

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**ESTUDO DA REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DOS GENES DE
HSP70 EM *Trypanosoma cruzi***

Deivid de Carvalho Rodrigues

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEIVID DE CARVALHO RODRIGUES

**ESTUDO DA REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DOS GENES DE
HSP70 EM *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Turán Peter Ürményi

Rio de Janeiro

Abril, 2009

Rodrigues, Deivid de Carvalho.

Estudo da Regulação Pós-Transcricional dos Genes de HSP70 em *Trypanosoma cruzi*

Deivid de Carvalho Rodrigues. Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

xiii, 106p. il.

Orientador: Turán Peter Ürményi

Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) - Programa de Biologia Molecular e Estrutural, 2009.

1 - HSP70. 2 - Regulação Gênica. 3 - Estabilidade do mRNA. 4 - Tradução. 5 - *Trypanosoma cruzi*. 6 - Tese (Doutorado - UFRJ/IBCCF).

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

*O mistério não é um muro onde a inteligência esbarra,
mas um oceano onde ela mergulha.*

(Gustav Thibon)

*Se queres vencer na vida,
consulta três velhos*

(Provérbio chinês)

À minha família: meus pais e irmãos

À Juliana

Agradecimentos

Ao meu orientador Turán Peter Ürményi, pelo apoio e ensinamentos, e por confiar a mim esse projeto ao qual devo a maior parte da minha formação.

Ao Edson Rondinelli e Rosane Silva, pela fundamental co-orientação e confiança.

Ao Cláudio Nunes e César Schmidt, pelo auxílio, presteza e disponibilidade.

Aos velhos e novos membros do Laboratório de Metabolismo Macromolecular - Firmino Torres de Castro, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular, pelo companheirismo dentro e fora da universidade.

Aos colegas de IBCCF, alunos, professores e funcionários.

Aos meus queridos pais: Sr. Francisco das C. M. Rodrigues e Sra. Lanabety Amaral de Carvalho; meus queridos irmãos: Dayse A. de Carvalho Silva, Thiago Carvalho Rodrigues e Samuel Carvalho Rodrigues. Pelo amor e incentivo.

À minha esposa Juliana Manasfi Figueiredo, pelo amor, dedicação, cumplicidade, incentivo, compreensão e paciência em todos os momentos.

Obrigado a todos.

Índice Geral

| | |
|--|------------|
| Índice de Figuras | xi |
| Lista de Abreviaturas | xii |
| Resumo | xiv |
| Abstract | xv |
| Introdução | 1 |
| <i>O Controle Transcricional</i> | <i>1</i> |
| <i>O controle Pós-Transcricional</i> | <i>5</i> |
| <i>O controle da expressão gênica durante o choque térmico</i> | <i>14</i> |
| <i>As chaperonas moleculares e a resposta ao estresse</i> | <i>15</i> |
| <i>O Trypanosoma cruzi</i> | <i>18</i> |
| Objetivos | 26 |
| Materiais e Métodos | 27 |
| <i>Microrganismos utilizados</i> | <i>27</i> |
| <i>Meios de cultura</i> | <i>27</i> |
| <i>Soluções utilizadas</i> | <i>28</i> |
| <i>Indução de competência de Escherichia coli</i> | <i>31</i> |
| <i>Transformação bacteriana</i> | <i>31</i> |
| <i>Cultivo de T. cruzi</i> | <i>31</i> |
| <i>Extração de ácidos nucléicos</i> | <i>32</i> |
| <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> | <i>34</i> |
| <i>Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT)</i> | <i>34</i> |
| <i>Oligonucleotídeos</i> | <i>35</i> |
| <i>Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose</i> | <i>36</i> |
| <i>Quantificação de ácidos nucléicos</i> | <i>36</i> |

| | |
|--|-----------|
| <i>Digestão de DNA plasmideal e produtos de PCR com enzimas de restrição</i> | 36 |
| <i>Eletroforese</i> | 37 |
| <i>Transferência de RNA para membranas de nylon – northern blot</i> | 37 |
| <i>Hibridização de ácidos nucleicos</i> | 38 |
| <i>Determinação da meia-vida do mRNA de HSP70</i> | 39 |
| <i>Construção dos plasmídeos repórter</i> | 40 |
| <i>Ensaio repórter CAT por transfecção transiente</i> | 42 |
| <i>Quantificação dos mRNAs CAT por RT-PCR em Tempo Real</i> | 43 |
| <i>Reação de degradação in vitro de RNA</i> | 44 |
| <i>Seqüenciamento de DNA</i> | 47 |
| Resultados | 48 |
| <i>Determinação da meia-vida do mRNA de HSP70</i> | 48 |
| <i>Identificação de elementos regulatórios presentes nas UTRs 3` e 5` do mRNA de HSP70</i> | 52 |
| <i>Os papéis das UTRs 5` e 3` na estabilidade e tradução dos mRNAs de HSP70</i> | 62 |
| <i>O papel da região rica em AU da UTR 3` de HSP70 na estabilização do mRNA durante o choque térmico</i> | 65 |
| Discussão | 72 |
| Conclusões | 78 |
| Referências | 79 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Determinação da meia-vida do mRNA endógeno de HSP70 a 29°C e a 37°C - AMD. | 50 |
| Figura 2: Determinação da meia-vida do mRNA endógeno de HSP70 a 29°C e a 37°C - AMD + Cicloheximida. | 51 |
| Figura 3: Representação esquemática dos plasmídeos repórter CAT. | 53 |
| Figura 4: Sequência da região intergênica de HSP70. | 54 |
| Figura 5: Análise do ensaio CAT por cromatografia de camada fina. | 57 |
| Figura 6: Atividade CAT relativa a 29°C e 37°C de epimastigotas transfectados transientemente com os quatro plasmídeos repórter. | 58 |
| Figura 7: Representação esquemática dos plasmídeo repórter CAT com deleção da UTR 5` de HSP70. | 60 |
| Figura 8: Atividade CAT de epimastigotas transfectados transientemente com o plasmídeo repórter contendo a deleção da UTR 5` de HSP70. | 61 |
| Figura 9: Níveis dos mRNAs CAT de epimastigotas transfectados transientemente a 29°C e 37°C. | 64 |
| Figura 10: Alinhamento das UTRs 3` do mRNA de HSP70 de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> . | 66 |
| Figura 11: Predição, <i>in silico</i> , da estrutura secundária da região rica em AU da UTR 3` do mRNA de HSP70. | 67 |
| Figura 12: Sequências utilizadas no ensaio de degradação <i>in vitro</i> de RNA | 70 |
| Figura 13: Quantificação dos níveis de RNA sintético do ensaio de degradação <i>in vitro</i> . | 71 |

Lista de Abreviaturas

μCi – microcurie

μg – micrograma

μL – microlitro

μM - micromolar

Abs - Absorbância

ARE – elemento rico em adenina e uridina

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

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

g – grama

g – gravidade

HSP - Proteínas de choque térmico

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

Kb - quilobases

kDa – quilodaltons

M – molar

mA – mili-ampéres

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

mRNA – RNA mensageiro
N - normal
ng - nanograma
nM - nanomolar
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
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
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
Tris – tris (hidroximetil) aminometano
U - Unidades
UTR – região não traduzida
V – volts
W - watts

Resumo

O estudo do controle da expressão gênica das proteínas da família das chaperonas pode esclarecer alguns dos mecanismos da regulação pós-transcricional, a qual os membros da família dos tripanosomatídeos utilizam para controlar a expressão da maioria dos seus genes. Nós determinamos que, a 29°C, o mRNA de hsp70 apresenta uma meia-vida de 60 minutos, com uma cinética exponencial de decaimento, enquanto que, a 37°C, a meia-vida aumenta para 120 minutos. Além disso, essa estabilização do mRNA de hsp70 a 37°C é perdida quando a síntese proteica é inibida. Nós também determinamos a contribuição das regiões não traduzidas (UTRs) do mRNA de hsp70 na regulação gênica durante o choque térmico. Nós construímos plasmídeos repórter contendo o gene cloranfenicol acetil-transferase (CAT), flanqueado pelas regiões intergênicas que continham as UTRs 5' e 3' bem como suas respectivas sequências regulatórias. Nossos resultados mostraram que ambas as UTRs 5' e 3' conferem regulação dependente de temperatura ao gene repórter CAT, e que os efeitos de cada uma na indução de CAT parecem ser aditivos. Nós também mostramos que, enquanto cada UTR separadamente é incapaz de afetar a estabilidade a 37°C, a presença de ambas as UTRs leva a um aumento de duas vezes nos níveis do mRNA CAT, indicando que as UTRs 5' e 3' agem cooperativamente para estabilizar o mRNA de hsp70 durante o choque térmico, e contribuem individualmente e em combinação para aumentar a eficiência de tradução a 37°C. Nós também investigamos a função de um elemento rico em AU presente na UTR 3' do mRNA de hsp70, e verificamos que ele pode agir como elemento desestabilizador deste mRNA a 29°C.

Abstract

The understanding of control of gene expression of members of the chaperone family will shed light on the mechanisms of post-transcriptional regulation through which trypanosomatids govern the fate of most of their mRNAs. We have determined that at 29°C the HSP70 mRNA shows a half-life of 60 minutes in an exponential kinetics, while at 37°C the half-life is increased to 120 minutes. In addition, the stabilization of HSP70 mRNA at 37°C is lost when protein synthesis is inhibited. We have also determined the contribution of untranslated regions (UTRs) of the mRNA to HSP70 gene regulation during heat shock. Plasmids containing the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene, flanked by intergenic regions containing either the 5' or 3' UTR and their respective regulatory sequences of the HSP70 mRNA were constructed. Our results show that both the 5'- and 3'-UTRs confer temperature-dependent regulation to CAT reporter gene, and that the effects of each on CAT induction appear to be additive. We also show that, while each UTR separately is unable to affect CAT mRNA stability at 37°C, the presence of both UTRs lead to a two-fold increase in CAT mRNA levels, indicating that the 5'- and 3'-UTRs act cooperatively to stabilize HSP70 mRNA during heat shock, and both UTRs can contribute individually and in combination to increase translational efficiency at 37°C. We have also investigated the function of an AU-rich element present in the 3'-UTR of the HSP70 mRNA, and we found that it may act as a destabilizing element of its mRNA at 29°C.

1. Introdução

A execução de processos biológicos tais como desenvolvimento, proliferação, apoptose e diferenciação requerem um conjunto de passos precisamente orquestrados. Tais passos dependem, em todas as instâncias, da correta expressão de determinados genes tanto espacialmente quanto temporalmente. Como resultado, erros no controle da expressão de tais genes podem levar a problemas de desenvolvimento e doenças. A finalização do sequenciamento do genoma humano e sua anotação usando os métodos de genômica computacional e comparativa permitiram a catalogação de algo em torno de 25.000 genes codificantes de proteínas (Consortium IHGS, 2004). O estudo destes genes e de seus produtos funcionais têm se intensificado nos últimos anos, principalmente no que se refere ao estabelecimento dos padrões espaciais e temporais de expressão destes genes, e como esse padrão pode ser controlado tanto ao nível celular quanto ao nível de um organismo como um todo.

Os mecanismos moleculares que governam o padrão específico de expressão em escala global ocorrem em etapas distintas durante o fluxo da informação gênica e, por convenção, tais mecanismos são divididos em dois grupos: aqueles que atuam até que a transcrição se inicie - o controle transcricional - e aqueles que atuam após o início da transcrição - o controle pós-transcricional.

1.1. O Controle Transcricional

No controle da expressão de genes, uma das mais importantes questões é a identificação dos elementos regulatórios associados a cada gene. De fato, a habilidade de se encontrar tais elementos e a identificação de potenciais modificações em sua estrutura é um importante passo no entendimento do controle da expressão de cada gene em particular e como sua expressão pode ser alterada em condições diversas ou até patológicas. A identificação destes elementos funcionais é um dos principais desafios da pesquisa em genômica, e a disponibilidade de sequências de genomas completos em combinação com os dados de expressão em larga escala têm auxiliado na identificação

destes elementos de regulação da transcrição (Foekens *et al.*, 2008; Keurentjes *et al.*, 2008).

Os genes codificantes de proteínas, transcritos pela RNA polimerase II, tipicamente possuem duas famílias distintas de elementos regulatórios que atuam em *cis*: (a) um promotor, que é composto de uma sequência promotora central e elementos regulatórios proximais; e (b) elementos regulatórios distais, a saber, *enhancers*, *silencers*, *insulators*, e *locus control regions* (LCR) (Simpson e Ayvar, 2008; Higgs *et al.*, 2008). Esses elementos regulatórios presentes no DNA contêm sítios para ligação de fatores proteicos os quais funcionam tanto para aumentar quanto para reprimir a transcrição (Bickel e Perotta, 1990; Brown, 2003).

A necessidade dessa estrutura complexa dos promotores de transcrição, tipicamente constituídos de múltiplos elementos regulatórios, se faz evidente: tomando o genoma humano como exemplo, sabemos que existem em torno de 25.000 genes codificantes de proteína, e que a maioria destes genes deve ter um padrão único de expressão temporal e espacial. No entanto, este genoma não codifica mais do que 2.000 diferentes tipos de fatores de transcrição - um número presumivelmente bem menor do que o número de padrões de expressão que devem existir. Logo, a presença de múltiplos elementos regulatórios nos promotores permite um controle combinatório para a regulação dos genes, o que aumenta exponencialmente o número potencial de padrões de expressão (Venter *et al.*, 2001).

Mutações em alguns elementos regulatórios têm sido associadas com doenças humanas. Em muitos casos, as alterações específicas são conhecidas. Por exemplo, mutações em um elemento promotor proximal do gene *GpIb β* resultam em baixa capacidade de ligação da proteína GATA-1, com consequente redução da expressão da própria *GpIb β* , e isso leva a uma doença conhecida como Síndrome de *Bernard-Soulier* (Ludlow *et al.*, 1996). Em outros casos, as mutações ainda não estão bem definidas. Por exemplo, uma expansão de uma repetição de 12-mero no promotor do gene *cystatin B* tem sido proposta como a causa da epilepsia mioclonus progressiva, presumivelmente por alterar o espaço entre os elementos no promotor (Lalioi *et al.*, 1999).

Da mesma forma, mutações nos genes de componentes da maquinaria de transcrição também têm sido associadas com doenças. Vários exemplos foram descritos: (1) mutações no fator de transcrição TFIID têm sido associadas com a doença xeroderma

pigmentosa (Lehmann, 2001); (2) mutações no ativador GATA-1 estão associadas com muitas desordens hematopoiéticas (Cantor, 2005); e (3) mutações em vários fatores de transcrição homeodomínios (como LMX1B e PHOX2B) também são conhecidas como causa de algumas doenças (Amiel *et al.*, 2003; Vollrath *et al.*, 1998).

A sequência promotora central e elementos reguladores proximais

A sequência promotora central é uma região a 5' do início de transcrição que serve como sítio de ligação para a maquinaria básica da transcrição e para a montagem do complexo de pré-iniciação, de modo a definir a posição do início da transcrição bem como sua direção (Smale e Kadonaga, 2003). O primeiro elemento na sequência promotora central a ser descrito foi o TATA-*box*, o sítio de ligação para da fator TBP (TATA-*box binding protein*). Além do TATA-*box*, o promotor dos metazoários também pode ser composto de um número de outros elementos, os quais incluem: *Initiation element* - Inr (Kaufmann e Smale, 1994), *Downstream Promoter Element* - DPE (Willy, *et al.* 2000), *Downstream Core Element* - DCE (Smale e Kadonaga, 2003), *TFIIB-Recognition Element* - BRE (Deng e Roberts, 2005), e o *Motif Ten Element* - MTE (Lim, *et al.* 2004). Os elementos reguladores proximais estão localizados em uma região de até poucas centenas de nucleotídeos imediatamente a 5' da sequência promotora central. Eles tipicamente contêm múltiplos sítios de ligação de ativadores e diferentes combinações desses elementos podem conferir distintos efeitos na regulação da transcrição (McKnight e Kingsbury, 1982). Curiosamente, foi demonstrado recentemente por análise estatística de sequências centrais de promotores de cerca de 10.000 genes humanos que que esses elementos podem não ser tão comuns quanto se imaginava antes do advento das ferramentas da genômica (Gershenson e Ioshikhes, 2005). Dos quatro elementos TATA, Inr, DPE, e BRE, o elemento Inr foi o elemento mais comum, ocorrendo em quase metade dos promotores estudados. Em contraste, os elementos DPE e BRE foram encontrados em cerca de um quarto dos promotores, e os TATA-boxes estavam presentes em somente um oitavo dos promotores. Além disso, quase um quarto dos promotores analisados não tinha nenhum dos quatro elementos, sugerindo que elementos adicionais para a sequência central de promotores devam existir. Consistente com essa idéia, um outro recente trabalho sugere a existência de

uma arquitetura não usual para os elementos centrais de promotores, que foi chamada de desertos de ATG (Lee *et al.*, 2005).

Enhancers

Os *enhancers* são elementos que regulam a transcrição temporal e espacialmente de maneira independente de sua distância, posição ou orientação relativa ao promotor (Banerji *et al.*, 1981; Banerji *et al.*, 1983). Os *enhancers* são também frequentemente modulares, ou seja, um único promotor pode ser controlado por *enhancers* distintos em tempos diferentes, ou em tecidos diferentes ou mesmo em resposta a diferentes estímulos (Atchison, 1988). Eles são similares aos elementos reguladores proximais, de modo que um mesmo fator de transcrição pode se ligar a um elemento proximal de um gene e a um *enhancer* de um outro gene. A diferença entre os dois elementos está principalmente no fato de que os *enhancers* se encontram tipicamente distantes do início de transcrição (Atchison, 1988).

Silenciadores

Os silenciadores são elementos que conferem um efeito repressor ou silenciador na transcrição de alguns genes associados (Ogbourne e Antalis, 1998). Funcionam tipicamente independente da distância, posição e orientação dos seus promotores associados, podendo inclusive se localizarem dentro de introns (Harris *et al.*, 2005). Os silenciadores contêm elementos para ligação de fatores de transcrição chamados repressores, que atuam negativamente na transcrição. Os repressores podem ainda recrutar outros cofatores negativos chamados corepressores (Privalsky, 2004).

Insulators

Os *insulators* impedem que seus genes associados sejam afetados pela atividade transcricional de um gene vizinho, delimitando o genoma em diferentes blocos com atividade distinta (Recillas-Targa *et al.*, 2002). Os *insulators* têm duas propriedades principais: (a) eles podem bloquear a comunicação *enhancer*-promotor (*enhancer-blocking activity*), e (b) eles ainda podem prevenir o espalhamento de heterocromatina repressora (*heterochromatin-barrier activity*) (Recillas-Targa *et al.*, 2002).

Locus control regions

As regiões controladoras de locus (LCRs, *locus control regions*) são grupos de elementos regulatórios envolvidos na modulação de um *locus* inteiro ou de um aglomerado de genes (Li *et al.*, 2002). São operacionalmente definidos como elementos que dirigem a expressão de genes adjacentes de forma independente de sua posição e do número de cópias de genes. Os LCRs são tipicamente compostos de múltiplos elementos, os quais podem incluir os *enhancers*, silenciadores e *insulators*. Estes elementos são alvo de ligação de fatores de transcrição, coativadores, repressores e/ou modificadores de cromatina. Cada componente afeta a expressão dos genes de uma maneira diferente, do modo que é a atividade coletiva desses elementos que define funcionalmente um LCR e confere a apropriada expressão dos genes.

1.2. O controle Pós-Transcricional

O controle pós-transcricional da expressão dos genes em eucariotos possui um papel igualmente importante na coordenação global da expressão gênica destes organismos. Cada etapa do metabolismo dos mRNAs está sujeita à regulação, o que confere à célula uma ampla gama de respostas a estímulos diversos além de maior flexibilidade do genoma.

Splicing Alternativo

O *splicing* alternativo dos pré-mRNAs têm particular relevância no controle da expressão dos genes em eucariotos, além de ser o principal mecanismo gerador de diversidade proteômica nestes organismos. A maquinaria da reação de *splicing* é denominada spliceossômo, e trata-se de um complexo contendo 5 moléculas de snRNAs e diversas proteínas associadas (Jurica e Moore, 2003). Ambos os componentes, os snRNA e as proteínas associadas do spliceossômo, interagem com sequências definidas nas junções exon/intron para dirigir a clivagem do RNA e a ligação dos exons adjacentes mediante reações de transesterificação (Jurica e Moore, 2003). Embora o spliceossômo catalise as reações com alta fidelidade, uma flexibilidade inerente a esse complexo enzimático permite que este seja sensível à regulação (Black, 2003), tornando

possível a geração de isoformas múltiplas de *splicing* contendo diferentes combinações de exons (Johnson *et al.*, 2003). De fato, a maioria dos genes em eucariotos sofre o chamado *splicing* alternativo e os seus efeitos nos produtos protéicos podem ser dramáticos. Por exemplo, a produção de formas solúveis ou ligadas à membrana do receptor Fas, que têm efeitos opostos na apoptose (Cascino *et al.*, 1995), ou a produção de isoformas da proteína *fruitless* que atua na determinação sexual em *Drosophila* (Demir e Dickson, 2005).

Localização dos mRNAs

Um importante mecanismo de regulação pós-transcricional diz respeito à localização dos mRNAs maduros no citoplasma celular. Esse tipo de regulação permite a síntese de proteínas em domínios subcelulares específicos (Palacios, 2007). Esse mecanismo tem sido encontrado em uma diversa gama de organismos. Por exemplo, em oócitos de *Drosophila* e embriões de *Xenopus* a correta localização de determinados mRNAs parece importante para o estabelecimento dos eixos corporais (Hengst e Jaffrey, 2007). A localização de mRNA também foi mostrada como sendo importante para a determinação das divisões assimétricas dos neuroblastomas nos embriões de drosófila (Hengst e Jaffrey, 2007). Em mamíferos, a localização de mRNAs foi mostrada como sendo importante na formação do citoesqueleto de actina em células migrantes, na formação da bainha de mielina no sistema nervoso central, e no desenvolvimento dos axônios e dendritos (revisto por Dahm *et al.*, 2007).

NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay)

O controle pós-transcricional também pode atuar na avaliação da qualidade dos mRNAs. Uma vez transcritos, os mRNAs associam-se a diversas proteínas durante toda sua permanência no citoplasma (Moore, 2005). Estes complexos de ribonucleoproteína (mRNPs) sofrem uma série de eventos de remodelamento que são influenciados, ou influenciam, as maquinarias de tradução ou de degradação dos mRNAs (Dreyfuss *et al.*, 2003). Um dos eventos de degradação de mRNAs é denominado degradação de mRNA mediado por terminação prematura (*Nonsense-Mediated mRNA Decay* - NMD), e se trata de um mecanismo de segurança que detecta mRNAs aberrantes cuja tradução resultaria em proteínas truncadas que são com frequência deletérias aos organismos. O

NMD é um mecanismo conservado encontrado em *Saccharomyces cerevisiae* (Losson e Lacroute, 1979), *Drosophila melanogaster* (Brognia, 1999), *Caenorhabditis elegans* (Hodgkin *et al.*, 1989), mamíferos (Maquat *et al.*, 1981), e plantas (van Hoof e Green, 1996). A maioria dos mRNAs eucarióticos não sofrem o NMD porque eles contêm apenas um códon de terminação no final de sua região codificante. Ao contrário, mRNAs mutantes que contêm um códon de terminação prematuro a 5' do códon de terminação normal são reconhecidos pela maquinaria de NMD, o que leva à desestabilização do mRNA. Muitas doenças humanas hereditárias são causadas por mutações que atingem o NMD (Frischmeyer e Dietz, 1999). Os fatores proteicos requisitados para o NMD e conservados entre vários organismos são: Upf1p, Upf2p e Upf3p, os quais foram originalmente identificados em um rastreamento genético em leveduras (Culbertson *et al.*, 1980). Porém, sabe-se que proteínas adicionais são também necessárias para o NMD em eucariotos superiores, mas apesar de muitos trabalhos neste campo o mecanismo de ação do NMD está apenas começando a ser compreendido. Por exemplo, a única proteína da maquinaria com função bioquímica claramente definida é Upf1: trata-se de uma proteína ligadora de ATP com atividade de RNA helicase (Czaplinski *et al.*, 1995; Bhattacharya *et al.*, 2000).

Estabilidade dos mRNAs

Grande importância também é dada para a regulação das taxas de degradação, às quais os mRNAs estão sujeitos uma vez no citoplasma. A abundância de um mRNA em um momento qualquer é dada pela diferença entre a taxa de transcrição e a velocidade de degradação do mesmo, e esta última pode ser controlada em função de variações ambientais. Os mRNAs de eucariotos são criados com duas estruturas que, além de outras funções, lhes conferem estabilidade: o cap 5' (5' 7-metilguanossina) e a cauda poli-A. Uma vez que as condições ambientais exigem que um determinado mRNA seja degradado, o cap 5' ou a cauda poli-A devem ser removidos e, quando isso acontece, uma via irreversível de degradação é ativada. Quando o cap 5' é removido, em um processo conhecido como decapeamento, o mRNA está sujeito à degradação na direção 5'→3' pela enzima exoribonucleásica XRN1 (Yamashita *et al.*, 2005). Quando a cauda poli-A é encurtada a um tamanho mínimo crítico, o terminal 3' dos mRNAs é atacado pelo complexo exossômico com atividade exonucleásica 3'→5' (Yamashita *et al.*, 2005).

Essas duas vias não são excludentes, e a contribuição relativa de cada uma no controle dos níveis dos diferentes mRNAs ainda não é completamente conhecida. Por exemplo, em *S. cerevisiae*, a repressão de componentes da via de degradação 3'→5' ou 5'→3' tem pouco efeito nos níveis globais dos mRNAs, o que sugere redundância das vias (He *et al.*, 2003; Houalla *et al.*, 2006).

Outro eficiente conjunto de enzimas de degradação de mRNA utilizado pelos organismos eucarióticos são as endonucleases. Elas clivam internamente o mRNA, independente do decapeamento ou deadenilação, produzindo fragmentos que são alvos para as exonucleases 5'-3' e 3'-5' (Yang e Schoenberg, 2004; Yang *et al.*, 2006). Várias endonucleases com essa função específica foram caracterizadas recentemente, incluindo PMR1, IRE1 e MRP (Yang e Schoenberg, 2004; Yang *et al.*, 2006).

As taxas de degradação de um mRNA em particular também dependem de sequências contidas no próprio transcrito. Essas sequências são geralmente encontradas na UTR 3' e são alvos para ligação de proteínas (Wilusz *et al.*, 2001; Garneau *et al.*, 2007). Dentre essas sequências, a mais estudada é o elemento rico em adenilato-uridilato - ARE (Shaw e Kamen, 1986; Chen e Shyu, 1995). Os elementos AREs foram originalmente definidos pela sequência AUUUA (Shaw e Kamen, 1986), embora subsequentes estudos tenham mostrado outras sequências comportando pequenas variações dentro do elemento que apresentam as mesmas propriedades do ARE canônico. As diversas sequências descritas como elementos ARE são classificadas em três grupos principais: AREs classe I, que consistem de uma a três cópias do pentâmero AUUUA dentro de uma região rica em U; AREs classe II, que contêm pelo menos duas cópias que se sobrepõem do nonâmero UUAUUUA(U/A)(U/A) também dentro de uma sequência rica em U; e AREs classe III, que não possuem o pentâmero típico AUUUA mas possuem regiões ricas em U (Chen e Shyu, 1995). Muitas proteínas que se ligam ao elemento ARE foram identificadas e são coletivamente chamadas de AUBPs (*AU-rich binding proteins*). Algumas das AUBPs aumentam a estabilidade dos mRNAs enquanto outras diminuem, de modo que a abundância dos mRNAs que possuem este elemento depende de um balanço entre sua taxa de transcrição e os níveis de expressão e atividade das proteínas desestabilizadoras vs. proteínas estabilizadoras que se ligam ao elemento ARE. Uma das famílias de proteínas estabilizadoras de mRNAs que se ligam ao elemento ARE é a Hu. Essa família é composta por 4 proteínas em mamíferos e contém

três motivos de reconhecimento de RNA (RRM -*RNA recognition motifs*) (Query *et al.*, 1989). Foi demonstrado que as proteínas Hu se ligam aos elementos ARE encontrados na UTR 3' de mRNAs específicos envolvidos no crescimento e diferenciação celular (Keene, 1999). A proteína HuR, em particular, funciona se ligando ao ARE competindo com AUBPs desestabilizadoras, prevenindo desta forma a ação das proteínas que degradam os mRNAs (Chen *et al.*, 2001). Existem muitas proteínas descritas que se ligam ao elemento ARE e promovem a degradação dos mRNAs. Uma delas, a proteína AUF1 (também conhecida como hnRNP D), possui quatro isoformas produzidas por *splicing* alternativo (p37, p40, p42, e p45) com pequenas diferenças de atividade. AUF1 foi a primeira proteína que se liga ao ARE a ser associada com a estabilidade de mRNAs, quando foi verificada sua habilidade de promover a degradação do mRNA de c-myc (Brewer, 1991).

miRNAs

Os eventos de remodelamento dos mRNPs também são cruciais para outro mecanismo de controle pós-transcricional: o silenciamento de mRNAs mediado por miRNA. Este tipo de regulação garante que uma dada proteína seja expressa em níveis adequados para permitir a função celular normal. Os miRNAs são RNAs endógenos, não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos que controlam processos celulares fundamentais em animais e plantas. Nos vertebrados, por exemplo, os genes de miRNAs formam a maior classe de genes regulatórios (~1% de todos os genes) (Lim *et al.*, 2003; Bartel, 2004; Bartel e Chen, 2004; Lim *et al.*, 2005). Após a incorporação do miRNA no conjunto de proteínas chamado de complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* - RISC), os miRNAs guiam a maquinaria de interferência de RNA (RNAi) para seus mRNAs alvos através da formação de RNAs dupla fita, o que resulta em uma repressão de tradução ou degradação do mRNA de maneira sequência-específica (Ambros, 2004).

Corpos P

Os corpos P (*P-bodies*) são locais específicos no citoplasma que contêm proteínas sabidamente envolvidas no metabolismo dos mRNAs (Kedersha e Anderson, 2007; Parker e Sheth, 2007; Eulalio *et al.*, 2007a). Esses locais podem também ser chamados de corpos GW (*GW bodies*), uma vez que eles contêm a proteína GW182 que é requerida para a repressão traducional mediada por miRNA (Eystathioy *et al.*, 2002; Jakymiw *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005). As funções do corpos P ainda não são completamente conhecidas, mas sabe-se que os mRNAs nesses locais podem tanto ser degradados ou retornar para a população de mRNAs citoplasmáticos traduzíveis. Na composição proteica dos corpos P são encontrados os fatores gerais para degradação de mRNA mediada por NMD Upf1, Upf2, Upf3, Smg5 e Smg7 (Unterholzners e Izaurralde, 2004). Também são encontrada outras proteínas que promovem a degradação dos mRNAs, incluindo a deadenilase CCR4 (Sheth e Parker, 2003; Andrei *et al.*, 2005) e o complexo decapeador DCP1–DCP2 (Ingelfinger *et al.*, 2002; Sheth e Parker, 2003). Acredita-se que os mRNAs nos corpos P sejam degradados no sentido 5´-3´, uma vez que os corpos P contêm a exonuclease 5´-3´ XRN1 (Ingelfinger, *et al.* 2002; Sheth, e Parker, 2003). Os corpos P não possuem os componentes ribossômicos, a maioria dos fatores de iniciação da tradução nem a proteína PABP, o que sugere que sejam locais de repressão traducional. Esta característica também indica que os ribossomos, PABP e os fatores de iniciação da tradução devem se dissociar dos mRNPs antes ou imediatamente após os mRNAs se agregarem aos corpos P. Os corpos P também contêm fatores proteicos envolvidos na repressão traducional mediada por miRNAs, incluindo as proteínas Argonata, Rck/p54, e GW182 (revisto em Kedersha e Anderson, 2007; Parker e Sheth, 2007; Eulalio *et al.*, 2007a). No entanto, sabe-se que os corpos P não são absolutamente necessários para a função dos miRNAs, uma vez que a depleção de Lsm1 ou GW182, que causa a perda dos corpos P e a dispersão das proteínas Argonata no citoplasma em células humanas e de drosófila, não afeta a capacidade repressora dos miRNAs (Chu e Rana, 2006; Stoecklin *et al.*, 2006).

1.2.1. O controle Traducional

A síntese proteica é um processo multifatorial complexo que envolve muitas etapas, no qual a célula gasta mais energia do que em qualquer outra atividade (Dever, 2002; Gebauer e Hentze, 2004). A regulação da tradução engloba mecanismos de controle global e específicos para a tradução dos mRNAs, e o início da tradução é o principal alvo do controle traducional (Preiss e Hentze, 2003). O controle da tradução em larga escala, que afeta a tradução da maioria dos transcritos, usualmente ocorre por mudanças do estado de fosforilação dos fatores iniciadores de tradução e pelo ajuste no número de ribossomos disponíveis no citoplasma. Por outro lado, a regulação específica, que modula o destino de grupos distintos de mRNAs, pode ser mediada por uma diversidade de mecanismos. Estes mecanismos envolvem por exemplo proteínas ligadoras de RNA, que se associam com estruturas particulares ou elementos de sequências presentes nas UTRs dos mRNAs alvo (Gebauer e Hentze, 2004). A regulação da tradução é de particular importância em condições que requerem mudanças rápidas e precisas dos níveis de proteínas, o que inclui por exemplo as respostas celulares ao estresse ambiental (Holcik e Sonenberg, 2005), e a regulação do crescimento celular e sua coordenação com a divisão celular (Jorgensen e Tyers, 2004).

O controle da iniciação da tradução

A tradução nos eucariotos é iniciada por um de dois mecanismos atualmente conhecidos: um mecanismo canônico dependente do cap 5', e um mecanismo alternativo independente do cap 5', que é mediado por elementos regulatórios em *cis* que funcionam como sítio interno de entrada dos ribossomos (IRES) (Sonenberg *et al.*, 2000). O mecanismo canônico dependente do cap 5' requer a ligação do fator de iniciação eIF4E ao residuo de 7-metil guanosina que todos os mRNAs possuem em seus terminais 5'. A ligação da subunidade menor do ribossomo com o mRNAs é feita através da interação entre os fatores eIF4G (que está associado ao ribossomo) com o fator eIF4E, associado ao mRNA. A interação entre estes fatores (eIF4E e eIF4G) é regulada por membros da família de proteínas ligadoras de eIF4E (eIF4E-BPs), uma família de repressores traducionais que contém motivos similares ao núcleo de interação da proteína eIF4G. Enquanto a forma hipofosforilada da proteína 4E-BP se liga fortemente ao fator eIF4E, sua forma hiperfosforilada tem pouca afinidade por esse fator (von der

Haar *et al.*, 2004). E de fato, o principal mecanismo de controle da tradução dependente de cap 5' é baseado na regulação do status de fosforilação de 4E-BP (von der Haar *et al.*, 2004). Em determinadas situações, a síntese global de proteínas é inibida por intermédio do bloqueio do início da tradução, no entanto, a tradução de reguladores críticos precisa ser ativamente mantida. Um exemplo típico é durante a mitose, onde a síntese proteica global dependente de cap 5' é inibida. Nesse momento, mRNAs resistentes mantêm a tradução independente do cap 5' devido aos seus elementos IRES funcionais (Elroy *et al.*, 2007). O recrutamento da subunidade menor do ribossomo dependente do cap 5' depende de eIF4E e eIF4B. eIF4E se liga a estrutura do cap 5' e o fator eIF4B facilita a atividade de outro fator: eIF4A, a helicase dependente de ATP que auxilia o escaneamento do ribossomo através da complexa estrutura da UTR 5' (Dmitriev *et al.*, 2003). É exatamente o sequestro de eIF4E (pela proteína mTOR) e eIF4B (pela proteína 14-3-3 σ) que leva à iniciação da tradução independente do cap 5' mediada pelo IRES (Tinton *et al.*, 2005; Gerlitz *et al.*, 2002). Trabalhos com *Drosophila* têm indicado recentemente que a própria expressão de eIF4E pode ser regulada. Pumilio (Pum), um repressor traducional, desempenha um importante papel na determinação do padrão corporal anterior-posterior de *Drosophila* durante o início da embriogênese (Johnstone e Lasko, 2001). Pum têm sido encontrada controlando a morfogênese dos dendritos (Ye *et al.*, 2004) e também envolvida na formação da memória de longa duração em *Drosophila* (Dubnau *et al.*, 2003). Nas junções neuromusculares de *Drosophila*, a proteína Pum nos terminais pós-sinápticos reprime a expressão de eIF4E (Menon *et al.*, 2004). Pum interage seletivamente com a UTR 3' do mRNA de eIF4E, indicando que pode modular a função sináptica através do controle direto da expressão de eIF4E (Menon *et al.*, 2004). A função de eIF4F também pode ser regulada pois sua atividade é significativamente aumentada por sua interação com PABP, a proteína que se liga à cauda poli(A) dos mRNAs. Essa interação tem sido mostrada ser o alvo do RNA não codificante BC1 (Wang *et al.*, 2002). O RNA BC1 é uma pequena molécula que não é traduzida e é seletivamente transportada para os dendritos (Muslimov *et al.*, 1997). Ele reprime o início da tradução inibindo a formação do complexo de pré-iniciação 48S (Wang *et al.*, 2002).

O controle do alongamento da tradução

O processo de alongamento da cadeia peptídica requer basicamente dois fatores: eEF1 que recruta os aminoacil-tRNAs ao sítio A do ribossomo, e eEF2 que promove a translocação do ribossomo para o próximo códon. O fator eEF1 é composto pela subunidade ligadora de GTP eEF1A, e pelo fator de troca de nucleotídeo guanina (GEF) eEF1B, que por sua vez, consiste de várias subunidades dependendo da espécie. Nos metazoários, o complexo eEF1B contém pelo menos 4 subunidades: uma estrutural, dois fatores de troca (*exchange factors*), e a valina-tRNA sintetase (Taylor *et al.*, 2007). As subunidades de troca são denominadas α, β em plantas e α, δ em animais, e a subunidade estrutural é chamada γ (Le Sourd *et al.*, 2006). As duas subunidades de troca são alvos da quinase mitótica CDK1/ciclinaB durante a meiose nos oócitos de *Xenopus* (Belle *et al.*, 1989; Janssen *et al.*, 1991; Mulner *et al.*, 1992 e 1994) e durante o início do desenvolvimento do ouriço do mar (Monnier *et al.*, 2001a e b). O fator eEF2 também pode ser regulado para o controle da taxa de alongamento. Por exemplo, a fosforilação de eEF2, em sua Thr57 pela kinase eEF2K, o dissocia do ribossomo como mostrado por medidas diretas de constantes de dissociação usando complexos ribossomais purificados (Carlberg *et al.*, 1990). Efeito também mostrado por Celis e colaboradores, uma vez que um aumento na taxa de fosforilação de eEF2 é detectado durante a mitose em correlação com a diminuição da taxa de síntese proteica (Celis *et al.*, 1990) e a diminuição da associação de eEF2 com os polissomos pesados (Sivan *et al.*, 2007). O próprio fator eEF2K pode ser regulado por fosforilação, que opera de acordo com vários sinais, muitos dos quais envolvidos no controle do ciclo celular (Nygard *et al.*, 1991; Browne e Proud, 2002).

1.3. O controle da expressão gênica durante o choque térmico

A sobrevivência das células depende, entre outros fatores, da sua capacidade de responder a condições ambientais adversas. As inhóspitas pressões ambientais, às quais os primeiros organismos estavam sujeitos, proporcionaram às células a habilidade de responder ao estresse reprogramando o metabolismo celular para reparar os danos provocados e evitar novos (Sorensen e Loeschke, 2007). Um dos eventos chave na resposta ao estresse é a reprogramação da tradução, que é acompanhada pela modificação de componentes da maquinaria de tradução (Keene, 2007; Moore, 2005). Além disso, a resposta redireciona mRNAs específicos que codificam proteínas não essenciais para os corpos P para serem estocados ou degradados, e induz a tradução dos mRNAs que codificam enzimas de reparo (Moore, 2005).

O bloqueio do início da tradução é a principal consequência para a reprogramação durante o estresse ambiental (Holcik e Sonenberg, 2005). Esse bloqueio é conseguido por vários eventos que culminam na desagregação do complexo de iniciação da tradução: fosforilação de eIF2a, fosforilação das proteínas que se ligam a eIF4E, fosforilação da proteína ribossômica S6, modificação do RNA dupla fita gerando inosina, e a clivagem de partes do RNA ribossômico por enzimas endonucleolíticas (Holcik e Sonenberg, 2005).

Por outro lado, os mRNAs codificantes de proteínas de reparo são seletivamente excluídos das vias de degradação e redirecionamento para os corpos P. Acredita-se que este fenômeno é o responsável pela tradução preferencial desses mRNAs durante o estresse (Kedersha e Anderson, 2002). Embora o mecanismo molecular para essa seletividade seja desconhecido, é possível que os mRNAs induzidos por estresse sejam alvos de proteínas que os protejam da estocagem ou degradação (Kedersha e Anderson, 2002). Além disso, mecanismos adicionais que promovam a seleção de mRNAs para a tradução durante o estresse também são considerados, como controle da tradução mediada por elementos IRES e por miRNAs (Kedersha e Anderson, 2002).

1.4. As chaperonas moleculares e a resposta ao estresse

Os mecanismos de resposta aos estresses ambientais são uma das estratégias que os organismos adquiriram para protegerem-se de um insulto inicial, facilitar sua recuperação e produzir um estado de resistência a estresses futuros (fenômeno chamado termotolerância). Esta resposta deve ser induzida rápida e repetidamente para que seja útil aos organismos sob estresse. Algumas destas respostas são compartilhadas por todos os organismos investigados até agora. (Fink, 1999). Ao nível molecular, esta resposta é acompanhada por um aumento expressivo do número de proteínas de uma família em particular, que está envolvida no enovelamento proteico. A indução da expressão de proteínas desta família, descrita por Gething e Sambrook em 1992, tem a função de estabilizar agregados de enovelamentos intermediários e facilitar a aquisição do estado nativo e funcional de várias proteínas. A essa família foi dada o nome de chaperonas moleculares (Gething e Sambrook, 1992).

A síntese destas chaperonas moleculares é aumentada em células experimentando uma situação de estresse, como um choque térmico por exemplo, por isso as chaperonas moleculares são também referidas como proteínas de estresse, ou mais comumente, proteínas de choque térmico (*HSP - heat shock protein*) (Burston e Clark, 1995).

Além das chaperonas induzíveis pelo estresse, outras proteínas dessa família são expressas constitutivamente (Gething e Sambrook, 1992; Hendrick e Harlt, 1993). A presença constante destas chaperonas na célula se faz necessária devido à alta concentração proteica intracelular e à tendência de agregação das cadeias polipeptídicas que estão parcial ou completamente desenoveladas durante a tradução (Ellis e Harl, 1996). A falha no enovelamento das proteínas é deletéria não somente por causa da perda de função da proteína incorretamente enovelada, mas também por causa da toxicidade dos agregados proteicos. As características de ação em comum entre as diferentes chaperonas são a interação transiente com espécies proteicas não nativas prevenindo a formação dos agregados proteicos. Essa interação pode ser seguida da correção ativa do enovelamento destas proteínas ou, mais drasticamente, do direcionamento dessas proteínas para degradação (Young *et al.*, 2004; Bukau *et al.*, 2006).

Alguns dos membros da família de HSPs são designados de acordo com seus tamanhos em quilodaltons: HSP10, HSP40, HSP70, HSP90 e HSP100.

O aumento na taxa de expressão das HSPs é geralmente proporcional à severidade e ao tipo de estresse aplicado às células, porém o grau de indução das diferentes HSPs pode ser significativamente diferente. Por exemplo, em células de mamíferos, a síntese de HSP90, HSC70 e HSP60 em resposta ao tratamento com choque térmico é apenas levemente aumentada, enquanto que a síntese de HSP70 e, em alguns tipos celulares, as pequenas HSPs, aumenta várias vezes (Welch, 1992). Além disso, a indução por calor, observada para diferentes isoformas do gene de HSP70, também tem sido descrita como diferente, a HSP70 humana (HSP70A) é induzida de 10 a 20 vezes (Wu *et al.*, 1985), enquanto que a expressão de HSP70B é aumentada em várias ordens de magnitude (Voellmy *et al.*, 1985).

A ativação transcricional das proteínas de choque térmico em resposta a um estresse é regulada pela interação do fator de transcrição de choque térmico (HSF) com os elementos de choque térmico (HSE) na região promotora destes genes. Existem quatro HSFs identificados em vertebrados, dois dos quais HSF1 e HSF2 são expressos constitutivamente e os mais conservados (Morimoto, 1991).

Nos vertebrados, o principal HSF envolvido na resposta a mudanças ambientais e fisiológicas é o HSF1 (Pirkkala *et al.*, 2001). O fator HSF1 é normalmente encontrado no citoplasma como uma molécula monomérica ou, às vezes, complexado como um heterodímero com uma das isoformas de HSP70, num estado latente que é incapaz de se ligar ao DNA. Então, sob condições de estresse e de modo dependente de Ras, os fatores HSF1 são hiperfosforilados por proteínas da subfamília das quinases ativadas por mitógeno (MAPK), e nessa condição eles formam trímeros fosforilados de HSF1 que têm a capacidade de se ligar ao DNA (Morimoto *et al.*, 1991).

O modelo proposto para a regulação da formação de oligômeros de HSF e sua habilidade de ligar ao DNA é como descrito: em células sem estresse, a oligomerização de HSF é impedida pela formação de heterodímeros entre monômeros de HSF e proteínas HSP70; após o estresse, acumulam-se proteínas em conformação não nativa que competem com HSF pela ligação com HSP70. Como consequência desta competição, a fração não ligada de monômeros de HSF aumenta, eles são fosforilados e formam-se os trímeros de HSF, que se ligam aos HSE nos promotores dos genes de

choque térmico desencadeando sua transcrição. Durante a recuperação do estresse, as HSPs continuam a ser sintetizadas e as proteínas desnaturadas voltam a sua conformação funcional ou são degradadas pelo sistema proteolítico das células. A concentração de HSP70 disponível para ligar com HSF aumenta até o nível anterior ao estresse, os trímeros de HSF são dissociados e os heterodímeros com HSP70 voltam a se formar, finalizando a indução de HSP70 (Morimoto *et al.*, 1991).

A chaperona HSP70

A HSP70 é a principal chaperona molecular e a primeira a se ligar aos polipeptídeos nascentes que emergem do ribossomo (Harlt, 1996). A chaperona HSP70, e sua forma constitutiva HSC70, possuem dois domínios funcionais: um domínio N-terminal com atividade ATPase e um domínio C-terminal que se liga às cadeias polipeptídicas nascentes (Jiang *et al.*, 2005). As funções biológicas da HSP70 estão relacionadas com o enovelamento e desenovelamento de proteínas para a translocação, a sinalização para a resposta ao choque térmico, a regulação do ciclo celular, diferenciação e com a morte celular programada (Bukau *et al.*, 2006). A maioria dos eucariotos tem pelo menos 12 isoformas de HSP70 diferentes, presentes numa grande variedade de compartimentos celulares (Fink, 1999). O ciclo de reação proposto para a HSP70 consiste nos seguintes passos: a HSP70 complexada ao ATP liga-se ao substrato proteico não enovelado, a este conjunto liga-se a chaperona cofatora HSP40 o que estimula a hidrólise do ATP, formando o complexo mais estável HSP70-ADP + substrato. O ADP desliga-se do complexo, sendo trocado por ATP em uma reação catalisada por outra chaperona, a proteína GrpE. A substituição de ADP por ATP gera alterações alostéricas na HSP70 que diminuem sua afinidade pelo substrato, fazendo com que o mesmo seja liberado. O complexo HSP70-ATP, agora livre, pode reiniciar o ciclo ligando-se a outra proteína não enovelada. Após a liberação da HSP70, as proteínas enovelar-se-ão espontaneamente ou, caso não possam fazê-lo sozinhas, deverão se ligar ao complexo de HSP60/HSP10 para atingir o estado nativo final (Fink, 1999).

1.5. O *Trypanosoma cruzi*

Taxonomia

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, classificado no grupo taxonômico Kinetoplastidae. Este grupo é definido por apresentar o cinetoplasto, uma rede de mtDNA disposta em círculos concatenados e localizada no interior de sua mitocôndria única (Simpson, 1986). Exemplos de organismos que pertencem a esse grupo taxonômico são os outros membros do gênero *Trypanosoma*, como *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, e os membros do gênero *Leishmania*, causadores de leishmaniose (revisto por de Souza, 2002).

Apesar da alta diversidade genética e fenotípica entre os seus diferentes isolados, o *T. cruzi* é considerado uma espécie única (Campbell *et.al.*, 2004). Dois genótipos principais são reconhecidos como componentes desta espécie: *T. cruzi* I (TCI) e *T. cruzi* II (TCII). O TCI é associado ao ciclo de transmissão selvagem e a infecção de marsupiais (De Freitas *et al.*, 2006), enquanto que o TCII, consistindo de cinco subgrupos relacionados, IIa, IIb, IIc, IId e IIe, é associado ao ciclo de transmissão doméstico e à infecção em mamíferos placentários incluindo o homem (De Freitas *et al.*, 2006). Recentes estudos sobre a ecologia do *T. cruzi* em seus ambientes naturais, no entanto, têm mostrado a presença de TCII no ciclo de transmissão selvagem, circulando em pelos menos cinco ordens de mamíferos: Primatas, Rodentia, Marsupialia, Xenarthra e Carnivora (Lisboa *et al.*, 2006)

O consórcio para o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* (*The Trypanosoma cruzi Genome Consortium*, 1997), elegeu como linhagem referência o clone CL Brener, derivado da cepa CL e membro do subgrupo IIe. No entanto, durante o sequenciamento e nas etapas posteriores de anotação do genoma, observou-se que este clone tratava-se de um híbrido cuja linhagem ancestral é representada pelos subgrupos IIb e IIc (Westenberger *et.al.*, 2005).

Ciclo de vida

O *T. cruzi* tem um ciclo biológico complexo envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento que se alternam entre diferentes hospedeiros. O hospedeiro invertebrado é um inseto triatomíneo hematófago cujas espécies mais conhecidas são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Pastrongylus megistus*, popularmente chamado de barbeiro; os hospedeiros mamíferos podem ser, além do homem, mais de 100 espécies de mamíferos diferentes, incluindo animais domésticos e silvestres. Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro torna-se portador das formas tripomastigotas encontradas no sangue de indivíduos infectados. Uma vez ingeridas pelo inseto, os tripomastigotas se diferenciam nas formas epimastigotas replicativas que se multiplicam por fissão binária. Após alcançar a porção final do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados junto com as fezes do inseto. Os tripomastigotas metacíclicos são transferidos mecanicamente para o hospedeiro mamífero e, ao atingirem a mucosa ou alguma descontinuidade da pele, invadem as células do hospedeiro. Os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam nas formas amastigotas replicativas que se dividem por fissão binária e se transformam em tripomastigotas que, após a ruptura da célula, são liberados no espaço intercelular. Ao atingirem a corrente sanguínea, os tripomastigotas podem penetrar em novas células do hospedeiro e, assim, disseminar a infecção ou infestar outros insetos, completando assim o ciclo biológico do *T. cruzi* (revisto por de Souza, 2002).

O controle da expressão gênica em tripanossomatídeos

A família Trypanosomatidae divergiu muito cedo da linhagem evolutiva eucariótica, de modo que possuem soluções adaptativas distintas dos outros eucariotos. De fato, os membros desta família acumularam diversas características particulares em sua biologia, o que vem atraindo a atenção e curiosidade da comunidade científica há muito tempo.

Os genes codificantes de proteínas estão arranjados em aglomerados que podem comportar dezenas ou mesmo centenas de genes na mesma fita de DNA (El-Sayed *et al.*, 2005a). Estes genes são transcritos em unidades policistrônicas únicas, separados

por pequenas regiões intergênicas. Estas 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), ou ainda genes com funções e padrão de expressão distintos como o tandem contendo os genes de α e β tubulina (Soares *et al.*, 1989) o tandem contendo os genes amastina/tuzina (Teixeira *et al.*, 1995), ou o tandem contendo os genes metaciclogenina/trypanredoxina peroxidase/gene associado (Mtc/TryP/AG) (Ávila *et al.*, 2001). Esse arranjo gênico em tandem dos tripanossomatídeos é semelhante ao arranjo de *operons* encontrado nos procariotos, sendo considerado uma característica que foi preservada nesse grupo (Clayton, 2002). No entanto, ao contrário dos operons bacterianos, o arranjo genômico de tripanossomatídeos não conta com um promotor definido cujo transcrito engloba genes com produtos proteicos de função metabólica afim. Outra importante particularidade da estrutura gênica dos tripanossomatídeos, que os fazem semelhantes aos procariotos, é o fato de que os genes codificantes de proteína também não contêm íntrons. Uma única exceção foi descrita para esta característica: o gene que codifica a enzima poli-(A) polimerase (PAP) de *T. brucei* (Mair *et al.*, 2000). A região codificante deste gene possui um íntron único que, tal qual os íntrons de eucariotos, possui o sinal canônico de *cis-splicing* GU/AG (Mair *et al.*, 2000).

Uma outra particularidade da biologia molecular dos tripanossomatídeos corresponde à transcrição dos genes em longas cadeias policistrônicas e ao mecanismo para a maturação dos mRNAs. O processo difere do que ocorre na maioria dos eucariotos: as unidades policistrônicas transcritas são clivadas e os genes são individualizados pelos mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação (revisto por Liang *et al.*, 2003). O *trans-splicing* foi identificado por Boothroyd e Cross em 1982 quando descobriram que o mRNA das proteínas VSG de *T. brucei* carregavam uma sequência de 39-nucleotídeos comum que foi chamada de sequência *spliced leader* (SL) ou mini-exon. Mais tarde foi verificado que todos os mRNAs contêm esta mesma sequência. A sequência do SL RNA não é exatamente igual entre os tripanossomatídeos, mas sua estrutura secundária é similar entre eles, sendo composta por três *stem-loops* (Liang *et al.*, 2003).

O mecanismo de *trans-splicing* envolve a união de duas moléculas de RNA, ou dois exons, que foram transcritos separadamente (revisto por Clayton, 2002). A adição do SL ao terminal 5' dos pré-RNAs nos tripanossomatídeos atende a dois propósitos: em

conjunto com a clivagem e poliadenilação do transcrito policistrônico individualiza os genes e, uma vez que o SL já possui o cap 5', torna os mRNAs aptos à tradução quando no citoplasma destes organismos (Agabian, 1990).

Um dos sinais importantes para o processamento e maturação dos mRNAs são as sequências ricas em polipirimidina encontradas nas regiões intergênicas que separam os cistrons nos pré-mRNAs (Benz *et al.*, 2005). Mutações nessa sequência podem levar ao uso de sítios crípticos de trans-*splicing* ou poliadenilação ou, mais drasticamente, podem abolir o processamento dos pré-mRNAs mutados (Hug *et al.*, 1993). Nos tripanossomas, a adição da cauda poli(A) é acoplada ao processo de trans-*splicing* do gene a 3' (LeBowitz *et al.*, 1993). Todavia, recentemente Jägger e colaboradores (2007) demonstraram que o processamento do RNA policistrônico parece depender também de outros sinais, uma vez que alguns dos sítios de trans-*splicing* e poliadenilação podem ser ignorados pela maquinaria de processamento a despeito da presença da sequência de polipirimidina. Desta forma são gerados longos transcritos estáveis de mRNA contendo mais de uma região codificante e apenas uma sequência SL em sua porção 5'. Os autores sugerem que estes RNAs intermediários estão em um estado de "latência traducional", pois poderiam ser estocados para processamento completo futuro em um transcrito maduro, quando o ambiente assim o requeresse (Jägger *et al.*, 2007).

O estudo dos promotores dos tripanossomatídeos também gerou uma série de informações que os distinguem dos outros eucariotos. A primeira sequência consenso de promotores encontrada nesses organismos foi para a RNA polimerase III em *T. brucei*. Se tratava de um promotor da classe 1 (contendo os elementos A e C), localizado dentro do gene de rRNA 5S (Cordingley, 1985). Os promotores de classe 2 (contendo os elementos A e B) foram em seguida encontrados dirigindo a transcrição dos genes de tRNA também em *T. brucei* (Campbell *et al.*, 1989). Os promotores de classe 3 da RNA polimerase III (contendo os elementos distal e proximal responsáveis pela transcrição de pequenos RNAs) não foram até hoje encontrados nos tripanossomatídeos. Entretanto, sabe-se que existe uma dependência por promotores de classe 2 e de um gene de tRNA em orientação oposta para que haja a transcrição dos snRNAs (U1-U6) e outros RNAs pequenos (Tschudi e Ullu, 2002).

Os promotores de RNA polimerase I foram primeiro identificados em *T. brucei* nos *loci* dos genes de rRNA e a 5' aos genes de VSG (Laufer *et al.*, 1999). Esses promotores

assemelham-se aos promotores de rRNA de outros eucariotos e, em sistemas *in vitro*, competem pelos mesmos fatores de transcrição (Laufer e Gunzl, 2001). Nos tripanossomatídeos os genes de rRNA organizam-se em uma unidade transcricional que contém oito genes: 18S, 58S 28S α , 28S β e mais quatro rRNAs menores de distintos tamanhos (220, 180, 140 e 70 nucleotídeos) (White *et al.*, 1986). Assim como os promotores de rRNA de outros eucariotos, o promotor de rRNA de *T. brucei* é sensível à mutação no sítio de início de transcrição (Rudenko *et al.*, 1991; Zomerdijk *et al.*, 1991).

A única sequência promotora identificada com características de RNA polimerase II é a que dirige a transcrição do gene *spliced leader* (SL) (Gillinger e Bellofatto, 2001). De fato, algumas evidências corroboram o fato de que essa transcrição é realizada pela RNA polimerase II, como por exemplo a presença da estrutura cap 5' no SL RNA (Mair *et al.*, 2000). Alguns fatores de transcrição foram identificados para estes promotores, porém não se sabe se estes estão também envolvidos na transcrição dos mRNAs (Wen *et al.*, 2000; Matkin e Bellofatto, 2001). O início da transcrição dos genes do SL RNA tem sido estudado extensivamente. Tipicamente são encontrados de 100 a 200 genes de SL RNA organizados em tandem, o que representa 6% da síntese total de RNAs da célula (Campbell *et al.*, 2000). Os promotores estão sempre a 5' em relação ao início de transcrição dos genes de SL RNA e apresentam os elementos críticos em *cis* localizados a -60 e -30, e em muitos casos o elemento -5 (Campbell *et al.*, 2000). Além disso, esses elementos se assemelham em muito aos PSEs dos promotores de snRNAs de humanos (Yu *et al.*, 1998).

Esse peculiar cenário para os tripanossomatídeos, transcrição policistrônica em conjunto a ausência de promotores clássicos de RNA polimerase II, indica que a iniciação da transcrição não é um fator limitante para a produção dos mRNAs. Ao contrário, tudo indica que a transcrição é um evento constitutivo para a quase totalidade dos genes (Clayton, 2002). Isso implica em outra particularidade deste organismos: o controle da expressão gênica deve ser predominantemente pós-transcricional e dirigido por elementos presentes nos próprios mRNAs. Esses elementos afetam o processamento dos pré-mRNAs, sua estabilidade e taxa de tradução (Clayton, 2002; Wong *et al.*, 1994).

A maioria dos eventos de controle pós-transcricional nos tripanossomas descritos até hoje correspondem a mudança rápida da meia-vida dos mRNAs ou pelo controle da taxa

de tradução (Clayton, 2002). Esses eventos são dependentes de elementos geralmente presentes nas regiões não traduzidas (UTRs) e de fatores que agem em *trans* reconhecendo essas sequências (Clayton, 2002). A composição do complexo ribonucleoproteico determina qual o tipo de controle que será executado para o mRNA.

Dos mRNAs observados até agora nos tripanossomatídeos, os mais instáveis são os que codificam as proteínas EP e PGKB em formas sanguícolas de *T. brucei*. O decaimento destes mRNAs apresenta uma cinética bifásica, ou seja, cerca de metade dos mRNAs decaem com meia-vida de menos de 5 minutos, enquanto a metade restante decai com meia-vida de cerca de 15 a 20 minutos (Li *et al.*, 2006; Hotz *et al.*, 1997). Outros mRNAs também instáveis em *T. brucei* são os que codificam as proteínas GPI-PLC e actina. Entretanto, diferente de EP e PGKB, estes decaem com cinética exponencial com meias-vidas de 25 e 15 minutos, respectivamente (Webb *et al.*, 2005). Em *T. cruzi*, o mRNA de amastina também apresenta uma meia-vida curta de cerca de 11 minutos (Coughlin *et al.*, 2000). Por outro lado, a meia-vida de um mRNA nos tripanossomatídeos pode ser bem longa, como por exemplo a dos mRNAs de EP e PGKB nas formas procíclicas de *T. brucei*, ambos com meias-vidas de 2 horas (Irmer e Clayton 2001; Schürch 1997). Outros exemplos de mRNAs de meia-vida longa em *T. brucei* são: ESAG 6,7 com meia-vida de 2 horas (Vanhamme *et al.*, 1999); VSG com meia-vida de 4,5 a 6 horas (Ehlers *et al.*, 1987). Em *leishmania*, exemplos de mRNAs de meia-vida longa são os que codificam as proteínas: PFR2 com meia-vida de 2,5 horas (Mishra *et al.*, 2003); tubulina com meia-vida de 7,5 horas (Purdy *et al.*, 2005).

Grande parte dos elementos reguladores de meia-vida dos mRNAs está localizada nas UTRs 3' (Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000; Dallagiovanna *et al.*, 2001; Clayton e Shapira 2007). Por exemplo, uma região de 26 nucleotídeos rica em U foi demonstrada como necessária para a estabilidade do mRNA da proteína EP nas formas sanguícolas de *T. brucei* (Irmer e Clayton 2001). No entanto, essa mesma região de 26 nucleotídeos não é capaz de conferir estabilidade a mRNAs quando clonada em outros contextos, ou seja, flanqueada por sequências de outras UTRs, mesmo sendo UTRs 3'. Esse fato sugere que outros elementos podem estar envolvidos na estabilização de mRNAs, tais como estruturas secundárias formadas pelos elementos ricos em U e sequências adjacentes (Irmer e Clayton 2001).

Diferente dos elementos regulatórios, as proteínas regulatórias são mais difíceis de serem estudadas. As razões dessa dificuldade ainda não são claras, mas a presença de muitas ligações inespecíficas entre RNA e proteína nesses organismos é uma delas (Clayton e Shapira 2007). Em mamíferos, as proteínas que modulam a estabilidade dos mRNAs geralmente possuem distintos domínios de ligação a outras proteínas ou aos RNAs, que podem ser: RRM (*RNA recognition motif*); domínio KH; proteínas dedo de zinco CCCH; e domínio Puf (pumilio). Sabe-se que o genoma dos tripanossomatídeos codifica 74 proteínas com domínio RRM (De Gaudenzi *et al.*, 2005), 39 proteínas com domínio dedo de zinco CCCH (Ivens *et al.*, 2005) e 12 proteínas com domínio Puf (Ivens *et al.*, 2005). Entretanto, na maioria dos casos, o papel delas no metabolismo dos RNAs não pode ser predito baseado unicamente na sequência. Assim, novas abordagens metodológicas têm sido desenvolvidas para o estudo dessas proteínas a fim de se determinar o papel de cada uma delas. Por exemplo, utilizando a técnica de RNAi, Luu e colaboradores testaram 9 das 12 proteínas com domínio Puf e verificaram que 2 dessas eram necessárias para o crescimento normal de *T. brucei* (Luu *et al.*, 2006). Também em *T. brucei*, e com metodologia semelhante, Wurst e colaboradores testaram 38 das 74 proteínas com domínio RRM e verificaram que 25 eram também necessárias para o desenvolvimento (Wurst *et al.*, 2009).

Alguns resultados sugerem que as proteínas UBP (*U-rich-RNA-binding protein*), um grupo de pequenas proteínas que possuem um domínio RRM único, possam regular a estabilidade de alguns mRNAs em *T. cruzi* incluindo o mRNA de mucina (D'Orso *et al.*, 2003). Essas proteínas, denominadas UBP1, UBP2 e RBP3, se ligam a um número aparentemente limitado de mRNAs controlando sua abundância (D'Orso *et al.*, 2003). Em *T. brucei*, o cenário parece o mesmo em relação as UBPs: a super-expressão de UBP2 inibi o crescimento tanto nas formas sanguícolas quanto nas procíclicas com um aumento nos níveis de vários mRNAs (Hartmann *et al.*, 2007). Quando as proteínas UBP1 e 2 foram simultaneamente reprimidas por RNAi, os níveis gerais de proteína diminuíram de 10 a 20 vezes e o crescimento do parasito também foi inibido (Hartmann *et al.*, 2007).

HSP70 de Tripanossomatídeos

O locus de *HSP70* em *T. brucei* apresenta 5 cópias arranjadas em um tandem (genes 2 a 6) e uma cópia separada (gene 1), a 5' do tandem, que se encontra a alguns quilobases de distância (Glass *et al.*, 1986). Na ocasião dessa descoberta, foi sugerido que o gene 1 poderia ser um pseudogene, uma vez que sua UTR 3' era diferente das demais do tandem. Porém, estudos subsequentes indicaram que esta cópia era transcricionalmente ativa, e que seus níveis de mRNA não eram alterados durante o choque térmico, passando a se chamar *HSP70* cognata (Lee *et al.*, 1990). Em *L. major*, 4 genes de *HSP70* também foram encontrados em um arranjo de tandem e uma quinta cópia em outro locus mas no mesmo cromossomo (Lee *et al.*, 1988). As análises de sequência indicam que os cinco genes devem ser idênticos.

Em *T. cruzi*, os genes de *HSP70* também foram descritos com organização em tandem possuindo cerca de 10 cópias (Requena *et al.*, 1988). Essas cópias apresentam 90% de conservação nas regiões intergênicas e 95% nas regiões codificantes (Requena *et al.*, 1988 e 1992). Entretanto o número de genes de *HSP70* identificados subiu para 21 após sequenciamento da maior parte do genoma do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005). As proteínas são sintetizadas constitutivamente, e um único mRNA de 2,4 Kb é detectado a 29°C (de Carvalho *et al.*, 1990). Foi verificado que essas diferentes cópias codificam 8 isoformas, das quais 5 são induzidas pelo calor (Giambiagi-DeMarval *et al.*, 1996). Após incubação das células a 37°C por 3 horas, verifica-se um aumento de 4 a 5 vezes nos níveis da proteína e um aumento de cerca de 2 vezes nos níveis do mRNA (Giambiagi-DeMarval *et al.*, 1996). Quando a síntese de RNA é inibida por actinomicina D a indução de HSP70 é ainda mantida, indicando a presença de um estoque de mRNA de HSP70 na célula (de Carvalho *et al.*, 1990). Logo, a diferença observada entre o aumento da síntese da proteína e o aumento dos níveis do mRNA correspondente sugere um componente traducional no controle da expressão gênica de HSP70 em *T. cruzi*. Estes resultados sugerem a presença de elementos de resposta ao choque térmico no mRNA de HSP70. Foram determinados, ainda, os sítios de processamento dos mRNAs de HSP70 em *T. cruzi*: para o *trans-splicing* foram encontrados dos sítios alternativos e para a poliadenilação três sítios alternativos (Rodrigues 2004).

2. Objetivos

Em face da importância da compreensão dos mecanismos de controle da expressão gênica do *T. cruzi* para um melhor entendimento de sua biologia e, sabendo-se que, apesar dos muitos esforços, ainda é escassa a literatura que trata desta questão nesse organismo, o objetivo geral desta tese é estudar os mecanismos de controle da expressão gênica de *hsp70* em *T. cruzi*. Os objetivos específicos são:

1. Investigar a participação de regulação de meia-vida e tradução do mRNA de HSP70 durante o choque térmico.
2. Investigar a presença dos elementos de resposta a choque térmico presentes no mRNA de HSP70.

3. Materiais e Métodos

3.1. Microrganismos utilizados

Cepa de *Escherichia coli*

- DH5F1Q (Hanahan 1983) - *supE44 lac* U169 (Δ 80*lacZ* Δ 15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Clone de *Trypanosoma cruzi*

- Clone CL Brener (Brener e Chiari 1963)

3.2. Meios de cultura

- LIT (Infusão de fígado-tripticase)

| | |
|---|--------|
| NaCl | 75 mM |
| KCl | 5,4 mM |
| Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O) | 62 mM |
| D-glucose | 0,2% |
| Bacto-triptona | 0,5% |
| Infusão de fígado | 0,5% |

pH ajustado para 7,2 com NaOH 1N.

- Meio LB (Luria Bertani)

| | |
|---------------------|-------|
| Bacto-triptona | 1,0% |
| Extrato de levedura | 0,5% |
| NaCl | 86 mM |

- Meio LB-agar

| | |
|---------|------|
| Meio LB | |
| Agar | 1,5% |

O pH ajustado para 7,0 com NaOH 5N.

Todos os meios de cultura recém-preparados eram esterilizados em autoclave a 120° C por 20 minutos. Os valores expressos % se referem à relação em percentagem entre o peso do soluto e o volume da solução (p/v).

3.3. Soluções utilizadas

- TE

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 10 mM |
| EDTA pH 8,0 | 1 mM |

- TE -4 (TR)

| | |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 10 mM |
| EDTA pH 8,0 | 0,1 mM |

- TBE

| | |
|-------------|-------|
| Tris-borato | 90 mM |
| EDTA pH 8,0 | 1 mM |

- TNE

| | |
|----------------|--------|
| Tris-Cl pH 8,0 | 0,1 M |
| NaCl | 1 M |
| EDTA | 0,01 M |

- PBS (Tampão Salina-Fosfato)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| Glicose | 5,5 mM |

pH ajustado para 7,5

- Tampão MOPS

| | |
|------------------|-------|
| MOPS pH7,5 | 20 mM |
| Acetato de sódio | 5 mM |
| EDTA | 1 mM |

- Solução de Denhardt

| | |
|---|-----------|
| Ficoll 400 | 1% (p/v) |
| Polivinilpirrolidona | 1 % (p/v) |
| Albumina sérica bovina (BSA) (Fração V) | 1 % (p/v) |

- SSC 20x

| | |
|------------------|-------|
| Citrato de sódio | 0,3 M |
| NaCl | 3 M |

Com o pH ajustado para 7,2 com NaOH

- Solução de lavagem

| | |
|-----|-------|
| SSC | 0,1 x |
| SDS | 1 % |

- Solução de pré-hibridização

| | |
|---|------------|
| Formamida | 50 % (v/v) |
| DNA de esperma de salmão | 100 µg/mL |
| SSC | 5x |
| Solução de Denhardt | 5x |
| Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 | 50 mM |

- Tampão de amostra de RNA (eletroforese desnaturante) 6x

| | |
|----------------------|------------|
| Formamida deionizada | 50 % (v/v) |
| Formaldeído | 6 % (v/v) |
| MOPS 1x | 44 % (v/v) |

| | |
|--------------------|--------------|
| Azul de bromofenol | 0,025% (p/v) |
| Xileno-cianol | 0,025% (p/v) |

- GET

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-HCl pH 8,0 | 25 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Glicose | 50 mM |

- Tampão de Amostra de DNA para gel de agarose 6x

| | |
|--------------------|--------------|
| Azul de bromofenol | 0,025% (p/v) |
| Xileno-cianol | 0,025% (p/v) |
| Glicerol | 30% (v/v) |

- ZFM (Zimmerman Fusion Media)

| | |
|----------------------------------|-------|
| NaCl | 132mM |
| KCl | 8mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5mM |
| Acetato de Mg | 0,5mM |
| CaOAc | 90μM |

pH ajustado para 7,0

- Solução de lise

| | |
|---------------|------|
| Hepes | 20mM |
| KCl | 50mM |
| Acetato de Mg | 3mM |
| Glicerol | 5% |

3.4. Indução de competência de *Escherichia coli*

Um mililitro de cultura da cepa de *E. coli* DH5 α F'IQ, crescida em 5mL de meio LB por 16 horas a 37C, sob agitação, era inoculado em 50 mL de meio LB e mantido a 37C sob agitação. Após a cultura atingir a fase exponencial com uma densidade óptica (DO - 600nm) de aproximadamente 0,6, a cultura era centrifugada a 1.000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era descartado e o sedimento celular era ressuspenso em 25 mL de solução de CaCl₂ 50 mM a 4°C. A suspensão era incubada em gelo por 30 minutos, seguida de centrifugação a 1.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O novo sedimento era ressuspenso em 5 mL de CaCl₂ 50 mM gelado e incubado no gelo por 1 hora. Adicionava-se glicerol para concentração final de 20% seguido de homogeneização. A suspensão de células competentes era distribuída em alíquotas de 200 μ L em tubos de 1,5 mL e armazenada a -70°C. (Sambrook e Russel 2001 com modificações).

3.5. Transformação bacteriana

As suspensões de bactérias *E. coli* competentes eram transformadas segundo o método de choque térmico. Aproximadamente 50 ng de DNA eram adicionados a uma alíquota de 200 μ L de bactérias competentes. A suspensão era incubada em gelo por 30 minutos, a 42°C por 90 segundos, e novamente em gelo por 2 minutos. Em seguida eram adicionados 800 μ L de meio LB à amostra, que era incubada a 37°C por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas de 50 e 200 μ L eram espalhadas em placas de *Petri* contendo LB-agar suplementado com ampicilina 50 μ g/ml. Essas placas eram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. (Sambrook e Russel 2001 com modificações).

3.6. Cultivo de *T. cruzi*

Formas epimastigotas do clone CL Brenner (Brenner e Chiari 1963) eram mantidas em meio LIT acrescido de 10% de soro fetal bovino, 0,025 mg/mL de hemina e o

antibiótico penicilina a 100 U/mL, e incubados a 29°C. A cultura era mantida sempre em fase log de crescimento, por meio de repiques com densidade populacional inicial fixada em 10^7 células por mL.

3.7. Extração de ácidos nucleicos

Extração de DNA de *T. cruzi*

O DNA total era extraído de culturas em fase estacionária contendo cerca de $2,5 \times 10^8$ células totais (Sambrook, e Russel, 2001 com modificações). Essas culturas eram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos a 3.500 x g em centrífuga clínica e lavadas com 30 mL de tampão PBS 1x pelo menos três vezes. A seguir, as células eram ressuspensas em 420 µL de tampão TNE. Adicionava-se então SDS para uma concentração final de 1% e 400 µg de proteinase K, incubando-se a 37°C por 18 horas. O DNA era extraído ao se adicionar ao lisado um igual volume de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v) e centrifugando a mistura por 1 minuto em microcentrífuga a 12.000 x g. A fase aquosa, que continha o DNA, era transferida para outro tubo e estes passos eram repetidos até o desaparecimento da interface proteica. O DNA era precipitado desta solução adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA precipitado era sedimentado por centrifugação por 15 minutos em microcentrífuga a 12.000 x g. O sedimento era lavado com etanol 70% e posteriormente o DNA era suspenso em 100-500 µL de TE-4 (concentração final de aproximadamente 1-2 µg /mL) e os tubos armazenados a 4° C.

Extração de RNA de *T. cruzi*

O RNA total de formas epimastigotas do clone CL-Brener era extraído utilizando o kit *RNeasy Mini-kit* (Qiagen®) conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações. Aproximadamente 2×10^8 células de cultura eram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos a 4° C e lavadas com 10 mL de PBS 1x gelado. As células eram novamente centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos a 4° C e o precipitado celular era

descolado do fundo do tubo e suspenso em 600 µL da solução de lise RLT (594 µL da solução RLT e 6 µL de 2-mercaptoetanol). O lisado de células era agitado em vortex e homogeneizado em 10 ciclos de passagem em seringa com agulha 20 Gauge (0,9 mm), em seguida era agitado em vortex novamente e era adicionado 600 µL de uma solução 70 % de etanol. O material era transferido para a coluna de purificação do kit e submetido à centrifugação a 8.000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Em seguida, 700 µL da solução RW1 eram adicionados à coluna e o material era novamente centrifugado a 8.000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. A coluna era lavada 2x com 500 µL da solução RPE e ao término da lavagem eram adicionados 50 µL de água livre de RNase à membrana da coluna. A coluna era centrifugada a 8.000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente e o RNA total eluído era dosado em espectrofotômetro a 260 nm conforme item 3.12. A integridade do RNA total era analisada por eletroforese desnaturante de RNA em gel de agarose (item 3.14) e as amostras eram armazenadas em alíquotas em N₂ líquido.

Extração de DNA plasmideal

As bactérias transformadas com plasmídeos de interesse eram cultivadas em 2 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina por 16 horas sob agitação a 37°C. As células eram posteriormente sedimentadas por centrifugação a 12.000 x g em microcentrífuga por 1 minuto. O sedimento de células era ressuspenso em 100 µL da solução GET, seguido da adição de 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 N e SDS 1%. Adicionava-se em seguida 150 µL de acetato de potássio 3M pH 4,8 e depois 150 µL de clorofórmio à solução e misturava-se por inversão. O material era então centrifugado por 3 minutos a 12.000 g em microcentrífuga e a fase aquosa transferida para um tubo novo. O DNA plasmideal 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 em microcentrífuga a 12.000 x g em microcentrífuga e ressuspenso em 20 a 30 µL de TE (Sambrook e Russel 2001 com modificações).

3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Na reação de PCR eram utilizados 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* (clone CL Brenner), 1 μ M de cada oligonucleotídeo senso e anti-senso, 200 μ M de cada um dos dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de PCR (Invitrogen™, Carlsbad, CA, U.S.A.) na concentração de 1x e 1,0 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen™) em um volume de reação de 50 μ L. A reação ocorria em aparelho termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research, Inc., Watertown, MA, U.S.A.) programado de acordo com cada experimento descrito a seguir.

3.9. Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT)

A síntese da primeira fita do cDNA era realizada utilizando 5 μ g de RNA total de células epimastigotas do clone de CL Brenner, 10mM de cada desoxiribonucleotídeo, 250 ng de *random primer* e água livre de RNases para um volume de 14 μ L. A mistura era incubada a 65°C por 10 minutos para desnaturação do RNA. Em seguida eram adicionados DTT para concentração final de 0,1 M, o tampão *First Strand Buffer* para concentração final de 1x (Invitrogen™) e a mistura de reação era incubada a 25°C por 2 minutos. Em seguida, era adicionado 200 U da enzima Super-Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) e a reação era incubada a 37°C por 50 minutos e 75°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

3.10. Oligonucleotídeos

| Nome | Sequência 5' - 3' | Sítio de restrição | Uso |
|--------------|--|-----------------------|--|
| 70-1 | GGTGGAGGAAGTGGACT G | x | Amplificação da região intergênica de <i>HSP70</i> |
| 70-2 | GGATGGAAGCTTATGGCT CCCTCGTACGTC | x | Amplificação da região intergênica de <i>HSP70</i> |
| 18S.1 | GGATCTGGTACCCACCAG TTTCCTTGCGGG | Kpn I | Amplificação do promotor ribossomal 18S |
| 18S.2 | GGATCCTCGAGATCCACA CGGCGCTTTGAC | Xho I | Amplificação do promotor ribossomal 18S |
| 5UTR.1 | GGATCCTCGAGCTGCTGC CGCCTGTGTGC | Xho I | Amplificação da UTR 5' e da UTR 5' deletada de <i>HSP70</i> |
| 5UTR.2 | GGATGGAAGCTTTTCTT CTTCTTTCCTGCTG | Hind III | Amplificação da UTR 5' e 3' de <i>HSP70</i> |
| 5UTR.3 | GGATGGAAGCTTGATAAC TCT CGACCTTGATTG | Hind III | Amplificação da UTR 5' deletada de <i>HSP70</i> |
| 3UTR.1 | GATGGTCTAGAGAGCGC ATCCCTGAAGATG | Xba I | Amplificação da UTR 3' de <i>HSP70</i> e 3UTR70 |
| 3UTR.4 | GATGGTCTAGATTCCCTC TCCATTATTATTA | Xba I | Amplificação da UTR 3' deletada de <i>HSP70</i> |
| 3UTR70 | GCAATGACAGTACAAATA ACA ACCG | x | Amplificação da UTR 3' completa de <i>HSP70</i> e de região rica em AU |
| 3UTR70ΔAREas | GTGATGGCTGCTGGGTTT GTC | x | Amplificação da UTR 3' de <i>HSP70</i> sem a região rica em AU |
| 3UTR70ΔAREs | GACAAACCCAGCAGCCA TCAC | x | Amplificação da região rica em AU |
| Enolase F | AACGGCCATTGAGAAGA AGGC | x | Controle endógeno qRT-PCR |
| Enolase R | TGCAGAACTTGGATGCCT CGAT | x | Controle endógeno qRT-PCR |

* As sequências sublinhadas correspondem aos sítios de restrição

3.11. Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose

Os fragmentos de DNA eram purificados do gel de agarose com o kit QIAEX® II (Qiagen®). Após eletroforese, o gel era corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e os fragmentos de interesse eram separados do gel utilizando lâminas descartáveis. Em seguida, os fragmentos eram purificados utilizando o kit mencionado acima seguindo as recomendações do fabricante.

3.12. Quantificação de ácidos nucleicos

A concentração de ácidos nucleicos era determinada medindo-se a densidade óptica (D.O.) a 260 nm em aparelho espectrofotômetro modelo BioPhotometer (Eppendorf, Westbury, NY, U.S.A.). Uma unidade de D.O. (1 D.O.) equivale a 50 µg/mL de DNA e a 40 µg/mL de RNA.

3.13. Digestão de DNA plasmideal e produtos de PCR com enzimas de restrição

Os plasmídeos e produtos de PCR eram digeridos com enzimas de restrição adequadas num volume final de 50 µL e utilizando-se a proporção de 2 U de enzima para cada µg de DNA. O tampão específico da enzima era diluído para concentração final de 1x e a reação enzimática transcorria de acordo com as especificações dos fabricantes, tipicamente durante 2 horas a 37°C.

3.14. Eletroforese

Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os géis de agarose eram feitos em concentrações que variavam de 0,8 a 2,0% em tampão TBE 1x. As amostras de DNA eram diluídas em tampão de amostra e aplicadas nos poços formados no gel, no pólo negativo. As condições de eletroforese eram 3-4 V/cm do gel. Após a eletroforese, os géis eram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta (Sambrook e Russel 2001 com modificações).

Eletroforese de RNA em gel de agarose

Para as condições desnaturantes da eletroforese de RNA, formaldeído era adicionado na concentração final de 6% (v/v) à solução contendo 1,2 µg de agarose, 10 mL de tampão MOPS 10x pH 7,5 e 73 mL de H₂O. A solução era vertida em cuba apropriada devidamente nivelada e o gel submerso em tampão de corrida MOPS 1x. As amostras eram preparadas adicionando-se 5 µg de RNA total a 9,7 µL de tampão de amostra de RNA, aquecendo-se por 10 minutos a 65°C e resfriando-se em gelo. A eletroforese era realizada à voltagem constante de 100V até que o corante azul de bromofenol chegasse a aproximadamente três cm do final do gel. O gel era então corado com solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em transiluminador de ultravioleta (Sambrook e Russel 2001 com modificações), ou submetido à transferência para filtro de nitrocelulose como descrito abaixo.

3.15. Transferência de RNA para membranas de nylon – northern blot

As preparações de RNA submetidas à eletroforese desnaturante em gel de agarose eram transferidas por capilaridade para membranas de nylon Hybond-N+ (GE

Healthcare Biosciences), utilizando-se a solução SSC 20x, por 18 horas à temperatura ambiente. Após a transferência o RNA era fixado por aquecimento a 80° C em forno próprio por 2 horas (Sambrook e Russel 2001).

3.16. Hibridização de ácidos nucleicos

Marcação de sonda de DNA

Parte da região codificante de *HSP70*, obtida por reação de PCR (item 3.8), e clonada em vetor pCR2.1 (Invitrogen™), era utilizada como sonda nos ensaios de hibridização. O vetor recombinante pCR2.1HSP70 era digerido com a enzima *EcoR* I para a liberação do inserto. Em seguida, o material digerido era separado através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O produto da digestão de 1000 pb era purificado do gel e quantificado em espectrofotômetro, conforme descrito nos itens 3.11 e 3.12, respectivamente. A marcação radioativa do inserto era realizada utilizando o kit *Random Primer DNA Labeling System* (Invitrogen™), segundo as recomendações do fabricante com modificações. Em tubos de 0,5 mL eram adicionados 0,2 mM de cada dNTP, 1x *first strand reaction buffer* e 250 ng de oligonucleotídeos randômicos. Em seguida, adicionava-se 50 µCi de [α -³²P]dCTP, 0,5 µg da amostra de DNA previamente desnaturada por aquecimento à 95° C por 10 minutos e 40 U do fragmento Klenow da DNA polimerase I (Invitrogen™). O volume final de reação era de 50 µL e os tubos eram mantidos a 37° C por 1 hora. A reação era interrompida com a adição de 150 µL de TE 1x. A sonda marcada radioativamente era purificada em coluna de gel filtração (G-50). A radioatividade incorporada era determinada por cintilação líquida em aparelho Modelo LS 6500 (Beckman Coulter, Inc.).

Reação de hibridização

A membrana, contendo os ácidos nucleicos transferidos do gel, era colocada em saco plástico, com a solução de pré-hibridização por 2 horas a 42° C. Após a pré-hibridização, adicionava-se SDS para uma concentração final de 0,1 % e a sonda

marcada radioativamente (5×10^6 cpm/ mL de solução de hibridização), previamente aquecida a 95°C por 5 minutos. A reação de hibridização era realizada a 42° C por 18 horas e, em seguida, a membrana era lavada (2 x) em solução de lavagem a 55° C por 15 minutos (Sambrook, e Russel, 2001). A membrana era mantida à temperatura ambiente sob papel de filtro 3MM para secagem e, em seguida, coberta com filme plástico. A membrana era exposta em tela *Storage Phosphor Screen* Modelo GP (GE Healthcare Biosciences) e os resultados digitalizados em aparelho *STORM™* Modelo 860 (GE Healthcare Biosciences). As imagens obtidas eram analisadas no software *ImageQuant™* (GE Healthcare Biosciences).

3.17. Determinação da meia-vida do mRNA de HSP70

O inibidor de transcrição actinomicina D - AMD (MERCK) foi adicionado, à concentração final de 10 µg/mL, em culturas de células epimastigotas de *T. cruzi* do clone CL Brenner em início da fase log de crescimento. Para os experimento com inibição da transcrição e tradução, cicloheximida - CHX (SIGMA) foi adicionada à concentração final de 20 µg/mL 30 minutos antes do tratamento com AMD. Estas culturas foram em seguida divididas em duas metades, uma permaneceu à incubação de 29°C e a outra sofreu o choque térmico a 37°C. Alíquotas de 10 mL contendo 2×10^8 células foram retiradas nos tempos de incubação: 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Cada alíquota foi lavada 2x em PBS 1x e submetida a extração de RNA total como descrito no item 3.7. Os RNAs totais obtidos foram quantificados por espectrofotometria (item 3.12) e tiveram sua qualidade avaliada por gel de agarose desnaturante. Os RNAs foram submetidos a northern blotting (itens 3.15 e 3.16) usando como sonda parte da região codificante de HSP70. A intensidade dos sinais de hibridização eram determinadas pela exposição dos filtros em cassetes PhosphorImager (GE Healthcare Biosciences) e digitalizados em scanner *STORM* Modelo 860 (GE Healthcare Biosciences). A imagens obtidas eram analisadas e quantificadas pelo software *ImageQuant™* (Molecular Dynamics).

3.18. Construção dos plasmídeos repórter

A região intergênica de *HSP70* que serviria de fonte para obtenção das sequências correspondentes as UTRs 5' e 3' dos mRNAs de *HSP70* foi obtida através de PCR usando como molde DNA genômico total de *T. cruzi* do clone CL Brener com os oligonucleotídeos 70.1 e 70.2 que anelam no início e no fim das regiões codificantes dos genes de *HSP70* (ver tabela no item 3.10). As condições de reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 60 segundos, 59°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O fragmento de PCR de 400 pb obtido foi purificado de gel, digerido com as enzimas *EcoR* I, *Hind* III e clonado nos sítios correspondentes do vetor pGEM-4z (Promega). O plasmídeo resultante foi denominado pIR70.

O gene repórter CAT foi obtido através de digestão do plasmídeo comercial pCAT 3 - Basic Vector (Promega) com as enzimas *Hind* III e *Xba* I. O produto da digestão foi purificado como descrito no item 3.11 e clonado no plasmídeo pBlueScript KS II (Stratagene), previamente digerido com as mesmas enzimas, a este plasmídeo foi dado o nome de pCAT. O promotor do RNA ribossomal 18S foi obtido através de PCR a partir do DNA genômico total de *T. cruzi* do clone CL Brener utilizando-se os oligonucleotídeos 18S.1 e 18S.2 (ver tabela no item 3.10), contendo sítios para as enzimas de restrição *Kpn* I e *Xho* I, respectivamente. As condições de reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, gerando um fragmento de 647 pb. O produto amplificado foi digerido com enzimas mencionadas, purificado como descrito no item 3.11 e então clonado no plasmídeo pCAT, previamente digerido com *Kpn* I e *Xho* I, denominado agora p18SCAT. O plasmídeo p18SCAT foi digerido com as enzimas *Xho* I e *Hind* III e nestes sítios foram clonadas as sequências contendo as regiões UTR 5' de *hsp70* ou do gene *rab7* de *T. cruzi*, dando origem aos plasmídeos p18S70CAT e p18SrabCAT, respectivamente. A sequência contendo a UTR 5' de *HSP70* foi obtida através de PCR a partir do plasmídeo pIR70, utilizando-se os oligonucleotídeos 5'UTR.1 e 5'UTR.2 (ver tabela no item 3.10), contendo os sítios de restrição para *Xho* I e *Hind* III, respectivamente (sequência sublinhada nos oligonucleotídeos). As condições de reação foram: desnaturação inicial

de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, gerando um fragmento de 150 pb. A sequência contendo a UTR 5' de *rab7* foi obtida a partir da digestão do plasmídeo prab7hygrab7 (Leal 1996), com as enzimas *Xho* I e *Hind* III.

Os plasmídeos p18S70CAT e p18SrabCAT foram, em seguida, digeridos com as enzimas *Xba* I e *Sac* I e nestes sítios foram clonadas as sequências contendo as regiões intergênicas de *HSP70* e UTR 3' de *rab7* para que fossem finalizados os quatro plasmídeos repórter. Os plasmídeos resultantes foram denominados p70CAT70, p70CATrab, prabCAT70 e prabCATrab. A sequência contendo a região intergênica de *HSP70* foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pIR70 utilizando-se os oligonucleotídeos 3'UTR.1 e 5'UTR.2 (ver tabela no item 3.10). As condições de reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C, gerando um fragmento de 400 pb. O fragmento foi purificado e clonado no vetor do kit pMOSBlue *Blunt Ended Cloning Kit* (Amersham). Em seguida, este plasmídeo foi digerido com as enzimas *Xba* I e *Sac* I, e o fragmento de 400 pb obtido foi novamente purificado e clonado nos plasmídeos repórter. A sequência contendo a UTR 3' de *rab7* foi obtida a partir de digestão do plasmídeo prab7hygrab7 com as enzimas *BamH* I e *Sac* II. O produto da digestão foi purificado como descrito no item 3.11. e clonado nos plasmídeos repórter mencionados acima.

Todos os fragmentos de DNA foram ligados com a enzima T4 DNA ligase; os fragmentos eram combinados num volume final de 20 µL contendo 2 µL de tampão de ligação 10x e 5 U da enzima. A reação era incubada a 14°C por 16 horas e uma alíquota de 10 µL era utilizada para a transformação bacteriana.

A posição e orientação de todos os fragmentos de DNA clonados nos plasmídeos descritos acima foram confirmadas por sequenciamento ao final de cada etapa de clonagem.

3.19. Ensaio repórter CAT por transfecção transiente

Transfecção Transiente de *T. cruzi*

Os plasmídeos repórter eram transfectados em células epimastigotas de *T. cruzi*, sempre em fase exponencial de crescimento ($1,5 - 2,5 \times 10^7$ células/mL). As células eram lavadas duas vezes com 20 mL de tampão ZFM e em seguida ressuspensas no mesmo tampão na concentração final de 5×10^8 células/mL. A suspensão de células era distribuída em cada cubeta de eletroporação em alíquotas de 400 μ L. Às células nas cubetas, eram adicionados 100 a 300 μ g de DNA de plasmídeo em 50 μ L de tampão ZFM. Após incubação por 10 minutos no gelo, as células eram transferidas para o eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) sob as seguintes condições: um pulso de 1,5 Kv, 50 μ F, 200 Ω e voltagem final de $\sim 1,4$ Kv. Após o pulso as células eram incubadas ainda dentro da cubeta à temperatura ambiente por cinco minutos, e transferidas para erlenmeyer contendo 10 mL de meio LIT. As células eram incubadas então a 29°C por 48 horas. No caso de experimento com choque térmico, após essas 48 horas a cultura era dividida em duas metades, uma metade permanecia a 29°C e a outra sofria o choque térmico a 37°C por quatro horas (Lu e Buck 1991 com modificações).

Ensaio CAT

Após o período de recuperação das células (48 horas), estas eram lavadas uma vez em tampão PBS e em seguida ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, EDTA 1 mM e DTT 1 mM). As células eram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, onde cada ciclo consistia de incubação por 3 minutos em nitrogênio líquido seguida de incubação pelo mesmo tempo a 37°C. As células eram centrifugadas a 12.000 x g em microcentrífuga e o sobrenadante era transferido para um novo tubo. O lisado celular era incubado a 65°C por 6 minutos e mais uma vez centrifugado a 12.000 x g em microcentrífuga. O sobrenadante era transferido para novo tubo. Para a reação enzimática era utilizado o kit *CAT enzyme Assay System* (Promega). Uma alíquota de 112 μ L do extrato era adicionada a 4 μ L de butiril-CoA e 4 μ L [14 C] cloranfenicol (25

Ci/mL; Amersham). A reação era incubada a 37°C por 16 horas e interrompida pela adição de 200 µL de xileno (Lu e Buck 1991. com modificações).

Cromatografia em camada fina

A mistura de reação contendo xileno, descrita na seção anterior, era misturada por agitação e centrifugada a 13.000 g por um minuto à temperatura ambiente. A fase orgânica resultante era transferida para um novo tubo. A esta fase orgânica eram adicionados 100 µL da solução TE, seguida de nova mistura por agitação e centrifugação a 13.000 g por um minuto à temperatura ambiente. A fase orgânica era novamente transferida para um novo tubo e esse processo era repetido mais uma vez. A fase orgânica final era evaporada em liofilizador *Concentrator 5301* (Eppendorf). O resíduo resultante era dissolvido em 20 µL de acetato de etila e as amostras analisadas em cromatografia de camada fina. As amostras eram aplicadas em placas de sílica em suporte de vidro (Merck 20x20 60254) a aproximadamente 2 cm da base da placa. A placa era acondicionada em tanque apropriado contendo 200 mL de clorofórmio/metanol 19:1 (v/v). Após o solvente atingir 75% do comprimento da placa, esta era seca e exposta à tela intensificadora do aparato de exposição *Phosphor Screen General Purpose* (*Molecular Dynamics*).

3.20. Quantificação dos mRNAs CAT por RT-PCR em Tempo Real

Após o choque térmico das culturas transfectadas de *T. cruzi* com os diferentes plasmídeos repórter, o RNA total era extraído conforme item 3.7, quantificado por espectrofotometria e tinha sua integridade avaliada por gel de agarose desnaturante (item 3.14). cDNAs de cada extração de RNA total eram sintetizadas conforme descrito no item 3.9. Os cDNAs eram amplificadas no ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*). As reações de amplificação eram feitas em placas de 96 poços em um volume final de 25µL que continha 2 µL do cDNA diluído 10x, 12,5 µL de 2x Power SYBR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 150 nM de cada oligonucleotídeo senso e anti-senso (tabela I). O programa de amplificação foi 55°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40

ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. A eficiência da reação de RT-PCR foi avaliada usando diluições seriadas de cada cDNA, e os dados da curva de desnaturação foram utilizados para se avaliar a especificidade do RT-PCR. Cada cDNA foi amplificado em triplicata, e uma amostra correspondente sem a enzima transcriptase reversa foi incluída como controle negativo de amplificação. Além disso, os níveis dos mRNAs CAT foram normalizados pelos níveis dos mRNAs de enolase. As variações dos níveis dos mRNAs CAT em resposta ao choque térmico eram calculadas usando a fórmula $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre o Ct (*threshold cycle*) encontrado para os mRNAs CAT a 37°C e o Ct dos mRNAs CAT a 29°C.

3.21. Reação de degradação *in vitro* de RNA

Obtenção dos clones

A UTR 3' completa do mRNA de HSP70 de 230 pb, a sequência com os primeiros 111 pb da UTR 3' que não contém a região rica em AU, e a sequência de 139 pb referentes a região rica em AU da UTR 3' foram amplificadas do clone da região intergênica pIR70 (item 3.18 - construção do plasmídeo repórter) utilizando os primers 3UTR70.1 + 3UTR70, 3UTR Δ AREas + 3UTR.1 e 3UTR70 + 3UTR70 Δ AREs, respectivamente. As condições de reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram purificados de gel e clonados em vetor pCR2.1 (Invitrogen™). Os respectivos clones foram denominados pTOPO-3UTR70, pTOPO-3UTR70 Δ ARE e pTOPO-ARE. Ao final, as clonagens foram verificadas por sequenciamento.

Transcrição *in vitro*

Para a transcrição *in vitro* e geração de moléculas de RNA para o ensaio de degradação, os vetores pTOPO-3UTR70 e pTOPO-3UTR70 Δ ARE foram linearizados por digestão com a enzima de restrição *Sac* I. Os produtos de digestão com tamanhos

esperados foram purificados de gel, quantificados em espectrofotômetro e submetidos à seguinte reação de transcrição *in vitro*: 400 ng de DNA molde, 5 mM de cada ribonucleotídeo, T3/T7 *transcription buffer* à concentração final de 1x, 0,01% de BSA e 50U de T7 RNA polimerase (Invitrogen™). A reação era incubada a 37°C por 1 hora. Ao final, era realizado a digestão dos moldes de DNA com a enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega) segundo recomendações do fabricante. Após a digestão do DNA molde, os transcritos eram purificados em coluna do kit *RNeasy Mini-kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, os transcritos eram quantificados em espectrofotômetro.

Obtenção do extrato proteico

Culturas de 4×10^8 células de culturas de epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, em início de fase *log* de crescimento, eram usadas para a preparação dos extratos proteicos. Essa cultura era inicialmente dividida em duas partes iguais contendo 2×10^8 células cada: uma permanecia a 29°C enquanto a outra sofria o choque térmico a 37°C (em banho maria) por 4 horas. Ao final desse período, as culturas eram lavadas 2 vezes em 10 mL de PBS 1x gelado e o pellet celular era ressuspensão em 88 µL da solução de lise acrescida de 2 µL de DTT 0,1 M e 10 µL do coquetel inibidor de protease (SIGMA-ALDRICH). A mistura era agitada em vortex e a lise ocorria em três ciclos de congelamento e descongelamento que consistia em: congelamento por 3 minutos e nitrogênio líquido, seguido de descongelamento por 3 minutos a 37°C. Ao término dos ciclos, o lisado era centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante era coletado e dosado através do método de Bradford (Sambrook e Russel 2001 com modificações). Os extratos proteicos eram usados imediatamente.

Reação de degradação *in vitro*

Cada reação de degradação consistia em 150 ng do transcrito *in vitro*, Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 10 µg de tRNA de levedura e 1 µg de extrato proteico (29°C ou 37°C) em um volume final de 11 µL. Para cada um dos dois transcritos (3UTR70 e 3UTR70ΔARE), 10 reações eram realizadas a partir de um

mesmo mix reacional, que continha todas as soluções para garantir iguais condições entre as amostras. Em 5 reações eram utilizados o extrato de 29°C e em outras 5 os extratos de 37°C. Cada reação era incubada a 37°C por diferentes tempos, a saber: 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Como controle negativo de degradação, duas reações para cada transcrito eram realizadas sem a presença de extrato por um período de 0 e 120 minutos. Após o tempo de incubação, as reações eram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para término da reação e armazenadas a -70°C.

Quantificação dos transcritos

A quantificação dos transcritos após a reação de degradação *in vitro* era realizada por RT-PCR em tempo real. Para tanto, cópias de cDNA de cada reação eram sintetizadas conforme descrito no item 3.9 a partir de toda a reação de degradação (11 µL). As amplificações das cópias de cDNA eram realizadas no ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*). As reações de amplificação eram feitas em placas de 96 poços em um volume final de 25 µL que continha 2µL do cDNA diluído 10x, 12,5 µL de 2x Power SYBR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 150 nM de cada primer senso e anti-senso (tabela I). O programa de amplificação foi 55°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 58°C por 1 minuto. A eficiência da reação de RT-PCR foi avaliada usando diluições seriadas de cada cDNA, e os dados da curva de desnaturação foram verificados para se avaliar a especificidade do RT-PCR. Cada cDNA foi amplificado em triplicata, e uma amostra correspondente sem a enzima transcriptase reversa foi incluída como controle negativo de amplificação. As quantidades dos transcritos presentes na reação de degradação foram determinadas por correspondência com uma curva padrão específica realizada para cada transcrito. Em cada ensaio, a curva padrão foi realizada com 4 diluições seriadas do cDNA de cada um dos transcritos (320, 80, 20 e 5 ng). Ao final da reação de PCR, os dados foram analisados usando o software 7500 *Sequence Detection* (*Applied Biosystems*). Para manter a consistência dos dados, a linha de base foi ajustada automaticamente pelo software usando os dados coletados entre os ciclos 3 a 15. A crescente intensidade de fluorescência do corante repórter (*reporter dye*) foi plotada contra o número de ciclos para gerar a curva padrão. A quantificação dos transcritos foi calculada pelo software

pela interpolação dos valores de Ct encontrados (*threshold cycle* - definido como o ciclo onde a intensidade de fluorescência cruza a linha de base) na curva padrão gerada.

3.22. Seqüenciamento de DNA

O DNA plasmideal foi sequenciado em sequenciador de DNA capilar MegaBACE 1000 de 96 capilares (*Molecular Dynamics e Amersham*). As reações eram 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 eram analisadas pelo software *Sequence Analyser v3.0* utilizando o Base Caller Cimarron 3 (*Amersham*).

4. Resultados

4.1. Determinação da meia-vida do mRNA de HSP70

Nós investigamos algumas das vias do metabolismo de RNAs para determinarmos se o mecanismo de modulação da estabilidade do mRNA faz parte do controle da expressão de HSP70. Foi descrito que os níveis do mRNA de HSP70 em *T. cruzi* aumentam cerca de duas vezes após o choque térmico (Engman *et al.*, 1989; de Carvalho *et al.*, 1990). O primeiro passo foi a determinação da meia-vida do mRNA de HSP70 antes e depois do choque térmico, para se verificar a contribuição da estabilização deste mensageiro na indução da proteína a 37°C. Culturas de epimastigotas, em início da fase logarítmica de crescimento, foram incubadas a 29°C ou 37°C na presença do agente intercalante AMD. Amostras de RNA total foram extraídas de alíquotas dessas culturas retiradas em intervalos de 30 minutos por um tempo total de 3 horas. As amostras de RNA foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante, transferidas para filtro de nitrocelulose, e hibridizadas com sonda correspondente à região codificante do gene de *HSP70*.

A figura 1A mostra um *northern blot* representativo dos três que foram realizados. É possível observar os níveis do mRNA de HSP70 decaindo a taxas diferentes a 29°C e 37°C. A coloração com brometo de etídeo dos rRNAs mostra a equivalência das massas de RNA total utilizadas nesse experimento. A figura 1B mostra a cinética de decaimento dos níveis de mRNA na ausência de transcrição. Curiosamente, um aumento inicial dos níveis de mRNA nos primeiros 30 minutos pode ser observado. As razões para esse aumento ainda não são totalmente conhecidas, mas estão de acordo com o observado em outros genes de tripanossomatídeos (Quijada *et al.*, 2002; Colasante *et al.*, 2007). Uma das proposições para esse efeito é a de que os pré-mRNAs continuam a ser processados em mRNAs maduros mesmo após a inibição da transcrição (Li *et al.*, 2006).

Para que o efeito do aumento dos níveis de mRNA de HSP70 nos primeiros 30 minutos não alterasse a correta avaliação de sua meia-vida, nós decidimos calcular essa medida após os 30 minutos iniciais. A 29°C, o mRNA de HSP70 apresenta uma meia-vida de 60 minutos (Fig. 1B, quadrados e linha azul). A 37°C, a meia-vida deste mRNA aumenta

para 120 minutos (Fig. 1B, triângulos e linha vermelha). Esse aumento de duas vezes na meia-vida após o choque térmico é compatível com o aumento da abundância anteriormente descrito (de Carvalho *et al.*, 1990). Esse resultado é consistente com um componente transcricional no controle da expressão de HSP70 muito pequeno ou mesmo inexistente, sendo a estabilização do mensageiro maduro provavelmente a responsável pela maior parte do incremento de sua abundância em duas vezes após o choque térmico.

Curiosamente, enquanto uma cinética exponencial de decaimento do mRNA de HSP70 ocorre a 29°C, a cinética de decaimento a 37°C apresenta uma curva bifásica. A primeira fase se estende até os 90 primeiros minutos após a adição do AMD, onde os níveis do mRNA permanecem essencialmente constantes, seguida da segunda fase durante a qual o mRNA é degradado com taxa aproximadamente igual ao mRNA a 29°C. Esse resultado é compatível com a hipótese de um fator regulatório de meia-vida curta que estabiliza os mRNAs de HSP70 a 37°C. À luz dessa hipótese, quando a quantidade deste fator diminui à níveis críticos mínimos, em função do tratamento com AMD, a estabilização dos mRNAs de HSP70 a 37°C é perdida e seus níveis voltam a decair a uma taxa comparável àquela dos mRNAs das células incubadas a 29°C.

Para verificar esta hipótese, e testar se a síntese proteica é necessária para conferir o efeito estabilizador, nós determinamos a meia-vida do mRNA a 29°C e 37°C na presença de AMD e de cicloheximida, um inibidor da tradução. Como pode ser observado na figura 2 A, o tratamento com a cicloheximida 30 minutos antes do tratamento com AMD e do choque térmico aboliu o efeito protetor sobre o mRNA à 37°C. Na figura 2 B, é possível ver a cinética de decaimento dos níveis de mRNA com a ausência da transcrição e tradução. Em ambas as temperaturas (29°C quadrados e linhas azuis - 37°C triângulos e linhas vermelhas), a meia-vida do mensageiro é de 60 minutos com cinética de decaimento exponencial similar ao apresentado a 29°C quando foi usado apenas a AMD (Fig. 1 B). Concluímos que a síntese proteica é necessária para a estabilização do mRNA de HSP70 a 37°C.

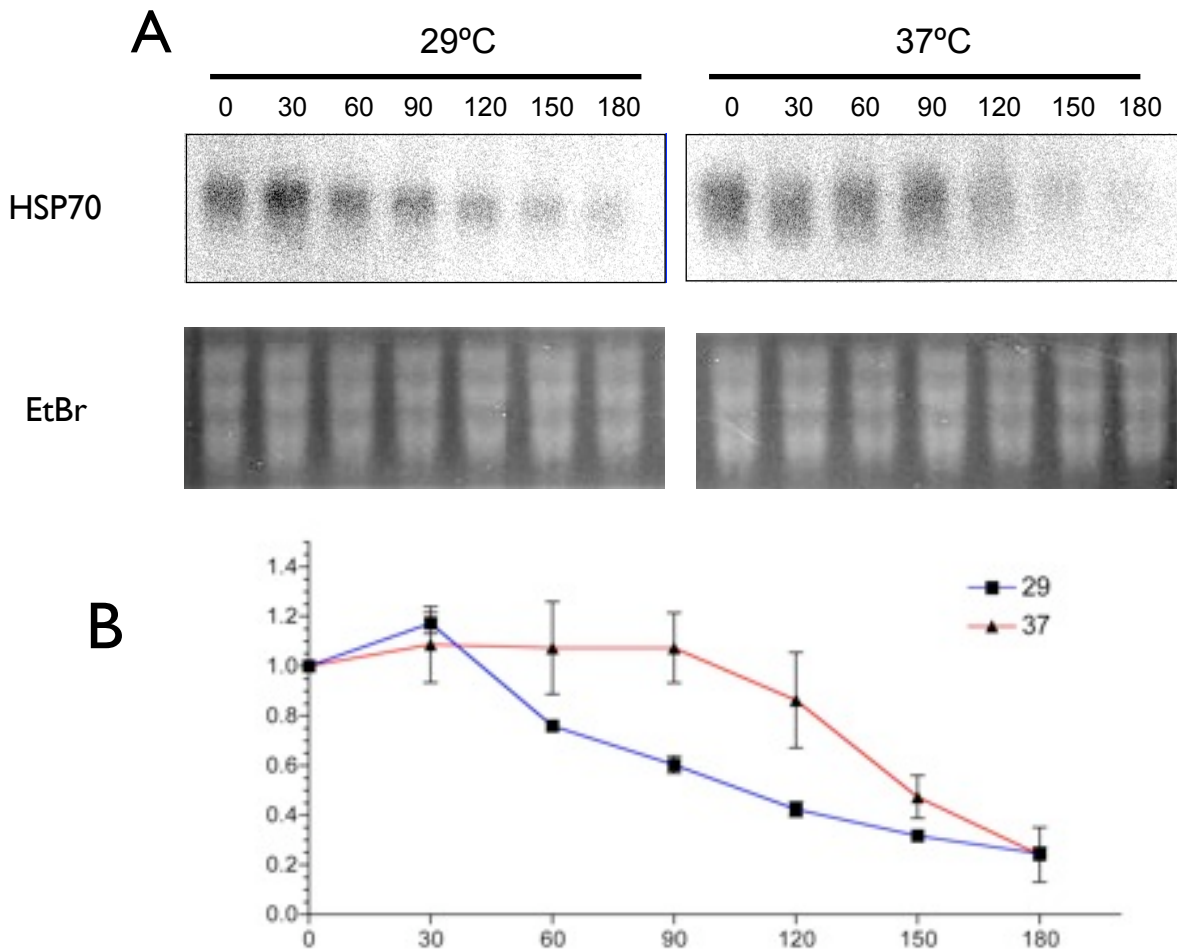


Figura 1. Determinação da meia-vida do mRNA endógeno de HSP70 a 29°C e a 37°C. Culturas de *T. cruzi* epimastigotas em início de fase log de crescimento foram incubadas com 10 µg/ml de actinomicina D (AMD) e mantidas a 29°C (no gráfico - linha azul) ou 37°C (no gráfico - linha vermelha) por 3 horas. Amostras destas culturas foram retiradas a 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a adição da droga e usadas para extração de RNA total. A, análises de northern *blot* foram realizadas com 5 µg de RNA total e como sonda utilizamos a região codificante de HSP70. Coloração com brometo de etídeo dos RNAs ribossomais foi usada como controle interno de massa. Os números acima de cada lane indicam o tempo em minutos após a adição da AMD. B, os níveis dos mRNA em cada ponto foram quantificados com o software *ImageQuant* (Applied-Biosystems). A intensidade do sinal de cada lane é mostrada como porcentagem em relação ao tempo 0 min (eixo y). Eixo x mostra o tempo de tratamento com AMD em minutos. As barras indicam o desvio padrão correspondem a dados de 3 experimentos independentes.

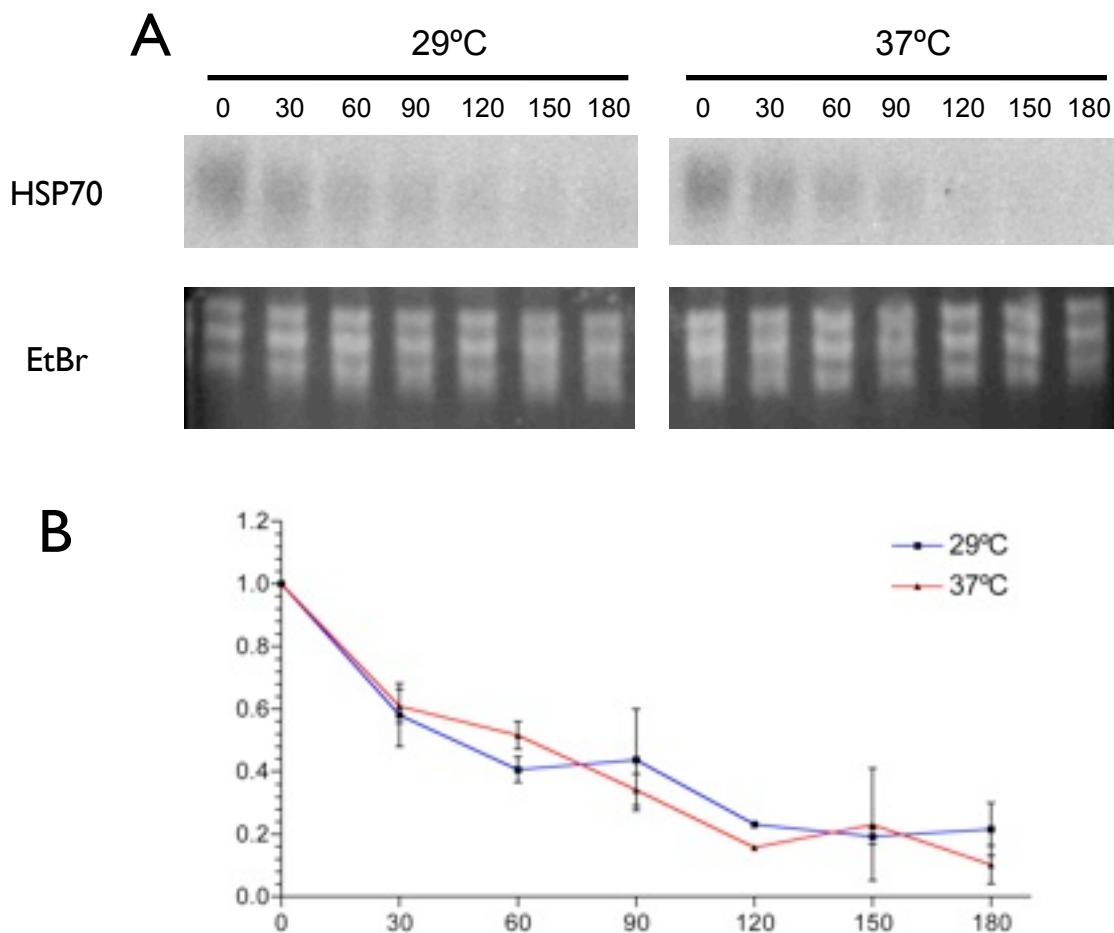


Figura 2. Determinação da meia-vida do mRNA endógeno de HSP70 a 29°C e a 37°C. Culturas de *T. cruzi* epimastigotas em início de fase log de crescimento foram incubadas por 30 minutos com 20 µg/ml de cicloheximida em seguida adicionou-se 10 µg/ml de actinomicina D (AMD). A cultura foi dividida em duas partes iguais sendo uma parte incubada a 29°C (no gráfico - linha azul) e a outra incubada a 37°C (no gráfico - linha vermelha) por 3 horas. Amostras destas culturas foram retiradas a 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a adição da droga e usadas para extração de RNA total. A, análises de northern blot foram realizadas com 5 µg de RNA total e como sonda utilizamos a região codificante de HSP70. Coloração com brometo de etídeo dos RNAs ribossomais foi usada como controle interno de massa. Os números acima de cada lane indicam o tempo em minutos após a adição da AMD. B, os níveis dos mRNA em cada ponto foram quantificados com o software *ImageQuant* (Applied-Biosystems). A intensidade do sinal de cada lane é mostrada como porcentagem em relação ao tempo 0 min (eixo y). Eixo x mostra o tempo de tratamento com AMD em minutos. As barras indicam o desvio padrão correspondem a dados de 3 experimentos independentes.

4.2. Identificação de elementos regulatórios presentes nas UTRs 3' e 5' do mRNA de HSP70

Com o objetivo de melhor compreender os mecanismos regulatórios da indução de HSP70, nós investigamos a presença de elementos de resposta ao choque térmico nas UTRs de seu mRNA. Para tanto, nós construímos uma série de plasmídeos repórter contendo o gene repórter CAT sob o controle do promotor do rRNA 18S, flanqueados por sequências que continham as regiões UTRs 5' e 3' de *HSP70* (Fig. 3). As sequências utilizadas para as UTRs 5' e 3', bem como seus respectivos sinais de processamento, foram previamente mapeadas e obtidas durante minha tese de mestrado (Fig. 4). A sequência que se estende do nucleotídeo -146 até -1 (numerando o primeiro nucleotídeo do códon de iniciação +1), que contém a UTR 5' e os sinais de processamento para trans-splicing, foi inserida a 5' do gene CAT (Fig. 3, retângulo vermelho 5'-70), e a região intergênica inteira, de 436 nucleotídeos, foi inserida a 3' do gene CAT (Fig. 3, retângulo vermelho 3'-70). Como controles negativos que não respondem ao choque térmico, utilizamos sequências que continham as UTRs 5' e 3' e os sinais de processamento do mRNA de TcRab7 (Fig. 3, retângulos laranja 5'-rab e 3'-rab). TcRab7 é uma proteína associada com os endossomos tardios e acredita-se que ela regule o tráfico dessas organelas no citoplasma (Feng *et al.*, 1995; Bucci *et al.*, 2000). Em *T. cruzi*, TcRab7 é um gene de cópia simples e seu mRNA de 1,7 kb mantém seus níveis estáveis mesmo durante transição de formas epimastigotas para formas metacíclicas (Leal *et al.*, 2000).

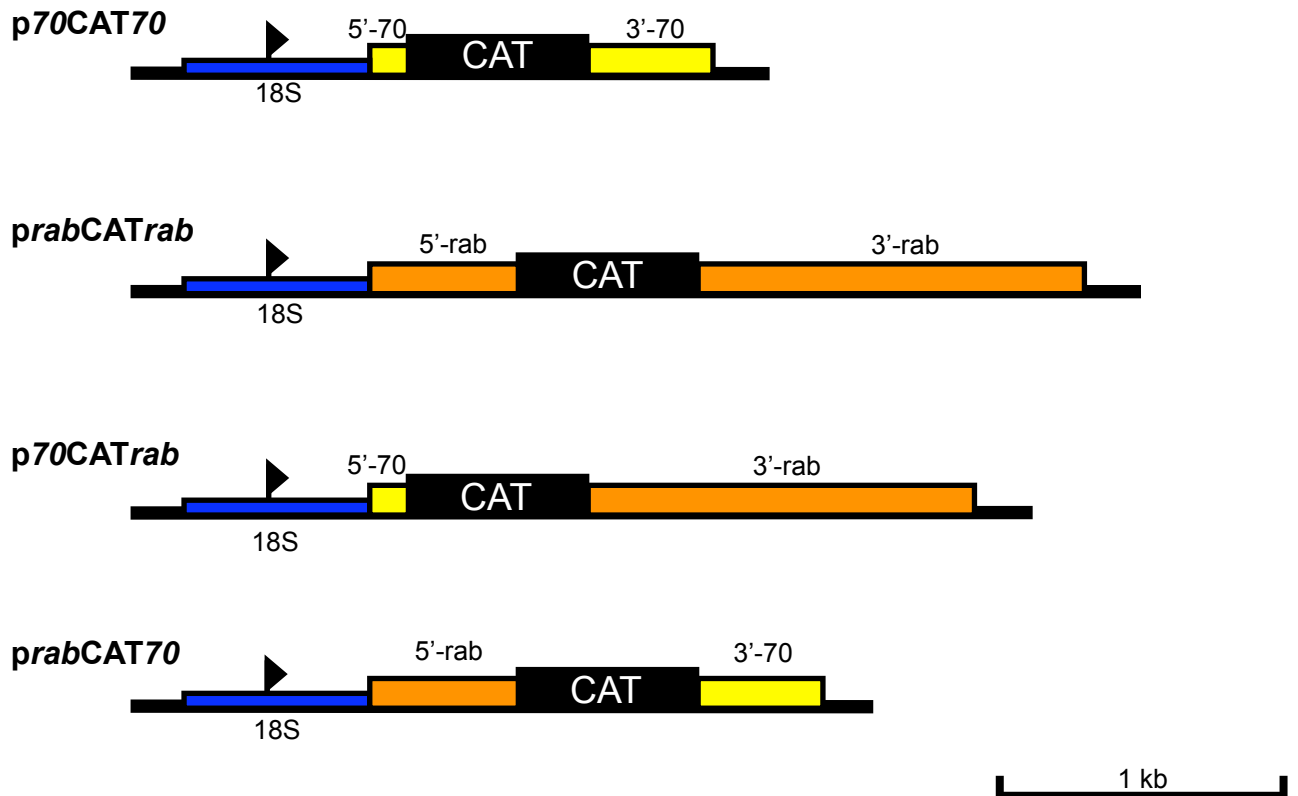


Figura 3. Representação esquemática dos plasmídeos repórter CAT. Os nomes de cada plasmídeo são mostrados a esquerda. Eles contêm o promotor do gene de rRNA 18S (retângulo azul), o gene repórter CAT (retângulo preto), as UTRs 5' e 3' do gene HSP70 (retângulos amarelos) e as UTRs 5' e 3' do gene *rab7* (retângulos laranja). A linha preta representa o vetor pBluescript II KS.

```

AAGTGGACTG Aagagcgcac ccctgaagat gttctcatgg cggcgtctgt tcgcgaacga 60
ataaccggtt ggttttctcc tttgtagagc gtagtggctt gcgacaaacc cagcagccat 120
cactattatt attatTTTTT tttttccctc tccattatta ttattattat tattgattat 180
tattattatt attattattg ttattattat tggttacggg tgttatttgt actgtcattg 240
cgatggcact tgtgctggtg agggcaccac ggttgccctc gccattggtg ttgctgactg 300
accgcctgtg tgcgtgtcct tgtactgccg gcttccttcc ctcctttctc ccccgctcct 360
ccgctctgtg ccacggagca cgccagagtc aatcaaggtc gagagttatc ttttaaaaaa 420
acagcaggaa agaagaagaa aATGACGTAC GAGGGAGCCA 460

```

Figura 4. Sequência da região intergênica de HSP70. Uma das regiões intergênicas de HSP70 foi clonada e sequenciada. A sequência entre o final da região codificante de um gene *upstream* (em maiúsculo com o códon de terminação em negrito e sublinhado) e o início da região codificante de um gene *downstream* (em maiúsculo com o códon de iniciação em negrito e sublinhado) é mostrada. Os sítios de poliadenilação estão em azul e os sítios aceptores de *trans*-splicing em vermelho.

Após a construção dos vetores, nós analisamos os efeitos do choque térmico sobre a expressão do gene repórter CAT em parasitas transientemente transfectados com os plasmídeos p70CAT70, p70CATrab, prabCAT70 e prabCATrab. As culturas de parasitas transfectadas com cada um dos plasmídeos repórter, após o período de recuperação da eletroporação de 48 horas, eram divididas em duas metades: uma das metades permanecia a 29°C e a outra sofria o choque térmico de 37°C por 4 horas. Assim, poderíamos determinar a atividade CAT relativa e a indução com o choque térmico proporcionada por cada plasmídeo. Ao final do período de incubação, o extrato proteico era preparado e a este eram adicionados os substratos da enzima CAT: butiril-CoA e cloranfenicol marcado radioativamente [¹⁴C]. Em seguida, uma análise de cromatografia por camada fina era realizada para se determinar a quantidade de cloranfenicol [¹⁴C] modificado pelos diferentes extratos. A figura 5 mostra uma cromatografia típica onde se pode observar a atividade CAT dos extratos de células transfectadas com os plasmídeos p70CAT70, prabCAT70, p70CATrab, e prabCATrab, a 29°C e 37°C. A atividade CAT da enzima de *E. coli* foi utilizada como padrão de comparação para assegurar que a atividade dos extratos estava na faixa linear de detecção. Estes resultados indicam que as células transfectadas com os plasmídeos p70CAT70, p70CATrab, prabCAT70 e prabCATrab são igualmente capazes de dar origem a mRNAs CAT funcionais.

A atividade do gene repórter CAT de cada cultura era então determinada em função da quantidade de cloranfenicol butirilado, e o grau de indução pelo choque térmico era dado pela razão atividade a 37°C/atividade a 29°C. A figura 6 mostra a atividade CAT relativa dos quatro plasmídeos repórter. Como esperado, a atividade CAT não é afetada pelo choque térmico quando o gene CAT é flanqueado pelas UTRs de TcRab7 (Fig. 6, prabCATrab). Por outro lado, a atividade do gene CAT, quando flanqueado pelas UTRs de *HSP70*, aumenta aproximadamente 3 vezes a 37°C (barras negras) quando comparada com a atividade a 29°C (barras brancas) (Fig. 6, p70CAT70). Alternativamente, quando o gene CAT é flanqueado pela UTR 5' de *HSP70* e pela UTR 3' de TcRab7, pode-se observar um pequeno aumento de aproximadamente 1,3 vezes na atividade CAT a 37°C (Fig. 6, p70CATrab). E quando o gene CAT é flanqueado pela UTR 5' de TcRab7 e a UTR 3' de *HSP70* um aumento de 1,7 vezes é observado com o choque térmico (Fig. 6, prabCAT70). Com esses resultados, nós concluímos que ambas

UTRs 5' e 3' do mRNA de HSP70 contêm elementos de resposta que atuam na regulação dependente de temperatura deste gene. Além disso, os efeitos de cada uma das UTRs parecem ser somatórios uma vez que nenhum deles sozinho foi capaz de induzir a enzima CAT aos mesmos níveis de quando utilizados juntos.

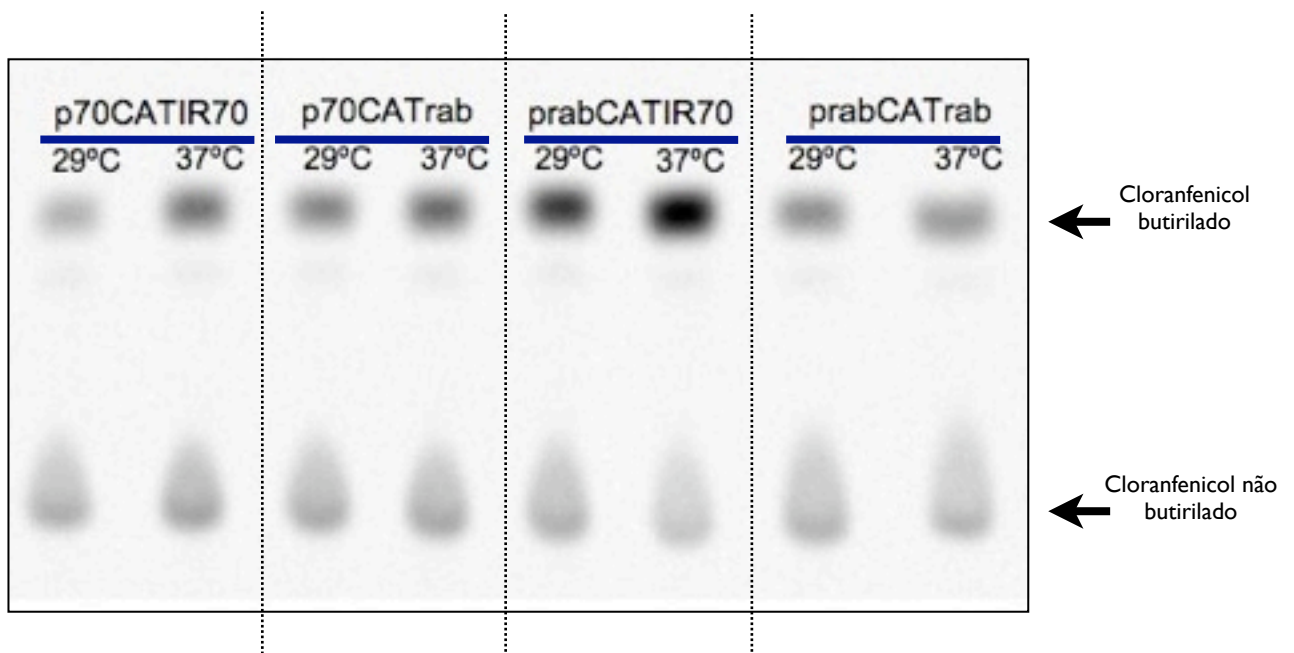


Figura 5. Análise do ensaio CAT por cromatografia de camada fina. Resultado típico de um ensaio CAT de células epimastigotas transfectadas transientemente com 100µg de cada construção. Após a eletroporação, as células foram recuperadas por 48 horas e incubadas a 29°C ou 37°C por 4 horas. Os extratos celulares foram obtidos e a reação enzimática CAT realizada adicionando-se butiril-CoA e [¹⁴C]chloranfenicol e incubando-se a 37°C por 1,5 horas. Após a incubação, o [¹⁴C]chloranfenicol butirilado (seta superior) bem como o não butirilado (seta inferior) são separados por cromatografia de camada fina. Os plasmídeos usados e as temperaturas de incubação são mostradas no topo da figura.

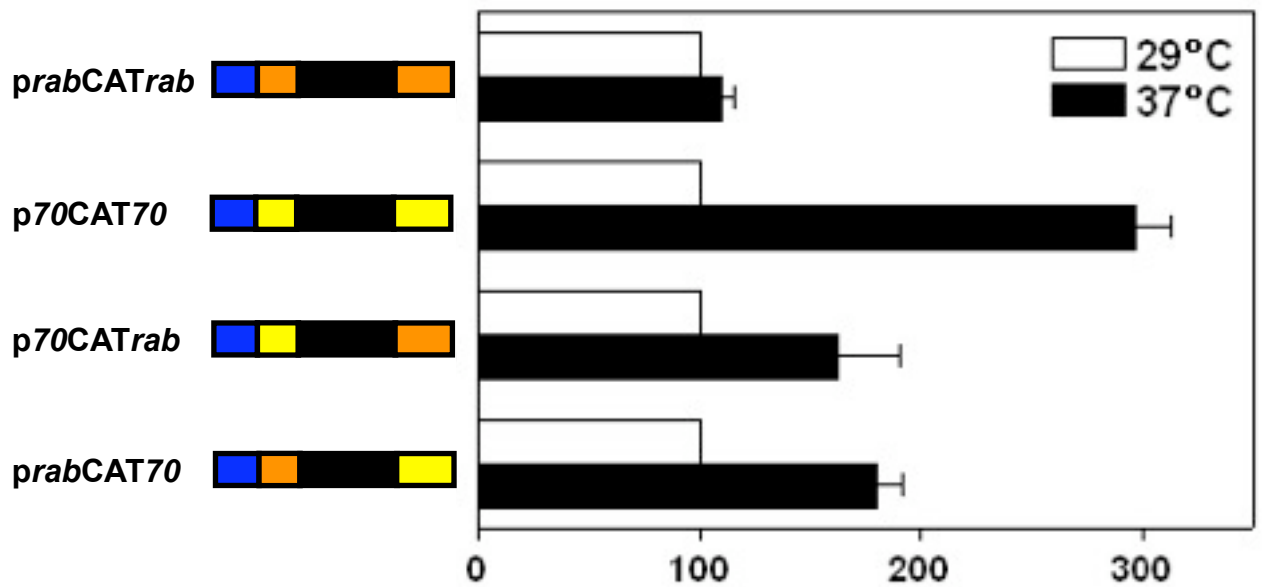


Figura 6. Atividade CAT relativa a 29°C e 37°C de epimastigotas transfectados transientemente com os quatro plasmídeos repórter. Os plasmídeos usados são mostrados a esquerda. As barras brancas e pretas correspondem a atividade CAT relativa a 29°C e 37°C respectivamente. A atividade CAT a 29°C foi arbitrariamente definida como 100%. As barras de erro indicam o desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

Uma vez que as duas UTRs do mRNA de HSP70 são capazes de conferir a resposta ao choque térmico, nós tentamos identificar quais eram os elementos de sequência responsáveis por essa resposta dentro das UTR. Para tanto, nós construímos um novo plasmídeo repórter que continha deleção de parte da sequência correspondente a UTR 5', se o elemento regulatório estivesse nessa região deletada, a resposta ao choque térmico seria perdida. A sequência correspondente a UTR 5' utilizada para construir o plasmídeo p70 Δ CATrab, se estendia do nucleotídeo -146 até -31, de modo a deletar os últimos 31 nucleotídeos da UTR 5'. A figura 7 apresenta uma representação esquemática do plasmídeo repórter com a deleção. Os ensaios repórter com o plasmídeo p70 Δ CATrab foram realizados em 2 vezes independentes e sob as mesmas condições dos experimentos anteriores. Como pode ser observado na figura 8 A, para esta construção não há indução dos níveis de CAT após o choque térmico. No entanto, não é possível concluir se a ausência de indução foi pela deleção de parte da UTR 5' ou se houve algum problema com o processamento do mRNA desta construção pois, como pode ser observado na figura 8 B, os níveis brutos da enzima CAT obtidos com esta nova construção foram muito baixos, pelo menos 25 vezes menores do que os níveis brutos encontrados para o plasmídeo 70CATrab com a UTR 5' completa.



Figura 7. Representação esquemática dos plasmídeo repórter CAT com deleção da UTR 5' de HSP70. O nome do plasmídeo é mostrado a esquerda. Ele contém o promotor do gene de rRNA 18S (retângulo azul), o gene repórter CAT (retângulo preto), a UTRs 5' de HSP70 (retângulo amarelo) do nucleotídeo -146 até -31 (a partir do início da tradução) e UTR 3' de *rab7* (retângulo laranja). A linha preta representa o vetor pBluescript II KS.

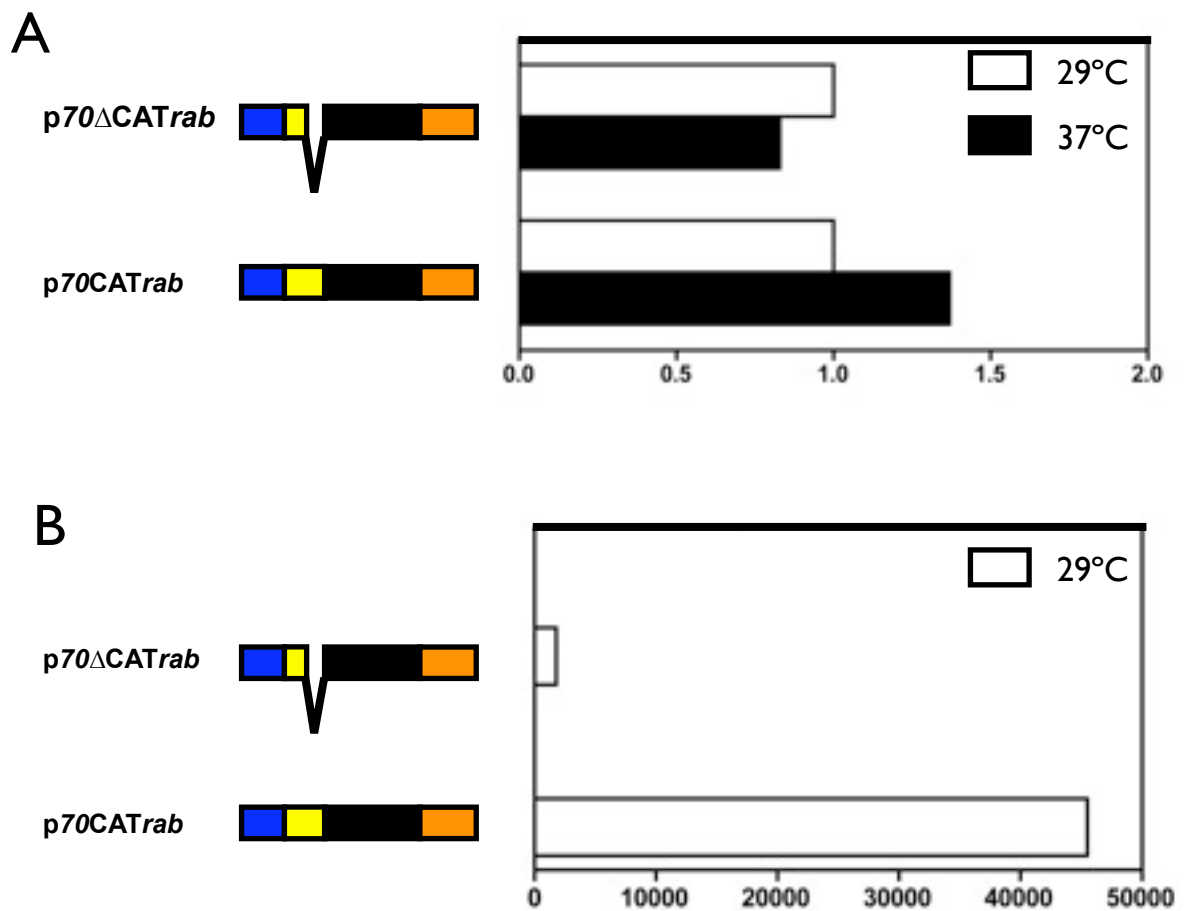


Figura 8. Atividade CAT de epimastigotas transfectados transientemente com o plasmídeo repórter contendo a deleção da UTR 5' de HSP70. Os plasmídeos usados são mostrados a esquerda. Em A, atividade CAT relativa a 29°C e 37°C do plasmídeo 70 Δ CATrab, e para efeito de comparação, foi incluída a atividade CAT a 29°C e 37°C do plasmídeo 70CATrab. As barras brancas e pretas correspondem a atividade CAT relativa a 29°C e 37 respectivamente. A atividade CAT a 29°C foi arbitrariamente definida como 100%. Em B, atividade CAT bruta a 29°C dos plasmídeos 70 Δ CATrab (acima no gráfico) e 70CATrab (abaixo no gráfico).

4.3. Os papéis das UTRs 5' e 3' na estabilidade e tradução dos mRNAs de HSP70

Uma vez tendo determinado que a estabilização dos mRNAs, mediada pelo aumento da sua meia-vida, é responsável pelo acúmulo de 2 vezes dos níveis do mRNA de HSP70 e, conseqüentemente, parte do mecanismo de controle da expressão de *HSP70* durante o choque térmico, nós investigamos se esse mecanismo é também responsável pela modulação da expressão do gene *CAT* nos diferentes plasmídeos repórter construídos. Para avaliar a possível contribuição de cada UTR na estabilização dos mRNAs *CAT*, nós determinamos os níveis dos mRNAs *CAT* nos parasitas transfectados através de RT-PCR em tempo real. Após o choque térmico dos parasitas transfectados (seguinto o mesmo protocolo de transfecção dos vetores e choque térmico dos parasitas utilizados para os ensaios da enzima *CAT*), nós extraímos o RNA total das culturas e avaliamos sua integridade em gel desnaturante de agarose. Em seguida, sintetizamos os cDNAs e realizamos a quantificação relativa dos mRNAs *CAT* utilizando uma sonda específica *TaqMan* (Applied Biosystems) desenhada contra sua sequência. Como controle endógeno, utilizamos o gene da enolase.

A figura 9 mostra os níveis relativos dos mRNAs *CAT* dos parasitas transientemente transfectados com os plasmídeos repórter *CAT*. Como esperado, os níveis dos mRNAs não aumentam com o choque térmico nas células transfectadas com o plasmídeo *prabCATrab*. Por outro lado, os níveis dos mRNAs *CAT* das células transfectadas com o plasmídeo *p70CAT70* aumentaram um pouco mais de duas vezes a 37°C. Este resultado indica que as UTRs de *HSP70* são capazes e suficientes para estabilizar o mRNA *CAT* a 37°C nos mesmos níveis do mRNA endógeno de *HSP70*. Para nossa surpresa, no entanto, as UTRs de *HSP70* quando separadas não são capazes de conferir a estabilização a 37°C, como pode ser verificado para os níveis dos mRNAs *CAT* das células transfectadas com os plasmídeos *p70CATrab* ou *prabCAT70* (fig. 9). Concluimos que ambas as UTRs 5' e 3' atuam cooperativamente na estabilização do mRNA de *HSP70* durante o choque térmico.

Entretanto, apesar de isoladamente não estabilizarem o mRNA *CAT*, cada UTR foi suficiente para aumentar a atividade da enzima *CAT* a 37°C (Figura 6, *p70CATrab* e *prabCAT70*), o que indica que ambas as UTRs são capazes de aumentar a eficiência de

tradução durante o choque térmico. Este aumento da eficiência de tradução é também observado quando ambas as UTRs estão juntas no mesmo plasmídeo, uma vez que a indução da enzima CAT é maior do que o aumento dos níveis do mRNA CAT (Figuras 6 e 9, p70CAT70). Baseado nestes resultados nós concluímos que as UTRs 5' e 3' de *HSP70* modulam tanto a estabilidade quanto a tradução do mRNA durante o choque térmico.

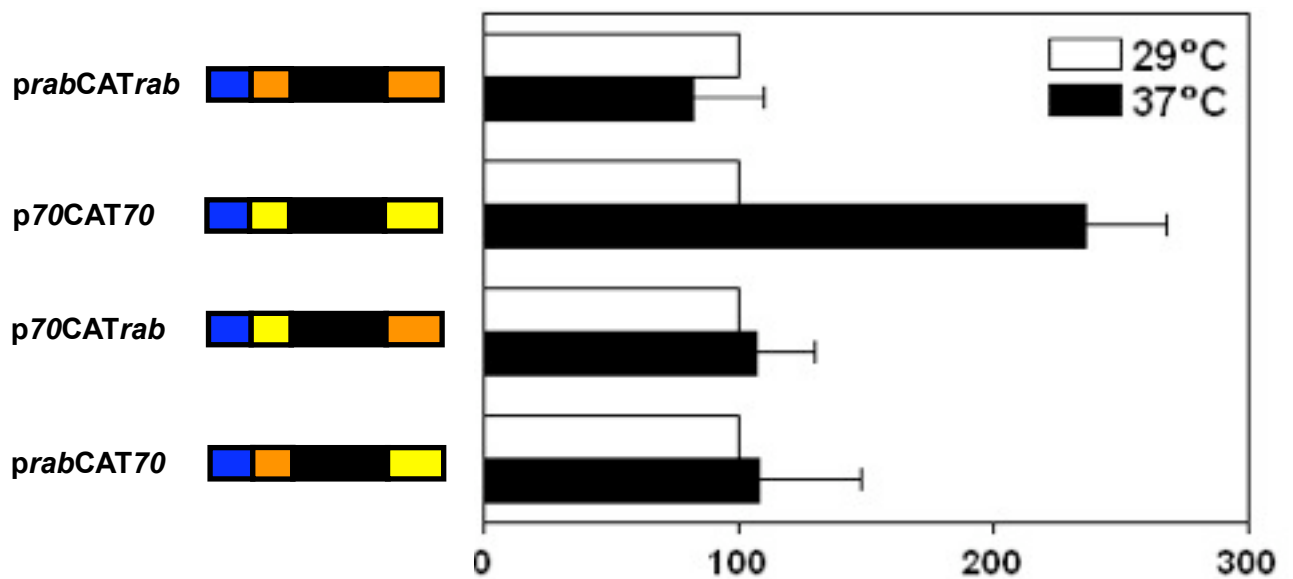


Figura 9. Níveis dos mRNAs CAT de epimastigotas transfectados transientemente a 29°C e 37°C. Os plasmídeos usados são mostrados a esquerda. Para cada plasmídeo repórter, os níveis de mRNA a 29°C e 37°C foram determinados por qRT-PCR a partir de RNA total como descrito em métodos. Barras brancas e pretas correspondem aos níveis relativos de mRNA a 29°C e 37°C respectivamente. Os níveis de mRNA a 29°C foram arbitrariamente definidos como 100%. As barras de erro indicam o desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

4.4. O papel da região rica em AU da UTR 3' de *HSP70* na estabilização do mRNA durante o choque térmico

Na quase totalidade das vezes, a estabilização dos mRNAs é conferida por elementos regulatórios presentes na UTR 3'. Esses elementos são frequentemente formados por sequências ricas nos nucleotídeos adenina e uridina que formam estruturas secundárias particulares. Desta forma, fatores proteicos reguladores podem se ligar a esses elementos estabilizando o mRNA em situações onde expressão aumentada do gene é necessária (Clayton 2002). No caso do mRNA de HSP70 de *T. cruzi*, nós determinamos que sua meia-vida é aumentada durante o choque térmico e que essa estabilização é dependente de síntese proteica (figuras 1 e 2, respectivamente). Além disso, durante o sequenciamento e mapeamento da UTR 3' para a construção dos plasmídeos repórter, nós detectamos uma sequência rica em AU que também está presente na UTR 3' de *HSP70* de *T. brucei* como pode ser observado na figura 10. É possível que esta sequência corresponda a um dos elementos regulatórios da UTR 3' (figura 4). Com o objetivo de verificar se essa sequência rica em AU é importante na estabilização do mRNA de HSP70, inicialmente foi feita a predição da estrutura secundária desta porção da UTR 3' a 29°C e a 37°C utilizando o software MFold (Zucker, 2003; <http://bioinfo.hku.hk/Pise/mfold.html>). Como pode ser observado na figura 11 A, a predição da estrutura secundária da sequência composta dos últimos 139 nucleotídeos da UTR 3' (referentes a região rica em AU) mostra que, nas duas temperaturas, uma estrutura em forma de grampo é formada por essa sequência. Em seguida, para excluirmos a possibilidade da estrutura gerada ser um artefato resultante da ausência do restante da UTR, logo fora de seu contexto, foi feita a predição de estrutura secundária de toda a UTR 3'. A figura 11 B mostra que a mesma estrutura em forma de grampo é formada tanto a 29°C quanto a 37°C.

```

T.cruzi 3'UTRHSP70      GAGCGCATCCCTGAAGATGTTCTCATG---GCGGCGTCTGTTTCGCGAACGAATAACCCGT 57
T.brucei 3'UTRHSP70    -----CTGCAGTCGTCTCACTGTCTACGGTGATGGTCCGCCGCCACAT-----T 44
                        *** ** **      **   *** *  ** ***  * **   *

T.cruzi 3'UTRHSP70      TGGTTTTCTCCTTTGTAGAGCGTAGTGG-TCTGCGACAAACCCAGCAGCCATCAC-TATT 115
T.brucei 3'UTRHSP70    TTCTCTTCGTCTCTGTAGCATTTAGGGAACCCCTCGTTGCGGGAAAGATGCGTGACACATT 104
* * *** ** *****   *** *  * **           * * * * * ***

T.cruzi 3'UTRHSP70      ATTATTATTTTTTTTTTCCCTCTCCATTATTATTATTATTATTATTGATTATTATTATT 175
T.brucei 3'UTRHSP70    GATGCTACTACTATTATTAATACTCTACTATTATTATTATTATTATT-ATTTTTATTTT- 162
* * * * * ** **   *** *  ***** * * * * * *

T.cruzi 3'UTRHSP70      ATTATTATTATTGTTATTATTATTGGTTACGGTTGTTATTGTTACTGTCA 225
T.brucei 3'UTRHSP70    -----

```

Figura 10. Alinhamento das UTRs 3' de *T. cruzi* e *T. brucei*. As seqüências de DNA correspondentes as UTRs 3' dos mRNAs de HSP70 foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W. Os asteriscos indicam os nucleotídeos idênticos. Os retângulos vermelhos destacam a região rica em AU presente nas UTRs de *T. cruzi* e *T. brucei*.

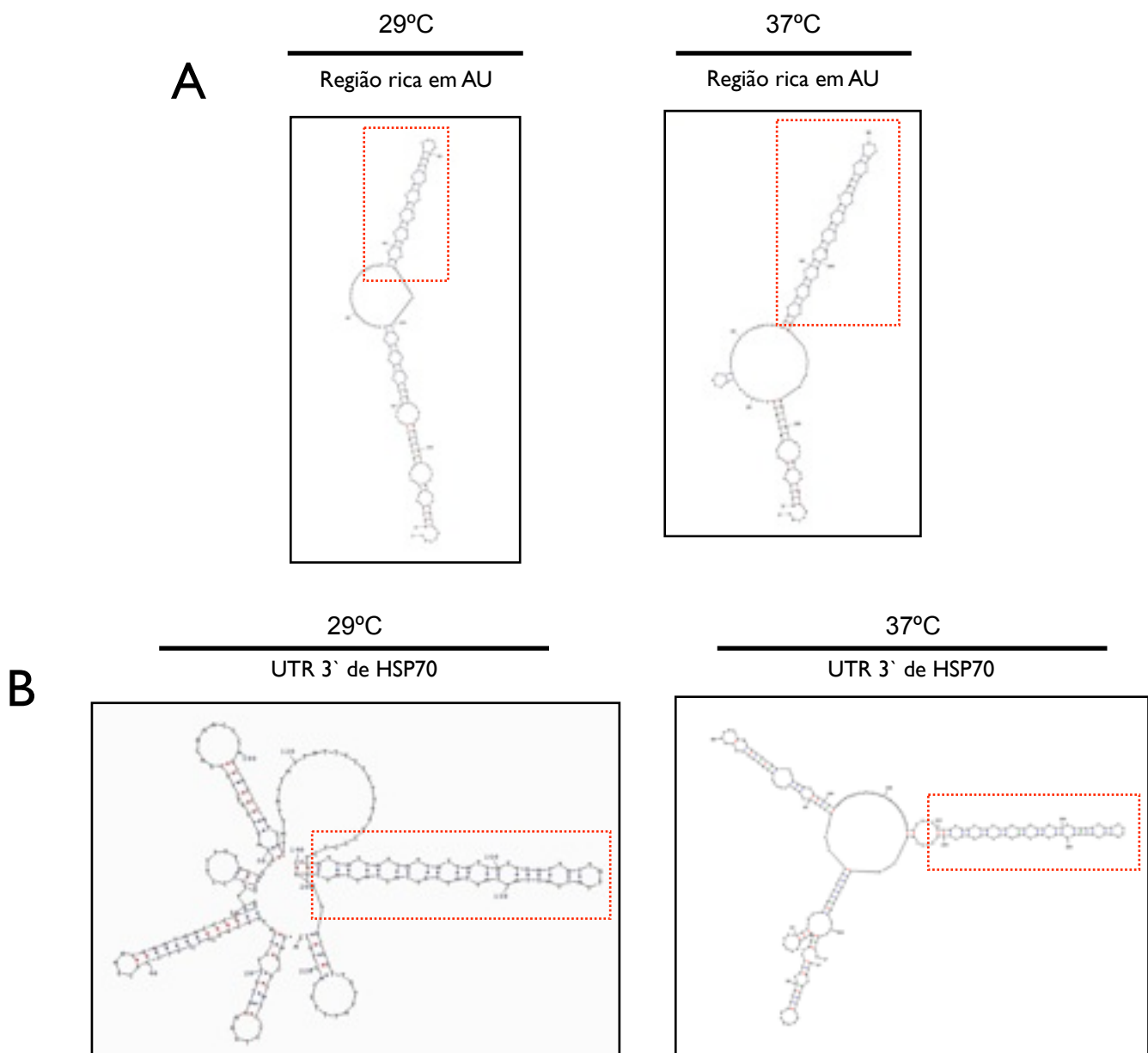


Figura 11. Predição, *in silico*, da estrutura secundária da região rica em AU da UTR 3' do mRNA de HSP70. A predição das estruturas secundárias foi realizada com o software Mfold utilizando os parâmetros pré-estabelecidos do programa variando apenas as temperaturas. Em A, estruturas secundárias prováveis da sequência correspondente a região rica em AU da UTR 3' do mRNA de HSP70 nas temperaturas 29°C e 37°C. Em B, estruturas secundárias prováveis da sequência correspondente a UTR 3' completa do mRNA de HSP70. Os retângulos em vermelho destacam a estrutura que se repete em todas as predições.

Com o objetivo de investigar a relevância funcional desta sequência e avaliar sua participação na estabilização do mRNA de HSP70 a 37°C, nós desenvolvemos um ensaio de degradação *in vitro* de RNA. A cinética de degradação de transcritos correspondentes a UTR 3' completa (que foi chamada 3UTR70), a UTR 3' sem a região rica em AU (3UTR70 Δ ARE) e a sequência rica em AU (ARE) foi avaliada neste ensaio (figura 12). As sequências mencionadas acima foram clonadas em vetor para transcrição *in vitro*, e os RNAs sintetizados foram incubados em tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos com os extratos proteicos de células tratadas a 29°C ou 37°C. Como controle negativo de degradação, cada um dos RNAs sintetizados foi incubado na ausência de extratos proteicos. Ao final do período de incubação os RNAs eram quantificados por RT-PCR em tempo real. Uma curva padrão de diluição dos cDNA feitos a partir de quantidades conhecidas de cada um dos RNAs foi utilizada para a quantificação absoluta dos transcritos. A figura 13 mostra, como esperado, que nenhum dos três transcritos sofreu degradação considerável quando incubados na ausência de extrato celular (fig. 13 A, B e C - linhas negras). Quando o RNA sintético 3UTR70 (correspondente a UTR 3' completa do mRNA de HSP70) era incubado com extrato de células tratadas a 29°C, foi possível observar sua degradação em taxa exponencial, resultando numa redução de aproximadamente 150 vezes no período de 120 minutos (fig. 13 A, linha azul). Por outro lado, a incubação deste RNA com extratos de 37°C pelo mesmo período resultou numa redução de aproximadamente 15 vezes (fig. 13 A, linha vermelha). A degradação dos transcritos neste ensaio, portanto, é claramente dependente da presença de extrato proteico. Além disso, a taxa de degradação a 37°C é aproximadamente 10 vezes menor que a taxa de degradação a 29°C, sugerindo a presença de um fator protetor no extrato de 37°C. Por fim, a sequência de RNA utilizada, ou seja, a UTR 3' completa do mRNA de HSP70, contém elemento regulador capaz de modular a resposta diferencial de degradação no extrato de 37°C.

A incubação do RNA sintético 3UTR70 Δ ARE (correspondente a UTR 3' de HSP70 sem a região rica em AU) com extratos de 29°C resultou em redução de menos de dez vezes no período de 120 minutos (fig. 13 B, linha azul). A incubação com extratos de 37°C resultou na mesma taxa de redução (fig. 13 B, linha vermelha). Uma vez que a taxa de degradação do RNA 3UTR70 Δ ARE foi menor nas duas temperaturas do que a

do RNA 3UTR70, notadamente na incubação com o extrato de 29°C, concluímos que a região rica em AU é importante na desestabilização destes RNAs.

A utilização do RNA sintético ARE (correspondente a região rica em AU somente), ao contrário do esperado, resultou em taxa de degradação bastante semelhante após incubação com os extratos de 29°C e 37°C, que foi de aproximadamente 15 vezes (fig. 13 C, linhas azul e vermelha). Estudos adicionais são necessários para a elucidação do mecanismo de estabilização do mRNA de HSP70.

A 3'UTR completa - 228 pb

```

agcgcacccc tgaagatggt ctcatggcgg cgtctgttcg cgaacgaata acccgttggt 60
tttctccttt gtagagcgta gtggtctgcg acaaaccag cagccatcac tattattatt 120
atTTTTTTTT ttccctctcc attattatta ttattattat tgattattat tattattatt 180
attattgta ttattattgg ttacggttgt ttttgtact gtcattgc 228

```

B 3'UTR Δ ARE - 110 pb

```

agcgcacccc tgaagatggt ctcatggcgg cgtctgttcg cgaacgaata acccgttggt 60
tttctccttt gtagagcgta gtggtctgcg acaaaccag cagccatcac 110

```

C ARE - 138 pb

```

acaaccag cagccatcac tattattatt atTTTTTTTT ttccctctcc attattatta 150
ttattattat tgattattat tattattatt attattgta ttattattgg ttacggttgt 210
ttttgtact gtcattgc 228

```

Figura 12. Sequências utilizadas no ensaio de degradação *in vitro* de RNA. Em A, sequência correspondente a UTR 3' completa do mRNA de HSP70. A sequência se estende do nucleotídeo 1 (exatamente *downstream* ao códon de terminação) até o nucleotídeo 228 (correspondente ao sítio de poliadenilação que gera a maior UTR 3' possível). Em B, sequência correspondente a UTR 3' sem a região rica em AU. A sequência se estende do nucleotídeo 1 até o nucleotídeo 110. Em C, sequência correspondente a região rica em AU da UTR 3' do mRNA de HSP70. A sequência se estende do nucleotídeo 100 até o nucleotídeo 228. As sequências foram amplificadas e clonadas em vetor para transcrição *in vitro* conforme descrito em métodos.

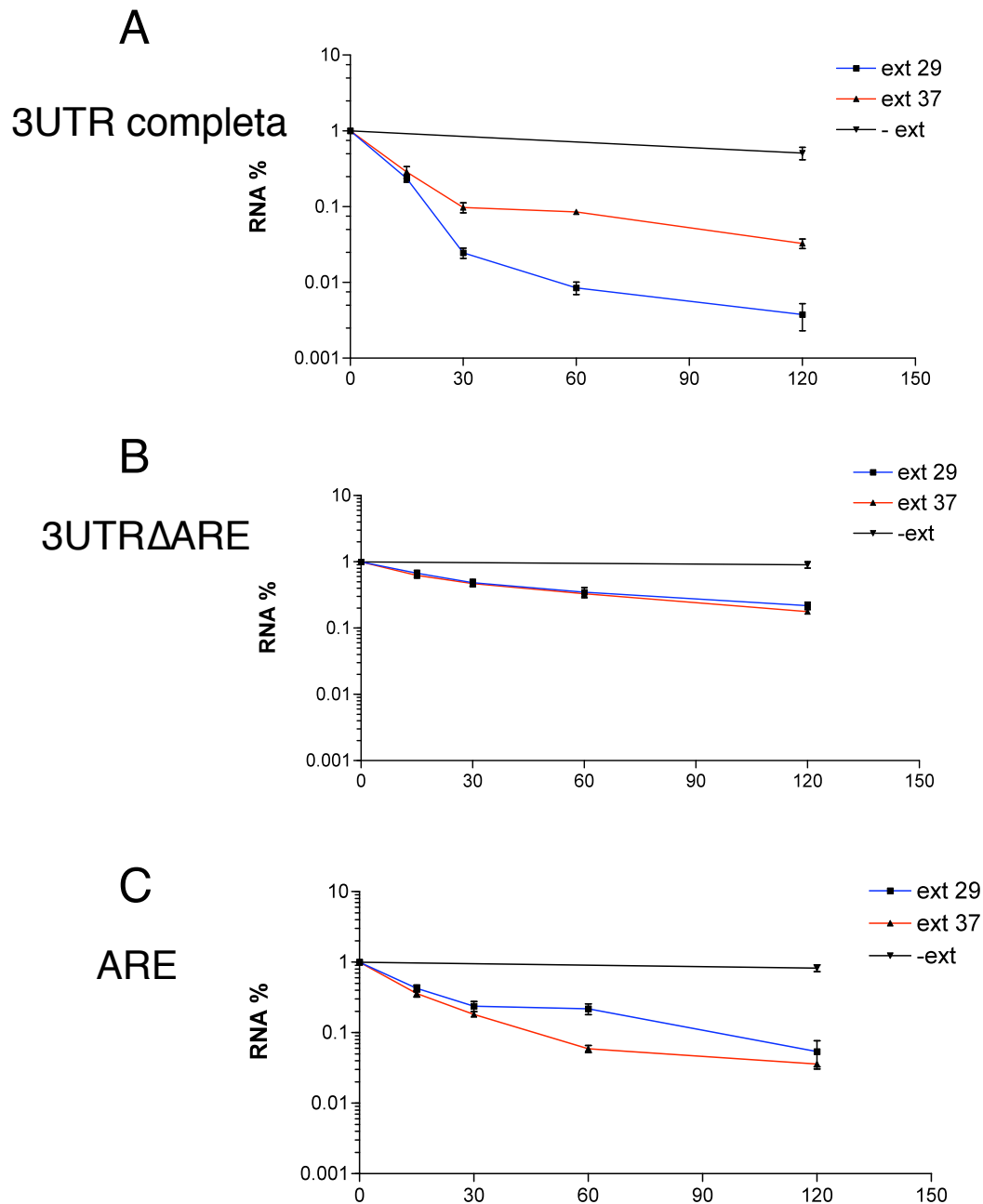


Figura 13. Quantificação dos níveis de RNA sintético do ensaio de degradação *in vitro*. Os RNAs foram tratados na presença dos extratos celulares de epimastigotas incubados a 29°C ou 37°C e alíquotas de intervalos de 30 minutos de cada tratamento foram submetidas a quantificação por qRT-PCR. Em A, B e C, os RNAs sintéticos correspondentes a (nessa ordem): UTR 3' completa, UTR 3' sem a sequência rica em AU e sequência rica em AU do mRNA de HSP70, foram incubado na presença extratos proteicos de 29°C (linha azul), 37°C (linha vermelha) e na ausência de extrato (linha preta). O gráfico mostra a quantificação relativa dos níveis de RNA com as alíquotas do tempo de 0 min de cada tratamento definidas como 100%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três experimentos independentes.

5. Discussão

O controle da expressão gênica em tripanossomatídeos é um processo ainda pouco conhecido apesar de amplamente estudado por diversos grupos. Alguns membros desta família de organismos são patogênicos aos animais, inclusive o homem, e são também capazes de se replicar em hospedeiros invertebrados. O *T. cruzi* multiplica-se no citoplasma de células de vertebrados (amastigotas) e no intestino de insetos do gênero Reduviidae (epimastigotas). Para se adaptar aos diferentes ambientes, alterações na expressão dos genes são necessárias, e algumas centenas de mRNAs mostram variação de pelo menos duas vezes em seus níveis quando o parasita troca de hospedeiro (Brems *et al.*, 2005; McNicoll *et al.*, 2006).

As mudanças na expressão dos genes relacionadas a sobrevivência do organismo durante o choque térmico constituem um fenômeno amplamente conservado e resultam em dois principais efeitos: 1, uma diminuição na expressão dos genes associados com o crescimento celular; e 2, um aumento na expressão de genes associados com a manutenção da integridade da estrutura das proteínas. Em tripanossomatídeos, o controle da expressão dos genes ocorre pós-transcricionalmente (revisto por Clayton e Shapira 2007). Acredita-se que esse fato se deve à organização das fases abertas de leitura (ORFs) desses organismos em tandem, de modo que aqueles devem ser transcritas como longos RNAs policistrônicos (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003). Posteriormente esses pré-mRNAs são processados em mRNAs individuais maduros através do *trans*-splicing e poliadenilação (Liang *et al.*, 2003). Além disso, não existem evidências até hoje de regulação da transcrição mediada pela RNA polimerase II e o genoma desses organismos codifica poucos fatores de transcrição (Palenchar e Bellofatto 2006). A única exceção a regra de regulação pós-transcricional preponderante é a regulação transcricional dos genes EP e VSGs de *T. brucei* (e outros genes da mesma unidade transcricional). A transcrição desses genes é regulada durante o desenvolvimento e é mediada pela RNA polimerase I com promotores dedicados (Glover *et al.*, 2006).

Desta forma, o controle pós-transcricional da expressão dos genes em tripanossomatídeos é exercido basicamente em três etapas: o processamento dos pré-mRNAs, a estabilização dos mRNAs maduros no citoplasma e a taxa de tradução desses

mensageiros (revisto por Clayton e Shapira 2007). As regiões não-traduzidas dos mRNAs são frequentemente alvo para o controle da estabilidade e meia-vida dos mRNAs e da tradução. Essas regiões apresentam elementos de sequência que são reconhecidos por proteínas ligadoras de RNA como descrito por diversos autores (Nozaki e Cross 1995; Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000; Dallagiovanna *et al.*, 2001). No controle da estabilidade, a ligação desses fatores proteicos pode apresentar ou esconder os mRNAs aos complexos de degradação de RNA, e no controle traducional essa ligação pode aumentar ou diminuir a interação dos mRNAs com a maquinaria de tradução. Justifica-se então a importância da identificação de elementos nas regiões UTRs e das proteínas de ligação a RNA para que possamos entender os complexos mecanismos que governam a expressão dos genes nestes organismos.

As proteínas de choque térmico são um excelente modelo para esse tipo de estudo uma vez que sua expressão é facilmente modulada com a variação da temperatura de incubação. Os mecanismos de regulação da proteína HSP70 já foram parcialmente elucidados em *T. brucei* e *Leishmania* (Hausler *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Quijada *et al.*, 1997; Folgueira *et al.*, 2007). Em *T. cruzi*, os estudos preliminares da expressão da proteína HSP70 mostraram que sua síntese aumenta cerca de 4 a 5 vezes durante o choque térmico (de Carvalho *et al.*, 1990), enquanto os níveis de seus mRNAs aumentam apenas 2 vezes (Engman *et al.*, 1989; de Carvalho *et al.*, 1990), sugerindo a existência de um mecanismo traducional no controle da expressão dessa proteína.

Na intenção de esclarecer os mecanismos de regulação pós-transcricional que os genes de HSP70 sofrem durante o choque térmico, primeiramente, nós verificamos qual era a contribuição da estabilização do mRNA durante o choque térmico. Para isso, nós determinamos a meia-vida do mRNA de HSP70 em temperaturas de 29°C e 37°C. Nossos resultados indicam que a 29°C a meia-vida é de 60 minutos. Comparando com dados de outros mRNAs em tripanossomatídeos, essa é uma meia-vida intermediária entre mRNAs instáveis e mRNAs estáveis. mRNAs instáveis têm meias-vidas de 15 minutos ou menos, como no caso de EP e fosfoglicerato kinase em *T. brucei* (Hotz *et al.*, 1997). Já mRNAs estáveis têm meias-vidas de várias horas, como os mRNAs de tubulina em *Leishmania* (Purdy *et al.*, 2005). Quando nós determinamos a meia-vida do mRNA de HSP70 a 37°C nós verificamos que esta aumenta 2 vezes, ou seja, de 60 minutos para 120 minutos, indicando que esse mRNA é estabilizado durante o choque

térmico. Além disso, essa estabilização de 2 vezes é equivalente ao aumento de 2 vezes dos níveis de mRNA a 37°C previamente verificado (Engman *et al.*, 1989; Folgueira *et al.*, 2007). Esses resultados estão de acordo com um reduzido ou inexistente componente transcricional participando do controle da expressão dos genes de HSP70 durante o choque térmico, que já havia sido antes descrito para *T. cruzi* (Giambiagi-de Marval *et al.*, 1993; Folgueira 2007) e *T. brucei* (Lee *et al.*, 1998). A estabilização de mRNA pela variação de temperatura também já foi descrito em *Leishmania*, onde os mRNAs de HSP70 (Folgueira *et al.*, 2005), HSP83 (Zilka *et al.*, 2001) e amastina (McNicoll *et al.*, 2005) são estabilizados durante o choque térmico.

Curiosamente, nós observamos que a cinética de estabilização do mRNA de HSP70 a 37°C se comportou como uma curva bifásica: uma fase inicial de estabilização, que durou 90 minutos e onde não há degradação aparente, seguida de uma fase de degradação que ocorre aproximadamente com a mesma cinética de degradação a 29°C. Além disso, nós também observamos que a inibição da síntese proteica leva a perda do efeito estabilizador a 37°C. Estes resultados são consistentes com a existência de uma proteína reguladora instável que estabiliza o mRNA de HSP70 durante o choque térmico. A perda do efeito estabilizador após inibição da síntese proteica também foi descrita para os mRNAs de ESAG em *T. brucei* (Vanhamme *et al.*, 1999).

Para investigar os elementos presentes no mRNA de HSP70 que contribuem para a resposta ao choque térmico, nós construímos uma série de plasmídeos contendo o gene repórter CAT. Nesses plasmídeos, o gene repórter era flanqueado pelas sequências correspondentes as UTRs do mRNA de *hsp70* ou as UTRs do gene *rab7*. Nossos resultados mostram que ambas as UTRs 5' e 3' do mRNA de *hsp70* contêm elementos que respondem ao choque térmico, uma vez que foram capazes de aumentar a atividade da enzima CAT quando testadas juntas ou separadamente. Além disso, nós observamos que o uso em conjunto das duas UTRs apresenta efeito somatório no controle da expressão de HSP70. Estes dados estão de acordo com outros já descritos para *hsp70* de *T. brucei* e *hsp83* de *Leishmania*, onde ambas as UTRs são capazes de responder ao choque térmico (Aly *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Quijada *et al.*, 2000).

Para verificar qual a contribuição de cada UTR na estabilização do mRNA de HSP70, nós determinamos os níveis dos mRNAs CAT nos parasitas transfectados com os 4

plasmídeos repórter. Os nossos resultados mostraram que ambas as UTRs, quando juntas (plasmídeo p70CAT70), foram capazes de estabilizar os mRNAs durante o choque térmico. Além disso, essa estabilização gerou um acúmulo de cerca de 2 vezes nos níveis do mRNA CAT p70CAT70, a mesma variação de acúmulo observada para o mRNA de HSP70 endógeno. Isso nos levou a conclusão que as UTR 5' e 3' de HSP70 contêm os elementos necessários para a estabilização do mRNA a 37°C. A presença de elementos que regulam a estabilização nas duas UTRs 5' e 3' do mRNA de HSP70 é também descrita para a HSP83 de *Leishmania* (Zilka *et al.*, 2001). No entanto, na maioria dos casos, a UTR 3' é suficiente para conferir a estabilização ou desestabilização dos mRNAs durante o ciclo de vida ou o choque térmico nos tripanossomatídeos (revisto por Clayton e Shapira 2007). É portanto possível que as UTRs 5' e 3' de HSP70 devam interagir para manter o mRNA protegido da degradação durante o choque térmico.

Curiosamente, quando as UTRs de HSP70 foram utilizadas separadamente nos plasmídeos repórter, não foram capazes de promover a estabilização dos mRNAs CAT (apesar de se poder observar a indução da enzima CAT durante o choque térmico). Logo, as UTR separadamente são capazes de aumentar a eficiência de tradução. Corroborando essa conclusão, a indução da enzima CAT com o plasmídeo p70CAT70 é de 3 vezes, portanto maior do que o acúmulo dos níveis de mRNA que é de 2 vezes. Esses resultados diferem dos previamente descritos onde a regulação da tradução é apenas controlada pela UTR 3', como descrito em *Leishmania* (Zilka *et al.*, 2001; Purdy *et al.*, 2005), *T. brucei* (Schürch *et al.*, 1997; Urwyler *et al.*, 2007) e *T. cruzi* (Jäger *et al.*, 2008). A UTR 5' do mRNA de HSP83 de *Leishmania* é também capaz de aumentar a taxa de tradução durante o choque térmico, porém apenas quando a UTR 3' está presente na mesma construção (Zilka *et al.*, 2001).

Uma família de motivos ricos em adenina e uridina específicos de mRNAs (*AU-rich elements* ou AREs), que foram inicialmente identificados a mais de duas décadas atrás (Shaw e Kamen 1986), são amplamente reconhecidos como importantes determinantes da estabilidade de muitos mRNAs (Ross 1995). Os dados em conjunto indicam que essas sequências são elementos que desestabilizam os mRNAs que os contêm e que, em condições especiais, podem ser alvos de ligação de proteínas que podem acelerar a taxa de degradação dos mRNA ou os proteger da maquinaria de degradação aumentando sua

meia vida no citoplasma (Bevilacqua *et al.*, 2003). Durante o mapeamento da UTR 3' do mRNA de HSP70, nós detectamos a presença de uma sequência rica nos nucleotídeos adenina e uridina nos seus últimos 100 nucleotídeos. Elementos ricos em AU também foram identificados nas UTRs 3' dos genes da mucina pequena (SMUG) e EP prociclina (EP1) em *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente (Di Noia *et al.*, 2000; D'Orso e Frascch 2001; Irmer e Clayton 2001). Esses elementos conferem desestabilização seletiva dos mRNAs dependendo do estágio celular, e em *T. cruzi*, o elemento é reconhecido por uma proteína ainda não identificada (D'Orso & Frascch 2001; D'Orso *et al.*, 2003). A sequência rica em AU que nós encontramos não contém a repetição clássica de nenhuma das três classes de elementos ARE já descritos com esse papel. Porém essa sequência poderia estar envolvida na estabilização diferencial dependente de temperatura do mRNA de HSP70. A predição *in silico* da estrutura secundária desse elemento, tanto a 29°C quanto a 37°C, sugere que ele forme uma dupla fita, com uma estrutura em forma de grampo com 9 bolhas simétricas de não pareamento. Até hoje, a única predição de estrutura secundária de elementos reguladores da estabilidade presentes na UTR 3' foi realizada por Quijada e colaboradores em 2002. Esse trabalho mostra que os elementos ricos em U nas UTRs 3' dos genes PGKB e PDDK se apresentam como fita simples, e funcionalmente são responsáveis pela desestabilização dos respectivos mRNAs durante o ciclo de vida do *T. brucei* (Quijada *et al.*, 2002). Nós verificamos a funcionalidade da sequência rica em AU da UTR 3' do mRNA de HSP70 em um experimento de degradação *in vitro* de RNA onde a cinética de degradação da UTR 3' com e sem a região rica em AU e da região rica em AU isolada na presença de extratos celulares foi comparada. Os nossos resultados mostraram que, de fato, a UTR 3' completa pode conter o elemento responsável pela regulação da estabilidade dependente de temperatura, pois as taxas de degradação deste transcrito quando incubado com extratos de células tratadas a 29°C ou a 37°C são bastante diferentes. Esse resultado é também consistente com a hipótese onde um fator protetor está presente no extrato de 37°C. Além disso, é possível que esse fator protetor reconheça algum elemento na UTR 3'. Nós também observamos que, a região rica em AU pode ser, pelo menos, um dos elementos desestabilizadores do mRNA, pois quando esse elemento foi deletado, no transcrito 3UTR70 Δ ARE, a degradação da UTR que ocorria no extrato de 29°C diminuiu em 10 vezes, ficando em

níveis comparáveis de degradação com a incubação com extrato de 37°C. Nós imaginamos que essa sequência desestabilizaria o mRNA porque poderia ser reconhecida e clivada pela maquinaria de degradação de RNA existente nos extratos, o que justificaria a diminuição da degradação quando deletamos este elemento. Para averiguar esta hipótese, nós fizemos o mesmo ensaio de degradação *in vitro* com um transcrito que continha apenas a sequência rica em AU. Porém, ao contrário do que esperávamos, a cinética de degradação deste transcrito foi igual na incubação com os dois extratos. Portanto, é possível que a região rica em AU da UTR 3' do mRNA de hsp70 seja reconhecida pela maquinaria de degradação a 29°C, e esta clive o mRNA em outro ponto da própria UTR 3'. Além disso, também é provável que algum fator proteico presente no extrato a 37°C impeça o reconhecimento do RNA pela maquinaria de degradação por se ligar a região rica em AU, o que aumenta a meia-vida do mRNA nessa temperatura.

Todas as hipóteses que levam em conta a presença de um fator proteico ainda precisam ser testadas com ensaios que mostrem a ligação proteína/RNA como experimentos de alteração de motilidade eletroforética. É preciso averiguar se de fato algum fator proteico se liga ao mRNA de hsp70 a 37°C protegendo-o de degradação, e se essa ligação ocorre na região rica em AU. Além disso, é também preciso que sejam feitos novos ensaios de degradação *in vitro* onde a região rica em AU seja substituída por outra sequência para verificarmos se o efeito protetor é perdido ou não.

6. Conclusões

- A meia-vida do mRNA de hsp70 em formas epimastigotas de *T. cruzi* a 29°C é de 60 min e a 37°C é de 120 min.
- A estabilização do mRNA de hsp70 a 37°C depende de síntese proteica.
- As duas UTRs do mRNA de hsp70 contêm elementos de resposta ao choque térmico.
- As duas UTRs do mRNA de hsp70 conferem aumento de estabilidade ao mRNA a 37°C, porém apenas quando ambas estão presentes.
- As duas UTRs do mRNA de hsp70 contêm elementos que conferem aumento da tradução a 37°C.
- A região rica em AU é necessária para a degradação *in vitro* de um RNA sintético correspondente a UTR 3' do mRNA de hsp70.

7. Referências

- Agabian, N. *trans*-splicing of Nuclear pré-RNAs. (1990) *Cell* 61:1157-1160
- Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. (1994). *Nucleic. Acids. Res.* 22:2922-9
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. (2004) *Nature* 431:350–355
- Amiel J., Laudier B., Attie-Bitach T., Trang H, de Pontual, L. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. (2003) *Nat. Genet.* 33:459–61
- Andrei M.A., Ingelfinger D., Heintzmann R., Achsel T., Rivera-Pomar R., Luhrmann R. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. (2005) *RNA* 11:717–727
- Atchison M.L. Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. (1988) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4:127–53
- 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 Metacicloenin Gene, Which Is Specifically Expressed During *Trypanosoma cruzi* Metaciclogenesis. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* 117:169-177;

- Banerji J., Olson L., Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. (1983) *Cell* 33:729–40
- Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. (1981) *Cell* 27:299–308
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. (2004) *Cell* 116: 281–297
- Bartel D.P., Chen C.Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. (2004) *Nat. Rev. Genet.* 5:396–400
- Belle R., Derancourt J., Poulhe R., Capony J.P., Ozon R., Mulner-Lorillon O. A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an *in vivo* substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 gamma and EF-1 beta. (1989) *FEBS Lett* 255:101-4. 31.
- 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
- Bevilacqua A., Ceriani M.C., Capaccioli S., Nicolin A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. (2003) *J. Cell. Physiol.* 195: 356–372.
- Bhattacharya A., Czaplinski K., Trifillis P., He F., Jacobson A., Peltz S.W. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. (2000) *RNA* 6: 1226–1235

- Bickel S., Perotta V. Self-association of the *Drosophila* zeste protein is responsible for transvection effects. (1990) *EMBO J.* 9:2959-2967.
- Black D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA *splicing*. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 291–336
- 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;
- Brems S., Guilbride D.L., Gundlesdodjir-Planck D. The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. (2005) *Mol. Biochem. Parasitol.* 139:163–72.
- Brener Z., Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. (1963) *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19:220-224
- Brewer G. An A 1 U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability *in vitro*. (1991) *Mol Cell Biol* 11:2460–2466.
- Brogna S. Nonsense mutations in the alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster* correlate with an abnormal 3' end processing of the corresponding pre-mRNA. (1999) *RNA* 5: 562–573
- Brown K.E. Chromatin folding and gene expression: new tools to reveal the spatial organization of genes. (2003) *Chromosome Research* 11:423-433.
- Browne G.J., Proud C.G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. (2002) *Eur J Biochem* 269:5360-8.

-
- Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., van Deurs B. *Rab7*: a key to lysosome biogenesis. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11 467–480
- Bukau B., Weissman J., Horwich A.L. Molecular chaperones and protein quality control. (2006) *Cell* 125:443-451.
- Burston S.G., Clarke A.R. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. (1995) *Essays Biochem.* 29:125-136
- Campbell D.A., Suyama Y., Simpson L. Genomic organisation of nuclear tRNAGly and tRNA^{Leu} genes in *Trypanosoma brucei*. (1989) *Mol Biochem Parasitol* 37:257-262
- Campbell D.A., Sturm N.R., Yu M.C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. (2000) *Parasitol Today*. 16:78-82
- Cantor A.B. GATA transcription factors in hematologic disease. (2005) *Int. J. Hematol.* 81:378–84
- Carlberg U., Nilsson A., Nygard O. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. (1990) *Eur J Biochem* 191:639-45
- Cascino I., Fiucci G., Papoff G., Ruberti, G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. (1995) *J. Immunol* 154: 2706–2713.
- Cassola, A., De Gaudenzi, J.G., Frasch, A.C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes (2007) *Mol. Microbiol.* 65:655-670

- Chen C.Y., Shyu A.B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. (1995) *Trends Biochem Sci* 20:465–470.
- Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L., Rajmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karin M. AU-binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. (2001) *Cell* 107:451–464.
- Chu C.Y., Rana T.M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. (2006) *PLoS Biol* 4:e210
- Clayton C. Life Without Transcription Control? From Fly to Man and Back Again (2002) *EMBO J.* 21:1881-1888
- Clayton C., Shapira, M. Post-Transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. (2007) *Mol Biochem Parasitol*, 156:93-101.
- Coughlin B.C., Teixeira S.M., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. (2000) *J Biol Chem.* 275:12051-60
- Colasante C., Robles A., Li C.H., Schwede A., Benz C., Voncken F., Guilbride D.L., Clayton C. Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. (2007) *Mol Biochem Parasitol* 151:193-204
- Celis J.E., Madsen P., Ryazanov A.G. Increased phosphorylation of elongation factor 2 during mitosis in transformed human amnion cells correlates with a decreased rate of protein synthesis. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4231-5

- Cordingley J.S., Dallagiovanna B., Plazanet-Menut C., Ogatta S.F., Avila 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* 99:7-16
- Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. (2004) *Nature* 431:931-45
- Coughlin B.C., Teixeira S.M., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. (2000) *J Biol Chem.* 275:12051-60
- Culbertson M.R., Underbrink K.M., Fink G.R. Frameshift suppression in *Saccharomyces cerevisiae* II. Genetic properties of group II suppressors. (1980) *Genetics* 95: 833-853
- Czaplinski K., Weng Y., Hagan K.W., Peltz S.W. Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. (1995) *RNA* 1: 610-623
- Dahm R., Kiebler M., Macchi P. RNA localisation in the nervous system. (2007) *Semin Cell Dev Biol.* 18:216-23
- de Carvalho E.F., de Castro F.T., Rondinelli E., Soares C.M., Carvalho J.F. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. (1990) *J. Cell. Physiol.* 143:439-44

-
- Demir E., Dickson B.J. fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. (2005) *Cell* 121:785–794
- Deng W., Roberts S.G. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. (2005) *Genes Dev.* 19:2418-23
- De Freitas J.M., Augusto-Pinto L., Pimenta J.R., Bastos-Rodrigues L., Gonçalves V.F., Teixeira S.M., Chiari E., Junqueira A.C., Fernandes O., Macedo A.M., Machado C.R., Pena S.D., Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. (2006) *PLoS Pathog* 2:e24
- De Gaudenzi J.G., Frasch A.C.C., Clayton C. RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. (2005) *Eukaryot Cell.* 4:2106-14
- 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
- Dever T.E. Gene-specific regulation by general translation factors. (2002) *Cell* 108:545–556 31
- Di Noia J.M., D'Orso I., Sanchez D.O., Frasch A.C. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:10218-10227
- 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.* 273:10843-10850

- Dmitriev S.E., Terenin I.M., Dunaevsky Y.E., Merrick W.C., Shatsky I.N. Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. (2003) *Mol Cell Biol* 23:8925-33
- D'Orso I., De Gaudenzi J.G., Frasch A.C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. (2003) *Trends Parasitol* 19:151-5
- D'Orso I., Frasch, A.C.C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes. (2001) *J. Biol. Chem* 276:34801-34809
- Dreyfuss G., Kim V.N., Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:195-205
- Dubnau J., Chiang A.S., Grady L., Barditch J., Gossweiler S., The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. (2003) *Curr. Biol.* 13:286-96
- Ehlers B., Czichos J., Overath P. RNA turnover in *Trypanosoma brucei*. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1242-1249
- Ellis R.J., Hartl F.U. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. (1996) *FASEB J* 10:20-26
- Elroy Stein O., Merrick W.C. Translation Initiation via Cellular Internal Ribosome Entry Sites. In: Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B., eds Translational Control in Biology and Medicine. (2007) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 155-72.

- 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. Hall N. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* (2005) 309:409-15
- Engman D.M., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. (1989) *Mol Cell Biol* 9:5163-5168
- Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:9-22
- Eystathioy T., Chan E.K.L., Tenenbaum S.A., Keene J.D., Griffith K., Fritzler M.J. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. (2002) *Mol Biol Cell* 13:1338-1351
- Feng Y., Press B., Wandinger-Ness A. *Rab7*: an important regulator of late endocytic membrane traffic. (1995) *J. Cell Biol.* 131:1435-1452.
- Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding. (1999) *Physiol Rev.* 79:425-449
- Foekens A.J., Wang Y., Martens J.W.M., Berns E.M.J.J., Klijn J.G.M. The use of genomic tools for the molecular understanding of breast cancer and to guide personalized medicine. (2008) *Drug Discov Today.* 13:481-7

- Folgueira C., Quijada L., Soto M., Abanades D.R., Alonso C., Requena J.M. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3' -untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. (2005) *J Biol Chem* 280:35172-83
- Frischmeyer P.A., Dietz H.C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. (1999) *Hum Mol Genet* 8:1893–1900
- Garneau N.L., Wilusz J., Wilusz C.J. The highways and byways of mRNA decay. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:113–126
- Gebauer F., Hentze M.W. Molecular mechanisms of translational control. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:827–835
- Gerlitz G., Jagus R., Elroy-Stein O. Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. (2002) *Eur J Biochem* 269:2810-9
- Gershenzon N.I., Ioshikhes I.P. Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. (2005) *Bioinformatics* 21:1295–300
- Gething M.J., Sambrook J. Protein folding in the cell. (1992) *Nature*. 355:33-45
- Giambiagi-de Marval M., Souto-Padrón T., Gottesdiener K., Silva R., Van der Ploeg L.H.T., Rondinelli E. Heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*: identification and localization of HSP70 and HSP60 proteins and structure of HSP60 genes (brief report). (1993) *Biol Res* 26:313-4

- Giambiagi-DeMarval M., Souto-Padron T., Rondinelli E. Characterization and Cellular Distribution of Heat-Shock Proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. (1996) *Exp. Parasitol.* 83:335–345
- Gilinger G., Bellofatto V. Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. (2001) *Nucleic Acids Res* 29:1556-1564
- Ginger M.L., Blundell P.A., Lewis A.M., Browitt A., Gunzl A., Barry J.D. *Ex vivo* and *in vitro* identification of a consensus promoter for VSG genes expressed by metacyclic-stage trypanosomes in the Tsetse fly. (200) *Cell* 1:1000-1009
- Glass D.J., Polvere R.I. Van der Ploeg L.H.T. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. (1986) *Mol Cell Biol* 6:4657–4666
- Glover L., Horn D. Repression of polymerase I-mediated gene expression at *Trypanosoma brucei* telomeres. (2006) *EMBO Rep* 7:93–9
- Harris M.B., Mostecky J., Rothman P.B. Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. (2005) *J. Biol. Chem.* 280:13114–21
- Hartl F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. (1996) *Nature* 381:571-579
- Hartmann C., Benz C., Brems S., Ellis L., Luu V.D., Stewart M., D'Orso I., Busold C., Fellenberg K., Frasch A.C., Carrington M., Hoheisel J., Clayton C.E. The small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of cyclin F box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes. (2007) *Eukaryot Cell* 6:1964-78

-
- Hausler T., Clayton C. Post-transcriptional control of hsp70 mRNA in *Trypanosoma brucei*. (1996) *Mol. Biochem. Parasitol* 76:57-71
- He F., Li X., Spatrick P., Castilho R., Dong S., Jacobson A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. (2003) *Mol. Cell* 12:1439–1452.
- Hendrick J.P., Hartl F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. (1993) *Annu Rev Biochem.* 62:349-84
- Hengst U., Jaffrey S.R. Function and translational regulation of mRNA in developing axons. (2007) *Semin Cell Dev Biol* 18:209–15
- Higgs D.R., Vernimmen D., Wood B. Long-range regulation of alpha-globin gene expression. (2008) *Adv Genet* 61:143-73
- Hodgkin J., Papp A., Pulak R., Ambros V., Anderson P. A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. (1989) *Genetics* 123: 301–313
- Holcik M., Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318-327
- 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

- Hotz H.R., Hartmann C., Huober K., Hug M., Clayton C.E. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: A polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a trypanosome surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. (1997) *Nucl Acids Res* 25:3017–25
- Horn D. Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. (2001) *Int J Parasitol* 31:1157-1165
- Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. (2006) *Yeast* 23:439–454
- 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
- Irmer H., Clayton C.E. Degradation of the EP1 mRNA in *Trypanosoma brucei* is initiated by destruction of the 3'-untranslated region. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29:4707-4715
- Ingelfinger D., Arndt-Jovin D.J., Luhrmann R., Achsel T. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. (2002) *RNA* 8:1489–1501
- 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) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2035-2042

- Jäger A.V., Muiá R.P., Campetella O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* transsialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. (2008) *FEMS Microbiol Lett* 283:182-188
- Jakymiw A., Lian S., Eystathioy T., Li S., Satoh M., Hamel J.C., Fritzler M.J., Chan E.K. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. (2005) *Nat Cell Biol* 8:1267-1274
- Janssen G.M., Morales J., Schipper A., Labbe J.C., Mulner Lorillon O., Belle R., Moller W. A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1 beta gamma delta in *Xenopus laevis*. (1991) *J Biol Chem* 266:14885-14888
- Jiang J., Prasad K., Lafer E.M., Sousa R. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. (2005) *Mol Cell* 20:513-524
- Johnson J.M., Castle J., Garrett-Engele P., Kan Z., Loerch P.M., Armour C.D., Santos R., Chadt E.E., Stoughton R., Shoemaker D.D. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. (2003) *Science* 302:2141-2144
- Johnstone O., Lasko P. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. (2001) *Annu. Rev. Genet.* 35:365-406
- Jorgensen P., Tyers M. How cells coordinate growth and division. (2004) *Curr. Biol.* 14:R1014-R1027
- Jurica M.S., Moore M.J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. (2003) *Mol. Cell* 12:5-14

- Kaufmann J., Smale S.T. Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. (1994) *Genes Dev.* 8:821-829
- Kedersha N., Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. (2007) *Methods Enzymol* 431:61–81
- Keene J.D. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5–7
- Keene J.D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. (2007) *Nat Rev Genet.* 8:533-543
- Keurentjes J.J.B., Koornneef M., Vreugdenhil D. Quantitative genetics in the age of omics. (2008) *Curr Opin Plant Biol.* 11:123-128
- Lalioti M.D., Scott H.S., Antonarakis S.E. Altered spacing of promoter elements due to the dodecamer repeat expansion contributes to reduced expression of the cystatin B gene in EPM1. (1999) *Hum. Mol. Genet.* 8:1791–1798
- Laufer G., Shaaf G., Bollgonn S., Gunz A. *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. (1999) *Mol Cell Biol* 19:5466-5473
- Laufer G., Gunzl A. *In vitro* competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. (2001) *Mol Biochem Parasitol* 113:55-65
- Leal S.T. Tese de Doutorado (1996) *UFRJ, RJ*

- Leal S.T., Araripe J.R., Urmenyi T.P., Cross G.A.M., Rondinelli E. *Trypanosoma cruzi*: Cloning and Characterization of a RAB7 gene. (2000) *Exp. Parasitol.* 96:23–31
- LeBowitz J.H., Smith H.Q., Rusche L., and Beverley S.M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. (1993) *Genes & Dev.* 7:996–1007.
- Lee M.G. The 3' untranslated region of the hsp 70 genes maintains the level of steady state mRNA in *Trypanosoma brucei* upon heat shock. (1998) *Nucleic Acids Res* 26:4025-4033
- Lee M.G., Atkinson B.L., Giannini S.H., Van der Ploeg L.H.T. Structure and expression of the hsp70 gene family of *Leishmania major*. (1988) *Nucleic Acids Res* 16:9567–9585
- Lee M.P., Howcroft K., Kotekar A., Yang H.H., Buetow K.H., Singer D.S. ATG deserts define a novel core promoter subclass. (2005) *Genome Res.* 15:1189–1197
- Lehmann A.R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. (2001) *Genes Dev.* 15:15–23
- Le Sourd F., Boulben S., Le Bouffant R., Cormier P., Morales J., Belle R., Mulner-Lorillon O. eEF1B: At the dawn of the 21st century. (2006) *Biochim Biophys Acta* 1759:13-31
- Liang X., Haritan A., Uliel S., Michaeli S. *Trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. (2003) *Eukaryot Cell* 2:830–840

- Li C.H., Irmer H., Gudjonsdottir-Planck D., Freese S., Salm H., Haile S., Estévez A.M., Clayton C. Roles of a *Trypanosoma brucei* 5' ->3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. (2006) *RNA* 12:2171-2186
- Li Q., Peterson K.R., Fang X., Stamatoyannopoulos G. Locus control regions. (2002) *Blood* 100:3077–3086
- Lim C.Y., Santoso B., Boulay T., Dong E., Ohler U., Kadonaga J.T. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. (2004) *Genes Dev.* 18:1606–160617
- Lim L.P., Glasner M.E., Yekta S., Burge C.B., Bartel D.P. Vertebrate miRNA genes. (2003) *Science* 299:1540
- Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. (2005) *Nature* 433:769–773
- Lisboa C.V., Pinho A.P., Monteiro R.V., Jansen A.M. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. (2006) *Exp. Parasitol.* 116:150–155
- Losson R., Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5134–5137
- Lu H. Y., Buck G. A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. (1991) *Mol Biochem Parasitol* 44:109–114

- Ludlow L.B., Schick B.P., Budarf M.L., Driscoll D.A., Zackai E.H. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ib β promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22076–22080
- Luu V.D., Brems S., Hoheisel J., Burchmore R., Guilbride D., Clayton C. Functional analysis of *Trypanosoma brucei* PUF1. (2006) *Mol. Biochem. Parasitol.* 150:340–349
- 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
- Maquat L.E., Kinniburgh A.J., Rachmilewitz E.A., Ross J. Unstable beta-globin mRNA in mRNA-deficient beta o thalassemia. (1981) *Cell* 27:543–553
- Martinez-Calvillo S., Yan S., Nguyen D., Fox M., Stuart K., Myler P.J. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. (2003) *Mol Cell* 11:1291–1299
- Matkin A., Das A., Bellofatto V. The *Leptomonas seymouri* spliced leader RNA promoter requires a novel transcription factor. (2001) *Int J Parasitol.* 31:545-549
- McKnight S.L., Kingsbury R. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. (1982) *Science* 217:316–324
- McNicoll F., Drummel-Smith J., Muller M. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. (2006) *Proteomics* 2006. 6:3567-3581

- McNicoll F., Müller M., Cloutier S., Boilard N., Rochette A., Dubé M., Papadopoulou B. Distinct 3' -untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. (2005) *J Biol Chem* 280:35238-46
- Meister G., Landthaler M., Peters L., Chen P.Y., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. Identification of novel argonaute-associated proteins. (2005) *Curr Biol* 15:2149–2155
- Menon K.P., Sanyal S., Habara Y., Sanchez R., Wharton R.P. The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E. (2004) *Neuron* 44:663–76
- Mishra K.K., Holzer T.R., Moore L.L., LeBowitz J.H. A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2. (2003) *Eukaryot Cell* 2:1009-17
- Monnier A., Morales J., Cormier P., Boulben S., Belle R., Mulner Lorillon O. Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. (2001a) *Zygote* 9:229-36
- Monnier A., Belle R., Morales J., Cormier P., Boulben S., Mulner-Lorillon O. Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. (2001b) *Nucleic Acids Res* 29:1453-7
- Moore M.J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. (2005) *Science* 309:1514–1518

- Morimoto R.I. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. (1991) *Genes Dev.* 5:1902-1911
- Mulner Lorillon O., Cormier P., Cavadore J.C., Morales J., Poulhe R., Belle R. Phosphorylation of *Xenopus* elongation factor-1 gamma by cdc2 protein kinase: identification of the phosphorylation site. (1992) *Exp Cell Res* 202:549-51
- Mulner Lorillon O., Minella O., Cormier P., Capony J.P., Cavadore J.C., Morales J., Poulhe R., Belle R. Elongation factor EF-1 delta, a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus* oocytes. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:20201-7
- Muslimov I.A., Santi E., Homel P., Perini S., Higgins D., Tiedge H. RNA transport in dendrites: a *cis*-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. (1997) *J. Neurosci.* 17:4722-33
- Nollen E.A., Morimoto R.I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. (2002) *J Cell Sci* 115:2809-2816
- Nozaki T., Cross G.A. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* 75:55-67
- Nygaard O., Nilsson A., Carlberg U., Nilsson L., Amons R. Phosphorylation regulates the activity of the eEF-2-specific Ca(2+)- and calmodulin-dependent protein kinase III. (1991) *J Biol Chem* 266:16425-30
- Ogbourne S., Antalis T.M. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. (1998) *Biochem. J.* 331:1-14

- Palacios I.M. How does an mRNA find its way? Intracellular localisation of transcripts. (2007) *Semin Cell Dev Biol.* 18:163–70
- Palenchar J.B., Bellofatto V. Gene transcription in trypanosomes. (2006) *Mol Biochem Parasitol* 146:135–41
- Parker R., Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. (2007) *Mol Cell* 25:635–646
- Pirkkala L., Nykanen P., Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. (2001) *FASEB J.* 15:1118-1131
- Preiss T., Hentze M.W. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. (2003) *Bioessays* 25:1201–1211
- Privalsky M.L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. (2004) *Annu. Rev. Physiol.* 66:315–60
- Purdy J.E., Donelson J.E., Wilson M.E. *Leishmania chagasi*: the alpha-tubulin intercoding region results in constant levels of mRNA abundance despite protein synthesis inhibition and growth state. (2005) *Exp Parasitol* 110:102-7
- Query C.C., Bentley R.C., Keene J.D. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. (1989) *Cell* 57:89–101

- Quijada L., Guerra-Giraldez C., Drozd M., Hartmann C., Irmer H., Ben-Dov C., Cristodero M., Ding M., Clayton C. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. (2002) *Nucleic Acids Res* 30:4414-24
- Quijada L., Soto M., Alonso C., Requena J.M. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. (1997) *J Biol Chem* 272:4493-9
- Quijada L., Soto M., Alonso C., Requena J.M. Identification of a putative regulatory element in the 3' -untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. (2000) *Mol Biochem Parasitol* 110:79-91
- Recillas-Targa F., Pikaart M.J., Burgess-Beusse B., Bell A.C., Litt M.D. Position effect protection and enhancer blocking by the chicken β -globin insulator are separable activities. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6883–88
- Requena J.M., Jimenez-Ruiz A., Soto M., Assiego R., Santaren J.F., Lopez M.C. Patarroyo M. E., Alonso C. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. (1992) *Mol Biochem Parasitol*. 53:201-11
- Requena J.M., Lopez M.C., Jimenez-Ruiz A., de la Torre J.C., Alonso C. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. (1988) *Nucleic Acids Res* 16:1393–1406
- Rodrigues, D.C. Dissertação de Mestrado (2004) *UFRJ, RJ*
- Ross J. mRNA stability in mammalian cells. (1995) *Microbiological Reviews* 59:423–450

- Rudenko G., Chung H.M.M., Pham V.P., Van der Ploeg L.H.T. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. (1991) *EMBO J* 10:3387
- Sambrook and Russell. Molecular Cloning: a laboratory manual. (2001) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Schürch N., Furger A., Kurath U., Roditi I. Contribution of the procyclin 3' untranslated region and coding region to the regulation of expression in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. (1997) *Mol. Biochem. Parasit.* 89:109-121
- Shaw G., Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. (1986) *Cell* 46:659-667
- Sheth U., Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. (2003) *Science* 300:805-808
- Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosome flagellates. (1986) *Int Rev Cytol.* 99:119-79
- Simpson P., Ayvar S. Evolution of cis-regulatory sequences in *Drosophila*. (2008) *Adv Genet.* 61:67-106
- Sivan G., Kedersha N., Elroy Stein O. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. (2007) *Mol Cell Biol* 27:6639-46

- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72:449–79
- Soares C.M.A., Carvalho E.F., Ürményi T.P., Carvalho J.F., 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
- Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B. Translational Control of Gene Expression. (2000) *Cold Spring Harbor Press, New York* 295–370
- Sorensen J.G., Loeschcke V. Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. (2007) *J Biosci.* 32:447-456
- Stoecklin G., Mayo T., Anderson P. ARE-mRNA degradation requires the 5′–3′ decay pathway. (2006) *EMBO Rep* 7: 72–77
- Taylor D.J., Frank J., Kinzy T.G. Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome and Elongation factors. In: Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B., eds *Translational Control in Biology and Medicine.* (2007) *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 59-85
- Teixeira S.M.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.* 279:22586-22594
- The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. (2005) *Science* 309: 409-415

- Tinton S.A., Schepens B., Bruynooghe Y., Beyaert R., Cornelis S. Regulation of the cell cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. (2005) *Biochem J* 385:155-63
- Tschudi C., Ullu E. Unconventional rules of small nucleolar RNA transcription and cap modification in trypanosomatides. (2002) *Gene Expression* 10:3-16
- Unterholzner L., Izaurralde E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. (2004) *Mol Cell* 16:587–596
- Urwyler S., Studer E., Renggli C.K., Roditi I. A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*. (2007) *Mol Microbiol* 63:218-28
- Vanhamme L., Postiaux S., Poelvoorde P., Pays E. Differential regulation of ESAG transcripts in *Trypanosoma brucei*. (1999) *Mol Biochem Parasitol* 102:35-42
- Van Hoof A., Green P.J. Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. (1996) *Plant J* 10:415–424
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J. The sequence of the human genome. (2001) *Science* 291:1304–51
- Voellmy R., Ahmed A., Schiller P., Bromley P., Rungger D. Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:4949-4953

- Vollrath D., Jaramillo-Babb V.L., Clough M.V., McIntosh I., Scott K.M. Loss-of function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome. (1998) *Hum. Mol. Genet.* 7:1091–98
- von der Haar T., Gross J.D., Wagner G., McCarthy J.E.G. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:503–511
- Wang H., Iacoangeli A., Popp S., Muslimov I.A., Imataka H. Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. (2002) *J. Neurosci.* 22:10232–41
- Webb H., Burns R., Ellis L., Kimblin N., Carrington M. Developmentally regulated instability of the GPI-PLC mRNA is dependent on a short-lived protein factor. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33:1503-12
- Welch W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. (1992) *Physiol Rev.* 72:1063-81
- Wen L.M., Xu P., Benegal G., Carvalho M.R.M., Buck G.A. PPB1, a putative spliced leader RNA gene transcription factor in *Trypanosoma cruzi*. (2000) *Mol Biochem Parasitol.* 110:207-221
- Westenberger S., Barnabé C., Campbell D.D., Sturm N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. (2005) *Genetics* 171: 527-543

- White T.C., Rudenko G., Borst P. Three small RNAs within the 10Kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to Domain VII of other eucaryotic 28S rRNAs. (1986) *Nucleic Acids Res* 14:9471-9489
- Willy P.J., Kobayashi R., Kadonaga J. A basal transcription factor that activates or represses transcription. (2000) *Science* 290:982-5
- Wilusz C.J., Wormington M., Peltz S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:237–246
- Wong A.K., Curotto de Lafaille M.A., Wirth D.F. Identification of a *cis*-acting gene regulatory element from the *lemdr1* locus of *Leishmania enrietti*. (1994) *J Biol Chem* 169:26497-26502
- Wu B., Hunt C., Morimoto R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. (1985) *Mol Cell Biol* 5:330-41
- Wurst M., Roblesa A., Poa j., Luua V.D., Bremsb S., Marentije M., Stoitsovaa S., Quijada L., Hoheiselb J., Stewart M., Hartmanna C., Clayton C. An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. (2009) *Mol Biochem Parasitol* 163:61–65
- Yamashita A., Chang T.C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C.Y., Shyu A.B. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. (2005) *Nature Struct. Mol. Biol.* 12:1054–1063
- Yang F., Schoenberg D.R. Endonuclease-mediated mRNA decay involves the selective targeting of PMR1 to polyribosome-bound substrate mRNA. (2004) *Mol. Cell* 14, 435–445

- Yang F., Peng Y., Murray E.L., Otsuka Y., Kedersha N., Schoenberg D.R. Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1. (2006) *Mol. Cell Biol.* 26:8803–8813
- Ye B., Petritsch C., Clark I.E., Gavis E.R., Jan L.Y., Jan Y.N. Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. (2004) *Curr. Biol.* 14:314–21
- Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781-791
- Yu M.C., Sturm N.R., Satio R.M., Roberts T.G., Campebell D.A. Single nucleotide resolution of promoter activity and protein binding for the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene. (1998) *Mol Biolchem Parasitol* 94:265-281
- Zilka A., Garlapati S., Dahan E., Yaolsky V., Shapira M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3' - untranslated region. (2001) *J Biol Chem* 276:47922-9
- Zomerdijk J. C., Kieft R., Shiels P. G., Borst P. α -Amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 19:5153, 1991.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-15

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)