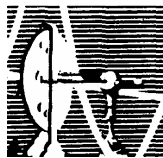


GISELLE GUIMARÃES GOMES

CARACTERIZAÇÃO DO LÓCUS *TcRRM/Tcp28* DE *TRYPANOSOMA*

CRUZI

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Gomes, Giselle G.

Caracterização do Locus TcRRM/Tcp28 de *Trypanosoma cruzi*

Giselle Guimarães Gomes. Rio de Janeiro: UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2008.

xiii, 100p. il.

Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Biologia Molecular e Estrutural.

1 - RNABP. 2 - *Trypanosoma cruzi*. 3 - Tese (Dout. - UFRJ/IBCCF)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro, sob a orientação de Rosane Silva e com apoio financeiro da FAPERJ, CAPES, CNPq, PRONEX e FUJB.

“Ciência é muito mais uma maneira de pensar do que um corpo de conhecimento”.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Rosane, por todo apoio e incentivo. Ao Edson e ao Turán pela co-orientação constante. Ao Bill e ao César pelo auxílio na bancada.

A todos os membros do Laboratório de Metabolismo Macromolecular pelo clima constantemente agradável, pelas discussões e pelos vários ombros amigos.

À Bia e à Cinthia, um agradecimento especial pela grande ajuda.

Aos companheiros dos outros laboratórios, ao Celso, ao Camacho, ao Dione, ao Zé, ao Paulo, à Emile, à Tereza, à Renata, à Michele, à Scheila e a todos os outros pelos tantos galhos quebrados nestes anos todos.

À professora Tecia, à professora Thaís e ao professor Peralta pela contribuição, sem a qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Ao meu maridinho, que após 13 anos ainda está ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na riqueza e na pobreza e sempre me dando força, nem que isso signifique ir ao Fundão no fim de semana só para me fazer companhia.

Aos meus amigos do INPI, de Campo Grande, da Fiocruz, ex e atuais lemêmês, todos que sempre me deram força e nunca me deixaram desistir.

À minha família, e aqui eu repito o que disse no mestrado, que tem o maior orgulho de mim, mesmo sem fazer a menor idéia do que eu faço!

À Elisa, pelo apoio profissional, sem a menor sombra de dúvida, fundamental.

ABREVIATURAS

μ Cu – microcurie

μ g – micrograma

μ l – microlitro

μ M - micromolar

Abs - Absorbância

APS – persulfato de amônio

ARE – elemento rico em adenina e uridina

ARM – motivo rico em arginina

ATP - adenosina trifosfato

BSA – albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar;

cm - centímetros

CPM – contagem por minuto

DEPC - dietilenopirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxirribonucleotídeos trifosfatos

DsRBM – motivo de ligação a RNA fita dupla

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EST – marcadores de seqüências expressas

g – grama

g – gravidade

GRE – elemento rico em guanina

GST – glutationa peptidil S-transferase

HRP – Horseradish Peroxidase

HSP - Proteínas de choque térmico

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – isopropil-1-tio-(β -D-galactopiranosídeo)

Kb - quilobases
kDa – quilodaltons
kDNA – DNA de cinetoplasto
KH – domínio de homologia K
M – molar
mA – mili-ampéres
mg – miligrama
mL – mililitro
mM – milimolar
MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
mRNA – RNA mensageiro
mt-DNA – DNA mitocondrial
N - normal
ng - nanograma
nM - nanomolar
NMR - ressonância nuclear magnética
nt - nucleotídeos
°C – graus Celsius
ORF – fase aberta de leitura
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS – tampão salina-fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH - potencial hidrogeniônico
RAPD – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RBP – proteínas de ligação a RNA
rDNA – DNA ribossomal
RGG – domínio rico em glicina
RNA – ácido ribonucléico
RNAbp – proteínas de ligação a RNA
RNP - ribonucleoproteína
rpm – rotações por minuto

RRM – motivo de reconhecimento do RNA
rRNA – RNA ribossomal
RT-PCR – PCR com transcriptase reversa
SDS – dodecil sulfato de sódio
SL – RNA – RNA *spliced leader*
SSC – salina-citrato de sódio
ssDNA – DNA fita simples
TBE – tris-borato EDTA
TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
TNE – tris-NaCl EDTA
Tris – tris (hidroximetil) aminometano
U - Unidades
UTR – região não traduzida
V – volts
W - watts

RESUMO

Os tripanossomas são um grupo de organismos eucarióticos com muitas características peculiares em sua biologia molecular. A identificação e a caracterização de proteínas de ligação a RNA em *T. cruzi* é particularmente relevante uma vez que elas representam papéis chave nos mecanismos de regulação da expressão gênica. Durante o mestrado, foi possível identificar duas proteínas, TcRRM1 e 2, cada uma apresentando dois domínios de ligação a RNA. Ambas são muito semelhantes a duas proteínas de *T. brucei*, p34 e p37, e a uma ORF anotada no genoma de *Leishmania major*. Os genes RRM de *T. cruzi* são organizados em um tandem alternando com cópias do gene Tcp28, de função desconhecida. Todavia, o acúmulo de transcritos de TcRRM é maior nas formas amastigotas enquanto que para Tcp28, o acúmulo é maior nas formas tripomastigotas. Ambas as proteínas codificadas por estes genes podem ser identificadas em extratos celulares através de ensaios de Western blot. Estes ensaios indicam que a regulação da expressão diferencial ao longo do ciclo para ambos os genes se mantém no nível protéico. As regiões não-traduzidas de ambos os genes foram mapeadas de modo a identificar no futuro possíveis elementos em *cis* envolvidos nesta regulação gênica. Ensaio de imunofluorescência indicam que tanto as proteínas TcRRM como a proteína Tcp28 se localizam no citoplasma. Para TcRRM, parece haver localização diferencial nos tipos celulares. Nas formas epimastigotas, a localização parece ser perinuclear, enquanto que nas formas amastigotas, a localização parece ser abaixo da membrana. Ensaio de ligação preliminares sugerem uma possível capacidade de ligação da proteína TcRRM1 a polirribonucleotídeos.

ABSTRACT

Trypanosomes are a group of eukaryotic organisms with many peculiarities in their molecular biology. The identification and characterization of RNA binding proteins in *T. cruzi* is particularly relevant once they play key roles in the gene expression regulation mechanisms. In a previous work, it was possible to identify two proteins, TcRRM1 and 2, each presenting two RNA binding domains. Both are very similar to two *T. brucei* proteins, p34 e p37 and to an annotated ORF in *Leishmania major*. The TcRRM genes are organized in an tandem with alternating copies of Tcp28, of unknown function. However, TcRRM transcript accumulation is higher in amastigotes while for Tcp28 transcripts, accumulation is higher in trypomastigotes. Both proteins can be identified in total cell extracts through Western blot assays. These assays indicate that the differential express regulation found in the RNA level along the biologic cycle can still be found in the protein level. The untranslated regions of both genes were mapped in order to identify, in the future, possible cis elements involved in this gene regulation. Immunofluorescence assays indicate that both TcRRM and Tcp28 proteins are cytoplasmic. TcRRM may have a different localization on the different cell types. In the epimastigotes, the localization may be perinuclear, while for the amastigotes, the localization may be under the membrane. Preliminary binding assays suggest a possible binding capacity of TcRRM1 to polirribonucleotides.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
ÍNDICE	XI
INTRODUÇÃO	1
A DOENÇA DE CHAGAS	1
A BIOLOGIA DO TRYPANOSOMA CRUZI	2
Taxonomia	2
Ciclo de vida	3
Organização gênica e controle da expressão gênica em tripanossomatídeos	5
A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA	10
O PAPEL DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA NO CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	13
OBJETIVOS	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
MICROORGANISMOS	19
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	19
Clones de <i>T. cruzi</i>	19
LINHAGENS CELULARES	19
OLIGONUCLEOTÍDEOS	19
PLASMÍDEOS UTILIZADOS	20
SONDAS	21
MEIOS DE CULTURA	21
SOLUÇÕES:	22

CULTURA DE TRYPANOSOMA CRUZI	25
Cultura axênica das formas epimastigotas	25
Cultura das formas tripomastigotas e amastigotas em células de mamíferos	25
EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	26
Extração de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Extração de RNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS	27
CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA EM VETORES BACTERIANOS	27
Indução de competência em <i>E. coli</i>	27
Transformação bacteriana	28
Extração de DNA plasmidial em pequena escala	28
ELETROFORESE	29
Eletoforese de DNA em gel de agarose	29
Eletoforese desnaturante de RNA em gel de agarose	29
Eletoforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS – PAGE)	30
Eletoforese em gel de poliacrilamida	31
TRANSFERÊNCIA DE MACROMOLÉCULAS PARA MEMBRANAS	31
Transferência de RNA para membranas de nylon – northern blot	31
Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose – western blot	32
HIBRIDIZAÇÃO A SONDAS MOLECULARES	32
Marcação de sondas de DNA por iniciação randômica	32
Marcação de sondas de DNA por <i>end-labeling</i>	33
Marcação de sondas de RNA por transcrição <i>in vitro</i>	33
Reação de hibridização à sonda homóloga	33
IMUNOBLOT	34
CONSTRUÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES	35
Reação em Cadeia da Polimerase	35
Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose	35
Reação de ligação do vetor ao produto de PCR	35
SEQUENCIAMENTO DE DNA	36
PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	36
IMUNOFLUORESCÊNCIA	37
AVALIAÇÃO DE MEIA VIDA DE MRNA	38
REAÇÃO DE LIGAÇÃO PROTEÍNA-RNA	38
FILTRAGEM EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE	38
PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES	39
RESULTADOS	40
MAPEAMENTO DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (UTRs) DOS GENES TCRRM	40

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA DE T. CRUZI, T. BRUCEI E L. MAJOR.	42
MEIA VIDA DOS RNAs CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS TcRRM	45
PROTEÍNAS TcRRM NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO T. CRUZI	45
LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS TcRRM EM T. CRUZI.	48
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM1 E TcRRM2 A HOMORRIBOPOLÍMEROS	48
AValiaÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM1 A OLIGORIBONUCLEOTÍDEOS	52
ACÚMULO DE mRNA DE Tcp28 NAS 3 DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE T. CRUZI.	56
MAPEAMENTO DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (3´ E 5´UTR) DO GENE Tcp28	56
ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE Tcp28 DE T. CRUZI, T. BRUCEI E L. MAJOR	58
ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE Tcp28 DE T. CRUZI, T. BRUCEI E L. MAJOR	59
ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE Tcp28 DE T. CRUZI, T. BRUCEI E L. MAJOR	60
MEIA VIDA DO RNA CODIFICANTE DA PROTEÍNA Tcp28	60
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE Tcp28	60
PRESENÇA DE Tcp28 NOS 3 DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE T. CRUZI	63
LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA Tcp28 EM T. CRUZI	63
DISCUSSÃO	67
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXO 1	85
RESULTADOS ANTERIORES OBTIDOS NO MESTRADO	85
ANEXO 2	92
GOMES, G.G.; ÜRMÉNYI, T.P.; RONDINELLI, E.; WILLIAMS, N.; SILVA, R. (2004) TcRRMs AND Tcp28 GENES ARE INTERCALATED AND DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN TRYPANOSOMA CRUZI LIFE CYCLE. BBRC 322: 985-992	92

INTRODUÇÃO

A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, identificada em 1909 por Carlos Chagas, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. (Chagas, 1909). Em sua fase aguda a doença pode ser letal, entretanto a infecção geralmente evolui para o estágio crônico. A doença de Chagas é uma antropozoonose geralmente circunscrita à América Latina e é a principal causa de cardiomiopatia crônica no continente (Benchimol-Barbosa, 2006). A imunidade protetora adquirida após a infecção natural não ocorre e não existem vacinas disponíveis para a doença de Chagas (Barret, et.al., 2003). A estimativa mais recente do *Disease Control Priorities Project*, financiado pelo NIH e pelo Banco Mundial, indica uma prevalência total de 9,8 milhões de pessoas em todo o mundo (Schofield, et.al., 2006).

A transmissão clássica da doença de Chagas se dá por insetos da subfamília Triatominae, da família Reduviidae (Ordem: Hemiptera). Os vetores mais importantes são o *Triatoma infestans*, o *Rhodnius prolixus* e o *Pangstrongylus megistus* (Figura 1). Em 9 de junho de 2006, a *Intergovernment Commission of the Southern Cone Initiative Against Chagas Disease* declarou formalmente o Brasil como sendo livre de transmissão pelo *Triatoma infestans*. Todavia, ainda é prematuro acreditar que a doença de Chagas tenha sido conquistada por três principais motivos: primeiramente, as técnicas disponíveis nem sempre eliminam completamente os insetos que habitam o ambiente peridoméstico. Em segundo, as populações selvagens de triatomíneos são amplamente difundidas pelas Américas. Deste modo, mesmo uma eliminação total das populações domésticas pode não ser suficiente contra a reinfestação por populações peridomésticas e selvagens (Schofield, et.al., 2006). Em terceiro, ainda que a transmissão clássica da doença de Chagas através do inseto barbeiro tenha sido controlada com sucesso, a transmissão oral tem sido responsável por registros regionais de episódios epidêmicos da doença em sua forma aguda (Benchimol-Barbosa, 2006). Nestas situações questiona-se o controle do vetor

como solução quando comparado com o pronto diagnóstico e o tratamento específico.

A BIOLOGIA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Taxonomia

O *Trypanosoma cruzi* é classificado no grupo taxonômico *Kinetoplastidae*. Este grupo é definido por apresentar o cinetoplasto, uma rede de mtDNA em círculos concatenados localizada no interior da mitocôndria única e que está associada à base flagelar. Além do *T. cruzi*, neste táxon também se incluem outras espécies do gênero *Trypanosoma*, como o *Trypanosoma brucei* causador da doença do sono na África, além de espécies do gênero *Leishmania* causadoras de leishmaniose, todos na família *Trypanosomatidae*. Assim, este grupo taxonômico possui alta relevância médica e econômica (de Souza, 2002).

O *T. cruzi* é considerado uma espécie única, ainda que apresente alta diversidade genética e fenotípica entre os seus diferentes isolados. Acredita-se, inclusive, que as variações clínicas apresentadas pelos pacientes portadores da doença de Chagas tenham correlação não só com a variabilidade genética do hospedeiro, mas também com as variações apresentadas pelo parasito (Campbell, et.al., 2004).

O táxon *T. cruzi* contém dois grupos definidos: *T. cruzi* I, associado ao ciclo de transmissão selvagem e à infecção em marsupiais e *T. cruzi* II, que consiste de cinco subgrupos relacionados, denominados IIa, IIb, IIc, IId e IIe associado ao ciclo de transmissão doméstico e à infecção em mamíferos placentários.

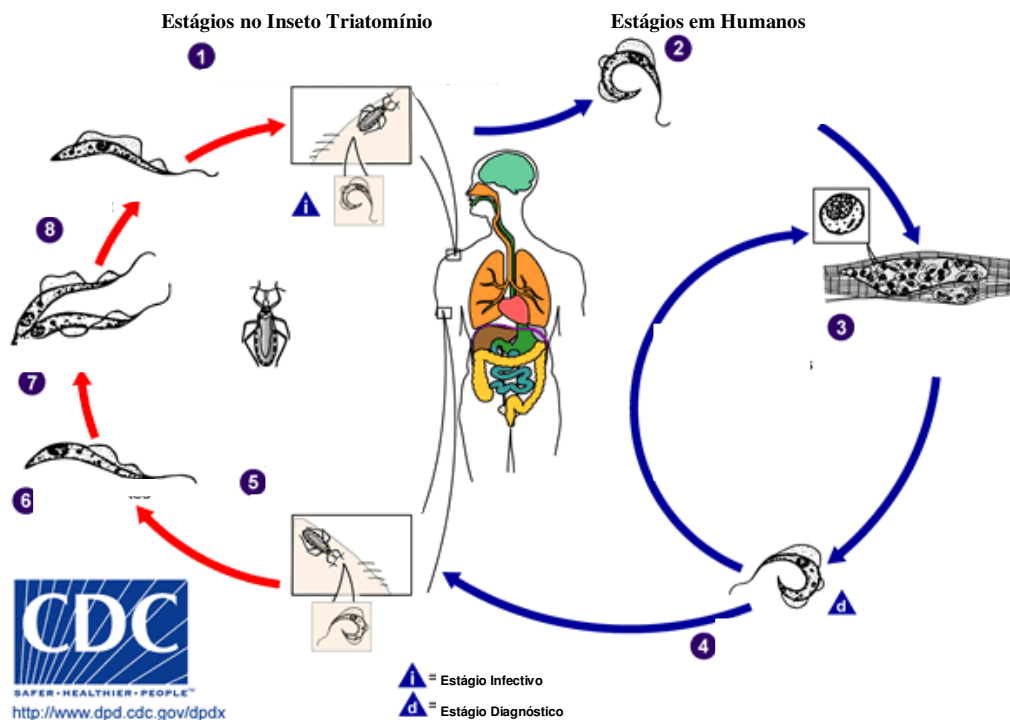
O consórcio de Iniciativa Genômica de *T. cruzi* elegeu como linhagem referência o clone CL Brener, derivado da linhagem CL e membro do subgrupo IIe (The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium, 1997). Mais tarde, mostrou-se que este clone é um híbrido cuja linhagem ancestral é representada pelos subgrupos IIb e IIc (Westenberger, et.al., 2005).

Ciclo de vida

O *T. cruzi* apresenta ao longo do seu ciclo biológico diferentes formas celulares definidas pelo aspecto geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de emergência do flagelo. As formas amastigotas possuem formato arredondado e um pequeno flagelo não visível em microscopia óptica convencional; as formas epimastigotas possuem o corpo celular alongado e são capazes de divisão, assim como os amastigotas, possuindo o cinetoplasto localizado anterior ao núcleo. As formas tripomastigotas metacíclicas e sangüícolas têm o cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo sendo estas formas incapazes de divisão (Figura 1) (revisto por de Souza, 2002).

A transmissão da doença de Chagas pelos insetos se dá após os mesmos ingerirem sangue de um indivíduo infectado. Durante esta ingestão, os insetos defecam e eliminam estágios infectivos do parasito perto da ferida (Figura 1). As formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes são capazes de penetrar nas células do hospedeiro através da ferida, onde se transformam em amastigotas. A multiplicação inicial nos macrófagos no sítio de picada do inseto origina uma reação inflamatória característica, o chagoma. Os macrófagos possuem um papel importante na infecção inicial e no transporte dos parasitas para outros sítios dentro do corpo. No citoplasma das células do hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas se dividem por fissão binária e se transformam em tripomastigotas sangüícolas que, após a ruptura da célula são liberados na corrente sangüínea onde poderão penetrar em novas células do mesmo hospedeiro ou poderão infestar outros insetos. A superfície do parasito é coberta por glicoproteínas tipo mucinas que se ligam à membrana por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas âncoras podem ativar os macrófagos hospedeiros (revisto por de Souza, 2002).

No estômago do inseto, o ciclo continua, quando as formas tripomastigotas sangüícolas ingeridas se diferenciam em epimastigotas que se dividem por fissão binária no intestino e se transformam em tripomastigotas metacíclicas no reto, onde poderão reiniciar o ciclo infectando novo hospedeiro (revisto por Vickerman,



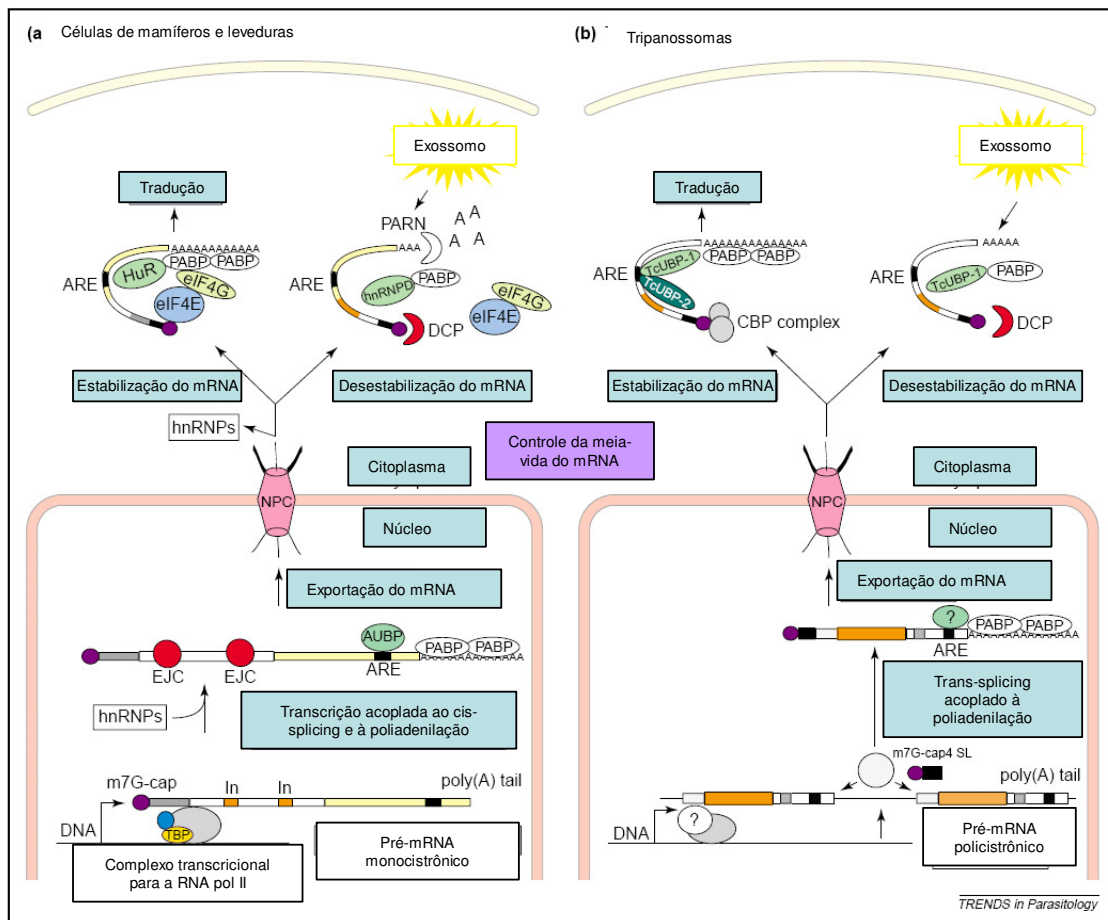
Esquema 1 – (1) O vetor triatomíneo ingere sangue de um indivíduo liberando formas tripomastigotas em suas fezes próximo ao local da ferida. (2) Os tripomastigotas penetram nas células do hospedeiro onde se transformam em (3) amastigotas, que se multiplicam por fissão binária e (4) são liberados na corrente sanguínea como formas tripomastigotas sanguícolas que podem reinfectar novas células (3) ou ser ingerido por um outro vetor (5). No intestino do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas (6), que são capazes de divisão por fissão binária (7) diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos (8) que serão liberados nas fezes podendo reiniciar o ciclo. Fonte: Center for Disease Control and Prevention – USA Government.

1985; Burleigh e Andrews, 1995; Kollien e Schaub, 2000; Tyler e Engman, 2001 e De Souza, 2002).

Organização gênica e controle da expressão gênica em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos divergiram muito inicialmente na linhagem evolutiva eucariótica, evoluindo separadamente por muito tempo. Assim, puderam acumular diversas características exclusivas em sua biologia que são bastante peculiares quando comparadas às encontradas nos eucariotos superiores. Estas características os tornam bastante interessantes como modelo de estudo na biologia celular e molecular. Além do ciclo de vida complexo com diferentes formas celulares adaptadas ao hospedeiro invertebrado e ao hospedeiro mamífero, podemos ressaltar diversas peculiaridades no nível molecular.

Os genes codificantes de proteínas estão arranjados em longos *clusters* de dezenas a centenas de genes na mesma fita de DNA (El-Sayed, et.al., 2005a). Estes genes são transcritos em unidades policistrônicas, separados por pequenas regiões intergênicas. As unidades policistrônicas podem conter cópias de um mesmo gene, como é o caso dos genes da família mucina TcMUC e TcSMUG (Di Noia, et al., 1998 e 2000) e os genes da proteína de choque térmico HSP70 (Requena et al., 1988), ou ainda genes de funções e padrão de expressão distintos como o tandem contendo os genes Amastina/Tuzina (Teixeira et al., 1995); o tandem contendo os genes metaciclogenina/Trypanredoxina Peroxidase/Gene Associado (Mtc/TryP/AG) (Ávila et al., 2001) e o tandem contendo os genes de α - e β -tubulina (Soares et al.; 1989). Assim, alguns autores chegam a afirmar que o arranjo gênico em tripanossomatídeos seria remanescente dos operons bacterianos (Clayton, 2002; D'Orso, et.al., 2003). Todavia, cabe ressaltar que, ao contrário dos operons bacterianos, o arranjo genômico de tripanossomatídeos não inclui um promotor definido, nem engloba genes cujos produtos protéicos exerçam uma função metabólica singular. No entanto, há uma semelhança forte com os operons especialmente porque os genes codificantes de proteína não contêm íntrons; a única exceção encontrada



Esquema 2 – Comparação entre os mecanismos de processamento de RNA em (a) células de mamíferos e de levedura e em (b) tripanossomas. As etapas gerais do processo de maturação dos mRNAs são mostrados nas caixas azuis. O círculo cinza no núcleo dos tripanossomas indica a presença da maquinaria de trans-splicing e de poliadenilação. ARE – Elemento rico em Adenina; PARP – Proteína ligadora da cauda poliA; DCP – Proteína decapeadora; NPC – Complexo do poro nuclear.; HuR – Hu antígeno R; eIF4G e eIF4E – elementos de alongamento 4G e 4F; hnRNP – Ribonucleoproteínas heterogêneas; PARN – PoliA ribonuclease; EJC – complexo de junção de exon; AUBP – Proteína ligadora de Adenina e Uridina; CBP - Proteína ligadora do terminal C. Fonte: Adaptado de D’Orso, 2003.

até agora foi no gene que codifica a poli (A) polimerase (PAP) de *T. brucei* (Mair, *et al.*, 2000). O gene PAP possui um único íntron que obedece à regra GU/AG dos íntrons de *cis-splicing* (Mair, *et al.*, 2000). Do ponto de vista filogenético, a descoberta de *cis-splicing* em tripanosomas unifica o tema de que todos os organismos que possuem *trans-splicing* também possuem *cis-splicing*.

Devido à transcrição policistrônica, a maturação do mRNA em tripanossomas difere do processo que ocorre na maioria dos eucariotos (Figura 2) (revisto por Liang, *et al.*, 2003). As unidades policistrônicas transcritas são posteriormente individualizadas pelos mecanismos de poliadenilação e de *trans-splicing*. Este último foi identificado por Boothroyd e Cross em 1982 quando descobriu-se que o mRNA das proteínas VSG de *T. brucei* carregavam uma seqüência de 39-nucleotídeos comum que foi chamada de seqüência *spliced leader* (SL) ou mini-exon. Mais tarde foi verificado que todos os mRNAs contêm esta seqüência. A estrutura secundária do SL RNA é similar em todos os organismos que apresentam *splicing*, sendo composta por três *stem-loops*, todavia a seqüência não é conservada entre as diferentes espécies. (Liang, *et al.*, 2003).

O mecanismo de *trans-splicing* envolve a junção de dois exons de dois RNAs transcritos separadamente, e sua função primordial em tripanossomatídeos é a maturação da porção final 5' dos RNAs mensageiros codificados nas unidades policistrônicas (revisto por Clayton, 2002). A adição do mini-exon atende a dois propósitos: funciona em conjunto com a poliadenilação na liberação dos transcritos policistrônicos e fornece o cap aos mRNAs (Agabian, 1990).

Ainda que inicialmente descoberto em tripanossomas, o processo de *trans-splicing* foi mais tarde encontrado nos protozoários do filo Euglenozoa (Tessier *et al.*, 1991) e nos metazoários dos filos Nematoda (Krause e Hirsh, 1987) e Platyhelminthes (Rajkovic, *et al.*, 1990), além de cordados (Vandenberghe, *et al.*, 2001).

Os sítios de inserção de *trans-splicing*, como os sítios de *cis-splicing* de outros eucariotos, são precedidos por tratos de polipirimidina (Benz, *et al.*, 2005) Mutações no trato polipirimidínico podem levar à escolha de sítios aberrantes de poliadenilação (Hug, *et al.*, 1993). Nos tripanossomas, a adição da cauda poliA é

acoplada ao processo de *trans-splicing* do gene à jusante (LeBowitz, *et.al.*, 1993). Todavia, recentemente Jägger *et.al.*, (2007) demonstraram que o processamento do RNA policistrônico acoplado à transcrição não é uma regra e alguns destes sítios podem ser ignorados de modo a gerarem longos transcritos estáveis de mRNA contendo mais de uma região codificante e apenas uma sequência mini-exon em sua porção 5' final. Os autores sugeriram que estes RNAs intermediários funcionariam como um “estado de latência traducional” que poderia ser estocado para processamento completo futuro em um transcrito maduro, quando requerido pela célula.

Ao longo do ciclo de vida, o parasita se vê obrigado a multiplicar-se e a adaptar-se a diferentes meios, com diferentes temperaturas, nutrientes e defesas, o que requer uma alteração em seu padrão protéico e significa que a expressão em tripanossomatídeos precisa responder a estes estímulos (Giambiagi-deMarval, *et.al.*, 1996). Em geral, as células dos metazoários não necessitam responder de forma tão rápida às mudanças externas quanto as células dos eucariotos inferiores, pois se encontram em um microambiente mantido relativamente constante. Neste caso, e ainda assim, a regulação sobre o início da transcrição é a forma de controle da expressão gênica mais utilizada, onde elementos presentes no DNA, em conjunto com proteínas de ligação a DNA, endereçam genes para a transcrição pela RNA polimerase II (Taatjes, *et.al.*, 2004). Contudo, nos tripanossomatídeos nenhum promotor para a RNA polimerase II foi identificado, à exceção do promotor do gene *spliced leader* (SL) (Gillinger e Bellofatto, 2001) além do fato de que vários fatores de transcrição basais parecem estar ausentes do genoma, como por exemplo, a proteína ligadora de TATA (Kelly, *et.al.*, 2005). A proteína TATA, uma proteína conservada em eucariotos, é responsável pela transcrição basal da RNA polimerase II. O promotor do gene SL RNA não possui seqüência TATA, tampouco seqüência de reconhecimento do elemento B, assemelhando-se ao promotor do gene snRNA U1 (Gunzl, *et.al.*, 2002). Entretanto, recentemente, identificou-se em *T. brucei* uma forma divergente do fator de transcrição TFIIB que é essencial para a transcrição a partir do promotor do gene SL RNA (Palenchar e Bellofatto 2006).

A transcrição policistrônica nos tripanossomatídeos, em conjunto à ausência de promotores clássicos, indica que a iniciação da transcrição não é um fator limitante na produção do mRNA. Ao contrário, o que parece ocorrer é a transcrição constitutiva de todos os genes (Clayton, 2002). Esta falta de controle da iniciação da transcrição nos parasitas kinetoplastídeos demonstra a importância da regulação durante processos pós-transcricionais específicos, como o *trans splicing* e a estabilidade do mRNA (D'Orso, *et.al.*, 2003). O controle pós-transcricional em organismos eucarióticos é um mecanismo de regulação gênica bastante conservado e inclui a inibição da tradução, a desestabilização de mRNAs, o *splicing* alternativo e o sequestro de mRNAs a corpos subcelulares bem definidos. Em tripanossomas, a regulação parece ser alcançada principalmente pela mudança rápida na meia-vida do RNAm e pelo controle traducional, ao invés da ocorrência de ativação pós-transcricional (D'Orso, *et.al.*, 2003). A estabilidade do mRNA é dependente das regiões não traduzidas e credita-se este tipo de atividade regulatória a fatores que agem em *trans* reconhecendo elementos em *cis* presentes nas regiões não-traduzidas 3' e 5' (Clayton, 2002 e D'Orso, *et.al.*, 2003).

Vários elementos reguladores em *cis* alteram a meia-vida dos RNAs mensageiros maduros, a maioria localizada na região 3'UTR (Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000; Dallagiovanna *et al.*, 2001). Este processo é essencialmente alcançado através de proteínas ligadoras de RNA que formam, em conjunto ao mRNA, complexos ribonucleoprotéicos. É a composição do complexo que determina se o mRNA será transportado ao citoplasma para tradução, degradação ou outro evento de processamento. Proteínas capazes de interagir em *trans* com estes elementos foram identificadas por D'Orso e Frasch (2001b; 2002), mas o mecanismo pelo qual elas agem nos tripanossomatídeos permanece ainda indefinido.

Recentemente, identificou-se em *Trypanossoma cruzi* corpos subcelulares semelhantes a corpos P. Estes são sítios onde o mRNA pode ser decapeado e degradado 5'-3' ou estocado para o retorno subsequente aos polissomos (Holetz *et.al.*, 2007). Cassola *et.al.*, (2007) logo em seguida, demonstraram grânulos

contendo mRNAs que compartilham componentes com corpos P e com grânulos de estresse, inclusive com o recrutamento da proteína TcUBP-1. Estes novos estudos sugerem que não se pode descartar outros mecanismos que envolvam, por exemplo, a acessibilidade de mRNAs à maquinaria de tradução.

Em leveduras e em células de mamíferos, os mecanismos pós-transcricionais também representam papéis importantes na regulação da expressão gênica. Os transcritos presentes em complexos ribonucleoprotéicos se encaminham aos polissomos para tradução, enquanto outros são endereçados para decaimento ou têm a sua tradução reprimida e são estocados, sendo degradados posteriormente. A primeira etapa na degradação do mRNA é deadenilação, deixando a porção 3' susceptível à clivagem pelo exossomo (Parker e Song, 2004). Alternativamente, a perda da cauda poliA disponibiliza a porção 5' para o decapeamento pelo complexo Dcp1/2 deixando o RNA susceptível à degradação pela exoribonuclease XRN1, ambas co-localizadas nos corpos-P (Eulalio *et.al.*, 2007).

Outra alteração pós-transcricional descrita em tripanossomatídeos é a edição dos transcritos mitocondriais descoberta em 1986 (Benne, *et.al.*, 1986). O processo de editoração dos RNAs envolve a inserção e/ou a deleção de resíduos de uridina de acordo com seqüências contidas em RNAs guias, transcritos de minicírculos de DNA de cinetoplasto na mitocôndria (kDNA). (revisito por Adler e Hadjuk, 1994; Alfonso, *et al.*, 1997; Estévez e Simpson, 1999)

A ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA

O RNA possui considerável importância na perpetuação e manifestação de informação contida no genoma. RNAs participam nos processos de replicação, transcrição, processamento, transporte e tradução. No contexto de controle da expressão gênica, os RNAs reguladores participam na modulação da cromatina e na determinação da meia-vida e da tradução de mRNAs.

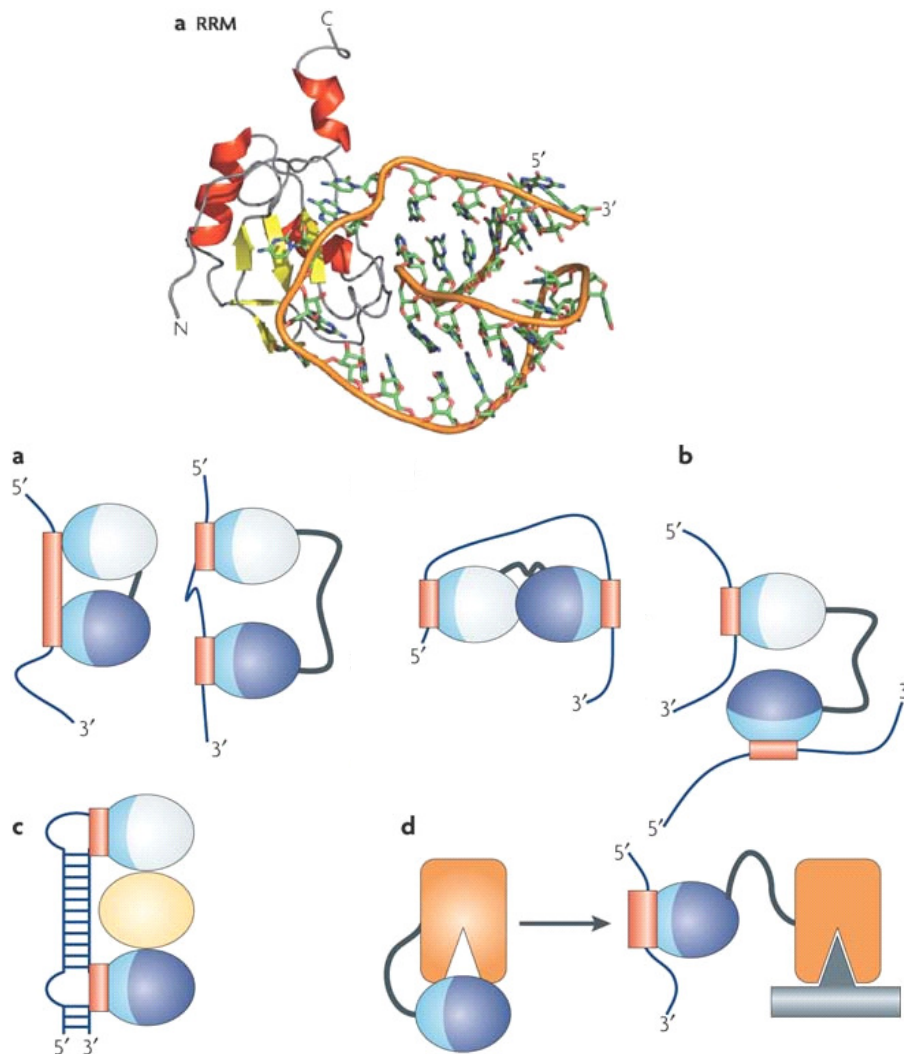
A molécula de RNA raramente encontra-se isolada na célula. Durante a formação dos transcritos, ribonucleoproteínas (RNPs) se agregam co-

transcricionalmente a este transcrito nascente e participam nas etapas de processamento, exportação do núcleo, transporte e localização do RNA (Dreyfuss, *et.al.*, 2002).

A diversidade de funções das proteínas ligadoras de RNA sugere uma diversidade correspondente de motivos responsáveis pelo reconhecimento da molécula de RNA. Todavia, a maioria destas proteínas é modular e a ampla diversidade estrutural de substratos ocorre em decorrência de múltiplas cópias de domínios de ligação a RNA. É a combinação destes domínios em vários arranjos estruturais que gera proteínas que podem reconhecer o RNA com a afinidade e a especificidade necessárias para encontrar os RNAs cognatos no meio celular enquanto retêm a versatilidade requerida para a função complexa de atuar no processamento do RNA (revisto por Lunde, *et.al.*, 2007).

Vários domínios já foram identificados e são utilizados inclusive na caracterização de RNAbps (*RNA Binding Proteins*) (Pérez-Cañadillas e Varani, 2001). O domínio de ligação a RNA do tipo RRM (*RNA Recognition Motif*) é composto de 80-90 aminoácidos. Mais de 10.000 RRM já foram identificados sendo de longe o mais comum e melhor caracterizado dos módulos de ligação a RNA. As proteínas RRM funcionam, em sua maioria, em processos de regulação pós-transcricional da expressão gênica (Lunde, *et.al.*, 2007).

A estrutura terciária do domínio RRM da proteína A do complexo ribonucleoprotéico U1, que está envolvido em *splicing* foi determinada por Nagai *et al.* em 1990. Esta consiste em quatro folhas β -pregueadas antiparalelas agrupadas contra duas α -hélices orientadas perpendicularmente (Figura 3). Os dois submotivos ficam justapostos nas duas folhas β centrais onde fazem contato direto com a molécula de RNA (revisto por Lunde, *et.al.*, 2007). A ligação é mediada na maioria dos casos por três resíduos conservados: um resíduo Arg ou Lys que forma uma ponte de sal com o esqueleto fosfodiéster e dois resíduos aromáticos que fazem interações *stacking* com as nucleobases. Estes três resíduos se situam nos dois motivos altamente conservados RNP1 e RNP2 que se localizam nas duas folhas beta centrais. (Figura 3) (Lunde, *et.al.*, 2007, Outbridge, *et.al.*, 1994).



Esquema 3 – O domínio de ligação a RNA do tipo RRM. Acima, a estrutura do domínio RRM da proteína U1A humana ligada à molécula de RNA (laranja). As bases de fita simples são especificamente reconhecidas pela folha β -pregueada e através de duas alças que conectam os elementos da estrutura secundária. Abaixo, vários módulos se combinam para exercer múltiplas funções. Em (a), os múltiplos módulos aumentam a especificidade de reconhecimento; em (b), eles se organizam para reconhecerem mais de uma molécula; em (c), eles funcionam como espaçadores para o posicionamento de outros módulos e em (d), eles se combinam com domínios enzimáticos. Fonte: Lunde, 2007

Grande parte da capacidade destas proteínas de reconhecerem o RNA depende especificamente das seqüências presentes entre os domínios, chamadas de *linkers*. Seqüências *linkers* longas (> 50-60 resíduos) são geralmente desorganizadas e permitem que os dois domínios reconheçam uma gama ampla de alvos. Enquanto que *linkers* curtos predispõem os domínios a se ligarem a um *stretch* contíguo de ácidos nucleicos. Quando isto acontece, o *linker* forma uma α -hélice curta em resposta à ligação ao RNA que posiciona os dois domínios relativos um ao outro e algumas vezes contactam o RNA diretamente. Nestas situações, as seqüências *linkers* são tão conservadas quanto, ou melhor que, os próprios domínios. Porque o posicionamento preciso dos domínios facilita a sua função (Lunde, *et.al.*, 2007), conforme o *linker* se encurta, a afinidade pelo RNA aumenta entre 10 e 1000 vezes, quando comparada com a afinidade de dois domínios RRM somados (revisto por Lunde, *et.al.*, 2007).

O PAPEL DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA NO CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Uma vez que os tripanossomatídeos apresentam características de biologia celular e molecular bastante peculiares, como o ciclo de vida digenético e a regulação da expressão gênica basicamente pós-transcricional, a família *Trypanosomatidae* constitui um grupo bastante interessante para o estudo de proteínas de ligação a RNA. As proteínas RNAbp são essenciais na regulação da expressão de proteínas específicas às diferentes formas celulares do parasita, e portanto na sua adaptação aos diferentes ambientes encontrados ao longo do seu ciclo biológico. Diversas RNAbps já foram isoladas e caracterizadas em tripanossomatídeos, dada a sua importância na biologia molecular desses organismos.

Em 1998, Manger e Boothroyd identificaram em *T. brucei* a RRM1, uma proteína nuclear essencial, cujo gene apresenta três domínios RRM arranjados em tandem (Manger and Boothroyd, 1998) e cuja função ainda é desconhecida (Manger e Boothroyd, 2001). Em 2001, Xu *et al.* identificaram a proteína XB1 em *T. cruzi* através do sistema de três híbridos em levedura, que selecionou proteínas

que interagem ao RNA mini-exon (Xu *et al.*, 2001). Em 2001, D'Orso e Frasch descreveram a proteína TcUBP-1, que apresenta o domínio RRM e é regulada ao longo do ciclo. TcUBP-1 forma um complexo ribonucleoprotéico com TcUBP-2 e TcPABP e pode ligar regiões ricas em adenosina e uridina (ARE), conseqüentemente diminuindo a meia vida do mRNA de TcSMUG (D'Orso e Frasch, 2002). Mais tarde, De Gaudenzi *et al.* descreveram que as proteínas TcUBP 1 e 2 formam uma família, com pelo menos 6 membros, de proteínas ligadoras de RNA que apresentam um único domínio de RRM (De Gaudenzi, *et al.*, 2005)

As proteínas de ligação à cauda poli (A) dos mRNAs, altamente conservadas em eucariotos, também foram identificadas em *T. cruzi* (Batista *et al.*, 1994), e em *T. brucei* (Pitula *et al.*, 1998). Zhang e Williams identificaram três proteínas de ligação a RNA em *T. brucei* através de afinidade por ssDNA (Zhang and Williams, 1997). Uma delas é ortóloga a PABP (Pitula *et al.*, 1998) enquanto as outras duas, Tbp34 e Tbp37, foram capazes de se ligar ao rRNA 5S (Pitula *et al.*, 2002a). As proteínas Tbp34 e Tbp37 são bastante similares, com exceção de uma inserção de 18 aminoácidos em Tbp37 no terminal amino. Elas apresentam três domínios distintos: um domínio APK N-terminal rico nos resíduos alanina, prolina e lisina; dois domínios RRM internos e uma região C-terminal KKDX (Zhang e Williams, 1997). A expressão destas proteínas é estágio-específica, sendo Tbp34 presente predominantemente na forma procíclica, sugerindo um controle tanto traducional quanto pós-transcricional (Li, *et al.*, 2003). A interação específica das proteínas Tbp34 e Tbp37 com o RNA ribossomal 5S sugere um papel na via de importação e exportação nuclear durante a biogênese do ribossomo. Esta hipótese foi reforçada com a verificação de que Tbp34 e Tbp37 se associam a duas proteínas de ligação ao RNA fosforiladas em tirosina, NOPP44/46, que se localizam primariamente no nucléolo (Pitula *et al.*, 2002b). Recentemente, Hellman, *et al.*, (2007a) sugeriram que Tbp34 e Tbp37 têm um importante papel na estabilização do rRNA 5S. Através da técnica de interferência de RNA, eles demonstraram que a perda da função destas proteínas se correlaciona com uma diminuição nos níveis de rRNA 5S, assim como uma diminuição na atividade

ribossômica e alteração da biogênese ribossomal. Experimentos de captura seqüencial demonstraram ainda que Tbp34, Tbp37 e NOPP44/46 se associam com o fator de exportação nuclear, exportina 1, formando um complexo, mas ainda não se sabe se o rRNA 5S faz parte deste complexo nem se a interação com o rRNA 5S e NOPP44/46 reflete um papel comum ou dois papéis distintos destas proteínas (Hellman, *et.al.*, 2007b).

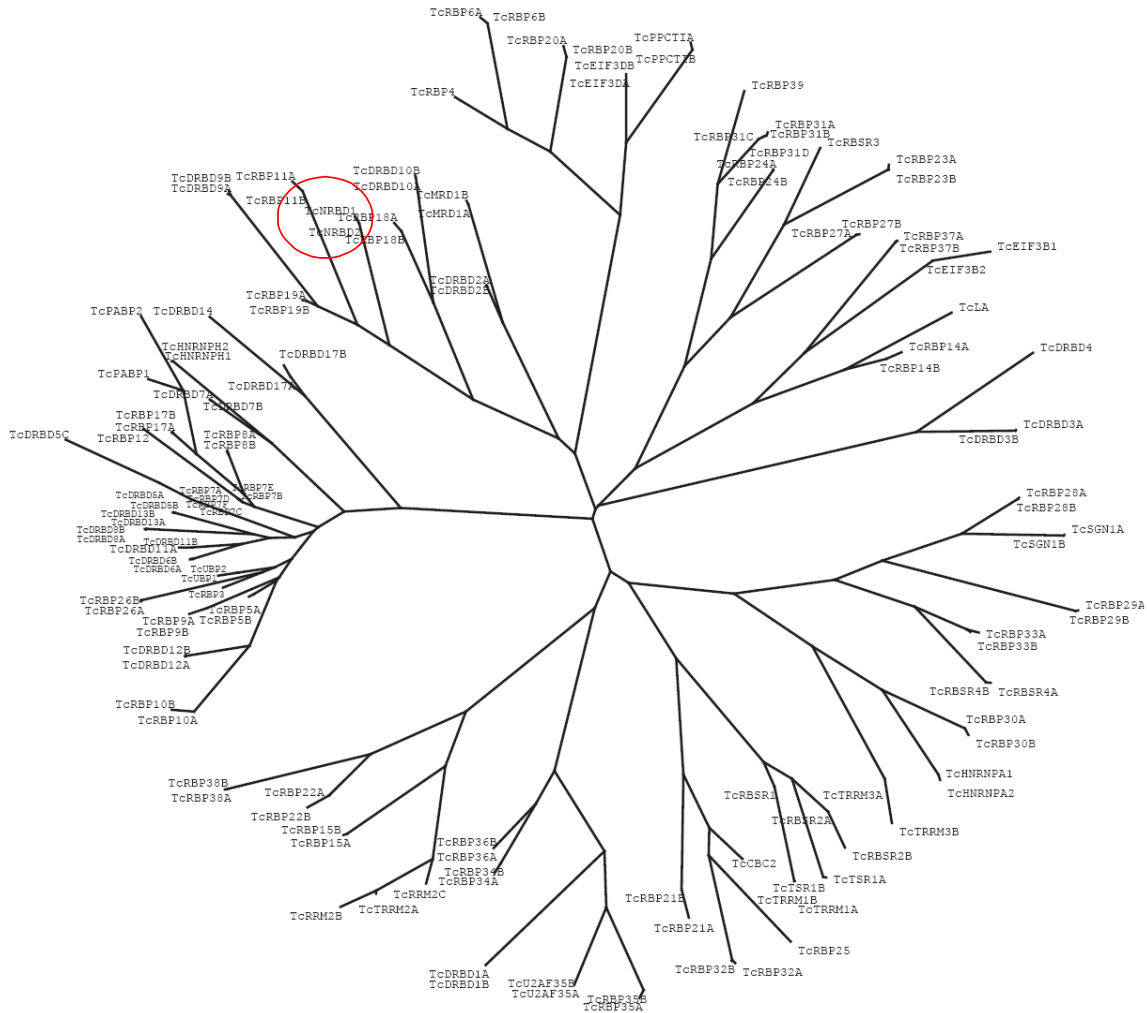
De Gaudenzi *et.al.* analisaram em 2005 as proteínas contendo domínios de ligação a RNA do tipo RRM presentes nos três genomas tripanossomatídeos, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. Major*, seqüenciados e um total de 77 ortólogos diferentes foram identificados (Figura 4) num resultado consistente com a publicação da comparação dos três genomas de tripanossomatídeos, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, que inclui a conservação da ordem dos genes e o agrupamento de homólogos em repetições em tandem (De Gaudenzi, *et.al.*, 2005) (Figura 4).

O trabalho aqui apresentado é uma continuação do trabalho anterior do nosso grupo, relatado em minha tese de mestrado e resumido no anexo 1. Segue-se uma breve descrição dos resultados obtidos. Durante a elaboração da minha dissertação de mestrado, foi possível identificar duas proteínas, nomeadas TcRRM1 e 2 através da análise dos bancos de dados gerados pela iniciativa genômica do *T. cruzi*. Estas proteínas são bastante semelhantes entre si e apresentam cada uma dois domínios de ligação a RNA do tipo RRM, além de um domínio N-terminal rico nos aminoácidos alanina, prolina e lisina (APK-Rich) sendo a principal distinção a presença ou a ausência de 18 nucleotídeos na porção 5' da região codificante (Anexo 1 – Figura 1).

Os genes TcRRM estão arranjados em um tandem no genoma de *T. cruzi* contendo pelo menos oito cópias e o seqüenciamento da região intergênica revelou uma fase aberta de leitura que apresentou alta homologia a um EST. A sua seqüência predisse uma proteína de aproximadamente 28kDa e o gene intercalante foi então nomeado Tcp28 (Anexo 1 – Figura 2).

A procura por seqüências semelhantes em bancos de dados mostrou que os genes RRM de *T. cruzi* (TcRRM) são bastante semelhantes a dois genes já descritos em *Trypanosoma brucei*: Tbp34 e Tbp37. Um gene semelhante também

T. cruzi



Esquema 4 – Árvore Filogenética das proteínas com domínios de ligação a RNA de *T. cruzi*. O círculo vermelho aponta para a posição das proteínas TcRRM1 e 2, que aqui tiveram seu nome alterado para TcNRBD 1 e 2. Fonte: De Gaudenzi, 2005.

foi encontrado no genoma de *Leishmania major*. Anticorpos gerados contra as proteínas de *T. brucei* capazes de reconhecer proteínas em diferentes clones e cepas de *T. cruzi*, além de proteínas de *Crithidia fasciculata* e de *Leishmania braziliensis* (Anexo 1 – Figura 3).

Analisamos o acúmulo de RNA mensageiro dos genes TcRRM nas três diferentes formas celulares do *T. cruzi* através de northern blot. Não foi possível a distinção entre os mRNAs de TcRRM 1 e TcRRM 2, mas o acúmulo é claramente maior nas formas amastigotas (Anexo 1 – Figura 4).

Como as proteínas Tbp34 e Tbp37 de *T. brucei* se localizam no núcleo e apresentam sinal de localização nuclear, realizamos ensaios de imunofluorescência com células de *T. cruzi*. Este ensaio preliminar com os anticorpos contra as proteínas de *T. brucei* mostrou localização citoplasmática para as proteínas RRM em *T. cruzi* (Anexo 1 – Figura 5).

As regiões codificantes de TcRRM 1 e TcRRM 2 foram clonadas em vetores para expressão em *E. coli* e posterior purificação das proteínas recombinantes. Estas proteínas também são reconhecidas pelos anticorpos anti-p34/p37 (Anexo 1 – Figura 6).

OBJETIVOS

Em face da importância das proteínas de ligação a RNA na biologia do *Trypanosoma cruzi* e dos dados anteriores obtidos durante a dissertação de mestrado na caracterização da estrutura gênica das proteínas TcRRM 1 e TcRRM 2 de *T. cruzi*, o objetivo geral desta tese é a expansão do conhecimento a respeito destas proteínas no que tange à sua função e à sua importância para *T. cruzi*. Constitui também um objetivo geral desta tese a caracterização da proteína codificada pelo gene Tcp28, localizado intercalado aos genes TcRRM no genoma de *T. cruzi*. Assim sendo, nossos objetivos específicos são:

1. Caracterizar funcionalmente TcRRM 1 e TcRRM 2;
 - 1.1. Determinar o padrão de expressão de TcRRM1 e TcRRM2 ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*;
 - 1.1.1. Determinar as regiões não traduzidas (UTRs) dos genes TcRRMs
 - 1.1.2. Verificar a meia vida dos RNAs codificantes das proteínas TcRRMs;
 - 1.1.3. Verificar a presença das proteínas TcRRMs nos diferentes tipos celulares;
 - 1.2. Determinar a localização das proteínas TcRRM nas células do *T. cruzi*;
 - 1.3. Caracterizar a propriedade de ligação a ácidos nucléicos das proteínas TcRRMs testando sua capacidade de ligação ao rRNA5s e a homorribopolímeros;
2. Caracterizar o gene Tcp28 que intercala os genes TcRRM1 e 2;
 - 2.1. Determinar o padrão de expressão de Tcp28;
 - 2.1.1. Verificar a presença de Tcp28 nos 3 diferentes tipos celulares;
 - 2.1.2. Determinar as regiões não traduzidas do gene Tcp28;
 - 2.2. Determinar a localização da proteína Tcp28

MATERIAIS E MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Cepas de *Escherichia coli*

- DH5 α F'IQ (Hanahan, 1983)

supE44 Δ *lac* U169 (\emptyset 80/*lacZ* Δ 15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

- BL-21 (Studier e Moffatt, 1986)

hsdS gal (clts857 ind San&nin5) lac UV5 T7 gene 1

Clones de *T. cruzi*

- CL Brener (Cano *et.al.*, 1995)
- Dm28c (Contreras, *et.al.*, 1988)

LINHAGENS CELULARES

- LLCMK2 (Hull, *et.al.*, 1962) *Macaca mulatta* (macaco, Rhesus, rim) – Epitelial – ATCC #: CCL-7

OLIGONUCLEOTÍDEOS

Primers	Sequências (5'-3')	Enzimas
TcRNAbp NH ₂ Bam	CGCGGATCCGGCAGACTTGGCGGGCAT	BamH1
COOHbp RACE	CAUCAUCAUCAUAAGAACCACACGAAGTAA	—
TcRNAbp COOH Eco	CCGGAATTCAAGAACCACACGAAGTAA	EcoR1
Tcp28- NH ₂	GACGCGGATCCATGGGCCTGAAAAGGC	BamH1

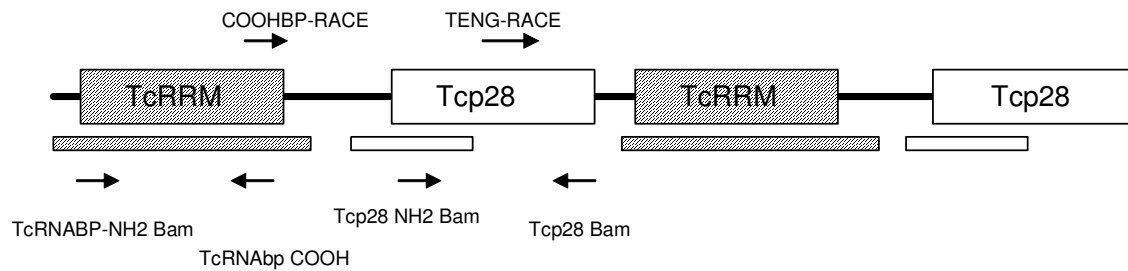
Bam		
Teng NH ₂ Bam	CGCG GGATCC GATACAATCGCCGTACAT	BamH1
Teng RACE	CAUCAUCAUCAUATGTACGGCGATTGT	_____
Tcp28 COOH Bam	GACGC GGATCC GAGGCAGTGTTGATG	BamH1
ME- Cruzei	GGATG GAATTC AGTTTCTGTACTATATTG	EcoR1

Obs. As sequências em negrito correspondem aos sítios de restrição indicados à direita.

PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Nome	Origem-	Nº Acesso GenBank	Tamanho aproximado do inserto	Vetor
40°22	Porcel, B. <i>et al</i> , 2000a	AW329912	1Kb	pT7T3
18h2	Porcel, B. <i>et al</i> , 2000a	AW324803	1Kb	pT7T3
InterRBPs	Gomes et.al., 2004	-	1,3Kb	pBluescript II KS
ME/Tcp28	Gomes et.al., 2004	-	600pb	pBluescript II KS
RRM1/GST	Gomes, Dissertação de Mestrado	-	800pb	pGEX 4T1
RRM2/GST	Gomes, Dissertação de Mestrado	-	800pb	pGEX 4T1
Tcp28/GST	Neste trabalho	-	800pb	pGEX 4T1
UBP1/GST	Neste trabalho	-	800pb	pGEX 4T1

SONDAS



Desenho indicando o lócus contendo os genes TcRRM (caixa listrada) e Tcp28 (caixa branca) com a posição das sondas TcRRM (retângulo listrado) e Me-Tcp28 (retângulo branco) e a posição dos iniciadores.

MEIOS DE CULTURA

- Meio LIT (Infusão de fígado-tripticase)
 - NaCl 75mM
 - KCl 5,4mM
 - Na₂HPO₄(12H₂O) 62mM
 - Glicose 0,2%
 - Bacto-triptona 0,5%
 - Infusão de fígado 0,5%
 - pH ajustado a 7,2 com NaOH 1N
- Meio LB (Luria Bertani)
 - Bacto-triptona 1%
 - Extrato de levedura 0,5%
 - NaCl 85mM
 - pH ajustado a 7 com NaOH 5N
- Meio LB-agar
 - Meio LB
 - Agar 1,5%p
- Meio 2xYT-G
 - Bacto-triptona 1,6%

- RPMI
 - Extrato de Levedura 1%
 - NaCl 86mM
 - Glicose 2%
 - pH ajustado a 7 com NaOH 5N
 - RPMI Medium1640 Gibco
 - NaHCO₃ 2,0g/L
 - pH ajustado a 7,4 com NaOH 5N

Todos os meios de cultura eram autoclavados a 120°C por 20 minutos, à exceção do meio RPMI que era filtrado (Millipore, 0,22µm).

SOLUÇÕES:

- Acri-bis 30%
 - Acrilamida 29,2% (w/v)
 - Bisacrilamida 0,8% (w/v)
- GET
 - Tris-HCl pH8,0 25mM
 - EDTA 10mM
 - Glicose 50mM
- MOPS 10x
 - MOPS 20mM
 - Acetato de sódio 5mM
 - EDTA1mM
 - pH ajustado a 7,5
- PBS
 - NaCl 140mM
 - KCl 2,7mM
 - Na₂HPO₄ 8mM
 - KH₂PO₄ 1,5mM
 - Glicose 5,5mM
 - pH ajustado a 7,5
- PBS-T
 - PBS 1x
 - Tween 0,05% (v/v)
- Solução de Azul de Coomassie
 - Metanol 45% (v/v)
 - Ácido acético 10% (v/v)

	Azul de coomassie R250 0,2% (w/v)
➤ Solução de bloqueio	PBS-T 0,05% leite em pó Molico
➤ Solução de Denhardt 5x	Ficol 400 1% 50x Polivinilpirrolidona 1% BSA 1%
➤ Solução de desnaturação	NaOH 0,5M NaCl 1,5M
➤ Solução de extração de RNA 1	Solução de hidrocloreto de guanidina 99,92% (V/V) 2-mercaptoetanol 0,08% (V/V)
➤ Solução de extração de RNA 2	Solução de Isotiocianato de guanidina 92% (V/V) 2-mercaptoetanol 8% (V/V)
➤ Solução de hidrocloreto de guanidina	Hidrocloreto de guanidina 6M pH 7,5 EDTA 25mM
➤ Solução de isotiocianato de guanidina	Tris-HCl 50mM pH 7,5 Isotiocianato de guanidina 4M EDTA 25mM
➤ Solução de lavagem 1	SSC 1% (v/v) SDS 0,1% (v/v)
➤ Solução de lavagem 2	SSC 0,1% (v/v) SDS 0,1% (v/v)
➤ Solução de neutralização	Tris-HCl pH 8,0 0,5M NaCl 1,5M
➤ Solução de pré-hibridização	Formamida 50% (v/v) DNA de esperma de salmão 100ng/mL Tampão fosfato 50mM SSC 5x Denhardt 5x
➤ Solução de revelação por fosfatase alcalina	NBT 1% (v/v) BCIP 1% (v/v) Tampão de Susbtrato 98% (v/v)

Materiais e Métodos

- Solução de ressuspensão
Tris-HCl 50mM pH 7,5
EDTA 2mM
NaCl 0,1M
- Solução de transferência
Glicina 190mM
Metanol 20%(v/v)
Tris 25mM
- Solução de vermelho de Ponceau
Vermelho de Ponceau 0,025% (w/v)
Ácido Tricloroacético 3%
- Solução descorante para SDS-PAGE
Metanol 5% (v/v)
Ácido acético 7%(v/v)
- Solução encolhedora para SDS-PAGE
Metanol 65%(v/v)
Glicerol 0,5%(v/v)
- SSC 10x
NaCl 3M
Citrato de Sódio 0,3M
- Tampão de Amostra para gel de agarose 6x
Azul de bromofenol 0,025%(w/v)
Xileno-cianol 0,025%(w/v)
Glicerol 30%(v/v)
- Tampão de amostra de RNA
Formamida deionizada 50%(v/v)
Formaldeído 6%(v/v)
tampão MOPS 1x
- Tampão de amostra de proteína 6x
SDS 2%(v/v)
DTT 10mM
Azul de bromofenol 0,02%(w/v)
Glicerol 10%(v/v)
- Tampão Fosfato 10x
Na₂HPO₄ 0,3mM
Na H₂PO₄ 5mM
NaCl 72,6mM
- Tampão de Substrato
Tris-HCl 1,2% (p/v)
MgCl₂ 0,1M
azida sódica 0,01%
- Tampão Tris-Glicina
Tris-HCl 0,1M
Glicina 0,7%(p/v)

➤ TBE	Tris-borato 90mM EDTA 1mM pH8,0 pH ajustado a 7,5
➤ TE-4	Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA 0,1mM
➤ TE	Tris-HCl 10mM pH8,0 EDTA 1mM
➤ TNE	Tris-HCl 1M pH 7,6 NaCl 5M EDTA 0,5M pH8,0

CULTURA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Cultura axênica das formas epimastigotas

Utilizamos células de *Trypanosoma cruzi* das cepas CL e Y e os clones de *T. cruzi* CL Brenner (Cano *et al.*, 1995) e Dm28c (Contreras *et al.*, 1988). Formas epimastigotas eram mantidas em cultura axênica em meio LIT (Camargo, 1964) a 29°C, com repiques semanais para a densidade populacional de 1×10^7 células/mL.

Cultura das formas tripomastigotas e amastigotas em células de mamíferos

As formas tripomastigotas e amastigotas foram produzidas *in vitro* em colaboração com a Professora Thaís Souto-Padrón do Instituto de Microbiologia aqui da UFRJ. Utilizamos células LLCMK2 (Hull, *et.al.*, 1962) cultivadas em meio RPMI a 37°C com 5% de CO₂ em estufa *Nuaire IR Autoflow CO₂ Water-Jacketed incubator* com troca de meio a cada 2-3 dias. A infecção com formas tripomastigotas de *T. cruzi* ocorria com inóculo de aproximadamente 10^6 células por garrafa de cultura por 24 horas.

Após o rompimento das células LLCMK2, o que ocorria em torno de 7-15 dias, o sobrenadante era submetido a uma centrifugação inicial de 1000rpm em centrífuga clínica (180g) por 5 minutos para sedimentação dos debrís celulares. Este sobrenadante era filtrado em papel de filtro e transferido para outro tubo e novamente centrifugado, desta vez a 3000 rpm (2250g) por 10 minutos para sedimentação das células de *T. cruzi*. O tubo era colocado a 37°C por 2 horas sem agitação quando as formas amastigotas e tripomastigotas eram então separadas, baseado no fato de que as formas tripomastigostas escapavam do sedimentado para a superfície devido à sua maior mobilidade enquanto as formas amastigotas permaneciam no fundo do tubo.

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Extração de DNA de *Trypanosoma cruzi*

A extração do DNA dos microrganismos era realizada a partir de 25mL de cultura em fase estacionária (Sambrook *et al.* 2001 com modificações). As células eram sedimentadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm em centrífuga clínica e lavadas com 30mL de tampão PBS pelo menos 3 vezes. A seguir, as células eram ressuspensas em 420µL de tampão TNE. Adicionava-se então SDS para uma concentração final de 1% e 400µg de proteinase K incubando-se a 37°C por 18 horas. Extraía-se o DNA adicionando-se ao lisado de células igual volume de fenol-clorofórmio e centrifugando-se por 1 minuto em microcentrífuga a 12.000 rpm; a fase aquosa era transferida para outro tubo e estes passos eram repetidos até o desaparecimento da interface protéica. Precipitava-se o DNA presente na solução aquosa adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA precipitado na mistura era sedimentado por centrifugação por 15 minutos em microcentrífuga a 12.000 rpm. O sedimento era lavado com etanol 70% e posteriormente ressuspensado na concentração de 2µg/mL em TE.

Extração de RNA total de *Trypanosoma cruzi*

Para a extração de RNA, utilizava-se uma cultura em fase exponencial contendo geralmente 5×10^9 células. As células eram sedimentadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm em centrífuga clínica e lavadas com 10mL de PBS pelo menos 2 vezes. O sedimento de células era coberto com 25mL de solução de extração de RNA 1 e imediatamente vortexado até que a solução ficasse translúcida, quando então, adicionava-se 0,3 volume de etanol absoluto para a precipitação diferencial das moléculas de RNA. Centrifugava-se por 5 minutos a 16.000g a 4°C e descartava-se o sobrenadante. Ressuspendia-se o precipitado de RNA em 1mL de solução de extração de RNA 2, adicionando-se depois, 0,05 volume de ácido acético 1M e 0,5 volume de etanol absoluto. Após 10 minutos a -20°C, a solução era submetida à centrifugação por 10 minutos a 7000g a 4°C. O precipitado de RNA era ressuspensão em 1 a 3mL de H₂O e novamente precipitado como descrito para DNA (Chomczynski e Sacchi, 1987).

OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

As células eram primeiramente contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as mesmas eram sedimentadas através de centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm. O sedimentado era lavado com PBS e as células ressuspensas em tampão de amostra de proteína 1x para uma concentração de 10^5 a 10^6 células/ μ L. Os extratos celulares totais eram imediatamente utilizados para evitar a ação de proteases (Sambrook *et al.*, 2001).

CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA EM VETORES BACTERIANOS

Indução de competência em *E. coli*

A cultura bacteriana era inoculada, com alça de platina ou ponteira estéril, diretamente do estoque congelado em 3mL de meio LB e cultivada por 18 horas

sob agitação a 37°C. Em seguida, a cultura era repicada retirando-se 1mL e inoculando-se em 50mL de meio LB. A cultura era cultivada até que atingisse Abs_{600nm} 0,5, quando as células eram sedimentadas por centrifugação a 2800 rpm a 4°C por 10 minutos. O sedimentado de células era ressuspensão em 25mL de solução de $CaCl_2$ 50mM e mantido no gelo por pelo menos 30 minutos tomando-se o devido cuidado no manuseio das células bacterianas a fim de se evitar lise celular. Após a incubação, as células eram novamente centrifugadas sob as mesmas condições já citadas, no entanto ressuspensas desta vez em 5mL de $CaCl_2$ 50mM. Após nova incubação em gelo por 60 minutos, adicionava-se glicerol para uma concentração final de 20% e aliquotava-se em tubos que posteriormente eram armazenados a -70°C (Sambrook *et al.* 2001., com modificações)

Transformação bacteriana

A transformação era induzida, adicionando-se de 50 a 100ng do DNA plasmidial de interesse em volume de 1-15µL, às células competentes e incubando-se em gelo por 15 minutos. Um choque térmico de 90 segundos era feito colocando-se a mistura em banho-maria a 42°C e retornando-as ao gelo por 2 minutos. As células eram recuperadas adicionando-se 800µL de meio LB e mantendo-se a cultura a 37°C por 30 minutos. A seleção dos transformantes se dava plaqueando-se 100µL da cultura em placas contendo LB-ágar e 100µg/mL de ampicilina. Otimizava-se a obtenção de transformantes, sedimentando-se as células restantes na cultura através de centrifugação por 1 minuto em microcentrífuga a 12.000 rpm. Retirava-se 800µL do meio e ressuspensava-se as células nos 100µL restantes para posterior plaqueamento (Sambrook *et al.* 2001., com modificações).

Extração de DNA plasmidial em pequena escala

As bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse eram cultivadas em 2mL de meio LB com ampicilina a 50µg/mL por toda a noite sob

agitação a 37°C. As células eram posteriormente sedimentadas por centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto em microcentrífuga. Ressuspendia-se o precipitado em 100µL da solução GET. Preparava-se imediatamente antes de usar uma solução contendo NaOH 0,2N e SDS 1%. Adicionava-se 150µL desta solução à suspensão de células e misturava-se por inversão. Adicionava-se 150µL de acetato de potássio 3M pH4,8 e em seguida 150µL de clorofórmio. O material era então centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm e a fase aquosa transferida para um tubo novo. O DNA plasmidial era precipitado adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto e incubando-se à temperatura ambiente por 2 minutos. O material precipitado era sedimentado por 15 minutos na microcentrífuga a 12.000 rpm e ressuspenso em 20 a 30 µL de TE (Sambrook *et al.* 2001., com modificações).

ELETROFORESE

Eletroforese de DNA em gel de agarose

Agarose suficiente para concentração final de 0,8 a 1,5% era dissolvida em tampão TBE. A solução era vertida ainda morna em fôrma apropriada para eletroforese horizontal e após gelificação, o gel era coberto com tampão TBE. As amostras de DNA eram diluídas em tampão de amostra para gel de agarose 6x para uma concentração final de 1x e aplicadas nos poços formados no gel no pólo negativo. A corrida eletroforética se dava entre 70 e 100V. Após a corrida eletroforética, os géis eram corados em solução de brometo de etídeo 5µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta (Sambrook *et al.* 2001, com modificações).

Eletroforese desnaturante de RNA em gel de agarose

Adicionava-se 1,2g de agarose e 10mL de tampão MOPS 10x pH 7,5 10x a 73mL de H₂O até a completa dissolução da agarose. Após o esfriamento da solução adicionava-se formaldeído para uma concentração final de 6%. O material

era vertido em cuba apropriada devidamente nivelada. A gelificação se dava em aproximadamente 30 minutos quando o gel era coberto com tampão MOPS 1x. As amostras eram preparadas adicionando-se 5µg de RNA total em 9,7µL de tampão de amostra de RNA, aquecendo-se por 10 minutos a 65°C e incubando-se em gelo. Antes da aplicação adicionava-se tampão de amostra para gel de agarose para uma concentração final de 1x. A corrida se dava a 100V constantes até que o corante azul de bromofenol chegasse a aproximadamente 3 cm do final do gel. O gel era então corado com solução de brometo de etídeo 5µg/mL e visualizado em transiluminador de ultravioleta (Sambrook *et al.* 2001, com modificações).

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS – PAGE)

Para a montagem do gel de separação, preparava-se uma solução contendo acrilamida-bisacrilamida 12-16%, onde a relação acrilamida-bisacrilamida era de 29:1, além de Tris-HCl pH 8,8 0,375M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1% e vertia-se em aparato apropriado para eletroforese vertical. Cobria-se o gel com 1mL de butanol e deixava-se polimerizando por 30 minutos. Após a polimerização, retirava-se a butanol, lavava-se com H₂O destilada e retirava-se a água com o auxílio de uma folha de papel de filtro. Cobria-se o gel de separação com a solução para o gel de empacotamento que continha acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris HCl pH6,8 0,125M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1%. Colocava-se o pente e deixava-se polimerizando por 30 minutos.

As amostras de extrato protéico eram preparadas adicionando-se tampão de amostra de proteína para concentração de 1x, aquecendo-as a 95°C por 5 minutos e incubando-as em gelo.

Durante a separação das amostras no gel de empacotamento, a corrida eletroforética se dava a 25mA constantes; quando as amostras passavam para o gel de separação, aumentava-se a corrente para 35mA.

Após a corrida eletroforética, os géis eram corados e fixados mergulhando-os em solução de Azul de Comassie por 1 a 18 horas. Posteriormente, os géis

eram mergulhados na solução descorante até que o fundo do gel clareasse e as bandas pudessem ser visualizadas com nitidez. Para a secagem do gel, este era mergulhado em solução encolhedora por 1 hora e posteriormente colocado entre duas folhas de papel celofane presas a grampos por aproximadamente 48hs (Weber e Osborne, 1969).

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida eram produzidos através da mistura de uma solução contendo acrilamida/bisacrilamida (38:2) com tampão TAE 1x ou TBE 0,5X, além de APS 0,1 % e TEMED 0,1%. Para os géis desnaturantes acrescentava-se ainda uréia a 6%. Estes eram corridos a 40W constantes a uma temperatura controlada de 50°C. Os géis não desnaturantes (para gel shift) eram corridos a 4°C a 100-200V constantes. Após a corrida, os géis eram transferidos para papel de filtro e secos em secador de gel por 1 hora a 80°C. Após a secagem, os mesmos eram expostos a filme de raio X ou à tela intensificadora do aparato de exposição Phosphor Screen General Purpose (Molecular Dynamics).

TRANSFERÊNCIA DE MACROMOLÉCULAS PARA MEMBRANAS

Transferência de RNA para membranas de nylon – northern blot

Os géis de agarose de RNA para transferência eram sempre feitos em duplicata. Uma cópia era corada com brometo de etídeo e a outra usada para transferência sem tratamento prévio. Para a transferência, uma cuba de transferência era devidamente preenchida com SSC 2X e o gel era colocado invertido sobre a cuba seguido pela membrana de *nylon* previamente mergulhada em SSC 2X por 10 minutos e devidamente marcada para orientação posterior. A membrana era coberta com um volume de 5 cm de papel de filtro e guarnecida com um peso de papel. Toda a cuba era coberta com um filme plástico e a transferência se dava por 18 horas à temperatura ambiente. Após a transferência,

a membrana era exposta à luz de transiluminador ultravioleta por 1 minuto e deixada em forno a 80°C por 1 hora e 30 minutos (Sambrook, *et.al.*, 2001)

Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose – western blot

Os géis de poliacrilamida com SDS eram feitos em duplicata. Uma das cópias era corada com comassie blue e a outra submetida à transferência.

A transferência se dava em aparato apropriado para eletrotransferência. O gel e a membrana de nitrocelulose eram posicionados entre duas folhas de papel de filtro e este conjunto era fixado em grades especiais. Alternativamente, utilizava-se a membrana Hybond-P de acordo com as instruções do fabricante (Amershan-Pharmacia). O aparato era mergulhado em solução de transferência de forma que o gel ficasse no pólo negativo e a membrana no pólo positivo. A transferência das proteínas para a membrana acontecia a 50mA constantes por 16 horas a 4°C ou, alternativamente, por 300mA constantes por 1 hora em gelo.

A membrana era armazenada a 4°C até a sua utilização. A verificação da transferência era feita através da coloração da membrana com solução de vermelho de Ponceau. A membrana era mergulhada nesta solução por 5 minutos e o excesso de corante retirado com PBS até a visualização das bandas (Sambrook *et al.*, 2001).

HIBRIDIZAÇÃO A SONDAS MOLECULARES

Marcação de sondas de DNA por iniciação randômica

Os vetores utilizados como sonda eram previamente digeridos com enzimas de restrição para a liberação do inserto. Após a digestão, o inserto era purificado através de eletroforese em gel de agarose de onde a banda de interesse era excisada e purificada com o kit *QiaxII* da *Qiagen*[®].

O material eluído era posteriormente dosado em espectrofotômetro a 260nm.

A marcação radioativa do inserto purificado de DNA era feita em 25ng do mesmo com 50 μ Cu do isótopo [α -³²P]dCTP ou [α -³²P]dATP de acordo com o protocolo do kit *RadPrime DNA Labeling System*, da GibcoBRL[®] (Sambrook *et al.*, 2001., com modificações).

Marcação de sondas de DNA por *end-labeling*

5pmoles de sonda eram incubados juntamente com exchange buffer 1X (Gibco[®]) e 10 unidades da enzima T4 quinase, além de 10 unidades de inibidor de RNase e 50 μ Cu do isótopo [γ -³²P]dATP em água DEPC num volume final de reação de 20 μ L. Após incubação por 1 hora a 37°C, a sonda era purificada em coluna de sefarose G50 ou precipitada com cloreto de amônio e contada em cintilador.

Marcação de sondas de RNA por transcrição *in vitro*

400ng de DNA molde previamente linearizado eram incubados com 500nM de ribonucleotídeos, 10mM de DTT, tampão de transcrição 1x (Gibco[®]), 0,005% de BSA, 50 μ Cu do isótopo [α -³²P]UTP, 10 unidades de inibidor de RNase e 10 unidades de T7 RNA polimerase por 1 hora a 37°C. Após a incubação inicial, o DNA molde era digerido com 10 unidades da enzima DNase RNase free por 1 hora a 37°C. A reação era purificada com fenol-clorofórmio e coluna de sefarose G50. A marcação obtida era contada no cintilador.

Reação de hibridização à sonda homóloga

A membrana contendo os ácidos nucléicos transferidos do gel, era colocada em saco plástico com a solução de pré-hibridização por no mínimo 1 hora a 42°C. Após a pré-hibridização, adicionava-se à solução SDS para uma concentração

final de 0,1% e a sonda marcada, previamente aquecida a 95°C por 5 minutos. A reação de hibridização ocorria por 18 horas a 42°C.

Após a incubação, a membrana era lavada com a solução de lavagem 1 por 15 minutos a 42°C duas vezes e posteriormente duas vezes com a solução de lavagem 2 também a 42°C por 15 minutos.

A membrana era acomodada em cassete apropriado, coberta com filme de raios X e com tela intensificadora (*lightning Plus*, Du Pont®). A exposição ocorria a -70°C em tempos variados (Sambrook *et al.*, 2000, com modificações).

IMUNOBLOT

Com Anticorpo conjugado à Peroxidase

A membrana contendo as proteínas transferidas do gel de poliacrilamida com SDS era mergulhada em solução de bloqueio e mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, retirava-se a solução de bloqueio inicial e adicionava-se nova solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, na diluição ideal de cada anticorpo. A incubação se dava à temperatura ambiente sob agitação por 1 hora quando a membrana era então lavada por duas vezes com PBS-T por 5 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. À membrana, então, adicionava-se nova solução de bloqueio, desta vez contendo o anticorpo secundário, anti -IgG de coelho ou camundongo conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*). A incubação e a lavagem ocorriam da mesma forma que com o anticorpo primário.

A revelação era feita com o kit de *ECL* da Santa Cruz Biotechnology®, de acordo com o protocolo do fabricante.

Com Anticorpo conjugado à Fosfatase Alcalina

Alternativamente à revelação por peroxidase, utilizava-se protocolo para revelação com a fosfatase alcalina. Neste caso, as soluções de bloqueio e lavagem não continham fosfato e sim o sal Tris para evitar reação cruzada. A

revelação era feita incubando-se a membrana em Solução de Revelação até o aparecimento das bandas protéicas de interesse.

CONSTRUÇÃO DE VETORES RECOMBINANTES

Reação em Cadeia da Polimerase

Para a reação de PCR utilizava-se 100ng de DNA genômico, 1 μ M de cada oligonucleotídio, 200 μ M de cada um dos dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, tampão de PCR GibcoBRL[®] para concentração de 1x e 1,5U de *Taq DNA polimerase* GibcoBRL[®] em um volume de reação de 25 μ L. A reação ocorria em termociclador modelo *Mastercycler gradient*, da Eppendorff[®], programado para desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, a exceção de quando especificado no texto.

Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose

O fragmento de DNA era purificado do gel pelo *Kit Consert Gel Extraction System* da GibcoBRL[®] ou com o kit QiaexII da Qiagen[®] de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de ligação do vetor ao produto de PCR

6 μ L do produto de PCR digerido e purificado do gel de agarose eram ligados a 6 μ L do vetor pKS também digerido e purificado do gel utilizando-se 1U da enzima *T4 DNA ligase* (Gibco[®]) num volume de reação de 15 μ L. A reação de ligação ocorria a 14°C por 15 horas de acordo com recomendações do fabricante. 6 μ L desta reação de ligação eram utilizados para transformação de células *E.coli* DH5 α F'1Q.

SEQUENCIAMENTO DE DNA

1µg do DNA plasmidial era seqüenciado em Seqüenciador *Capilar MegaBace* 1000 (Molecular Dynamics e Amersham Biosciences®), um sistema de análise de DNA de 96 capilares. As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o *MegaBACE 1000*, utilizando o *APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*). As seqüências são analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3*.

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes eram purificadas de acordo com as recomendações do fabricante com algumas modificações (*Bulk GST Purification Modules* – Amersham Pharmacia®). Os clones recombinantes de *E. coli* eram inoculados em 4mL de meio 2xYT-G contendo 100µg/mL de ampicilina e cultivados por 18 horas sob agitação a 37°C. Posteriormente, o volume era elevado adicionando-se 36mL de meio 2xYTG – Ampicilina e a cultura era crescida sob as mesmas condições até que atingisse Abs_{600nm} 1-2 quando então era adicionado IPTG para uma concentração final de 0,1µg/mL. A indução da expressão da proteína de fusão se dava por 3 horas e 30 minutos. A cultura era, então, centrifugada a 5000rpm em rotor SS-34 (Sorvall®) por 10 minutos e o sedimentado de bactérias era ressuspensa em 3mL de solução de ressuspensão. Adicionava-se lisozima para uma concentração final de 10µg/mL e deixava-se sob agitação a 30°C por 15 minutos. Adicionava-se então triton X-100 para concentração final de 1% e incubava-se em gelo por 30 minutos. Centrifugava-se por 10 minutos a 12.000 rpm para retirada dos debris celulares e transferia-se o sobrenadante para outro tubo. Ao sobrenadante adicionava-se a matriz glutationa sefarose preparada de acordo com o kit *Bulk GST purification module*, da Amersham Pharmacia® e deixava-se sob agitação por 20 minutos. A retirada da

proteína recombinante se dava por uma das duas formas: ou a proteína de fusão era eluída 3 vezes com tampão de eluição acrescido de NaCl 0,2N por 10 minutos, ou adicionava-se 90µL de tampão PBS à matriz juntamente com 10U de trombina e deixava-se sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células de *T. cruzi* eram contadas em câmara de Neubauer, lavadas com PBS e ressuspensas em solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,32%. A fixação se dava por 30 minutos à temperatura ambiente, quando um volume contendo 10^6 células era colocado sobre lamínulas novas e secas previamente tratadas. O tratamento das lamínulas consistia em lavagem com acetona, e tratamento com poli-L-lisina por 30 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas eram posteriormente lavadas com PBS e secas em estufa a 37°C. A adesão das células às lamínulas se dava à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos.

Para a permeabilização das células, as lamínulas contendo as células aderidas eram mergulhadas em acetona gelada, mantidas a 4°C por 10 minutos e posteriormente lavadas com PBS, quando eram tratadas com Cloreto de amônio 150mM por 20 minutos. Após lavagem das lamínulas com PBS, estas eram tratadas com solução contendo PBS e BSA 3% por 16 horas a 4°C. RNase A para concentração de 20µg/mL era adicionada à solução de PBS/BSA e as lamínulas mantidas em estufa a 37°C por 1 hora. Após retirada da solução PBS/BSA/RNase, com a solução PBS/BSA, adicionava-se a solução contendo o anticorpo anti34p37 diluído 100x em PBS. A reação de ligação antígeno-anticorpo se dava à temperatura ambiente por 1 hora. As lamínulas eram lavadas com PBS e tratadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à fluoresceína diluído 500x e com iodeto de propídio 10µg/mL por 1 hora à temperatura ambiente sob iluminação indireta. As lâminas eram montadas colocando-se sobre elas 1 gota de N-propil galacto e posteriormente a lamínula era selada com esmalte. As lâminas prontas eram congeladas a -20°C protegidas da luz. A análise das lâminas foi

feita em microscópio confocal de fluorescência no modo fluorescência convencional em colaboração com o Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer/IBCCF. Como controle negativo, utilizou-se soro pré-imune, quando presente.

AVALIAÇÃO DE MEIA VIDA DE MRNA

Realizamos este ensaio de modo a estimar o tempo de degradação do RNA mensageiro de interesse. Para isso, utilizamos o inibidor da transcrição actinomicina D. Partimos de 200mL de cultura axênica de formas epimastigotas em fase exponencial (em torno de 2×10^7 células/mL). Aplicamos actinomicina D para uma concentração final de 10µg/mL. Uma alíquota de 12mL era retirada imediatamente após a adição do inibidor para o ponto 0 minutos e alíquotas eram retiradas após 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos e 180 minutos. Em cada ponto, as células eram sedimentadas e o RNA extraído. As amostras de RNA total extraído em cada ponto era separada em gel de agarose com formamida e transferidas para membrana Hybond-N. As membranas eram hibridizadas com a sonda de interesse, marcada com o isótopo [α - 32 P]dCTP.

REAÇÃO DE LIGAÇÃO PROTEÍNA-RNA

A reação de ligação proteína-RNA ocorria colocando-se em contato entre 0 e 800ng de proteína com 40.000 cpm de cada sonda em Tris-HCl 10mM, glicerol 5%, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM, BSA 1µg/mL e tRNA 50ng/µL por 10 minutos a 37°C. A ligação poderia ser visualizada em gel de poliacrilamida não desnaturante (EMSA) ou filtrada em membranas de nitrocelulose.

FILTRAGEM EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE

A reação de ligação proteína-RNA era aplicada diretamente sobre a membrana (Schleicher & Schuel®) montada sobre um quitasato. Com a ajuda de uma bomba de vácuo, pressão negativa era aplicada no interior do quitasato. A membrana era lavada com 100x o volume da reação de ligação com solução de

binding. As membranas eram secas em forno a 80°C por 1 hora e contadas em cintilador.

PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os anticorpos foram produzidos com o auxílio do Professor José Mauro Peralta do Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, da UFRJ. Brevemente, 3 injeções de 30µg da proteína recombinante foram realizadas em camundongos Balb-c com intervalos de 10 dias e uso de adjuvante de Freud. Dois camundongos foram utilizados para cada proteína. Após os trinta dias, os camundongos foram sacrificados e os soros foram obtidos. Os soros são mantidos aliquotados e congelados a -20°C.

RESULTADOS

MAPEAMENTO DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (UTRs) DOS GENES TcRRM

Resultados anteriores mostraram que os genes TcRRM se arranjam em tandem intercalado a cópias do gene TcP28 (Anexo 1 – Figura 1). É bem sabido que as regiões não traduzidas exercem um papel fundamental no controle da expressão gênica agindo em *cis* com fatores que podem regular a estabilidade e tradução de um dado RNA. Daí a importância de se mapear os sítios de processamento e de se delimitar as regiões não traduzidas durante a caracterização de um determinado gene. A região 3'UTR dos RNAs mensageiros de TcRRM foi mapeada através da técnica de 3'RACE. Brevemente, esta técnica consiste na síntese de DNA através da técnica de RT-PCR onde se utiliza um oligonucleotídeo iniciador composto por uma seqüência poli(t) ligada a uma seqüência específica rica GC. Posteriormente amplifica-se o produto obtido com oligonucleotídeos que pareiem a esta seqüência específica e à seqüência codificante do gene de interesse. O produto amplificado é então clonado em vetor plasmidial e posteriormente seqüenciado. Neste caso utilizamos o oligonucleotídeo COOHbp-RACE para a amplificação da região 3'UTR dos genes TcRRM. Este procedimento foi realizado a partir de RNA total das 3 formas celulares do parasito (Figura 1 A) e 10 clones de cada foram selecionados para seqüenciamento. As seqüências obtidas puderam ser separadas em dois grupos diferentes e foram nomeadas 3'UTR I e 3'UTR II (Figura 1B). Para a seqüência 3'UTR I, 5 diferentes sítios de poliadenilação foram encontrados enquanto que para a seqüência 3'UTR II apenas 1. Não encontramos associação entre a presença de uma destas seqüências de UTR e um determinado estágio celular. Inclusive, a proporção de 7 para 3 de 3'UTR I para 3'UTR II é mantida aproximadamente nas três formas celulares, conforme mostra o gráfico (Figura 1C). Portanto, não há associação entre a presença dos diferentes sítios de poliadenilação do 3'UTR I e as diferentes formas do parasito, indicando que não há acúmulo preferencial de uma das formas de 3'UTR do gene TcRRM nos diferentes estágios.

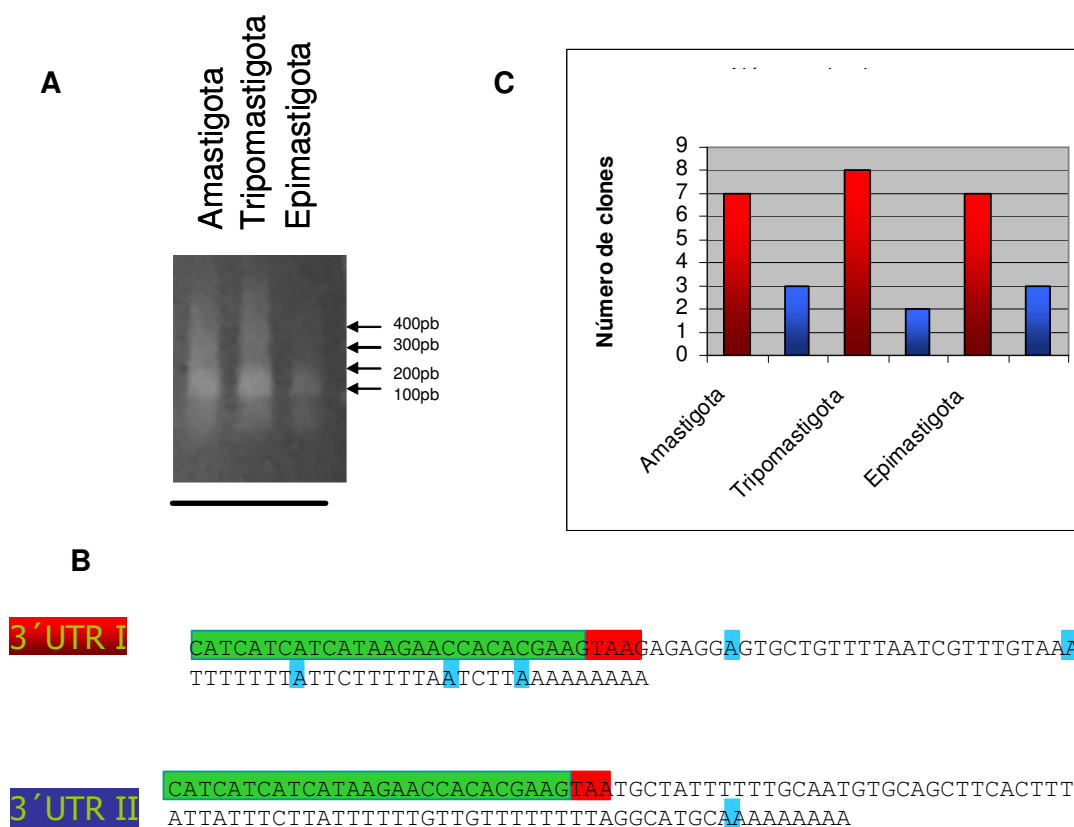


Figura 1 –Mapeamento da Região 3' Não Traduzida (3'UTRs) dos Genes

TcRRM – Em A, produtos de amplificação da região 3'UTR dos genes TcRRM dos diferentes tipos celulares de *T. cruzi* pela técnica de 3'RACE; Os padrões de peso molecular encontram-se indicados á direita. Em B, seqüências de DNA encontradas nas três formas celulares. Dois tipos de seqüências foram determinados. Em azul, os diferentes sítios de poliadenilação mapeados; em verde, o primer utilizado; em vermelho, o sítio de terminação; Em C, o gráfico mostra o número de clones de cada tipo de seqüência 3'UTR encontrados em cada forma celular.

A região 5'UTR de TcRRM foi obtida através da amplificação de RNA das três formas celulares por transcrição reversa utilizando-se iniciadores para a região do mini-exon em conjunto com oligonucleotídeos para a região codificante de TcRRM (TcRNAbp NH₂ Bam). O cDNA obtido foi submetido a PCR e os produtos clonados em vetores plasmidiais e 10 clones de cada foram seqüenciados. Devido à presença da inserção ou deleção dos 18 nucleotídeos na porção 5' da região codificante (Anexo I – Figura 1B), pudemos distinguir entre os genes TcRRM 1 e 2. Uma única seqüência foi obtida para cada gene. Interessantemente, esta seqüência é bastante similar à região 5'UTR dos genes de *T. brucei*, apresentando inclusive uma deleção comum a Tbp34 e a TcRRM1 (Figura 2).

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA DE *T. CRUZI*, *T. BRUCEI* E *L. MAJOR*.

Conforme determinado durante o mestrado (Anexo 1 – Figura 3), a seqüência predita das proteínas TcRRM é bastante similar a duas proteínas de *T. brucei*, Tbp34 e Tbp37. Com a liberação das seqüências do projeto genoma de *L. major*, apenas 1 gene havia sido descrito, ao contrário dos dois que haviam sido descritos nas duas espécies do gênero *Trypanosoma*. A fim de verificarmos se isto ocorria devido a erros inerentes ao processo de empilhamento de seqüências com alta semelhança que é utilizado durante a montagem de um genoma, ou se esta espécie apresentava realmente uma única proteína, realizamos um experimento de Western blot com anticorpos gerados contra as proteínas Tbp34/Tbp37 (Figura 3). A figura mostra que o anticorpo é capaz de reconhecer as duas proteínas de *T. brucei*, Tbp34 e Tbp37, bem como as duas proteínas de *T. cruzi*, TcRRM1 e TcRRM2. Na raia contendo extrato total de *L. braziliensis*, apenas 1 única banda é reconhecida pelo anticorpo. Esta é compatível com o tamanho esperado a partir da seqüência predita sugerindo que se trata realmente de um único gene.

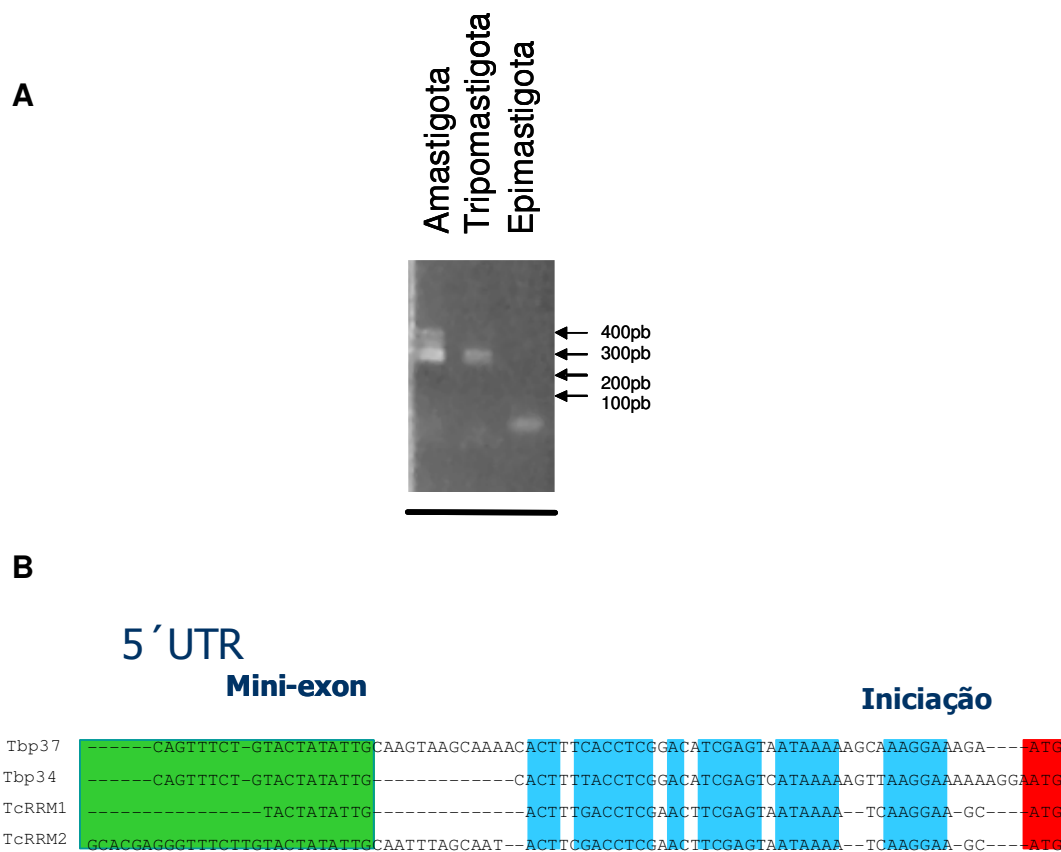


Figura 2 –Mapeamento da Região 5' Não Traduzida (5'UTRs) dos Genes

TcRRMs – Em A, produtos de amplificação da região 5'UTR dos genes TcRRM das diferentes tipos celulares de *T. cruzi* utilizando-se oligonucleotídeo iniciador para a região do mini-exon. Os padrões de peso molecular encontram-se indicados á direita. Em B, seqüências encontradas nas três formas celulares de *T. cruzi* e comparação com seqüências dos genes Tbp34 e Tbp37 de *T. brucei*. Dois tipos de seqüências foram determinados. No caso do *T. cruzi*, TcRRM 1 e 2. Em verde, seqüência de mini-exon; em azul, os nucleotídeos idênticos, em vermelho, o sítio de iniciação.

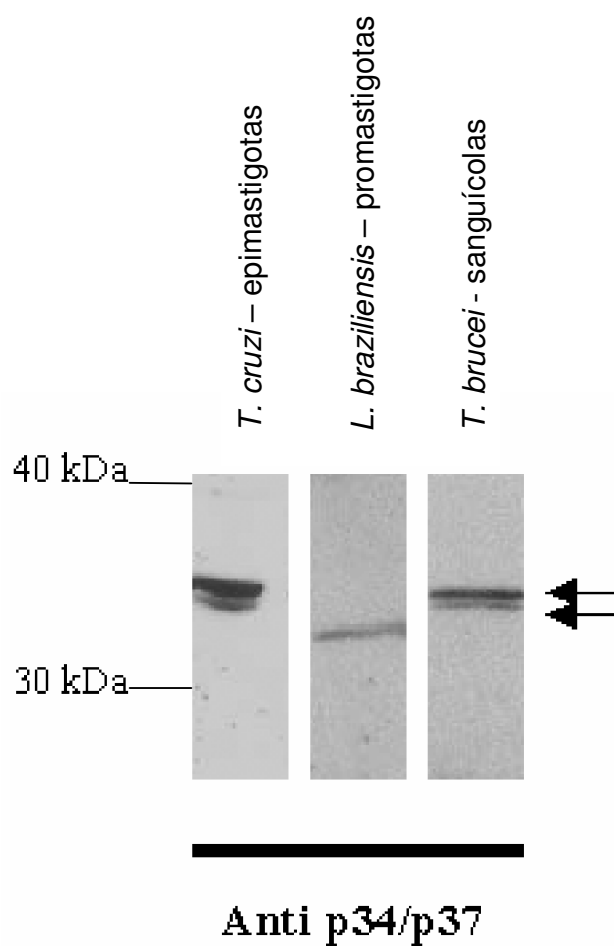


Figura 3 – Detecção de proteínas de ligação a RNA de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis* por Western blot a partir de extratos celulares usando os anticorpos gerados contra as proteínas Tbp34/Tbp37 de *T. brucei*. Gel de Poliacrilamida com SDS 12%.

MEIA VIDA DOS RNAs CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS TcRRM

Uma das formas de controle da expressão gênica utilizada pelos tripanossomatídeos com frequência é a regulação da estabilidade do RNA mensageiro. Assim, de modo a estimar o tempo de degradação do RNA mensageiro de TcRRM, nós utilizamos o inibidor da transcrição actinomicina D. Este foi adicionado na fase exponencial de uma cultura de epimastigotas de *T. cruzi*. Dadas as dificuldades de manutenção das culturas de tripomastigotas e de amastigotas, realizamos este ensaio apenas com as formas epimastigotas. Alíquotas das culturas foram retiradas em diferentes tempos após a adição da droga, a saber, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos. O RNA total foi extraído de cada alíquota e separado por gel de agarose com formamida e posteriormente foi transferido para membrana. A membrana foi hibridizada com uma sonda correspondente a região codificante de RRM (Figura 4A). Podemos observar que, mesmo após 120 minutos, a abundância do mRNA não se reduziu à 50%, o que leva a crer que este mRNA é bastante estável.

PROTEÍNAS TcRRM NAS DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO *T. CRUZI*

Ensaio de northern blot realizados durante o mestrado (Anexo I – Figura 4) sugeriam um acúmulo diferencial de RNAs mensageiros nas três diferentes formas celulares de *T. cruzi*, com um acúmulo maior na forma amastigota. Todavia, a sonda RRM não é capaz de distinguir entre os transcritos de TcRRM1 e 2 dada a semelhança na seqüência de nucleotídeos e a mínima diferença no peso molecular entre os mRNAs. Os extratos protéicos das três formas celulares do *T. cruzi*, amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas foram separados em géis de poliacrilamida com SDS realizados em duplicata. Uma das cópias do gel foi corada, e a outra foi transferida para membrana e incubada com o anticorpo anti-p34/p37, produzido contra as proteínas de *T. brucei* (Figura 5). Este procedimento nos permitiu identificar duas proteínas nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Apenas a proteína TcRRM 1, de maior peso molecular, pode ser identificada nas

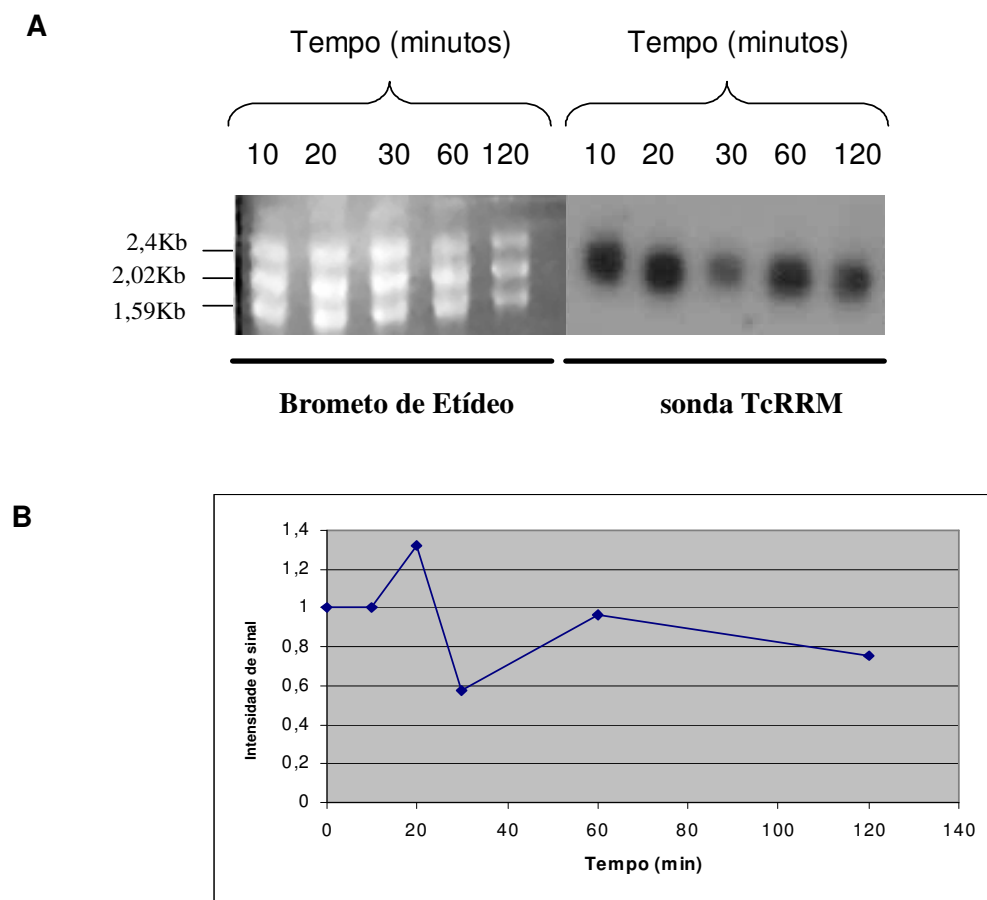


Figura 4 – Meia vida dos RNAs codificantes das proteínas TcRRMs. RNA total foi extraído em diferentes tempos após a adição de actinomicina D à cultura de formas epimastigotas de *T.cruzi*. (A) RNA separado por eletroforese em gel de agarose-formamida. O gel foi transferido para membrana e a membrana foi hibridizada à sonda TcRRM, que compreende toda a região codificante. Os pesos moleculares relativos aos RNAs ribossomais estão delimitados à esquerda. B, Diminuição da densidade do sinal obtido após o tempo de exposição à actinomicina D.

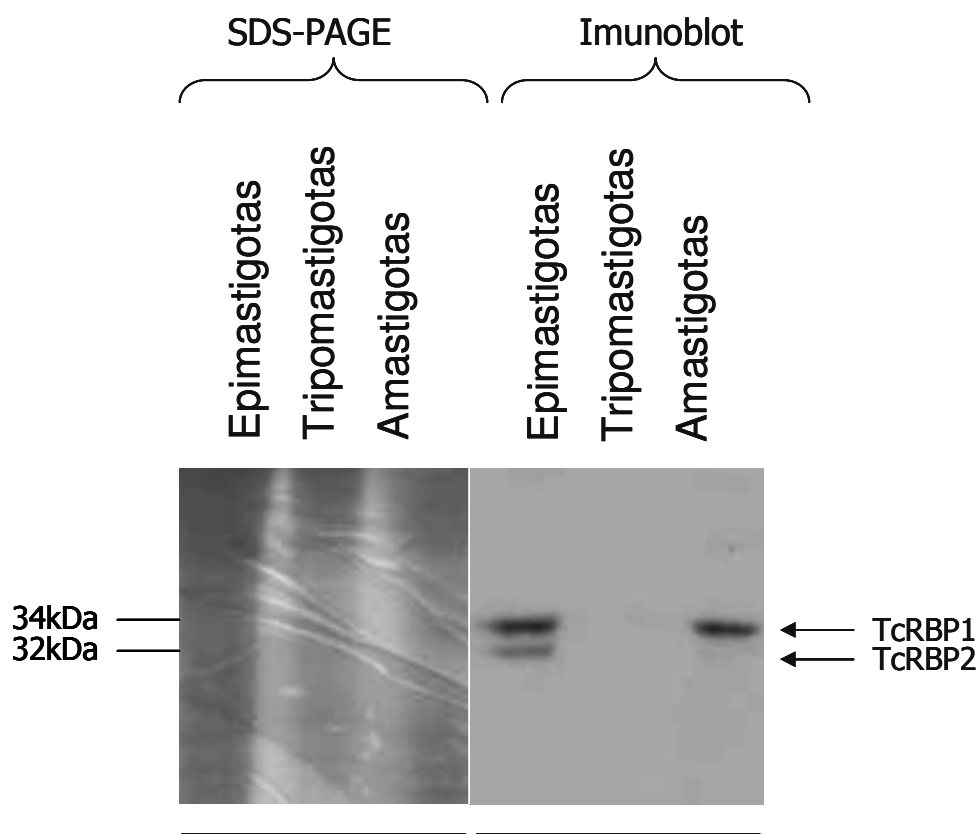


Figura 5 – Verificação da Presença das Proteínas TcRMM nos diferentes tipos celulares de *T. cruzi* – Extrato Protéico obtido a partir de 10^6 células foi separado em gel de poliacrilamida 12% e transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo específico para as proteínas Tbp34/Tbp37 de *T. brucei*. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda.

formas amastigotas. Nenhuma proteína foi identificada nas formas tripomastigotas. Este experimento sugere que as proteínas TcRRM sejam reguladas ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*.

LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS TcRRM EM *T. CRUZI*.

Experimentos realizados durante o mestrado (Anexo I – Figura 5), sugeriam que as proteínas TcRRM se localizavam no citoplasma das formas epimastigotas de *T. cruzi*, ao contrário das ortólogas de *T. brucei*. Continuamos então a avaliação da localização das proteínas de *T. cruzi* utilizando os anticorpos anti-Tbp34/Tbp37 de *T. brucei* reconhecidos por anticorpo secundário conjugado à fluoresceína, em um experimento de imunofluorescência. Neste caso, utilizamos não só as formas epimastigotas previamente estudadas (Figura 6 A-C) como também as formas amastigotas (Figura 6 D-E) e tripomastigotas (Figura 6 F-I).

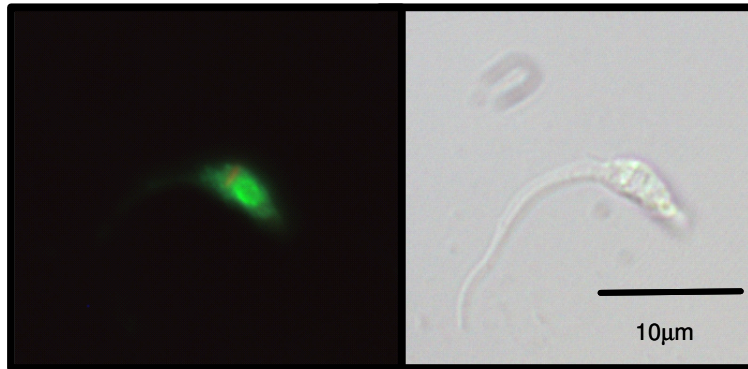
Nas formas epimastigotas, (Figura 6 A-C) o sinal emitido se concentra na região perinuclear, região rica em retículo endoplasmático, local de síntese protéica. Esta localização, que parece ser diferente das proteínas ortólogas de *T. brucei* pode sugerir que as mesmas talvez apresentem funções fisiológicas distintas. Neste experimento, pudemos detectar as proteínas TcRRM no citoplasma das formas amastigotas, possivelmente na região abaixo da membrana (Figura 6 D-E).

No caso das formas tripomastigotas, a localização foi variável, ora apresentando uma localização semelhante àquela apresentada pelos amastigotas (6F), ora apresentando uma localização mais difusa no citoplasma, ora não apresentando marcação nenhuma (Figura 6G-I). Este resultado variável foi encontrado em todas as vezes que esse experimento foi repetido.

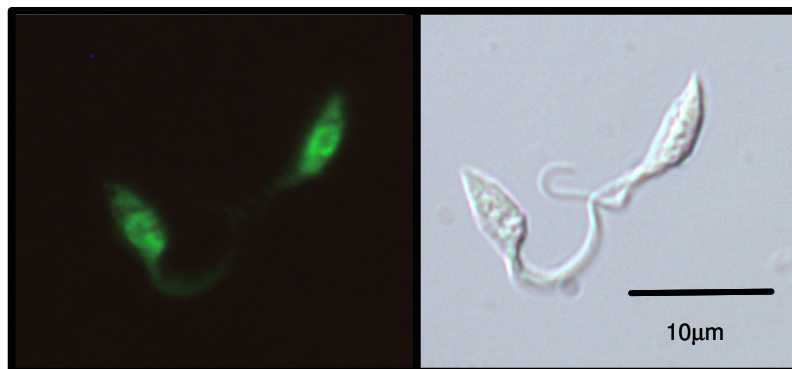
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM1 E TcRRM2 A HOMORRIBOPOLÍMEROS

Uma vez que as proteínas TcRRM apresentam domínios conservados de ligação a RNA e com o intuito de avaliar se estas proteínas reconheceriam e se

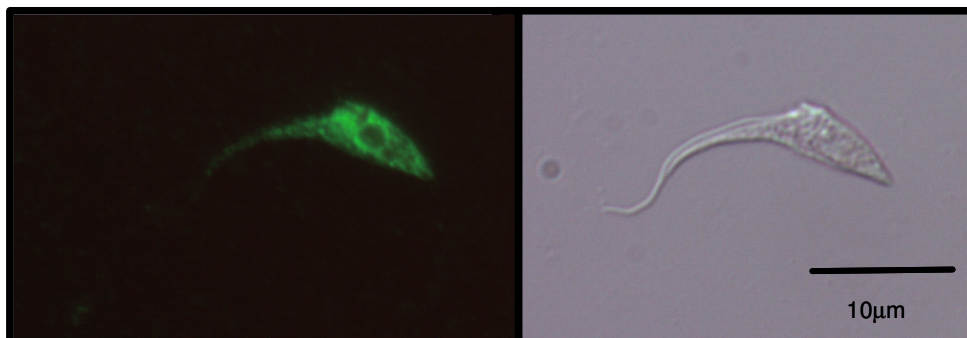
A



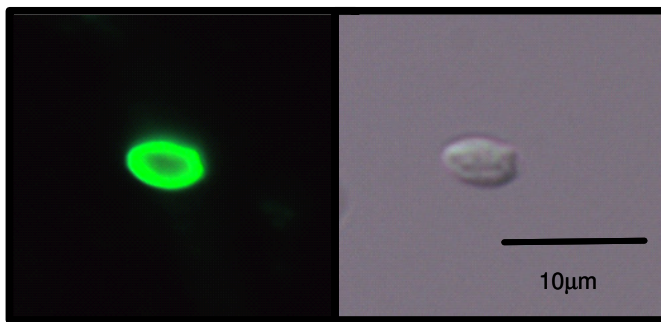
B



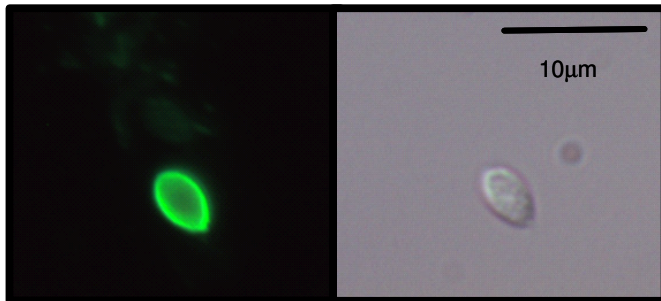
C



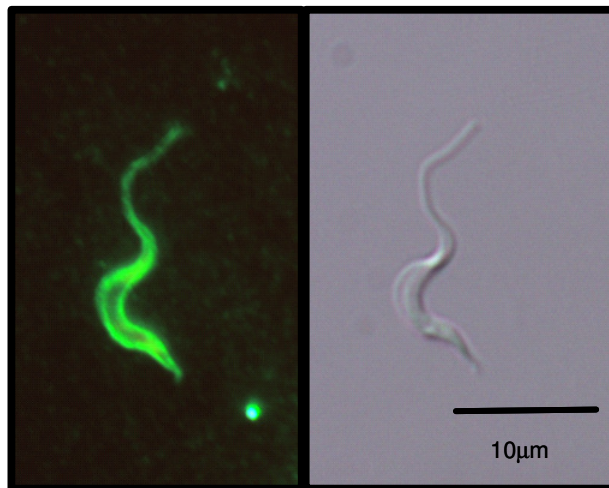
D



E



F



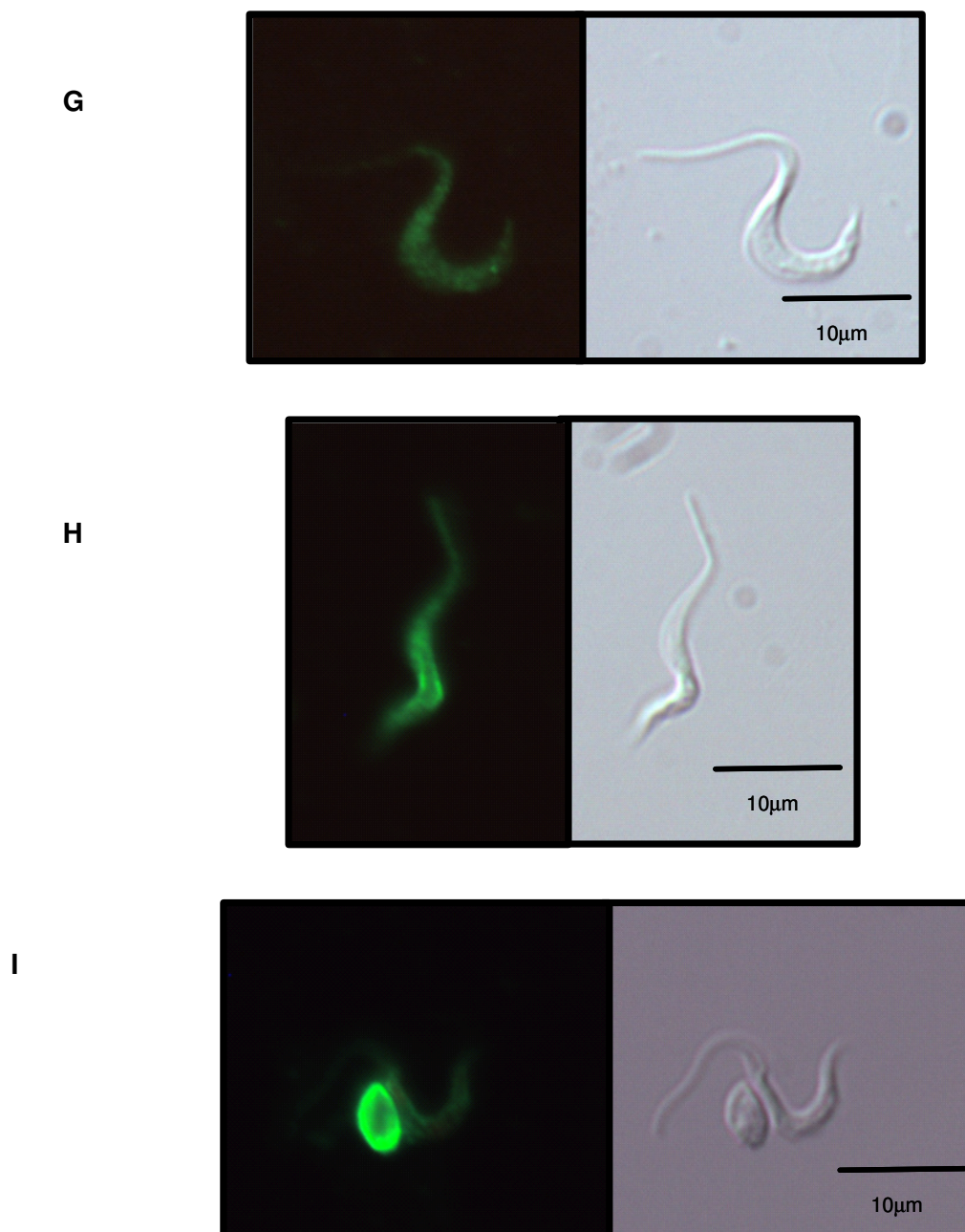


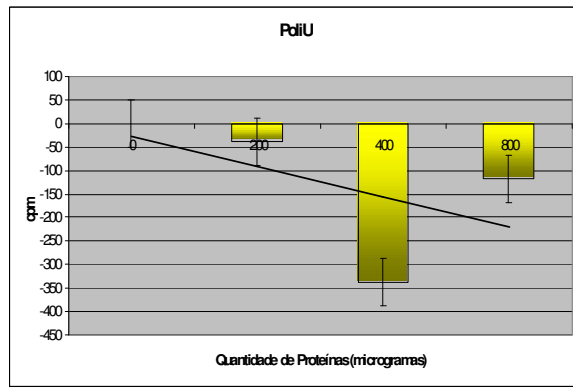
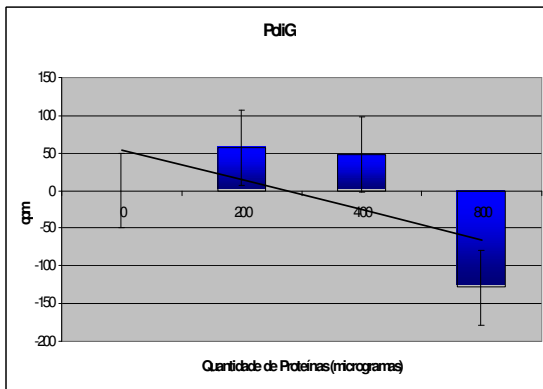
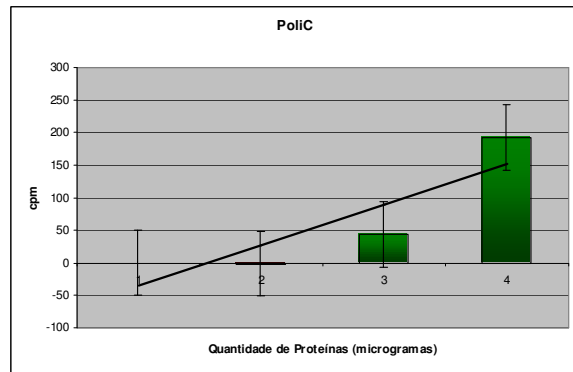
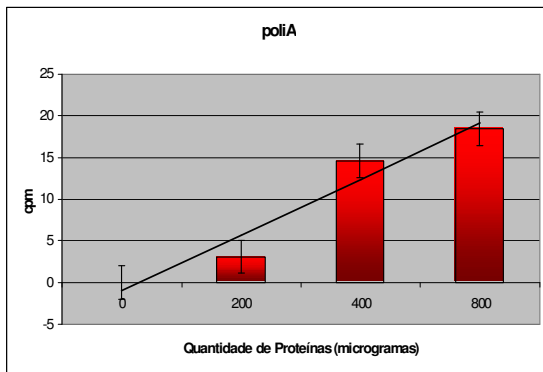
Figura 6 – Determinação da sub-localização celular das proteínas TcRRMs por imunofluorescência nas células de *T. cruzi*. À direita, microscopia de contraste diferencial interferencial, à esquerda, filtro para fluoresceína indicando as proteínas TcRRMs; A-C, formas epimastigotas; D-E; formas amastigotas; F-H, formas tripomastigotas; I, forma tripomastigota e forma amastigota; A barra indica 10μm.

ligariam a seqüências homogêneas de RNA, incubamos as mesmas então com polirribonucleotídeos: poliadenina (A), policitosina (C), poliguanina (G) e poliuridina (U). A reação de ligação proteína-RNA ocorreu incubando-se entre 0 e 800ng de proteína com as sondas de RNA marcadas com 40.000 cpm de cada sonda. Ao final da incubação, o material foi filtrado em membranas de nitrocelulose. A radioatividade nelas fixada, relativa ao complexo proteína-RNA, foi contada em cintilador. Os experimentos foram feitos em duplicata e obteve-se a média das contagens. Observou-se uma capacidade de ligação crescente de TcRRM1 na presença dos polirribonucleotídeos poliA e poliC conforme aumentava-se a quantidade de proteína, diferentemente do que ocorre com o polirribonucleotídeos poliG e poliU (Figura 7A). No caso da proteína TcRRM2, esta ligação dependente da concentração de proteína ocorreu com o polirribonucleotídeo poliC. (Figura 7B).

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA TcRRM1 A OLIGORIBONUCLEOTÍDEOS

As proteínas ortólogas Tcp34 e Tcp37 de *T. brucei* foram caracterizadas como sendo capazes de se ligarem ao rRNA 5S. Como as proteínas TcRRM apresentam localização diferente, prosseguimos os ensaios de ligação a RNA testando não apenas o rRNA 5S, como também oligoribonucleotídeos sintéticos. Estes foram desenhados conforme DiNoia *et.al.* (2001a) e apresentam seqüências ricas em adenina e em uridina (sonda S1) comumente encontradas em elementos cis de regiões não traduzidas ou seqüências onde algumas adeninas foram substituídas por guaninas (sonda S2). Como controle negativo, escolhemos a molécula de ssDNA SP6. Todas as sondas foram marcadas radioativamente, ou através de marcação terminal no caso das sondas S1 e S2 e SP6, ou, no caso do rRNA 5S, durante a transcrição *in vitro*. Neste experimento, a proteína TcRRM1 reconheceu a sonda S1 (Figura 8). Essa ligação não ocorreu com as sondas S2 nem com a sonda de rRNA 5S e nem com a molécula de ssDNA SP6, à exceção de sua concentração de 800ng. Entretanto, este experimento não pode ser validado já que em nenhuma das vezes em que tentamos repeti-lo, obtivemos este mesmo resultado. Diversos testes foram feitos, com diferentes condições de gel e

A



B

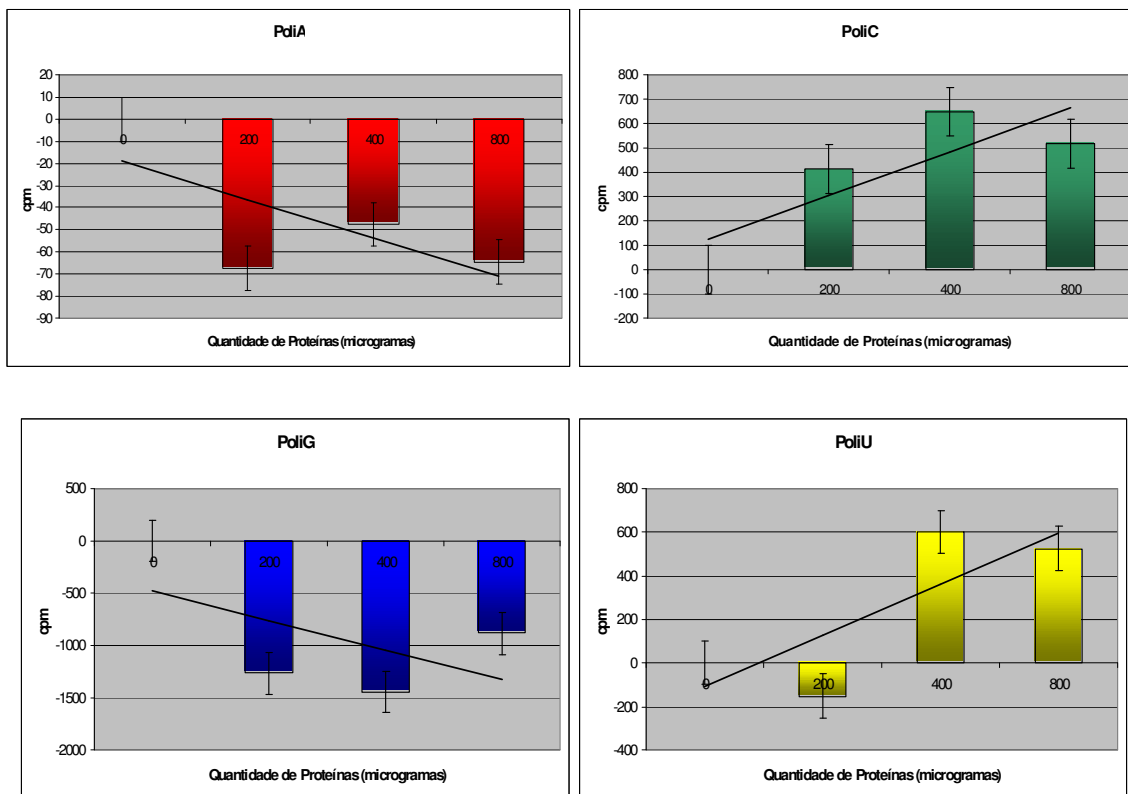
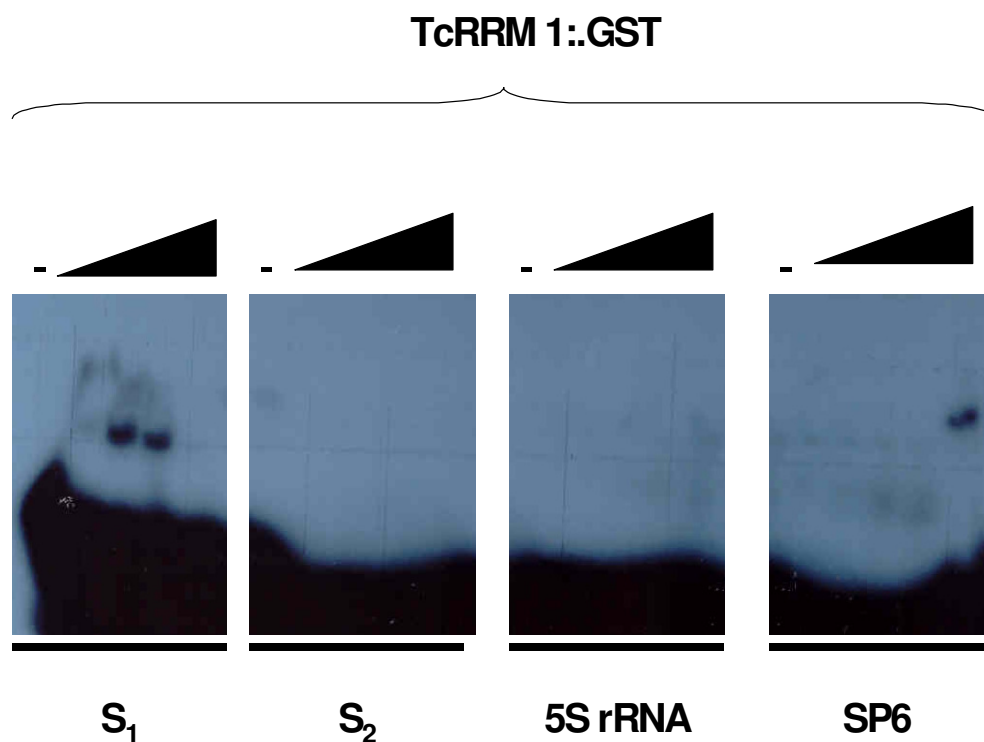


Figura 7 – Ligação das Proteínas TcRRM a Homorribopolímeros – Em A, TcRRM1 e em B, TcRRM2. As proteínas de fusão TCRRM foram incubadas com poliribonucleotídeos, poliadenina, policitosina, poliguanina e poliuridina. A reação de ligação proteína-RNA ocorreu utilizando-se entre 0 e 800ng de proteína com 40.000 cpm de cada sonda em Tris-HCl 10mM; glicerol 5%, KCl 100mM; MgCl₂ 5mM, BSA 1?g/mL e tRNA 50ng/µL por 10 minutos a 37°C. Ao final da incubação, a reação era aplicada em membranas de nitrocelulose mantidas sob pressão negativa, posteriormente secas e contadas em cintilador.



S1 – AUU UAU UUU UAU UUA

S2 - AUG GUG UUG GUG UUG

5SrRNA – AAGGGTTGTGGCCGCTTAACTTCACAAATCGGACGGGATGTGGTG
CACTCGGCCAAGTATGGTCGTACCC

SP6 - ATTTAGGTGACACTATAG

Figura 8 – Teste de Ligação das Proteínas TcRRM a Oligorribopolímeros –

A proteína de fusão TcRRM 1 foram incubadas com os oligoribonucleotídeos: S1, S2, 5S rRNA e SP6. A reação de ligação proteína-RNA foi aplicada em gel de poliacrilamida não-desnaturante para separação da sonda livre e do complexo proteína-sonda. O gel foi transferido para papel, seco e exposto a filme de raio X.

de reação de ligação e esse resultado não pode ser repetido para a proteína TcRRM1. No caso da proteína TcRRM2, não observamos em nenhuma condição ligação a qualquer dos oligoribonucleotídeos testados.

ACÚMULO DE MRNA DE TCP28 NAS 3 DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *T. CRUZI*.

O gene Tcp28 foi identificado durante a elaboração da dissertação de mestrado (Anexo 1 – Figura 2) quando o mesmo foi caracterizado como estando intercalado no arranjo *in tandem* composto por cópias dos genes TcRRM. Este gene codifica uma proteína putativa de 28kDa. Aqui, nós avaliamos se este gene estava sendo transcrito através do acúmulo de RNAs mensageiros nos três diferentes tipos celulares do *T. cruzi*. A sonda específica para o gene Tcp28 (Sonda Me-Tcp28) foi capaz de reconhecer um RNA, em torno de 1,2Kb, nas três formas (Figura 9). Todavia, comparando-se a intensidade do sinal, vemos que o acúmulo é maior nas formas tripomastigotas. Este resultado é diferente do resultado encontrado para TcRRM (Anexo 1 – Figura 4) que tem um maior acúmulo nas formas amastigotas, sugerindo uma regulação diferencial para os genes contidos no tandem.

MAPEAMENTO DAS REGIÕES NÃO TRADUZIDAS (3´ E 5´UTR) DO GENE TCP28

A fim de caracterizarmos o gene Tcp28, com as suas regiões não traduzidas e seus sítios de processamento, utilizamos as mesmas técnicas já descritas para os genes TcRRM. Assim, amplificamos, clonamos e seqüenciamos. Neste caso, utilizamos apenas as formas epimastigotas de *T. cruzi* e os oligonucleotídeos iniciadores (Teng NH2 Bam e Tcp28 COOH Bam). Uma única seqüência e um único sítio foram mapeados nos 10 clones seqüenciados para a região 3´UTR (Figura 10).

O mesmo também se pode dizer para a porção 5´UTR. A seqüência obtida apresenta um único sítio de trans splicing (Figuras 11 A-B).

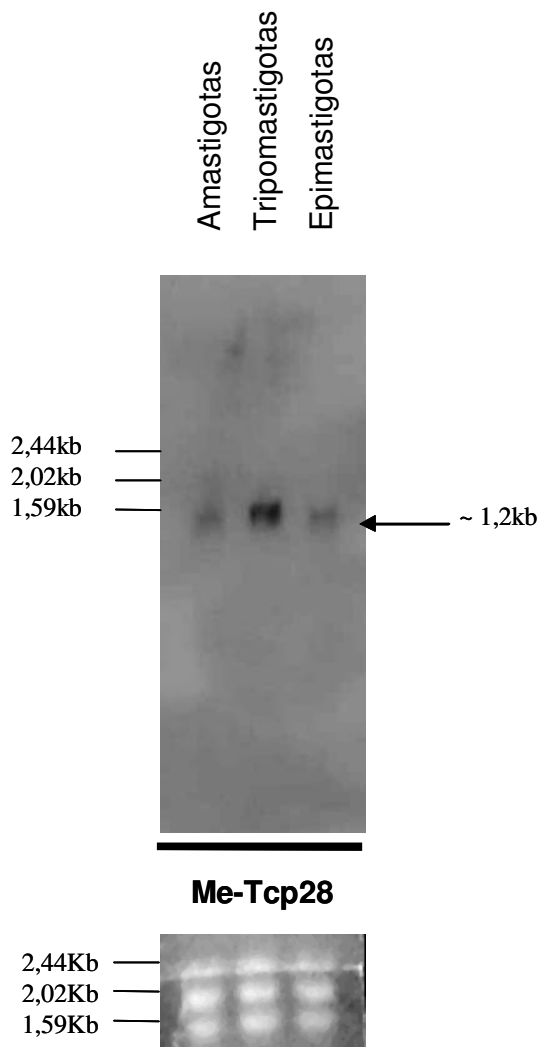


Figura 9 – Acúmulo de mRNA de Tcp28 nos 3 diferentes tipos celulares de *T. cruzi*. RNA total foi separado por eletroforese em gel de agarose-formamida, transferido para membrana e hibridizado com a sonda Me-Tcp28. Os pesos moleculares dos RNAs ribossomais estão indicados à esquerda. Abaixo, as quantidades equivalentes de rRNA nas 3 formas de *T. cruzi*, usadas como controle de carregamento no gel.

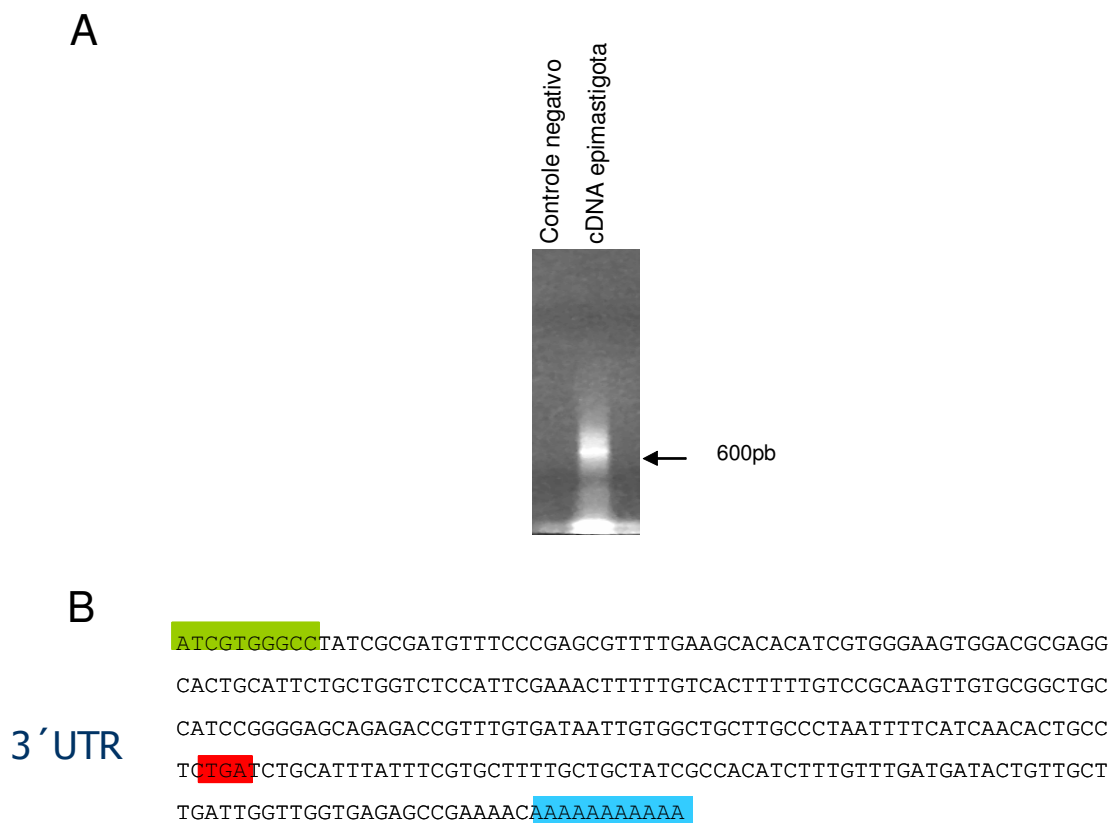


Figura 10 – Determinação da região não traduzida (3'UTRs) do gene *Tcp28*

– Em A, produto de amplificação da região 3'UTR da forma epimastigota de *T. cruzi* pela técnica de 3'RACE; Em B, a sequência obtida. Em vermelho, o sítio de término da tradução e em azul o único sítio de poliadenilação mapeado.

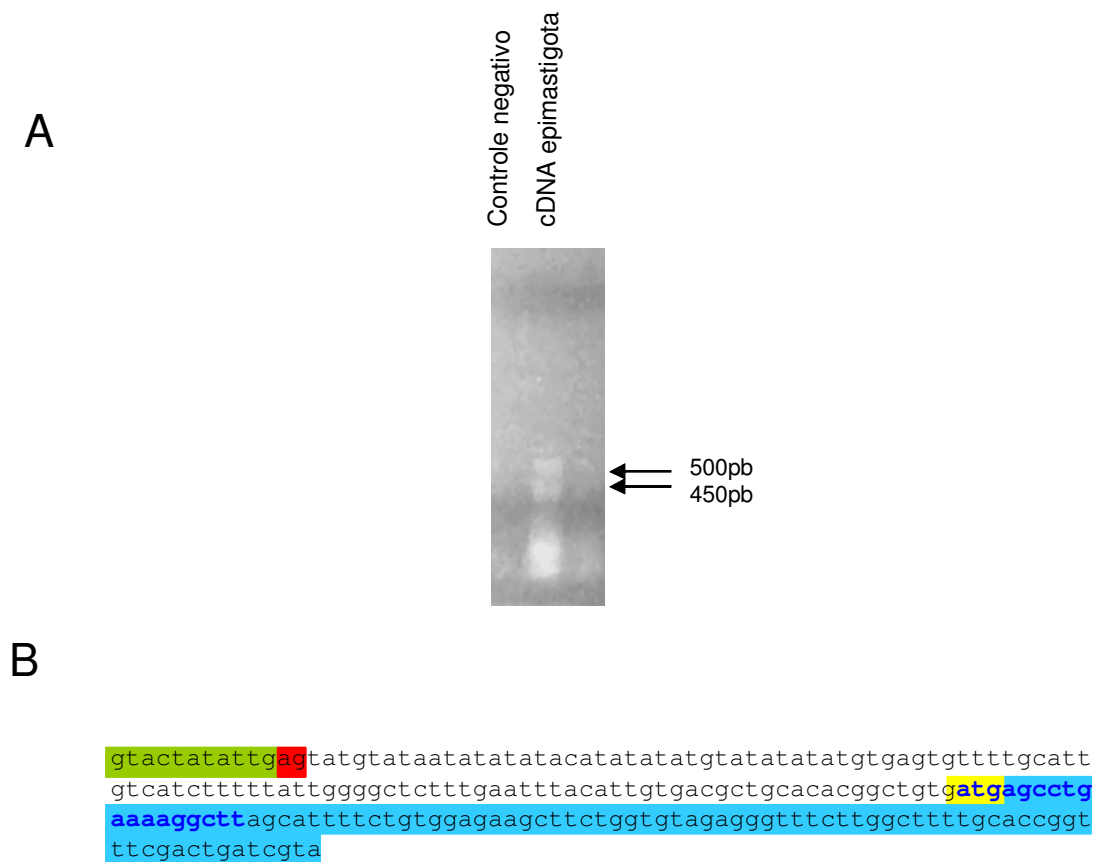


Figura 11 – Determinação da região não traduzida (5'UTRs) do gene *Tcp28*

– Em A, produto de amplificação da região 5'UTR da forma epimastigota de *T. cruzi* com o uso do oligonucleotídeo iniciador mini-exon; Em B, a sequência obtida. Em verde a sequência do mini-exon; em vermelho, o sítio de trans-splicing, em amarelo, o sítio de iniciação e em azul, a sequência codificante.

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PREDITAS PARA AS PROTEÍNAS DE TCP28 DE *T. CRUZI*, *T. BRUCEI* E *L. MAJOR*

Assim como TcRRM, Tcp28 também pode ser identificada nos genomas de *T. brucei* e de *L. major*. Este gene não havia sido ainda identificado em nenhum destes organismos, tampouco pudemos encontrar ortólogos em outros organismos baseados nas seqüências depositadas no GenBank. A figura 12 mostra o alinhamento entre as seqüências preditas. Pode-se perceber que a proteína de *L. major* é maior (135 aminoácidos a mais) e menos conservada que Tcp28 de *T. cruzi*. O arranjo gênico também é conservado nestes organismos com este gene se localizando intercalante ao gene TcRRM precedido pelo gene da fucose sintase.

MEIA VIDA DO RNA CODIFICANTE DA PROTEÍNA TCP28

Os resultados de northern blot da figura 9 sugeriram que o mRNA de Tcp28 acumulava de forma diferencial ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. De maneira a avaliarmos a estabilidade do RNA mensageiro, realizamos um experimento sob as mesmas condições já explicadas antes para os mRNAs de TcRRM na figura 4 (Figura 13A). Conforme podemos observar no gráfico (Figura 13B), neste caso também não foi possível determinar a queda de 50% na intensidade com os tempos utilizados, indicando que o RNA mensageiro codificante para Tcp28 parece ser bastante estável com uma meia-vida superior a 2 horas.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE TCP28

Com o intuito de dar prosseguimento aos estudos de função e localização desta proteína, clonamos a região codificante com o auxílio dos oligonucleotídeos iniciadores TcHO-NH₂ e Teng-Sal no vetor de expressão pGEX4T1 e produzimos a proteína recombinante em grande escala, partindo-se de 4L de cultura bacteriana.

Resultados

```

Tcp28      -----MGLKRLS ICCGEASGVEGFLAFAPVSTDRIP-----S 32
Tbp28      -----MLLKLPVFGTEFLTDAHLAIMTSGGVSIP-----L 32
Lmp28      MPGASDRGTAYVSCRHCLPACFSRAVVAVCKLTSPAPGIPPLVSLCRYGLPGYSAQEGE 60
           : : . . . : *

Tcp28      ELRKRVEALHVNHQMPYVLSRVAASAALSLSLK-----APFLFVGSREEARKY 80
Tbp28      EMESRCKELHPNHRVPYVLSRLAASSALSTVLG-----KPITFGSRHDAEQY 80
Lmp28      AFSAAASGLHPRHQLPFVLSRVAASKAIASLSPDKRAACPGEEDGPAVVFTDRREAAPTL 120
           : . ** * : : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Tcp28      G-ANLSLSHEDAVGGAVAWCDN-----VVF 104
Tbp28      D-ANLSLSHEDFVGAAVAWRKG-----TSN 104
Lmp28      HGCCLSIAHEDSAAASVAWSVPSPDSSSFKDYHAAPERLYMEAQLVCSHSTLPDATATSF 180
           . ** : : * * . . : : * * . .

Tcp28      VFGIDVVDVKQLARVRRRPFHFAARCMPCCQPSMLD---AVELLKVQTMYYDDCIDPS--- 158
Tbp28      AIGIDVVDVQQLERVVKRFPQFAARFMPCDLSALS---SVDACNIERTFRGHADQV--- 158
Lmp28      AYAIDVVNVAEVHRVRSRFPHFQGRWMPQCTTASADDVGRALTCVQKQHQCVAAVGAP 240
           . . * * * : * : * * * : * . * * * : . : : .

Tcp28      -----DVVLAQHWGLRECCVKLVGILGR 181
Tbp28      -----TVTLSQHWGLRECCVKLVGVEGR 181
Lmp28      GGSHGGEVGSACQAACRRDEWVKHLVTPYVTEADAYAAVVLAQHWGVRECAVKLVGIPGR 300
           * . * : * * * : * * * : * * * : * *

Tcp28      SFPFDCFRGP-----IAMFPERFEAHIVGSGREALHSAGLHSKLFVTF 224
Tbp28      TFPFECFRGP-----RAYFPDRFKAQVVEEGSDALRAAGLNSSLFVST 224
Lmp28      SFAYECVRALPPRGAVVTESTPFTASF LMSHTLYSAEVHGAEAAATLAQQRLHPLLYLYT 360
           : * . : * . * . : * . : * : * : * : * : *

Tcp28      CPQVVQLPSGEQRPFVIIVAACPCLHQHCL 254
Tbp28      WPELLKLPSGDVKPYIVVVAACPRKSAV-- 252
Lmp28      WTEWVPLNSTVDLPYVVVLACAPCRSDAR- 389
           . : : * * * : : : * . *

```

Figura 12 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditas para a proteína Tcp28 de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*. Os asteriscos indicam os aminoácidos idênticos; os pontos, diferenças em um único nucleotídeo e os dois pontos, dois aminoácidos.

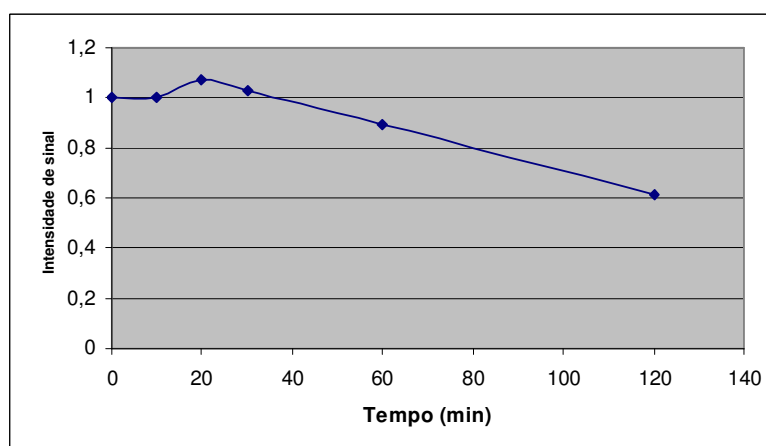
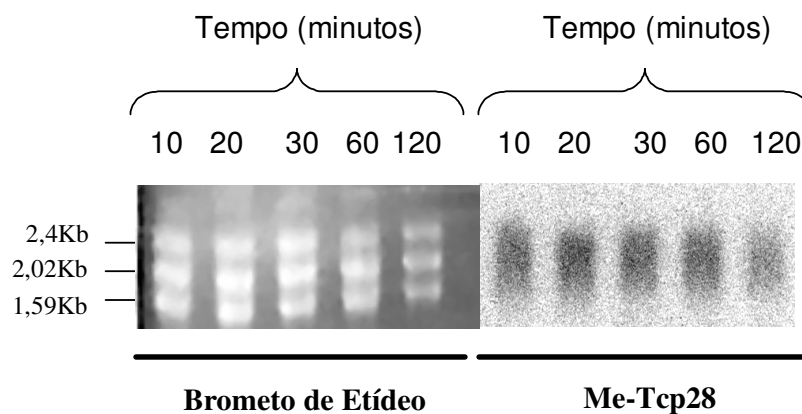


Figura 13 – Verificação da meia vida do RNA codificante da proteína **Tcp28.** RNA total foi extraído em diferentes tempos após a adição de actinomicina D à cultura de formas epimastigotas de *T.cruzi* e foi separado por eletroforese em gel de agarose-formamida. Os pesos moleculares relativos aos RNAs ribossomais estão delimitados à esquerda. O gel foi transferido por northern blot. A membrana foi hibridizada à sonda Me-Tcp28 e posteriormente exposta. As bandas obtidas foram analisadas pelo programa ImageQuant 5.2.

Estas proteínas recombinantes foram então utilizadas para produção de anticorpos em camundongos.

Os anticorpos produzidos reconheceram a proteína Tcp28, tanto fusionada à GST quando após a digestão com a enzima trombina que libera a proteína de fusão. O anticorpo não reconheceu a proteína GST, sugerindo especificidade (Figura 14A). Os soros obtidos foram então testados com extratos celulares totais das formas epimastigotas de *T. cruzi*. O soro imune foi capaz de reconhecer uma proteína com em torno de 30kDa, não identificada pelo soro pré-imune, corroborando o tamanho esperado decorrente da seqüência predita de aminoácidos (Figura 14B).

PRESENÇA DE TCP28 NOS 3 DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *T. CRUZI*

O acúmulo diferencial dos RNAs de Tcp28 nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* nos sugere um controle ao longo do desenvolvimento. Assim, avaliamos a presença da proteína Tcp28 nos 3 diferentes estágios do parasita. A figura 15 mostra a presença de bandas em torno de 30kDa identificadas não só em epimastigotas como também em amastigotas e em tripomastigotas. Todavia, parece haver o reconhecimento de uma banda dupla.

LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA TCP28 EM *T. CRUZI*

A proteína predita Tcp28 não possui domínio conservado para que pudéssemos inferir sua função ou localização. Sua expressão foi definida por detecção por northern blot e por western blot. Como sua localização poderia informar sobre sua atividade na célula, avaliamos a capacidade dos anticorpos produzidos localizarem a proteína Tcp28 pela técnica de imunofluorescência. Em dois ensaios diferentes, observamos um sinal intenso e difuso no citoplasma das células epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 16).

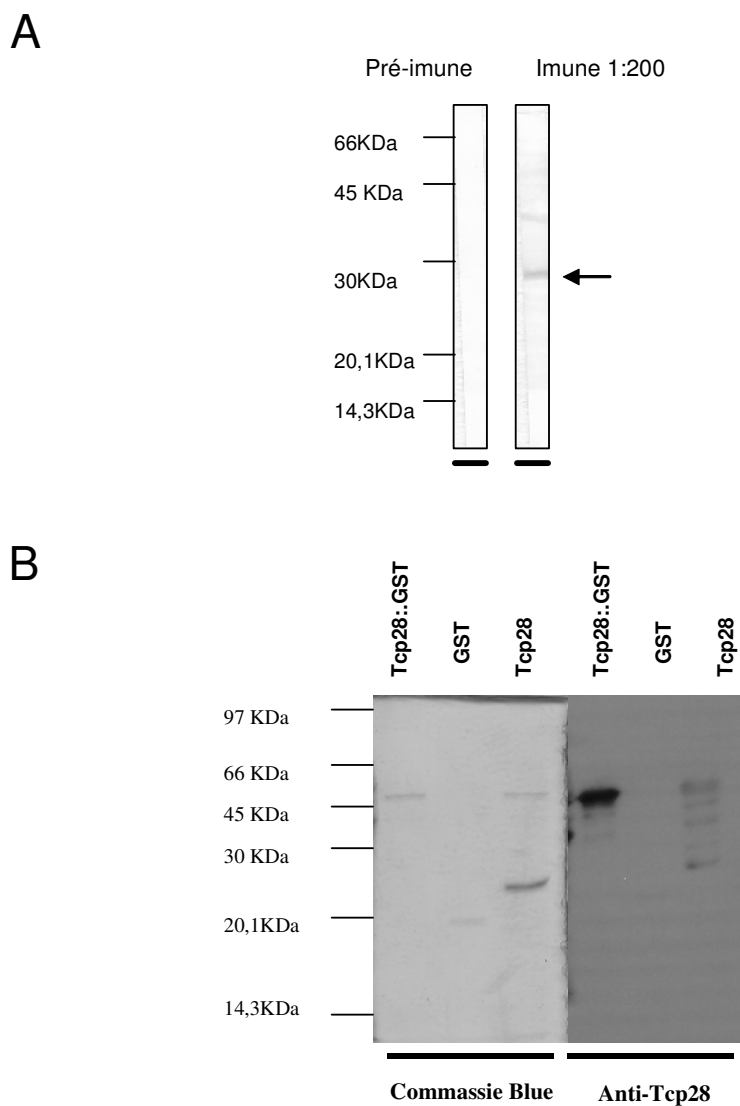


Figura 14 – Reação de anticorpos contra a proteína recombinante Tcp28.

Camundongos foram imunizados com a proteína recombinante Tcp28. (A) soro pré-imune e soro imune incubados com extrato total da formas epimastigotas; (B) soro incubado com a proteína recombinante de fusão purificada, com a GST purificada e com a proteína recombinante digerida com a enzima trombina.

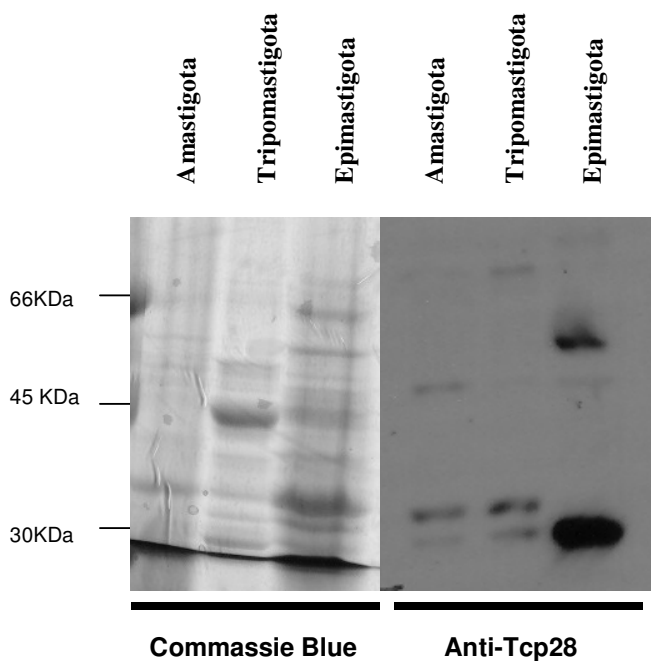
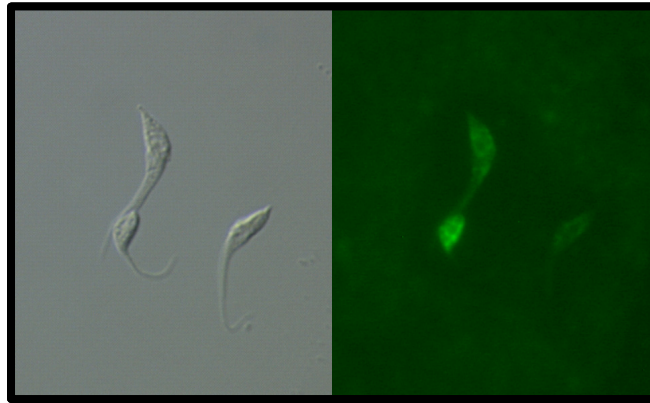


Figura 15 – Verificação da presença de Tcp28 nos 3 diferentes tipos celulares de *T. cruzi*. Extrato protéico contendo 10^6 células separado através de eletroforese em gel de poliacrilamida e transferido para membrana. A membrana foi incubada com o anticorpo contra Tcp28 recombinante. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda.

A



B

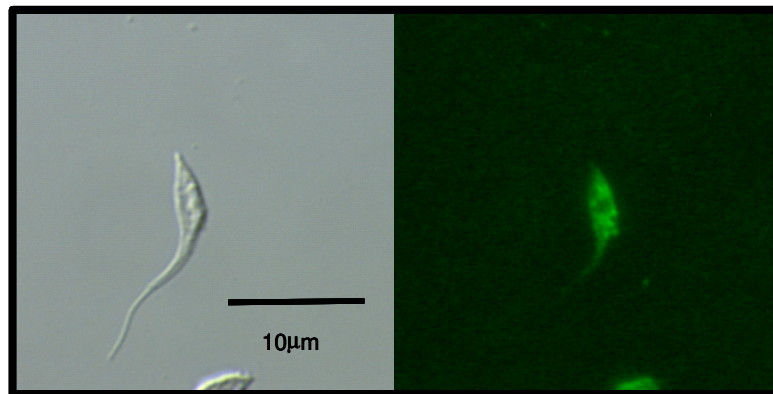


Figura 16 – Determinação da sub-localização celular da proteína Tcp28 por imunofluorescência em *T. cruzi*. À esquerda, microscopia de contraste diferencial interferencial, à direita, filtro para fluoresceína indicando as proteínas TcRRM. A e B - Formas epimastigotas.

DISCUSSÃO

O controle da expressão gênica em tripanossomatídeos é bastante complexo. Apesar de as três classes de RNA polimerase já terem sido identificadas com base na sua resistência à α -amanitina e na identificação dos respectivos genes, apenas poucos promotores foram caracterizados, sendo a transcrição de genes que codificam proteínas basicamente policistrônica. A regulação transcricional já foi descrita, mas apenas para os genes com promotores característicos da RNA polimerase I, como os genes VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) (Vanhamme e Pays, 1995). Assim, a regulação pós-transcricional é essencial, sendo a expressão da maioria dos genes que codificam proteína controlada durante o processamento e tradução do RNA e não na iniciação da transcrição. As regiões intergênicas e não-traduzidas são responsáveis pelo controle da meia vida e estabilidade do mRNA, pois apresentam seqüências que são reconhecidas por proteínas de ligação a RNA, como já descrito por diversos autores (Nozaki e Cross, 1995; Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000; Dallagiovanna *et al.*, 2001) Daí a importância da identificação de novas proteínas de ligação a RNA que possam controlar a estabilidade e assim, a meia-vida destas moléculas.

Durante a elaboração da dissertação de mestrado, nós identificamos os genes *TcRRM1* e *TcRRM2* através da análise das seqüências expressas disponibilizadas nos bancos de dados pelo Projeto Genoma de *T. cruzi*, lançado em 1994. Este projeto tinha como objetivo principal permitir o acesso global às seqüências do parasita para a identificação de novos genes (The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium, 1997) através da análise de seqüências-alvo de expressão (ESTs - *Expressed Sequence Tags*) (Verdun *et al.*, 1998). A identificação dos genes PDZ-5 (Coelho *et al.*, 2003) e TcRABT (Ramos, *et al.*, 2005) em nosso laboratório e dos genes que codificam para a subunidade F da

ATP sintase e a protease prenil CAAX identificados em 2000 por Porcel *et al.* exemplificam esta abordagem.

A análise das proteínas codificadas pelos genes TcRRM1 e 2 mostrou que as mesmas são bastante semelhantes entre si apresentando a estrutura modular comumente encontrada em proteínas de ligação a RNA. Níveis variáveis de diversidade de seqüência entre membros desta família de genes podem refletir a divisão atual entre as linhagens I e II de *T. cruzi* (Cerqueira, *et al.*, 2008). Cada uma apresenta dois domínios de ligação a RNA do tipo RRM (RNA recognition motif). O domínio RRM é comumente visto em proteínas envolvidas em diversos processos celulares como splicing, tradução e estabilidade dos RNAs (Burd & Dreyfuss, 1994). De Gaudenzi *et al.*, descreveram em 2003 uma família de proteínas RRM em *T. cruzi* em que cada membro apresentava um domínio RRM (De Gaudenzi, *et al.*, 2003). A presença de mais de um domínio RRM já foi descrita em diversas proteínas, como a PABP que apresenta 4 destes (Burd & Dreyfuss, 1994). A presença de mais de um domínio pode elevar a afinidade da proteína pela molécula de RNA ou pode estar envolvida em interações com outras proteínas (Lunde, *et al.*, 2007). Além dos módulos RRM, estas proteínas apresentam um domínio N-terminal rico nos aminoácidos alanina, prolina e lisina (APK-Rich). Esta região básica pode interagir com regiões ácidas de outras moléculas.

Os genes TcRRM estão arranjados em um tandem no genoma de *T. cruzi* contendo pelo menos oito cópias e a amplificação da região intergênica revelou um fragmento de 1,3Kb cuja seqüência apresentou uma fase aberta de leitura. Esta apresentou alta homologia a um EST: TENG 0695. A sua seqüência prediz uma proteína de aproximadamente 28kDa e o gene intercalante foi então, nomeado Tcp28. Bem como os genes TcRRM, o gene Tcp28 também parece ser exclusivo de tripanossomatídeos, sendo encontrado somente nos genomas dos três parasitos já disponibilizados, *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*. Além da conservação da seqüência também parece haver conservação do arranjo gênico. A alternância de genes com função e padrão de expressões distintos é bastante comum em tripanossomatídeos (Soares, *et al.* 1989; Teixeira, *et al.*, 1995, Di Noia,

et.al., 1998, Ávila, *et.al.*, 2001). Foi proposto, inclusive, que todos os genes seriam transcritos em grandes unidades policistrônicas, como para o cromossomo 1 de *L. major* (Myler, *et.al.*, 1999).

As regiões não traduzidas exercem um papel fundamental no controle da expressão gênica agindo em *cis* com fatores que podem regular a estabilidade e tradução de um dado RNA. Elementos em *cis* já foram identificados em diversos genes de tripanossomatídeos tanto na região 5'UTR (Teixeira *et al.*, 1999; Pasion *et al.*, 1996) quanto na região 3'UTR (Wilson *et al.*, 1999; Di Noia *et al.*, 2000 e D'Orso e Frasch, 2001a). Deriva daí a importância de se mapear os sítios de processamento e de se delimitar as regiões não traduzidas durante a caracterização de um determinado gene. Diversos genes que são regulados pós-transcricionalmente apresentam a região ARE no 3'UTR, por exemplo, os genes da família de mucinas TcSMUG (D'Orso e Frasch, 2001a). Esta região está implicada na desestabilização dos RNAs mensageiros em eucariotos superiores e recentemente foi observado que a proteína TcUBP1 é capaz de reconhecer esta região em *T. cruzi*, participando, assim, do controle da meia-vida do RNA mensageiro (D'Orso e Frasch, 2001b). É possível que a expressão dos genes RRM também seja controlada desta forma. Para TcRRM, pudemos identificar dois diferentes 3'UTR que foram nomeadas 3'UTR A e 3'UTR B, todavia, não foi possível a associação entre a presença de uma destas seqüências de UTR e um determinado estágio celular, tampouco nos foi possível detectar associação entre a presença dos diferentes sítios de poliadenilação do 3'UTR A e as diferentes formas do parasito. Para o gene Tcpc28, uma única seqüência 3'UTR foi obtida entre as diferentes formas do parasito.

Devido à presença da inserção ou deleção dos 18 nucleotídeos na porção 5'da região codificante, pudemos distinguir entre os genes TcRRM 1 e 2 ao analisarmos a sua região 5'UTR. Uma única seqüência foi obtida para cada gene. Interessantemente, esta seqüência é bastante similar à região 5'UTR dos genes Tbp34 e Tbp37 de *T. brucei*, apresentando inclusive uma deleção comum a Tbp34 e a TcRRM1. Uma única seqüência foi obtida para a 5'UTR de Tcpc28. Todavia,

como os ortólogos de *T.brucei* e *L. major* não foram caracterizados, não é possível a comparação.

Comparando as seqüências de aminoácidos de TcRRM1 e 2, a principal diferença apresentada é a presença ou a ausência de 18 nucleotídeos na porção 5' da região codificante. A procura por seqüências semelhantes em bancos de dados mostrou que os genes RRM de *T. cruzi* (TcRRM) são bastante semelhantes a dois genes já descritos em *Trypanosoma brucei*: Tbp34 e Tbp37. A semelhança foi tal que anticorpos gerados contra as proteínas de *T. brucei* são capazes de reconhecer proteínas em diferentes clones e cepas de *T. cruzi*. Um gene semelhante também foi encontrado no genoma de *Leishmania major*. TcRRM1 também é semelhante a um antígeno previamente descrito em amastigotas de *T. cruzi*, TcAG18, através de rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de amastigotas com soro chagásico humano (Da Rocha, *et.al.*, 2002). O projeto de *L. major* sugeria a presença de apenas 1 único gene contrastando com os dois genes descritos para as duas espécies do gênero *Trypanosoma*. Neste trabalho, um experimento de Western blot mostrou a presença de 1 única banda protéica compatível com o tamanho esperado sugerindo ser este o caso em *L. braziliensis*. Ainda assim, o arranjo gênico parece ser mantido, com a presença de um ortólogo de Tc28 localizado imediatamente adjacente às ortólogas de TcRRM, tanto em *L. major* quanto em *T. brucei*. Este resultado é compatível com a noção de grandes agrupamentos de genes policistrônicos nos protozoários tripanossomatídeos (El Sayed, *et.al.*, 2005b).

Foi demonstrado durante o mestrado que os genes RRM apresentam níveis de RNA mensageiro detectáveis nos três diferentes estágios do ciclo do *T. cruzi*, sendo o teor menor na forma infectante, maior nas formas replicativas, e maior ainda na forma esferomastigota. Este resultado significa que há regulação da expressão destas proteínas no nível do RNA mensageiro. No caso de Tc28, o mesmo experimento de Northern blot apenas havia sido realizado com extratos celulares de epimastigotas. No presente trabalho, a análise do acúmulo de mRNAs nos três diferentes tipos celulares de *T. cruzi* mostrou que a intensidade do sinal emitido pela sonda específica é maior nas formas tripomastigotas. Estes

resultados sugerem que estes genes, arranjados intercalados no mesmo locus, são expressos diferentemente em relação um ao outro. Padrões semelhantes de expressão diferencial de RNA já haviam sido observados em *T. cruzi* para os genes amastina/tuzina (Teixeira, *et.al.*, 1995) e podem envolver regulação pós transcricional.

Ainda nesta linha, um ensaio de Western blot utilizando-se as três diferentes formas celulares do *T. cruzi* nos permitiu identificar que a regulação pós transcricional se mantém no nível protéico. Os anticorpos antip34/p37 foram capazes de identificar duas proteínas nas formas epimastigotas, além de uma única proteína na forma amastigota, sugerindo uma provável regulação ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* para as proteínas TcRRM.

Para a proteína Tcp28, o anticorpo produzido contra Tcp28 recombinante foi capaz de identificar proteínas com o tamanho esperado nas três diferentes formas celulares. Todavia, parece haver o reconhecimento de uma banda dupla nas formas amastigotas e tripomastigotas. Outros experimentos seriam necessários a fim de se afirmar se isto se deve a algum tipo de modificação pós-traducional. Este mesmo anticorpo também reconhece bandas de alto peso molecular, com um sinal bastante intenso especialmente nos extratos celulares das formas epimastigotas. É possível que Tcp28 interaja com outras proteínas, formando complexos protéicos, que não tenham sido rompidos pela técnica utilizada. Seria interessante verificar a capacidade destas proteínas de interagirem com outras proteínas. Este resultado não confere com o que seria esperado pelo resultado do experimento de northern blot, onde o acúmulo de mRNA foi muito mais intenso nas formas tripomastigotas, uma vez que o sinal detectado pelo anticorpo no western blot foi muito mais intenso nas formas epimastigotas. A comparação não seria recomendável entre as raias deste western blot, pois se utilizou contagem de células (10^7 células/raia) como normatização, e os diferentes tipos celulares de *T. cruzi* possuem tamanhos diferentes e conjuntos protéicos muito diversos como pode ser verificado pela coloração dos extratos com Commassie blue. Esta dificuldade poderia ser superada com o uso de uma proteína sabidamente sem variação ao longo do ciclo como padrão ou ainda com

aplicação nas raias do gel de quantidades protéicas uniformes. Caso esta variação se mantenha, poderia ser explicada pela presença de controles pós-transcricionais como, por exemplo, a estocagem de RNAs mensageiros em corpos P recentemente descrita por Holetz et.al. (2007). Estes corpos poderiam estocar mRNAs transcritos em uma fase do ciclo para tradução pelos polissomos na fase seguinte.

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é basicamente pós-transcricional e, neste sentido, com freqüência é utilizada a regulação da estabilidade do RNA mensageiro. Um ensaio da avaliação da meia-vida do mRNA dos genes TcRRM mostrou que, mesmo após 120 minutos, a abundância de mRNA não se reduziu a 50%. O mesmo também foi observado para TcP28. Para ambos os casos, seria interessante repetir o experimento utilizando-se tempos mais longos a fim de se determinar com clareza a meia-vida. RNAs mensageiros com meia vida superior a duas horas são considerados estáveis em tripanossomatídeos (Dallagiovana, *et.al.*, 2008).

Uma vez que as proteínas RRM não apresentam sinal de localização nuclear e apresentam acúmulo diferencial de mRNA e de proteínas ao longo do ciclo, realizamos experimentos de localização celular. Dados preliminares do mestrado sugeriram localização citoplasmática para as proteínas RRM. Ao contrário das ortólogas de *T. brucei*, que apresentam localização nuclear (Zhang, *et.al.*, 1998), os experimentos de imunofluorescência ora apresentados indicam que, em epimastigotas de *T. cruzi*, as proteínas se localizam no citoplasma, em uma região ao redor do núcleo, corroborando o dado recente para o antígeno TcAG48 que mostra esta mesma localização para este antígeno utilizando-se a proteína fusionada à GFP (Pais et.al, 2008). Esta localização pode coincidir com uma região rica em retículo endoplasmático e um experimento de imunocitoquímica com ouro coloidal em conjunto a marcadores específicos de retículo poderia responder a esta questão. Esta localização poderia sugerir um papel na síntese protéica e aqui cabe ressaltar que as proteínas ortólogas de *T. brucei*, Tbp34 e Tbp37, são capazes de se ligar ao rRNA5S (Pitula *et.al.*, 2002b). Seria interessante realizar um estudo mais aprofundado de localização com as

proteínas de *T. brucei* a fim de se verificar possíveis variações em sua localização, pois apenas um único ensaio foi realizado (Zhang, et.al., 1998).

A localização das proteínas TcRRM encontrada nas formas epimastigotas não se mantém nas outras formas celulares. Em amastigotas, a localização, apesar de citoplasmática, é mais concentrada numa região abaixo da membrana. Em tripanossomatídeos, na região abaixo da membrana, se localizam os microtúbulos subpeliculares responsáveis por transporte no interior da célula. Seria interessante verificar a co-marcação com anticorpos anti-tubulina. Esta localização pode ter alguma relação com o fato de que apenas uma proteína é encontrada nas formas amastigotas de acordo com os experimentos de Western blot.

Em tripomastigotas, a localização variou nas diferentes células de uma mesma amostra. Algumas células apresentavam um padrão de localização semelhante ao apresentado pelas formas amastigotas, outras não apresentavam marcação alguma, este último corroborando os resultados do Western blot, onde nenhuma proteína era detectada. À primeira vista, poderia se tratar de diferenças na permeabilidade das células aos anticorpos, mas o mesmo resultado variável foi encontrado em todas as vezes em que este experimento foi repetido e em que utilizou-se técnicas de permeabilização. Uma especulação provável é a de que com a incapacidade de se sincronizar as células do *T. cruzi*, a amostra dita tripomastigota poderia conter células em diferentes etapas da fase tripomastigota.

A presença de domínios conservados de ligação a RNA sugere que as proteínas TcRRM apresentem capacidade de ligação a moléculas de RNA. A incubação de TcRRM1 com os polirribonucleotídeos, poliadenina (poliA), policitosina (poliC), poliguanina (poliG) e poliuridina (poliU), mostrou uma capacidade de ligação crescente conforme a maior quantidade de proteína para poliA e poliC, diferentemente da ligação de TcRRM2, que ocorreu com poliC.

De acordo com Pitula *et.al.*, (2002b), as proteínas ortólogas de *T. brucei*, Tbp34 e Tbp37, são capazes de se ligar ao rRNA5S. Hellman, *et.al.*, (2007a) nocautearam a expressão destas proteínas com o uso de RNAi e mostraram que estas proteínas são essenciais para a sobrevivência celular, agindo possivelmente

na estabilização do rRNA5S e direcionando-o à subunidade 60S. Hellman, *et.al.*, (2007b) demonstraram ainda a forte interação com as proteínas NOPP44/46. Como as proteínas RRM parecem ser exclusivas de tripanossomatídeos, é possível que elas apresentem a mesma função metabólica em todas as espécies em que são expressas. Neste sentido, realizamos experimentos de alteração da mobilidade eletroforética utilizando o rRNA 5S. Todavia, não nos foi possível determinar tal capacidade de ligação para as proteínas TcRRM de *T.cruzi*, tampouco nos foi possível determinar a capacidade de ligação desta proteína a oligoribonucleotídeos sintéticos. Um controle positivo com uma proteína sabidamente ligadora a RNA seria bastante útil na validação deste experimento. E neste sentido, a proteína TcUBP1 foi clonada em vetor plasmidial e produzida de forma recombinante. Outros experimentos que utilizassem extratos protéicos ao invés de proteínas recombinantes também seriam úteis em eliminar a probabilidade de erros nas proteínas recombinantes ou até de modificações pós-traducionais essenciais.

Contudo, dado a abundância de expressão destas proteínas, também é possível que ela estejam envolvidas em múltiplos processos e possuam muitas funções ao longo do ciclo de vida do parasito. E para verificar esta última hipótese, seria interessante avaliar a interação destas proteínas com chips de microarrays contendo o pool de RNAs de *T.cruzi* a fim de determinar os possíveis alvos destas proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, B.K.; Hadjuk, S.L. Mechanisms and Origins of RNA Editing (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:316-322;
2. Agabian, N. trans splicing of Nuclear pré-RNAs (1990) *Cell* 61:1157-1160;
3. Alfonzo, J.D.; Thiemann, O.; Simpson, L. The Mechanism of U Insertion/Deletion RNA Editing in Kinetoplastid Mitochondria. (1997) *Nuc. Acids Res* 25(19): 3751-3759;
4. Ávila, A.R.; Yamada-Ogatta, S.F.; Monteiro, V.S.; Krieger, M.A.; Nakamura, C.V. de Souza, W; Goldenberg, S. Cloning and Characterization of The Metaciclogenin Gene, Which Is Specifically Expressed During *Trypanosoma cruzi* Metaciclogenesis. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol* 117:169-177;
5. Barrett M.P.; Burchmore R.J.; Stich A., Lazzari J.O., Frasch A.C., Cazzulo J.J., Krishna S..The trypanosomiases.*Lancet.* (2003) 362(9394):1469-80.
6. Batista, J.A.N.; Teixeira,S.M.R.; Donelson,J.E.; Kirchhoff,L.V.; Sá,C.M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Poly (A)-Binding Protein and Its Genes. (1994) *Mol Biochem Parasitol.* 67:301-312
7. Benchimol-Barbosa, P.R. The oral transmission of Chagas' Disease: an Acute form of Infection Responsible for Regional Outbreaks. (2006) 112: 132-133;
8. Benne, R.; Van Den Burg, J.; Brakenhoff, J.P. J.; Sloof, P.; Van Boom, J.H.; Tromp, M.C. Major Transcript of The Frameshifted CoxII Gene From Trypanosome Mitochondria Contains Four Nucleotides That Are Not Encoded in The DNA (1986) *Cell* 46: 819-826;
9. Benz, C.; Nilsson, D.; Andersson, B., Clayton, C.; Guilbride, D.L. Messenger RNA Processing sites in *Trypanosoma brucei*. (2005) *Mol. Biochem. Parasitol.* 143:125-134;

10. Boothroyd, J.C.; Cross, G.A. Transcripts Coding For Variant Surface Glycoproteins Of *Trypanosoma brucei* Have A Short Identical Exon At Their 5'End. (1982) *Gene* 20:281-289;
11. Burd, C.; Dreyfuss, G.; Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins (1994) *Science* 265:615-621;
12. Burleigh, B.A.; Andrews, N.W. The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200;
13. Camargo, E.P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi* (1964) *Rev. Inst. Med. Trop.* 6:93-100;
14. Campbell, D.A. Westenberger, S.J.; Sturm, N.R. The determinantes of Chagas Disease: Connecting parasite and host genetics (2004) *Curr. Mol. Med.* 4:549-562;
15. Cano, M.I.; Gruber, A.; Vazquez, M.; Cortés, A.; Levin, M.J.; González, A.; Degrave, W.; Rondinelli, E.; Zingales, B.; Ramirez, J.L.; Alonso, C.; Requena, J.; M.; Silveira, J.F. Molecular Karyotype of Clone CL Brener Chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project (1995) *Mol Biochem. Parasitol* 71:273-278;
16. Cassola, A.; De Gaudenzi, J.G.; Frasch, A.C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes (2007) *Mol. Microbiol.* 65(3): 655-670;
17. Cerqueira, G.C.; Bartholomeu, D.C.; DaRocha, W.; Hou, L.; Freitas-Silva, D.M.; machado, C.R.; El-Sayed, N.M.; Teixeira, S.M.R. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. (2008) *Mol. Biochem. Parasitol.* 157:65-72;
18. Chagas CRJ 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218;
19. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction (1987) *An. Biochem.* 162:156-159;

20. Clayton, C. Life Without Transcription Control? From Fly to Man and Back Again (2002) *EMBO J.* 21(8): 1881-1888;
21. Coelho, E.R. Ürményi, T.P.; Silveira, J.F.; Rondinelli, E.; Silva, R. Identification of PDZ5, a candidate universal minicircle sequence binding protein of *Trypanosoma cruzi*. (2003) *Int. J. Parasitol.* 33: 853-858;
22. Contreras, V.T.; Araujo-Jorge, T.C.; Bonaldo, M.C.; Thomas, N.; Barbosa, H.S.; Meirelles, M.N.L.; Goldenberg, S.; Biological Aspects of the Dm28c Clone of *Trypanosoma cruzi* after Metacyclogenesis in Chemically Defined Media. (1988) *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 83:123-33;
23. Coughlin, B.C.; Teixeira, S.M.R.; Kirchhoff, L.V.; Donelson, J.E. Amastin mRNA Abundance in *Trypanosoma cruzi* Is Controlled By a 3'-Untranslated Region Position-Dependent *Cis*-Element and an Untranslated Region-Binding Protein. (2000) *J. Biol. Chem.* 276(16): 12051-12060;
24. Dallagiovanna, B. Plazanet-Menut, C; Ogatta, S.F.Y.; Ávila, A.R.; Krieger, M.A.; Goldenberg, S. *Trypanosoma cruzi*: A Gene Family Encoding Chitin-Binding-Like Proteins is Posttranscriptionally Regulated During Metacyclogenesis (2001) *Exp. Parasitol* 99(7):7-16;
25. Dallagiovanna, B.; Correa, A.; Probst, C.M.; Holetz, F.; Smircich, P.; de Aguiar, A.M.; Mansur, F.; da Silva, C. V.; Mortara, R.A.; Garat, B.; Buck, G.A.; Goldenberg, S.; Krieger, M.A. Functional genome characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. (2003) *J. Biol. Chem.* 283(13): 8266-8273;
26. Da Rocha, W.D.; Bartholomeu, D.C.; Macêdo, C.D.S.; Horta, M.; F.; Cunha-Neto, E.; Donelson, J.E.; Teixeira, S.M.R. Characterization Of cDNA Clones Encoding Ribonucleoprotein Antigens Expressed In *Trypanosoma cruzi* Amastigotes (2002) *Parasitol Res* 88(4):292-300;
27. De Gaudenzi JG, D'Orso I, Frasch AC. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *J Biol Chem.* (2003) 278(21):18884-94.

28. De Gaudenzi, J.; Frasch A.C.; Clayton, C. RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis (2005) *Eukaryotic Cell* 4(12):2106-2114;
29. de Souza, W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. (2002) *Kinetop. Biol. Dis.* 1:3-24;
30. Di Noia, J.M.; D'Orso, I.; Aslund, L.; Sánchez, D.O.; Frach, A.C.C.; The *Trypanosoma cruzi* Mucin Family Is Transcribed From Hundreds Of Genes Having Hypervariable Regions. (1998) *J. Biol. Chem.* 273(18):10843-10850;
31. Di Noia, J.M.; D'Orso, I.; Sánchez, D.O.; Frach, A.C.C.; AU-rich Elements in the 3'-Unstranlated Region of a New Mucin-type Gene Family of *Trypanosoma cruzi* Confers mRNA Instability and Modulates Translation Efficiency. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(14):10218-10227;
32. D'Orso, I.; Frasch, A.C.C. Functionally Different AU- And G-Rich *Cis*-Elements Confer Developmentally Regulated mRNA Stability In *Trypanosoma cruzi* By Interactions With Specific RNA-Binding Proteins (2001a) *J. Biol. Chem.* 276(19):15.783-15.793;
33. D'Orso, I.; Frasch, A.C.C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA binding Protein Involved in Selective mRNA Desestabilization in Trypanosomes (2001b) *J. Biol. Chem* 276(37):34801-34809;
34. D'Orso, I.; Frasch, A.C.C. TcUBP-1, a mRNA Desestabilizing Factor from Trypanosomes Homodimerizes and Interacts with Novel AU-rich Element and Poly(A) binding Proteins Forming a Ribonucleoprotein Complex (2002) *J. Biol. Chem* 277(52):50520-50528;
35. D'Orso, I.; De Gaudenzi, J.; Frasch, A.C.C. RNA-Binding Proteins and mRNA Turnover in Trypanosomes. (2003) *Trends Parasitol.* 19(4): 151-155;
36. Dreyfuss, G. et.al. Messenger RNA Binding Proteins and the Messages They Carry (2002) *Genes Dev.* 8:491-501;
37. El-Sayed, N.M. Myler P J, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey E A, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu D C, Haas B J, Tran A N, Wortman J R, Alsmark U C, Angiuoli

- S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton J M, Cerqueira G C, Creasy T, Delcher A L, Djikeng A, Embley T M, Hauser C, Ivens A C, Kummerfeld S K, Pereira-Leal J B, Nilsson D, Peterson J, Salzberg S L, Shallom J, Silva J C, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville S E, Donelson J E, Andersson B, Stuart K D and Hall N The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease (2005a) Science 309: 409-415;
38. El-Sayed N M, Myler P J, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey E A, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu D C, Haas B J, Tran A N, Wortman J R, Alsmark U C, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton J M, Cerqueira G C, Creasy T, Delcher A L, Djikeng A, Embley T M, Hauser C, Ivens A C, Kummerfeld S K, Pereira-Leal J B, Nilsson D, Peterson J, Salzberg S L, Shallom J, Silva J C, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville S E, Donelson J E, Andersson B, Stuart K D and Hall N (2005b) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science vol 309 issue 5733 pp 404-9;
39. Estévez, A.M.;Simpson, L. Uridine insertion/deletion RNA Editing in Trypanosome Mitochondria – a review (1999) Gene 240:247-260;
40. Eulalio, A. Behm-Ansmant, I.; Izaurralde, E. P.bodies: at the crossroads of pos-transcriptional pathways. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8:9-22;
41. Giambiagi-deMarval, M.; Souto-Padrón, T.; Rondinelli, E. Characterization and cellular distribution of heat shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi* (1996). Exp. Parasitol. 83(3):335-345;
42. Gillinger, G. Bellofatto, V. Trypanosome Spliced Leader RNA Genes Contain the First Identified RBA Polymerase II Gene Promoter in These Organisms (2001) Nuc. Ac. Res. 29:1556-1564;
43. Gunzl, A.; Palfi, Z.; Bindereif, A. Analysis of RNA-protein complexes by oligonucleotide-targeted RNase H digestion (2002) Methods 26:162-169;
44. Hanahan,D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. (1983) J. Mol. Biol. 166:557;

45. Hellman, K.M.; Ciganda, M.; Brown, S.V.; Li, J.; Ruyechan, W.; Williams, N. Two Trypanosome-Specific Proteins are Essential Factors for 5S rRNA Abundance and Ribosomal Assembly in *Trypanosoma brucei* (2007a) Eukaryot. Cell 6(10):1766-1772;
46. Hellman, K.M.; Prohaska, K.; Williams, N. *T. brucei* RNA binding proteins, p34 and p37 mediate NOPP44/46 cellular localization via the exportin 1 nuclear export pathway. (2007b) Eukariot. Cell (*accepted*);
47. Holetz, F.B. Correa, A.; Avila, A.R.; Nakamura, C.V.; Krieger, M.A.; Goldenberg, S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. (2007) Biochem. Biophys. Res. Comm 356:1062-1067;
48. Hug, M.; Carruthers, V.B.; Hartmann, C.; Sherman, D.S.; Cross, G.A.M.; Clayton, C. A possible role for the 3' untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. (1993) Mol. Biochem. Parasitol. 61:87-96;
49. Hull, R. N.; Cherry, W.R.; Tritch, O.J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2 and LLC-MK2 (NCTC-3196) and their utility in virus research. (1962) J. Exp. Med. 115: 903-18;
50. Jäger, A.V.; DeGaudenzi, J.G.; Cassola, A.; D'Orso, I.; Frasch, A.C. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes (2007) PNAS 104(7):2035-2042;
51. Kelly, S. Wickstead, B.; Gull, K. An in silico analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. (2005) Biochem. Soc. Trans 33:1435-1437;
52. Kollien, A.H.; Schaub, G.A The Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatominae*. (2000) Parasitol. Today 16(9): 381-387;
53. Krause, M; Hirsh, D. A Trans-Spliced Leader Sequence on Actin mRNA In *C. elegans*. (1987) Cell 49:753-761;
54. LeBowitz, J.H.; Smith, H.Q.; Rusche, L.; Beverly, S.M. Coupling of poli(A) site selection and trans splicing in Leishmania (1993) Genes Dev. 7:996-1007;

55. Li, J. Tuyechan, W.T.; Williams, N. Stage-specific translational efficiency and protein stability regulate the developmental expression of p37, an RNA binding protein from *Trypanosoma brucei* (2003) BBRC 306:918-923;
56. Liang, X.; Haritan, A.; Uliel, S. Michaeli, S. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors and Regulation (2003) Eukarotic Cell 2(5): 830-840;
57. Lunde, B.M.; Moore, C.; Varani, G. RNA-Binding Proteins: Modular Design for Efficient Function (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8: 479-490;
58. Mair, G.; Shi, H.; Li, H.; Djikeng, A.; Aviles, H.O.; Bishop, J.R.; Falcone, F.H.; Gavrilescu, C.; Montgomery, J.L.; Santori, M.I.; Stern, L.S.; Wang, Z.; Ullu, E.; Tschudi, C. A New Twist In Trypanosome RNA Metabolism: *Cis*-Splicing Of Pre-mRNA. (2000) RNA 6:163-169;
59. Manger, I.; Boothroyd, J.C.; Identification Of A Nuclear Protein In *Trypanosoma brucei* With Homology To RNA-Binding Proteins From *Cis*-Splicing Systems. (1998) Mol. Biochem. Parasitol. 97:1-11
60. Manger, I.; Boothroyd, J.C. Targeted Disruption Of An Essential RNA-Binding Protein Perturbs Cell Division In *Trypanosoma brucei*. (2001) Mol. Biochem. Parasitol. 116:239-245;
61. Myler, P. J. ; Audleman, L.; deVos, T.; Hixson, G.; Kiser, P.; Lemley, C.; Magness, C.; Rickel, E.; Sisk, E.; Sunkin, S.; Swartzell, S.; Westlake, T.; Bastien, P.; Fu, G.; Ivens, A.; Stuart, K. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (6): 2902–2906
62. Nozaki, T.; Cross, G.A. Effects of 3' Untranslated and Intergenic Regions on Gene Expression in *Trypanosoma cruzi* (1995) Mol. Biochem. Parasitol. 75:55-97
63. Outbridge, C.; Ito, N.; Evans, P.R.; Teo, C.H. Nagai, K. Cristal Structure at 1.92 A Resolution Of The RNA- Binding Domain Of The U1a Spliceosomal Protein Complexed With An Rna Hairpin (1994) Nature 372:432-438;
64. Palenchar, J.B.; Bellofatto, V. Gene transcription in trypanosomes (2006) Mol. Biochem Parasitol. 146:135-141;

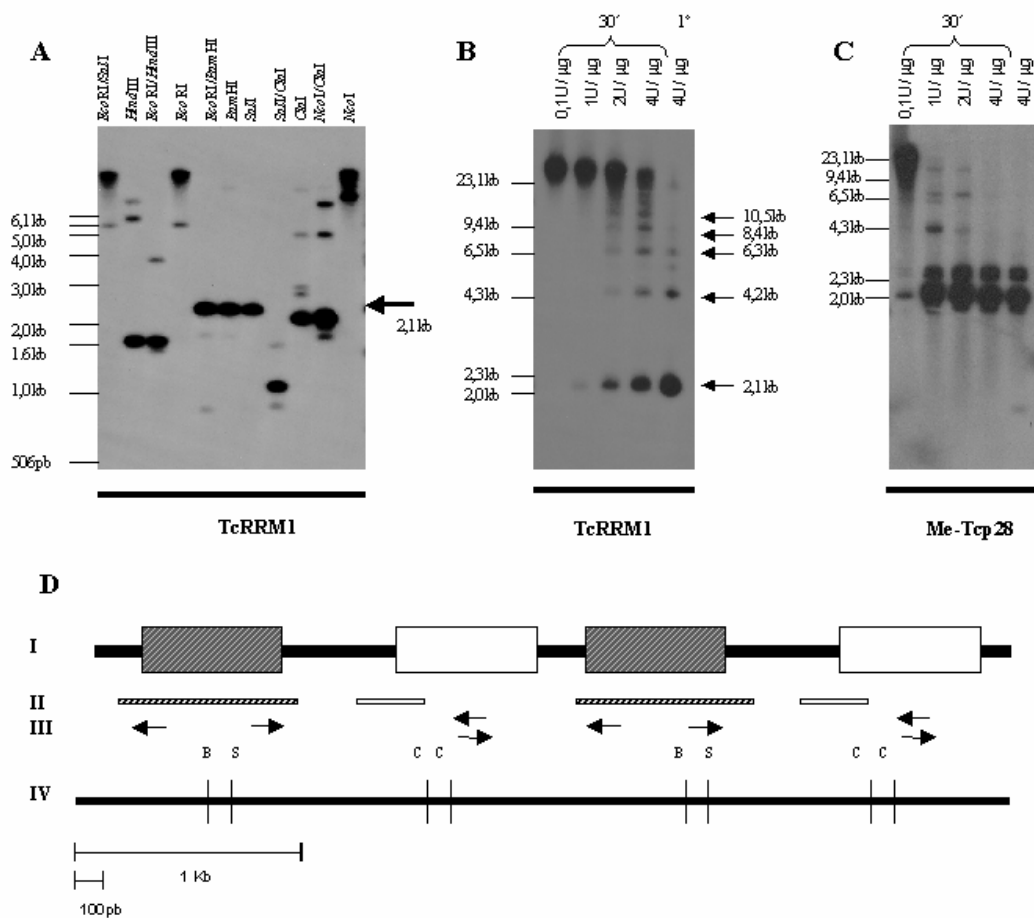
65. Pais, F.S. DaRocha, W.D.; Almeida, R.M.; Leclercq, S.Y.; Penido, M.L.; Fragoso, S.P.; Bartholomeu, D.C.; Gazzinelli, R.T.; Teixeira, S.M.R. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated aminoacid sequences from *Trypanosoma cruzi*. (2008) *Micro. Infec.* 10:716-725;
66. Parker, R.; Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. (2004) *Nat. Struct. Mol. Boil.* 11:121-127;
67. Pasion, S.G.; Hines, J.C.; Ou, X.; Mahmood, R.; Ray, D.S. Sequences Within The 5' Untranslated Region Regulate The Levels Of Kinetoplast DNA Topoisomerase mRNA During The Cell Cycle (1996) *Mol. Cel. Biol.* 16(12):6724-6735;
68. Pérez-Cañadillas, J.M.; Varani, G. Recent Advances In RNA-Protein Recognition (2001) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11-53-58;
69. Pitula, J.; Ruyechan, W.T.; Williams, N. *Trypanosoma brucei*: Identification And Purification Of A Poly(A) – Binding Protein. (1998) *Exp Parasitol* 88:157-160;
70. Pitula, J.; Ruyechan, W.T.; Williams, N. Two Novel RNA Binding Proteins From *Trypanosoma brucei* Are Associated With 5S rRNA (2002a) *Biochem. Biophys. Res* 290:569-576;
71. Pitula, J.S.; Park, J.; Parsons, M.; Ruyechan, W.T.; Williams, N.; Two Families Of RNA Binding Proteins From *Trypanosoma brucei* Associate In A Direct Protein-Protein Interaction. (2002b) *Mol. Biochem. Parasitol.* 122(1):81-9;
72. Porcel, B. M.; Tran, A. N.; Tammi, M.; Nyarady, Z.; Rydaker, M.; Ürményi, T.P.; Rondinelli, E.; Pettersson, U.; Andersson, B.; Aslund, L. Gene Survey Of The Pathogenic Protozoan *Trypanosoma cruzi*. (2000a) *Genome Res.* 10(8):1103-1107;
73. Rajkovic, A.; Davis, R.E.; Simonsen, J.N.; Rottman, F.M. A Spliced Leader Is Present On A Subset Of mRNAs From The Human Parasite *Schistosoma mansoni* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:8879-8883;

74. Ramos FP, Araripe JR, Urményi TP, Silva R, Cunha e Silva NL, Leite Fontes CF, da Silveira JF, Rondinelli E.; Characterization of RAB-like4, the first identified RAB-like protein from *Trypanosoma cruzi* with GTPase activity (2005) *BBRC* 333(3):808-817;
75. Requena, J. M.; Lopez, M.C.; Jimenez-Ruiz, A.; De La Torre, J.C.; Alonzo, C. A Head-To-Tail Tandem Organization Of Hsp70 Genes In *Trypanosoma cruzi*. (1988) *Nuc. Acids Res* 16:1393-1406;
76. Schofield, C.J.; Jannin, J.; Salvatella. R. The Future of Chagas Disease Control (2006) *Trends Parasitol.* 22(12): 583-588;
77. Sambrook J.; Russel, D.W.; Sambook, J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory 3rd Ed. (2001);
78. Soares, C.M.A.; Carvalho, E.F.; Ürményi, T.P.; Carvalho, J.F.^o; Castro, F.T.; Rondinelli, E. Alpha- And Beta-Tubulin mRNAs Of *Trypanosoma cruzi* Originate From A Single Multicistronic Transcript. (1989) *FEBS Lett.* 250,497-502;
79. Studier, F.W.; Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. (1986) *J Mol Biol.* 189(1):113-30;
80. Taatjes, D.; Marr, M.T.; Tjian, R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes (2004). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:403-410;
81. Teixeira, SM.R.; Kirchhoff, L.V.; Donelson, J.E. Post-transcriptional Elements Regulating Expression of mRNAs from Amastin/Tuzin Gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. (1995) *J. Biol. Chem.* 279(38):22586-22594;
82. Teixeira, S.M.R.; Kirchhoff, L.K.; Donelson, J.E. *Trypanosoma cruzi*: Suppression of Tuzin Gene Expression by its 5'UTR and Spliced Leader Addition Site. (1999)*Exp. Parasitol.* 93:143-151;
83. Tessier, LH.; Keller, M.; Chan, R.L.; Fournier, R.; Well, J.H.; Imbault, P.; Short-Leader Sequences May Be Transferred From Small Rnas To Pre-Mature Mrnas By Trans-Splicing In *Euglena*. (1991) *EMBO J.* 10:2621-2625;
84. The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium. The *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative (1997) *Parasitol. Today* 13(1):16-22;

85. Tyler, K.M.; Engman, D.M. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi* Revisited (2001) Int. J. Parasitol. 31:472-481;
86. Vandenberg, ^a E.; Meedel, T. H. Hasting, K. E. mRNA 5'leader trans splicing in the chordates. (2001) Genes Dev. 15:294:303;
87. Vanhamme,L.; Pays,E. Control Of Gene Expression In Trypanosomes (1995) Microbiol. Rev. 59(2):223-240;
88. Verdun, R. E.; Di Paolo, N.; Urmenyi, T. P.; Rondinelli, E.; Frasch, A. C.; Sanchez, D. O.; Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. (1998) Infect Immun. 66(11): 5393-8;
89. Vickerman, K. Developmental Cycles And Biology Of Pathogenesis Trypanosomes. (1985) Br. Med. Bull 41(2):105-114;
90. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. (1969) 244(16):4406–4412.
91. Westenberger, S.; Barnabé, C.; Campbell, D.A.; Sturm, N.R. Two Hibridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi* (2005) Genetics 171: 527-543;
92. Wilson, K.; Uyetake, I.; Boothroyd, J. *Trypanosoma brucei*: *Cis*-Acting Sequences Involved in the Developmental Regulation of PARP Expression. (1999) Exp. Parasitol. 91:222-230;
93. Xu, P.; Wen, L.; Benegal, G.;Wang, X.;Buck, G.A. Identification Of A Spliced Leader RNA Binding Protein From *Trypanosoma cruzi* (2001) Mol. Biochem.Parasitol 112:39-49
94. Zhang, J.; Williams, N. Purification, Cloning, And Expression Of Two Closely Related *Trypanosoma brucei* Nucleic Acid Binding Proteins (1997) Mol. Biochem. Parasit. 87: 145-158;
95. Zhang, J.; Ruyechan, W.; Williams, N. Developmental Regulation Of Two Nuclear RNA Binding Proteins, P34 And P37, From *Trypanosoma brucei* (1998) Mol. Biochem. Parasitol. 92:79-88

ANEXO 1

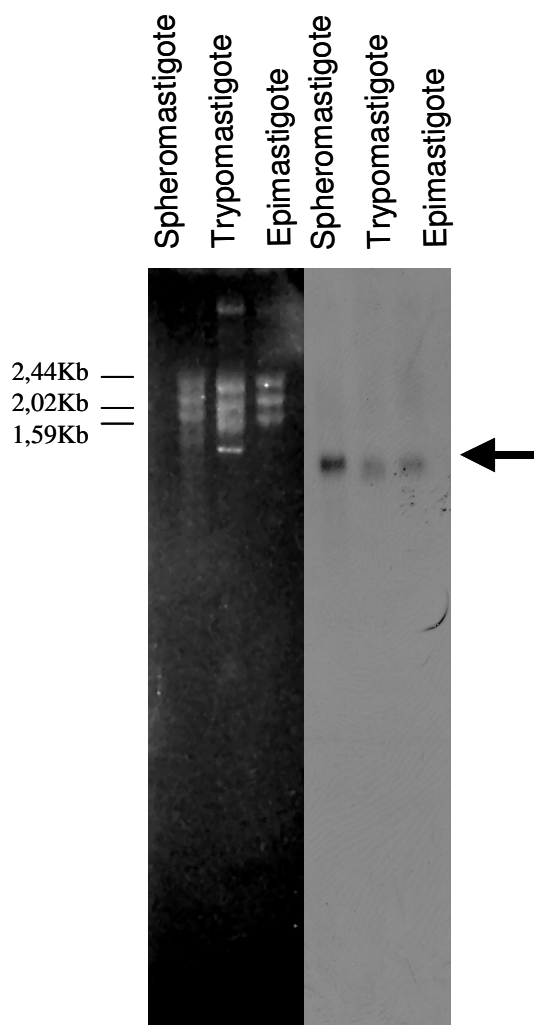
RESULTADOS ANTERIORES OBTIDOS NO MESTRADO



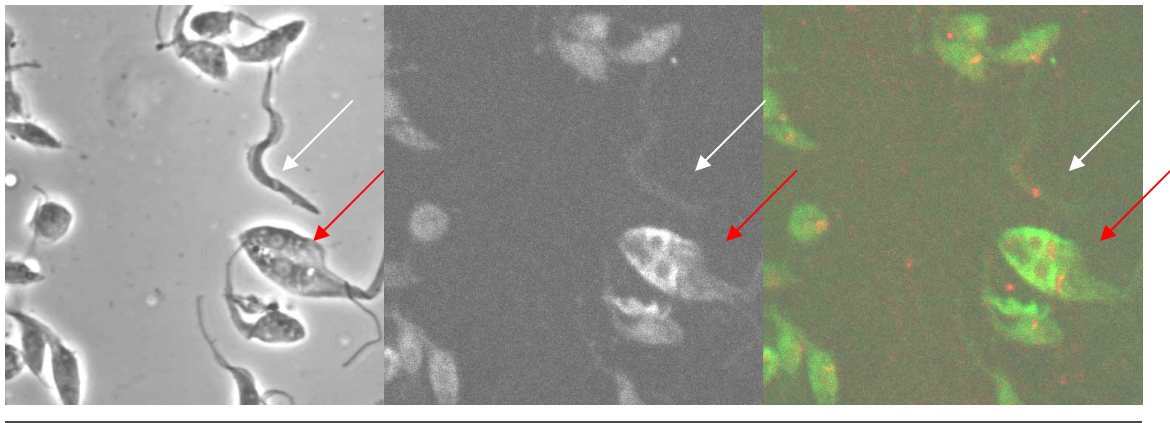
ANEXO 1 B – Arranjo estrutural do locus RRM em *T. cruzi*. (A) *Southern* blot de DNA genômico de *T. cruzi* digerido com diferentes enzimas utilizando *TcRRM1* como sonda. A seta indica o fragmento de 2,1Kb comum às digestões com *Bam*H1 e *Sal*I. Os números à esquerda dos painéis (A., B e C) indicam os marcadores de peso molecular. (B) *Southern* blot de DNA genômico de *T. cruzi* digerido com concentrações crescentes de *Sal*I utilizando *TcRRM1* como sonda. As setas indicam os fragmentos com tamanhos múltiplos de 2,1kb. (C) *Southern* blot de DNA genômico de *T. cruzi* digerido com concentrações crescentes de *Cla*I utilizando *ME-Tcp28* como sonda. (D) Mapa físico do locus *TcRRM*. I, esquema indicando o locus contendo os genes *TcRRM* (caixa cinza) e *Tcp28* (caixa branca). II, posição das sondas *TCRRMI* (retângulo cinza) e *Me-Tcp28* (retângulo branco). III, posição dos primers utilizados. IV – posição dos sítios de restrição *Bam*HI, *Sal*I e *Cla*I.

Tbp37	MAPKSAAKPAASGKNAPAPKSAPAAKSAPATKASAPKND----	PKKNAPKAA-----AP	50
Tbp34	MAPKSAAK-----SAPPAKASAPKND----	PKKNAPKAA-----AP	32
Lmr1bp	MPAKAAAKP-----VKPAAKA-APKPA----	NKAPAPKAA-----AA	32
TcRRM1	MPAKSANKP-----ASKPANKPAPK-PAAKPAAKPAAKAPAPKA	EKKGAAKAPAPKAA	47
TcRRM2	MPAKSANKP-----ASKPAAKPAAKAPAPKA	EKKGAAKAPAPKAA	42
	* . . * : * * *	* . . * * . *	* * * * *
Tbp37	KP-AATAPKAAAAKEAKARPAAGTHNGVYVKNWGQGSVTDATRIFSAAGKVVSAQIRRRR		109
Tbp34	KP-AATAPKAAAAKEAKARPAAGTHNGVYVKNWGQGSVTDATRIFSAAGKVVSAQIRRRR		91
Lmr1bp	KP-VAKAAPKAAA--PAARPASGSSNGVYVKNWGTGSVADAANVFSAAGKVVQVLRQR		89
TcRRM1	APKAAAAAPKPAVRDAKQRSDAANHNGLYVKNWGQVFCGRRQALFGTAGKVVGVRRRRR		107
TcRRM2	APKAAAAAPKPAVRDAKQRSDAANHNGLYVKNWGQGSVDDARALFGTAGKVVGVRRRRR		102
	* . * * . . *	* . . * * * * *	* : * * * * * . : : * * : *
Tbp37	YAI IFFENAAAVRKAIDLNEKEVLGAKVTVSPAKTSPKDPHEGSSVFLSPIFRMSTT		169
Tbp34	YAI IFFENAAAVRKAIDLNEKEVLGAKVTVSPAKTSPKDPHEGSSVFLSPIFRMSTT		151
Lmr1bp	YAI VFFENSAAVKKAIDLNEKEVLGKTVLVPKTPSPKPDHANSVVFVSPIFRPSTT		149
TcRRM1	YAI IFFENAAAVKKAIDLNGKEFMGNVLSVVPKTPPKPDHANSVVFVSPIFRASTT		167
TcRRM2	YAI IFFENAAAVKKAIDLNGKEFMGNVLSVVPKTPPKPDHANSVVFVSPIFRASTT		162
	*** : *** : *** : *** : * * . : * :	* * * * * : * * * * * . * . * * *	* : * * * * * * * *
Tbp37	NGQIRELFTGMRVLRIRTYRQNYAYVYLDAAAAQKFVKEKNGTEFRGKKLRVALSTRSL		229
Tbp34	NGQIRELFTGMRVLRIRTYRQNYAYVYLDAAAAQKFVKEKNGTEFRGKKLRVALSTRSL		211
Lmr1bp	KAQVMELFAGVKVQRLRMYRQNFAYAYLDSAAAQKFVKEKNGTEFRGHTLRVALSARSL		209
TcRRM1	KKQILELFSGMKVLRLRTYRNNYAYVYLDTPAAAQRAVKEKNGAEFRGKQLRVALSTRSL		227
TcRRM2	KKQILELFSGMKVLRLRTYRNNYAYVYLDTPAAAQRAVKEKNGAEFRGKQLRVALSTRSL		222
	: * : * * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *		
Tbp37	QKEKDRAPERANLLSDAHNFKKDAKKDIKRDDKKDPKKDSRRNEKKDAKRK-		279
Tbp34	QKEKDRAPERANLLSDAHNFKKDAKKDIKRDDKKDPKKDSRRNEKKDAKRKQ		262
Lmr1bp	EKLRAEQEAANVVAHRHYKTHERQ-----		235
TcRRM1	AKDRARAERARLLMAAQSSTEKEPHEVRECCFNRL-----		263
TcRRM2	AKDKARAERADFLMAAQSLTRERTTRSKRGVLF-----		255
	* : * * * * . : * :		

ANEXO 1 C – Alinhamento das seqüências de aminoácidos de TcRRM de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*. Os asteriscos indicam os aminoácidos idênticos, os pontos indicam diferenças em um único aminoácido; os dois pontos indicam diferença em dois aminoácidos.

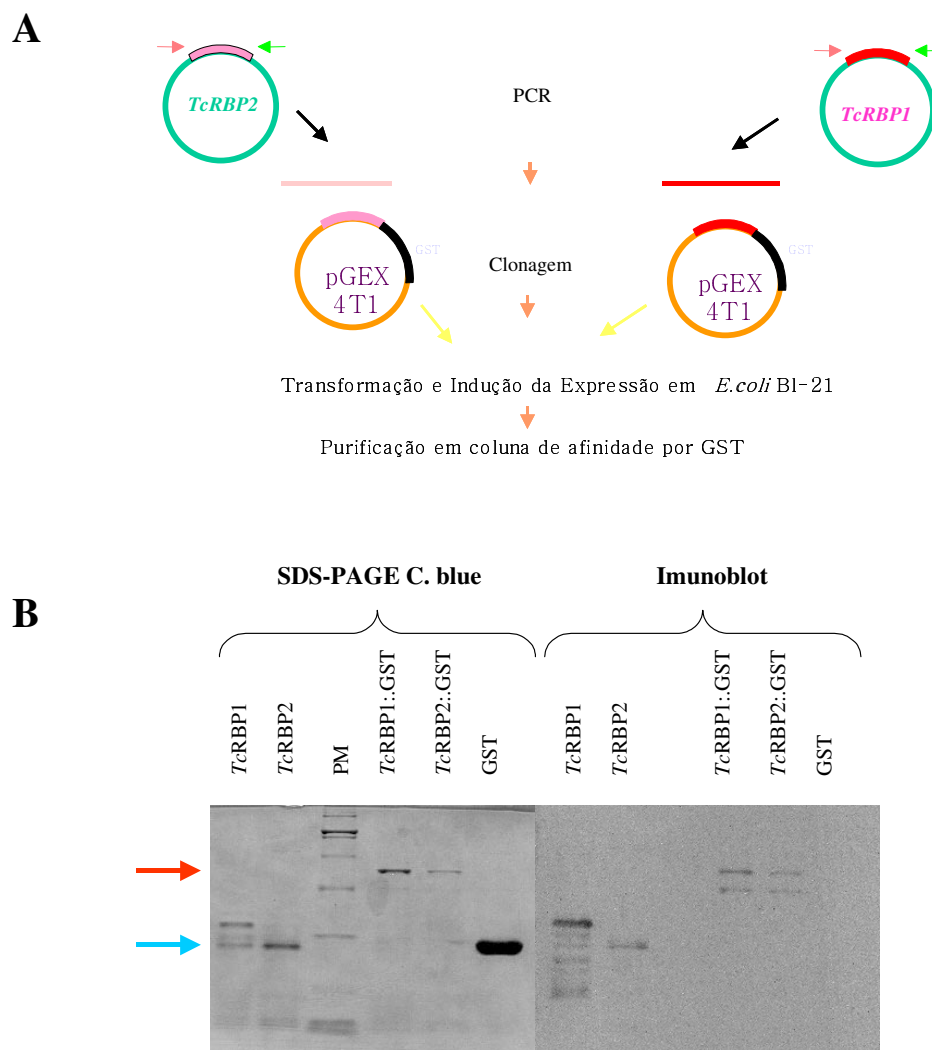


ANEXO 1 D – Acúmulo de RNAs mensageiros dos genes RBP nas diferentes formas celulares de *T. cruzi* – *Northern blot* mostrando os níveis de RNA detectados. À esquerda, gel de agarose-formaldeído 2% com 5 μ g de RNA total corado com brometo de etídio; à direita, autoradiografia do filtro hibridizado com a sonda TcRBP1; S – esferomastigotas; M – tripomastigotas metacíclicas; E – epimastigotas. A seta aponta o RNA reconhecido pela sonda TcRBP1.



Antip34/p37

ANEXO 1 E – Localização subcelular das proteínas RBP nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* por imunofluorescência e microscopia confocal – À esquerda, micrografia de contraste de fase; no centro, micrografia confocal de fluorescência com o filtro para a fluoresceína indicando RBP; à direita, sobreposição das micrografias de fluorescência com os filtros para a fluoresceína (verde) e para o iodeto de propídeo revelando DNA (vermelho). A seta branca aponta para uma célula tripomastigota; a seta vermelha para formas epimastigotas.



ANEXO 1 F – Produção de TcRRM 1 e TcRRM 2 recombinantes em *E. coli*– Em A, esquema de clonagem das proteínas recombinantes TcRBP1 e TcRBP2. As setas laranjas e verdes representam os oligonucleotídeos RBP-Eco e RBP-Not respectivamente. **Em B, expressão das proteínas RBP recombinantes** - À esquerda, SDS-PAGE 12% corado com comassie blue. A seta vermelha indica as proteínas de fusão; a seta azul indica as proteínas RBP recombinantes isoladas. PM: padrão de peso molecular (200KD, 116,25KD, 97,4KD., 66,2 KD, 45KD, 31KD, 21,5KD, 14,4KD). À direita, *imunoblot* revelado com os anticorpos heterólogos anti-Tbp34/Tbp37, produzidos contra as proteínas de *T. brucei*.

ANEXO 2

GOMES, G.G.; ÜRMÉNYI, T.P.; RONDINELLI, E.; WILLIAMS, N.; SILVA, R. (2004) TcRRMs AND TcP28 GENES ARE INTERCALATED AND DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN *TRYPANOSOMA CRUZI* LIFE CYCLE. BBRC 322: 985-992



TcRRMs and *Tcp28* genes are intercalated and differentially expressed in *Trypanosoma cruzi* life cycle

Giselle Guimarães Gomes^a, Turán Peter Ürményi^a, Edson Rondinelli^a,
Noreen Williams^b, Rosane Silva^{a,*}

^a Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

^b Department of Microbiology and Immunology, University at Buffalo, SUNY, USA

Received 26 July 2004

Abstract

The identification and characterization of RNA binding proteins in *Trypanosoma cruzi* are particularly relevant as they play key roles in the regulatory mechanisms of gene expression. In this work, we have identified coding sequences for the proteins, named *TcRRM1* and *TcRRM2*, in the EST database generated by the *T. cruzi* genomic initiative. *TcRRM1* and *TcRRM2* contain two RNA binding domains (RRM) and are very similar to two *Trypanosoma brucei* RNA binding proteins previously reported, *Tbp34* and *Tbp37*, and to a not yet annotated ORF in *Leishmania major* genome project. The *T. cruzi* RRM genes are organized in tandem, alternating with copies of *Tcp28*, a gene of unknown function. However, *TcRRM* transcript accumulation is higher in the spheromastigote stage, while *Tcp28* transcripts accumulate more in the trypomastigote stage suggesting developmental regulation. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: RNA binding protein; *Tbp34*; *Tbp37*; Differential gene expression; *Trypanosoma cruzi*; Post-transcriptional gene regulation

Trypanosoma cruzi, a member of the Trypanosomatidae family, is the etiological agent of Chagas' disease, which affects 18 million people in Latin America (WHO). This unicellular parasite has a complex life cycle with two hosts, a vertebrate and an insect from the reduviidae family, presenting different cellular forms in each host [1]. An evolutionary ancient group of organisms, trypanosomatids have accumulated several peculiarities in their molecular biology, such as: RNA editing, where uridine residues are inserted and/or deleted from mitochondrial transcripts; trans-splicing, whereby a species-specific spliced leader sequence is added to the 5' untranslated region (UTR) of all mature RNAs; and polycistronic transcription, where the genes are transcribed in a single unit containing copies of the

same gene or even genes whose function and expression pattern are distinct [2].

As the parasite is exposed to different environments during its life cycle, gene expression must be tightly regulated in order to adapt to the different hosts. Regulation of gene expression in trypanosomatids is mainly post-transcriptional, which means that RNA molecules and RNA binding proteins play a key role. Many regulatory cis elements have already been identified in the untranslated regions (UTRs), which are involved in the maintenance or alteration of the half-life and translation efficiency of the mRNA [3–5]. Proteins capable of interacting in trans with these elements were identified by D'Orso and Frach [6,7] but the mechanism is still undefined.

RNA binding proteins present a modular structure [8] and several domains have already been identified [9]. The most common RNA binding domain is the RNA recognition motif (RRM), also known as RNA

* Corresponding author. Fax: +55 21 2280 8193.
E-mail address: rsilva@ibcc.ufrj.br (R. Silva).

binding domain (RBD), consisting of a region of approximately 80 amino acids with many conserved residues that are grouped in two short sub motifs, RNP-1 (an octamer) and RNP-2 (an hexamer) [10]. One to four copies of the RNP motif can be present in proteins with distinct functions that vary from mRNA biogenesis to alternative splicing (reviewed in [9]).

In the past few years, many RNA binding proteins have been characterized in trypanosomatids. In 1998, Manger and Boothroyd [11] identified in *Trypanosoma brucei* RRM1, an essential nuclear protein, which presents three RRM domains arranged in tandem but its function is still unknown [12]. In 2001, Xu et al. [13], using a yeast three hybrid system, identified the protein XBI in *T. cruzi* that interacts with the spliced leader RNA (SLRNA). In 2001, D'Onofrio and Frasch described a RRM domain protein, the TcUBP-1, which is developmentally regulated. TcUBP-1 forms a ribonucleoprotein complex with TcUBP-2 and TcPABP and together can bind to adenosine and uridine-rich regions (ARE), consequently diminishing the mRNA half-life of TcSMUG [7].

The poly(A) binding proteins, highly conserved in eukaryotes, have also been identified in trypanosomatids, such as *T. cruzi* [14] and *T. brucei* [15]. Zhang and Williams [16] identified three RNA binding proteins through affinity to ssDNA. One of them was the *T. brucei* PABP ortholog [15] while the other two, Tbp34 and Tbp37, were able to bind 5S ribosomal RNA [17]. The Tbp34 and Tbp37 proteins are highly homologous, the main difference being an 18 amino acid insertion in Tbp37. These two proteins present three distinct motifs, the APK (alanine, proline, and lysine) rich motif in the N-terminal, two internal RRM domains, and the repetitive KKDX motif in the C-terminal region [16]. The expression of these proteins is developmentally regulated, Tbp34 being predominantly present in the procyclic form of *T. brucei*, while Tbp37 is almost exclusively expressed in the parasite bloodstream form [18].

In this work, we have identified in *T. cruzi*, two putative RNA binding proteins, TcRRM1 and TcRRM2, each containing two RRM domains, showing similarity to Tbp34 and Tbp37 from *T. brucei*, that are developmentally regulated and arranged in multiple copies in the genome, interspersed by Ttp28, a gene of unknown function.

Materials and methods

Parasite culture. *Trypanosoma cruzi* CL and Y strains and the clones CL Brno [19] and Dm28c [20] were grown in LIT medium [21] at 29°C, with weekly passages. Differentiation to metacyclic trypomastigotes and spheromastigotes was performed as described by Rondinelli et al. [22]. Cell cultures from bloodstream *T. brucei* strain 427, *Leishmania braziliensis*, and *Cryptosporidium parvum* were supplied by the Trypanosomatid repository.

Sequence analysis. Sequence alignment was performed with the ClustalW program (<http://www.dn.ic.ac.uk/cluster/W/>) [23] and the LaserGene Program Package (DNASTAR). The PROSITE program, available at <http://au.expasy.org/>, was used to search for protein domains [24]. Similarity searches in the GenBank/EMBL databases were done with the BLAST algorithm [25].

DNA extraction and digestion. Genomic DNA extraction and the restriction enzyme digestion were done essentially as described in [26]. Partial digestion was performed by digesting 5 µg of genomic DNA with different enzyme concentrations (0, 1 U/µg, 1 U/µg, 2 U/µg, and 4 U/µg) at 37°C for 30 min. Completed digestion of the genomic DNA was done by digestion with 4 U/µg DNA for 3 h at 37°C and used as a positive control.

Immunoblotting analysis. Total cell extract was prepared from 10⁶ cells as described in [27] with modifications. Briefly, the cell pellet was washed once in PBS, resuspended in SDS loading buffer (SDS 2%, DTT 10 mM, bovine serum albumin 0.02% and glycerol 10%), and applied to a 12% SDS-PAGE. Samples were electrotransferred (30 mA) on to nitrocellulose membranes for 16 h at 4°C using a buffer containing glycine 190 mM, methanol 20%, and Tris 25 mM. The membrane was incubated with Tbp34/Tbp37 antibodies diluted 1:8000 and revealed with the ECL kit (Santa Cruz Biotechnology) according to the manufacturer's instructions.

Northern blot analysis. Total RNA was extracted as described in [28]. Five micrograms was separated in 1.5% formaldehyde agarose gel and transferred to nylon membranes as described in [29]. The probes were labeled with γ -³²PdCTP using the RadPrime DNA Labeling System (Invitrogen). Hybridizations were performed according to standard protocols.

PCR amplification and cloning. Unless otherwise specified in the text, all PCRs were carried out in 1.5 mM MgCl₂ using the Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf) programmed for an initial denaturation of 94°C for 5 min, 25 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension of 10 min at 72°C. BamHI and EcoRI recognition sites were added to the primers' sequence. Amplification products were cloned in pBluescript KS II vector (Stratagene). The primers were as follows: ME-cruzi 5'-GGATGGATCCAGTTCCTGGTACATCTGG-3'; Ttp28-NH₂ 5'-CGCGCGGATCCCGATACAGTTCGGGTACAC-3'; RRM1COOH 5'-CGGAGATCCAGGAAACCAACGAGTAA-3'; and RRM1NH₂ 5'-CGCGGATCCGGCAGACTTGGCGGGCAT-3'. Cloned fragments were sequenced by fluorescent cycle sequencing using the DYE terminator Dye Terminator kit (Amersham Biosciences) in a MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences).

Results

TcRRM1 and TcRRM2 sequence and analysis

Analysis of the cDNA clones generated by the EST sequencing effort of the *T. cruzi* Genome Initiative [30] allowed us to identify 17 clones presenting the RRM domain, which were separated in two groups according to the presence (group 1) or absence (group 2) of an 18 nucleotide sequence in the 5' portion of the coding region. One clone from each group was chosen for detailed analysis, clone 40c22 (AW329912) from group 1 and clone 18h2 (AW324803) from group 2, and the corresponding genes were named TcRRM1 and TcRRM2, respectively. Sequencing of the full insert of these clones showed the presence of the complete coding region, part of the mini-exon sequence, the 5' UTR, and the 3' UTR.

(Fig. 1). *TcRRM1* cDNA clone is 905 bp long, with an open reading frame of 792 bp encoding a protein of 263 amino acids, while *TcRRM2* is 863 bp long, with an open reading frame of 768 bp encoding a protein of 255 amino acids. The two gene sequences show a similarity of 88.2% and were deposited in GenBank under Accession Nos. AY590473 and AY590473, for *TcRRM1* and 2, respectively.

The amino acid sequence comparison for *TcRRM1* and *TcRRM2* shows an identity of 79%. In silico analysis of these sequences by the PROSITE (www.expasy.org) program identified two RRM domains in each protein (Fig. 1). The main differences found between

the RRM proteins are the 6-amino acid deletion in the N-terminal region of *TcRRM2* and the several different amino acids in the C-terminal region (Fig. 1).

Structure of the TcRRM locus

In order to determine the structure of the *TcRRM* gene locus, Southern blot analysis of genomic DNA was performed. Among the restriction enzymes used, *SalI* and *BamHI* cut in the coding region of *TcRRM1* and *TcRRM2* (Fig. 1). Since both genes are highly similar, probe *TcRRM1* was able to recognize both sequences (data not shown). The resulting hybridization

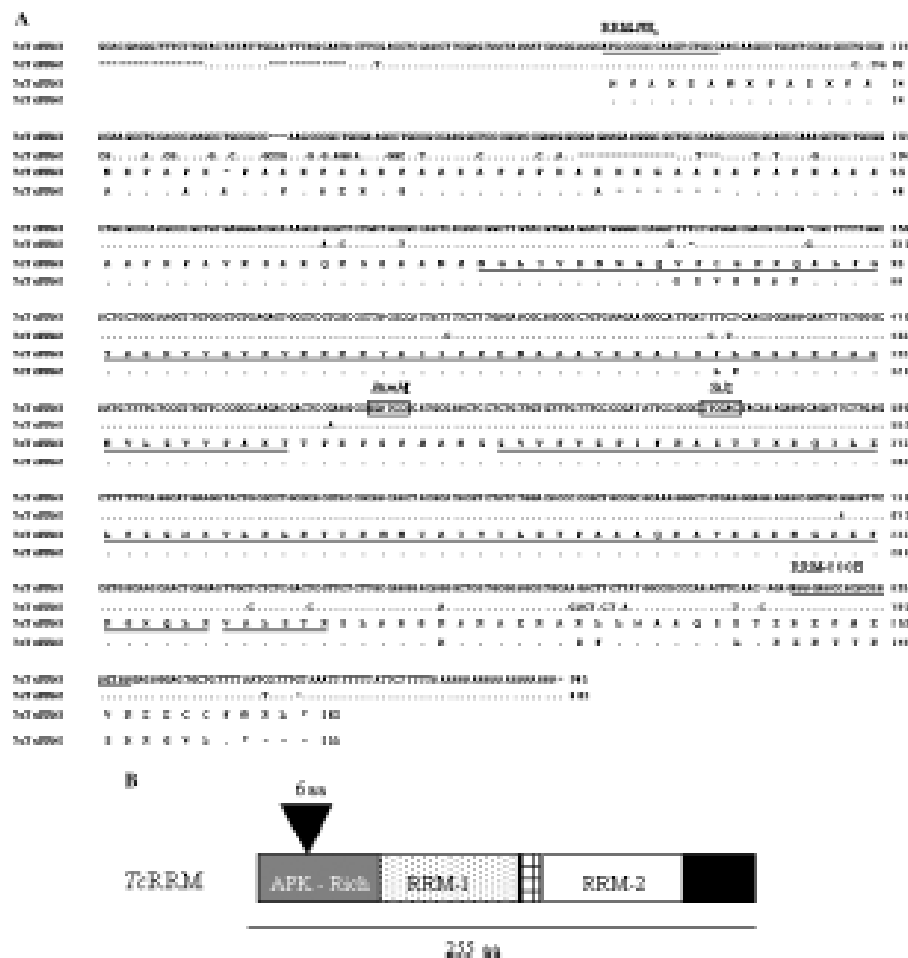


Fig. 1. (A) Nucleotide and predicted amino acid sequence from *TcRRM1* and *TcRRM2*. Dashes indicate deletion and dots indicate the missing nucleotide or amino acid. *BamHI* and *SalI* restriction sites are highlighted. Primers RRM-NH₁ and RRM-COOH are underlined. The RRM domains are indicated (underlined). (B) Scheme showing the position of the different domains present in the *TcRRM* genes. The APK-rich and the RNA binding domains are indicated. The black box marks the differences on carboxyl terminal and the arrowhead points to the six amino acid insertion.

RNA binding proteins in different T. cruzi lineages and in other trypanosomatids

A similarity search in the public databases showed that the *T. cruzi* RRM genes are highly similar to two

previously characterized RNA binding protein genes in *T. brucei* [16], Tb34 and Tb37. A similar protein-coding gene was also found in the *L. major* genome, showing two RNA binding domains and an APK-rich N-terminal sequence. Fig. 3A shows the predicted amino acid se-

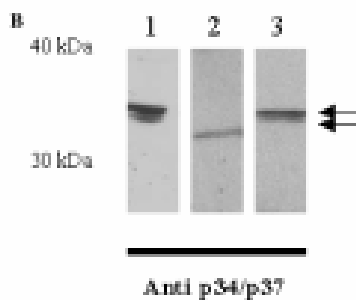


Fig. 3. (A) Alignment of predicted amino acid sequences of RNA binding protein from *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major*. Asterisks indicate identical amino acids, dots indicate single amino acid differences, and colons indicate two amino acid differences. Tbp34, Tbp37, LmRRM, TcRRM1, and TcRRM2. (B) RRM proteins as detected by Western blot in total opisthokont cell extracts of *T. cruzi* CL Brno strain and *L. braziliensis* promastigotes using antibodies raised against *T. brucei* RRM proteins - Tbp34 and Tbp37 (arrows). Molecular weight markers are assigned: 1, *T. cruzi* CL Brno strain promastigotes; 2, *L. braziliensis* promastigotes; and 3, *T. brucei* bloodstream form.

quence alignment of these proteins. *TcRRM2*, *LwRRM*, *Tbp34*, and *Tbp37* present identities of 79%, 60%, 65%, and 65%, respectively, in relation to *TcRRM1*.

The high degree of identity between trypanosomatid RNA binding proteins led us to use antibodies raised against *T. brucei* proteins *Tbp34* and *Tbp37* [16] which recognized two polypeptides in Western blot analysis of *T. cruzi* CI Brener total cell extract (Fig. 3B) and a smaller polypeptide in promastigotes of *L. braziliensis*. Polypeptides were also detected in epimastigotes from *T. cruzi* clone DM28c, CI and Y strains, and *Crithidia fasciculata* (Data not shown).

Differential expression of *TcRRM* and *Top28* in the life cycle of *T. cruzi*

Given the high degree of similarity between *T. cruzi* and *T. brucei* RNA binding proteins and the fact that *T. brucei* proteins *Tbp34* and *Tbp37* are developmentally regulated [18], we have analyzed the pattern of *TcRRM* transcript accumulation in the three different stages of the *T. cruzi* life cycle by Northern blot. Total RNA

extracted from epimastigotes, metacyclic trypomastigotes, and spheromastigotes was hybridized to the *TcRRM* probe. We also analyzed *Top28* RNA levels, since these genes are in the same locus. As can be seen in Fig. 4, a single *TcRRM* RNA of approximately 0.9 kb was detected whose level is higher in spheromastigotes. In contrast, an approximately 1.2 kb *Top28* RNA is more abundant in metacyclic trypomastigotes. These results suggest that both *TcRRM* and *Top28* genes are developmentally regulated and differentially expressed during the parasite's life cycle.

Discussion

The EST sequencing effort of the *T. cruzi* genome initiative consortium increased the discovery of new *T. cruzi* genes [31], among them the ATP synthase F subunit and CAAX prenyl protease [32], and PDZ5 [26]. In the present work we describe the identification of genes of two putative RNA binding proteins and a protein of unknown function in *T. cruzi*, that are differentially expressed. The identification of RNA binding protein genes in kinetoplastida is particularly relevant for gene expression regulation in these organisms, since it is mainly post-transcriptional. mRNA untranslated regions, which in eukaryotes typically contain elements regulating stability, localization, and translation, and the corresponding RNA binding proteins are therefore targets for gene regulation studies [3–5,33].

Similarity searches for RNA binding proteins allowed us to identify several *T. cruzi* clones. The predicted coding regions of these clones present the singular modular structure found in other RNA binding proteins such as the two RRM (RNA recognition motif) domains. This domain is commonly seen in proteins involved in several cellular processes such as RNA splicing, protein translation, and RNA stability [34]. D'Orso and Frasch, in 2003 have recently described a family of RRM proteins presenting a single RRM in *T. cruzi* [35]. The presence of more than one RRM domain has already been described for the *Drosophila* Sxl protein (two RRM domains) and for the ubiquitous protein PABP (four RRM domains) [34]. The presence of more than one RNA binding domain may enhance the protein affinity for the RNA molecule [36] or may be involved in protein-protein interactions [17]. Besides the RRM domain, the *TcRRM* proteins present an APK-rich region, rich in the amino acids alanine, proline, and lysine, already described for the histone genes [37]. This basic region may interact with acidic regions of other molecules.

The *TcRRM* proteins of *T. cruzi* are highly similar to each other (83.7% amino acid identity), with three main differences: a 6 amino-acid deletion in the N-terminal portion of *TcRRM2*; 7 different amino acids in a central

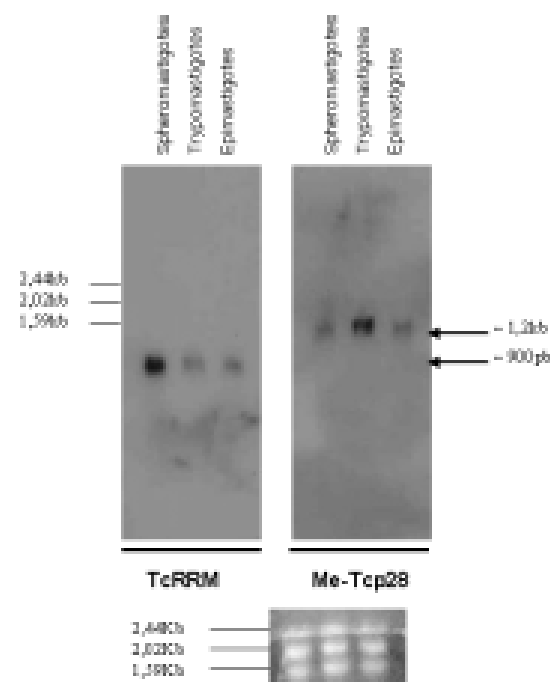


Fig. 4. *TcRRM* and *Top28* mRNA accumulation in different *T. cruzi* stages. Total RNA, 5 µg extracted from spheromastigotes, metacyclic trypomastigotes, and epimastigotes, was separated on 1.5% formaldehyde agarose gel and hybridized with specific probes for *TcRRM* and *Top28* genes. Equal amounts of rRNA are shown by ethidium bromide staining. The molecular weights for rRNAs and for mRNAs are indicated.

portion; and the C-terminal, where a frameshift alteration distinguishes TzRRM1 and TzRRM2. The *T. cruzi* RRM are highly similar to Tbp34 and Tbp37 [16]. These proteins possess, as does the *T. cruzi* RRM, a N-terminal sequence rich in alanine, proline, and lysine (APK) and two RRM domains where most of the similarity is concentrated. TzRRM1 is also similar to the previously described amastigote antigen TzAG18 [38].

Southern blot analysis indicated that the RRM genes are arranged in tandem, a common gene organization in trypanosomatids [39–42]. Partial digestion experiments revealed that there are at least eight copies of the RRM genes, although the order is uncertain as well as the number of different isoforms of TzRRM1 and TzRRM2. An intercalating gene of unknown function, Tzp28, was also found to be located in this locus, an arrangement also common in trypanosomatids [40–42].

Antibodies generated against Tbp34 and Tbp37 recognized a protein of approximately 30 kDa in total cell extracts of different *T. cruzi* clones and strains as well as in *L. braziliensis* and *C. faxiculans*.

We have shown that the TzRRM mRNAs are differentially accumulated during the *T. cruzi* life cycle, with the highest level in spheromastigotes, although the small difference between TzRRM1 and TzRRM2 prevented us from distinguishing the corresponding mRNAs. We have also shown that Tzp28 mRNAs are differentially expressed and are most abundant in metacyclic trypanosomastigotes. These results suggest that these genes, arranged intercalated in the same locus, are differentially expressed between each other. A similarly different RNA expression pattern was also observed in *T. cruzi* for the amastin and tuzin genes [40] and might involve post-transcriptional regulation.

Acknowledgments

We thank Dr. Simone T. G. Leal for the *T. brucei* bloodstream trypomastigote from wt strain 427, and César Felix Schmidt and Claudio Nunes Pereira for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Sequence data for *Leishmania major* project were obtained from The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>.

References

- [1] K.M. Tyler, D.M. Engman, The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 472–481.
- [2] S.M.R. Teixeira, Control of gene expression in *Trypanosomatidae*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 1303–1316.
- [3] I.M. De Nova, I. D'Orso, D.O. Sánchez, A.C.C. Frach, AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mazin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confer mRNA instability and modulate translation efficiency, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10218–10227.
- [4] B.C. Coughlin, S.M.R. Teixeira, L.V. Kirchhoff, J.E. Donelson, Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent co-element and an untranslated region-binding protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12051–12060.
- [5] B. Dellagiovanna, C. Pflanzner-Mermet, S.P.Y. Ogata, A.R. Ávila, M.A. Krieger, S. Goldenberg, *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis, *Exp. Parasitol.* 99 (2001) 7–16.
- [6] I. D'Orso, A.C.C. Frach, TeUHP-1, a developmentally regulated U-rich RNA binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosoma, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34801–34809.
- [7] I. D'Orso, A.C.C. Frach, TeUHP-1, a mRNA destabilizing factor from trypanosoma homo-dimerizes and interacts with novel AU-rich element and poly(A) binding proteins forming a ribonucleo-protein complex, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 30520–30528.
- [8] G. Varani, K. Nagai, RNA Recognition By RNP proteins during RNA processing, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27 (1998) 407–445.
- [9] I.M. Ferra-Caballero, G. Varani, Recent advances in RNA-protein recognition, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 53–58.
- [10] E. Binney, S. Kumar, A. Kravac, Analysis of the RNA recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 5803–5816.
- [11] J. Manger, J.C. Boothroyd, Identification of a nucleic protein in *Trypanosoma brucei* with homology to RNA-binding proteins from *ds*-splicing systems, *Mol. Biochem. Parasitol.* 97 (1998) 1–11.
- [12] J. Manger, J.C. Boothroyd, Targeted disruption of an essential RNA-binding protein perturbs cell division in *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 116 (2001) 239–245.
- [13] P. Xu, L. Wen, G. Renegat, X. Wang, G.A. Buck, Identification of a spliced leader RNA binding protein from *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 112 (2001) 39–49.
- [14] J.A.N. Batista, S.M.R. Teixeira, J.E. Donelson, L.V. Kirchhoff, C.M. Sá, Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its gene, *Mol. Biochem. Parasitol.* 67 (1994) 301–312.
- [15] J. Pituk, W.T. Ruyechan, N. Williams, *Trypanosoma brucei*: identification and purification of a poly(A)-binding protein, *Exp. Parasitol.* 88 (1998) 157–160.
- [16] J. Zhang, N. Williams, Purification, cloning, and expression of two closely related *Trypanosoma brucei* nucleic acid binding proteins, *Mol. Biochem. Parasitol.* 87 (1997) 143–158.
- [17] J. Pituk, W.T. Ruyechan, N. Williams, Two novel RNA binding proteins from *Trypanosoma brucei* are associated with 58S rRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 569–576.
- [18] J. Zhang, W. Ruyechan, N. Williams, Developmental regulation of two nucleic RNA binding proteins, p34 and p37, from *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 92 (1998) 79–88.
- [19] M.J. Cano, A. Oehler, M. Vazquez, A. Corón, M.J. Levin, A. González, W. Degraw, E. Ronchini, B. Zingales, J.L. Ramirez, C. Alonso, I. Requena, J.P. Sáez, Molecular karyotype of clone CL Brener clones for the *Trypanosoma cruzi* genome project, *Mol. Biochem. Parasitol.* 71 (1995) 273–278.
- [20] V.T. Commins, T.C. Amayo-Jorge, M.C. Bonaldo, N. Thomas, H.S. Barbosa, M.N.L. Meireles, S. Goldenberg, Biological aspects of the DmZc clone of *Trypanosoma cruzi* after Metacyclogenesis in chemically defined media, *Mem. Inst. Osw. Cruz* 83 (1988) 123–133.

- [21] E.P. Carrasco, Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Inst. Med. Trop.* 6 (1964) 93–100.
- [22] E. Rondinelli, R. Silva, J.F.O. Carvalho, C.M.A. Soares, E.P. de Carvalho, P.T. de Castro, *Trypanosoma cruzi* an in vitro cycle of cell differentiation in axenic culture, *Exp. Parasitol.* 66 (1988) 197–204.
- [23] D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [24] N. Hulo, C.J.A. Sigrist, V. Le Saux, P.S. Langendijk-Genevaux, L. Bordoli, A. Clark, E. De Castro, P. Bacher, A. Bairoch, Recent improvements to the PROSITE database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D134–D137.
- [25] S.P. Altschul, T.L. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [26] E.R. Coelho, P. da Silveira, T.P. Urmanyi, T.P. Rondinelli, E.R. Silva, Identification of PDZ5, a candidate universal zinc-finger sequence binding protein of *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. Parasitol.* 33 (2003) 853–858.
- [27] S.T.G. Leal, J.R. Anzipe, T.P. Urmanyi, G.A.M. Cruz, E. Rondinelli, *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of a *rab7* gene, *Exp. Parasitol.* 96 (2000) 23–31.
- [28] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [29] J. Sambrook, D.W. Fritsch, E. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2001.
- [30] The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium. The *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative *Parasitol. Today* 13 (1997) 16–22.
- [31] R.E. Verdun, N. de Paolo, T.P. Urmanyi, E. Rondinelli, A.C.C. Frach, D.C. Sanchez, Gene discovery through expressed sequence tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 5393–5398.
- [32] B.M. Forcel, L. Akland, V. Peterson, B. Anderson, *Trypanosoma cruzi*: a putative vacuolar ATP synthase subunit and CAAX prenyl protease—encoding gene, as examples of gene identification in genome projects, *Exp. Parasitol.* 95 (2000) 176–186.
- [33] T. Nozaki, G.A. Cross, Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 75 (1995) 55–97.
- [34] C. Bard, G. Dreyfuss, Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins, *Science* 265 (1994) 615–621.
- [35] J.C. DeGaudenzi, I. D'Onofrio, A.C. Frach, RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18884–18894.
- [36] Y. Sharnoa, N. Abdul-Mannan, K.R. Williams, Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up, *Nucleic Acid Res.* 23 (1995) 728–735.
- [37] D.L. Maister, L. Bohm, The C-domain in the H1 histone is structurally conserved, *Biochim. Biophys. Acta* 1076 (1991) 253–258.
- [38] W.D. Da Rocha, D.C. Bartholomeu, C.D.S. Machado, M. Horta, E. Cunha-Neto, J.E. Donelson, S.M.R. Teixeira, Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes, *Parasitol. Res.* 88 (2002) 292–300.
- [39] W.D. Da Rocha, D.C. Bartholomeu, C.D.S. Machado, M. Horta, E. Cunha-Neto, J.E. Donelson, S.M.R. Teixeira, Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes, *Parasitol. Res.* 88 (2002) 292–300.
- [40] C.M.A. Soares, E.P. Carvalho, T.P. Urmanyi, J.F.O. Carvalho, P.T. Castro, E. Rondinelli, Alpha- and beta-tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript, *FEBS Lett.* 250 (1989) 497–502.
- [41] S.M. Teixeira, L.V. Kirchhoff, J.E. Donelson, Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/turin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 22586–22594.
- [42] J.M. De Nova, I. D'Onofrio, L. Akland, D.C. Sanchez, A.C.C. Frach, The *Trypanosoma cruzi* main family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions, *J. Biol. Chem.* 275 (1998) 10843–10850.