

ROBERTA ALVARES CAMPOS

A chaperona ClpB/HSP104 de *Trypanosoma cruzi*



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA ALVARES CAMPOS

A chaperona ClpB/HSP104 de Trypanosoma cruzi

Orientador: Dr. Turán Péter Ürményi

Tese de Doutorado submetida à UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO como parte dos requisitos para a obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA).



*Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009*

Campos, Roberta Alvares.

A chaperona ClpB/HSP104 de *Trypanosoma cruzi*.

Roberta Alvares Campos. Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009. XVI, 126p. Il.

Orientador: Dr. Turán Péter Ürményi

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

1 - ClpB/HSP104. 2 - *Trypanosoma cruzi*. 3 - Regulação Gênica. 4 - Chaperona.

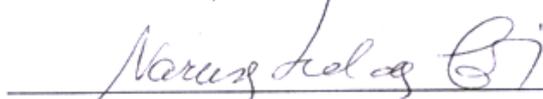
"A chaperona ClpB/HSP104 de *Trypanosoma cruzi*."

ROBERTA ALVARES CAMPOS

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

APROVADA POR:

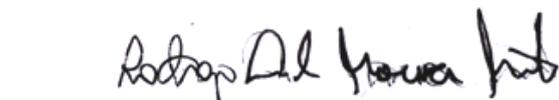
RIO DE JANEIRO, 15 DE SETEMBRO DE 2009.



PROF.^a NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



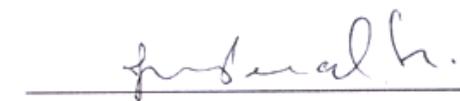
PROF. TURAN PETER URMENYI (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR



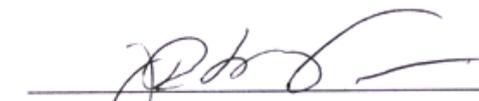
PROF. RODRIGO SOARES DE MOURA NETO (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR



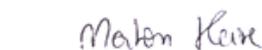
PROF.^a ALANE BEATRIZ VERMELHO (DOUTOR - UFRJ)



PROF. JOSÉ MAURO PERALTA (DOUTOR - UFRJ)



PROF. JOSÉ ROBERTO MEYER FERNANDES (DOUTOR - UFRJ)



PROF. NORTON HEISE (DOUTOR - UFRJ)

*“A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”.*

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Turán Péter Ürményi, por acreditar sempre na minha capacidade, por me deixar “livre para voar” nos meus caminhos pela Biofísica, pela sua paciência, sua compreensão em todos os momentos e amizade.

A todos os meus colegas do LMMFTC, em especial pela amizade, à Luisa Hoffmann, Caroline Lage, Juliene Ramos, Claudio Nunes, César Schmidt, José Bernardes, Ernesto Curty, Abdulwahab Al-Deib, Cíntia Simas e Giselle Gomes.

À Dra. Rosane Silva com carinho, pelo seu acompanhamento constante à minha Tese e experimentos de proteômica. Pelo seu bom humor incansável que alegria a todos em sua volta deixando tudo “mais leve” e pela sua amizade.

Ao Dr. Edson Rondinelli, com muito respeito, por ter me recebido em seu laboratório durante esses 4 anos.

Ao colega e amigo Giovani Veríssimo da Microbiologia/IMPPG com muito carinho, pela sua grande participação, pelo apoio de sempre, ensinamentos, pelos domingos perdidos no Fundão na eletroforese bidimensional e demais experimentos que realizamos juntos.

Ao Dr. José Mauro Peralta da Microbiologia/IMPPG com muito carinho, pelo seu acompanhamento semanal neste trabalho, ensinamentos preciosos, compreensão e amizade dedicada.

À amiga Manuela Leal com carinho, pelo bate-papo acompanhado pelos seus chás calmantes nas horas certas, por reservar sempre um cantinho para mim em sua sala. E principalmente, pela sua preciosa participação na modelagem tridimensional neste trabalho, com tanto afinco. “Nada como ter uma amiga Bioinformata”.

À Dra. Márcia Giambiagi de Marval da Microbiologia com carinho, pela sua idéia original do tema que deu origem a esta Tese, e pelo seu acompanhamento.

Ao Dr. Rodrigo Moura Neto com muito respeito, por sua grande gentileza de ter revisado este trabalho.

À minha amiga e colega de profissão da Fiocruz Flávia Fontenelle & Família com muito carinho, pela grande amizade e por sempre ter me recebido na sua casa como se eu fosse um membro de sua família no Rio de Janeiro.

Ao meu noivo e companheiro Fabiano Calsolares Relva com muito carinho e amor, por tudo, sem palavras!

À Família Carioca do meu noivo, com muito respeito, pelo grande apoio e por ter me dedicado o carinho de sempre e um pouso seguro no Rio de Janeiro.

A minha Família Gaúcha que está no Sul do Brasil, com muito carinho. Em especial a minha querida MÃE, ELISABETE, com muito amor, que a 2.000 km de distância, sempre acreditou em mim, pelo seu incentivo e apoio, por sentir tanto orgulho da sua filha. Em especial a vocês, eu dedico este trabalho!

RESUMO

O gene *clpb/hsp104* de *Trypanosoma cruzi* foi identificado e caracterizado quanto a sua estrutura gênica, sítios de processamentos e expressão gênica durante o choque térmico. Foi realizado o mapeamento completo e o fechamento da lacuna de sequência (*gap*) do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi* disponível em banco de dados, que havia sido gerado com erro de orientação/montagem de *contigs*. Este gene codifica uma proteína de 868 aminoácidos, com identidade de 71,9% entre os tripanossomatídeos *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. Análises realizadas por *Southern blot* são compatíveis com o gene *clpb/hsp104* estar presente no genoma de *T. cruzi* em cópia única. A variação dos níveis do mRNA foram investigadas por qRT-PCR em diferentes temperaturas (37 e 40 °C) de incubação, em que ocorre um aumento do teor de 3,67 vezes do mRNA quando as culturas são incubadas a 37 °C por 3 horas. Análise por *western blot* com anticorpo policlonal anti-HSP100 de *L. major* identificou uma proteína de 97 kDa em todos os extratos citosólicos de proteínas totais tanto de *T. cruzi* como de *L. major*, nas diferentes temperaturas de incubação. Análises em géis 2D-IEF e 2D-*Immunoblotting* com anticorpo anti-HSP100 reconheceu uma única isoforma com pI aproximado de 6,5 tanto em extratos protéicos sem choque térmico a 29 °C, e o número de isoformas parece aumentar após 37 °C por 24 horas. Análises por *western blot*, utilizando soros de pacientes Chagásicos, testou a capacidade antigênica da proteína ClpB/HSP104, que reconheceu uma proteína de peso molecular de 97 kDa em todos os extratos citosólicos. Por fim, a estrutura protéica de ClpB/HSP104 de *T. cruzi* foi proposta por modelagem molecular utilizando como molde a estrutura da proteína ClpB/HSP104 de *Thermus thermophilus*.

ABSTRACT

The *clpb/hsp104* gene structure, RNA processing sites and gene expression during heat shock of *Trypanosoma cruzi* was characterized. The complete mapping and closing of the sequence gap of the *clpb/hsp104* gene of *T. cruzi*, available in the public databases in incorrectly assembled contigs, was obtained, and the gene codes for a protein of 868 amino acids, showing 71.9% identity with the corresponding proteins from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. A southern blot analysis suggests that the *clpb/hsp104* gene is present in the genome of *T. cruzi* as a single copy gene. Variations in the levels of mRNA were investigated by qRT-PCR at different temperatures (37 °C and 40 °C) of incubation, and shown to increase by 3.67 fold when the cultures were incubated at 37 °C for 3 hours. Western blot analysis using a polyclonal antibody anti-HSP100 of *L. major* recognized a protein of 97 kDa in all protein extracts of *T. cruzi* and of *L. major*, in the different temperatures of incubation. Two dimensional and 2D-Immunoblotting analyses with polyclonal antibody anti-HSP100 of *L. major* recognized only one isoform with a pI of approximately 6,5 in protein extracts of cells incubated at 29°, and additional isoforms appear when cells are incubated at 37 °C for 24 hours. Western blot analysis using chagasic patients' sera tested the immunogenicity of the ClpB/HSP104 protein, where the pool of sera recognized a protein of molecular weight of \approx 97 kDa in all protein extracts. Finally, the protein structure of ClpB/HSP104 de *T. cruzi* was proposed by molecular modelling using as template the structure of the ClpB/HSP104 protein of *Thermus thermophilus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. O Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	19
FIGURA 2. Característica dos domínios de Clp/HSP100	30
FIGURA 3. Atividade das proteínas Clp/HSP100	31
FIGURA 4. O hexâmero de TClpB104 de <i>T. thermophilus</i>	36
FIGURA 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas Clp/HSP100	63
FIGURA 6. Sequência parcial da região codificante do gene de <i>clpb/hspP104</i>	66
FIGURA 7. PCR de parte da região codificante do gene de <i>clpb/hsp104</i> de <i>T. cruzi</i>	67
FIGURA 8. Padrão de fragmentos genômicos de <i>clpb/hsp104</i>	68
FIGURA 9. Mapa esquemático do <i>scaffold</i> contendo a sequência do gene <i>clpb/hsp104</i>	69
FIGURA 10. Alinhamento da sequência de aminoácidos ClpB/HSP104	72
FIGURA 11. Esquema da posição e orientação corretas dos <i>contigs</i> contendo a sequência do gene de <i>clpb/hsp104</i>	73

FIGURA 12. Alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína ClpB/HSP104 de tripanossomatídeos	74
FIGURA 13. Amplificação por PCR da região codificante completa do gene <i>clpb/hsp104</i> de <i>T. cruzi</i>	75
FIGURA 14. Alinhamento da sequência predita de aminoácidos de ClpB/HSP104 de tripanossomatídeos	76
FIGURA 15. Alinhamento estrutural comparativo com proteínas ClpBs e ClpAs de alguns organismos	77
FIGURA 16. Análise filogenética das sequências de aminoácidos conservadas de Clp/HSP100 de diferentes organismos	80
FIGURA 17. Amplificação por RT-PCR da região 5'UTR do mRNA <i>clpb/hsp104</i> de <i>T. cruzi</i>	82
FIGURA 18. Sequência do clone da UTR 5' sítio de <i>trans-splicing</i>	83
FIGURA 19. Análise dos níveis do mRNA de <i>clpb/hsp104</i> em diferentes temperaturas por qRT-PCR	85
FIGURA 20. Perfil eletroforético e detecção de ClpB/HSP104	88
FIGURA 21. Perfil eletroforético bidimensional de proteínas citosólicas de <i>T. cruzi</i>	92
FIGURA 22. Imunoblotting bidimensional da fração citosólica de extratos de <i>T. cruzi</i> utilizando anticorpo anti-HSP100	93

FIGURA 23. Análise por <i>western blot</i> com soros de pacientes Chagásicos com anticorpo anti-HSP100	96
FIGURA 24. Alinhamento de sequência de aminoácidos de ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i> e a ClpB/HSP104 de <i>Thermus thermophilus</i> (1QVR)	99
FIGURA 25. Gráfico de Ramachandran para validação do modelo da proteína ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i>	102
FIGURA 26. Modelo construído por modelagem comparativa para a proteína ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i>	103
FIGURA 27. TClpB104 de <i>T. thermophilus</i> X modelo do monômero construído por modelagem comparativa ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i>	105
FIGURA 28. Modelo construído por modelagem de ClpB/HSP104 com peptídeos propostos em destaque	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação das famílias de <i>Heat Shock Proteins</i>	25
TABELA 2. Relação dos oligonucleotídeos	44
TABELA 3. Resultado de busca por palavra-chave por sequências do gene <i>clpb/hsp100</i> em banco de dados	62
TABELA 4. Tampões e métodos de precipitação de extratos de proteínas citosólicas de <i>T. cruzi</i> testados na reidratação de fitas e métodos de focalização de géis 2DE/SDS-PAGE	90

ABREVIATURAS

µg - micrograma

µl - microlitro

µM - micromolar

2-DE - Eletroforese bidimensional

2D-IEF - *First Dimensional Isoelectric Focusing*

ABS - Absorbância

APS - Persulfato de amônio

ASB-14 - detergente *zwitterionic*

ATP - adenosina trifosfato

BCIP - bromo 4-cloro 3-indol-fosfato

CHAPS - detergente *zwitterionic*

clpb/hsp104 - nomenclatura do gene

clpb/hsp100 - nomenclatura do gene

ClpB/HSP104 - nomenclatura da proteína

ClpB/HSP104 - nomenclatura da proteína

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP/dXTP - deoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

HSP - Proteína de choque térmico (*heat shock protein*)

Hora - h

Kb - quilobase

kDa - quilodalton

kDNA - DNA de cinetoplasto

M - molar

mA - miliampere

mg - miligrama

minuto - min

mL - mililitro

mM - milimolar

MOPS - Ácido Propano Sulfônico

mRNA - RNA mensageiro

NaOH - Hidróxido de Sódio

NBT - *Nitro Blue Tetrazolium* (azul de nitrotetrazolio)

ng - nanograma

NBD - *Nucleotide Binding Domain*

°C - graus Celsius

ORF - fase aberta de leitura (*open reading frame*)

pb - pares de base

PBS - tampão salina-fosfato

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDB - *Protein Data Bank*

pH - potencial hidrogeniônico

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SL-RNA - RNA spliced leader

TBE - tris-borato EDTA

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamida

tRNA - RNA transportador

U - Unidade

UTR - região não traduzida (*untranslated region*)

V - volt

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios: de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro/IBCCF; de Diagnóstico de Doenças Infecciosas/IMPPG; de Física Biológica/IBCCF. Localizados no Centro de Ciências da Saúde, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2 Expressão e regulação gênicas em tripanossomatídeos	20
1.3 Proteínas de Choque Térmico	23
1.4 Expressão Gênica de HSPs em Cinetoplastídeos	26
1.5 As Chaperonas Moleculares HSP100	27
1.6 Expressão gênica de <i>clp/hsp100</i> em cinetoplastídeos	32
1.7 Predições de estruturas de proteína por modelagem comparativa	33
1.8 Estrutura da proteína ClpB/HSP104	36
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. MATERIAL E METODOS.....	38
3.1 Microrganismos	38
3.2 Clone de <i>T. cruzi</i>	38
3.3 Culturas de Células	38
3.3.1 Culturas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.3.2 Culturas de <i>Leishmania major</i>	38
3.4 Meios de cultura	39
3.5 Soluções	40
3.6 Oligonucleotídeos	44
4. DNAs - Preparações.....	45
4.1 Extrações de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
4.2 Quantificações de DNA	45

4.3 Análises para determinação da pureza do DNA	46
4.4 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)	46
4.5 Reações de ligação do vetor ao produto de PCR	46
4.6 Clonagens de fragmentos de DNA em vetores bacterianos	47
4.6.1 Indução de competência em <i>E. coli</i>	47
4.6.2 Transformação bacteriana	47
4.7 Extrações de DNA plasmidial em pequena escala	48
4.8 Digestões de DNA plasmidial e produtos de PCR com enzimas de restrição	48
4.9 Sequenciamento de DNA	49
4.10 Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT)	49
4.11 Eletroforeses de DNA em gel de agarose	49
4.12 Purificações de fragmentos de DNAs em gel de agarose	50
4.13 Marcações de sondas de DNA por iniciação randômica	50
4.14 Reações de hibridização de DNA à sonda homóloga	50
5. RNAs - Preparações.....	51
5.1 Extrações de RNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
5.2 Tratamento dos RNAs com DNase	51
5.3 Análise e determinação da pureza do RNA	52
5.4 Eletroforeses de RNA em gel de agarose desnaturante	52
5.5 Preparação de amostras de cDNA para ensaios em PCR Real Time qRT-PCR	52
6. Proteínas - Preparações.....	53
6.1 Obtenção de extratos citoplasmáticos para SDS-PAGE e 2-DE	53
6.3 Eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
6.4 Eletroforeses Bidimensionais (2-DE) com extratos de <i>T. cruzi</i>	55
6.4.1 - Primeiro passo - hidratação das tiras IEF	55

6.4.2 - Segundo passo - focalização da primeira dimensão	55
6.4.3 Terceiro passo – segunda dimensão	56
6.5 Fase de Equilíbrio I	56
6.5.1 Fase de Equilíbrio II	57
6.6 Transferências de proteínas para membranas de nitrocelulose ou PVDF a partir de géis SDS-PAGE ou 2-DE	57
6.7 Blotting e Immunoblotting 2-DE	58
6.7.1 Com anticorpo conjugado à Peroxidase	58
6.7.2 Com anticorpo conjugado à Fosfatase Alcalina	59
6.7.3 Géis preparativos para <i>Immunoblot</i> com soros Chagásicos	59
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
7.1 Caracterizações da estrutura gênica de <i>clpb/hsp104</i>	60
7.2 Caracterização da indução do mRNA do gene <i>clpb/hsp104</i> em resposta ao choque térmico	81
7.3 Caracterização da indução da proteína ClpB/HSP104 em resposta ao choque térmico	86
7.3.1 Eletroforese Bidimensional (2-DE) com extratos solúveis de <i>T. cruzi</i>	89
7.4 Investigação preliminar da capacidade antigênica da proteína ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i>	94
7.5 Construção de modelo tridimensional de ClpB/HSP104 de <i>T. cruzi</i> por Modelagem Comparativa	97
8. CONCLUSÕES.....	107
9. PERSPECTIVAS.....	108
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, um membro da família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da doença de Chagas, que afeta 20 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2009). Como mostrado na FIGURA 1, este parasita unicelular possui um ciclo de vida complexo com dois hospedeiros, um vertebrado e um inseto da família Reduviidae, apresentando formas celulares diferentes em cada hospedeiro (TYLER & ENGMAN, 2001).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do *T. cruzi* inicia-se após a ingestão de sangue infectado durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago do vetor, as formas tripomastigotas sanguíneas iniciam sua diferenciação em formas epimastigotas. Estas formas migram para o intestino onde se multiplicam. Na porção média e posterior do intestino, ocorre a diferenciação celular das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas), que são liberadas nas fezes e na urina do triatomíneo (BRENER & CHIARI, 1963; DE SOUZA, 2002). Durante o repasto sanguíneo de insetos infectados, parasitas podem ser eliminados nas fezes e podem infectar seus hospedeiros mamíferos através da pele (pequenas descontinuidades) ou pelas mucosas (ELIAS *et al.*, 2001).

Os tripomastigotas podem se desenvolver na grande maioria das células com exceção de alguns tipos celulares, como neutrófilos e basófilos. A entrada do parasita na célula hospedeira é um processo complexo. O tripomastigota metacíclico entra na célula de uma maneira polarizada, preferencialmente ao longo da parte basolateral da membrana, lugar das fibronectinas e receptores da célula hospedeira estão concentrados (SCHENKMAN, 1991).

Logo após a penetração do parasito, forma-se o vacúolo parasitóforo e se inicia a diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas em amastigotas, com posterior ruptura da membrana do vacúolo. Após sucessivas divisões dos

amastigotas no interior da célula, ocorre um processo de transformação dos mesmos em tripomastigotas sanguíneos, passando por um estágio intermediário. Logo que as formas adquirem um flagelo mais longo, inicia um movimento que pode ser responsável pela ruptura da membrana da célula hospedeira com a liberação de muitos tripomastigotas, algumas formas intermediárias e até formas amastigotas, para o espaço extracelular (DE SOUZA, 2002).

Um grande número de tripomastigotas sanguíneos é liberado na ruptura da célula. Estes parasitas podem ou não infectar outras células e tecidos, tais como sistema reticulo endotelial, sistema nervoso, músculo cardíaco, músculo esquelético ou serem ingeridos pelo inseto vetor, completando assim seu ciclo de vida (BRENER & CHIARI, 1963; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003; DE SOUZA, 2002) (FIGURA 1).

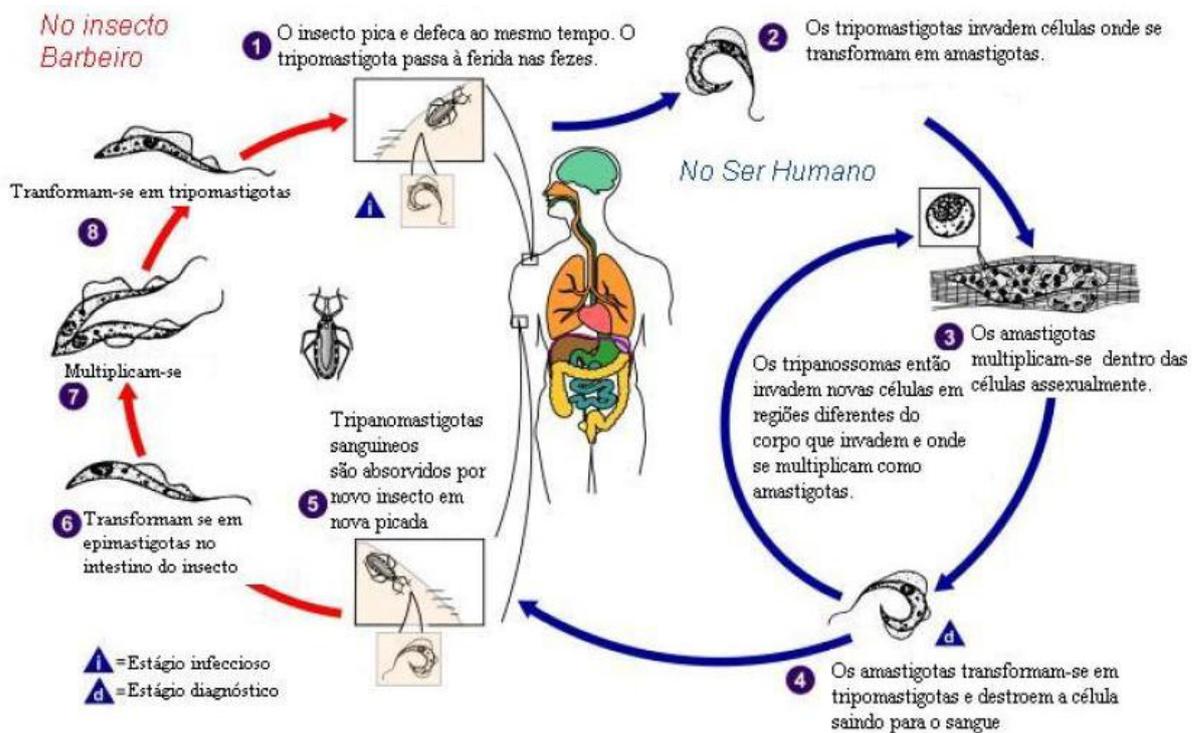


FIGURA 1. O Ciclo de vida do *T. cruzi*. (Modificado do CDC, 2009).

O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide com cerca de 22.520 genes codificantes de proteínas. O clone CL Brener que foi utilizado para o sequenciamento do genoma deste parasita é composta de muitas sequências repetitivas, e de genes que codificam proteínas, tais como retrotransposons da grande família de proteínas superfície, os quais incluem trans-sialidades (TS), mucinas, proteases (gp63) e as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP). Algumas das famílias de proteínas mais representativas que foram encontradas no sequenciamento do genoma de *T. cruzi* são: glicosiltransferases, RNA helicases, DNA helicases, cisteíno peptidases, proteínas hipotéticas, *ABC Transporters* e *Heat Shock Proteins* (HSPs) (EL-SAYED *et al.*, 2005).

1.2 Expressão e regulação gênicas em tripanossomatídeos

O controle da expressão dos genes em tripanossomatídeos é majoritariamente pós-transcricional, o que significa que as proteínas de ligação ao RNA possuem um papel fundamental na regulação. Vários elementos regulatórios já foram identificados nas regiões não traduzidas dos mRNAs (UTRs), que estão envolvidos na manutenção ou alteração da meia vida do RNA e de sua tradução (DI NOIA *et al.*, 2000; COUGHLIN *et al.*, 2000; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001). Proteínas capazes de interagir em *trans* com estes elementos foram identificadas por D'ORSO & FRASCH (2001), mas o mecanismo pelo qual elas funcionam permanece indefinido.

Os mecanismos que controlam a expressão dos genes em tripanossomatídeos dependem de diversos fatores de regulação. Conseqüentemente, estes parasitas podem reagir positivamente às mudanças rápidas associadas com as transições entre o vetor-hospedeiro, com reprogramação imediata da expressão gênica (DAVIS, 1996).

Os tripanossomatídeos são considerados um dos “mais antigos” grupos de organismos da escalada evolutiva, apresentando alguns mecanismos biológicos peculiares, tais como: a editoração do RNA, no qual os resíduos de uridina são inseridos e/ou deletados de alguns transcritos mitocondriais (KIM *et al.*, 1994); o *trans-splicing*, na qual uma sequência mini-exon, que é espécie-específica, é

adicionada ao 5'UTR de todos os mRNAs maduros, e a transcrição multigênica, no qual os genes são transcritos em grandes moléculas de RNA que correspondem a cópias de um mesmo gene ou de genes com funções e padrões de expressão distintos (TEIXEIRA *et al.*, 1995).

As unidades de RNA multigênicas são processadas através de reações de *trans-splicing* e poliadenilação para dar origem aos RNAs mensageiros maduros monocistrônicos. O *trans-splicing* é uma reação de processamento de RNA na qual sequências de duas moléculas separadas são associadas para formar um mRNA maduro. Em tripanossomatídeos, uma sequência, *spliced-leader* (SL) ou *mini-exon*, presente na extremidade 5' UTR de um pequeno RNA não poliadenilado (SL-RNA), é adicionada ao transcrito primário em um sítio de clivagem caracterizado pelo dinucleotídeo AG e um resíduo de adenosina (DAVIS, 1996).

As reações de *trans-splicing* e poliadenilação ocorrem através de clivagens dentro das regiões intergênicas. Ainda não há evidências para uma sequência sinal consenso conhecida para a poliadenilação (VAN HAMME & PAYS, 1995) e a reação parece ocorrer em uma região a montante, situada a uma distância conservada do sítio de corte e adição do *mini-exon* (LEBOWITZ *et al.*, 1993; SCHURCH & COLS, 1994). As regiões intergênicas apresentam motivos ricos em pirimidinas que parecem ser cruciais para o processamento correto do mRNA (HUANG & VANDER PLOEG, 1991; NOZAKI & CROSS, 1995).

Em geral os genes de *T. cruzi* organizam-se em aglomerados e são separados por regiões intergênicas curtas, tais como os genes de α - e β -tubulina (SEEBECK *et al.*, 1983), os genes HSP70 (VAN DER PLOEG *et al.*, 1985) e os genes ISG75 (ZIEGELBAUER *et al.* 1995). Tal organização deve-se, possivelmente à evolução do mecanismo incomum de transcrição e do processamento de mRNA dos cinetoplastídeos. A maioria dos genes que codificam proteínas nestes organismos são transcritos em um RNA multigênico e processados então aos mRNAs individuais que codificam um único polipeptídeo.

Estudos relacionados com a estabilidade de certos mRNAs propõem possíveis mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Esta estabilidade diferencial, de acordo com a forma evolutiva do ciclo do parasita, pode

estar em parte associada a presença de sequências reguladoras nas regiões não traduzidas. Estudos em *T. cruzi* demonstraram que a meia-vida do mRNA do gene amastina é sete vezes maior em amastigotas do que em epimastigotas, e que uma região na 3'UTR é a responsável por esta diferença (TEIXEIRA *et al* , 1995). Este efeito é provavelmente mediado por fatores que se ligam na região 3'UTR e estabilizam o RNA em amastigotas (COUGHLIN *et al*, 2000). Também foi demonstrado que, em *T. cruzi*, moléculas de RNA mensageiro, podem ser mantidas estáveis e não associadas aos polissomas, no citoplasma. (GOLDENBERG *et al*, 1985).

Existem evidências que o controle da mobilização polissomal é um importante mecanismo na regulação pós-transcricional (DALLAGIOVANNA & COLS, 2001). Este mecanismo provavelmente está também associado às sequências nas UTRs o que leva à tradução diferencial dos RNAs. Em *Leishmania major* o gene da amastina tem a expressão regulada por um elemento em sua 3' UTR que modula a associação do transcrito deste gene a polissomos aumentando sua tradução (BOUCHER & COLS, 2002).

A recombinação tem sido bem documentada em tripanossomatídeos pelo fato de serem usados em manipulações experimentais do genoma e é a chave do mecanismo da variação antigênica que *T. brucei* usa para a evasão imune. Algumas classes de moléculas importantes não são encontradas nos genomas dos tripanossomatídeos como as da via de sinalização celular, que envolve a proteína G heterotrimérica incluindo receptores transmembrânicos, a maior parte dos receptores catalíticos, domínios SH2 e SH3, e fatores que regulam a transcrição. Alguns receptores catalíticos foram encontrados e todos são adenilato ciclases (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Apesar das sequências do genoma de *T. cruzi* estarem disponíveis em bancos de dados, em *websites* (TcruziDB e GeneDB), com dados de fechamento denominados completos deste genoma, muitas sequências de genes apresentam lacunas. Alguns cientistas consideram este fato como um erro na escolha do clone CL Brener, que foi utilizado para sequenciamento e a montagem das bibliotecas do projeto genoma de *T. cruzi*. Devido este clone ser derivado de um híbrido e por ter perdido as suas

características selvagens de virulência, quando comparada as demais cepas existentes.

1.3 Proteínas de Choque Térmico

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), HSPs são agrupadas em uma das famílias de proteínas mais estudadas entre as chaperonas moleculares. São proteínas que estão disponíveis em grande quantidade na célula, são conservadas na evolução das espécies e sintetizadas por uma grande variedade de organismos. Enquanto algumas são constitutivas, outras são marcadores de estresse celular (GEORGOPOULOS & MCFARLAND, 1993).

As proteínas HSPs são componentes chaves para o controle de qualidade da maquinaria celular. Estas proteínas são induzidas na célula quando a mesma é exposta a situações de estresse, como aumento da temperatura. Em tais circunstâncias, as proteínas HSPs agem facilitando a interação das proteínas parcialmente desenoveladas, estimulando as suas regiões hidrofóbicas expostas ao solvente, promovendo seu retorno ao *folding* protéico (ELLIS, & HEMMINGSEN, 1989).

Também podem agir tardiamente formando uma “câmara de isolamento”, como as proteínas HSP60, dentro da qual as proteínas mal enoveladas são mantidas, proporcionando-as um ambiente hidrofóbico adequado para o enovelamento correto e retorno a sua forma nativa (O'BRIEN *et al.*, 1992). Todo este processo complexo deverá ocorrer antes do controle de qualidade feito pelo complexo ubiquitina-proteossoma que vai marcar e recrutar essas proteínas parcialmente enoveladas e sem função específica para a via de degradação (PAUGAM *et al.*, 2003).

As proteínas HSPs são divididas em famílias e subclasses. São agrupadas de acordo com a sua função celular dentro da célula. Os principais grupos são HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e HSP10, e as proteínas de uma mesma família têm características e funções em comum (FINK, 1999) (TABELA 1).

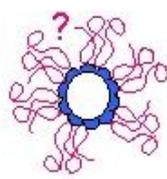
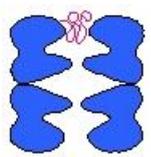
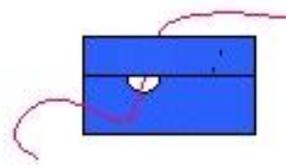
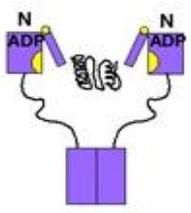
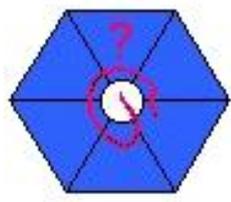
As diferentes famílias protéicas de chaperonas podem habitar diferentes organelas celulares. As HSP70 mitocondriais, por exemplo, são diferentes das do citosol. No retículo endoplasmático rugoso (RER) uma HSP70 especial (BIP) ajuda a dobrar as proteínas neste compartimento. Para realizar a sua função, as chaperonas obtêm energia com a hidrólise do ATP. Depois que a proteína enovelada se libera da chaperona para o citosol, a chaperona fica livre novamente, podendo ser reutilizada (KOMIYA *et al.*, 1996).

O endereçamento das proteínas, porém, é mais complexo do que a simples presença de sequências de direcionamento. Como no caso da mitocôndria, ele envolve vários subcompartimentos. As proteínas direcionadas para cada um desses subcompartimentos requerem informações de endereçamento específicas e vias de direcionamento que envolve fatores distintos a cada uma das etapas (DUBY *et al.*, 2001).

As chaperonas mais conhecidas são as HSP70. Essas proteínas não são específicas para o transporte mitocondrial, mas auxiliam tanto nesse aspecto, que a simples adição de HSP70 purificada é suficiente para estimular a importação de várias proteínas precursoras em experimentos *in vitro* (KOMIYA *et al.*, 1996).

Um grupo em especial de proteínas HSPs não são chamadas de chaperonas e sim de chaperoninas, e são somente duas famílias que atuam, geralmente em conjunto, que são as HSP10 e HSP60. Essas chaperoninas em *T. cruzi* já foram descritas e estudadas quanto a sua conformação, localização celular e função dentro da célula. Uma chaperonina HSP10 mitocondrial foi caracterizada estruturalmente por FERNANDES e colaboradores (2005), que construíram um modelo tridimensional para HSP10 de *T. cruzi* baseado em dados comparativos de cristalografia com a chaperonina GroES de *E. coli* (XU *et al.*, 1997). As características estruturais previstas, consideradas funcionalmente importantes para a maquinaria da célula, estão presentes também neste modelo construído para do *T. cruzi*. O ambiente hidrofóbico fornecido pela chaperonina para a interação com o substrato polipeptídico da estrutura modelo, foi fornecido pela interação do resíduo Phe74, e na superfície pelos resíduos Val34, Leu35 e Ile36 (FERNANDES *et al.*, 2005).

TABELA 1. Classificação das famílias de HSPs, conforme sua função celular:

Famílias	Função Celular	Modelo de substrato
Small HSPs (HSP10-25)	*Proteção contra estresse celular *Previne agregação	
HSP60 Chaperoninas Sistema (GroEL)	*Enovelamento protéico	
HSP70 Sistema (DnaK-BIP)	*Estabilização de cadeias laterais	
HSP90	*Sinalização e estabilização *Regulação de receptores esteróides	
HSP100 (Clps)	*Resolubilização de agregados *Enovelamento/Endereçamento *Termotolerância *Proteólise	

Detalhes em vermelho são representações das proteínas a serem desenoveladas; em azul, é a representação da conformação quaternária de cada cheperona. Adaptado de ZHANG, BEURON & FREEMONT (2002).

1.4 Expressão gênica de HSPs em Cinetoplastídeos

O sistema modelo de proteínas HSPs é encontrado em cinetoplastídeos. Sabe-se que para aumentar a expressão dessas proteínas a executar as suas funções e interagir com outras proteínas que estejam com a sua conformação não-nativa, depende que seus genes sejam diferencialmente expressos por choque térmico. Assim, a resposta ao choque térmico pode ser vista como um mecanismo homeostático geral que protege as células dos efeitos deletérios da adaptação ambiental em cinetoplastídeos (FEDER & HOFMANN, 1999).

Os cinetoplastídeos são organismos em que choque térmico é um evento natural de sua biologia, isto é, possuem um ciclo de temperaturas relativamente frescas em parte do seu ciclo de vida, e um segundo ciclo com temperaturas mais elevadas, quando habitam seus hospedeiros mamíferos. Esta mudança na temperatura é acompanhada de forte indução de HSPs (MARESCA & CARRATU, 1992). Como exemplo, análises proteômicas detalhadas durante a diferenciação do estágio de *L. donovani* e de *T. cruzi* mostraram síntese aumentada de HSP60, HSP70, HSP70 mitochondrial e HSP90 (BENTE *et al.*, 2003; PABA *et al.*, 2004). Entretanto, até o momento, não está claro se a expressão de HSPs é a parte do processo de diferenciação própria ou é um epifenômeno envolvido na adaptação à temperatura ambiental nova e circunstâncias de vida (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007)

Um gene ortólogo entre *Escherichia coli* e *L. major*, e o gene de uma levedura *clpb/hsp104*, foram utilizados em clonagens para expressão dessas proteínas pelo grupo de Joachim Clos, do Bernhard Nocht Institute/Alemanha (KROBITSCH *et al.*, 1998). Este grupo mostrou que o gene de *L. major* codifica uma proteína citoplasmática de aproximadamente 97 kDa que é detectável em células promastigotes de *L. donovani* e *L. major* após a exposição à 37°C por longos períodos (6 a 24h). Uma recolocação de ambos os alelos desta *clpb/hsp100* não afetava a viabilidade do promastigota sob condições padrão da cultura, mas reduzia consideravelmente a termotolerância celular. Experiências *in vitro* e *in vivo* com esta infecção indicaram um papel importante para HSP100 durante o desenvolvimento

das formas promastigotas e amastigotas (HUBEL *et al.*, 1997; KROBITSCH *et al.*, 1998).

1.5 As Chaperonas Moleculares HSP100

Os membros da família das chaperonas Clp/HSP100 estão presentes em eubactérias e em todos os eucariotos, promovendo como função geral, a dissociação e desagregação dos complexos protéicos parcialmente enovelados, que se formam após o estresse celular (DI XIA *et al.*, 2004). Fazem parte desta família as chaperonas ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpL, ClpM, ClpN, ClpX, ClpQ e ClpY (as duas últimas também podem ser denominadas de HslU) (ELLIS & HARTL, 1996; ZHANG, BEURON & FREEMONT, 2002; HOURY, 2001)

Segundo DOYLE & WICKNER (2008), as proteínas HSP100 pertencem a superfamília de ATPases, que possuem a característica de distinção AAA⁺ (ATPases associadas com as várias atividades celulares), que é uma família de proteínas que apresenta um sitio de ATP entre os aminoácidos 200-250, e que contém diversos motivos característicos, como: *Walker A*, *Walker B*, *Sensor 1*, *Sensor 2*, e os motivos dedo de arginina entre os aminoácidos 10-12. E que segundo esses autores pode receber outra subclassificação dentro desta subfamília: Classe I, são as proteínas que contém dois módulos (AAA⁺), dependentes de ATP que são as ClpAs, ClpBs, ClpCs, HSP104, HSP78; e a Classe II que contém as duas chaperonas menores que são as ClpXs e HslUs, que possuem somente um compartimento ou módulo dependente de ATP, também denominado de *Walker B* ou *NBD2* (*Nucleotide Binding Domain 2*), que é o motivo, neste caso, responsável pela desagregação de outras proteínas.

Estas proteínas podem atuar sozinhas ou através da formação de complexos conjugados, ou ainda ligadas a outras proteínas ou com ligação a adaptadores específicos (SCHIRMER & LINDQUIST, 1997; TORRES, ANINO, SCHLOTHAUER, 2003; RUTHERFORD, 2003). Cada uma delas compõe uma unidade específica com função e propriedades próprias, mas que estão intimamente ligadas a desagregação e o *refolding* protéico (MAURIZI & XIA 2004) (FIGURAS 2 e 3).

As chaperonas Clp/HSP100 pertencem à superfamília das proteínas AAA+ (ATPases associadas com uma variedade de atividades celulares) e são dependentes da energia obtida através da hidrólise do ATP (MAURIZI & XIA 2004).

Os módulos AAA+ das Clps/HSP100 servem como os motores para a maquinaria molecular e são usadas para gerar força para a desagregação e dissociação protéica. Estes módulos consistem em dois subdomínios, um maior α/β -domínio formado por 5 fitas antipareladas do tipo folhas- β flanqueadas por um par de hélices, conectadas por uma alça móvel ligada a um pequeno domínio α -hélice C-terminal (MAURIZI & LI 2001).

Localizado entre os dois subdomínios na cavidade central existe o principal sítio de resíduo catalítico para a hidrólise de ATP chamados de *Walkers A* e *B*, onde um ou mais resíduos funcionais, respondem positivamente as interações hidrofóbicas, quando as Clp/HSP100 entram em contato com uma proteína parcialmente desenovelada (Figura 2). O módulo mais próximo da parte N-terminal da proteína é chamado de *Nucleotide Binding Domain 1* (NDB1), e o módulo próximo ao C-terminal, que diferem em sequências e composição de aminoácidos, é chamado de NDB2. Estes módulos são altamente conservados em todas as Clps/HSP100 (MAURIZI & XIA, 2004).

A principal diferença estrutural entre as proteínas ClpA e a ClpB é a presença, nesta última, de um domínio *l-domain* ou *M-domain* (DOYLE & WICKNER, 2008), que situa-se entre os motivos NBD1 e NBD2, em azul claro (FIGURA 2). Esta estrutura, o *l-domain*, confere a ClpB três funções específicas: desagregação, ressolubilização e remodelamento (LEE *et al.*, 2003). Além desta diferença estrutural entre a ClpA e ClpB, SHORTER & LINDQUIST (2005) acrescentam outro diferencial a ClpB/HSP104, a presença de um resíduo ácido no C-terminal.

A estrutura quaternária das ClpB/HSP104 é em forma de hexâmero, formada de seis monômeros idênticos de alto peso molecular, que teve sua estrutura monomérica resolvida por cristalografia e sua dinâmica molecular da plasticidade estudada por LEE *et al* (2003). Para investigar a posição relativa e a função do principal motivo de reconhecimento de ClpB/HSP104 com poder de desagregação, este grupo também investigou mutantes de ClpB/HSP04, substituindo aminoácidos específicos

de posição dentro do principal motivo de reconhecimento de agregados, os motivos 1 e 2 que formam o domínio *l-domain*, cujos aminoácidos L396 e L340 foram substituídos por alaninas. Estes resíduos de leucina que foram substituídos estão localizados especificamente entre a interface de *ClpB/HSP104-linker* e o *D1-small domain*, que dão estabilidade e base ao longo domínio *l-domain*. Quando a posição do mutante L460A foi substituída a atividade da chaperona diminuiu 4 vezes. Quando o mutante era L396A a sua atividade diminuía em torno de 9 vezes. Quando era utilizado um duplo mutante L396A/L460A a sua capacidade de ajuda a outras proteínas durante o estresse diminuía mais de 20 vezes, mostrando que os aminoácidos de interface entre o *ClpB/HSP104-linker* e o *D1-small domain*, que dão suporte ao *l-domain* são essenciais para a sua atividade de desagregação (LEE *et al.*, 2003).

Apesar da autosuficiência das chaperonas ClpB/HSP104 a interação entre este hexâmero com o sistema HSP70/DnaK,DnaJ, GroEL acontece para a realização de funções importantes como dissolução de pequenos agregados de proteína (PARSELL *et al.*, 1994). *In vitro*, os dois sistemas de chaperonas atuam juntos para desenovelar agregados insolúveis que nenhuma outra chaperona pode atuar eficientemente sozinha (GOLOUBINOFF, *et al.*, 1999). Além disso, ClpB/HSP104 e o sistema DnaK,DnaJ, GroEL atuam sinergeticamente para remodelar agregados que cada uma poderia atuar em separado, aumentando a rapidez do processo (DOYLE *et al.*, 2007) (LEE *et al.*, 2003). Mas este processo ainda não está muito claro, pois a arquitetura de acoplamento deste complexo, ClpB/HSP104 e DnaK,DnaJ, GroEL, ainda não foi bem elucidado e em que condições específicas de estresse a célula depende dele (SHORTER & LINDQUIST, 2005).

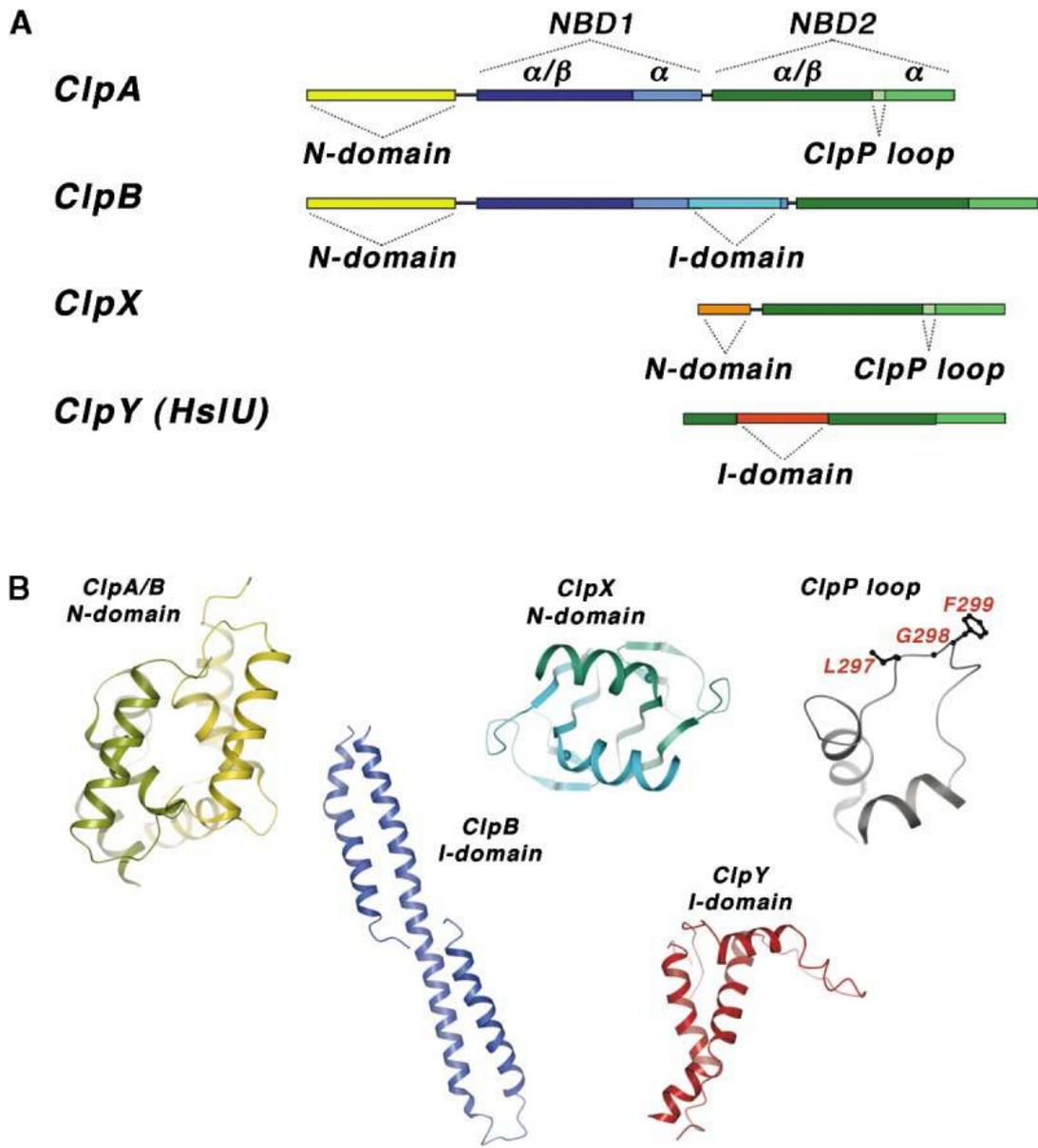


FIGURA 2. Características de domínios específicos que compõem cada tipo de chaperona molecular Clp/HSP100 (A). Composição das estruturas secundárias formadas de cada proteína (B). (Modificado de MAURIZI e XIA, 2004).

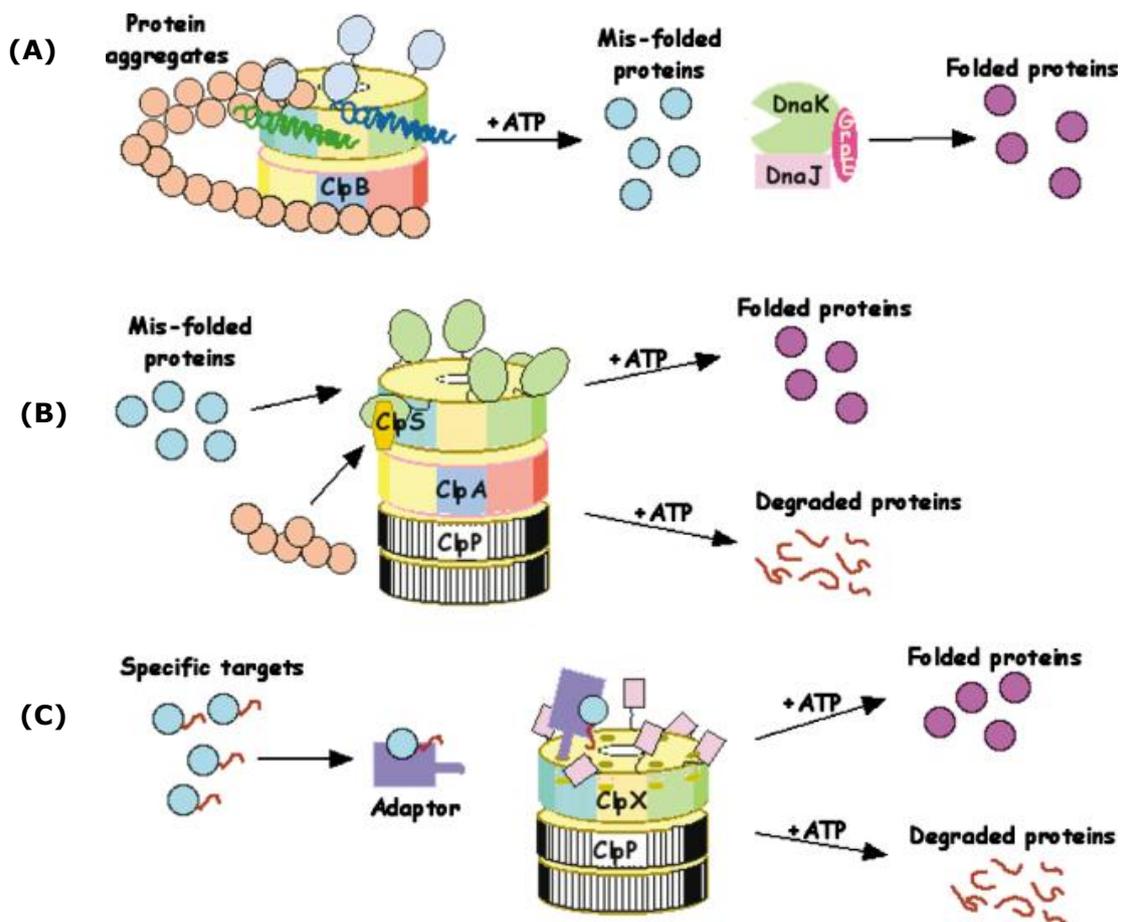


FIGURA 3. Atividade das proteínas Clp/HSP100. ClpB/HSP100 desagregando proteínas e recrutando outras chaperoninas para o *refolding* (A). ClpA/HSP100 pode reconhecer motivos específicos para seleção de marcas nas proteínas parcialmente enoveladas e ainda pode auxiliar as demais chaperonas a desagregar emaranhados protéicos, na presença do adaptador ClpS (B). ClpX/HSP100 requer uma sequência do motivo adaptador específico, para reconhecer seu substrato e formar um complexo ternário para ser eficientemente endereçado ao *refolding* ou para a degradação pela ubiquitina no proteossoma (C). Modificado de: MAURIZI & XIA, 2004.

1.6 Expressão gênica de *clp/hsp100* em cinetoplastídeos

A observação de que o aumento de temperatura induzia a ativação transcricional em determinadas regiões dos cromossomos gigantes (*puffing* em cromossomos politênicos) de *Drosophila* (RITOSSA, 1962) impulsionou as primeiras explorações do mecanismo de termotolerância (BECKER & CRAIG, 1994; FEDER, 1995). Segundo este fenômeno, um primeiro estresse subletal torna a célula tolerante a um subsequente estresse extremo (BECKER & CRAIG, 1994; FEDER, 1995; LINDQUIST, 1986). A deleção do gene de Hsp104 e de Hsp70 em levedura mostrou que as proteínas de estresse não só estão relacionadas com termotolerância, como são vitais para este fenômeno (CRAIG & JACOBSEN, 1984).

Estudos com a expressão gênica e a caracterização das proteínas Clp/HSP100 em resposta ao choque térmico em Cinetoplastídeos foram com *Leishmania* spp. HÜBEL e colaboradores (1995) identificaram um gene de cópia única ortólogo ao *clpb/hsp100* da levedura *Saccaromyces cerevisiae* demonstrando a presença desta proteína no citoplasma da célula, que codificava um mRNA de baixa abundância, mas que induzia o enovelamento de outras proteínas quando a células promastigotas do parasita eram submetidas ao choque térmico.

HÜBEL e colaboradores (1997) realizaram testes experimentais super-expressando *clpb/hsp104* de *L. major*, para testar a sua termotolerância em células promastigotas a amastigotas, e *in vivo* com a infecção de camundongos BalbC com mutantes nocautes para o gene, resultando em perdas ou até mesmo o não surgimento das lesões cutâneas características dos animais infectados, quando comparados com os camundongos infectados com o gene super-expressado *clpb/hsp100* de *L. major* do tipo selvagem.

A indução de síntese por aquecimento foi observada com as proteínas HSP100 e os resultados corresponderam respectivamente ao teor intracelular das HSP100 em *L. donovani*. Para este experimento foram utilizadas culturas de células promastigotas de *L. donovani* incubadas a 25°C e a 37°C durante 24 horas. Análises por *imunoblotting*, das proteínas recombinantes eram quantificadas e os montantes comparados entre as diferentes condições de incubação, mostraram um aumento dos

níveis da proteína de 6 a 7 vezes maior nas células aquecidas a 37°C durante as 24 horas de estresse celular (KROBITSCH *et al.*, 1998).

A indução de uma proteína de aproximadamente 100 kDa em resposta ao choque térmico em *T. cruzi* já foi descrita por nosso laboratório anteriormente, com culturas contendo formas epimastigotas foram submetidas ao choque térmico a 37°C, por 2 horas. Posteriormente fez-se a preparação de extratos protéicos citosólicos marcados com Metionina [³⁵S] para análises em gel 2D-IEF. Neste ensaio evidenciou-se que na forma epimastigota de *T. cruzi* estão presentes de 8 a 9 proteínas induzíveis por calor (DE MARVAL *et al.*, 1996).

1.7 Predições de estruturas de proteína por modelagem comparativa

Um dos grandes desafios da bioinformática começa a aparecer na era pós-genômica, na qual a proteômica se torna um dos principais alvos de estudo juntamente com o entendimento estrutural e funcional de proteínas. A pesquisa de proteínas em bioinformática utiliza-se de anotações de proteínas e bancos de dados de eletroforese bidimensional. Após a separação, identificação e caracterização de uma proteína, o próximo desafio na bioinformática é a predição de sua estrutura (DA SILVEIRA, 2005).

Biólogos usam a bioinformática para manusear o vasto e complexo conjunto de dados de cristalografia de raios X e RMN (Ressonância Magnética Nuclear). A interação das áreas que têm contribuído para a formação e o desenvolvimento da bioinformática (BAYAT, 2002), para predizer modelos 3D de moléculas de proteínas por modelagem molecular comparativa (BURLEY *et al.*, 1999).

O rápido aumento no número de estruturas 3D disponíveis em bancos de dados como o PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN *et al.*, 2000), e os avanços que esta ferramenta trouxe para biologia molecular e seus os experimentos de bancada foi grandioso. Levando os pesquisadores, principalmente os que trabalham com a expressão de proteínas, a busca de profissionais ligados a bioinformática estrutural.

O principal foco desta busca é a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural a níveis atômicos. Assim, a predição de estruturas 3D de proteínas permanece uma área de grande interesse, sendo que a principal categoria de predições de estruturas de proteínas tem sido a modelagem molecular comparativa, baseada na alta homologia de uma sequência por uma estrutura conhecida (SÁNCHEZ & SALI, 1997).

Os projetos de sequenciamento de genomas completos têm nos fornecido uma enorme quantidade de dados, possibilitando a análise em larga escala das estruturas 3D obtidas através do método de modelagem molecular comparativa daquelas estruturas não determinadas por cristalografia de raios X e RMN, tal como o genoma do *T. cruzi*.

As atuais análises de bioinformática vêm nos munindo de grande quantidade de dados armazenados em bancos de dados públicos, podendo ser utilizados no cruzamento de dados, obtendo inúmeras informações relevantes ao avanço em pesquisas biológicas e tecnológicas no estudo de proteínas e de outras áreas relevantes (DA SILVEIRA, 2005).

Atualmente, modelos comparativos estão sendo usados em conjunto com *screening* virtual para identificar novos inibidores. Uma série de trabalhos demonstra o sucesso no uso de modelos estruturais para auxiliar no desenho racional de drogas contra parasitas. Modelos comparativos foram usados em simulações de *docking*, identificando uma baixa constante de inibição para inibidores não peptídicos de proteases em malária e schistosoma (RING *et al.*, 1993). Adicionalmente, modelos comparativos foram usados para justificar a afinidade de ligantes pelo sítio de ligação em *Entamoeba histolytica* (QUE *et al.*, 2002).

Atualmente, a única maneira prática de explorar interações proteína-ligante para um número maior de sistemas é o uso de modelos moleculares de estruturas de proteínas, estabelecendo um limite mínimo de identidade com o *template* de 40%, podendo variar de acordo com a aplicação a que o modelo será submetido (Figura 4). Uma aproximação alternativa no programa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993), procura satisfazer restrições estruturais expressas como função densidade de probabilidade, as quais são derivadas de outras proteínas homólogas.

O primeiro passo para o desenho de alvos de interesse inclui a determinação da estrutura da proteína alvo por um dos três principais métodos usados para desenho de drogas: cristalografia de raios X, RMN, ou modelagem molecular comparativa de estruturas de proteínas. Uma vez que o alvo foi identificado, é necessário se obter informações sobre a precisão estrutural.

Todas as estruturas devem ser avaliadas por vários programas para determinar desvios do comprimento de ligação com relação à geometria ideal, as quais não devem ser maiores que 0,015 Å ou 3° para ângulos de ligação. Átomos planares não devem estar mais que 0,015 Å fora do plano e não deve haver centros quirais incorretos. Finalmente, no mínimo 90% dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal devem cair na região mais favorável do gráfico de Ramachandran. O conjunto destes parâmetros irá garantir uma maior precisão aos modelos (ANDERSON, 2003).

As estruturas tridimensionais de proteínas com alto grau de similaridade são conservadas durante o processo de evolução, sobretudo no que diz respeito aos resíduos funcionais, pois a conservação da estrutura é crucial para a manutenção e desempenho de funções específicas. As maiores divergências entre proteínas similares ocorrem com mais frequência em regiões próximas da superfície tridimensional, ou seja, nos *loops*, sem estrutura secundária definida. Nessas regiões, até mesmo as propriedades físico-químicas dos resíduos que sofreram mutações são muito diferentes dos resíduos anteriores ao processo de mutação. Em geral, os resíduos localizados no interior das proteínas variam com menor frequência, e quando o fazem, ocorrem, normalmente, com menor distinção de propriedades físico-químicas. Habitualmente, certo conjunto de resíduos de aminoácidos que compreendem o núcleo da proteína e os principais elementos de estrutura secundária permanece mais conservado dentro de uma família de proteínas similares (HÖLTJE *et al.*, 2003).

1.8 Estrutura da proteína ClpB/HSP104

A estrutura das proteínas ClpB/Hsp104 é em forma de hexâmero formada de 6 monômeros complexos e com funções independentes, a sua estrutura em cristal de *Thermus thermophilus* foi resolvida por LEE e colaboradores (2003) (FIRURA 4).

Apesar da autosuficiência das chaperonas ClpB/HSP104, a interação entre este hexâmero e o sistema da chaperona HSP70/DnaK acontece para a realização de funções importantes como dissolução de pequenos agregados de proteína (PARSELL *et al.*, 1994). *In vitro*, os dois sistemas de chaperonas atuam juntos para desagregar agregados insolúveis que nenhuma chaperona pode atuar eficientemente sozinha (GOLOUBINOFF *et al.*, 1999). Além disso, ClpB/HSP104 e o sistema de DnaK atuam sinergicamente para remodelar agregados que cada uma poderia atuar em separado, aumentando a rapidez do processo (DOYLE *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2003).

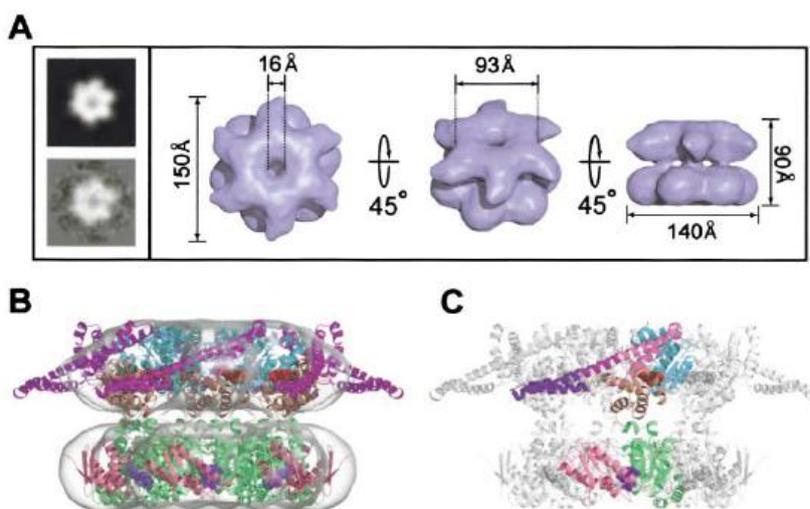


FIGURA 4. (A) O hexâmero de TClpB104 de *Thermus thermophilus* mostrando os ângulos das estruturas e a sua interação com a chaperona Hsp70/DnaK. (B) Modelo do hexâmero de TClpB104 mostrando os principais domínios da proteína e sua interação com Hsp70/DnaK (C) Detalhe da ligação do monômero de cada domínio de ligação. (LEE *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O ciclo de vida do *T. cruzi* inclui a sua transmissão pelo inseto hospedeiro Reduvidae, um animal poiquilotérmico, para o hospedeiro mamífero homeotérmico. Esta transição de hospedeiros acarretou uma adaptação seletiva a termotolerância do sistema de expressão gênica em *T. cruzi*. Neste cenário, o papel das proteínas ClpB/HSP104 na desagregação, enovelamento, checagem e endereçamento das demais proteínas presentes no citosol do parasita é essencial para sua sobrevivência. Conseqüentemente, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a estrutura e expressão gênica da chaperona ClpB/HSP104 de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Caracterizar a estrutura gênica de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*.
- II. Investigar a indução do mRNA de *clpb/hsp104* em resposta ao choque térmico.
- III. Investigar a indução da proteína ClpB/HSP104 em resposta ao choque térmico.
- IV. Estudo da estrutura tridimensional da proteína ClpB/HSP104 por modelagem comparativa.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Microrganismos

Cepas de *Escherichia coli* DH5 α F'IQ (HANAHAN, 1983), *supE44* Δ *lac* U169 (Δ 80*lacZ* Δ 15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

3.2 Clone de *T. cruzi*

CL Brener (CANO *et al.*, 1995).

3.3 Culturas de Células

3.3.1 Culturas de *Trypanosoma cruzi*

Utilizamos células de *Trypanosoma cruzi* formas epimastigotas que eram mantidas em cultura axênica em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 29°C com repiques semanais de densidade populacional de 1×10^7 células/mL para outros experimentos que envolviam indução por choque térmico as culturas foram incubadas a 37°C e 40°C por 3, 6 ou 24 horas.

3.3.2 Culturas de *Leishmania major*

Utilizamos células de *Leishmania major* cepa *Friedlin* (CHIURILLO & RAMÍREZ 2002), promastigotas como controle para os experimentos de *western blot*, que envolveram a utilização de extratos protéicos de *T. cruzi*. Com incubação anticorpo monoclonal anti-HSP100 de *Leishmania major* produzido a partir de um recombinante em galinha e purificado em gema de ovo (*chicken egg yolk*) pelo grupo de JOACHIM CLOS (Bernhard Nocht Institute/Alemanha). As células promastigotas eram mantidas em meio Schneider (Gibco), adicionado de urina filtrada a 2% e gentamicina (100 μ g/mL). Incubadas a 29°C com repiques a cada 5 dias para a densidade populacional de 1×10^7 células/mL.

3.4 Meios de cultura

Meio LIT (Infusão de fígado-tripticase)	NaCl 75mM KCl 5,4mM Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O) 62mM Glicose 0,2% Bacto-triptona 0,5% (w/v) Infusão de fígado 0,5% (w/v) pH ajustado a 7,2 com NaOH 1N
Meio LB (Luria Bertani)	Bacto-triptona 1% Extrato de levedura 0,5% NaCl 85mM pH ajustado a 7 com NaOH 5N
Meio LB-agar	Meio LB Agar 1,5% (w/v)
Meio Schneider Completo - <i>insect medium</i>	<i>Powder Schneider</i> (Sigma) L-glutamina (1%) Bicarbonato de Sódio a 7,5% pH ajustado a 9,0 com Hidróxido de Sódio 1N logo após, descer o pH ajustado até 6,9 com HCl 1M Cloreto de Cálcio a 0,6% pH ajustado a 6,6 com HCl 1M Filtrou-se o meio com membrana Millipore Φ 0,20 Adiciona-se urina filtrada 2% Soro Fetal Bovino 20% Gentamicina 100 μ g/mL

3.5 Soluções

Acri-bis 30%	Acrilamida 29,2% (w/v) Bisacrilamida 0,8% (w/v)
GET	Tris-HCl pH8,0 25mM EDTA 10mM Glicose 50mM
PBS 1X	NaCl 140mM KCl 2,7mM Na ₂ HPO ₄ 8mM KH ₂ PO ₄ 1,5mM Glicose 5,5mM pH ajustado 7,5
MOPS 10x	MOPS 1mM Acetato de Sódio 2mM EDTA 0,5M pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N
TBS 1X	TRIS 20mM NaCl 137mM Tween 0,05% (v/v) pH ajustado a 7,6 com HCl 1M
Solução de Azul de Coomassie	Metanol 45% (v/v) Ácido acético 10% (v/v) Azul de coomassie G250 0,2% (w/v)
Solução de bloqueio	PBS-T 0,05% leite em pó desnatado
Solução de Denhardt 5x	Ficol 400 1% 50x Polivinilpirrolidona 1% BSA 1%
Solução de desnaturação	NaOH 0,5M NaCl 1,5M

Solução de extração de RNA 1	Solução de hidrocloreto de guanidina 99,92% (v/v) 2-mercaptoetanol 0,08% (v/v)
Solução de extração de RNA 2	Solução de Isotiocianato de guanidina 92% (v/v) 2-mercaptoetanol 8% (v/v)
Solução de hidrocloreto de guanidina	Hidrocloreto de guanidina 6M pH 7,5 EDTA 25mM
Solução de isotiocianato de guanidina	Tris-HCl 50mM pH 7,5 Isotiocianato de guanidina 4M EDTA 25mM
Solução de lavagem 1	SSC 1% (v/v) SDS 0,1% (v/v)
Solução de lavagem 2	SSC 0,1% (v/v) SDS 0,1% (v/v)
Solução de neutralização	Tris-HCl pH 8,0 0,5M NaCl 1,5M
Solução de pré-hibridização	Formamida 50% (v/v) DNA de esperma de salmão 100ng/mL Tampão fosfato 50mM SSC 5x Denhardt 5x
Solução de Reveladora	NBT 1% (v/v) Dimetilformamida 10% Tampão Tris-HCl 100mM pH 9,5 MgCl ₂ 5mM BCIP 1% (v/v) Tampão de Substrato 98% (v/v)
Solução de Ressuspensão	Tris-HCl 50mM pH 7,5 EDTA 2mM

	NaCl 0,1M
Solução de Reidratação tiras 2-DE	Uréia 7, 8 ou 9M Tiouréia 1 ou 2M CHAPS (2 ou 4%) Sol. de Bromofenol Blue 1% (0,002% w/v) DTT 40mM Anfolinas pH 4-7 a 2% ou 4%
Solução de Vermelho de Ponceau	Vermelho de Ponceau 0,025% (w/v) Ácido Tricloroacético 3%
Solução descorante para SDS-PAGE	Metanol 5% (v/v) Ácido acético 7%(v/v)
SSC 10x	NaCl 3M Citrato de Sódio 0,3M
Tampão de amostra 6X para gel de agarose	Azul de bromofenol 0,025%(w/v) Xileno-cianol 0,025%(w/v) Glicerol 30%(v/v)
Tampão de amostra de RNA	Formamida deionizada 50%(v/v) Formaldeído 6%(v/v)
Tampão de amostra de proteína 6x	SDS 2%(v/v) DTT 10mM Azul de bromofenol 0,02% (w/v) Glicerol 10%(v/v)
Tampão Fosfato 10x	Na ₂ HPO ₄ 0,3mM Na H ₂ PO ₄ 5mM NaCl 72,6mM
Tampão de Substrato	Tris-HCl 1,2% (w/v) MgCl ₂ 0,1M azida sódica 0,01%
Tampão de Transferência <i>Western blot</i>	NaHCO ₃ 13 mM Metanol 20% (v/v)

	pH ajustado a 9,9 com HCl 5M
Tampão de corrida Tris-Glicina	Tris-HCl 0,1M Glicina 0,7% (w/v)
TE-4	Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA 0,1mM
TBE	Tris-borato 90mM EDTA 1mM pH8,0 pH ajustado a 7,5
TE	Tris-HCl 10mM pH8,0 EDTA 1mM
TNE	Tris-HCl 1M pH 7,6 NaCl 5M EDTA 0,5M pH8,0

3.6 Oligonucleotídeos

TABELA 2. Relação dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Nome dos iniciadores	Sequências (5'-3') *	Sítio de restrição	Uso
Tc100.RevCDR	GCAAGCACAGTAATGGCTTTTGG	-	Amplificação da sonda de 980pb da região codificante de HSP104
Tc100.ForCDR	CACGTACTGGCATGAAGCG	-	Amplificação da sonda de 980pb da região codificante de HSP104
TC100.Rev3UTR	GTCTCGGAGGCTATTCTGC	-	Amplificação da região 3UTR do gene <i>clpb/hsp104</i>
TC100.For5UTR	CGTTGGTCCATTCTGGCTG	-	Amplificação da região 5UTR do gene <i>clpb/hsp104</i>
FechaGAP/HSP100	GCTCCATGTACTCGCTCATGTCAAT	-	Amplificação da região da lacuna de sequência do gene <i>clpb/hsp104</i>
3SmaI	TATAAT CCC ↓ GGG TACTCCGACAAAGACGAGCGC	SmaI	Amplificação da região codificante total do gene <i>clpb/hsp104</i>
5BamHI	AG CGTG ↓ GAT CCATGTGTCAGACGGGCAG	BamHI	Amplificação da região codificante total do gene <i>clpb/hsp104</i>
ME-TCruzi	GGATGGAATTCAGTTTCTGTACTATATTG	-	Sequência do mini-exon de <i>T. cruzi</i>
TO-5MENSG	ACGAGCGTCTAACGCTGAAGG	-	Amplificação de uma região codificante de 100pb de <i>clpb/hsp104</i> próximo a 5UTR para ensaios em qRT-PCR
TO-3MENG	CCGCTGCGCCGCTGGGTAGAA	-	Amplificação de uma região codificante de 100pb de <i>clpb/hsp104</i> próximo a 5UTR para ensaios em qRT-PCR
ENOLASE . REV	AACGGCCATTGAGAAGAAGGC	-	Controle endógeno qRT-PCR
ENOLASE . FOR	TGCAGAACTGGATGCCTCGAT	-	Controle endógeno qRT-PCR

* Nucleotídeos em negrito mostram sítios de restrição e as setas indicam a posição de corte dos mesmos.

4. DNAs - Preparações

4.1 Extrações de DNA de *Trypanosoma cruzi*

A extração do DNA dos microrganismos era realizada a partir de 25 mL de cultura em fase estacionária (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As células eram sedimentadas por centrifugação em tubos do tipo GSA a 1000 x g, por 10 minutos e lavadas com 30mL de tampão PBS pelo menos 3 vezes. A seguir, as células eram ressuspensas em 420µL de tampão TNE. Adicionava-se então SDS para uma concentração final de 1% e 400µg de proteinase K incubando-se a 37 °C, por 18 horas. O DNA era extraído por adição de igual volume de fenol-cloroformio ao lisado de células e centrifugado em microcentrífuga a 12.000 x g, por 1 minuto. A fase aquosa era transferida para outro tubo e estes passos eram repetidos até o desaparecimento da interface protéica. O DNA era precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA precipitado na mistura era sedimentado por centrifugação por 15 minutos, em microcentrífuga a 12.000 x g. O sedimento era lavado com etanol 70%, e posteriormente ressuspensão na concentração de 2µg/mL em TE.

4.2 Quantificações de DNA

A concentração de ácidos nucléicos era determinada medindo-se a densidade ótica a 260nm em espectrofotômetro (Eppendorf Spectrophotometer 000576), 1 D.O. equivale a 50 µg/ml de DNA .

4.3 Análises para determinação da pureza do DNA

Para a determinação da concentração e pureza do DNA extraído, uma alíquota de 2 μ L de cada amostra era transferida para cubetas do nanoespectrofotômetro e realizada a leitura nos comprimentos de onda de 260nm, sendo obtido o gráfico e o valor da razão A260/280. Os dados da razão indicavam a pureza da amostra com valores ideais maiores ou iguais a 1,8. As amostras eram acondicionadas a 4°C, para posterior utilização.

4.4 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR utilizava-se 100ng de DNA genômico, 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de cada um dos dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, GoTaq *Master Mix Green Buffer* 5X (Promega) para concentração de 1X e 1,5U de GoTaq polimerase (Promega), em um volume de reação de 50 μ l. A reação ocorria em termociclador modelo *Mastercycler gradient* (Eppendorff), com ciclagens a: 5 min. a 94 °C, [1 min. a 94 °C, 1 min. a 55 °C, 2 min. a 72 °C, (25X)] e 10 min. a 72 °C.

4.5 Reações de ligação do vetor ao produto de PCR

Uma alíquota de 6 μ L do produto de PCR digerido e purificado em gel de agarose foram ligados a 2 μ L do vetor TOPO TA *Cloning* (GE Healthcare) utilizando 1U da enzima *T4 DNA ligase* (Gibco®) em um volume de reação de 15 μ L. A reação de ligação ocorria a 14 °C, por 15 horas, de acordo com recomendações do fabricante. Um μ L desta reação de ligação era utilizado para transformação de células *E.coli* DH5 α F'IQ.

4.6 Clonagens de fragmentos de DNA em vetores bacterianos

4.6.1 Indução de competência em *E. coli*

A cultura bacteriana era inoculada, com alça de platina ou ponteira estéril, diretamente do estoque congelado em 3mL de meio LB e cultivada por 18 horas, sob agitação, a 37 °C. Em seguida, a cultura era repicada retirando-se 1 mL e inoculando em 50 mL de meio LB. A cultura era cultivada até que atingisse ABS_{600nm} 0,5, quando as células eram sedimentadas por centrifugação a 2800 x g, a 4 °C, por 10 min. O sedimentado de células era ressuspensão em 25 mL de solução de $CaCl_2$ 50mM e mantido no gelo por, pelo menos, 30 min., tomando-se o devido cuidado no manuseio das células bacterianas a fim de se evitar lise celular. Após a incubação, as células eram novamente centrifugadas sob as mesmas condições já citadas, no entanto ressuspensas desta vez em 5 mL de $CaCl_2$ 50mM. Após nova incubação em gelo, por 60 min., adicionava-se glicerol para uma concentração final de 20% e posteriormente separa-se em alíquotas em tubos armazenados a -80 °C (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)

4.6.2 Transformação bacteriana

A transformação era induzida, por adição de 50 a 100ng do DNA plasmidial de interesse, em volume de 1-15 μ L, às células competentes, a mistura era incubada em gelo, por 15 min. Um choque térmico de 90 segundos era feito colocando a mistura em banho-maria, a 42 °C, e retornando-as ao gelo, por 2 min. As células eram recuperadas adicionando-se 800 μ L de meio LB e mantendo-se a cultura a 37°C por 30 min. A seleção dos transformantes era realizada por plaqueamento de 100 μ L da cultura em placas contendo LB-ágar e 100 μ g/mL de ampicilina. Os transformantes eram obtidos pela sedimentação das células restantes na cultura através de centrifugação por 1 min., em microcentrífuga a 12.000 x g. Retirava-se 800 μ L do meio

e as células eram ressuspensas nos 100 μ L restantes, para plaqueamento (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.7 Extrações de DNA plasmidial em pequena escala

As bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse eram cultivadas em 2 mL de meio LB, com ampicilina a 50 μ g/mL, por toda a noite, sob agitação a 37°C. As células eram posteriormente sedimentadas por centrifugação a 12.000 x g por 1 min. O precipitado era ressuspenso em 100 μ L da solução GET. Uma solução contendo NaOH 0,2N e SDS 1% era preparada imediatamente antes do uso. Adicionava-se 150 μ L desta solução à suspensão de células e misturada por inversão. Uma alíquota de 150 μ L de acetato de potássio 3M pH 4,8 era adicionada e em seguida 150 μ L de clorofórmio. O material era então centrifugado por 3 min., a 12.000x g, e a fase aquosa transferida para um tubo novo. O DNA plasmidial era precipitado adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto e incubado à temperatura ambiente, por 2 min. O material precipitado era sedimentado por 15 min. na microcentrífuga a 12.000x g, e ressuspenso em 20 a 30 μ L de TE (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.8 Digestões de DNA plasmidial 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 μ L, e utilizando-se a proporção de 2 U de enzima para cada μ g 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.

4.9 Sequenciamento de DNA

Um micrograma do DNA plasmidial era sequenciado em Sequenciador *Capilar MegaBace 1000* (Molecular Dynamics e Amersham Biosciences®), um sistema de análise de DNA de 96 capilares. As reações de seqüenciamento 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 programa *Sequence Analyser* utilizando *Base Caller Cimarron 3* (GE Healhtcare).

4.10 Síntese de cDNA por transcrição reversa (RT)

A síntese da primeira fita do cDNA era realizada utilizando 5µg de RNA total de células epimastigotas do clone de CL Brenner e 1µg/µl de óligo d(T). A mistura era incubada a 72 °C, por 15 min. para desnaturação do RNA. Em seguida eram adicionados dXTP para concentração final de 10 mM, DTT para concentração final de 0,1 M, o tampão *First Strand Buffer* para concentração final de 1x (Gibco-BRL) e a mistura de reação era incubada a 42°C por 2 min. Após a adição de 200U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Gibco-BRL), a reação era incubada a 42 °C, por 50 min.

4.11 Eletroforeses de DNA em gel de agarose

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

4.12 Purificações de fragmentos de DNAs em gel de agarose

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

4.13 Marcações de sondas de DNA por iniciação randômica

Os vetores utilizados como sonda eram previamente digeridos com enzimas de restrição para a liberação do inserto. Após a digestão, o inserto era purificado através de eletroforese em gel de agarose na qual o fragmento de interesse era excisado e purificado com o kit *QiaxII* (Qiagen).

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

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

4.14 Reações de hibridização de DNA à sonda homóloga

A membrana contendo os ácidos nucléicos transferidos do gel era colocada em saco plástico com a solução de pré-hibridização por no mínimo 1 hora a 42°C. Após a pré-hibridização, uma solução SDS, para uma concentração final de 0,1%, e a sonda marcada, previamente aquecida a 95 °C, por 5 min. era adicionada. A reação de hibridização ocorria por 18 horas a 42°C.

A membrana era incubada em solução de Lavagem 1 por 15 min., a 42°C, por duas vezes. Repetia-se duas vezes com a solução de lavagem 2, também a 42°C, por 15 min. A membrana era envolta com filme PVC e acomodada em cassette apropriado, coberta com filme apropriado (Amersham Hyperfilm MP) e com tela

intensificadora (*lightning Plus*, Du Pont[®]). A exposição ocorria a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tempos variados (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

5. RNAs - Preparações

5.1 Extrações de RNA total de *Trypanosoma cruzi*

Para a extração de RNA, uma cultura em fase exponencial contendo geralmente 5×10^9 células era utilizada. As células eram sedimentadas por centrifugação por 10 min. a $2000 \times g$, e lavadas com 10 mL de PBS, por pelo menos 2 vezes. O sedimento de células era coberto com 25 mL de solução de extração de RNA 1 e imediatamente misturado até que a solução ficasse translúcida, quando então, eram adicionados 0,3 volumes de etanol absoluto para a precipitação diferencial das moléculas de RNA. Centrifugava-se por 5 min., a $16.000 \times g$, a 4°C . Descartava-se o sobrenadante. O precipitado de RNA era ressuspenso em 1 mL de solução de extração de RNA 2, 0,05 vol. de ácido acético 1M e 0,5 vol. de etanol absoluto eram adicionados. Após 10 min., a -20°C , a solução era submetida à centrifugação por 10 min., a $7000 \times g$, a 4°C . O precipitado de RNA era ressuspenso em 1 a 3 mL de H_2O e novamente precipitado como descrito para DNA (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987).

5.2 Tratamento dos RNAs com DNase

A presença de possíveis DNAs contaminantes em amostras de RNA foram tratadas como o procedimento a seguir: $30\mu\text{g}$ de RNA, $30\mu\text{L}$ de DNase-RNase free buffer (FERMENTAS), $75\mu\text{L}$ de enzima DNase $1\text{U}/\mu\text{L}$ (FERMENTAS), com volume final de $300\mu\text{L}$ de reação. A mistura era incubada a 37°C , por 65 min. A reação era interrompida com adição de 1/10 vol. de Stop Solution (FERMENTAS) com incubação a 65°C , por 10 min.

5.3 Análise e determinação da pureza do RNA

Para a determinação da concentração e pureza do RNA extraído, uma alíquota de 2 μ L de cada amostra era transferida para cubetas do tipo descartáveis para uso no nanoespectrofotômetro e realizada a leitura nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo obtido o gráfico e o valor da razão A₂₆₀/A₂₈₀. Os dados da razão indicam a pureza da amostra com valores ideal maiores ou iguais a 1,8. As amostras eram acondicionadas a - 80 °C, para posterior utilização.

5.4 Eletroforeses de RNA em gel de agarose desnaturante

Adicionava-se 1,2g de agarose e 10 mL de tampão MOPS 10X pH 7,5 a 73 mL de H₂O até a completa dissolução da agarose. Após o esfriamento da solução adicionava-se formaldeído para uma concentração final de 6%. O material era vertido em cuba apropriada devidamente nivelada. A gelificação se dava em aproximadamente 30 min. quando o gel era coberto com tampão MOPS 1x. As amostras eram preparadas por adição de 5 μ g de RNA total em 9,7 μ L de tampão de amostra de RNA, aquecidas por 10 min., a 65 °C, incubadas em gelo, por 30 min. Antes da aplicação um tampão de amostra para gel de agarose era adicionado, para uma concentração final de 1x. A corrida se dava a 100 V constantes até que o corante azul de bromofenol chegasse a aproximadamente 3 cm do final do gel. O gel era então corado com solução de brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizado em transluminador de ultravioleta (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

5.5 Preparação de amostras de cDNA para ensaios em PCR Real Time qRT-PCR

Duas soluções de Master Mix individualizadas eram preparadas para as reações de qRT-PCR para as ciclagens no equipamento de PCR em Tempo Real ABI

7700 (Applied Biosystems). A uma solução era adicionada de primers para amplificação da região do gene endógeno ENOLASE e outra com primers específicos (Ver TABELA 2) da região para amplificação do gene alvo *clpb/hsp104*.

Para cada poço de reação de PCR em Tempo Real uma solução de Master mix era feita com: 1,25 µL (20 pMol) primer reverso, 1,25 µL (20 pMol) primer forward (Ver TABELA 2), 12µL de *Power SYBR Green solution 2X* (Applied Biosystems), 8 µL de água bidestilada estéril, totalizando um volume final de 23 µL de solução de Master Mix por poço. A esta solução era adicionada 2 µL de cDNA previamente sintetizado e purificado.

6. Proteínas - Preparações

6.1 Obtenção de extratos citoplasmáticos para SDS-PAGE e 2-DE

Os extratos protéicos eram preparados com células das formas epimastigotas de *T. cruzi*, ou alternativamente com células das formas promastigotas de *L. major*, com incubação a 29 °C, por 24h a partir de repiques de 1×10^8 células/mL. As expansões de massa de células para os ensaios de choque térmico eram realizadas com incubação dos extratos a 37°C por 3, 6 ou 24h e a 40°C, por 3 horas. O meio era coletado e centrifugado inicialmente a $3.000 \times g$, a 4°C, por 20 min. O sobrenadante era descartado e era acrescentado 20 mL de tampão PBS 1X. A suspensão era centrifugada a $3.000 \times g$, a 4°C, por 20 min. Este processo de lavagem com PBS 1x era repetido por mais 3 vezes. Dois mililitros de PBS 1x eram adicionados e a contagem de parasitos era realizada em câmara de Neubauer para uma suspensão de 1×10^8 células/mL (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

A mistura de inibição de proteases P2714 (Sigma-Aldrich) era adicionada a 1µg/mL (w/v), nas condições indicadas pelo fabricante, logo após, realizou-se 5 ciclos de congelamento e descongelamento por imersão alternada em nitrogênio líquido e banho-maria, a 37°C.

O homogeneizado era centrifugado a 5000 x g, a 4°C, por 10 min. O sobrenadante era transferido para outro tubo e centrifugado a 18000 x g, a 4 °C, por 20 min. As proteínas totais foram dosadas pelo Sistema Bradford (PIERCE) com curva padrão de albumina como controle conforme recomendações do fabricante. Os extratos eram alíquotados em pequenas frações de 200µg e armazenados (-80°C) até o momento do uso, como forma de se evitar possível degradação.

6.3 Eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a montagem do gel de separação, uma solução era preparada contendo acrilamida-bisacrilamida 10%, relação acrilamida-biscacrilamida era de 29:1, além de Tris-HCl pH 8,8 0,375M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1% e vertia-se em cuba *Minie-PROTEAN TETRA CELL* (Biorad) para eletroforese vertical. O gel era coberto com 1 mL de butanol e deixava-se polimerizando por 30 min. Após a polimerização, retirava-se a butanol saturado em água, lavava-se com H₂O destilada e retirava-se a água com o auxílio de uma folha de papel de filtro. Cobria-se o gel de separação com a solução para o gel de empacotamento que continha acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris HCl pH6,8 0,125M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1%. Colocava-se o pente e deixava-se polimerizando por 30 min (LAEMMLI, 1970)

As amostras de extrato protéico eram preparadas adicionando-se tampão de amostra de proteína para concentração de 1X, aquecendo-as a 95°C por 5 min. e incubando-as em gelo, por 15 min.

Durante a separação das amostras no gel de empacotamento, a corrida eletroforética se dava a 25mA constantes; quando as amostras passavam para o gel de separação, aumentava-se a corrente para 35mA. Após a corrida eletroforética, os géis eram corados mergulhando-os em solução de Azul de Comassie, por 3h. Posteriormente, os géis eram mergulhados na solução descorante até que o fundo do gel clareasse e as bandas pudessem ser visualizadas com nitidez.

Para a secagem do gel, este era mergulhado em solução encolhedora por 1h e posteriormente colocado entre duas folhas de papel celofane presas a grampos por aproximadamente 48h (LAEMMLI, 1970).

6.4 Eletroforeses Bidimensionais (2-DE) com extratos de *T. cruzi*

6.4.1 - Primeiro passo - hidratação das tiras IEF

Preparou-se uma solução de rehidratação contendo o extrato de proteínas e acrescentou-se somente no momento de uso DTT a 65 mM e anfólitos 0,5% (Ver variações destas concentrações na TABELA 4) no momento da hidratação. Retira-se o adesivo protetor da tira de IEF. Aplica-se 100 µL por 120-200µL de solução de hidratação com amostra em cada canaleta no *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* (GE Healthcare). Posiciona-se o lado da fita que contém gel na canaleta de modo que o gel fique em contato direto com a amostra. Aplica-se 3 mL de óleo de revestimento *Dry strip cover fluid* (GE Healthcare) até cobrir toda a tira, fecha-se o *Immobiline DryStrip Reswelling Tray*. Deixar em repouso durante 16h, a 20°C sobre bancada fixa e previamente aplainada (RABILLOUD, 2000).

6.4.2 - Segundo passo - focalização da primeira dimensão

Recomenda-se ligar o equipamento de focalização e 15 min. antes do seu uso, tanto o Multiphor II (GE Healthcare) quanto o Ettan IPG-Phor (GE Healthcare). Cada equipamento é singular na sua forma de utilização para a focalização isoelétrica de proteínas, portanto foram realizados todos os procedimentos e protocolos recomendados pelo manual do fabricante para cada equipamento no momento de uso. Nos procedimentos para utilização do Multiphor II para focalização aplica-se óleo de cobertura *Dry strip cover fluid* (GE Healthcare) na superfície até cobrir toda a plataforma de corrida (placa de cerâmica). Posiciona-se sobre o óleo o *Reswelling Tray* sobre a plataforma e cobriu-se toda a superfície com óleo de cobertura. Posicionam-se

as tiras de IEF corretamente, e anota-se o código de cada fita/amostra, antes da focalização. Aplicam-se as tiras de papel de filtro umedecido com água bidestilada em cada pólo da tira de IEF. Posicionar corretamente os eletrodos. Novamente toda a cuba era coberta com óleo de cobertura formando uma superfície de 1 cm de óleo de cobertura. Inicia-se a corrida conforme as especificações do fabricante. Ao final da corrida, as fitas podem ser acomodadas cuidadosamente, com o lado do gel para cima, em tubos de ensaio com tampa rosca por até 3 meses a -80°C , até o momento de uso (RABILLOUD, 2000).

6.4.3 Terceiro passo - segunda dimensão

Antes deste protocolo era realizada a preparação do gel SDS-PAGE, sem o gel e de separação. Era reservado um espaço de 0,5 cm na borda superior do gel para que caiba exatamente a fita de focalização.

Para a montagem do gel de separação, uma solução era preparada contendo acrilamida-bisacrilamida 10%, relação acrilamida-bisacrilamida era de 29:1, além de Tris-HCl pH 8,8 0,375M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1% e vertia-se em cuba *Minie-PROTEAN TETRA CELL* (Biorad) para eletroforese vertical. O gel era coberto com 1 mL de butanol e deixava-se polimerizando por 30 min. Após a polimerização, retirava-se a butanol saturado em água, lavava-se com H_2O destilada e retirava-se a água com o auxílio de uma folha de papel de filtro. Cobria-se o gel de separação com a solução para o gel de empacotamento que continha acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris HCl pH6,8 0,125M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1%. Colocava-se o pente e deixava-se polimerizando por 30 min (LAEMMLI, 1970).

6.5 Fase de Equilíbrio I

Realiza-se esta etapa com incubação da tira de IEF temperatura ambiente com 10 mL de solução de equilíbrio contendo 100 mg de DTT (preparar no momento do uso), por 15 min.

6.5.1 Fase de Equilíbrio II

Realiza-se esta etapa com incubação de 15 min. da tira de IEF com 10 mL de solução de equilíbrio contendo 250mg de Iodocetamida (SIGMA). A montagem dos géis era realizada em cuba *Mini-PROTEAN TETRA CELL* (Biorad) para eletroforese vertical com solução tampão de corrida TRIS-glicina 1x. Sobre põe-se a tira de IEF equilibrada sobre o gel de SDS-PAGE. Aplica-se 8 µL do padrão de peso molecular (Kaleidoscope - Biorad) em um pequeno pedaço de papel de filtro e acomoda-se o papel ao lado da tira de IEF, cuidadosamente. Este procedimento não pode ser demorado para evitar a dissociação das proteínas focalizadas na tira de IEF. Inicia-se a eletroforese a 100 V por 1h e 30min. Os géis posteriormente foram corados com Commasie G250 por 16 horas e descorados, com solução descorante, conforme protocolo de BLUM, *et al* (1987).

6.6 Transferências de proteínas para membranas de nitrocelulose ou PVDF a partir de géis SDS-PAGE ou 2-DE

Os géis de poliacrilamida com SDS eram feitos sempre em duplicata. Um dos géis era corado com comassie blue e o outro submetido à transferência.

A transferência se dava em cuba *Mini-PROTEAN TETRA CELL* (Biorad), conforme recomendações do fabricante. O gel e a membrana de nitrocelulose (Biorad) ou PVDF (Biorad) eram posicionados entre duas folhas de papel de filtro e este conjunto era fixado em grades especiais. O aparato era mergulhado em solução de transferência de forma que o gel ficasse no pólo negativo e a membrana no pólo positivo. A transferência das proteínas para a membrana acontecia a 70 V, por 2h, a temperatura ambiente, em presença de gelo tipo *cooler* dentro da cuba.

A membrana era seca e armazenada a temperatura ambiente e reservada em um envelope de papel filtro até a sua utilização. A verificação da transferência era feita através da coloração da membrana com solução de vermelho de Ponceau. A

membrana era mergulhada nesta solução por 5 min. e o excesso de corante retirado com PBS até a visualização das bandas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Alternativamente, tanto para transferências de SDS-PAGE como para 2-DE era usado a solução de *MemCode Reversible Protein Stain Kit* (PIERCE), conforme recomendações do fabricante, para a visualização com maior sensibilidade das proteínas transferidas.

6.7 Blotting e Immunoblotting 2-DE

6.7.1 Com anticorpo conjugado à Peroxidase

A membrana contendo as proteínas transferidas do gel SDS-PAGE era mergulhada em solução de bloqueio e mantida sob agitação por 2h, à temperatura ambiente. Em seguida, retirava-se a solução de bloqueio inicial e adicionava-se nova solução de bloqueio contendo o anticorpo policlonal primário Anti-HSP100 de *Leishmania major*, na diluição de 1/500. A incubação se dava à temperatura ambiente sob agitação por 1 hora quando a membrana era então lavada por três vezes com PBS-T, por 5 min. a temperatura ambiente, sob agitação. À membrana, então, adicionava-se nova solução de bloqueio, desta vez contendo o anticorpo secundário, Anti-IgY de galinha conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology). A incubação e a lavagem ocorriam da mesma forma como anticorpo primário descrito acima.

A membrana era seca à temperatura ambiente, envolta em filme PVC, e acomodada em cassete apropriado, coberta com filme apropriado (Amersham Hyperfilm MP).

A revelação era feita com o kit de *ECL Plus* GE Healthcare[®], de acordo com as recomendações e o protocolo do fabricante.

6.7.2 Com anticorpo conjugado à Fosfatase Alcalina

Alternativamente à revelação por peroxidase, utilizava-se protocolo para revelação com a fosfatase alcalina quando se realizou um imunoblotting com extratos protéicos citosólicos de *T. cruzi* contra um pool de soros de pacientes chagásicos. Neste caso, as soluções de bloqueio e lavagem não continham fosfato e sim o sal TRIS para evitar reação cruzada. A revelação era feita incubando-se a membrana em Solução de Revelação até o aparecimento das bandas protéicas de interesse.

6.7.3 Géis preparativos para *Immunoblot* com soros Chagásicos

Os géis preparativos eram confeccionados com 100µg de extratos totais citoplasmáticos de *T. cruzi*, da forma epimastigota, com choque térmico a 37 °C, por 24h. Logo após a eletroforese eram transferidos para membranas de nitrocelulose (Biorad). A metodologia aplicada foi à mesma já descrita no item (6.6). A membrana de nitrocelulose era medida e cortada em fitas com tamanho de 0,04 x 5 cm, e identificadas em separado para incubação individual em presença de soro específico, com diluição de 1/50. Em seguida, as tiras incubadas com soro humano eram novamente incubadas por 60 min., numa solução de anti-IgG humana conjugada à fosfatase alcalina (Sigma Chemicals) diluída numa razão de 1/3.000. A tira contendo anticorpo policlonal anti-HSP 100 de *L. major* era incubada com conjugado anti-IgY. Após mais 5 etapas de lavagens, os complexos imunes eram detectados com a uma Solução Reveladora as tiras de nitrocelulose permaneceram nesta solução reveladora a 25°C, até o momento do aparecimento de bandas de coloração violeta, devido à reação da fosfatase alcalina com BCIP/NBT. As membranas foram lavadas por 30 minutos em água destilada e deixadas para secar a temperatura ambiente.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterizações da estrutura gênica de *clpb/hsp104*

A fim de selecionar uma sequência alvo para iniciar o estudo e caracterização do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi*, foi realizada uma busca por palavra chave “Clp/HSP100” no banco de dados do genoma de *T. cruzi* (<http://www.genedb.org/>) (TABELA 3). A sequência do gene alvo escolhida foi obtida selecionando, por palavra-chave “HSP100”, a sequência com maior cobertura da região codificante disponível quando comparados com as sequências de *clp/hsp100* de referência de *T. brucei*, *L. major* e *L. donovani*.

As análises pela busca da *clpb/hsp104* no banco de dados do genoma do *T. cruzi* disponibiliza cinco sequências de genes *clp/hsp100*, mas duas delas foram classificadas de pseudo-genes (*Locus gene tag (ID)* Tc00.1047053506821.20 e Tc00.1047053506617.90), restando somente três possíveis de sequência de genes alvo candidatos (**Tc00.1047053508665.14**, Tc00.1047053511107.41 e Tc00.1047053508807.10). As duas últimas contêm poucas informações e cobertura reduzida de região codificante quando comparados aos genes de *T. brucei*. O primeiro locus gênico (em negrito) foi escolhido como o sequência alvo deste trabalho, pois apresentou a maior região codificante (1810 pares de base), melhor detalhamento e caracterização de domínios para a proteína ClpB/HSP104, e menos lacunas (*gaps*) na sua extensão. A sequência **Tc00.1047053508665.14** corresponde à cobertura dos 2/3 iniciais do gene da chaperona ClpB/HSP104 (578 aminoácidos), baseado na sequência gênica de Clp/HSP100 dos outros tripanossomatídeos como *T. brucei* (870 aminoácidos) e *L. donovani* (867 aminoácidos) (HÜBEL *et al.*, 1995).

A inexistência de estudos anteriores com a chaperona ClpB/HSP104 em *T. cruzi*, levou-nos a utilizar a sequência dos genes de *clpb/hsp104* ortólogos em *T. brucei* (REDPATH *et al.*, 1998), *Leishmania major* (HÜBEL *et al.*, 1995), *L. donovani* (KROBITSCH *et al.*, 1998), *Escherichia coli* (TANAKA *et al.*, 2006) e *Thermus thermophilus* (LEE *et al.*, 2003) para as buscas de similaridade. A sequência de aminoácidos tanto

das proteínas ClpB/HSP104 de *E. coli* e de *T. termophilus*, como das sequências das chaperonas em tripanossomatídeos utilizadas em todas as análises comparativas deste trabalho, foram previamente caracterizados e estudados funcionalmente em cada organismo correspondente. Possuem mais de 50% de similaridade estrutural como esperado em sequências de proteínas evolutivamente conservadas. As sequências de aminoácidos das proteínas ClpB/HSP104 apresentam uma identidade superior a 51% quando as respectivas proteínas de diversos organismos são comparadas por alinhamentos (FIGURA 5).

O mecanismo evolucionário de duplicação de genes, associado às mutações, leva a divergências moleculares e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas estruturalmente relacionadas. Proteínas derivadas de um ancestral comum são ditas homólogas. Em função do número de mutações envolvidas, as seqüências de aminoácidos de proteínas homólogas podem ser, idênticas, semelhantes ou dissemelhantes. Conseqüentemente, a semelhança entre as seqüências de aminoácidos em proteínas homólogas, expressa pelo grau (percentual) de identidade, é menos preservada do que a semelhança de estruturas tridimensionais. Em outras palavras, as estruturas tridimensionais de proteínas homólogas tendem a se conservar porque a estrutura ancestral comum é crucial para a manutenção da função das proteínas (HÖLTJE & FOLKERS, 1997).

A nomenclatura completa das sequências gênicas e protéicas ClpB/HSP104 alvo de *T. cruzi* utilizada neste trabalho, está disponível online no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), e pode ser identificada segundo a classificação do NCBI, nos exemplos a seguir: Organismo: *Trypanosoma cruzi*; Cromossomo: TcChr23-P; Scaffold: CH473417; Locus gene tag (ID): Tc00.1047053508665.14; Contig: AAHK01002902; General protein information (ID): EAN81877; Gene Identification (GI): 70866220; protein-gi: XM_789230.

TABELA 3. Resultado de busca por palavra-chave por sequências do gene de *clpb/hsp100*

<i>T. cruzi</i>	CDS	Tc00.1047053508665.14	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative, 7820.t00005
<i>T. cruzi</i>	CDS	Tc00.1047053511107.41	ATP-dependent Clp protease subunit heat shock protein 100 (HSP100), putative, 8599.t00005
<i>T. cruzi</i>	CDS	Tc00.1047053506617.90	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100)(pseudogene), putative, 7023.t00008
<i>T. cruzi</i>	CDS	Tc00.1047053506821.20	HSP100, ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (pseudogene), putative, serine peptidase (pseudogene), 7106.t00002
<i>T. cruzi</i>	CDS	Tc00.1047053508807.10	HSP100, ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100, putative, serine peptidase, putative, 5618.t00001

Disponíveis no bando de dados do GeneDB (<http://www.genedb.org>).

		Section 6				
	(226)	226	240	250	260	270
Ecoli (P0ABH9)	(220)	KTAIAEGLAWRIVQGDVPEVMADCTIYSLDIGSLLAGTKYRGDFE				
Ldonovani (Z94053)	(211)	KTAIVEGIAIQQVVRGDVDPDTLSGIRIFSLDMGALIAGAKYRCGEFE				
Lmajor (CAA86116)	(211)	KTAIVEGIAIQQVVRGDVDPDTLSGIRIFSLDMGALIAGAKYRCGEFE				
Tbrucei (AAQ16055)	(211)	KTAIAEGIAQRIVRGDVDPDTLLNTRLFSLDLGALIAGSSLRCEFE				
Tbrucei Treu927 (XP951738)	(211)	KTAIAEGIAQRIVRGDVDPDTLLNTRLFSLDLGALIAGSSLRCEFE				
Taruzi (EAN81877)	(211)	KTSIVEGIAIQQIVRGDVPDTLSSRIFSLDLGALIAGAKYRCGEFE				
Consensus (226)		KTAIVEGIAQRIVRGDVDPDTLS TRIFSLDLGALIAGAKYRCGEFE				
		Section 7				
	(271)	271	280	290	300	315
Ecoli (P0ABH9)	(265)	KRFKALLKQLRQDIN-SILFIDRIHTIIGAGAASGGQVDAANLLK				
Ldonovani (Z94053)	(256)	ERLKAVLNEVKESDNKIILFIDRIHLVLCAGCKS-DGAMDAANLLK				
Lmajor (CAA86116)	(256)	ERLKAVLNEVKESDNKIILFIVRIHLVLCAGCKS-DGAMDAANLLK				
Tbrucei (AAQ16055)	(256)	ERLKSVLNEVKESNGVILFIDRIHLVLCAGCKS-GCSMDAANLLK				
Tbrucei Treu927 (XP951738)	(256)	ERLKSVLNEVKESNGVILFIDRIHLVLCAGCKS-GCSMDAANLLK				
Taruzi (EAN81877)	(256)	ERLKSVLNEVRESPTPIILFIDEMHVLVLCAGCKS-EGAMDAANLLK				
Consensus (271)		ERLKAVLNEVKESSN IILFIDRIHLVLCAGCKS GGAMDAANLLK				
		Section 8				
	(316)	316	330	340	350	360
Ecoli (P0ABH9)	(309)	PLLESSGKIRVIGSITTYQEFNSNIFEKDRALARRFQKIDITEPSIERE				
Ldonovani (Z94053)	(300)	PLLARCELRTIGATTLLEYRQYVEKDAAFERRRFPVQVNEPSVEE				
Lmajor (CAA86116)	(300)	PLLARCDVRTIGATTLLEYRQYVEKDAAFERRRFPVQVHEPSVEE				
Tbrucei (AAQ16055)	(300)	PMLARCELRTIGATTLLEYRRTYVEKDAAFERRRFPVYVTEPSVEE				
Tbrucei Treu927 (XP951738)	(300)	PMLARCELRTIGATTLLEYRRTYVEKDAAFERRRFPVYVTEPSVEE				
Taruzi (EAN81877)	(300)	PMLARCELRTIGATTLLEYRKYVEKDAAFERRRFPVYVTEPSVDE				
Consensus (316)		PLLARCELRTIGATTLLEYRQYVEKDAAFERRRFPVYVTEPSVEE				
		Section 9				
	(361)	361	370	380	390	405
Ecoli (P0ABH9)	(354)	TWQIINGLKPXYEAHHDVRYTAKAVRAAVE LAVRYINDRHLDPDKA				
Ldonovani (Z94053)	(345)	CTSILRGLKDRYEQHHGVQITDKAVVVAAQLAGRYITNRFDPDKA				
Lmajor (CAA86116)	(345)	CTSILRGLKDRYEQHHGVQITDKAVVVAAQLAGRYITNRFDPDKA				
Tbrucei (AAQ16055)	(345)	CISILRGLKDRYEAHHGVQITDNAVVVAAQLANBYITNRFMPDKA				
Tbrucei Treu927 (XP951738)	(345)	CISILRGLKDRYEAHHGVQITDNAVVVAAQLANRYITNRFMPDKA				
Taruzi (EAN81877)	(345)	CISILRGLKDRYETHHGVQITDNAVVVAVQLADRYITGRFMPDKA				
Consensus (361)		CISILRGLKDRYEAHHGVQITDNAVVVAAQLA RYITNRFDPDKA				
		Section 10				
	(406)	406	420	430	440	450
Ecoli (P0ABH9)	(399)	IDVIDEAGARARLMPVSK-----RKK-----				
Ldonovani (Z94053)	(390)	IDLIDEACANVRVTLSSRPAEIDALERKKRQLEIEEAKALQRDKDA				
Lmajor (CAA86116)	(390)	IDLIDEACANVRVTLSSRPAEIDALERKKRQLEIEEAKALQRDKDA				
Tbrucei (AAQ16055)	(390)	IDLIDEACANVRVQLSSRPEAIDILERKKRQLEIEAKALERDKEA				
Tbrucei Treu927 (XP951738)	(390)	IDLIDEACANVRVQLSSRPEAIDILERKKRQLEIEAKALERDKEA				
Taruzi (EAN81877)	(390)	IDLIDEACANVRVQLSSRPEEIDQLERKKRQLEIEAKALERDKKE				
Consensus (406)		IDLIDEACANVRVQLSSRPEEID LERKKRQLEIEAKALERDKDA				

FIGURA 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas Clp/HSP100 de *E. coli*, *L. donovani*, *L. major*, *T. brucei*, *T. brucei* (linhagem Treu927) e *T. cruzi* (EAN81877, *protein ID NCBI*), apresentando elevado grau de similaridade entre as chaperonas de diferentes organismos. Em amarelo: aminoácidos com 100% de identidade; em azul 75% e em verde 50% de identidade.

A partir da escolha e caracterização da sequência do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi* com identificação do *Locus gene tag (ID)* Tc00.1047053508665.14 em banco de dados e o estudo preliminar da sua sequência do seu *contig* correspondente (AAHK01002902), deram início à parte de caracterização gênica e estrutural deste trabalho.

Com objetivo de se determinar a organização gênica do gene *clpb/hsp104* no genoma do *T. cruzi*, um *Southern blot* genômico foi realizado. Um segmento de 980 pares de bases da região codificante do gene (FIGURA 6) foi utilizado como sonda molecular. A região foi amplificada, purificada e clonada no vetor TOPO TA *Cloning* (FIGURA 7), e posteriormente seqüenciada para confirmação do gene alvo por análise de identidade entre a sequência obtida a partir do clone e o gene disponível no banco de dados do NCBI (ALTSHUL *et al.*, 1997). O DNA total de *T. cruzi* digerido com 9 enzimas de restrição e o controle (não-digerido), foi submetido à eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana de Nylon (Biorad) e hibridizado com a sonda de *clpb/hsp104*. Como pode ser observada na FIGURA 8, a maioria das digestões resultou em um único fragmento, como PstI e HinfI (em vermelho), ou poucos fragmentos sendo um deles com sinal mais intenso, o que pode ser devido à digestão parcial. O padrão de fragmentos resultante de análise por *Southern blot* genômico é compatível com o gene *clpb/hsp104* e está presente no genoma de *T. cruzi* em cópia única. Esses resultados são consistentes com os dados de sequência genômica disponível no banco público GeneDB. A FIGURA 9 mostra esquematicamente a localização de *clpb/hsp104* (Tc00.1047053508665.14) dentro do seu *contig* (AAHK01002902), onde o gene está flanqueado por 2 outros genes. É necessário observar que várias lacunas de sequência estão presentes, e uma delas no final da região codificante de *clpb/hsp104* (FIGURA 9, junção das setas amarelas).

Estes resultados corroboram os dados encontrados para o genoma de *L. donovani*, cujo gene que codifica a chaperona ClpB/HSP100 também foi encontrado em cópia única (HÜBEL *et al.*, 1995; KROBITSCH *et al.* 1998; KROBITSCH & CLOS *et al.* 1999). O gene que codifica a proteína ClpB/HSP104 difere em número de cópias dos demais genes de proteínas de choque térmico no genoma do *T. cruzi*, como as HSP70 (7 a 20 cópias) (CARVALHO *et al.*, 1990; REQUENA *et al.*, 1998; EL-SAYED *et*

al., 2005) e as proteínas HSP10 (3 cópias) (FERNANDES *et al.*, 2005), que possuem uma organização em múltiplas cópias dispostas em tandem em um locus único. Este arranjo gênico também é encontrado para muitas HSPs nos demais tripanossomatídeos, por exemplo, em *T. brucei* o gene que expressa a proteína HSP70 está presente em 5 cópias (GLASS *et al.*, 1986), em *L. major* 4 cópias (LEE *et al.*, 1988) e um tandem de 7 cópias e mais uma cópia fora dele em *L. amazonensis* (BOCK & LANGER, 1993). Outros genes que expressam proteínas de choque térmico como a HSP83 dispostos em tandem, por sua vez, são encontrados em *T. cruzi*, com 6 a 10 cópias (DRAGON, 1987), em *T. brucei*, com 10 a 12 cópias (MOTTRAM *et al.*, 1989), mas em *Leishmania* spp, encontra-se em poucas cópias, segundo HÜBEL & CLOS (1996). A HSP60 também teve sua estrutura gênica determinada em *T. cruzi*, e foi demonstrado que seus genes estão agrupados em tandem de pelo menos 3 cópias (DE MARVAL *et al.*, 1993).

Estes resultados corroboram os dados encontrados para o gene de cópia única de ClpB que codifica a proteína de choque térmico HSP100 de *L. donovani* (KROBITSCH *et al.* 1998), cujos níveis absolutos de expressão da HSP100 parecem ser em uma função do número de cópia do gene. A síntese de mRNA dos genes de HSP70, que foram encontrados como cinco cópias idênticas por LEE *et al.*, (1988), foram mais elevados do que, em cópia única do gene de *clpb/hsp100* que codifica uma proteína de choque térmico de 100kDa (HSP100) de *L. donovani* (HÜBEL *et al.*, 1995; BRANDAU *et al.*, 1995). Isto é refletido nas concentrações intracelulares máximas das proteínas HSP70 e de HSP100, 2.1% contra 0.25%, respectivamente, da proteína celular total (BRANDAU *et al.*, 1995).

```

ATGTCAGACGGGCAGCCAGAATGGACCAACGCGGCGGGCGACAGCGCTGCAAGATGCAGTGGCTCT
CGCGCGCAAGCACAGTAATGGCTTTTTGGACCCCGTCCATCTGGCGTGCGCGCTGTTCAAGGATG
AGAACGGTCTCCCCTCGCGTGTGCTGAAGAAAGTCGGAGCGGGAATCGTGATGGACGCCCTAATG
GCCCCGCGTGGAGGCAATTCCCACACAAAGCCCTGCACCGACGCAGCCGCATCCTAACTCCGACAT
GACGCGTGTACTAAACACCGCGGAGCAGAAGCGGGTTGCGTTTTGGCGATAACCCTTTTGGCTGTGC
ACCACCTTCTCCTTGGCGTGTACGAGAGCAAAGACACCAATTCCATCCTGAAGGGCGGCTGGTGCC
GACAGTAAGACCGTTGAGAAGGCCCTGAAGGAGCTTCGCAAGGGGAAGAAAATTACCTCAGAGTT
CCAGGATCAGAACTACGATGCATTGTCCAAGTACGCGATCGACATGTGTGACAGGGCGGAGGATG
GCAAGCTGGACCCACTTATTGGACGTGCCGACGAGGTATTACGCACCATTTCGCGTCTGTCCCGG
CGAACGAAAAACAACCCGGTTTTGATTGGCGAACAGGTGTTGGCAAGACGTCCATCGTGGAGGG
CATCGCGCAGCAAATTGTCCGGGGCGACGTGCCGGACACTCTTTCCTCTTCACGCATCTTTTCTC
TGGACCTCGGTGCCCTTATTGCCGGCGCAAATACCGCGCGAGTTTTGAGGAGCGTCTGAAGAGT
GTTTTGAACGAAGTGCGGGAGAGCCCTACCCCATCATTCTTTTCATTGATGAAATGCACGTCGT
GCTCGGGGCTGGCAAGTCGGAGGGCGCAATGGACGCAGCAAATCTTTTGAAGCCCATGTTGGCAC
GCGGAGAGCTGCGCACGATTGGTGCAACGACCTTGGAGGAGTACCGCAAATACGTGGAAAAGGAC
GCGGCGTTTTGAGCGGCGCTTCATGCCAGTGTACGTGACGGAGCCAAGTGTTGACGAGTGCATCAG
CATCCTCCGTGGTCTGAAGGAACGCTACGAGACGCACCACGGTGTTCAGATCACGGACAATGCGG
TGGTGGTTGCCGTTTCAAGTTGGCTGATCGCTACATTACGGGCGGCTTTATGCCAGACAAAGCCATT
GACCTCATTGACGAGGCATGCGCAAACGTGCGTGTGCAGCTCTCGTCGCGTCCAGAGGAGATTGA
TCAACTGGAGCGCAAGAAACGTCAAGTTGGAGATTGAGGCAAAGGCGCTTGAGCGAGACAAAAAAG
AAAAGTCGTCGAGGAACGGCTGAGGATTGTCAAGGGGATATTCAGCGTGTGGAGGAGCTTCTT
CAGCCACTCTTGGCACGGTACAATGAGGAGCGTCAGCGAGTTGATGAGCTGCACGAAATGCAAAC
CCGTCTTGATGAGAAGAAGACGAAGCTGGAGAGGGCCGAGCGAATGCGGGACATGGAGCTTGCCG
CCGACCTCAAGTACAATGCCATACCCGTTATTCAAGACCGCATCCGGTTCGTTGAAGGAGAAGATT
GAGCAGCAGAAGGCCTCCATGGTGCAGGAGAAGGTCACGGAGGTGGAAGTTGCGGCAGTGGTGGC
GCGCTGGACGGGCATTCCGGTGAAGAAGTTAAGCCAGACCGATCGTGAGCGACTGCTGCAGCTCT
CGTCGCACCTGCACCGTTCGCGTAAAAGGTCAGGATGAGGCGGTGGAACGCGTCTCGGAGGCTATT
CTGCGGTTCGCGTGCGGGTCTTTCGCGGCCACACGCACCCACTGGCTCCTTCCTCT

```

FIGURA 6. Sequência parcial da região codificante do gene de *clpb/hsp104*. Região em destaque (cinza) é a região amplificada para utilização como sonda molecular; sequência dos oligonucleotídeos está em azul. As sequências em vermelho correspondem a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para mapear as regiões não traduzidas 5' e 3' do gene em estudo.

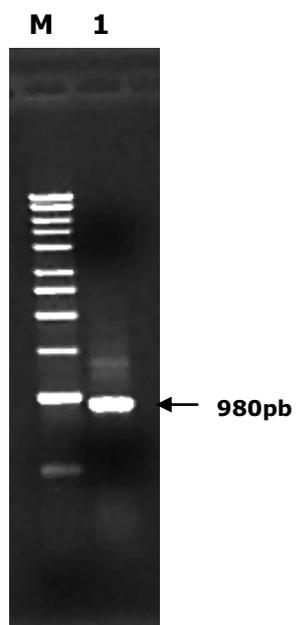


FIGURA 7. PCR de parte da região codificante do gene de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*. Uma região de 980 pares de bases foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico e iniciadores específicos. Produto amplificado (1); marcador de peso molecular 1Kb ladder (M).

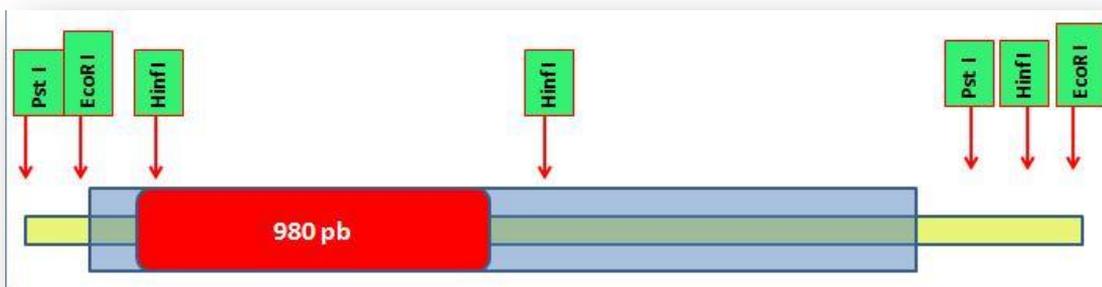
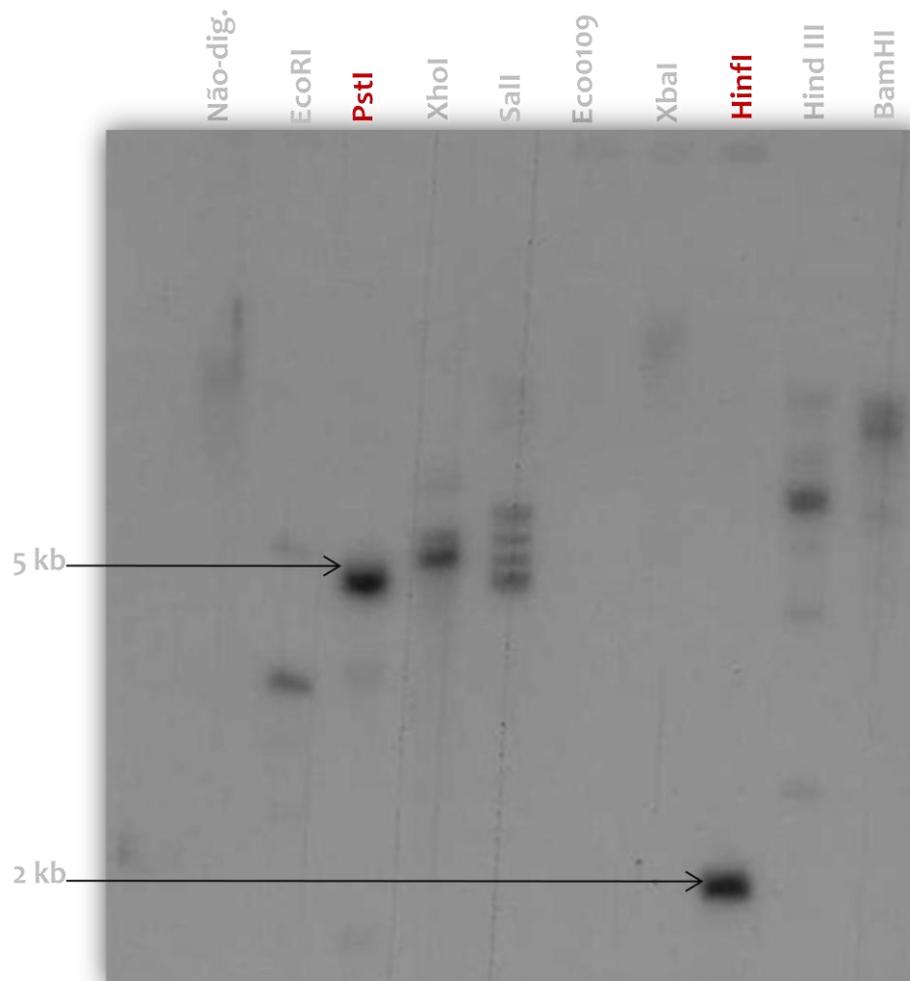


FIGURA 8. Padrão de fragmentos genômicos de *clpb/hsp104*. Uma massa de 20 μ g de DNA genômico foi digerido com 9 enzimas de restrição: 1 - Fragmento não-digerido; 2 - EcoRI; 3 - PstI; 4 - XhoI; 5 - Sall; 6 - Eco0109; 7 - XbaI; 8 - Hinfi; 9 - Hind III; 10 - BamHI. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos para uma membrana de nylon. A sonda foi marcada radioativamente com α [P³²]dCTP e Kit *Randon Primer Labelling System* (GIBCO-BRL). Exposição de 72h. Setas indicam fragmentos únicos (A). Esquema da posição dos sítios de restrição das enzimas utilizadas: barra em vermelho é a região da sonda de 980 pares de bases. Barra em azul é a região codificante total do gene. Barraas em verde: enzimas de restrição.

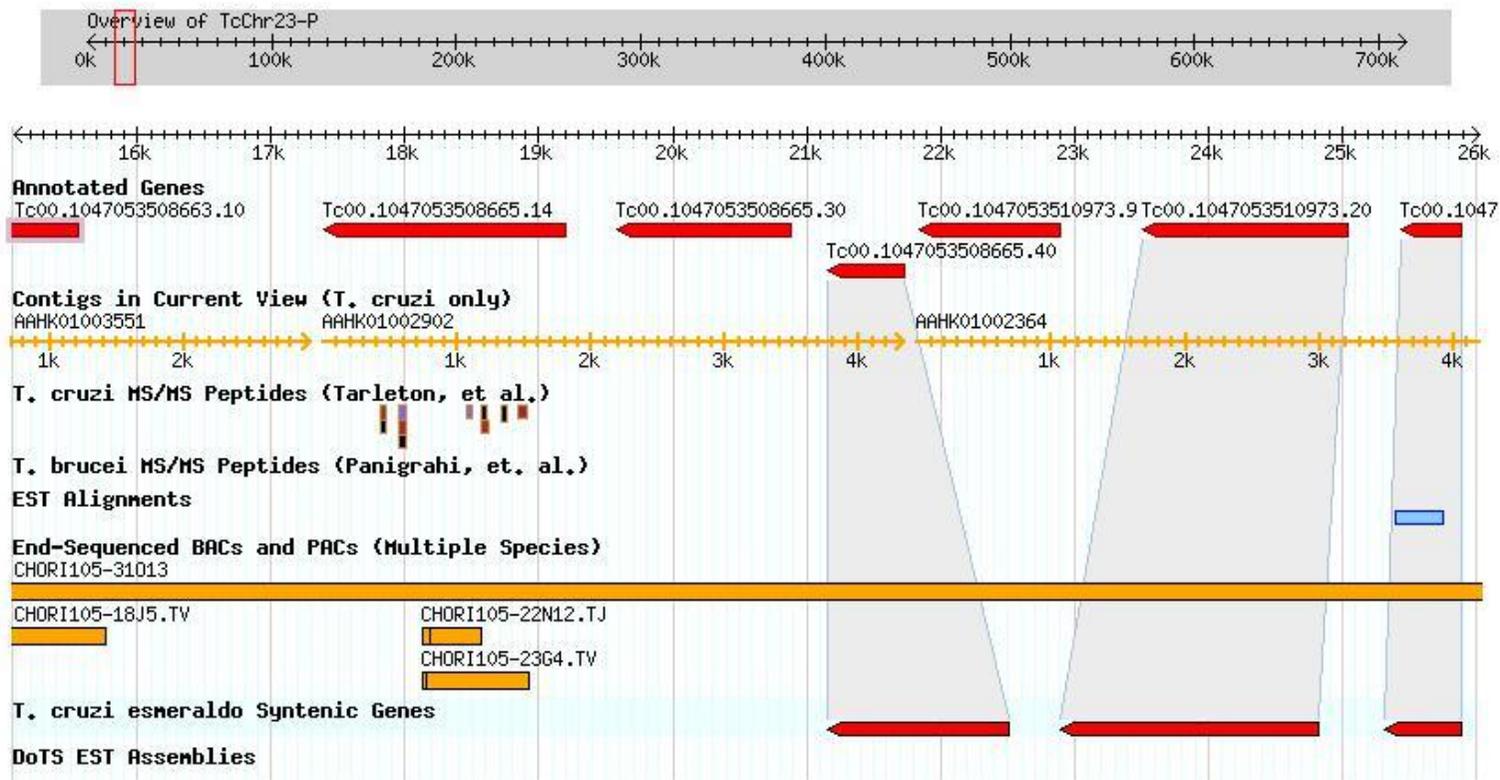


FIGURA 9. Mapa esquemático do *scaffold* contendo a sequência do gene *clpb/hsp104* no genoma de *T. cruzi* disponível no GeneDB. ID correspondente ao gene é Tc00.1047053508665.14. Regiões codificantes, segmentos vermelhos; *contigs*, setas amarelas; clones de bibliotecas genômicas, segmentos laranja. Alguns peptídeos específicos dentro do *contig* de estudo foram caracterizados por espectrometria de MS/MS por TARLETON e colaboradores (ATWOOD *et al.*, 2005). Outros peptídeos ortólogos específicos dentro do *contig* de estudo foram caracterizados por espectrometria MS/MS em *T. brucei* por PANIGRAHI *et al.*, (2008).

A sequência de aminoácidos predita do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi* foi comparada com as sequências dos genes ortólogos de outros tripanossomatídeos. Como pode ser observado na FIGURA 10 a sequência obtida de *T. cruzi* é aproximadamente 1/3 menor que as demais. Tal diferença, juntamente com a existência de uma lacuna no final da sequência de *T. cruzi* (FIGURA 9), sugeriu a possibilidade de a sequência disponível estar incompleta. Com o objetivo de obter a sequência gênica correspondente ao terço final da proteína estudada, que não estava disponível na sequência genômica do clone CL Brener de *T. cruzi*, as sequências genômicas adjacentes ao *contig* AAHK01002902 foram investigadas através de PCR e subsequente sequenciamento dos produtos de amplificação. Foram desenhados oligonucleotídeos correspondentes as regiões que flanqueiam a lacuna adjacente ao final da sequência disponível do gene *clpb/hsp104* (*contigs* AAHK01002902 e AAHK01003551), mas repetidas tentativas de amplificação não obtiveram sucesso. A sequência ausente poderia ser de comprimento suficiente para impedir uma amplificação com um só par de iniciadores, o que poderia explicar os resultados descritos acima.

De acordo com estudos recentes de WEATHERLY, BOEHLKE & TARLETON (2009), a publicação de três Genomas dos *TriTryps* (tripanosomatídeos: *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*), em 2005 foi um avanço importante para compreensão desses parasitas. Entretanto, como em outros genomas, um genoma publicado não é necessariamente um genoma terminado. A existência de lacunas na sequência disponível dos genomas dos *TriTryp* é mais evidente no que diz respeito ao *T. cruzi*, por causa do grande número de sequências repetitivas encontradas em seu genoma, e pelo fato do clone de referência CL Brener ser um híbrido de duas linhagens distintas de *T. cruzi*. Dificuldades de montagem da sequência final resultaram na publicação de 32.746 *contigs* montados parcialmente e de 638 lócus gênicos incompletos (WEATHERLY, BOEHLKE & TARLETON, 2009). Tais dificuldades poderiam resultar em erros de montagem, uma possibilidade alternativa para explicar os resultados descritos acima.

As buscas adicionais por palavras-chave e por similaridade foram realizadas em bancos de sequências parciais de outras cepas e clones de *T. cruzi*, obtidas com o objetivo de auxiliar na montagem da sequência genômica do clone CL Brener de *T. cruzi*. Sequências obtidas da cepa Esmeraldo de *T. cruzi* foram utilizadas para a localização *do contig* que continha o terço final da região codificante do gene *clpb/hsp104*. Este *contig* está localizado em outro *Scaffold*, caracterizando uma montagem incorreta, e com atribuição funcional incorreta da região codificante parcial. A montagem correta está mostrada na FIGURA 11. O erro de montagem foi comunicado aos pesquisadores responsáveis pelo banco de dados e confirmado pelos mesmos. De posse da sequência do terço final do gene da proteína ClpB/HSP104, foi realizado um novo alinhamento com as sequências de ortólogos de *T. brucei* e *L. donovani*.

A FIGURA 11 mostra que, baseado na similaridade de sequência, a maior parte da região codificante do gene de *T. cruzi* foi obtida. No entanto, uma lacuna predita de apenas 11 aminoácidos ainda permanecia (FIGURA 12, região destacada). Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação a partir de DNA genômico da região contendo a sequência codificante dos 11 aminoácidos preditos, e o produto amplificado foi clonado e sequenciado, confirmando a previsão. A região codificante inteira do gene *clpb/hsp104* foi em seguida amplificada utilizando oligonucleotídeos específicos a partir de DNA genômico. O produto de amplificação de tamanho esperado confirma a organização gênica predita na sequência (FIGURA 13). O gene *clpb/hsp104* possui uma região codificante de 2604 pb, e dá origem a uma proteína predita com 868 aminoácidos. A sequência completa de *T. cruzi* foi comparada com as dos ortólogos de *L. major* e *T. brucei*, e o alinhamento está mostrado na FIGURA 14. O grau de identidade entre os tripanossomatídeos é de 71,9%, e a similaridade se estende por toda a proteína. Em seguida, foi realizado um alinhamento comparativo estrutural predito com algumas das principais ClpBs e algumas ClpAs de diferentes organismos para identificar semelhanças e diferenças entre essas sequências (FIGURA 15). As estruturas secundárias determinadas por cristalografia de raios-X da ClpA de *E. coli*, como α -hélice e folhas- β , aparecem acima do alinhamento, (FIGURA 15, cilindro rosa e seta amarela, respectivamente).

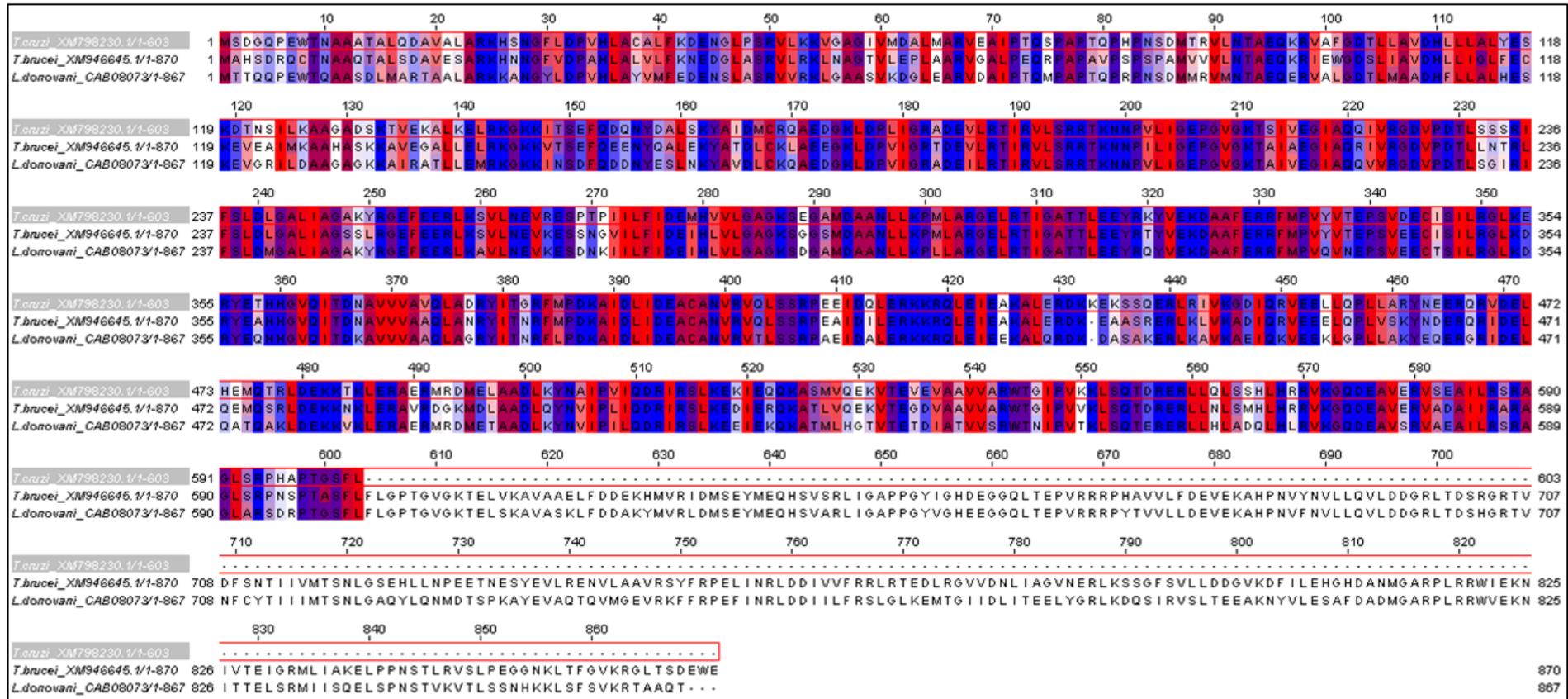


FIGURA 10. Alinhamento da sequência de aminoácidos predita disponível da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. donovani*. Cores segundo hidrofobicidade.

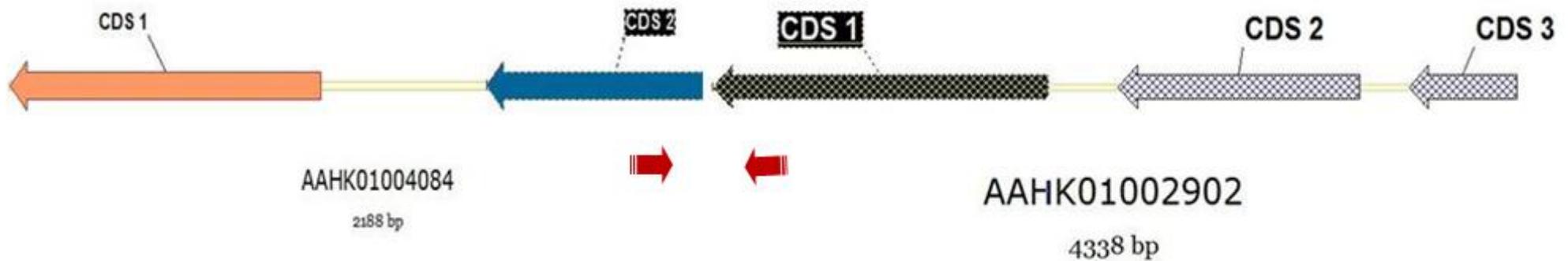


FIGURA 11. Esquema da posição e orientação corretas dos *contigs* contendo a sequência do gene de *clpb/hsp104*. O *contig* da esquerda (AAHK01004084) foi identificado por seqüenciamento da cepa Esmeraldo de *T. cruzi* e contém o terço final da região codificante de *clpb/hsp104* (em azul). O *contig* da sequência disponível em banco de dados, que foi seqüenciado com o clone CL Brener, e que contém a sequência dos 2/3 iniciais do gene *clpb/hsp104* é AAHK01002902 e está hachurada em preto. As setas vermelhas indicam a posição da lacuna e dos iniciadores utilizados para se obter a sequência restante e total do gene em estudo. Os números em pares de bases indicam o tamanho de cada *contig*.

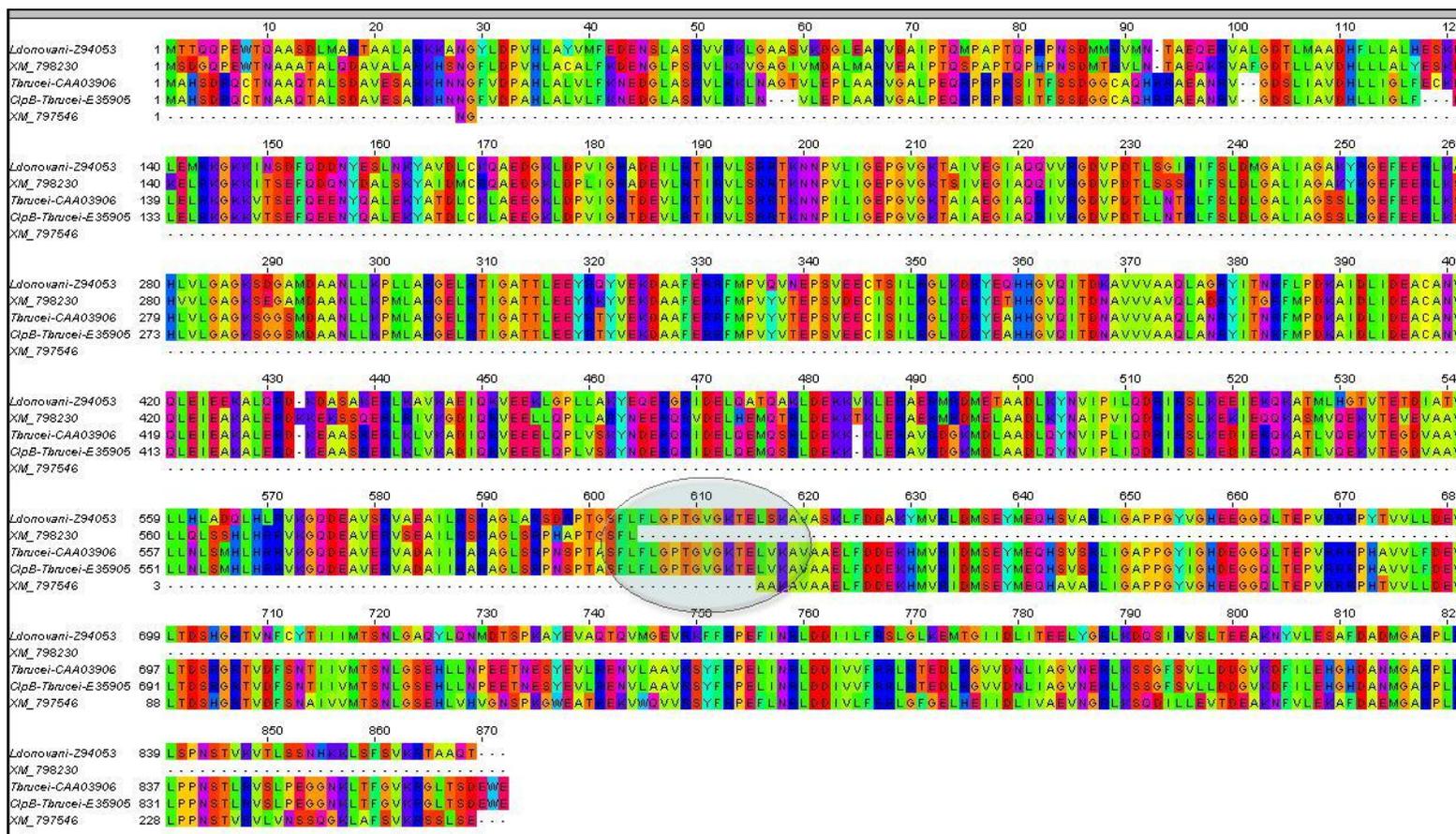


FIGURA 12. Alinhamento de seqüências de aminoácidos da proteína ClpB/HSP104 de tripanossomatídeos. Seqüências de *L. donovani* (Z944053); *T. brucei* (CAA03906 e E35905), e de *T. cruzi* (XM_798230 e XM_797546) foram alinhadas utilizando o software CLUSTALW. As seqüências de *T. cruzi* correspondem ao ID Tc00.1047053508665.14 de CL Brener (2/3 iniciais da proteína) e ao ID Tc00.1047053508807.10 da cepa Esmeraldo (terço final da proteína). A posição da junção das seqüências de *T. cruzi* está destacada com um círculo e mostra a lacuna predita de 11 aminoácidos. Classificação de cores segundo RASMBL RGB (Red, Green, Blue), RGB Triplet matrix combination.

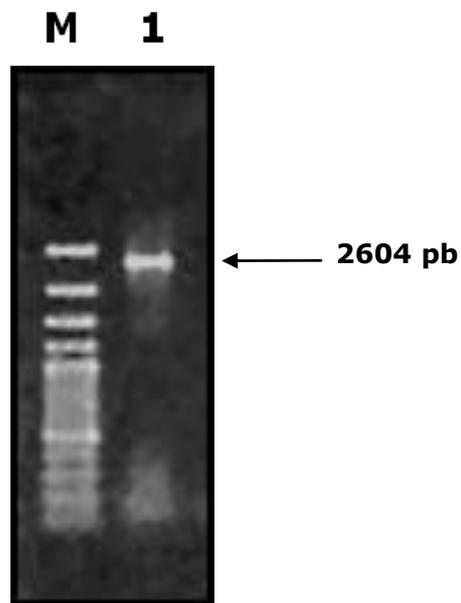


FIGURA 13. Amplificação por PCR da região codificante completa do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi*. Uma região de 2604 pares de base, correspondente a proteína predita de 868 aminoácidos, foi amplificada a partir de DNA genômico utilizando oligonucleotídeos específicos e analisada por eletroforese em gel de agarose. M, padrão de peso molecular 100bp *Gene Ruler Marker* (Fermentas); 1, produto de amplificação.

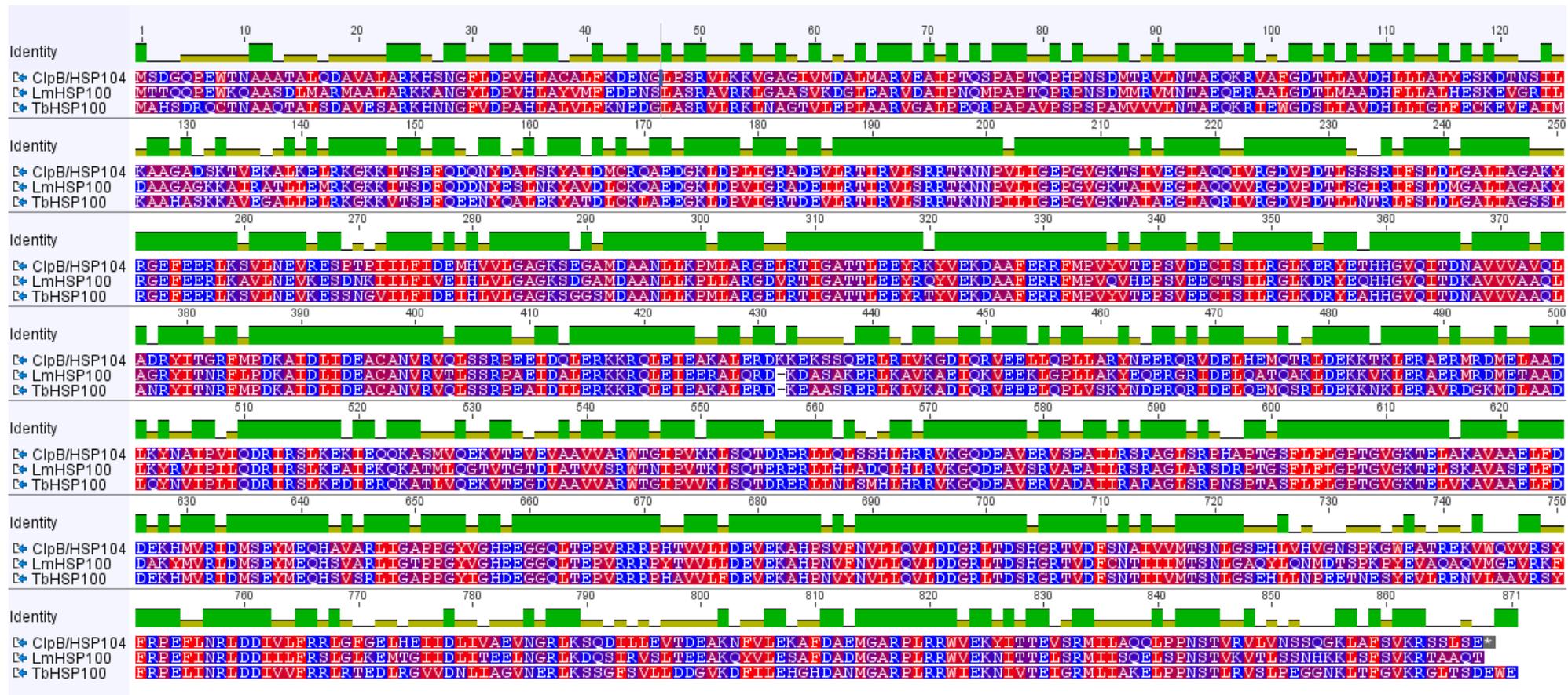


FIGURA 14. Alinhamento da sequência predita de aminoácidos de ClpB/HSP104 de tripanossomatídeos. A sequência completa da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* e de *T. brucei* (TbHSP100, E35905), e *L. major* (LmHSP100) foram comparadas. Escala de hidrofobicidade: aminoácidos hidrofóbicos em vermelho; neutros em violeta; anfipáticos em azul escuro; e hidrofílicos em azul claro. Retângulos verdes indicam aminoácidos idênticos nas 3 sequências; retângulos amarelos indicam aminoácidos idênticos em 2 das sequências. Alinhamento realizado com o programa Geneious Pro 4.6.4, com parâmetros segundo ClustalW.

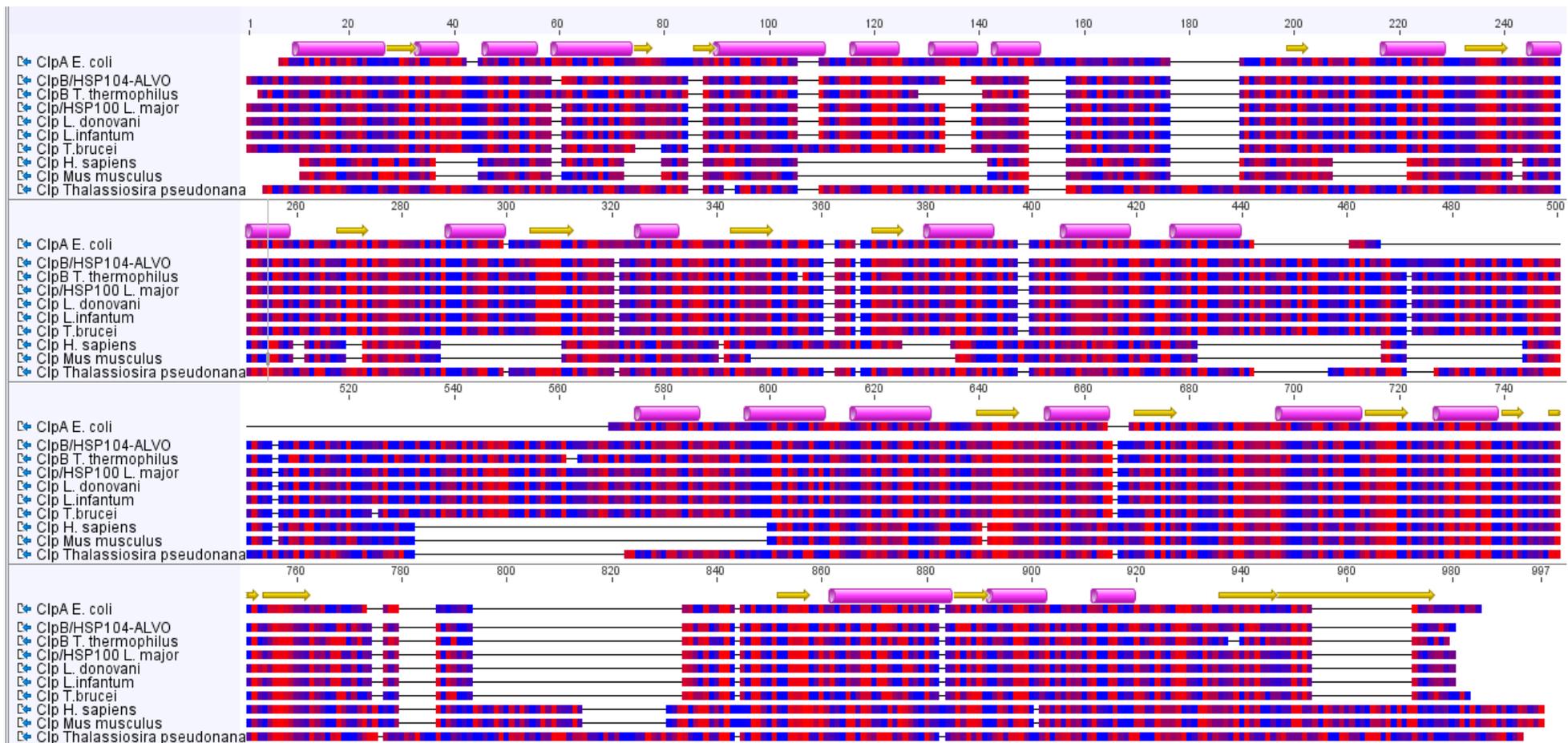


FIGURA 15. Alinhamento estrutural comparativo com proteínas ClpBs e ClpAs de alguns organismos. Estruturas secundárias da ClpA de *E. coli* determinadas por cristalografia de raios-X estão mostradas acima do alinhamento. Cilindros rosa, α -hélice; setas amarelas, folhas- β . Coloração dos aminoácidos como descrito na legenda da FIGURA 13. Alinhamento realizado com o programa Geneious Pro 4.6.4, com parâmetros segundo ClustalW. ClpB/HSP104-ALVO, sequência de *T. cruzi*.

Os tripanossomatídeos ramificaram-se da linha principal de evolução dos eucariotos há aproximadamente um bilhão de anos atrás. Esta separação pode ser evidenciada por características não compartilhadas com outros organismos próximos, tais como: uma única mitocôndria por célula, DNA mitocondrial de estrutura incomum (cinetoplasto), editoração de RNA, glicosomos com enzimas da via da glicólise, transcrição multigênica, adição em *trans* (*trans-splicing*) de mini-exon em todos os mRNAs (LUKES *et al.*, 1994).

Apesar dessa separação evolutiva dos tripanossomatídeos, o nível de conservação e similaridade das chaperonas ClpB ainda compartilha uma história evolutiva comum que, assim como os genes, podem ser denominadas de proteínas ortólogas, isto é, descende com divergência de um gene ancestral comum (FITCH, 1970). Na maioria das vezes, sequências de proteínas ortólogas possuem estruturas tridimensionais semelhantes e propriedades de aminoácidos específicos, como domínios, motivos e assinatura protéica única. No caso das chaperonas ClpB/HSP100, estas características são: os domínios *Walkers* A1, B1 e A2, B2 (proteínas ABC *transporters*); resíduos de aminoácidos específicos como dos motivos dos poros 1 (KYRG) e 2 (GYVG), localizados entre os *Walkers* A1 e B1, e *Walkers* A2 e B2, respectivamente (LEE *et al.*, 2003).

Com intuito de investigar a filogenia das proteínas ClpB/HSP104, foi construída uma árvore filogenética para comparar a proteína de *T. cruzi* com as proteínas de outros tripanossomatídeos, previamente caracterizadas, bem como a de outros organismos representantes de plantas (*T. pseudonana*), mamíferos (*M. musculus* e *H. sapiens*) e bactérias (*E. coli* e *T. thermophilus*). Esta análise filogenética foi realizada com as sequências parciais de aminoácidos, correspondentes aos domínios *Walkers* A1, B1 e A2, B2 das proteínas ClpB/HSP104 de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum* (Trityp), *E. coli* e *T. thermophilus* (Monera), *H. sapiens* e *Mus musculus* (mamíferos), *T. pseudonana* (Plantae), segundo metodologia do programa DAWGRAM PHYLOGENY (*Greedy majority-rule consensus clustering protein*) (LIM & ZHANG, 1999).

Conforme observado na FIGURA 16, a árvore filogenética construída agrupa a sequência da ClpB/HSP104 de *T. cruzi* com as Clps/HSP100 de *Leishmania* spp. e *T. brucei*. Além disso, a proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* se insere, juntamente com os demais tripanossomatídeos, numa posição mais próxima às proteínas dos demais eucariotos, e mais afastadas das proteínas de procariotos. Esta disposição filogenética mostra razoável concordância com árvores construídas a partir de RNA ribossomal 16S e do citocromo C, as macromoléculas correntes mais utilizadas para análise de relações filogenéticas. A concordância de análises filogenéticas sugere uma evolução vertical para a proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*. Esses resultados estão de acordo com os descritos por FERNANDES *et al.*, (2005), que também observou uma concordância filogenética das sequências de aminoácidos de algumas chaperonina HSP10 de outros organismos contra a mesma proteína em *T. cruzi*.

Um detalhe importante a ser mencionado é a dificuldade de classificação das famílias das proteínas Clps, principalmente entre as ClpAs e ClpBs, decorrente do alto grau de similaridade de sequência entre as mesmas. A classificação correta da proteína de *T. cruzi* na superfamília das Clp/HSP100, em particular entre ClpA ou ClpB, só foi conseguida com segurança por modelagem molecular (ver abaixo).

Por fim, é importante destacar que a sequência primária das proteínas Clp/HSP100 varia entre as espécies em decorrência de ser adicionada ou não um peptídeo sinal. Esta variação ocorre com as proteínas ClpB/HSP100 de plantas e fungos (OUDOT-LE *et al*, 2007).

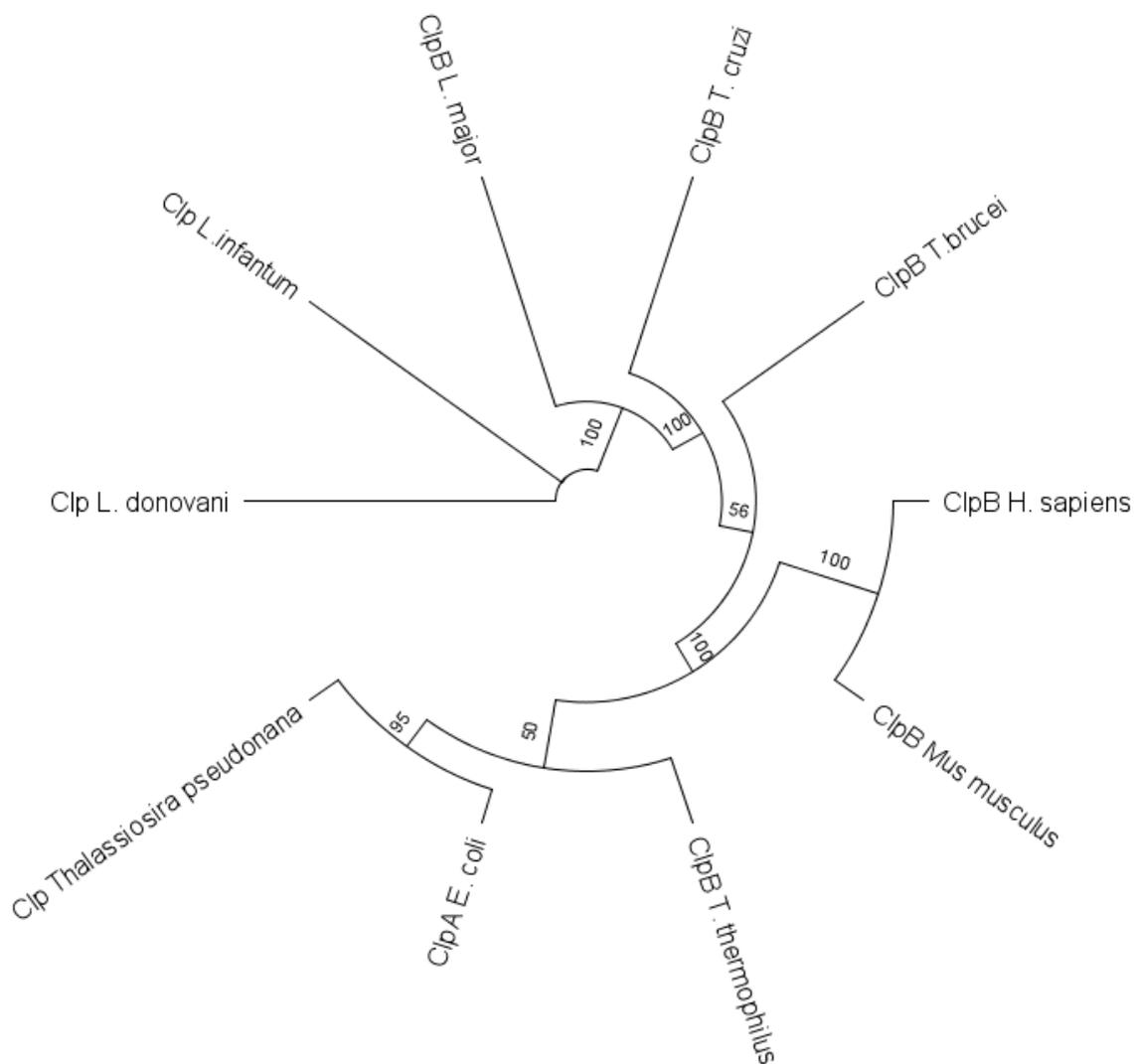


FIGURA 16. Análise filogenética das sequências de aminoácidos conservadas de Clp/HSP100 de diferentes organismos. Sequências parciais de aminoácidos, correspondentes aos domínios Walkers A1, B1 e A2, B2 das proteínas ClpB de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum* (Trityp), *E. coli* e *T. thermophilus* (Monera), *H. sapiens*, *Mus musculus*, *T. pseudonana* (Plantae) foram utilizadas para construção de árvore filogenética através do programa DAWGRAM PHYLOGENY (*Greedy majority-rule consensus clustering protein*) (LIM & ZHANG, 1999). A árvore construída está de acordo com o coeficiente de Jukes-Cantor e foi baseada na metodologia de *Neighbor-joining* (FELSENSTEIN, 1985). Números indicam iterações (*bootstrap*).

7.2 Caracterização da indução do mRNA do gene *clpb/hsp104* em resposta ao choque térmico

Como parte da caracterização do padrão de expressão gênica de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*, foi inicialmente realizado o mapeamento dos sítios de processamento do transcrito primário que dá origem ao mRNA maduro. A identificação dos sítios de *trans-splicing* e de poliadenilação permitem a predição do tamanho do mRNA e, principalmente, a investigar a existência de processamento alternativo, um mecanismo importante de regulação gênica. Além disso, a caracterização dos sítios de processamento é necessária como etapa preliminar para a construção de plasmídios para ensaios com genes repórter, abordagem importante para estudar regulação gênica e um dos objetivos futuros do presente trabalho.

Com o objetivo de mapear o sítio de *trans-splicing*, e conseqüentemente da UTR 5' do mRNA do gene *clpb/hsp104*, a UTR 5' foi amplificada a partir de RNA total por RT-PCR utilizando um oligonucleotídeo correspondente ao mini-exon e outro correspondente a uma região localizada a 14 nucleotídeos a 3' do início da região codificante (FIGURA 6). Conforme observado na FIGURA 17, um único produto foi amplificado de 150pb. O produto amplificado foi clonado, e alguns clones foram isolados e sequenciados. Um único sítio de *trans-splicing* foi identificado, e a seqüência está mostrada na FIGURA 18A. A FIGURA 18B mostra a região intergênica a UTR 5' do gene e o sítio de *trans-splicing* assinalado, correspondendo a uma UTR 5' de 72 nucleotídeos.

Em *T. cruzi*, assim como, em *Leishmania* e *T. brucei*, os mRNAs maduros são gerados por processamento de precursores policistrônicos, que envolve uma reação em *trans* na qual um mini-exon de 39 a 41 nucleotídeos é adicionado à extremidade 5' de cada mRNA (LIANG *et al.*, 2003). Somente um sítio acceptor de *splicing* para adição do mini-exon no mRNA de *clpb/hsp104* foi encontrado (FIGURA 18A). Este sítio é precedido por uma região rica em pirimidinas que, para outros organismos, foi estabelecida como fundamental para governar tal processo (MATTHEWS *et al.*, 1994).

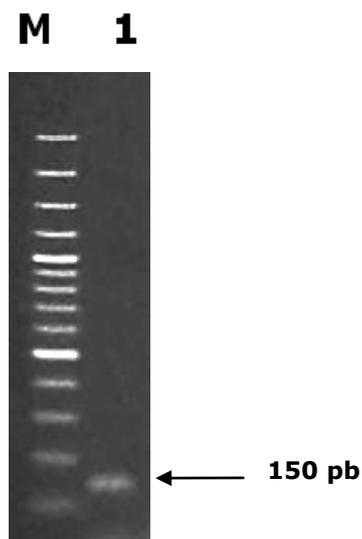


FIGURA 17. Amplificação por RT-PCR da região 5'UTR do mRNA de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*. cDNA foi sintetizado a partir de RNA total utilizando-se oligo(dT) como iniciador e transcriptase reversa, e a 5' UTR foi amplificada por PCR a partir do cDNA utilizando-se iniciadores correspondentes ao mini-exon e ao início da região codificante. O produto de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo. M, marcador de peso molecular; 1, produto amplificado.

18A

```
ClpB  ATGCGCTTCCTTTTCTTTCTTTCTTTCCCTTTTTCGCTCGCGTGAAGTGGCCTGCCTCGCTTGTCTGCCGTGGACGTGCT
RT-PCR GGGAATTCCTAACGCTATAATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTGTGGCCTGCCTCGCTTGTCTGCCGTGGACGTGCT
SL      1-AACTAACGCTATAATAAGTATCAGTTTCTGTACTTTATTG-
```

18B

```
cggcagcatTATAGCAGGAATCACGAGTGCTGGCGCCAAACATCCCACAAAGCAAAAAAATGAAATGAAGGTAGAC
ACACACAAAAATAGAAAAAGGAAGGACACACCATGGGCCATGAAAACAAAAACAAAAATTGATTCAGGCATACCACG
CCAGGCAGCAGCCACATAAGAAACCACTCCACTCCTAACCGTTTTTCCCGTTTTCTGTTTATCCTGCGTGTGTACTAA
AAAAATAGATATAATAATATATATTGAGGTGGAATAACAATAACACCGTAACACAAGCCGGTCCCCTGACAGCAGTG
GTTTGCCAGCGATCATGCATGCGCTTCCTTTTTCTTTCTTTCTTTCCCTTTTTCGCTCGCGTGAAGTGGCCTGCCTC
GCTTGTCTGCCGTGGACGTGCTatgtcagac
```

FIGURA 18. (A) Sequência do clone da - UTR 5' - que contém o sítio de *trans-splicing* do mRNA de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*. O produto de amplificação por RT-PCR da UTR 5' foi clonado e sequenciado. Sequência da região intergênica; RT-PCR, sequência do clone; SL, sequência do mini-exon de *T. cruzi*. O único sítio de *trans-splicing* encontrado aparece em negrito. (B) Sequência da região intergênica a 5' do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi*. O sítio de *trans-splicing* (AG) está sublinhado. O início da região codificante está em azul.

O *trans-splicing* alternativo já foi descrito para os genes PAG 1 (gene associado à prociclina) em *T. brucei*, no qual pode ocorrer em três sítios dando origem a transcritos monocistrônicos, bicistrônicos ou policistrônicos contendo ORFs curtas seguidas da ORF principal (VASSELLA *et al.*, 1994).

Com o objetivo de investigar o padrão de expressão gênica de *clpb/hsp104* de *T. cruzi*, foi realizada uma análise por *northern blot* com RNA total para detecção do mRNA correspondente. Mesmo após várias tentativas, no entanto, a análise não obteve sucesso, presumivelmente porque o mRNA é pouco abundante. De fato, foi descrito que a detecção do mRNA de *clpb/hsp104* de *Leishmania* requereu a utilização de RNA poli(A)+ (HÜBEL *et al.*, 1995). Decidimos, portanto, investigar a variação dos níveis do mRNA de *clpb/hsp104* em resposta ao choque térmico por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), uma técnica de sensibilidade elevada. Preparações de cDNA foram obtidas a partir RNA total de epimastigotas submetidos a diferentes temperaturas (29, 37 e 40 °C) de incubação durante 3 horas. O mRNA de *clpb/hsp104* foi detectado por qRT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (ver TABELA 2), e a quantificação relativa do mRNA foi feita em comparação com um controle endógeno, o mRNA da enolase, uma enzima que participa da via da glicólise. A FIGURA 19A mostra as curvas de amplificação representativas do mRNA nas diferentes temperaturas ocorrendo em ciclos distintos, o que juntamente com a curva de amplificação do controle inalterada (dados não mostrados), sugere níveis de mRNA diferentes. A quantificação dos resultados está mostrada na FIGURA 19B. Os resultados mostraram que ocorre um aumento no teor do mRNA de *clpb/hsp104* de 3,67 vezes a 37°C e 1,78 vezes a 40°C, quando comparados ao teor a 29 °C. O aumento de 3 vezes do mRNA de *clpb/hsp104* de *T. cruzi* a 37°C também já foi descrito para o mRNA do gene da proteína ClpA/HSP100 de *L. major* por HÜBEL *et al.* (1995), no qual demonstraram um aumento do mensageiro era de 2 a 3 vezes maior a 37°C. Quando os extratos eram submetidos a 40°C, a indução era menor. Segundo os autores, tal temperatura elevada promove um índice > 50% de letalidade para as células, o que é compatível com os nossos resultados com células incubadas a 40°C.

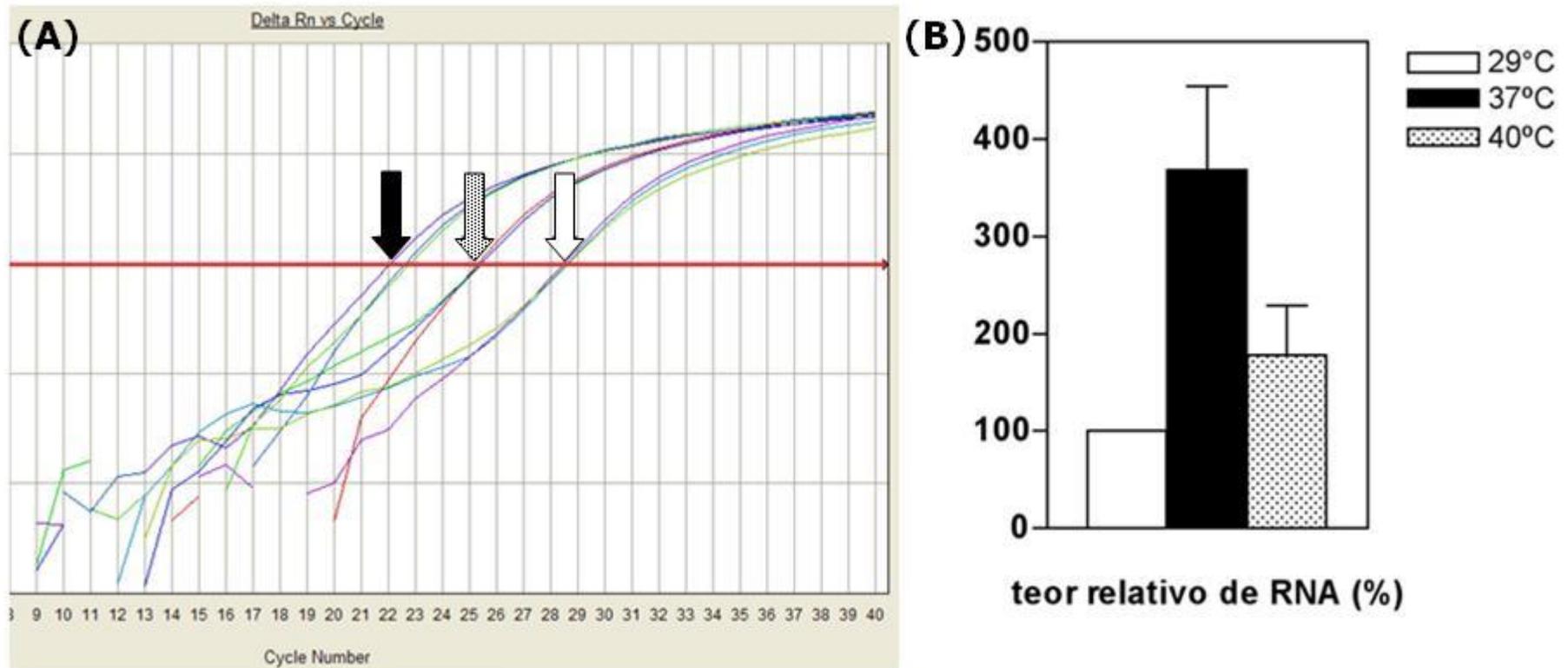


FIGURA 19. Análise dos níveis do mRNA de *clpb/hsp104* em diferentes temperaturas por qRT-PCR. (A) Curvas de amplificação do mRNA de *clpb/hsp104* por qRT-PCR a partir de RNA total de células incubadas a diferentes temperaturas por 3h, a 37°C (seta preta), a 40°C (seta hachurada) e a 29°C (seta branca). Experimentos realizados em triplicatas utilizando o agente intercalante *SYBRGreen* em equipamento *Real Time System 7500* (Applied Biosystem). (B) Teor relativo do mRNA de *clpb/hsp104* a 29°C, 37°C e a 40°C. Quantificação do teor relativo de mRNA utilizando o mRNA de enolase como controle interno. Barras correspondem a 3 experimentos independentes com erro padrão indicados.

7.3 Caracterização da indução da proteína ClpB/HSP104 em resposta ao choque térmico

Com o objetivo de investigar a indução da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* em resposta ao choque térmico, foi realizada análise eletroforética em géis SDS-PAGE e *western blot* com extratos protéicos de culturas de formas epimastigotas, contendo 1×10^8 células/mL incubadas a diferentes temperaturas (29, 37 e 40 °C), por períodos de 3, 6 ou 24 horas. Foram realizados experimentos com diferentes extratos protéicos com isolamento da fração citosólica em géis SDS-PAGE e posterior transferência para membranas de PVDF (Biorad). O *western blot* foi realizado utilizando o anticorpo policlonal anti-HSP100 de *Leishmania major* produzido em *chicken egg yolk* pelo grupo de Joachim Clos do Bernhard Nocht Institute (Alemanha), doado gentilmente para utilização neste trabalho.

Como pode ser visto na FIGURA 20B, a análise por *western blot* detectou uma proteína de aproximadamente 97 kDa em extratos citosólicos de proteínas totais de *T. cruzi* e de *L. major*. A detecção da proteína ClpB/HSP104 em extratos de células incubadas a 29 °C indica que a proteína está presente mesmo na ausência de choque térmico. O teor da proteína aumenta com maior período de choque térmico, atingindo maior acúmulo depois de 24 horas a 37 °C (FIGURA 20B); as quantidades de proteínas aplicadas no gel são equivalentes, como mostrados na coloração por Coomassie (FIGURA 20A). Quantificação utilizando o programa *Scion Image* (NHI Image) de 5 experimentos de *western blot* independentes revelou acúmulo da proteína de 1,9 vezes com choque térmico de 3h a 37 °C; 2,5 vezes com choque térmico de 6h a 37 °C; 5,2 vezes com choque térmico de 24h a 37°C; e 1,3 vezes com choque térmico de 3h a 40°C.

A indução da proteína por choque térmico também foi observado por KROBITSCH *et al* (1998), com a expressão da proteína HSP100 de *L. donovani* em culturas de células promastigotas incubadas a 37°C, por 24h, em ensaios de *western blot*

e *immunoblotting*, o qual foi observado pelos autores, um aumento 5-7 vezes do teor de HSP100 com 24 h de choque térmico.

HÜBEL e colaboradores (1997) realizaram testes experimentais super-expressando *clpb/hsp100* de *L. major*, para testar a sua termotolerância em células promastigotas a amastigotas, e *in vivo* com a infecção de camundongos BalbC com mutantes nocautes para o gene expressado, resultando em perdas ou até mesmo o não surgimento das lesões cutâneas características dos animais infectados, quando comparados com os camundongos infectados com o gene super-expressado *clpb/hsp100* de *L. major* do tipo selvagem.

Segundo KROBITSCH *et al.* (1998), a indução de síntese por aquecimento foi observada com as proteínas HSP100 e os resultados corresponderam respectivamente ao teor intracelular das HSP100 em *L. donovani*. Para este experimento foram utilizadas culturas de células promastigotas de *L. donovani* incubadas a 25°C e a 37°C durante 24 horas. Análises por *immunoblotting*, das proteínas recombinantes eram quantificadas e os montantes comparados entre as diferentes condições de incubação, mostraram um aumento dos níveis da proteína de 6 a 7 vezes maior nas células aquecidas a 37°C durante as 24 horas de estresse celular (KROBITSCH *et al.*, 1998).

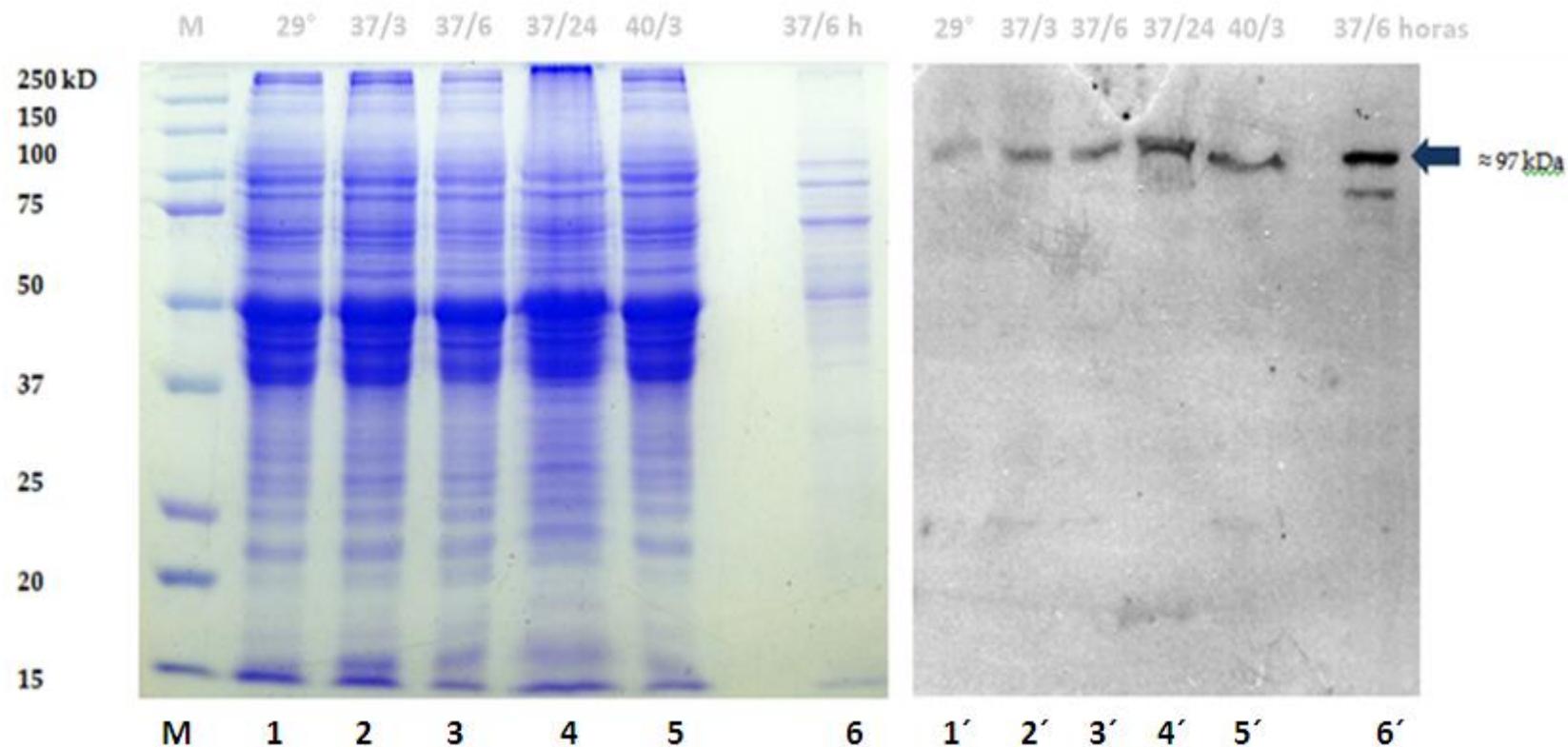


FIGURA 20. Detecção de ClpB/HSP104 por *western blot* (A) Análise eletroforética de proteínas totais da fração citosólica de extratos de *T. cruzi* (raias 1 a 5) e *L. major* (raia 6) em gel SDS-PAGE 10%. M: marcador molecular Kaleidoscope (Biorad); 1 – 29°C; 2 – 37°C/3 horas; 3 – 37°C/6 horas; 4 – 37°C/24 horas; 5 – 40°C/3 horas; 6 - 37°C/3 horas. (B) *Western blot* do gel SDS-PAGE fração citosólica de extratos de *T. cruzi* (raias 1' a 5') e *L. major* (raia 6') em gel SDS-PAGE 10%, com incubação do anticorpo anti-HSP104 de *Leishmania major*. Revelação com Kit ECL (GE HEALTHCARE).

7.3.1 Eletroforese Bidimensional (2-DE) com extratos solúveis de *T. cruzi*

Com o objetivo de investigar a presença de diferentes isoformas de ClpB/104 de *T. cruzi*, foi realizada análise por eletroforese bidimensional. Para obtenção do extrato de células de *T. cruzi* mais adequado para os géis 2D-IEF/SDS-PAGE foram feitos diversos testes. O melhor extrato foi obtido com culturas de células de 24 horas com 1×10^8 células/mL, que foram divididos em 3 conjuntos, conforme a temperatura (29, 37 ou 40°C) e o tempo de incubação (3 ou 6 horas).

Na eletroforese bidimensional (2D-IEF) as proteínas são separadas em duas de suas propriedades: numa primeira dimensão de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e, numa segunda dimensão, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a sua massa molecular (MM) (O' FARREL, 1975). Em géis 2D-IEF/SDS-PAGE os polipeptídios aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Diferentes *spots* podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de pI e MM. 2D-IEF/SDS-PAGE é uma técnica que pode ser usada para obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de *spots* podem fornecer informações acerca de proteínas estágio-específico, enquanto a intensidade dos spots fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídios (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Uma predição preliminar do valor do pI da proteína ClpB/HSP104 resultou num valor em torno de 7,5. Não foram consideradas as condições de *folding* protéico, nem a presença de solventes orgânicos nos cálculos executados pelo programa *Protein Calculator* v3.3 (disponível em: <http://www.scripps.edu/>).

As condições para a construção de géis bidimensionais em regiões de pH ligeiramente alcalino ou alcalino constituem um grande desafio técnico (BAE *et al.*, 2003; OLSSON *et al.*, 2002). Em tais faixas de pH é notável o aparecimento de longas listras horizontais (*streaking*), baixa resolução de *spots* e baixa reprodutibilidade. Os problemas de *streaking* são consequências do aparecimento do agente redutor (normalmente DTT) da

parte básica do gel de gradiente imobilizado de pH (IPG *strip*) usado na etapa de focalização isoeletrica. Esse desaparecimento acarreta oxidação dos grupos tióis das proteínas resultando em pontes dissulfeto intra e intercadeias. Decidimos, portanto, analisar inicialmente as amostras na faixa de pH de 4 a 7.

A reidratação do gel na solução da amostra e a reidratação em tampão 2D seguido de aplicação da amostra com o auxílio de um recipiente especial *cup-loading*, são algumas das várias maneiras diferentes de aplicar a amostra no IPG *strip* para a focalização e tentar contornar as dificuldades da técnica. Para a padronização da amostra deste estudo foram utilizadas varias combinações de metodologias e equipamentos de eletroforese 2D-IEF/SDS-PAGE, e as melhores foram com o protocolo de número 3 realizado em equipamento Multiphor II (GE *Healthcare*) e demais parâmetros de preparação do tampão de reidratação e método de aplicação. (TABELA 4).

TABELA 4. Tampões e métodos de precipitação de extratos de proteínas citosólicos de *T. cruzi* testados na reidratação de fitas e métodos de focalização de géis 2DE/SDS-PAGE

Tampão/ Método	Precipitação	Equipamento	Reagente Caotrópicos	Detergente	Método de aplicação
1	TCA 10% + Acetona	IPG Phor*	Uréia7M + Tiouréia 2M	CHAPS (4%)	Reidratação do gel
2	TCA 10% + Acetona	Multiphor II*	Uréia7M + Tiouréia 2M	ASB 14 (1%)	<i>Cup loading</i>
3	TCA 10% Etoh/Éter	Multiphor II	Uréia7M + Tiouréia 2M	ASB 14 (1%)	Reidratação do gel
4	TCA 10% + Acetona	Multiphor II	Uréia 9M	CHAPS (4%)	<i>Cup loading</i>
5	2D-Clean Up Kit*	IPG Phor	Uréia7M + Tiouréia 2M	ASB 14 (1%)	Reidratação do gel
6	2D-Clean Up Kit*	Multiphor II	Uréia 9M	ASB 14 (1%)	<i>Cup loading</i>

*2D-Clean Up Kit, IPG Phor e Multiphor II (GE *Healthcare*).

Com a padronização do protocolo dos géis 2D-IEF/SDS-PAGE para extratos protéicos de células epimastigotas de *T. cruzi*, obtivemos resultados satisfatórios em gel bidimensional com IPG *strip* de 7 cm com pH 4-7 (FIGURA 21). Amostras contendo 200 µg de proteínas predominantemente citosólicas de *T. cruzi* foram separadas em gel bidimensional e transferido para membranas de nitrocelulose para os experimentos de 2D-*Immunoblotting*, que foi realizado com os mesmos procedimentos do *western blot* com incubação do anticorpo policlonal anti-HSP100 de *L. major*. O anticorpo reconheceu uma única isoforma com pI aproximado de 6,5 tanto em extratos protéicos de células incubadas a 29°C (FIGURA 22A), como em extratos de células incubadas a 37°C por 24 horas (FIGURA 22B). Sinais que poderiam representar diferentes isoformas da proteína foram detectados em extratos de células incubadas a 37°C (FIGURA 22B, setas).

A indução de síntese por aquecimento foi observada com as proteínas HSP100 e os resultados corresponderam respectivamente ao teor intracelular das HSP100 em *L. donovani*. Para este experimento foram utilizadas culturas de células promastigotas de *L. donovani* incubadas a 25°C e a 37°C durante 24 horas. Análises por *imunoblotting*, das proteínas recombinantes eram quantificadas e os montantes comparados entre as diferentes condições de incubação, mostraram um aumento dos níveis da proteína de 6 a 7 vezes maior nas células aquecidas a 37°C durante as 24 horas de estresse celular (KROBITSCH *et al.*, 1998).

A indução de uma proteína de aproximadamente 100 kDa em resposta ao choque térmico em *T. cruzi* já foi descrita por DE MARVAL *et al.* (1996) com culturas contendo formas epimastigotas foram submetidas ao choque térmico a 37°C, por 2 horas, para análises em gel 2D-IEF. Segundo os autores foi possível identificar de 8 a 9 spots de proteínas induzíveis por calor em *T. cruzi* (DE MARVAL *et al.*, 1996).

Segundo SODRÉ *et al.* (2009), que observaram mapas proteômicos de extratos protéicos de *T. cruzi* CL Brener utilizando géis bidimensionais com pH de 4-7 e depois com os *spots* identificados em MALDI-TOF, muitas proteínas como tubulinas, quinases, enolases e algumas poucas chaperonas como Hslvu, co-chaperona GrpE, HSP70 e HSP83, que apresentaram pI 6.77, 8.49, 5.92, 5.22 e 5.07 (respectivamente).

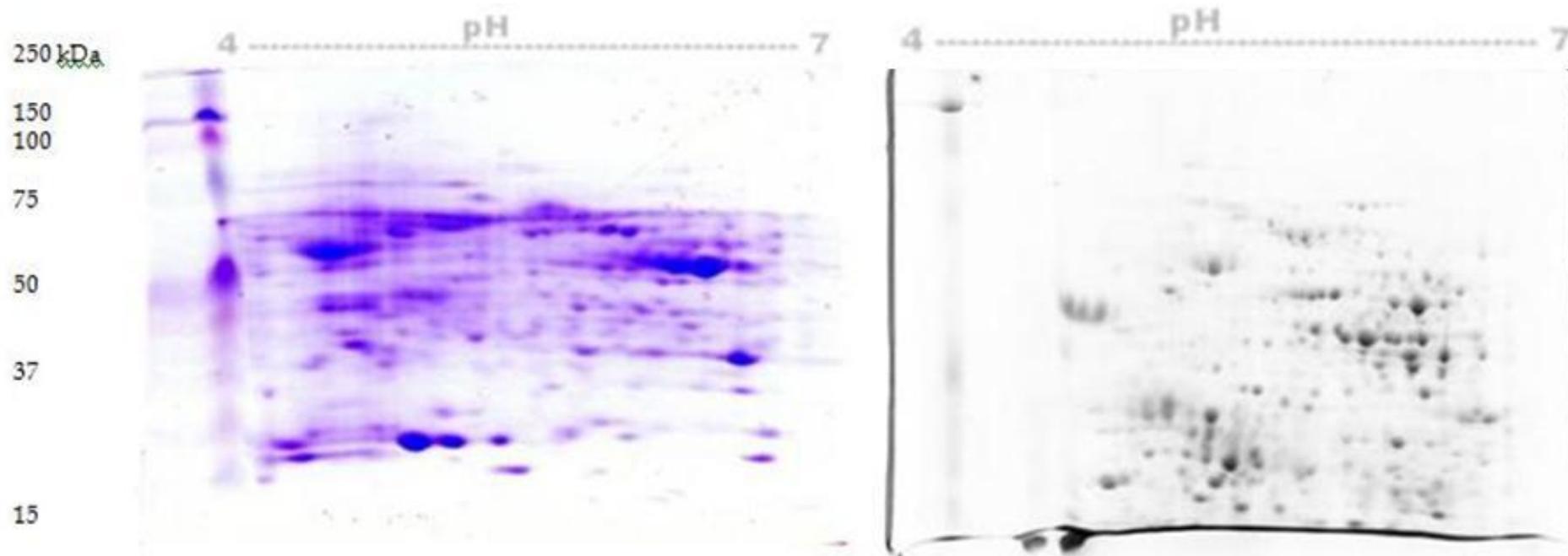


FIGURA 21. Perfil eletroforético bidimensional de proteínas citosólicas de *T. cruzi*. Extratos protéicos (1×10^8 células) das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas a eletroforese bidimensional segundo tampão/método 3 (gel da esquerda) e tampão/método 1 (gel da direita). A descrição em detalhes está na Tabela 4. O gel a esquerda foi corado com *Comassie Blue G250* e o da direita com *Memcode Kit* (PIERCE).

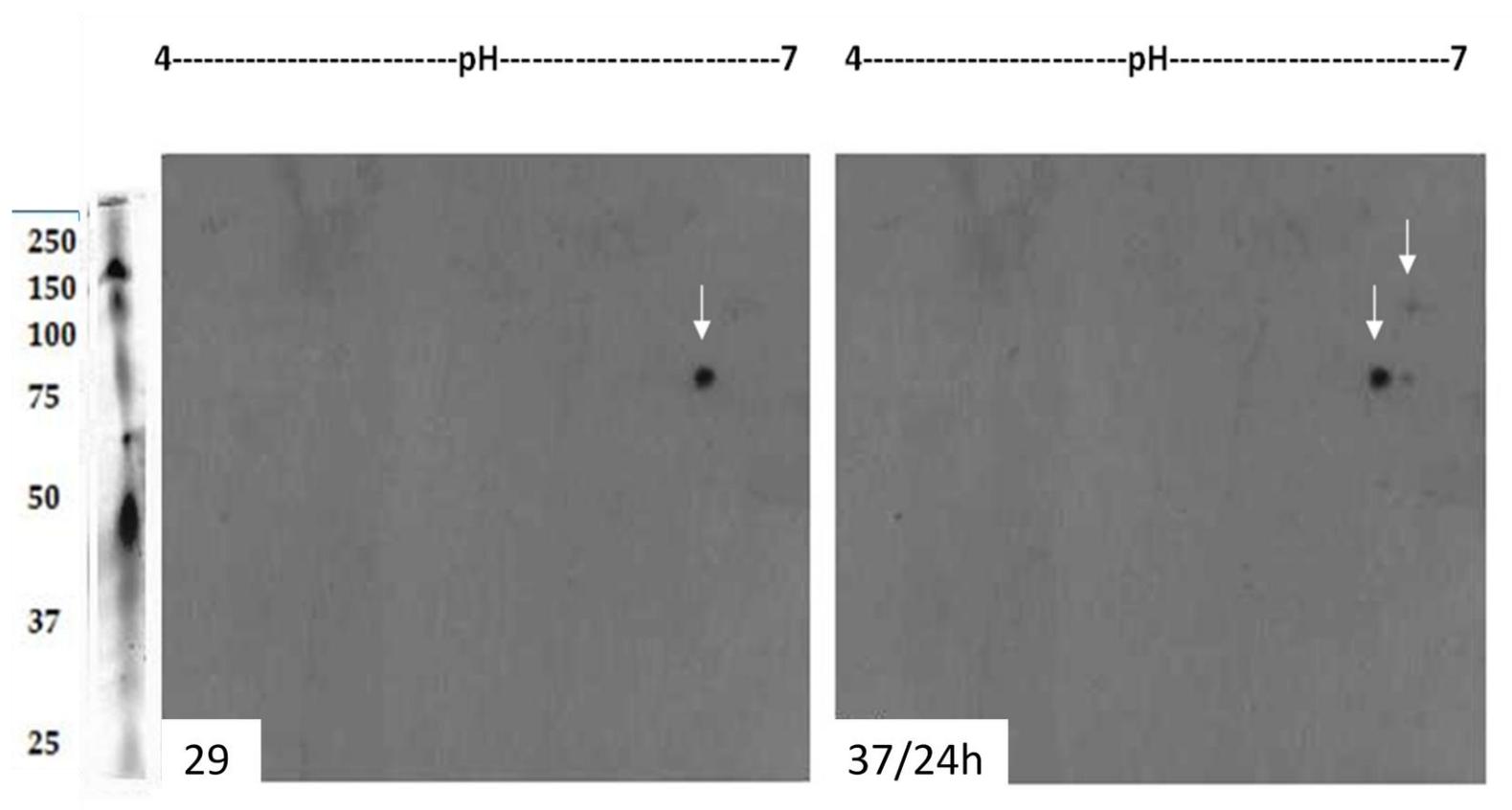


FIGURA 22. *Immunoblotting* bidimensional da fração citosólica de extratos de *T. cruzi* utilizando anticorpo anti-HSP100 de *L. major* a 29°C e a 37°C por 24h. As setas indicam *spots* detectados. Utilizou-se uma massa de 200µg de extrato protéico citosólico em cada focalização isoeletrica e transferência em membranas de nitrocelulose. A revelação foi com Kit ECL (GE Healthcare).

7.4 Investigação preliminar da capacidade antigênica da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*

As proteínas de choque térmico HSPs de patógenos parasitários têm sido relatadas como moléculas altamente antigênicas capazes de reagir com soros de indivíduos infectados (PALMERA *et al.*, 1995; BRANDAU, DRESEL & CLOS, 1995). Nesta abordagem preliminar nós utilizamos a técnica de *western blotting* com objetivo de investigar a capacidade antigênica da proteína ClpB/HSP104 de *Trypanosoma cruzi* frente à amostras de soros de indivíduos chagásicos crônicos, provenientes de diferentes áreas endêmicas do Brasil. Estas amostras fazem parte de um painel sorológico de 1064 amostras com diferentes perfis de reatividade sorológica para anticorpos anti-*T. cruzi*, obtidas a partir de estudos epidemiológicos sazonais realizados em dois Estados brasileiros: Minas Gerais e Piauí, apresentando alto e médio perfil de reatividade em ensaios sorológicos, respectivamente (OELEMANN *et al.*, 1998). Todas as amostras foram previamente testadas e apresentaram positividade a partir de diferentes técnicas sorológicas, que incluíam três kits de ELISA comerciais, um ELISA *in-house* (TEIXEIRA, *et al.*, 1994; OELEMANN *et al.*, 1998), uma técnica de hemaglutinação indireta, uma técnica de imunofluorescência indireta, além de um teste confirmatório (INNO-LIA), em que eram utilizados sete proteínas recombinantes e/ou sintéticos (OELEMANN *et al.*, 1999).

Muito embora tenha sido utilizado um número reduzido de amostras neste estudo preliminar, esta abordagem inicial pôde demonstrar a presença de reatividade das 2 amostras positivas, independentemente do nível de reatividade de cada indivíduo. Os soros de pacientes chagásicos são provenientes do sertão do estado do Piauí, denominada PI-51 e da cidade de Virgem da Lapa (VL-58), localizada no vale do Jequitinhonha no estado de Minas. As análises por *western blot* utilizando anticorpo Anti-HSP100 de *L. major* e soros de pacientes Chagásicos estão na FIGURA 23 (raia 4),

assim como um controle de paciente soro negativo para Doença de Chagas (FIGURA 23 raia 3). Uma proteína de peso molecular de aproximadamente 100 kDa foi reconhecida em todos os 2 soros, individualmente (FIGURA 23, raias 1 e 2).

Este tipo de abordagem foi previamente descrita por VERÍSSIMO DA COSTA (2007), que utilizou um *Pool* de soros de pacientes Chagásicos frente a uma fração de proteínas imunogênicas com faixa de peso molecular entre 30 e 34 kDa de *T. cruzi*, mostrando um excelente índice de sensibilidade e especificidade tanto no ELISA (99%) como em teste com *western Blot* (100%).

Estes resultados sugerem uma possível reatividade desta proteína com anticorpos específicos de indivíduos infectados, uma vez que esta reatividade também pôde ser comparada à reatividade do anticorpo policlonal específico anti-HSP100 de *L. major* (FIGURA 23, raia 4). Neste mesmo ensaio também podemos observar à presença de reatividade com outras proteínas de peso molecular inferior a 100 kDa. Tais evidências podem estar atribuídas à degradação de proteínas durante o processo de preparação, incluindo o choque térmico de 24 horas. Outro fator que pode ser incidente é a presença de proteases no extrato citosólico, apesar dos extratos serem preparados com adição de inibidores de proteases, este fator é comumente observado em preparo de antígenos parasitários; ou ainda, à presença reatividade cruzada com domínios conservados de outras moléculas do parasito. Estudos posteriores de purificação e/ou de utilização da tecnologia do DNA recombinante para a clonagem e expressão desta proteína serão realizados para ampliação da investigação sorológica, como perspectivas futuras do trabalho.

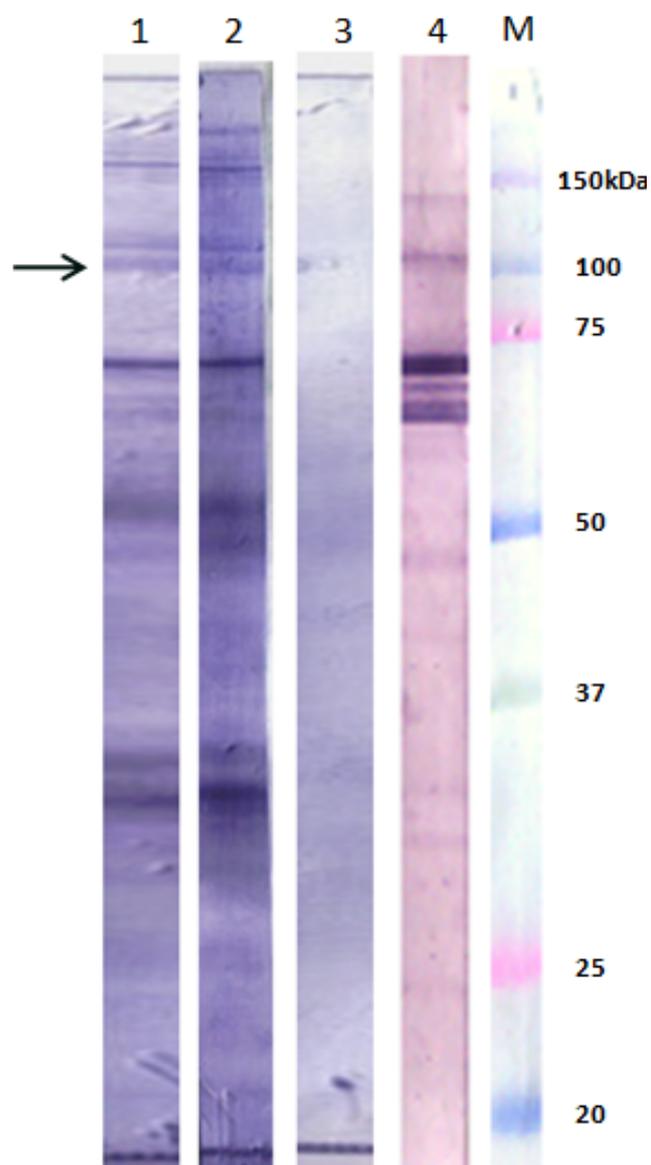


FIGURA 23. Análise por western blot com soros de pacientes Chagásicos e com anticorpo anti-HSP100. Um total de 100µg de frações de proteínas citosólicas de células epimastigotas de *T. cruzi* foi incubado a 37°C, por 24h. Foi separado por gel SDS-PAGE e transferido para membrana, e incubado com soros de pacientes Chagásicos ou anticorpo anti-HSP100 de *L. major*: 1 - soro de paciente Chagásico PI-51; 2 - soro de paciente Chagásico VL-581; 3 - Paciente soro negativo para Doença de Chagas; 4 - Detecção com anti-HSP100 *L. major*. M- marcador de proteínas alto peso molecular Kaleidoscope (Biorad). Revelação direta em membrana com substrato BCIP/NBT.

7.5 Construção de modelo tridimensional de ClpB/HSP104 de *T. cruzi* por Modelagem Comparativa

A técnica de Modelagem Comparativa consiste em explorar similaridades estruturais entre proteínas, construindo um modelo tridimensional a partir de uma ou mais estruturas conhecidas de proteínas relacionadas. Esta abordagem baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência primária durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em sutis modificações na estrutura tridimensional (NAYEEM, 2006). Além disso, durante o processo de evolução biológica tem sido observado que proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- α e fitas- β) e as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“*loops*”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (BRANDEN & TOOZE, 1991).

A similaridade entre duas proteínas pode ser sugerida pela comparação de sequências de aminoácidos. Para isso, é necessário escolher criteriosamente a proteína que será utilizada como molde para o modelo a ser construído. Para esse processo de obtenção de um modelo protéico virtual através da estratégia da modelagem comparativa são necessárias basicamente quatro etapas principais: identificação de referências; alinhamento entre sequências - alvo e molde(s); construção do modelo; validação do modelo (MARTI-RENOM, 2002) (HILLISH, 2004).

Uma das maneiras mais eficientes para se realizar uma busca de proteínas que possamos utilizar a técnica de modelagem comparativa é através de similaridade seqüencial, utilizando técnicas de bioinformática. Um procedimento comumente utilizado para encontrar a proteína molde a ser utilizada consiste em confrontar a seqüência da proteína que se deseja modelar com o banco de dados de proteínas com estruturas tridimensionais elucidadas experimentalmente (PDB - *Protein Data Bank*). Para tal busca são utilizados algoritmos aproximativos, como o BLAST (ALTSHUL *et al.*, 1997) e o FASTA (MUNIZ, 2003). A partir do momento que seqüências homólogas à da proteína-alvo ClpB/HSP104 de *T. cruzi* foram identificadas, as quais contêm estruturas resolvidas experimentalmente e com um grau de similaridade seqüencial aceitável, a construção do modelo pode ser realizada facilmente e com sucesso.

As seqüências das proteínas-molde selecionadas, bem como da proteína-alvo, precisam ser alinhadas para que fragmentos estruturais conservados sejam identificados. Utilizando o algoritmo BLASTp (ALTSHUL *et al.*, 1997) e o banco de dados do PDB obteve-se alinhamento com identidade de 53% (457/858 aminoácidos) e positividade de 72% (613/858 aminoácidos) de acordo com a matriz BLOSUM62, utilizando como molde diferentes cadeias da estrutura da proteína ClpB/HSP104 de *Thermus thermophilus* (Código PDB: 1QVR). Observamos com os resultados que a cobertura foi de 98, 84%. Podemos visualizar o alinhamento entre ClpB/HSP104 de *T. cruzi* (proteína alvo) e a proteína de *T. thermophilus* a ser utilizada como molde no alinhamento a seguir (FIGURA 24).

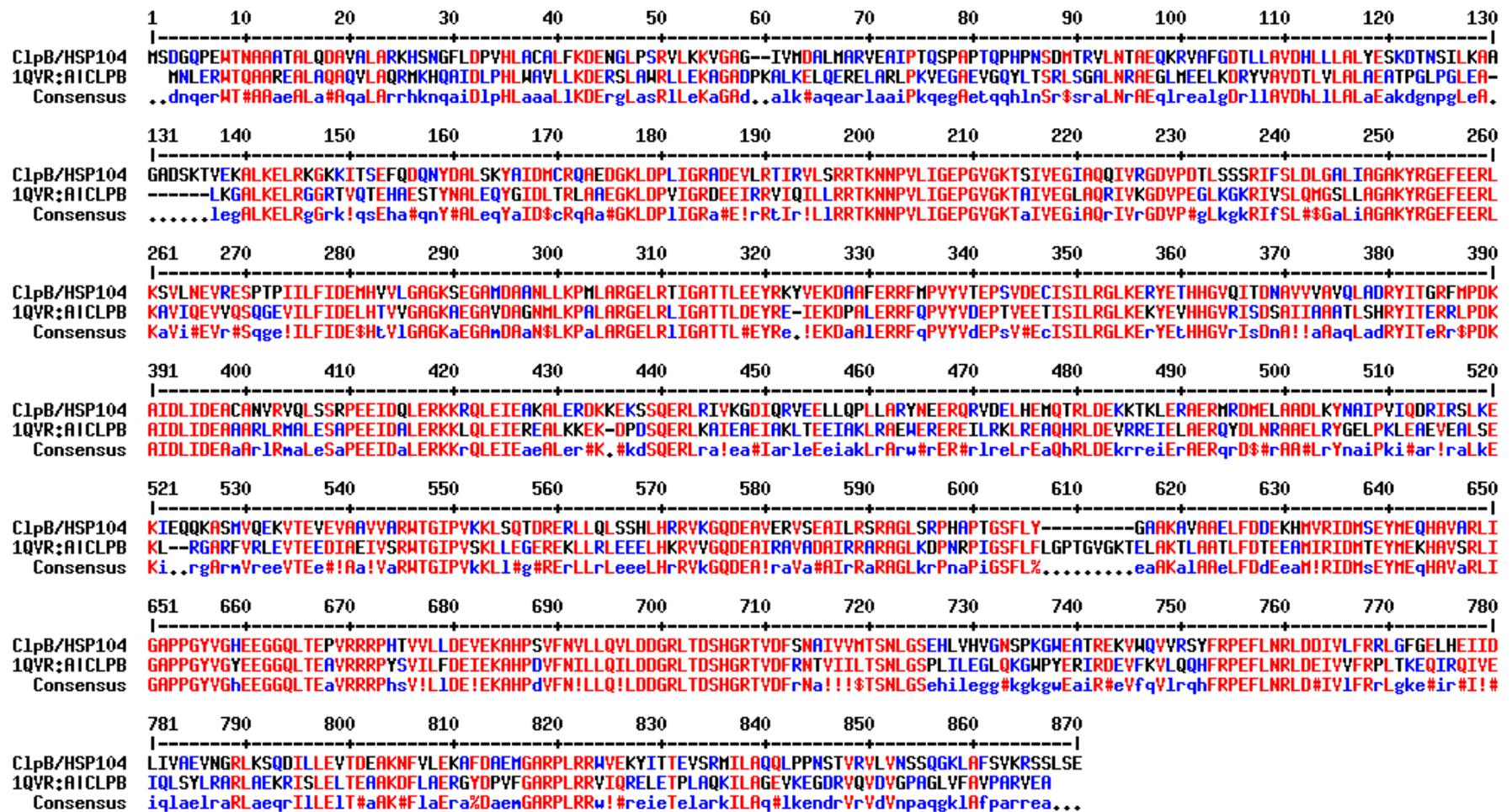


FIGURA 24 – Alinhamento de sequência de aminoácidos de ClpB/HSP104 de *T. cruzi* e a cadeia A da proteína ClpB/HSP104 de *Thermus thermophilus* (1QVR) gerado pelo programa e classificação MULTATIN: em vermelho (high consensus colour); em azul (low consensus colour); em preto (neutral).

Uma vez que o alinhamento entre a sequência da proteína molde e proteína a ser modelada é determinado, prossegue-se para a construção do modelo que nesse caso foi feito através do programa Modeller. Esse programa utiliza restrições espaciais concomitantemente com a energética para gerar os modelos tridimensionais.

Foi utilizado como molde a estrutura tridimensional da proteína ClpB/HSP104 de *Thermus thermophilus* (1QVR) determinada por cristalografia de raio-X com resolução de 3 Angstrom (LEE *et al.*, 2003). Nessa etapa, foram analisados os 300 melhores modelos construídos pelo programa Modeller (SALI & BLUNDELL, 1993), onde foi gerado a modelagem da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* (FIGURA 26).

A última etapa do processo de modelagem comparativa de proteínas consiste na análise da confiabilidade do modelo gerado. Ou seja, é necessário validar a estrutura obtida. Isto é uma tarefa importante e, ao mesmo tempo, difícil, pois a qualidade do modelo depende de um elevado número de propriedades, em diferentes níveis da organização estrutural e principalmente da acurácia da proteína-molde (experimental) utilizada. Quanto melhor a resolução da proteína, melhor o número de observações experimentais diferentes derivadas dos dados de difração com maior a acurácia da estrutura da proteína (NAYEEM, 2006).

Um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína é a distribuição dos ângulos torcionais da cadeia principal. A distribuição de todos os ângulos ϕ e ψ pode ser examinada através do gráfico de Ramachandran que é gerado pelo programa Procheck (LASKOWSKI, 1993).

O critério de seleção para a escolha do melhor modelo foi em função da energética gerada pelo Modeller e a qualidade do gráfico de Ramachandran, gerado pelo Procheck.

Nós realizamos estudos de modelagem molecular da ClpB/HSP104 de 300 modelos de menor energia gerados, selecionou-se aquele com melhor *plot* de Ramachandran, possuindo 91.3% dos seus aminoácidos nas regiões muito favoráveis do gráfico, 7.3% dos aminoácidos em regiões favoráveis e 0,3% dos aminoácidos em regiões desfavoráveis do gráfico conforme podemos visualizar no gráfico da FIGURA 25, que apresenta as análises de Ramachandran com programa Procheck (LASKOWSKI, 1993).

Para interpretação do gráfico de Ramachandran, em traços gerais, são as combinações mais estáveis (de energia mais baixa) de pares de ângulos C alfa-N e C alfa-C (localizadas nas regiões em vermelho, na FIGURA 25), dentre todas as teoricamente possíveis. Existem basicamente três tipos de estruturas estáveis para uma cadeia polipeptídica: alfa-hélice e folha-beta. Uma das características que as distingue, e que é consequência direta dos diferentes ângulos de ligação, cuja alfa-hélice, apresenta ligações de hidrogênio mais ou menos alinhadas com o eixo da molécula, possibilitando a formação de ligações intracadeia. Por sua vez, a folha-beta apresenta ligações de hidrogênio mais ou menos perpendiculares ao eixo da molécula, permitindo a formação de ligações intercadeia.

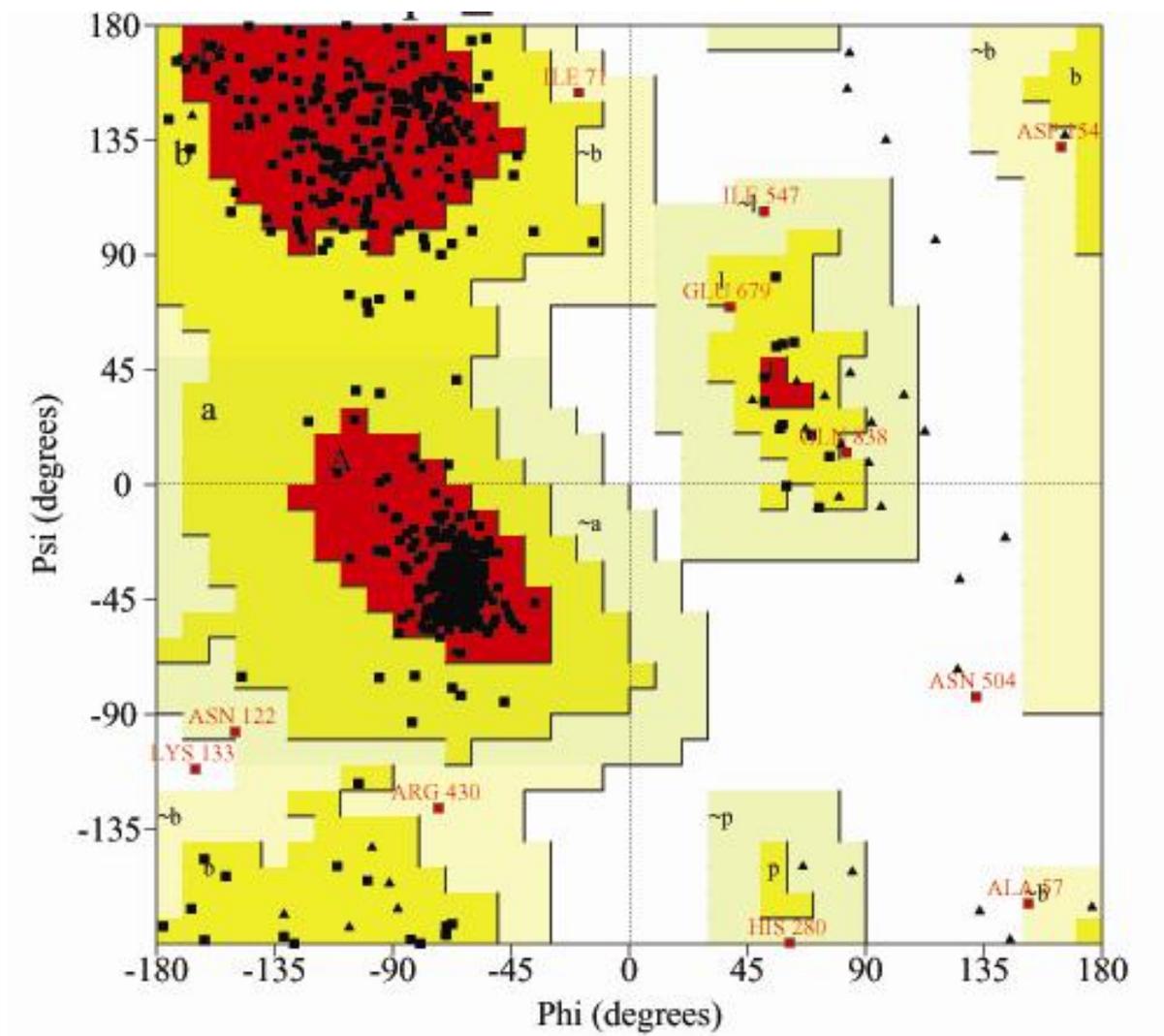


FIGURA 25 - Gráfico de Ramachandran: para validação do modelo da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*. Resíduos nas regiões muito favoráveis – 91.3% estão na região em vermelho do gráfico (aminoácidos representados em quadrados em preto); resíduos em regiões favoráveis – 7.3% estão na região em amarela do gráfico; resíduos em regiões generosamente permitidas – 1.2% estão na região em bege do gráfico; resíduos em regiões desfavoráveis – 0.3% estão na parte em branco (aminoácidos representados em quadrados em vermelho). Os quadrados representam cada resíduo de aminoácido que compõe a proteína. Os triângulos representam os resíduos que compõem alças de glicina.



FIGURA 26. Modelo construído por modelagem comparativa para a proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* com os programas Swiss-PDBViewer (GUEX, 1997) e Pymol (WARREN, 2004). O modelo corresponde a sexta parte de um monômero que constitui parte do hexâmero da proteína.

A estrutura do monômero da chaperona ClpB, presente na maioria dos organismos, pode ser dividido em 5 domínios distintos: (1) *N-terminal*, que aparece em amarelo na FIGURA 27 (A); (2) *D1-large* ou também conhecido como *Nucleotide Binding Domain 1* (NBD1), que possuem a função de *Walkers* na grande família de proteínas *ABC transporters*, dependentes de ATP (em azul); (3) *D1-small*, que contém o fator característico de ligação desta proteína chamado de *Hsp104-linker* (em marrom); (4) *D2-large* ou NBD2 (em verde); (5) *D2-small*, que contém o Motivo 1 com a hélice L1 (em roxo), e o Motivo 2 que contém L2, L3 & L4 (rosa), todos eles ricos em resíduos de leucina e com função muito importante de desagregação e ressubilização de agregados realizados pela ClpB/HSP104 (LEE *et al.*, 2003).

Os motivos 1 e 2 da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*, por estarem localizados no exterior do hexâmero, podem expor epítomos ao sistema imune do hospedeiro. Estas regiões podem servir como base para se desenhar peptídeos sintéticos com o objetivo de se usar como futuros alvos de diagnóstico da doença de Chagas. Apesar de testes diagnósticos já estarem disponíveis e em uso na prática clínica, os mesmos estão protegidos por patentes, sendo de interesse o desenvolvimento de novos métodos. Concluímos que a região mais indicada para o propósito descrito são os Motivos 1 e 2 da proteína, na qual delimitamos 2 áreas de interesse (FIGURA 28). Como estudo preliminar nesse sentido, o modelo tridimensional da proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* previamente construído foi comparado por modelagem com uma estrutura de outra proteína humana ClpP (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1TG6>) (dados não mostrados), que pertence a família das chaperonas HSP100, e a única disponível em bancos de dados do PDB para modelagem. Diferenças significativas de sequência entre a proteína humana e de *T. cruzi* foram encontradas nas regiões dos motivos descritos, sugerindo que possivelmente não ocorre reação cruzada.

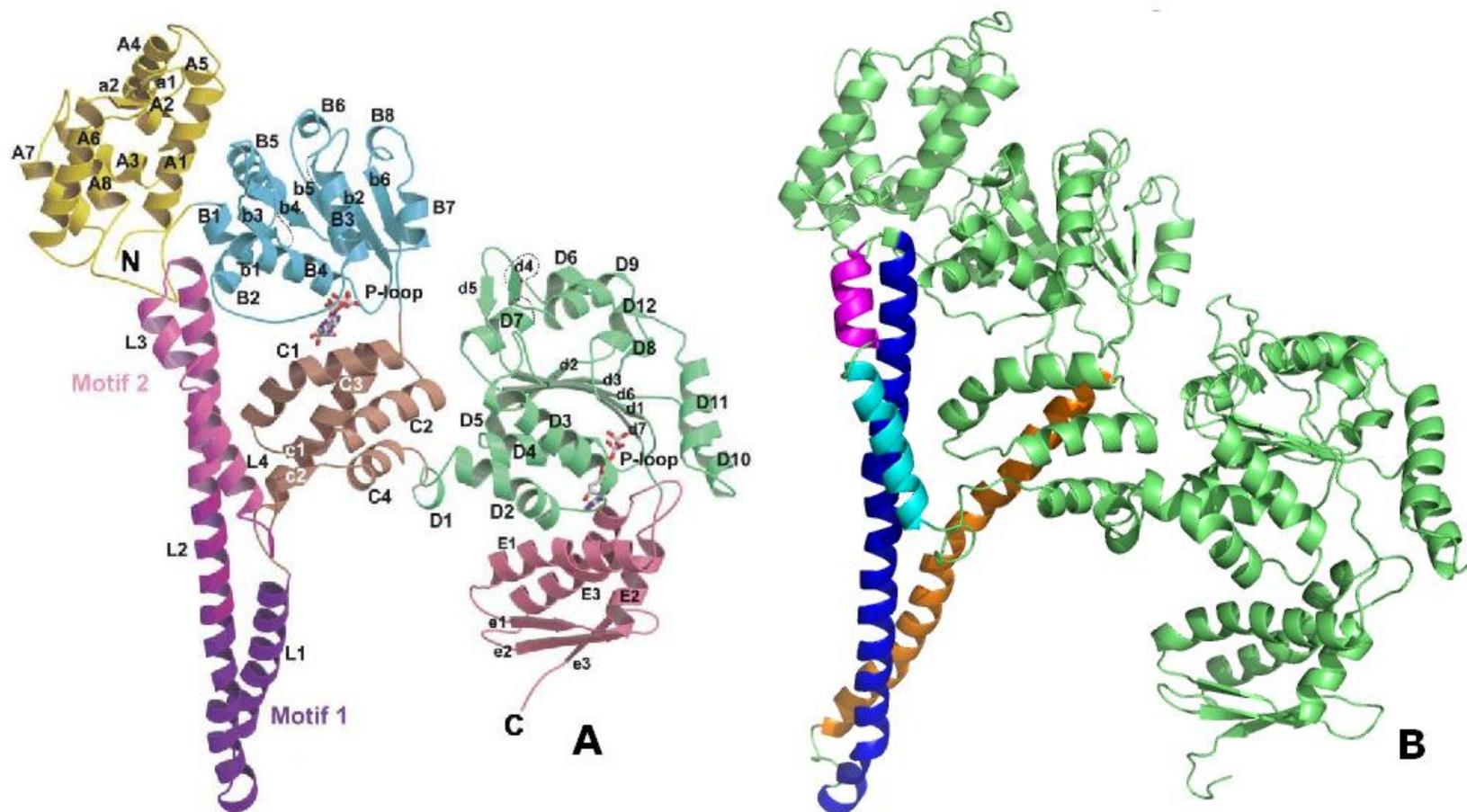


FIGURA 27. (A) TClpB104 de *T. thermophilus* mostrando os principais domínios estruturais da proteína (LEE *et al.*, 2003). (B) Modelo do monômero construído por modelagem comparativa para a proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi*. Em laranja = L1, em marinho = L2, em rosa = L3, em azul claro = L4. Os 2 monômeros foram colocados em eixos semelhantes para esta comparação. Programa Pymol (WARREN, 2004).

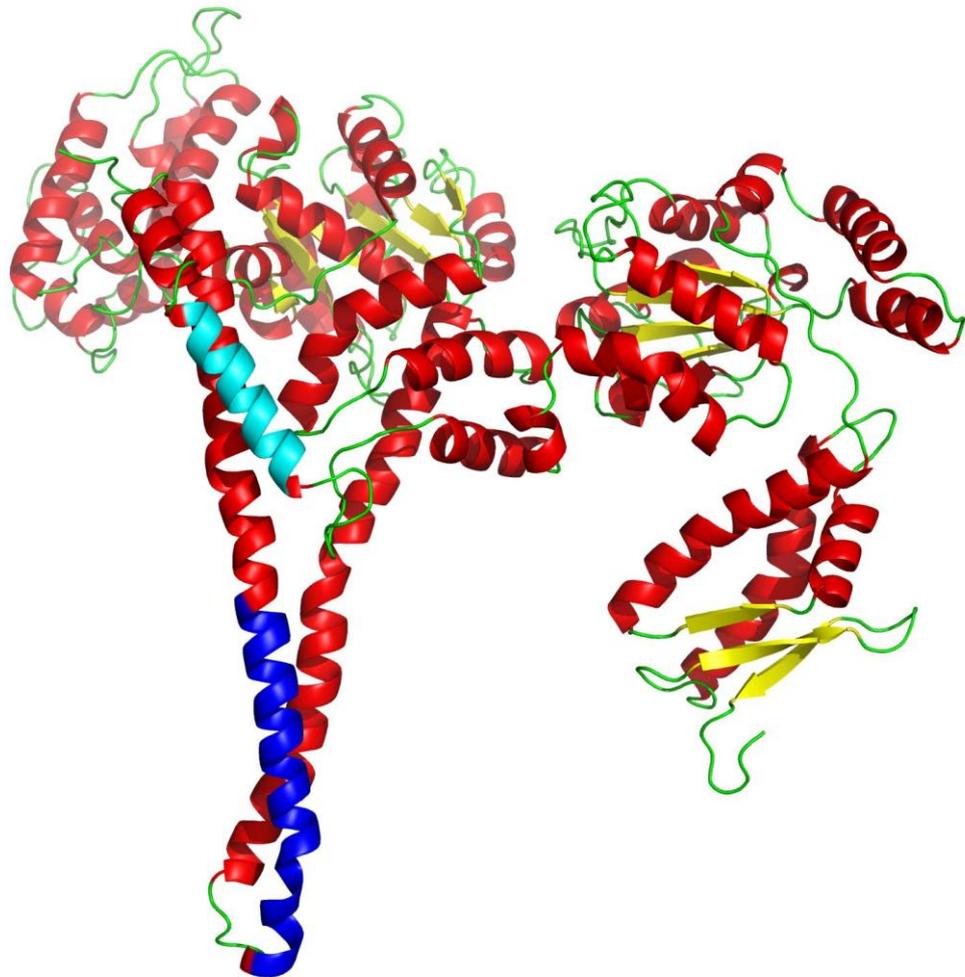


FIGURA 28. Modelo construído para ClpB/HSP104 de *T. cruzi*, em destaque os 2 peptídeos propostos: na alça L2 (em azul escuro) e na alça L4 (em azul claro).

8. CONCLUSÕES

- ✓ Foi clonada e caracterizada a sequência completa do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi* que dá origem a uma proteína de 868 aminoácidos, com identidade de 71,9% quando comparados aos genes ortólogos dos outros tripanossomatídeos.
- ✓ Análises de *Southern blot* sugerem que o gene *clpb/hsp104* está presente no genoma de *T. cruzi* em cópia única.
- ✓ Análises do teor relativo do mRNA mostraram que ocorre indução dos níveis de mRNAs *clpb/hsp104* de *T. cruzi* após o choque térmico, com um aumento de aproximadamente 4 vezes a 37°C e de 2 vezes a 40°C.
- ✓ Análises de indução por choque térmico do gene *clpb/hsp104* de *T. cruzi*, mostraram que ela está presente a 29°C, e que um acúmulo a 37°C, quanto a 40°C, sendo mais evidente ao final de 24 horas de incubação à 37 °C.
- ✓ A proteína ClpB/HSP104 de *T. cruzi* está presente em uma única isoforma a 29°C com pI aproximado de 6,5 cujo o número de isoformas parece aumentar com o choque térmico a 37°C.
- ✓ Foram propostos dois modelos para caracterizar as estruturas tridimensionais de ClpB/HSP104, o monômero da proteína por modelagem molecular, de boa qualidade.
- ✓ O modelo da estrutura tridimensional da chaperona de *T. cruzi* revelou algumas diferenças estruturais em relação ao molde de *T. thermophilus*, em particular no motivo 1.

9. PERSPECTIVAS

- Determinação do tamanho e número do mRNA do gene *clpb/hsp104* utilizando RNA Poly A+
- Caracterização das diferentes isoformas de ClpB/HSP104 encontradas nas análises em géis bidimensionais por espectrometria de massas
- Estudo dos peptídeos ligados a uma molécula de 5/Biotina para testes e ensaios de captura em placas de Elisa com soros Chagásicos

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997). A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- ANDERSON, A. C. (2003) The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology* 10: 787-797.
- ATWOOD, J. A., WEATHERLY, D. B., MINNING, T. A, BUNDY, B., CAVOLA, C., OPPERDOES, F. R., ORLANDO, R., TARLETON, R. L (2005) The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science* 309(5733):473 - 476
- AVILA A. R., YAMADA-OGATTA S. F., DA SILVA MONTEIRO, V., KRIEGER, M. A., NAKAMURA, C. V., DE SOUZA, W, GOLDENBERG, S. (2001). Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Bioch. Parasitol*; 117(2):169-77.
- BAE, S. H., HARRIS, A. G., HAINS, P. G., CHEN, H., GARFIN, D. E., HAZELL, S. L., PAIK, Y. K., WALSH, B. J., CORDWELL, S. J. (2003) Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects; *Proteomics*, 3 (5):569-79
- BAYAT, A. (2002) Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ* 324:1018-1022.
- BECKER. J. & CRAIG, E. A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem*, 219 (1-2):11-23.

- BENTE, M., HARDER S, WIESGIGL M, HEUKESHOVEN J, GELHAUS C, KRAUSE E, CLOS J, BRUCHHAUS I. (2003). Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, 3(9):1811-29.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, G., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I.N. & BOURNE, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.
- BLUM, H. & GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (93-99).
- BOUCHER, N., WU, Y., DUMAS, C., DUBE, M., SERENO, D., BRETON, M., PAPADOPOULOU, B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J. Biol. Chem.* 31:19511-19520.
- BRANDAU, S., DRESEL, A. & CLOS, J. (1995). High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem. J.* 310 (225-0).
- BRANDEN, C. & TOOZE, J. (1991). *Introduction to Protein Structure*, Garland: New York.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med Trop. Sao Paulo.* 19:220-4.

- BURLEY, S. K., ALMO, S. C., BONANNO, J. B., CARPEL, M., CHANCE, M. R. L., GAASTERLAND, T., LIN, D., SALI, A., STUDIER, F. W. & SWAMINATHAN, S. (1999). Structural genomics: beyond the human genome project. *Nat. Genet.* 23:151-157.
- BUSCAGLIA, C. A. & DI NOIA, J. M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*, (5):419-27.
- CAMARGO, E. P. (1964). Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 6:93-100;
- CANO, M. I., GRUBER, A., VAZQUEZ, M., CORTÉS, A., LEVIN, M. J., GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W., RONDINELLI, E.; ZINGALES, B., RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C., REQUENA, J., SILVEIRA, J. F. (1995). Molecular Karyotype of Clone CL Brener Chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mol Biochem. Parasitol*, 71:273-278;
- CARVALHO E. F., DE CASTRO F. T., RONDINELLI E., SOARES C. M. (1990). HSP70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J Cell Physiol*, 143:439-444.
- CDC on line - Centers for diseases control and prevention (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>). (Acesso em 03/03/2009).
- CHIURILLO, M. A. & RAMÍREZ, J. L. (2002). Characterization of *Leishmania major* Friedlin Telomeric Terminus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(3): 343-346.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156-9.

CRAIG, E. A., & JACOBSEN, K. (1984). Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell*, 3:841-9.

COUGHLIN B. C., TEIXEIRA S. M., KIRCHHOFF L. V., DONELSON J. E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J Biol Chem*, 21:12051-60.

DALLAGIOVANNA B., PLAZANET-MENUT C., OGATTA S. F., AVILA A. R., KRIEGER M. A., GOLDENBERG S. (2001). *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* 99:7-16.

DAVIS, R. E. (1996) Spliced leader RNA trans-splicing in metazoa. *Parasitol Today*. (1):33-40.

DA SILVEIRA, NELSON JOSÉ FREITAS. Bioinformática Estrutural Aplicada ao Estudo de Proteínas Alvo do Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. 2005, 131p, il. TESE DE DOUTORADO. Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP. São José do Rio Preto, São Paulo, 2005.

DE MARVAL, G. M., SOUTO-PADRON, T., RONDINELLI, E. (1996). Characterization and Cellular Distribution of Heat Shock Proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 83: 335-345.

- DE MARVAL, M. G., SOUTO-PADRON, T., GOTTESDIENER, K., SILVA, R., VAN DER PLOEG, L. H., RONDINELLI, E. (1993). Heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*: identification and localization of HSP70 and HSP60 proteins and structure of HSP60 genes (brief report). *Biol. Res.*, 26(1-2):313-4.
- DE SOUZA, W. (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8:269-85.
- DI NOIA, J. M., D'ORSO I., SANCHEZ D. O., FRASCH A. C. (2000). 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. *J. Biol. Chem.* 275:10218-10227.
- DI XIA, ESSER, L., SINGH S. K., GUO F, MAURIZI, M. R. (2004) Crystallographic investigation of peptide binding sites in the N-domain of the ClpA chaperone. *J Struct. Biol.* 146:166-79
- D'ORSO, I. & FRASCH, A. C. (2001) Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Biol Chem*, 276(19):15783-93.
- DOYLE, S. M., HOSKINS, J. R., WICKNER, S. (2007). Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104; 11138-11144.
- DOYLE S, M. & WICKNER, S. (2008). HSP104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci*, 34(1): 40-8.

- DRAGON, E. A., SIAS S. R., KATO E. A., GABE J. D. (1987). The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol Cell Biol*, (3):1271-1275.
- DUBY G, OUFATTOLE M, BOUTRY M. (2001). Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import. *Plant J*. 27(6):539-49.
- ELIAS M. C., MARQUES-PORTO R., FREYMÜLLER. E., SCHENCKMAN S (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol* 112: 79-90.
- ELLIS, R. J. & HARTL, F. U. (1996). Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J* 10(1):20-26,.
- ELLIS, R. & HEMMINGSEN, S. (1989). *Trends in Biochemical Sciences*, 14: 339-342.
- EL-SAYED, N.M. MYLER P J, BLANDIN G, BERRIMAN M, CRABTREE J, AGGARWAL G, et al, (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* 309: 409-415.
- FEDER, M. E. & HOFMANN, G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 61:243-82.

- FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on filogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- FERNANDES, M., SILVA, R., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., RONDINELLI, E., URMÉNYI, T. P. (2005). Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, 349:135-42.
- FINK, A. L. (1999). Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiological Reviews*, (79) 2: 425-449.
- FITCH, W. M. (1970). Distinguishing homologous and analogous proteins. *Syst. Zool.* 19, 99-113.
- FOLGUEIRA C, REQUENA JM. (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev.* (4):359-77.
- GLASS, D. J., POLVERE, R. I., VAN DER PLOEG, L. H. (1986) Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*.
- GEORGOPOULOS, C. & MCFARLAND, H. (1993). Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Immunol Today*, (8):373-5.
- GOLDENBERG S, SALLES JM, CONTRERAS VT, LIMA FRANCO MP, KATZIN AM, COLLI W, MOREL CM. (1995). Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 180(2):265-70.

- GOLOUBINOFF, P., MOGK, A., ZVI, AP., TOMOYASU, T., BUKAU, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96. pp. 13732-13737.
- GUEX, N. & PEITSCH, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18, 2714-2723.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557
- HILLISCH, A., PINEDA, L. F., HILGENFELD, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. Drug Discovery Today v.09, p. 659-669.
- HÖLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. (2003) Introduction to comparative protein modeling. In Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH.
- HOURY, W. A. (2001). Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. Curr Protein Pept Sci., 2(3):227-44. Review.
- HUANG, J. & VANDER PLOEG, L. H. T. (1991). Maturation of polycistronic mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of trans splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcript from the HSP70 locus. Mol. Cel. Biol. 11:3180-3190.

HÜBEL A., BRANDAU S., DRESEL, A, CLOS, J. (1995). A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. Mol Biochem Parasitol, 70(1-2):107-18.

HÜBEL A, & CLOS J. (1996). The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. Exp Parasitol, 82(2):225-8.

HÜBEL A, KROBITSCH S, HÖRAUF A, CLOS J. (1997). *Leishmania major* HSP100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. Mol Cell Biol. (10):5987-95.

KIM, K. S., TEIXEIRA, S. M., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E. (1994). Transcription and editing of cytochrome oxidase II RNAs in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 269 (2):1206-11.

KOMIYA, T., SAKAGUCHI, M., MIHARA, K.. (1996). Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. EMBO J. 15(2):399-407.

KROBITSCH, S., BRANDAU, S., HOYER, C., SCHMETZ, C., HUBEL, A. & CLOS, J. (1998). *Leishmania donovani* Heat Shock Protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. Journal of Biol Chem, 273(11)6488-6494.

KROBITSCH, S. & CLOS, J. (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. Cell stress & chaperones;4(3):191-8.

- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 157:105-132.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LASKOWSKI, R. A., Mac ARTHUR, M. W., MOSS, D S., THORNTON, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26: 283-291.
- LEBOWITZ, J. H., SMITH, H. Q., RUSCHE, L., BEVERLEY, S. M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 7:996-1007.
- LEE, M. G., ATKINSON, B. L., GIANNINI, S. H. & VAN DER PLOEG, L. H. T. (1988). Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(20): 9567-9585.
- LEE, S., SOWA ME, WATANABE YH, SIGLER PB, CHIU W, YOSHIDA M, TSAI FT. (2003). The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone that Rescues Proteins from an Aggregated State. *Cell* 115:229-240, 2003.
- LIANG, X.-H., A. HARITAN, S. ULIEL, AND S. MICHAELI. (2003). Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* 2:830-840.
- LIM, A. & ZHANG, L. (1999) WebPHYLP: a web interface to PHYLIP. *Bioinformatics*, 15(1068-1069).

- LINDQUIST, S. (1986). The heat shock response. *Annu Rev Biochem*; 55:1151-1191.
- LUKES J, ARTS GJ, VAN DEN BURG J, DE HAAN A, OPPERDOES F, SLOOF P, BENNE R. (1994). Novel pattern of editing regions in mitochondrial transcripts of the cryptobiid *Trypanoplasma borreli*. *EMBO J*. 1994 Nov 1;13(21):5086-98.
- MARESCA B, CARRATÙ L. (1992). The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today*. (8):260-6.
- MARTI-RENOM, M.A., YERKOVICH, B., SALI, A. (2002). Comparative protein structure prediction, *Current Protein Science*, 294: 93-96.
- MATTHEWS K. R., TSCHUDI C., ULLU E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8: 491- 501.
- MAURIZI, M. R. & LI, C. C. (2001). AAA proteins: in search of a common molecular basis. *EMBO*, 2(11):980-5.
- MAURIZI, M. R. & XIA, D. (2004). Protein Binding and Disruption by Clp/HSP100 Chaperones. *Structure*, 12: 175-183.
- MOTTRAM JC, MURPHY WJ, AGABIAN N. (1989). A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei hsp83* gene cluster. *Mol Biochem Parasitol*. 37(1):115-27.

- MUNIZ, J. R. C. (2003). Aplicação da bioinformática nos estudos dos genes e enzimas envolvidos na síntese da goma fastidiana produzida pela *Xylela fastidiosa*. 2003. 124p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- NAYEEM, A., SITKOFF, D., JUNIOR, S. K. (2006). A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*. 15:808-824.
- NOZAKI, T & CROSS, G. A. (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 75: 55-67.
- O'BRIEN RL, FU YX, CRANFILL R, DALLAS A, ELLIS C, REARDON C, LANG J, CARDING SR, KUBO R, BORN W. (1992). Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(10):4348-52.
- OELEMANN, W. M., TEIXEIRA, M. D., VERÍSSIMO DA COSTA, G. C., BORGES-PEREIRA, J., DE CASTRO, J. A., COURA, J. R., PERALTA, J. M. (1998). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol*, 36(9):2423-7.
- OELEMANN W, TEIXEIRA M, PERALTA J. (1999). Screening and confirmation in chagas disease serology - a contribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Sup.* 1:307-8.
- OU DOT-LE SEC M. P., GRIMWOOD, J., SHAPIRO, H., ARMBRUST EV, BOWLER C, GREEN BR (2007). Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Mol Genet Genomics*, 277(4):427-39.

- PABA, J., RICART, C. A., FONTES, W., SANTANA, J. M., TEIXEIRA, A. R., MARCHESI, J., WILLIAMSON, B., HUNT, T., KARGER, B. L., SOUSA, M. V. (2004). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J. Proteome Res.* (3):517-24.
- PANIGRAHI, A. K., ZÍKOVÁ, A., DALLEY, R. A., ACESTOR, N., OGATA, Y., ANUPAMA, A., MYLER, P. J. AND STUART, K. D. (2008). Mitochondrial Complexes in *Trypanosoma brucei* A Novel Complex and a Unique Oxidoreductase Complex. *Molecular & Cellular Proteomics* (7):534-545, 2008.
- PALMERA, G.; LOUVIONA, JF; TIBBETTSB, RS.; ENGMANB, DM; E PICARD, D. (1995). *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 90 can functionally complement yeast. *Mol e Biochem Parasitol*, 1-2(70)199-202.
- PARSELL D.A., A.S KOWAL, SINGER, M.A & LINDQUIST, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104, *Nature* 372:475-478.
- PAUGAM, A., BELTEAU, A., CAMET-DOPOUY, J., CREZEUT, C., FRIGUET, B. (2003). Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *TRENDS in Parasitology* 19: 55-59.
- PROTEIN CALCULATOR V3.3 - ONLINE PROGRAM (disponível em: <http://www.scripps.edu/>) (acessado em 21/03/2009).
- QUE, X., BRINEN, L.S., PERKINS, P., HERDMAN, S., HIRATA, K., TORIAN, B.E., RUBIN, H., MCKERROW, J.H. & REED, S.L. (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119:23-32.

RABILLOUD, T. (2000) Detecting proteins: separated by 2-D gel electrophoresis, analytical chemistry (1) 48a-55a.

REDPATH, M. B., CARNALL, N., WEBB, H., COUREL, M., AMORIM A, GÜTHER M. L., CARDOSO DE ALMEIDA, M. L., CARRINGTON, M. (1998). Conservation of genetic linkage between heat shock protein 100 and glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 94(1):113-21.

REQUENA J. M., LOPEZ M. C., JIMENEZ-RUIZ A., DE LA TORRE J. C., ALONSO C. (1998). A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res 16:1393-406.

RING, C. S., SUN, E., MCKERROW, J. H., LEE, G. K., ROSENTHAL, P. J., KUNTZ, I. D. & COHEN, F. E. (1993) Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3583-3587.

RITOSSA, F. M. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia; 18:571-573.

RUTHERFORD, S. L. (2003). Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. Nat. Rev. Genet. 4(4)263-74.

SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. Journal of Molecular Biology, 234 779-815.

SAMBROOK & RUSSELL (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SÁNCHEZ, R. & ŠALI, A. (1997) Advances in comparative protein-structure modelling. *Curr Opin Struct Biol* 7:206-214

SCHIRMER, E. C. & LINDQUIST, S. The HSP100 family - an overview. Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-folding Catalyst. Org. Mary-Jane Gething. Oxford University Press. 1997. 554p, il.

SEEBECK, T., WHITTAKER, P. A., IMBODEN, M. A., HARDMAN, N., BRAUN, R. (1983). Tubulin genes of *Trypanosoma brucei*: a tightly clustered family of alternating genes. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 80(15):4634-8

SCHENKMAN S, JIANG MS, HART GW, NUSSENZWEIG, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, 65(7):1117-25

SHORTER, J. & LINDQUIST, S. (2005). Navigating the ClpB channel to solution. *Nature Structural e Molecular Biology*. 12(1): 4-6.

SODRÉ, C. ; CHAPEAUROUGE, D. A. ; KALUME, D.E. ; MENDOÇA, L.L. ; PERALES, J. ; FERNANDES, O. (2009). Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*, 191:177-184.

- TANAKA N, TANI Y, TADA T, LEE YF, KANAORI K, KUNUGI S. (2006). The roles of conserved amino acids on substrate binding and conformational integrity of ClpB N-terminal domain. *Biochemistry*, 45(28):8556-61.
- TEIXEIRA, A. R., NASCIMENTO, R. J., STURM, N. R. (2006). Evolution and pathology in chagas disease - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(5):463-91
- TEIXEIRA, M. G., BORGES-PEREIRA, J., NETIZERT, E., SOUZA, M. L., PERALTA, J. M. (1994). Development and evaluation of an enzyme-linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chaga disease. *Trop. Med. Parasitol.* 45:308-312.
- TEIXEIRA, S. M., RUSSELL, D. G., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E. (1994) A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J BIOL CHEM.* 269 (32):20509-16.
- TEIXEIRA, S. M., KIRCHHOFF L. V., DONELSON J. E. (1995). Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/ tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270:22586-22594.
- TEIXEIRA, S. M., KIRCHHOFF, L. K., DONELSON, J. E. (1999). *Trypanosoma cruzi*: Suppression of Tuzin Gene Expression by its 5'UTR and Spliced Leader Addition Site. *Exp. Parasitol.* 93:143-151;
- TORRES, M. E., ANINO M. M. & SCHLOTHAUER, G. (2003) Automatic detection of slight parameter changes associated to complex biomedical signals using multiresolution q-entropy1. *Med Eng Phys*, 25(10):859-67.

TRITRYP DB - THE KINETOPLASTID GENOME SOURCE. (disponível em:
<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (acessado em 10/07/2009).

TYLER, K. M. & ENGMAN, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Inter. J Parasit.*, 31: 472-481, 2001.

VAN HAMME, L. & PAYS, E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59:223-401.

VASSELLA E., BRAUN R., RODITI, I. (1994) Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Res.* 22:1359-1364.

VERÍSSIMO DA COSTA, GIOVANI CARLO (2007). DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Estabelecimento de protocolos de solubilização para géis de eletroforese bidimensional, identificação e produção de anticorpos monoclonais para proteínas de 30 a 34 kDa de *T. cruzi*. IMPPG/UFRJ, Rio de Janeiro. II, 99p.

XU, Z., HORWICH, A. L., SIGLER, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, 388(6644):741-50.

WEATHERLY, D. B., BOEHLKE, C. AND TARLETON, R. L. (2009) Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*, 10:255.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Control of Chagas Diseases.
Technician Report Series, 905: 82-83.

WHO 2009 - WORLD HEALTH ORGANIZATION STATISTICAL INFORMATION
SYSTEM WEBSITE (<http://www.who.ch>). (Acesso em março de 2009).

ZIEGELBAUER, K., RUDENKO, G., KIEFT, R., OVERATH, P. (1995). Genomic organization of an invariant surface glycoprotein gene family of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.*, 69(1):53-63.

ZHANG, X., BEURON, F. & FREEMONT, P. S. (2002). Machinery of protein folding and unfolding. *Current Opinion in Structural Biology* 12:231-238.

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](#)