001. ISSN 1046-2023.

179 RIGAUT, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology,** v. 17, n. 10, p. 1030-2, Oct. 1999. ISSN 1087-0156.

180 SCHIMANSKI, B.; NGUYEN, T. N.; GÜNZL, A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. **Eukaryotic Cell,** v. 4, n. 11, p. 1942-50, Nov. 2005. ISSN 1535-9778.

181 GÜNZL, A.; SCHIMANSKI, B. Tandem affinity purification of proteins. **Current Protocols Protein Science,** v. Chapter 19, Unit 19.19, Feb. 2009. ISSN 1934-3663.

182 THANGIMA ZANNAT, M.; BHATTACHARJEE, R. B.; BAG, J. Depletion of cellular poly (A) binding protein prevents protein synthesis and leads to apoptosis in HeLa cells. **Biochemical Biophysical Research Communications,** v. 408, n. 3, p. 375-81, May 2011. ISSN 1090-2104.

183 GÖRLACH, M.; BURD, C. G.; DREYFUSS, G. The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. **Experimental Cell Research,** v. 211, n. 2, p. 400-7, Apr. 1994. ISSN 0014-4827.

184 AFONINA, E.; STAUBER, R.; PAVLAKIS, G. N. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. **Journal Biological Chemistry,** v. 273, n. 21, p. 13015-21, May 1998. ISSN 0021-9258.

185 SCHWEDE, A. et al. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Research,** v. 37, n. 16, p. 5511-28, Sept. 2009. ISSN 1362-4962..

186 DACKS, J. B.; WALKER, G.; FIELD, M. C. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. **Parasitology International,** v. 57, n. 2, p. 97-104, June 2008. ISSN 1383-5769.

187 BATISTA, J. A. et al. Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. **Molecular Biochemical Parasitology,** v. 67, n. 2, p. 301-12, Oct. 1994. ISSN 0166-6851.

188 DA COSTA LIMA, T. D. et al. Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic Cell,** v. 9, n. 10, p. 1484-94, Oct. 2010. ISSN 1535-9786.

189 GALLIE, D. R. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. **Gene,** v. 216, n. 1, p. 1-11, Aug. 1998. ISSN 0378-1119.

190 IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 436-42, July 2005. ISSN 1095-9203.

191 GUAN, F. et al. A bipartite U1 site represses U1A expression by synergizing with PIE to inhibit nuclear polyadenylation. **RNA,** v. 13, n. 12, p. 2129-40, Dec. 2007. ISSN 1469-9001.

192 LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. **Genes Development,** v. 7, n. 6, p. 996-1007, June 1993. ISSN 0890-9369.

193 HUG, M. et al. Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. **Molecular Cellular Biology,** v. 14, n. 11, p. 7428-35, Nov. 1994. ISSN 0270-7306.

194 JÄGER, A. V. et al. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 104, n. 7, p. 2035-42, Feb. 2007. ISSN 0027-8424.

195 SCHWEDE, A.; KRAMER, S.; CARRINGTON, M. How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? **Protoplasma**, May 2011. ISSN 1615-6102.

196 SCHWEDE, A.; KRAMER, S.; CARRINGTON, M. How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? **Protoplasma**, May 2011. ISSN 1615-6102.

197 CASSOLA, A.; FRASCH, A. C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **Journal Biological Chemistry,** v. 284, n. 50, p. 35015-28, Dec. 2009. ISSN 1083-351X.

198 NÁZER, E.; SÁNCHEZ, D. O. Nucleolar Accumulation of RNA Binding Proteins Induced by ActinomycinD Is Functional in Trypanosoma cruzi and Leishmania mexicana but Not in T. brucei. **PLoS One,** v. 6, n. 8, p. e24184, 2011. ISSN 1932-6203.

Anexo

Pranchas de fluorescência

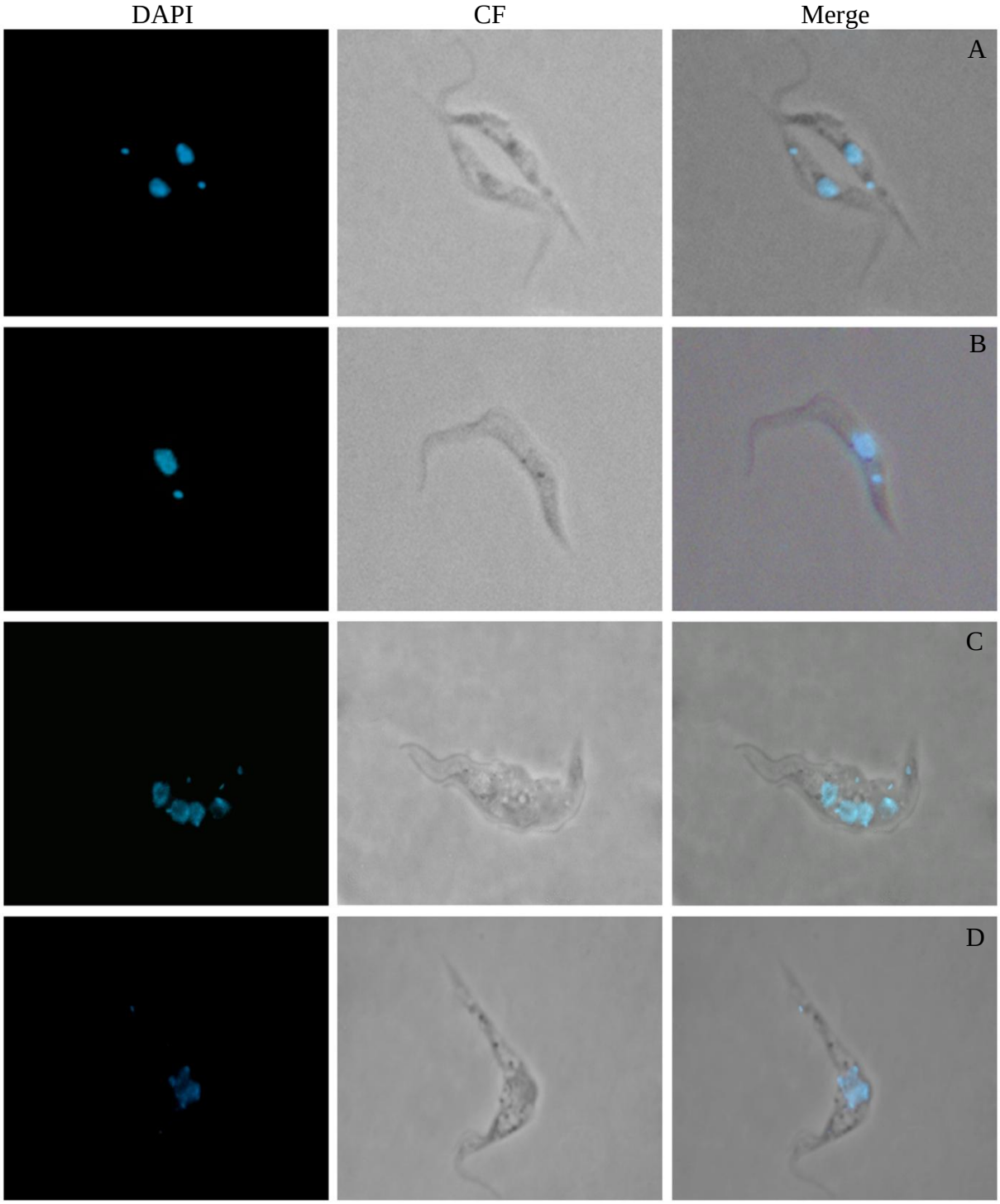


Figura 49 - Imagens de microscopia de contraste de fase (CF), marcada com DAPI e a sobre-posição das duas imagens (MERGE). Painel A: Célula selvagem da cepa 29-13 ; Painel B: controle –Tet (célula transfectada mas não onduzida); Painel C: +Tet após 24h de indução; Painel D: +Tet após 48h de indução.

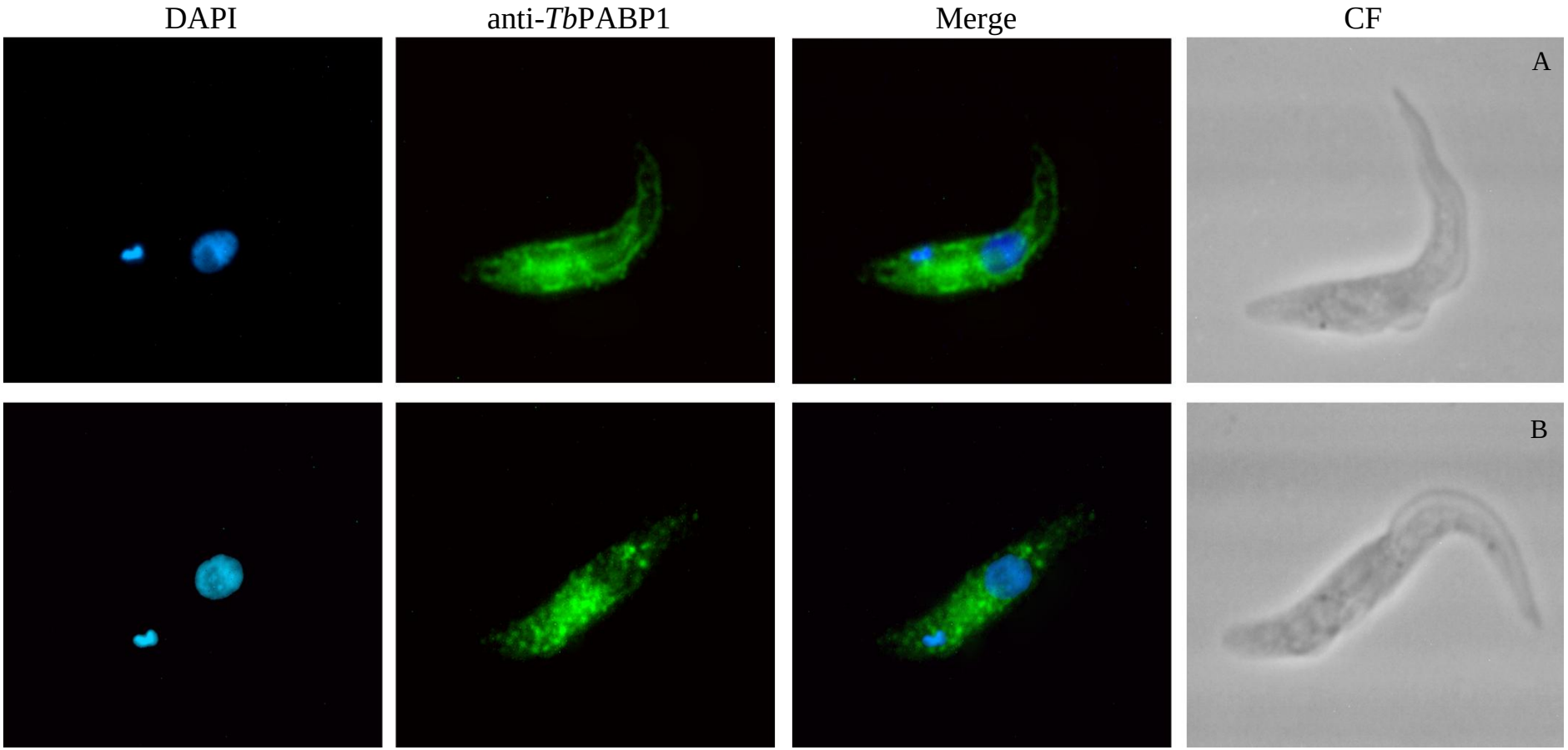


Figura 53 - Painel A e B representando a imunolocalização da proteína *Tb*PABP1. Imagens de microscopia de contraste de fase do parasito marcado com DAPI (DNA), com anticorpo anti-*Tb*PABP1 e sobreposição das imagens (Merge). O contraste de fase está representado em CF.

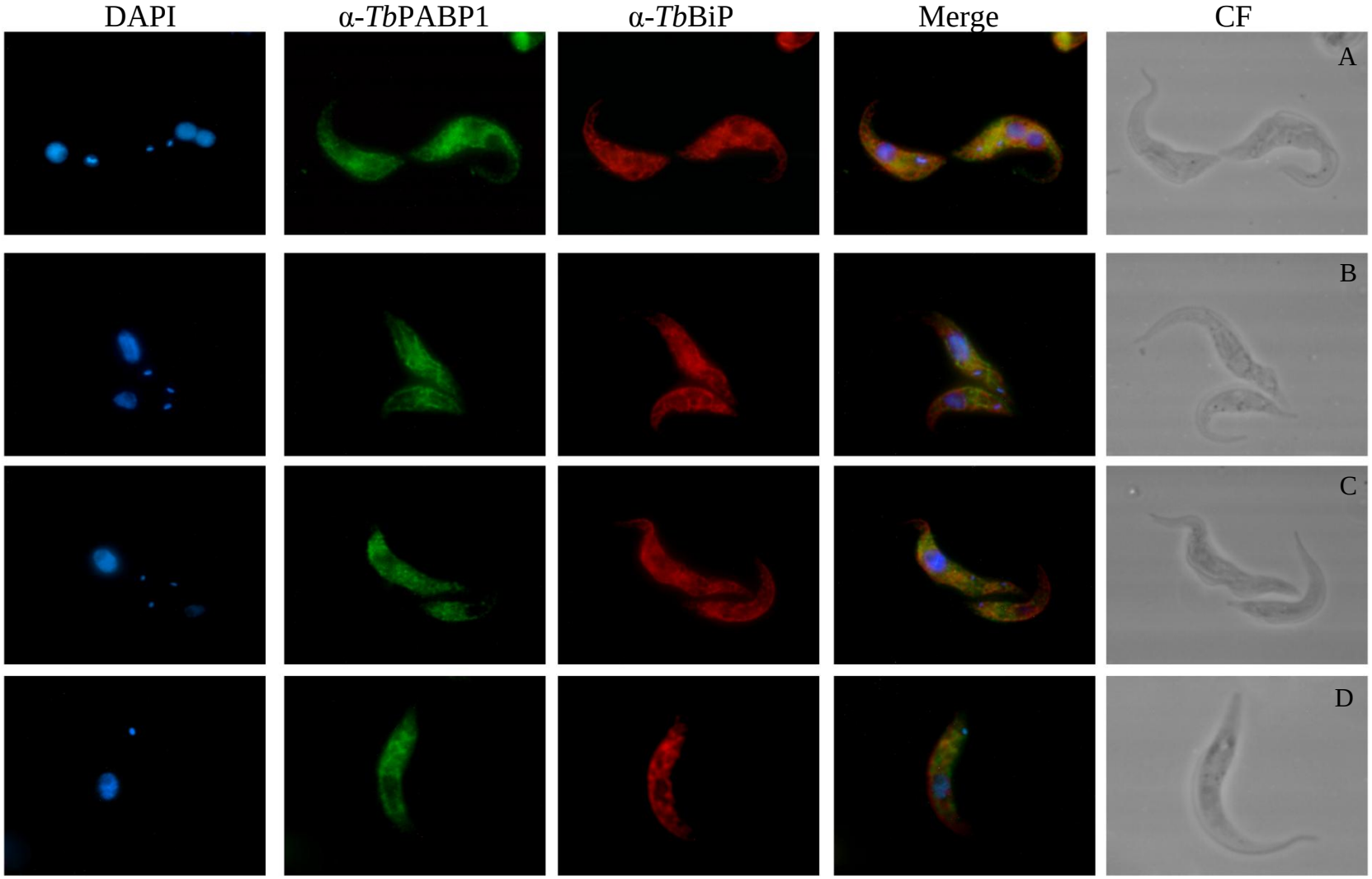


Figura 54 - Painel de marcação dupla utilizando os anticorpos *Tb*PABP1 e o marcador de retículo endoplasmático *Tb*BiP incubados com parasitas da cepa *Tb*427 selvagem. Também estão representadas as marcações com DAPI (DNA) e o contraste de fase (CF). A sobreposição das imagens (Merge) indica localização reticular da proteína de interesse *Tb*PABP1.

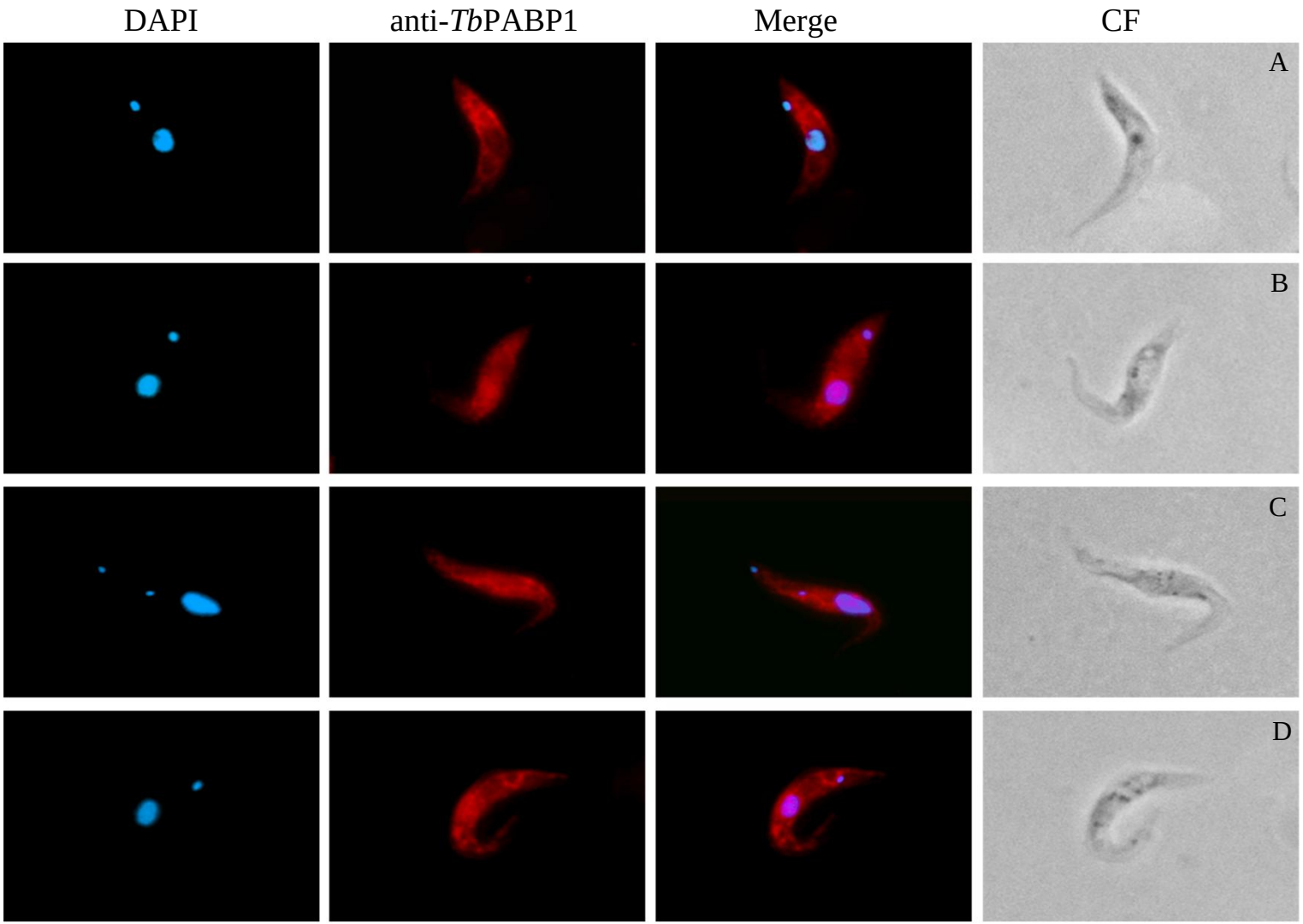


Figura 55 - Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo anti-TbPABP1 em parasitos da cepa Tb427 com diferentes tratamentos; A. Tb427 sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga.

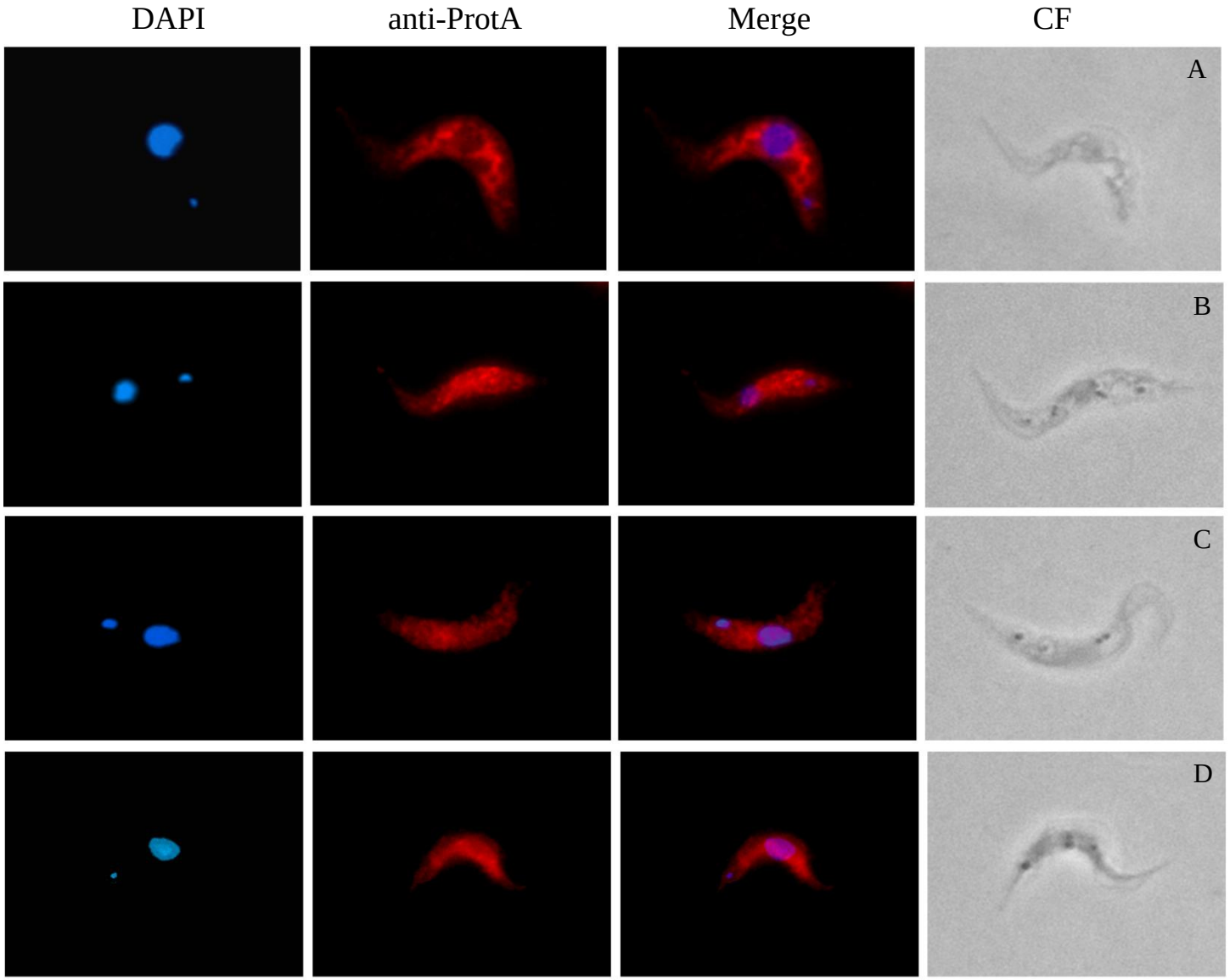


Figura 56 - Painel de imunolocalização utilizando o anticorpo α-ProtA em parasitos da cepa transfectada *Tb*PABP1/ptp-tag com diferentes tratamentos; A. *Tb*PABP1/ptp-tag sem incubação com a droga, controle negativo; B. Parasita incubado com 10µg de ActD por 24h; C. Parasita incubado com 20µg de ActD por 24h; D. Parasita incubado com 50µg de ActD por 24h; observa-se relocalização nuclear desde a primeira incubação com a droga.