

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TcYchF - UMA NOVA ATPase ASSOCIADA À MAQUINARIA DE
TRADUÇÃO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*.

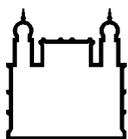
DANIELA FIORI GRADIA

Curitiba
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

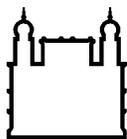
DANIELA FIORI GRADIA

**TcYchF - UMA NOVA ATPase ASSOCIADA À MAQUINARIA DE
TRADUÇÃO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Curitiba
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta tese intitulada

**TcYchF - UMA NOVA ATPase ASSOCIADA À MAQUINARIA DE
TRADUÇÃO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*.**

Defendida por

DANIELA FIORI GRADIA

Sob orientação de
Stenio Perdigão Fragoso

Foi avaliada e aprovada pela banca examinadora composta por

Dra. Yara Maria Traub Cseko
Dr. Augusto Schrank
Dr. Silvio Marques Zanata

Em Curitiba, na data de 29 de abril de 2008.

Este trabalho é o resultado da força da minha família. À presença e ajuda dos meus pais Edson e Doroty e minhas irmãs Flávia e Bia. À compreensão e dedicação do meu marido Maurício. E às minhas filhas Julia e Carolina, que na sua inocência entenderam o trabalho e o esforço da mãe. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Como qualquer trabalho, a participação de orientadores, pesquisadores e colegas de bancada é fundamental. Não há autoria solitária em nenhuma forma de pesquisa. Muito obrigada!

Stenio, por ser o grande mestre. Você mais do que a maioria, merece o título de orientador. Amigo e professor sempre disponível. Vou ser sempre grata.

Claudia, Marco, Maurílio e Samuel, nunca pensei poder conviver com pessoas tão sérias e comprometidas com seu trabalho. A possibilidade de trabalhar no IBMP com todos os recursos e liberdade foi um presente.

Gisele, por ter me aberto as portas. Sua amizade tão espontânea e autêntica me deu a oportunidade que eu procurava.

Édio, por ser aquele que disse que eu seria capaz. Você me fez acreditar em mim.

Alda, Didi, Flávia, Jana, Lauro, Léo, Marcinha, Pá e Rô (em ordem alfabética). Por toda amizade e ajuda. Não houve um experimento meu onde não houvesse a participação de pelo menos um de vocês. Desde um gel roubado a um experimento inteiro. Muito Obrigada. Além do mais, onde ficaria a diversão? Nosso encontro foi muito feliz e me fez ter vontade de ir ao Lab todos os dias.

Bruno e Alejandro, por serem amigos, professores e companheiros! Sinto-me privilegiada por ter tido vocês na minha formação.

Fabíola, Fabrício e Christian, por toda a ajuda e exploração. Certamente vocês vão ver parte do trabalho de vocês nestas páginas.

Nilson, Cassiano, Vanessa e Janaína, por facilitarem muito minhas tarefas. Por participarem da minha formação e por me ensinarem a ser aluna e professora.

Edilaine e Luís, por estarem sempre dispostos a ajudar, com a paciência e competência que lhes é evidente.

A todos os colegas do IBMP, essa “comunidade” é diferenciada tanto pela competência quanto pela habilidade de agregar cada pessoa que chega.

A Deus, por me manter perseverante, mesmo quando me faltava energia e por me dar amigos que não deixavam a minha tristeza ganhar forças. Obrigada.

ÍNDICE

Lista de Figuras	viii
Lista de Quadros	ix
Lista de Abreviaturas	x
Lista de Símbolos	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. P-Loop NTPases	01
1.1.2. P-loop GTPases	03
1.1.2.1 Características estruturais definem duas classes de P-loop GTPases.	04
1.1.2.2 Mecanismo de ação das P-loop GTPases	05
1.1.3. A Família Obg	08
1.1.4. Subfamília YyaF/YchF	10
1.2. Modelo Biológico	14
1.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.2.2. Doença de Chagas	15
1.2.3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.2.4. Organização do genoma do <i>T. cruzi</i>	20
1.2.5. Expressão Gênica em Tripanossomatídeos	21
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Reagentes e Soluções Utilizados	27
3.1.1. Reagentes	27
3.1.2. Tampões e Soluções	28
3.1.3. Meios de Cultura	29
3.2. Cultivo dos Parasitas	31
3.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.2.2. <i>Trypanosoma brucei</i>	31
3.3. Obtenção de DNA de <i>T. cruzi</i>	31
3.4. Identificação e clonagem do gene da <i>TcYchF</i>	32
3.5. Similaridade e análise filogenética da <i>TcYchF</i>	32
3.6. Clonagem do gene que codifica a proteína <i>TcYchF</i>	33
3.7. Clonagem do gene que codifica a enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i>	34
3.8. Clonagem dos genes que codificam as proteínas ribossomais S7 e L26 de <i>T. cruzi</i>	34
3.9. Clonagem dos genes que codificam as proteínas RPN7 e RPN10 do proteossomo de <i>T. cruzi</i>	35
3.10. Seleção dos clones recombinantes	38
3.10.1. Técnica da Palitagem (Toothpick)	38
3.10.2. Técnica de PCR de colônia	38
3.11. Preparação de plasmídeo em pequena escala (MINIPREP)	38
3.12. Produção da <i>TcYchF</i> , GAPDH, proteínas ribossomais S7 e L26 e proteínas do proteossomo RPN7 e RPN10 de <i>T. cruzi</i> .	39
3.12.1. <i>TcYchF</i> -GST:	39
3.12.2. <i>TcYchF</i> -His:	39

3.12.3. GAPDH, S7, L26, RPN7 e RPN10	40
3.13. Produção de anti-soro policlonal	41
3.14. Extratos de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	41
3.14.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
3.14.1.1. Extrato total:	41
3.14.1.2. Extrato citoplasmático:	42
3.14.2. <i>Trypanosoma brucei</i> :	42
3.14.2.1.: Extrato total:	42
3.15. Análise da expressão da TcYchF por <i>Western blot</i> .	42
3.16. Fracionamento do extrato citoplasmático de <i>T. cruzi</i> em gradiente de sacarose para análise do perfil de polissomos:	43
3.16.1: Fracionamento do extrato citoplasmático contendo cicloheximida:	43
3.16.2: Fracionamento do extrato citoplasmático tratado com puromicina:	44
3.17. Imunoprecipitação da proteína TcYchF para detecção de complexos protéicos	44
3.18. Ensaio reverso de imunoprecipitação (controle)	45
3.19. Silenciamento da expressão de TbYchF	46
3.19.1. Amplificação dos fragmentos gênicos	46
3.19.2. Clonagem da porção carboxi-terminal do gene <i>TbYchF</i> e transfecção do <i>T. brucei</i>	46
3.19.3. Seleção e clonagem dos parasitas	48
3.19.4. Indução do RNA dupla fita	48
3.20. Ensaio de atividade ATPase e GTPase.	48
3.21. Espectrometria de Massas de Eletronspray	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Clonagem e caracterização do gene da TcYchF:	50
4.2. Análise da sequência da TcYchF:	51
4.3. Análise da expressão da TcYchF por “western blot”:	57
4.4. atividade GTPase da TcYchF:	57
4.5. Clonagem, expressão e produção de anti-soro policlonal das proteínas ribossomais S7 E L26:	60
4.6. Clonagem, expressão e produção de anti-soro policlonal dos genes RPN7 e RPN10 da subunidade regulatória 19S do proteassomo.:	61
4.7. TcYchF co-sedimenta com ambas subunidades ribossomais e polissomos	62
4.8. TcYchF co-imunoprecipita com proteínas ribossomais:	65
4.9. TcYchF co-imunoprecipita com proteínas do proteassomo:	67
4.10. Proteínas detectadas por espectrometria de massas de amostras obtidas de ensaios de imunoprecipitação.	70
4.11. O ortólogo de TcYchF em <i>T. brucei</i> é importante para o crescimento celular	73
5. DISCUSSÃO	76
5.1. Distribuição da YchF	76
5.2. Caracterização estrutural da TcYchF	77
5.3. Atividade GTPase e ATPase	77

5.4. Associação da TcYchF com ribossomos	79
5.5. Associação da TcYchF com o proteassomo	82
5.6. Proliferação celular	83
6. CONCLUSÕES	84
7. PERSPECTIVAS	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIÇÃO	PÁG.
Figura 1.1	Representação do domínio P-loop	2
Figura 1.2	Diagrama da topologia de P-loop GTPases.	5
Figura 1.3	O ciclo catalítico das GTPases.	6
Figura 1.4	Distribuição das pequenas GTPases altamente conservadas em Bacteria, Eukaria e Archaea.	7
Figura 1.5	Representação da organização sistemática da subfamília YchF	10
Figura 1.6	Sítio de reconhecimento da guanina em uma proteína G típica RAS (a) e em YchF (b)	11
Figura 1.7	Representação do modelo tridimensional da YchF de <i>H. influenzae</i>	13
Figura 1.8	Representação do modelo tridimensional da hOLA1 associada à AMPPCP	13
Figura 1.9	Distribuição da Doença de Chagas no mundo	15
Figura 1.10	Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> .	18
Figura 1.11	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	19
Figura 1.12	“Trans-splicing” e poliadenilação do pré-mRNA em <i>T. cruzi</i> .	23
Figura 3.1	Mapa do vetor p2T7-177	47
Figura 4.1	Purificação da proteína TcYchF através de cromatografia por afinidade com glutathiona-sepharose.	51
Figura 4.2	Comparação das seqüências da TcYchF com GTPases relacionadas de bactérias e eucariotos.	53
Figura 4.3	Figura 4.3: Comparação entre a organização do domínio G de uma GTPase da classe TRAFAC com as estruturas secundárias da TcYchF	54
Figura 4.4	Figura 4.4: Modelagem da TcYchF comparada com seu ortólogo em <i>S. pombe</i> e em <i>Homo sapiens</i>	56
Figura 4.5	Análise da expressão da TcYchF	57
Figura 4.6	Avaliação da atividade GTPase “ <i>in vitro</i> ” da GST-TcYchF	59
Figura 4.7	Avaliação da atividade ATPase “ <i>in vitro</i> ” da GST-TcYchF	59
Figura 4.8	Comparação da atividade ATPase e GTPase <i>in vitro</i> da TcYchF-GST.	59
Figura 4.9	Expressão e purificação das proteínas ribossomais S7 e L26	60
Figura 4.10	Expressão e purificação das proteínas RPN7 e RPN10 do proteassomo.	61
Figura 4.11	Perfil polissomal de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 4.12	Perfil polissomal de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com puromicina	64
Figura 4.13	Imunoprecipitação da TcYchF.	66
Figura 4.14	Imunoprecipitação das proteínas ribossomais S7 e L26	67
Figura 4.15	Imunoprecipitação da TcYchF.	68
Figura 4.16	Imunoprecipitação das proteínas RPN7 E RPN10	69
Figura 4.17	RNAi de TbYchF inibe o crescimento das formas procíclicas de <i>T. brucei</i> .	75

LISTA DE QUADROS

QUADRO	DESCRIÇÃO	PÁG.
Quadro 3.1	Nome, tamanho e <i>primers</i> usados para amplificar as seqüências das proteínas selecionadas para clonagem e produção de anti-soros.	37
Quadro 4.1	Proteínas detectadas tanto no ensaio de imunoprecipitação da TcYchF quanto da proteína ribossomal S7.	70
Quadro 4.2	Proteínas detectadas apenas no ensaio de imunoprecipitação da TcYchF	71
Quadro 4.3	Proteínas detectadas apenas no ensaio de imunoprecipitação de S7.	71
Quadro 4.4	Proteínas detectadas no experimento controle.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amp	- Ampicilina
BLAST	- Ferramenta de comparação de seqüências em bancos de dados (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	- Albumina de soro bovino
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DNase	- Desoxirribonuclease
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético
G418	- Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina. A resistência é conferida pelo gene bacteriano que codifica a enzima neomicina-fosfotransferase e que pode ser expresso em células eucarióticas.
GAP	- Proteína ativadora de GTPase (GTPase-activation protein)
GDI	- Inibidor da dissociação de GTP (Guanine nucleotide dissociation inhibitor)
GDP	- Difosfato de Guanosina
GEF	- Fator de substituição por GTP (Guanine nucleotide exchange factor).
GEP	- Outro termo para representar GEF
GRP	- Partícula de reconhecimento do sinal de exportação
GTP	- Trifosfato de guanosina
IPTG	- Isopropil 1 tio- β -D galactosídeo
kb	- Quilobase; em RNA - 1000 nucleotídeos; em DNA 1000 pares de nucleotídeos
kDa	- QuiloDalton. Unidade de massa molecular. Aproximadamente 1 Dalton equivale a massa do átomo de hidrogênio (1.66×10^{-24} g)
LB	- Meio Luria-Bertani
LIT	- Meio Infusão de fígado e triptose (Liver Infusion Tryptose)
mRNA	- RNA mensageiro
nt	- nucleotídeo
ORF	- Região de leitura aberta (open read frame)
pb	- Pares de bases
PBS	- Solução salina tamponada (phosphate buffered saline)
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
PDB	- Banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas (Protein Data Bank)
RNA	- Ácido ribonucléico
RNase	- Ribonuclease
SDS	- Dodocil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS
TAU	- Meio Urina artificial de Triatomíneo (Triatomine Artificial Urine)
Tet	- Tetraciclina
TGS	- Domínio TGS derivado dos nomes ThrRS, GTPase, e SpoT e presente em GTPases da família Obg
Tween 20	- Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana
UTR	- Região não traduzida (untranslated region)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	-	Grau Celsius
%	-	Porcentagem
μg	-	Micrograma
μl	-	Microlitro
μM	-	Micromolar
CaCl ₂	-	Cloreto de cálcio
g	-	Aceleração de gravidade
LiCl	-	Cloreto de lítio
M	-	Molar
mA	-	Miliamperagem
Mg	-	Magnésio
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
min	-	Minuto
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
nm	-	Nanômetro
pH	-	Potencial hidrogeniônico. Definido como o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio em moles por litro
PM	-	Peso molecular
pmol	-	Picomol
s	-	Segundo
U	-	Unidade
V	-	Volts
V	-	Volume

<u>Aminoácidos</u>							
A	Alanina	G	Glicina	M	Metionina	S	Serina
C	Cisteína	H	Histidina	N	Asparagina	T	Treonina
D	Ácido aspártico	I	Isoleucina	P	Prolina	V	Valina
E	Ácido glutâmico	K	Lisina	Q	Glutamina	W	Triptofano
F	Fenilalanina	L	Leucina	R	Arginina	Y	Tirosina

RESUMO

Muitos processos celulares, incluindo síntese de proteínas, tráfego vesicular, transporte intracelular, sinalização e diferenciação celular, envolvem um importante grupo de proteínas da superfamília das P-loop GTPases. Algumas dessas GTPases, embora ubíquas, não tem função conhecida. Dentro desse último grupo está a subfamília de GTPases conhecida como YchF. A subfamília das GTPases YchF pertence a família das Obg GTPases, é ubíqua em bactérias e eucariotos e apresenta uma notável conservação de seqüência. Nós caracterizamos o ortólogo da YchF em *Trypanosoma cruzi*, TcYchF, potencialmente associada com a maquinaria de tradução. TcYchF é uma proteína de 44,3 kDa e possui grande percentagem de similaridade com seus ortólogos eucarióticos (45 a 86 %), bem como com os ortólogos bacterianos (38 a 43%). Algumas das mais importantes características do domínio G, responsável pelo reconhecimento e hidrólise do GTP e interação com outras proteínas, são conservadas em TcYchF. Apesar da sua classificação como uma GTPase, verificamos que a TcYchF hidrolisa preferencialmente ATP em relação à GTP. Embora a função das proteínas da subfamília YchF seja desconhecida, outros membros da família Obg, a qual YchF pertence, estão envolvidos na biogênese das subunidades ribossomais. Algumas delas foram encontradas em associação com ribossomos, sugerindo que possam ser fatores envolvidos no processo de tradução. De fato, a análise por "western blot" do fracionamento de polissomos por gradiente de sacarose mostrou que TcYchF estava associada tanto com subunidades ribossomais quanto com polissomos, sugerindo o seu envolvimento com a maquinaria de tradução de *T. cruzi*. A análise proteômica desses imunocomplexos mostra a associação da TcYchF não só com proteínas ribossomais, mas com diversos fatores de tradução e com a proteína RPN7 da subunidade regulatória do proteassomo. Esses resultados foram corroborados pela análise de imunoprecipitação, que mostrou que TcYchF coimunoprecipita com proteínas ribossomais e com proteínas da subunidade regulatória do proteassomo. Além disso, o silenciamento do ortólogo do gene *Tcychf* em *T. brucei* através de ensaios de RNA de interferência, leva a diminuição da proliferação do parasita. Estes dados nos levaram a sugerir a hipótese de que TcYchF apresenta um papel potencialmente importante na interação molecular da maquinaria de tradução com o proteassomo, na degradação de proteínas mal enoveladas durante a tradução.

ABSTRACT

Many cellular processes, including protein synthesis, vesicular traffic, intracellular transport, cell signaling and differentiation, involve an important group of proteins from the P-loop GTPase superfamily. This group of GTPases contains many ubiquitous sub-families, some of them with unknown functions, such as the YchF sub-family. YchF belongs to the Obg GTPase family and is ubiquitous in bacteria and eukaryotes presenting a remarkably high level of sequence conservation. We characterized an YchF-related protein, TcYchF, potentially associated with the protein translation machinery of *T. cruzi*. TcYchF is a 44.3 kDa protein and is very similar (45 to 86 %) to putative GTP-binding proteins from eukaryotes. A lower but significant level of similarity (38 to 43%) was also found between the predicted sequences of TcYchF and bacterial orthologs. Some of the most important features of the G domain, which is involved in the recognition and hydrolysis of the GTP as well as in the interaction with downstream effectors, are conserved in TcYchF. However, we found that TcYchF preferentially hydrolyzed ATP rather than GTP. The function of YchF is unknown, yet other members of the Obg family are known to be involved in the biogenesis of the ribosomal subunits. Some of them were found associated with the ribosome, suggesting that some of these proteins are translation factors. Indeed, immunoblots of the polysome fraction from sucrose gradients showed that TcYchF was associated with ribosomal subunits and polysomes, suggesting that TcYchF is involved with the translation machinery of *T. cruzi*. Proteomic studies from the TcYchF immunocomplexes identified several ribosomal proteins, several translation factors and the protein RPN7 from the regulatory subunit of the *T. cruzi* proteasome. These results were corroborated by immunoprecipitation assays that showed that the TcYchF coimmunoprecipitates with proteins from both ribosomal subunits and proteins from the regulatory subunit of the *T. cruzi* proteasome. Furthermore, the silencing of the ortholog of *ttychf* in *T. brucei* by RNA interference inhibited the growth of procyclic forms of the parasite. Thus, these data suggest that this protein may potentially play an important role in the molecular link between the translation apparatus and the proteasome for the degradation of proteins damaged during translation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. P-Loop NTPases

Em todos os organismos, a investigação da regulação de diversos processos celulares tais como tradução, transporte intracelular, transdução de sinais, mobilidade celular, divisão, crescimento entre outros eventos, tem mostrado que muitas destas funções são controladas por um grupo de proteínas ligadoras de GTP, pertencentes a uma superfamília de moléculas (P-loop NTPases) que apresentam uma arquitetura comum (Saraste *et al*, 1991; Vetter *et al*, 1999 e Koonin *et al*, 2000).

P-loop NTPases hidrolizam a ligação entre os fosfatos β e γ do ATP/GTP. Estruturalmente, as P-loop NTPases são proteínas do tipo α/β , ou seja, que contêm um arranjo recorrente de α -hélices que se alternam com fitas β (pelo menos 5 unidades α/β) ao longo de toda a cadeia polipeptídica. As fitas β formam uma estrutura central na forma de folhas β antiparalelas, envolvidas por α -hélices (Figura 1.1). Estas proteínas são caracterizadas por dois motivos altamente conservados, os motivos Walker A e Walker B, que ligam, respectivamente, o grupamento fosfato do NTP e o cátion Mg^{2+} (Walker *et al*, 1982). O motivo Walker A é caracterizado pela seqüência Gx4GK[T/S], onde x representa qualquer resíduo de aminoácido. Essa seqüência na proteína forma uma alça ("loop") e é precedida por uma fita β e seguida por uma α -hélice, formando o domínio P-loop (Figura 1.1). O motivo Walker B (tipicamente, hhhhD onde h é um resíduo hidrofóbico) contém um resíduo de aspartato conservado e está situado no final da terceira fita β universalmente conservada das P-loop NTPases. Este motivo coordena o íon Mg^{2+} , que direciona um ataque nucleofílico à ligação entre os fosfatos β e γ do NTP (Walker *et al*, 1982, Saraste *et al*, 1991 e Vetter *et al*, 1999). O domínio P-loop, aparentemente monofilético, constitui um dos grandes grupos de domínios de proteínas globulares presentes no proteoma da maioria dos organismos (Saraste *et al*, 1991, Koonin *et al*, 2000). Este domínio está presente em proteínas tais como, ATP sintetases, miosina, transducina, helicase e as pequenas GTPases (Walker *et al*, 1982, Milner-White *et al*, 1991, Lupas *et al*, 2002).

Figura 1.1. Representação da estrutura secundária de uma P-loop NTPase, evidenciando o domínio P-loop

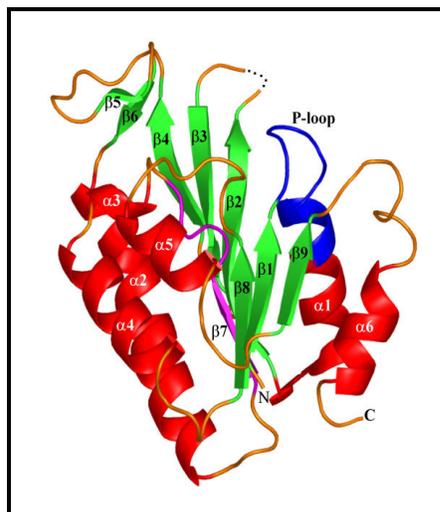


Imagem extraída do endereço: www.biomedcentral.com/1472-6807/5/7/figure/F2

Uma série de estudos comparativos das seqüências e estruturas das P-loop NTPases, mostrou a diversificação evolucionária deste domínio (Lupas *et al*, 2002; Leipe *et al*, 2000; Leipe *et al*, 2002; ; Leipe *et al*, 2003 e Anantharaman *et al*, 2002). Em particular, estes estudos delinearam duas maiores divisões das P-Loop NTPases, a divisão KG (do inglês “kinase-GTPase”) e a divisão ASCE (do inglês “additional strand, catalytic E”). A divisão KG inclui quinases e GTPases que dividem muitas similaridades estruturais, tais como a posição adjacente do P-loop e Walker B (Leipe *et al*, 2002 e Leipe *et al*, 2003), diferente da divisão ASCE, caracterizada por uma fita adicional no arranjo central de folhas β , localizada entre aqueles domínios.

De um modo diferente daquele observado em quinases e GTPases, a hidrólise de ATP pelas proteínas ASCE depende de um resíduo ácido catalítico conservado (geralmente um glutamato) que usa uma molécula de água para o ataque nucleofílico ao grupo γ -fosfato do ATP (Leipe *et al*, 2003). Como consequência, proteínas da divisão ASCE são NTPases mais ativas em relação àquelas da divisão KG e não requerem fatores acessórios, tais como, as proteínas ativadoras da atividade GTPásica (GAPs, “GTPase-activating proteins”) e proteínas trocadoras de GDP (GEF, “GDP exchange factor”), como observados para algumas GTPases (Leipe *et al*, 2002). Além disso, grande parte das NTPases da divisão ASCE possui um resíduo polar

conservado no carboxi-terminal da fita β_4 , inserido entre fitas associadas com os motivos Walker A e Walker B (Leipe *et al.*, 2003). A divisão ASCE inclui AAA+ (ATPases Associadas com diversas Atividades celulares) ABC, PiIT, superfamília de helicases 1/2 (SF1/2) e as classes RecA/F1/F0 de ATPases, e um grande conjunto de NTPases relacionadas às famílias AP (apoptótica) e NACHT (Lupas *et al.*, 2002; Leipe *et al.*, 2000; Koonin *et al.*, 2000).

1.1.2. P-loop GTPases

Muitas proteínas que ligam ATP ou GTP, o fazem a partir da interação do grupamento trifosfato com a região do P-loop, no entanto, as P-loop GTPases apresentam elementos estruturais adicionais, que interagem diretamente com o GTP, garantindo que a ligação com o resíduo de guanina do nucleotídeo seja específica. Estes elementos constituem um domínio conhecido como domínio G, cujo enovelamento está relacionado ao arranjo α/β das P-loop NTPases. Há GTPases que consistem unicamente do domínio G, outras têm domínios adicionais nas suas porções amino e carboxi terminais (Sprang, 1997, Leipe *et al.*, 2002). Embora o domínio G seja estruturalmente invariante, as seqüências aminoacídicas dentro desse domínio são bem diversificadas. Há, contudo, quatro elementos altamente conservados que são responsáveis por mediar interações com o GTP/GDP e com proteínas efetoras. Esses elementos são conhecidos como motivos G1, G2, G3 e G4 (Bourne *et al.*, 1991). Os motivos G1, G3 e G4 são os mais conservados entre as GTPases, pois são responsáveis pela ligação e hidrólise do GTP e pela interação com o íon Mg^{2+} . O motivo G1 é o motivo Walker A (P-loop), G3 representa um motivo Walker B específico (hhhhDxxG) com um resíduo de glicina conservado, além do resíduo de aspartato, e G4 é um motivo distal [NT]KxD que não é encontrado em outras P-loop NTPases. O resíduo de glicina conservado no motivo Walker B faz uma ponte de hidrogênio com o átomo de oxigênio do γ -fosfato terminal, enquanto o motivo [NT]KxD é responsável pela especificidade do resíduo de guanina sobre outras bases (Bourne *et al.*, 1991).

O motivo G2, também conhecido como efetor, não é conservado ao longo da superfamília das GTPases e é característico de cada sub-família das GTPases. Em geral os resíduos de aminoácidos desse motivo são responsáveis por interações com uma determinada proteína efetora (Caldon *et al.*, 2001).

1.1.2.1 - Características estruturais definem duas classes de P-loop GTPases.

Baseado em características estruturais e de seqüência, a superclasse de P-loop GTPases pode ser dividida em duas grandes classes. A primeira inclui a maioria das GTPases estudadas dentre as quais estão os fatores de tradução, os fatores de transdução de sinais, as proteínas G heterotriméricas, a família das pequenas proteínas G eucarióticas (Ras, Rab, Ran), as septinas envolvidas na divisão celular, as dinaminas envolvidas com tráfego de vesículas e algumas ATPases, tais como quinesinas e miosinas que atuam como motores na mobilidade e transporte intracelular em eucariotos. Esta classe foi designada TRAFAC (“translation factor-related”) (Leipe *et al.*, 2002).

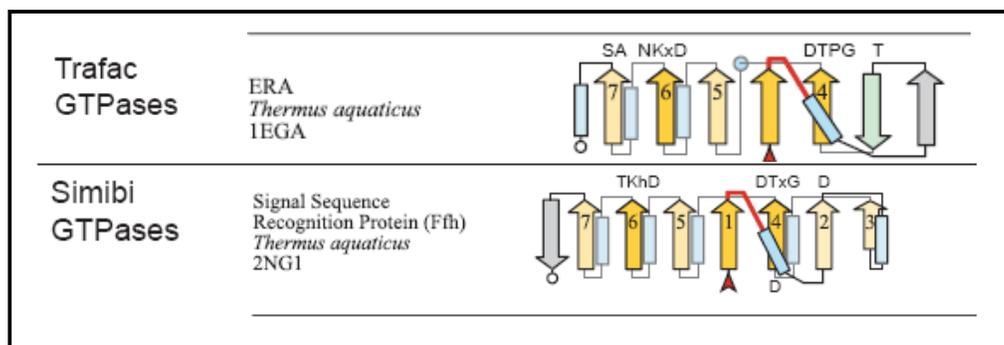
A segunda classe inclui GTPases associadas às partículas de reconhecimento de sinais. Esta classe foi denominada SIMIBI por seus três maiores subgrupos, as GTPases de reconhecimento de sinal, a superfamília MinD e a superfamília BioD (Leipe *et al.*, 2002).

Em ambas as classes de GTPases, o motivo NKxD que garante a especificidade para GTP pode estar alterado ou modificado por eventos evolutivos, o que resulta em uma perda de especificidade como observado, por exemplo, na miosina, quinesina e proteínas MRP/MinD/BioD (Sack *et al.*, 1999).

Em termos de seqüência, as GTPases da classe TRAFAC são caracterizadas por um resíduo de treonina ou serina altamente conservado, na alça entre as fitas $\beta 2$ e $\beta 3$, que faz ponte de hidrogênio com o íon Mg^{+2} requerido para a hidrólise do GTP (Bourne *et al.*, 1991). Além disto, muitas das GTPases desta classe têm um resíduo de serina conservado na fita $\beta 7$ que está envolvido com a ligação do resíduo de guanina do nucleotídeo (Bourne *et al.*, 1991). Estruturalmente, a característica distintiva da classe TRAFAC é que a orientação da fita β que flanqueia a fita $\beta 4$ (que contém o

Walker B) pelo lado direito, é antiparalela a ela. Na classe SIMIBI a topologia dos elementos estruturais equivalentes é completamente diferente (Figura 1.2).

Figura 1.2: Diagrama da topologia de P-loop GTPases.



As seqüências das proteínas são identificadas com o nome da proteína e da espécie. Fitas β são mostradas como setas com a ponta da seta na direção C-terminal e numeradas de 1 a 7. Fitas β 1, β 4 e β 7 que apresentam os motivos conservados GxxxGK[ST] (Walker A), DxxG (Walker B), e [NT]KxD (motivo de especificidade à GTP) são anotadas em laranja (fitas β 5 e β 7 em laranja claro). A fita antiparalela da classe TRAFAC é mostrada em verde. As demais fitas, presumivelmente ausentes no domínio GTP ancestral estão em cinza. Hélices são mostradas em retângulos azuis. O P-loop é mostrado como uma linha vermelha, uma seta vermelha marca o N terminal do domínio GTPase e o C terminal é mostrado como um anel. Seqüências altamente conservadas são mostradas acima ou abaixo de sua respectiva fita com a família consenso (sendo x para qualquer aminoácido e h para aminoácidos hidrofóbicos). Modificado de Leipe *et al*, 2002.

1.1.2.2 Mecanismo de ação das P-loop GTPases

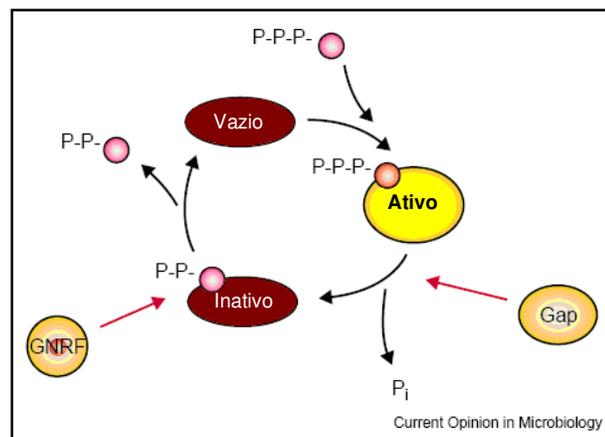
Durante as últimas três décadas, numerosas investigações sobre o papel destas GTPases e análises das seqüências de genomas de diversos organismos, têm mostrado a grande conservação das P-loop GTPases (Caldon *et al*, 2001; Mittenhuber, 2001 e Leipe *et al*, 2002). Cada uma destas muitas GTPases atuam como comutadores moleculares, que alternam seu estado de ativo a inativo pela ligação e hidrólise de GTP.

O papel regulatório destas moléculas nas funções celulares está relacionado à alternância entre três estados: uma forma ligada à GTP, uma forma ligada à GDP e a uma forma vazia. O modelo canônico do ciclo das GTPases descrito por Bourne e colaboradores (1990, 1991), inicia-se com a forma vazia. A GTPase passa por três

estados conformacionais. A forma vazia é inativa e transitória. Rapidamente o GTP ocupa o sítio de ligação ao nucleotídeo e a proteína torna-se ativa aumentando consideravelmente sua afinidade pelo alvo. O GTP é então hidrolisado e gera-se assim o efeito na(s) proteína(s) alvo. Este processo pode ocorrer com a participação de proteínas ativadoras GAPs (“GTPase-activation protein”). Finalmente, o GDP dissocia-se da GTPase e esta etapa pode ser catalisada por fatores de liberação de GDP - GEF ou GNRF (“guanine nucleotide release factor”) (Fig. 1.3).

Há importantes variações neste esquema: em alguns casos o ciclo da GTPase é regulado por propriedades intrínsecas da própria GTPase. O fator de alongação G (EF-G), por exemplo, não requer nenhuma atividade exógena para regenerar a forma ligada à GTP após sua hidrólise, por apresentar uma afinidade à GTP muito maior do que à GDP, e a troca de nucleotídeo ser governada tanto por sua afinidade à GTPase quanto por sua concentração celular relativa.

Figura 1.3: O ciclo catalítico das GTPases.



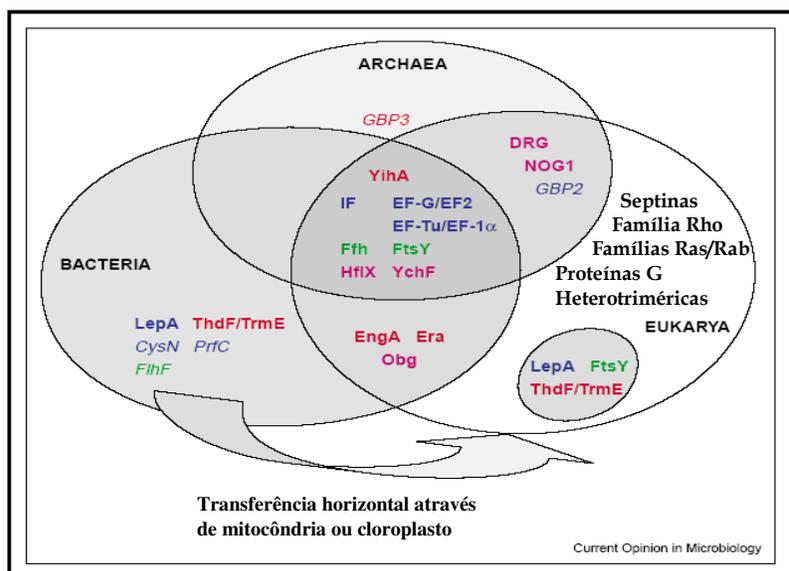
O esquema mostra a GTPase nos três possíveis estados: vazia, ligada à GTP (P-P-P) e ligada à GDP (P-P). GAP e GNRF (ou GEF) correspondem respectivamente a proteínas ativadoras e fatores de troca de GDP. Modificado de Caldon, 2003.

A arquitetura e estados de ligação ao nucleotídeo das P-loop-GTPases, são reflexos de elementos de seqüência conservados presentes nos domínios de ligação. Três pequenas seqüências aminoacídicas (G1, G3 e G4) definem características cruciais para interações diretas e indiretas com o nucleotídeo. Estes três motivos são

universalmente conservados nesta superfamília de GTPases, fato este que permite associar sua ocorrência com a predição de sua função.

Análises de genomas bacterianos identificaram várias GTPases conservadas (Caldon *et al*, 2001 e Mittenhuber 2001), muito embora somente algumas delas tenham funções conhecidas, tais como fatores de tradução (EF-G, EF-Tu e o fator de iniciação IF2) e fatores de secreção de proteínas (Ffh e FtsY). Algumas GTPases bacterianas universalmente conservadas tais como YihA, YchF e EngA (Figura 1.4) têm sido alvo de recentes estudos.

Figura 1.4. Distribuição das pequenas GTPases altamente conservadas em Bacteria, Eukaria e Archaea.



As quatro principais famílias de GTPases ancestrais estão representadas nos três reinos: grupo dos fatores de alongamento (em azul) grupo Era (em vermelho) grupo da FtsY/Ffh (em verde) e grupo das Obg (em roxo). Algumas famílias de proteínas tais como septinas, Rho, Ras/Rab e proteínas G heterotriméricas, são apenas encontradas de modo significativo em eucariontes (em preto). Contudo, algumas das GTPases eucarióticas atuam em mitocôndrias e cloroplastos, indicando sua origem bacteriana. Proteínas indicadas em negrito ocorrem em mais de 75% dos organismos completamente seqüenciados. Proteínas indicadas em itálico ocorrem em 25-75% dos organismos completamente seqüenciados. Modificado de Caldón, 2003.

Análises das seqüências de GTPases têm permitido chegar a algumas conclusões sobre estas proteínas. A primeira é que células eucarióticas têm grandes famílias de GTPases (Ras/Rab, Rac/Rho e proteínas G triméricas), que são importantes reguladores das vias de sinalização de membrana. Bacteria e Archaea

não possuem estas famílias. Uma exceção a esta generalização é a MglA, classificada como uma pequena GTPase que foi relacionada à família Ras por predição estrutural e experimentos funcionais (Hartzell, 1997 e Thomasson *et al*, 2002). No entanto, esta proteína não é encontrada na maioria das linhagens bacterianas e tem-se especulado que sua aquisição deu-se por transferência lateral a partir de uma célula eucariótica (Leipe *et al*, 2002).

A segunda conclusão global é que as GTPases procarióticas têm funções associadas à ligação aos ribossomos e a ácidos nucleicos (Baev *et al*, 1999 e Hang *et al*, 2001).

As GTPases bacterianas podem ser agrupadas em quatro grupos ancestrais principais : o grupo dos fatores de tradução, o grupo Era, o grupo FtsY/Ffh e o grupo Obg (Caldon *et al*, 2001; Mittenhuber, 2001 e Leipe *et al*, 2002). As GTPases relacionadas à Obg (Obg, YchF and HflX) ocorrem nos três domínios de vida, contudo, poucos dados existem sobre a HflX e a YchF, o que é surpreendente, já que ortólogos destas proteínas são amplamente distribuídos.

Análises mostram que o gene da YchF é co-transcrito com o gene da peptidil-tRNA hidrolase (pth) em *E. coli* (Cruz-Vera *et al*, 2002). A pth é uma enzima que cliva a peptidil-tRNA que foi abortivamente liberada dos ribossomos durante a síntese de proteínas. A estrutura deste *operon* é mantida em cerca de 50% dos genomas de bactérias diversas. Esta observação além de outras (Kobayashi *et al*, 2001; Slominska *et al*, 2002; Tan *et al*, 2002) aumentam a relação entre GTPases bacterianas e a regulação da síntese de proteínas e função dos ribossomos.

1.1.3. A Família Obg

A família Obg consiste em cinco subfamílias bem delimitadas denominadas Obg, DRG, YyaF/YchF, Ygr210 e NOG1. Quatro (Obg, DRG, YyaF/YchF, eYgr210) destes grupos são caracterizados por um motivo rico em glicina imediatamente após o motivo Walker B (seqüência consenso GAXXGXGXGXXL onde L é um dos resíduos alifáticos I, L ou V). Diversos genes que codificam GTPases desta família têm sido estudados. Obg/CgtA é um gene essencial que está envolvido na iniciação da esporulação e replicação do DNA nas bactérias *Caulobacter* e *Bacillus*, mas seu papel

molecular exato é desconhecido (Maddock *et al*, 1997 e Okamoto *et al*, 1997). A Obg de *Bacillus subtilis* está associada com a proteína ribossômica L13 (Scott *et al*, 2000). Muitos membros da família OBG possuem no C-terminal, o domínio TGS de ligação ao RNA, que está presente também na treonil t-RNA sintetase (Wolf *et al*, 1999). Estas observações, associadas à distribuição filética universal de algumas das subfamílias das OBG, sugerem que estas proteínas são possíveis fatores de tradução não caracterizados até o momento (Leipe, 2002). A proteína nucleolar Nog1, que não apresenta o motivo rico em glicina, parece estar relacionada com a associação das subunidades ribossomais (Park *et al*, 2001).

Os motivos Walker A, Walker B e NKxD são altamente conservados na família Obg, com exceção para a subfamília Yyaf/YchF, onde o resíduo de aspartato no motivo NKxD é substituído por um resíduo de glutamato (E).

As subfamílias DRG e Nog1 são ubíquas em Archaea e Eucariotos, a subfamília Ygr210 está presente em Archaea e Fungi e as subfamílias Obg e YyaF/YchF são ubíquas em Bacteria e Eucariotos. As subfamílias Obg/Nog1 e DRG aparecem formando um ramo maior da família Obg e as subfamílias Ygr210 e YyaF/YchF, formam outro ramo, ambos sendo parte de um contexto genético de LUCA (“Last Universal Common Ancestor”). Entre os eucariotos, a subfamília Ygr210 é representada apenas em Fungi. Neste caso, estas proteínas formam um pequeno “cluster” com seus ortólogos em Archaea, o que sugere a possibilidade de transferência horizontal de Archaea para Fungi. Uma outra possibilidade é que esta subfamília tenha sido perdida em outras linhagens eucarióticas. A subfamília Nog1, provavelmente emergiu precocemente nas linhagens arqueo-eucarióticas através da duplicação e divergência da família DRG. A presença ubíqua de cada um dos maiores ramos da família Obg (Ygr210-YyaF/YchF e Obg-DrG (Nog1) sugere que o ancestral de cada ramo já estava presente em LUCA e que a duplicação original e subsequente divergência nesta família é anterior à LUCA (Leipe *et al*, 2002).

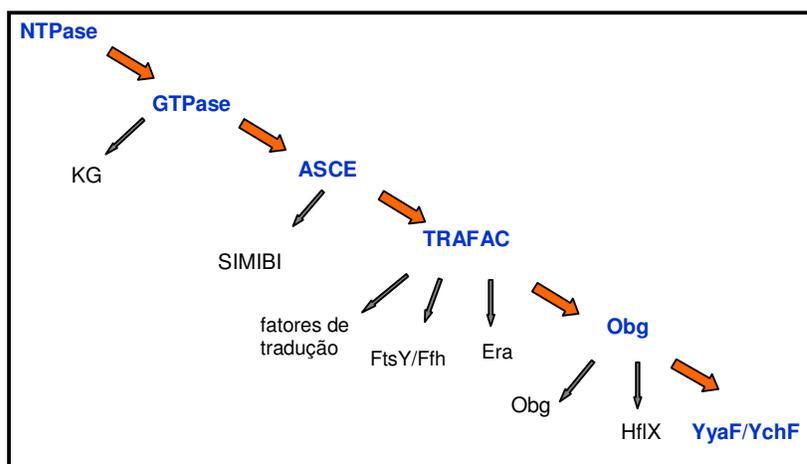
Assim como a Obg, a subfamília YyaF/YchF apresenta “clusters” bacterio-eucarióticos bem definidos, o que é compatível com a possibilidade de transferência horizontal de bactérias para eucariotos. Tanto a subfamília YyaF/YchF bacterio-eucariótica como a subfamília archeo-eucariótica DrG, apresentam um domínio TGS

de ligação ao RNA indicando novamente que um ancestral da família Obg estava presente em LUCA.

1.1.4. Subfamília YyaF/YchF

A proteína codificada pelo gene *ycaF* é uma das 11 GTPases universalmente conservadas e a única destas com função desconhecida (Caldon *et al*, 2001; Mittenhuber 2001 e Leipe *et al*, 2002). Em um estudo de genômica comparativa (Galperin *et al*, 2004) foram selecionadas proteínas hipotéticas conservadas como alvos prioritários de estudo, dentre as quais a YchF, por apresentar uma vasta distribuição filética, estar presente em organismos modelos, ser considerada essencial e possuir um pequeno número de parálogos. A família da YchF é caracterizada por uma notável conservação de sequência como é vista quando se analisa a identidade entre ortólogos de diferentes espécies. Comparando-se a proteína humana com a de *E. coli*, observa-se uma identidade de 47%. Quarenta e seis resíduos de cerca de 360, são praticamente invariantes na família. Assim como as demais P-loop GTPases que pertencem à classe TRAFAC e à superfamília Obg, a YchF apresenta os domínios de ligação ao nucleotídeo e ao íon magnésio que caracterizam esse grupo de proteínas. Uma visão esquemática da classificação desta subfamília pode ser vista na Figura 1.5.

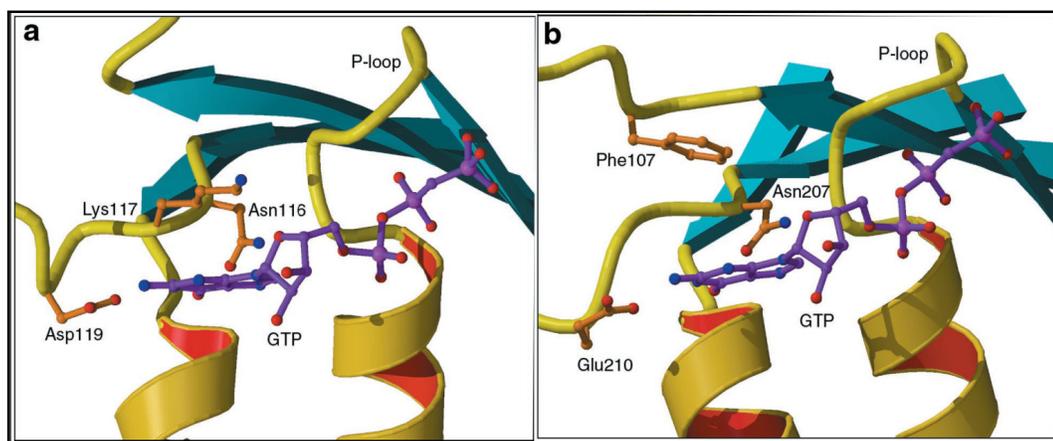
Figura 1.5: Representação da organização sistemática da subfamília YchF



A partir da NTPase observa-se a superclasse GTPase, as divisões ASCE e KG, as classes SIMIBI e TRAFAC, as famílias de fatores de tradução, FtsY/Ffh, Era e Obg e as subfamílias Obg, HflX e. Em letras azuis e setas laranjas a classificação da YyaF/YchF.

Contudo, este grupo de proteínas apresenta peculiaridades, como a modificação do motivo conservado G4, de NKxD para NxxE (Bourne *et al*, 1991). Este motivo está localizado no final da fita β_6 e é responsável pela especificidade de ligação ao resíduo de guanina. A perda da lisina conservada e a substituição do aspartato pelo glutamato nesta subfamília é a única exceção entre as GTPases da classe TRAFAC (Fig. 1.6).

Figura 1.6: Sítio de reconhecimento da guanina em uma proteína G típica RAS (a) e em YchF (b)



GTP é mostrado em roxo como observado em RAS (depositado no banco de dados de proteína sob o número 121P) e modelado em YchF. O resíduo de lisina da seqüência consenso NKXD (Lys117 em Ras) é substituído espacialmente pela Phe107 em YchF. Modificado de Teplyakov, A. *et al*, 2003.

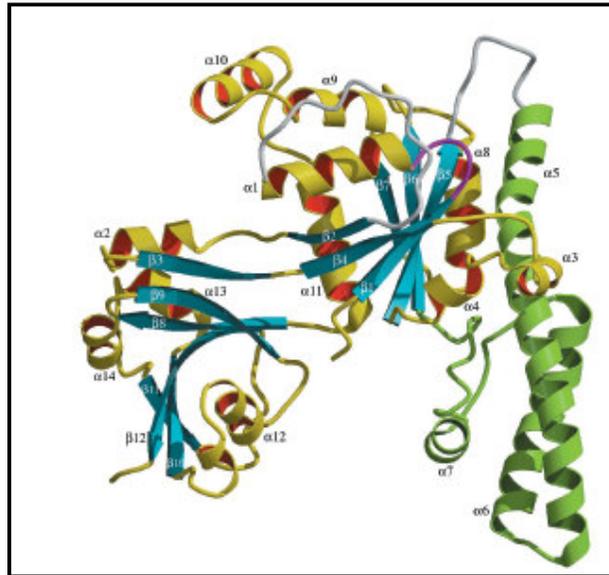
A estrutura cristalográfica da YchF foi determinada na tentativa de se compreender a assinatura funcional da proteína. A estrutura tri-dimensional da proteína YchF de *Haemophilus influenzae* (número HI0393 no “The Institute for Genomic Research”) foi determinada com uma resolução de 2.4 Å (Figura 1.7). O ortólogo da YchF em humanos denominada hOLA1 também teve sua estrutura resolvida, com uma resolução de 1.9 Å e consiste de domínio G N-terminal flanqueado por um domínio de “coiled-coil” e por um domínio TGS C-terminal (Figura 1.8). É interessante notar a conservação da estrutura geral molécula, mesmo em organismos filogeneticamente tão distantes. Análises da estrutura e experimentos

de ligação sugeriram que a YchF seria uma proteína de ligação a ácidos nucleicos GTP dependente e faça parte de um complexo de nucleoproteínas que talvez funcione como um fator de tradução GTP dependente (Teplyakov *et al*, 2003).

Em um estudo mais recente (Koller-Eichhorn *et al*, 2007), observou-se que os ortólogos de YchF em humanos (hOLA1), em *S. cerevisiae* (Ybr025c) e *H. influenzae* (HiYchF), apresentam uma capacidade de ligação e hidrólise de ATP mais eficiente do que o observado para GTP, colocando em discussão o mecanismo de ação desta subfamília de proteínas tão conservada e ao mesmo tempo tão pouco conhecida.

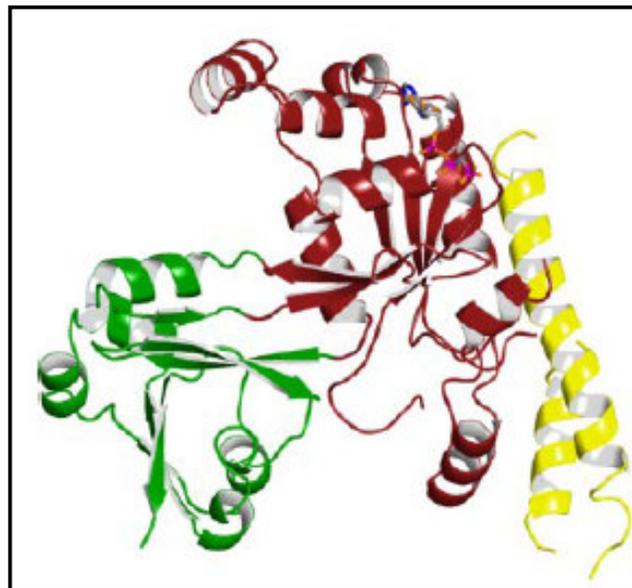
Em protozoários, a ocorrência de um ortólogo desta proteína foi observada pela primeira vez em *Trypanosoma cruzi*, em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, (Rau, 2004). No entanto, assim como nos demais organismos em que foi estudada, a função desta proteína permanece desconhecida.

Figura 1.7: Representação do modelo tridimensional da YchF de *H. influenzae*



α -hélices são mostradas em verde e a região P-loop de ligação à NTP é mostrada em roxo. Fitas β aparecem em azul. Alças desordenadas aparecem em branco. Modificado de Teplyakov *et al*, 2003.

Figura 1.8: Representação tridimensional da hOLA1 associada à AMP-PCP



O domínio G está assinalado em vermelho, a região de *coiled-coil* em amarelo e o domínio TGS em verde. Modificado de Koller-Eichhorn *et al*, 2007.

1.2. MODELO BIOLÓGICO

1.2.1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado unicelular pertencente à família Tripanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Este microrganismo é um parasita digenético, cujo ciclo de vida se alterna entre o hospedeiro invertebrado (insetos da família Triatominae, principalmente *Rhodinus prolixus* e *Triatoma infestans*, conhecidos popularmente como barbeiros) e o hospedeiro vertebrado (diversos mamíferos, entre eles o homem).

Descrito por Carlos Chagas no início do século XX (CHAGAS, 1909), o *T. cruzi* foi identificado como causador de uma moléstia endêmica e aspectos da sua biologia, patologia e epidemiologia foram detalhadamente evidenciados. Além disto, seu trabalho estendeu-se à observação dos vetores, reservatórios, determinação de diagnósticos sorológicos e ocorrência de transmissão congênita. Toda esta descrição da doença serviu ainda como base para políticas públicas voltadas à melhoria das habitações populares e controle do vetor tanto no Brasil como em outros países da América Latina.

A transmissão vetorial do *T. cruzi* apresenta um ciclo doméstico e um silvestre (Brenner *et al.*, 2000), podendo também, ocorrer transmissão através da ingestão de alimentos contaminados com o inseto vetor ou suas fezes além de contaminação via transfusões sanguíneas e transplacentária.

As populações de *T. cruzi* tendem a ser formadas por múltiplas linhas clonais, uma vez que a reprodução sexuada é rara. Assim mesmo é observada variabilidade biológica e genética intra-específica, permitindo uma divisão da espécie em duas linhagens principais, uma associada ao ciclo silvestre e a outra ao doméstico (Briones *et al.*, 1999; Devera *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003).

O ciclo silvestre caracteriza-se pela circulação do parasita entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados em um ambiente silvático. Dentre os reservatórios que compõe este ciclo encontram-se mamíferos de pequeno porte, como marsupiais, desdentados, roedores, quirópteros, carnívoros e lagomorfos. O ciclo doméstico caracteriza-se pela introdução do *T. cruzi* em ambientes em urbanização, onde

A fase aguda é usualmente assintomática, mas pode evoluir para um quadro clínico caracterizado por febre, cefaléia, edema, linfadenopatia, miocardite, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e cardiopatia aguda com parasitemia importante. O conjunto e a intensidade dos sintomas são variáveis e a duração do quadro vai de 4 a 12 semanas (revisto por Brener, 2000). A maioria dos casos agudos evolui para a fase crônica indeterminada da doença de Chagas que se inicia com a diminuição da parasitemia e dos níveis de imunoglobulinas do tipo IgM e aumento das do tipo IgG. A evolução desta fase é lenta e pode durar toda a vida do paciente manifestando-se pela presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e resultados normais ao exame clínico, eletrocardiográfico e radiológico. Apesar do bom prognóstico apresentado para a maioria dos pacientes, verifica-se em até 5% dos casos o desenvolvimento da forma crônica com dano cardíaco causado pela fibrose do miocárdio ou dano digestivo com desenvolvimento de megaesôfago e megacólon (Andrade *et al*, 1978 e revisto por Brener, 2000).

Apesar de menos comum, a transmissão por via oral é responsável por um número significativo dos casos agudos da doença principalmente na região norte do Brasil (Coura *et al*, 2002) através da contaminação por alimento contendo o inseto-vetor ou suas fezes. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (revisto por Schmuñis, 2000).

Embora já existam alguns medicamentos (Nifurtimox e Benznidazole) para tratamento da doença, estes têm efeito tóxico ao paciente e eficiência limitada (Brener *et al*, 2000). Não há vacina disponível e nenhum tratamento é capaz de impedir a progressão da forma crônica indeterminada para a determinada.

1.2.3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

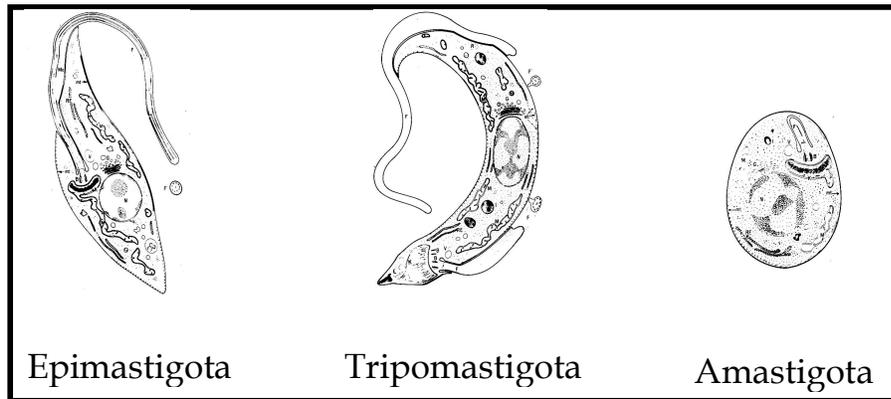
Durante seu ciclo, o protozoário sofre mudanças estruturais, morfológicas e bioquímicas adaptadas aos diferentes ambientes aos quais está sujeito durante a passagem em seus hospedeiros. Podem-se distinguir quatro estágios evolutivos principais do protozoário: as formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) e as formas infectantes não replicativas (tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos) (Figura 1.10).

O ciclo de vida do *T. cruzi* compreende dois tipos de hospedeiros: um vertebrado (mamífero) e um invertebrado (inseto), e está esquematizado na Figura 1.11. O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando formas infectantes do parasita (tripomastigotas metacíclicos) presentes nos dejetos (fezes e urina) do vetor são eliminadas durante ou pouco após o repasto sangüíneo. Ao alcançarem um local de descontinuidade cutânea infectam células da pele ou mucosas do mamífero. Essa etapa de interação célula-célula envolve uma série de moléculas, entre elas uma glicoproteína de superfície com atividade transialidase e neuraminidase que está fortemente associada à capacidade invasiva dos tripomastigotas (Schenkman *et al*, 1994; Pereira *et al*, 1996). Logo que o parasita se adere à célula hospedeira, uma série de modificações na membrana ocorrem em ambas as células e há o recrutamento de lisossomos no sítio de entrada do protozoário. Os lisossomos se fusionam, envolvem o parasita e formam o vacúolo parasitóforo. No interior das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, (De Carvalho & De Souza, 1989; Andrews *et al*, 1990) uma forma arredondada e com flagelo extremamente curto. Após intensa divisão binária, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sangüíneos, formas infectivas e não-replicativas que com o movimento intenso dos flagelos rompem as células hospedeiras liberando os parasitas na corrente sangüínea. Praticamente todos os tipos celulares podem ser infectados pelos tripomastigotas.

O ciclo no hospedeiro invertebrado inicia-se quando os tripomastigotas sangüíneos são ingeridos pelo inseto (hemípteros da família Reduviidae) durante o repasto sangüíneo. Ao longo do trajeto pelo tubo digestivo do vetor, o parasita se instala e evolui para a forma epimastigota (replicativa e não-infectiva). Depois de repetidas divisões por fissão binária, estas formas migram para a porção posterior do intestino e há a transformação de epimastigota em tripomastigota metacíclico, forma que infecta o hospedeiro mamífero. Esta diferenciação depende da interação hidrofóbica entre o flagelo e a parede interna no aparelho digestivo do inseto (revisto por de Souza, 1984; Bonaldo *et al*, 1988; Kollien e Schaub, 2000). A adaptação do protozoário a diferentes temperaturas, disponibilidade de nutrientes e o ambiente intra ou extracelular se reflete nas diferentes formas evolutivas observadas no ciclo de vida do parasita, que mostram diferenças morfológicas, ultra-estruturais,

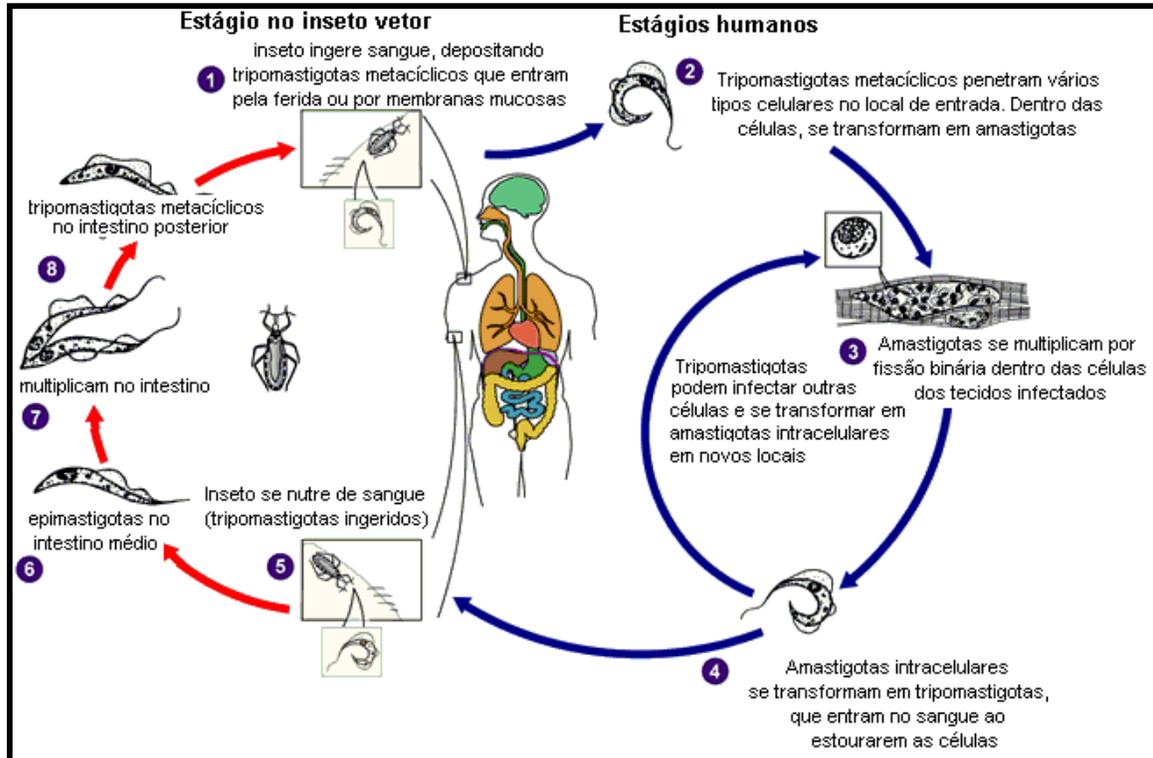
funcionais e bioquímicas (Brener, 1973; Zeledon, 1999; revisto por Tyler e Engman, 2001 e De Souza , 2000).

Figura 1.10: Formas evolutivas do *T. cruzi*.



(modificado de <http://lineu.icb.usp.br/~gwunder/3tripanosomiaseAmericana.ppt>)

Figura 1.11: Ciclo de vida do *T. cruzi*.



(modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.2.4. Organização do genoma do *T. cruzi*

Uma das peculiaridades observadas neste microrganismo refere-se à condensação atípica da cromatina, que impede a formação de cromossomos citologicamente individualizados (Vickerman e Tetley, 1977).

O genoma do *T. cruzi* apresenta grande variabilidade intra-específica que inclui vasto polimorfismo cromossômico numérico e estrutural e ainda possui duas frações, a mitocondrial e a nuclear. Apesar da estrutura clonal das populações, as variações observadas parecem advir de trocas genéticas entre organismos desta espécie (Machado & Ayala, 2001; Gaunt *et al.*, 2003).

A fração mitocondrial do genoma destes organismos representa até 30% do total, dependendo da linhagem (revisto por Silveira, 2000). O DNA do cinetoplasto (kDNA) está organizado em estruturas circulares denominadas maxicírculos e minicírculos, concatenados entre si. Os maxicírculos têm 30 kb e contêm basicamente os genes codificadores de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e RNA ribossômico. Os minicírculos com 1,4 kb contêm os genes que codificam os RNAs guias envolvidos na editoração do RNA (Shapiro e Englund, 1995; Madison-Antenucci, *et al.*, 2002).

Apesar da variabilidade, o cariótipo do *T. cruzi* tende a conservar sua organização gênica. Assim, vários grupos de genes ligados, inclusive grandes famílias multigênicas, são observados com a mesma estrutura, em diferentes linhagens (Henriksson *et al.*, 1995) e mostra-se estável nas diferentes formas evolutivas (Aymerich & Goldenberg, 1989).

Em 2001, três instituições – The Institute for Genomic Research (TIGR), Seattle Biomedical Research Institute (SBRI) e Karolinska Institutet – fizeram um consórcio (TSK) cujo objetivo foi o seqüenciamento do genoma de *T. cruzi*. A cepa eleita foi a CL Brener – por ser bem caracterizada experimentalmente (Zingales *et al.*, 1997) – e os primeiros resultados foram liberados no final de 2004. A estimativa do tamanho do genoma haplóide desta cepa é de aproximadamente 55 Mpb, bem maior do que se pensava (El-Sayed *et al.*, 2005a).

Estima-se que 50% do genoma nuclear seja constituído por seqüências repetitivas relativas à retrotransposons e seqüências teloméricas. Aproximadamente 60% do genoma contêm seqüências codificadoras. As maiores famílias gênicas são as

proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), trans-sialidades (TS), mucinas e a glicoprotease de superfície gp63 (El Sayed *et al.*, 2005a).

A caracterização do genoma do *T. cruzi* concomitante com de *T. brucei* e de *Leishmania major*, permitiu a comparação entre estes organismos e revelou que a sintenia é bastante conservada entre os três tripanossomatídeos (Berriman *et al.*, 2005; El Sayed *et al.*, 2005a, 2005b; Ivens *et al.*, 2005).

1.2.5. Expressão Gênica em Tripanossomatídeos

A adaptação às diferentes condições ambientais às quais os organismos encontram-se expostos, deve acontecer de modo rápido e eficiente. Esta adaptação normalmente exige que a expressão gênica seja modulada de modo a garantir a viabilidade do parasita. O controle da expressão gênica pode ocorrer em diferentes níveis: compactação da cromatina, transcrição, processamento, transporte e estabilidade do mRNA, tradução e pós-tradução.

A maioria dos organismos usa mecanismos de controle transcricional para que diferentes mRNAs sejam produzidos de acordo com as necessidades observadas naquele momento. Estes mecanismos baseiam-se fundamentalmente na regulação da iniciação da transcrição, onde a modulação da ação de promotores e/ou repressores aumentam ou diminuem a capacidade da RNA polimerase II em sintetizar o mRNA em questão. No entanto, os membros da família Trypanosomatidae, (entre os quais *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania sp.*) parecem ter perdido a capacidade de fazer a regulação da transcrição pela RNA polimerase II de modo convencional (Clayton, C.E, 2002).

Nos tripanossomatídeos, já foram identificados promotores para as RNA polimerase I e III. Contudo, ainda não foram identificados promotores para genes transcritos pela RNA polimerase II, com exceção de um promotor associado ao gene do minixon (Gillinger e Bellofatto, 2001; revisto em Campbell *et al.*, 2003).

Os genes dos tripanossomatídeos estão organizados em unidades policistrônicas e não apresentam interrupções por íntrons (exceção feita para o gene da poli-A polimerase (Mair *et al.*, 2000). Nesse ponto se assemelham aos operons bacterianos, com a diferença que essas unidades são transcritas em longos RNAs primários, com seqüências codificadoras para diversas proteínas de função não

relacionada. A transcrição policistrônica foi demonstrada pela primeira vez em tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* (Johnson *et al.*, 1987; Tschudi *et al.*, 1988).

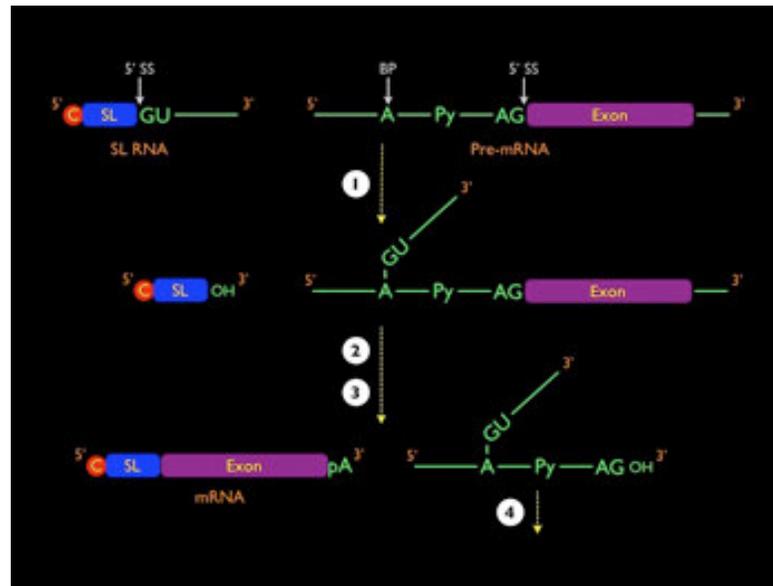
A formação de mRNAs em tripanossomatídeos ocorre pelo processamento de um RNA policistrônico precursor que contém regiões codificantes separadas por regiões intergênicas não codificantes. Nestes organismos o processamento se dá por mecanismos de “trans-splicing” (Agabian, 1990) e poliadenilação (LeBowitz *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994). Os dois processos ocorrem nas regiões intergênicas não codificantes do pré-mRNA. Este processamento parece ocorrer concomitantemente à transcrição com a poliadenilação sucedendo o “trans-splicing” (Ullu *et al.*, 1993).

Duas moléculas de RNA, transcritas em regiões distintas do genoma participam do processo de “trans-splicing”: o “RNA splice leader” e o pré-mRNA (Fig 1.12). O “RNA splice leader” possui dois domínios funcionais separados pelo sítio doador de “splicing”: o domínio 5’ chamado miniexon, e o domínio 3’ que corresponde ao íntron. Por este processo, o domínio 5’ do “RNA splice leader” é adicionado ao sítio acceptor de “splicing” no pré-mRNA. Este sítio é composto pelo dinucleotídeo AG localizado a jusante de uma região rica em pirimidinas (Huang *et al.*, 1991; de Lafaille *et al.*, 1992). Não foram identificadas seqüências consenso para a poliadenilação nestes organismos.

Apesar de não haver evidência clara da existência de promotores de polimerase II nos tripanossomatídeos, o sequenciamento do genoma destes microrganismos mostra a presença de poucas e longas regiões do genoma cujos genes são transcritos tendo a mesma fita de DNA como molde (Myler *et al.*, 1999; Worthey *et al.*, 2003). As regiões situadas nas proximidades destas seqüências são conhecidas como *strand-switch regions* (Ivens *et al.*, 2005). Acredita-se que nestes locais estejam os promotores de polimerase II e que o transcrito primário compreenda toda a região até o próximo *strand-switch region* (Clayton, 2002; Martinez-Cavilho *et al.*, 2003; Martinez-Cavillo *et al.*, 2004). A outra hipótese é que o início da transcrição é promíscuo, ou seja, a partir de vários pontos aleatórios do cromossomo, acontecendo até, em ambas as fitas (Myler *et al.*, 1999). Essa hipótese é fundamentada no fato de que genes repórteres podem ser expressos na ausência de promotores específicos, apenas sob o controle de seqüências intergênicas, tornando mais difícil o

entendimento acerca das regiões promotoras de genes transcritos por polimerase II (Curotto-de-Lafaille e Wirth, 1992).

Figura 1.12: “Trans-splicing” e poliadenilação do pré-mRNA em *T. cruzi*.



Representação esquemática do processamento do pré-mRNA. O sítio acceptor de “splicing” 5’ (5’ SS), o sítio acceptor 3’ (3’ SS) e o ponto de ramificação (BP) estão indicados. C, cap 5’; SL, “spliced leader”; Py, região de polipirimidina; pA, cauda poli(A). 1, primeira reação de transesterificação; 2, segunda reação de transesterificação; 3, clivagem e poliadenilação; 4, desramificação e degradação do intermediário em Y. Representação não está em escala.

Retirado de: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=76>

Na maioria das células eucarióticas o controle da expressão gênica ocorre principalmente na iniciação da síntese de RNA (controle transcricional), onde a presença de promotores da RNA pol II e a interação de fatores transcricionais específicos com a maquinaria de transcrição basal têm papel determinante (Orphanides & Reinberg, 2002). Contudo, as características do processo de transcrição dos tripanosomatídeos mostradas anteriormente, ou seja, a aparente ausência de sequências promotoras clássicas da RNA pol II e a transcrição gênica essencialmente policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos primários por “trans-splicing”, indicam que a regulação da expressão gênica nesses seres unicelulares ocorra principalmente (se não exclusivamente) por mecanismos

pós-transcricionais. Podemos então inferir que os processos responsáveis pelo processamento dos transcritos primários, pela estabilidade dos mRNAs maduros, pelo transporte dos mRNAs do núcleo para o citoplasma e pela seleção dos mRNAs que devem ser traduzidos constituem os principais mecanismos de regulação da expressão gênica desses microrganismos (Clayton, 2002; Boucher *et al.*, 2002).

Várias seqüências específicas que alteram a meia-vida dos mRNAs maduros já foram identificadas em tripanossomatídeos, muitas das quais estão localizadas na região 3'-UTR dessas moléculas. Um exemplo é a alça formada pelo pareamento de 16 nucleotídeos na região 3'-UTR dos mRNAs da proteína prociclina em *T. brucei* (Berberof *et al.*, 1995; Hehl *et al.*, 1994). Transcritos de *T. cruzi*, tais como aqueles para proteínas FL-160 (Weston *et al.*, 1999), amastina (Teixeira *et al.*, 1994), gp72 e gp85 (Nozaki & Cross, 1995) também contêm regiões reguladoras que modulam a estabilidade do mRNA.

Só recentemente alguns fatores protéicos envolvidos no processo de modulação da estabilidade dos mRNAs foram identificados, como a proteína TcUBP-1 de *T. cruzi*, que se liga a regiões ARE (A/U-rich element), é regulada durante a diferenciação do parasita e está envolvida com a desestabilização seletiva de mRNAs (D'Orso & Frasch, 2001). Outras proteínas que interagem com RNA foram identificadas em *T. brucei*, com papel importante no processo de diferenciação deste parasita (Hendriks *et al.*, 2001, 2005) e que têm como característica o domínio CCCH (CX8CX5CX3H, onde X indica resíduos de aminoácidos variáveis) de ligação ao íon zinco (CCCH zinc-finger motif).

Analisando-se as regiões 3'-UTR de vários mRNAs estágio-específicos de *Leishmania* identificou-se uma seqüência comum a todos eles, a qual modulava, não a estabilidade desses mRNAs, mas a capacidade de serem traduzidos (Boucher *et al.*, 2002), mostrando-se pela primeira vez o papel abrangente da tradução na regulação da expressão gênica em um tripanosomatídeo.

Um mecanismo de mobilização polisomal tem sido evidenciado em *T. cruzi*. Neste processo observou-se que, embora algumas espécies de mRNA estejam presentes em todos os estágios estudados, eles são encontrados associados aos polissomos somente em alguns deles (Avila *et al.*, 2001,2003, Dallagiovana *et al.*, 2001, Fragoso *et al.*, 2003, Yamada-Ogatta *et al.*,2004). Grânulos citoplasmáticos contendo

mRNA foram identificados em *T. cruzi* e podem ser locais de degradação ou de armazenamento de mRNAs para posterior tradução. Esses grânulos são melhor evidenciados quando os parasitas encontram-se em condições de estresse, ou sob tratamento com drogas que aumentam ou diminuem a associação dos mRNAs aos polissomos (Holetz *et al.*, 2007 e Cassola *et al.*, 2007).

O fenômeno de RNA interferência encontrado em *T. brucei* abre a possibilidade, pelo menos neste tripanossomatídeo, de que esse fenômeno seja utilizado como um mecanismo de controlar a estabilidade de mRNAs, assim como ocorre em plantas, fungos e animais (Ngô *et al.*, 1998).

Existem também, evidências de um controle traducional de expressão gênica. A concentração de mRNAs de algumas proteínas diferencialmente expressas nas diferentes etapas do ciclo de vida de tripanossomatídeos permanece constante nas diversas formas evolutivas (Tomás e Kelly, 1996; Fragoso *et al.*, 1998).

Embora um dos mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos envolva o processo de tradução, pouco se conhece sobre esta maquinaria nestes protozoários, tanto no que diz respeito à acessibilidade do mRNA ao ribossomo, aos eventos de iniciação, alongação e terminação e aos fatores traducionais envolvidos. Também pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no correto enovelamento das proteínas durante a síntese, bem como a eventual degradação de proteínas com erros de enovelamento.

Neste sentido, o presente trabalho traz luz a este campo através da caracterização de uma ATPase capaz de se associar aos polissomos do *T. cruzi*, sendo possivelmente um novo fator de tradução e podendo assim, contribuir na compreensão acerca deste mecanismo de regulação da expressão gênica nestes parasitas.

2. OBJETIVOS

Nós identificamos um gene de *T. cruzi* que codifica uma nova ATPase, denominada TcYchF, que, embora ubíqua, não tem função conhecida. Essa proteína está classificada na subfamília YchF pertencente a família das Obg GTPases. Várias proteínas dessa família se associam com subunidades ribossomais, sugerindo que sejam fatores traducionais ainda não caracterizados. O objetivo deste trabalho é, portanto, caracterizar a proteína TcYchF, analisar sua expressão, identificar associações com outras proteínas e dimensionar sua importância para os processos celulares do *T. cruzi*. Para tanto, usaremos técnicas de expressão gênica em *E. coli* para produzir a TcYchF recombinante que, uma vez purificada, será testada quanto a atividade de hidrolisar ATP e GTP. Analisaremos a expressão da TcYchF nos estágios de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos como primeira abordagem para avaliar a importância da proteína na replicação e diferenciação do parasita. Uma vez que TcYchF pode estar associada aos ribossomos, iremos analisar o perfil de polissomos fracionados em gradiente de sacarose para associar a presença da proteína TcYchF com as frações das subunidades ribossomais bem como dos polissomos. Associações entre TcYchF e as subunidades ribossomais serão também analisadas pela técnica de imunoprecipitação, usando antisoros específicos tanto para TcYchF quanto para proteínas de ambas as subunidades do ribossomo. Estudos de proteômica mostram que o ortólogo de YchF em levedura está associado ao proteasomo, portanto, investigaremos a associação da TcYchF com esse macro-complexo de degradação protéica por espectrometria de massas e imunoprecipitação. Finalmente utilizaremos a técnica de RNA de interferência (RNAi) para avaliar rapidamente as consequências do silenciamento da expressão do ortólogo de TcYchF na multiplicação celular de *Trypanosoma brucei*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções Utilizados

3.1.1. Reagentes

Amersham Bioscience: dNTPs; Hybond C; Hybond N, kit ECL de *western blotting*, anticorpo monoclonal anti-Histidina.

Bio-Rad: Acrilamida, Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis- Acrilamida; Persulfato de Amônia.

Cult-lab: Soro Fetal Bovino.

Difco: Bacto-ágar; Bacto triptona; Extrato de levedura.

Invitrogen Inc.: Kit TA cloning[®], pTrcHis-TOPO[®]; EDTA; Fenol; TRIS, Taq DNA polimerase, IPTG, Agarose, X-Gal, Marcador de massa molecular Bench Mark, λ DNA/*HindIII*.

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial; CaCl_2 ; Etanol absoluto; Formaldeído; Formamida; Glicina; Glicose; HCl; Isopropanol; KCl; Metanol; Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4 ; NaCl; NaOH; TCA; Tolueno.

New England Biolabs: Endonucleases de Restrição, 1 kb Plus DNA Ladder.

Pierce Biotechnology Inc.: SDS, Micro-BCA Protein Assay Kit.

Serva Electrophoresis: Alu-Gel S.

Sigma: Acetato de amônia; Ampicilina; Brometo de Etídeo; BSA; Kanamicina; Glicerol; HEPES; MgCl_2 ; Tetraciclina; β -mercaptoetanol; DEAE-celulose; HEPES; Tween 20, anticorpo anti IgG de coelho conjugado com FITC, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, GTP, ATP, proteína A-sepharose, proteína G-sepharose.

Roche: High Pure PCR Product Purification Kit, Pastilhas contendo mistura de inibidores de Protease, sem EDTA (Protease inhibitor EDTA FREE).

USB: T4 DNA ligase, Sacarose.

3.1.2. Tampões e Soluções

Meio de eletroporação para *T. brucei*: NaCl 129 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; KCl 8mM; Na₂HPO₄ 8 mM; MgCl₂ 1,5 mM; CaCl₂ 90 µM e NaAc 2,4 mM pH 7.

Mix de dNTP – dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham) misturados e diluídos em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido a - 20 °C.

PBS – solução tampão contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM. Mantida a 4 °C.

Reagente de Verde Malaquita: 2 volumes de verde malaquita a 0,0812% (SIGMA), 2 volumes de água bidestilada, 1 volume de molibdato de amônia (5,72% em HCl 6 M) e 1 volume de de polivinil álcool a 2.32%.

Solução de bloqueio para western blot – solução contendo TBST e de leite em pó desnatado 5%.

Solução de lise para Palitagem: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e Azul de bromofenol 0,025%.

Solução Ponceau S: Ponceau S 0,5%, ácido acético 1%.

Tampão da fosfatase alcalina: Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM.

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol FF 0,25%.

Tampão de amostra para proteína 4X– solução contendo Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%. Mantida a - 20 °C.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%

Tampão de ligação para ensaio de atividade: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, glicerol 5%).

Tampão de lise de bactérias: solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 8 e NaCl 0,5 M.

Tampão de lise celular hipotônico: β-mercaptoetanol 5 mM; cicloheximida 10 µg/ml; heparina 20 µg/ml; MgCl₂ 5 mM; NaCl 10 mM e tris-HCl 10 mM pH 7,6.

Tampão de lise 10X: Tampão TKM suplementado com sacarose 2 M e NP-40 10%.

Tampão de lise 10X com puromicina: Tampão TKMP suplementado com sacarose 2 M e NP-40 10%.

Tampão para proteômica: Uréia 7 M, Tiouréia 2 M, Chaps 2%, Triton X100 2%, DTT 1%, Nuclease (1:100), Inibidor de protease (1:100)

Tampão de ressuspensão (TMK): Tris-HCl 10mM pH 7,5, MgCl₂ 10mM, KCl 50mM.

Tampão de ressuspensão com puromicina (TMKP): Tris-HCl 10mM pH 7,5, MgCl₂ 500mM, KCl 50mM e puromicina 1 mM)

Tampão NKM: cicloheximida 10 µg/ml; heparina 20 µg/ml; Hepes 10 mM pH 7,4; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,5 mM e NaCl 140 mM.

Tampão para transferência (*western blot*) 1x: Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %.

Tampão TBE - solução contendo Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM. Mantida à temperatura ambiente.

TBS - solução com Tris-HCl 20 mM pH 8 e NaCl 150 mM. Mantida a 4 °C.

TBST - solução contendo TBS e Tween 20 0,05 % ou 0,1%.

TE - solução com Tris-HCl 10 mM pH 8 e EDTA 1 mM. Mantida a 4 °C.

3.1.3. Meios de Cultura

LB - meio de cultura contendo triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%. Autoclavado e mantido à temperatura ambiente.

Meio LIT (*liver infusion tryptose*) - infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5% , Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l.

Meio TAU - NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM, pH 6.

Meio TAU3AAG - meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.

Meio condicionado para seleção de *T. brucei*: Sobrenadante de cultura de *T. brucei* (1×10^7 parasitas/ml), obtido após centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min e filtrado esterilmente em membrana de $0,22 \mu\text{m}$.

<u>Meio de cultura SDM-79:</u>	<u>P/1litro</u>
MEM (Minimum Essential Medium)	7,0 g
Meio 199	2,0 g
MOPS	5,0 g
HEPES	8,0 g
Glicose	1,0 g
NaHCO ₃	2,0 g
Piruvato de Sódio	0,1 g
L-Alanina	0,2 g
L-Arginina	0,1 g
L-Glutamina	0,3 g
L-Metionina	0,07 g
L-Phenilalanina	0,08 g
L-Prolina	0,6 g
L-Serina	0,06 g
Taurina	0,18 g
L-Treonina	0,35 g
Adenosina	0,1 g
Guanosina	0,01 g
Glucosamina	0,05 g
MEM amino acids solution, 50x	10 ml
MEM non essential amino acids) 100x	6 ml
Penicilina	0,059 g
Streptomicina	0,133 g
Acido Fólico	0,004 g
PABA (ácido Para-aminobenzóico)	0,002 g
Biotina	0,0002 g

3.2. CULTIVO DOS PARASITAS

3.2.1. *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (5×10^5 a 1×10^6 parasitas/ml) foram cultivadas em meio LIT (Camargo, 1964) a 28 °C até uma densidade de $1 - 2 \times 10^7$ cel/ml. Os parasitas foram coletados por centrifugação ($10.000 \times g$ por 15 min a 10 °C).

As formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* foram obtidas *in vitro*, sob condições quimicamente definidas de acordo com protocolo descrito por Contreras *et al.* (1985) e Bonaldo *et al.* (1988). Os parasitas em fase estacionária na curva de crescimento foram coletados por centrifugação ($10.000 \times g$ por 15 min a 10 °C) e incubados em meio TAU (urina artificial de triatomíneo) por 2 h a 28 °C. Decorrido esse período, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura contendo o mesmo meio, suplementado de glicose e os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato de sódio (TAU3AAG). Após 24 h a maioria dos parasitas encontrava-se aderida às paredes da garrafa. As formas tripomastigostas metacíclicas foram observadas, após 96 h de incubação, no sobrenadante do meio de cultura e foram purificadas por cromatografia em DEAE-51 celulose (Contreras *et al* 1985).

3.2.2. *Trypanosoma brucei*

As formas procíclicas do *Trypanosoma brucei* (Lister 427), cepa 29-13 (Wirtz *et al*, 1999) foram cultivadas em meio SDM-79 (Brun e Schonenberger, 1979) com 10 % de soro fetal bovino a 28 °C na presença de higromicina 50 µg/ml e geneticina (G418) 15 µg/ml Essa cepa expressa os genes da T7 RNA polimerase e do repressor da tetraciclina.

3.3. OBTENÇÃO DE DNA DE *T. cruzi*

A extração e purificação do DNA do *T. cruzi* foram realizadas segundo Fragoso e Goldenberg (1992). Assim, 1×10^{10} epimastigotas foram obtidos por centrifugação ($8.000 \times g$, 10 minutos, 10 °C), lavadas em tampão NKM,

recuperadas com tampão de lise hipotônica nas mesmas condições de centrifugação e lisadas, pela adição de Nonidet P-40 (concentração final de 1%) por 2 a 3 minutos a 4 °C. Os núcleos celulares foram parcialmente purificados em três ciclos de centrifugação a 800 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Esta fração foi incubada em EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, proteinase K 100 µg/mL, SDS 0,5 % e Tris-HCl 10 mM pH 7,6, por 12 horas, a 37 °C. O DNA foi extraído com fenol saturado e purificado em várias diálises em EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

3.4. IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE DA *TcYchF*

O gene da *TcYchF*, bem como as regiões 5'-UTR e 3'-UTR presentes no transcrito maduro, foram identificados pelo sequenciamento de ESTs obtidas das formas epimastigotas do clone Dm28c de *T. cruzi* (Rau, 2004).

3.5. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA *TcYchF*

A seqüência nucleotídica do gene *Tcychf* foi analisada utilizando-se o pacote de programas Lasergene (DNASTAR Inc.) e o algoritmo BLAST - "Basic Local Alignment Search Tool" (Altschul *et al.*, 1997), do "National Center of Biotechnology Information" - NCBI vinculado ao "National Institute of Health" - NIH no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

A seqüência aminoacídica da proteína *TcYchF* foi analisada também em bancos de dados de domínios protéicos, através da ferramenta InterProScan Sequence Search do sistema de análise de proteínas ExPASy ("Expert Protein Analysis System") do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) (<http://www.expasy.ch>).

A modelagem da estrutura tridimensional da *TcYchF* foi obtida usando o sistema de modelagem comparativa automática Swiss Model diretamente do site swissmodel.expasy.org. A visualização das estruturas e arte gráfica foram

obtidas usando o programa Deep View Swiss Pdb Viewer (Guex *et al*, 1997 e Schwede *et al*, 2003).

3.6. CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA TcYchF

Os *primers* GBPF (5'- ATGCCTCCCAAGAAGAAGGATGAGAAGTC - 3') e GBPR (5'- CTACTTCTTACCTCCTTTAGCGGCGTTA - 3') foram usados para amplificar a região codificante de TcYchF, sob as seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos *primers* GBPF e GBPR, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, tampão da Taq DNA polimerase, 2.5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A mistura foi aquecida por 4 min a 94 °C, e então sujeita a 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min. O fragmento de DNA amplificado por PCR foi inserido em um plasmídeo (pTrcHis-TOPO - Invitrogen) que acrescenta uma cauda de seis histidinas à seqüência polipeptídica. Bactérias *E. coli* TOP10 foram transformadas com o plasmídeo acrescido da seqüência da TcYchF. A seleção dos clones com a correta orientação do gene foi realizada através da técnica de PCR de colônia.

Em paralelo, o gene *tcYchF* foi amplificado por PCR usando os *primers* GEXF (5' - ACGAGATCTTTATGCCTCCCAAGAAGAAG - 3') e GEXR (5' - GCCGAATTCCTACTTCTTACCTCCTTT - 3'). Seqüências correspondentes aos sítios de clivagem das enzimas *Bgl*III e *Eco*RI (em negrito) foram adicionadas às extremidades 5' dos *primers* GEXF e GEXR respectivamente. O produto de PCR foi digerido com estas enzimas e inseridas no vetor de expressão pGEX3x previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (Smith DB, 1988). A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem (3.10.1) ou de PCR de colônia (3.10.2).

3.7. CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA GAPDH DE *T. cruzi*

A seqüência do gene que codifica a enzima GAPDH de *T. cruzi* (ID: Tc00.1047053506943.60) foi obtida através de buscas no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR - The Institute for Genomic Research, www.tigr.org)

A região codificante do gene da GAPDH foi amplificada usando os *primers* GPDF (5'-TTGGGATCCATGCCCATCAAGGTCGGTATC - 3') e GPDR (5'-ATTTGTCGACCTACAACCTTTGCCGAACGATCC - 3'). O sítio para a enzima de restrição *Bam*HI foi adicionado à extremidade 5' do *primer* GPDF, enquanto o sítio para a enzima de restrição *Sal*I foi acrescentado à extremidade 5' do *primer* GPDR.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 100 µl contendo 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol de cada *primer*, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 1,5 mM, tampão da *Taq* DNA polimerase e 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A mistura foi aquecida por 4 min a 94 °C, e então sujeita a 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O fragmento de DNA amplificado foi digerido com as enzimas de restrição correspondentes e inserido em um vetor de expressão pQE30 (Qiagen), que acrescenta seis codons de histidina à extremidade 5' do inserto. Plasmídeos recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem (3.10.1) ou de PCR de colônia (3.10.2). Bactérias *E. coli* cepa M15 foram transformadas com o plasmídeo recombinante.

3.8. CLONAGEM DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS RIBOSOMAIS S7 e L26 DE *T. cruzi*

As seqüências dos genes que codificam as proteínas ribossômicas S7 (subunidade 40S) (ID: Tc00.1047053506593.19) e L26 (subunidade 60S) (ID: Tc00.1047053511067.20) de *T. cruzi* foram obtidas através de buscas no banco de

dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR – The Institute for Genomic Research, www.tigr.org).

O gene S7 foi amplificado usando os *primers* S7F (5'-GGGGGATCCATGTCTGTTAAGCCACACCTGCG - 3') e S7R (5'-AAAGTCGACTACCGCGAGGACACCTGCTGGAG - 3'), enquanto os *primers* L26F (5'-GGGGATCCATGGCCAGCATCAAGTGTGGAAGCCGTCGCA - 3') e L26R (AAAAGCTTTTAGTCCATCTGCTGCATGGCCTTCTCG - 3') foram usados para amplificar a região codificante do gene da L26. A seqüência correspondente ao sítio de clivagem da enzima *Bam*HI (em negrito) foi adicionada à extremidade 5' dos *primers* S7F e L26F. A seqüência do sítio de clivagem da enzima *Sal*I (em negrito) foi adicionada à extremidade 5' do S7R enquanto a seqüência do sítio da enzima *Hind*III foi adicionada à extremidade 5' do *primer* L26R.

Os genes S7 e L26 foram amplificados por PCR usando as mesmas condições descritas no item 3.7. Os produtos de PCR foram purificados e inseridos no vetor pQE30 como descrito no item 3.7. Clones recombinantes foram identificados pela técnica da palitagem (3.10.1) ou de PCR de colônia (3.10.2).

3.9. CLONAGEM DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS RPN7 E RPN10 DO PROTEASSOMO DE *T. cruzi*

As seqüências dos genes que codificam as proteínas RPN7 (ID: Tc00.1047053508707.90) e RPN10 (ID: Tc00.1047053509611.160) do proteassomo de *T. cruzi* foram obtidas através de buscas no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR – The Institute for Genomic Research, www.tigr.org).

O gene RPN7 foi amplificado usando os *primers* RPN7F (5'-GGGGGATCCATGCCACCGCAAACGAAAGGAACG - 3') e RPN7R (5'-GGGGTCTGACTCACATCTCTGCCAGACGGGACAAC - 3'), enquanto os *primers* RPN10F (5'-GGGGGATCCTTTCTGTGCCTGGACTCCACGGAGTTTATG - 3') e RPN10R (5'-GGGGTCTGACTTATTTTTTGTTCCTCGGTTGCTTCAC - 3') foram usados para amplificar a região codificante do gene da RPN10.

A seqüência correspondente ao sítio de clivagem da enzima *Bam*HI (em negrito) foi adicionada à extremidade 5' dos *primers* RPN7 e RPN10. A seqüência para o sítio da enzima *Sal*II (em negrito) foi adicionada à extremidade 5' dos *primers* RPN7 e RPN10.

Os genes RPN7 e RPN10 foram amplificados por PCR usando as mesmas condições descritas no item 3.7. Os produtos de PCR foram purificados e inseridos no vetor pQE30 como descrito no item 3.7. Clones recombinantes foram identificados pela técnica da palitagem (3.10.1) ou de PCR de colônia (3.10.2).

Quadro 3.1.: Nome, tamanho e *primers* usados para amplificar as seqüências das proteínas selecionadas para clonagem e produção de anti-soros.

Nome	ID number	Tamanho	Massa	Primers
TcYchF- His	Tc00.1047053504741.20	1290 pb	48 kDa	GBPF: 5' - ATGCCTCCCAAGAAGAAGGATGAGAAGTC - 3' GBPR: 5' - CTACTTCTTACCTCCTT TAGCGGCGTTA - 3'
TcYchF- GST	Tc00.1047053504741.20	1881 pb	70,3 kDa	GEXF: 5' - ACGAGATCTTTATGCCTCCCAAGAAGAAG - 3' GEXR: 5' - GCCGAATTCCTACTTCTTACCTCCTTT - 3'
GAPDH	Tc00.1047053506943.60	1077pb	39 kDa	GPDF: 5'-TTGGGATCCATGCCCATCAAGGTCGGTATC - 3' GPDR: 5'-ATTTGTCGACCTACAACCTTTGCCGAACGATCC - 3'
S7	Tc00.1047053506593.19	606 pb	23.9 kDa	S7F: 5'- GGGGGATCCATGTCTGTTAAGCCACACCTGCG - 3' S7R: 5'-AAAGTCGACTACCGCGAGGACACCTGCTGGAG - 3'
L26	Tc00.1047053511067.20	429 pb	16.3 kDa	L26F: 5'- GGGGATCCATGGCCAGCATCAAGTGTGGAAGCCGTCGCA - 3' L26R: 5'- AAAAGCTTTTAGTCCATCTGCTGCATGGCCTTCTCG - 3'
RPN7	Tc00.1047053508707.90	1206 pb	46.2 kDa	RPN7F: 5' - GGGGGATCCATGCCACCGCAAACGAAAGGAACG - 3' RPN7R: 5' - GGGGTCGACTCACATCTCTGCCAGACGGGACAAC - 3'
RPN10	Tc00.1047053509611.160	1026 pb	37,1 kDa	RPN10F: 5' - GGGGGATCCTTCTGTGCCTGGACTCCACGGAGTTTATG 3' RPN10R: 5' - GGGGTCGACTATTTTTTGTTCCTCGGTTGCTTCTCAC 3'

3.10. SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

3.10.1. Técnica da Palitagem (Toothpick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrifuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10µl do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo nativo como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.10.2. Técnica de PCR de colônia

As colônias selecionadas foram transferidas para tubos de PCR contendo os reagentes da PCR e os *primers* que hibridizam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA clonado, em um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas a 94 °C por 10 minutos e submetidas a 30 ciclos de PCR com as seguintes etapas: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão à 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel agarose 1% .

Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

3.11. PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)

Os clones recombinantes foram cultivados em 2 ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 18 h. Uma alíquota de 1,5 ml da cultura foi então centrifugada a 12.000 × g por 1 min a temperatura ambiente e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de minipreparação de plasmídeo (Miniprep Qiagen Kit) (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12. PRODUÇÃO DA TcYchF, GAPDH, PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS S7 E L26 E PROTEÍNAS DO PROTEASSOMO RPN7 E RPN10 DE *T. cruzi*.

3.12.1. TcYchF-GST:

A produção da proteína recombinante TcYchF-GST foi conseguida pela expressão do gene clonado no plasmídeo pGEXB e transformados em *E. coli* cepa Top10. A diluição a partir de um pré-inóculo foi de 1:100, em um volume final de 1 L de LB. As culturas foram cultivadas sob agitação constante a 37 °C e a indução da expressão foi feita através da adição de IPTG 0,4 mM (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside, Invitrogen) seguida de um cultivo adicional de 3 h a 37 °C. As bactérias foram coletadas por centrifugação (10 minutos a 5.000 x g), ressuspensas em PBS e lisadas por sonicação (4 vezes por 15 segundos, potência 8 a 4 °C, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer). Após centrifugação (15 minutos a 10.000 x g) o sobrenadante coletado e incubado em resina Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech). A proteína recombinante foi eluída da resina através da adição de uma solução de glutathione reduzida 10 mM em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, seguindo as recomendações do fabricante.

Alíquotas das diferentes etapas do processo foram analisadas por SDS-PAGE.

3.12.2. TcYchF-His:

Foi utilizado o plasmídeo pTrcHIS-TOPO (Invitrogen, Inc.) para expressar o gene codificando a proteína recombinante TcYchF. Nesse sistema, o fragmento de DNA é inserido diretamente no vetor a partir do produto amplificado por PCR. A proteína recombinante é produzida com uma etiqueta (*tag*) de seis resíduos de histidina na porção amino terminal, apresentando a vantagem de facilitar sua purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel-NTA (Ausubel *et al.*, 1987).

Um clone recombinante foi cultivado em 10 ml de LB durante 16 horas a 37 °C (pré-inóculo). O pré-inóculo foi então diluído 1:100 (10 ml de um pré-inóculo em um volume final de 1000 ml de LB) e incubado novamente a 37 °C sob agitação. por 1 hora. A expressão do gene recombinante foi induzida pela adição de IPTG

(concentração final = 1 mM) à cultura, que foi então mantida sob agitação a 28 °C por 4 h. As bactérias foram coletadas por centrifugação (10 minutos a 5.000 × g), ressuspensas em tampão de lise de bactérias e lisadas por sonicação (4 vezes por 15 segundos, potência 8 a 4 °C, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer). Após centrifugação (15 minutos a 10.000 × g) o sobrenadante foi coletado e incubado com resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen). A proteína recombinante purificada em condições nativas através da eluição com imidazol 300 mM, segundo recomendações do fabricante.

Alíquotas das diferentes etapas do processo foram analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3.12.3.: GAPDH, S7, L26, RPN7 e RPN10

A produção das proteínas recombinantes GAPDH, S7, L26, RPN7 e RPN10 acrescidas de uma cauda de seis resíduos de histidina foi obtida pela expressão dos respectivos genes clonados no plasmídeo pQE30 e transformados em *E. coli* cepa M15. A diluição a partir de um pré-inóculo foi de 1:100, em um volume final de 1 L de LB. As culturas foram cultivadas sob agitação constante a 37 °C por 1 hora e a indução da expressão foi feita pela adição de IPTG (concentração final = 2 mM) à cultura, que foi mantida sob agitação a 37 °C por 4 h. As bactérias foram coletadas por centrifugação (10 minutos a 5.000 × g), ressuspensas em tampão de lise de bactérias e lisadas por sonicação (4 vezes por 15 segundos, potência 8 a 4 °C, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer). Após centrifugação (15 minutos a 10.000 × g) o sedimento foi ressuspenso em PBS e tampão de amostra para proteína e submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (10 % SDS-PAGE). Após a corrida, o gel foi tratado com KCl 0,1 M gelado, o que permitiu a visualização de bandas claras, quando o gel foi colocado sobre um anteparo escuro. A banda correspondente à proteína recombinante foi removida com auxílio de uma lâmina de bisturi. Este material foi posteriormente eletroeluído e dialisado contra PBS 20 mM pH 8 por 16 h à temperatura ambiente.

Uma alíquota de 10µl da amostra dialisada foi submetida a uma eletroforese (SDS-PAGE) e analisada por *western blot* (Towbin *et al.*, 1970) (ítem 3.15), usando um

anticorpo monoclonal contra a porção de 6xHis, para confirmação da identidade da proteína recombinante.

As concentrações das proteínas de fusão foram determinadas com o kit microBCA (Pierce).

3.13. PRODUÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL

Os anti-soros utilizados neste trabalho foram produzidos tanto em coelhos como em camundongos. Os coelhos (linhagem New Zeland) foram imunizados por injeção subcutânea com aproximadamente 100 µg de TcYchF recombinante (TcYchF-His) e adjuvante completo de Freund (SIGMA) na primeira inoculação. Aplicando intervalos de duas semanas, foram feitas mais três inoculações com 50 µg de TcYchF recombinante e adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). O anti-soro foi obtido cinco dias após a última inoculação.

Camundongos da linhagem Swiss foram usados para produzir anticorpos policlonais contra as proteínas TcYchF-GST e TcGAPDH, contra as proteínas ribossomais S7 (subunidade 40S) e L26 (subunidade 60S) e contra as proteínas RPN7 e RPN10 da subunidade regulatória 19S do proteossomo de *T. cruzi*. Os animais foram imunizados por injeção intraperitoneal de 20 µg do antígeno apropriado em adjuvante completo de Freund (SIGMA) na primeira inoculação seguido de três outras imunizações com 20 µg de proteína associada à Alu-Gel S. O intervalo entre as inoculações foi de 15 dias. O anti-soro foi obtido cinco dias após a última inoculação.

3.14. EXTRATOS de *T. cruzi* e *T. brucei*

3.14.1. *Trypanosoma cruzi*

3.14.1.1. Extrato total: Os parasitas foram cultivados em meio LIT até a densidade de 1×10^7 células/ml e coletados por centrifugação ($4.000 \times g$, 15 min a $10^\circ C$), lavados duas vezes em PBS pH 7.5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS em uma densidade de 1×10^6 células/µl e lisados em tampão de amostra para proteína. Os extratos foram fervidos por 5 min e armazenados a $-20^\circ C$.

3.14.1.2. Extrato citoplasmático: Os parasitas foram cultivados em meio LIT até a densidade de 1×10^7 células/ml. A cultura foi submetida à centrifugação a $6.000 \times g$ a 4°C e as células lavadas com 15 ml de tampão TMK. Os parasitas (2×10^9 células totais) foram novamente centrifugados ($6.000 \times g$ a 4°C) e ressuspensos em 900 μl de tampão TMK suplementado com 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, 10 μM E-64 e uma solução de inibidores de proteases livre de EDTA (Roche). A suspensão celular foi transferida para um novo tubo, contendo 100 μl de tampão de lise 10X. A mistura foi agitada vigorosamente por 10 a 15 s. A lise celular foi monitorada por microscopia de contraste de fase. O lisado foi centrifugado a $18.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante (extrato citoplasmático) foi coletado para uso imediato ou congelado a -70°C .

Todos os tampões e soluções foram preparadas na condição definida como livre de RNase (RNase free).

3.14.2. *Trypanosoma brucei* :

3.14.2.1.: Extrato total: Os parasitas foram cultivados em meio SDM79 até a densidade de 10^7 células/ml e coletados por centrifugação ($10.000 \times g$, 5 min), lavados duas vezes em PBS pH 7.5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS em uma densidade de 1×10^6 células/ μl e lisados em tampão de amostra para proteína. Os extratos foram fervidos por 5 min e armazenados a -20°C .

3.15. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA TcYchF POR “WESTERN BLOT”.

A análise da expressão da TcYchF foi feita por ensaio tipo “western blot”. Extratos protéicos (equivalentes a 1×10^7 células) de epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 13%).

A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi feita em tampão de “western blot” a 20 V por 16 horas a 4°C . Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos à temperatura ambiente, para a

identificação das bandas dos marcadores de massa molecular (“Benchmark” - Invitrogen) e então descorada em água bidestilada. Em seguida, a membrana foi transferida para a solução de bloqueio por uma hora sob agitação suave. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS/Tween por 10 minutos e em seguida incubada com anti-soro anti-TcYchF (diluições de 1:1000 - coelho em TBS tween 0,1% por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBS/Tween 0,1% por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:7500) (Amersham Biosciences) por 1 hora à temperatura ambiente e o sinal foi detectado por quimioluminescência, usando o kit ECL “western blotting” (Amersham Biosciences) de acordo com as normas do fabricante.

3.16. FRACIONAMENTO DO EXTRATO CITOPLASMÁTICO DE *T. cruzi* EM GRADIENTE DE SACAROSE PARA ANÁLISE DO PERFIL DE POLISSOMOS:

3.16.1: Fracionamento do extrato citoplasmático contendo cicloheximida:

A análise dos polissomos de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada usando um protocolo adaptado de Brecht e Parsons, (1998). O extrato citoplasmático de 2×10^9 parasitas (item 3.14.1.2) foi obtido em condições apropriadas para a estabilização de mRNAs envolvidos na tradução na forma de polissomos, com a adição de 100 µg/ml de cicloheximida em todas as soluções de lavagem e lise. A cicloheximida inibe a função do fator de tradução EF2, que medeia a translocação do peptidil-tRNA do sítio A do ribossomo para o sítio P, bloqueando dessa maneira a elongação da tradução e mantendo os ribossomos associados ao mRNA.

O lisado foi centrifugado a $18.000 \times g$ a $4^\circ C$ por 10 minutos e 500 µl do sobrenadante (equivalente a 1×10^9 células) foi aplicado sobre um gradiente linear de 10 a 40% de sacarose em tampão TMK (suplementado com 100 µg/ml cicloheximida, 10 µg/ml de heparina, 10 µM E-64 e uma solução de inibidores de proteases livre de EDTA) e centrifugado a $4^\circ C$ por 2,5 h a $230.000 \times g$ em um rotor Hitachi RPST. As amostras foram coletadas usando o “ISCO gradient fractionation system” (ISCO) em frações de 300 ul.

Alíquotas de 20µl de cada fração foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 13%, submetidos à eletroforese e analisados por “western blotting” com soros de camundongos dirigidos contra a TcYchF (1:1000) e contra as proteínas ribossomais de *T. cruzi* S7 (1:500) e L26 (1:500). As membranas foram lavadas durante trinta minutos com solução TBST 0,1% e incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:7500) (Amersham Biosciences) por 1 hora à temperatura ambiente. O sinal foi detectado por quimioluminescência, usando o kit ECL “western blotting” (Amersham Biosciences) de acordo com as normas do fabricante.

3.16.2: Fracionamento do extrato citoplasmático tratado com puromicina:

Epimastigotas em meio LIT foram incubados com puromicina 2mM (Sigma) por 1 h a 28 °C antes de se obter o extrato citoplasmático. A puromicina é um antibiótico que causa a liberação prematura da cadeia polipeptídica em construção no ribossomo e a concomitante dissociação dos polisomos.

Os parasitas (2×10^9 células) foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ a 4 °C e ressuspensos em 900 µl de tampão TMKP suplementado com 10 µg/ml de heparina, 10 µM E-64 e uma solução de inibidores de proteases livre de EDTA (Roche). A suspensão celular foi transferida para um novo tubo contendo 100 µl de tampão de lise com puromicina 2 mM e o lisado foi centrifugado a $18.000 \times g$ a 4 °C por 10 minutos. Um volume de 500 µl do sobrenadante (equivalente a 1×10^9 células) foi aplicado sobre um gradiente linear de 15 a 55% de sacarose em tampão TMKP e centrifugado a 4°C por 2.5 h a $230.000 \times g$ em um rotor Hitachi RPST. As frações do gradiente foram coletadas e analisadas como descritas no item 3.16.1.

3.17. IMUNOPRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA TcYchF PARA DETECÇÃO DE COMPLEXOS PROTÉICOS

O soro de coelho contra a TcYchF foi diluído 1:50 em 250 µl de TMK e misturado com 50µl da resina proteína A-sepharose (SIGMA) previamente equilibrada com 500 µl de tampão TMK, por 1 hora sob agitação na câmara fria (4 °C). A proteína A tem a capacidade de se ligar preferencialmente a anticorpos da

classe IgG de alguns mamíferos. Após a incubação para a ligação de anticorpos, a resina foi coletada por centrifugação a $700 \times g$ a 4°C e lavada com 1 ml de TMK gelado, contendo inibidores de protease (Roche). A lavagem foi repetida por mais duas vezes nas mesmas condições. A resina foi então incubada com extrato citoplasmático obtido a partir de 5×10^8 epimastigotas de *T. cruzi* sob agitação por 2 horas a 4°C .

Os complexos imunoprecipitados foram coletados por centrifugação a $3.000 \times g$ por 2 min a 4°C e lavados cinco vezes com o tampão TMK, suplementado com Triton-X100 a 1%. A resina foi então ressuspensa em 75 μl de TMK e 25 μl de tampão de amostra para proteína 4X.

Alíquotas (2 a 8 μl) foram fracionadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anti-soro de camundongo dirigido contra a TcYchF (1:1000), anti-soro de camundongo contra a proteína S7 (1:250) da subunidade ribossomal 40S do *T. cruzi*, anti-soro de camundongo contra a proteína L26 (1:250) da subunidade ribossomal 60S do *T. cruzi*, anti-soros de camundongo contra a proteína RPN7 da subunidade 19S do proteassomo de *T. cruzi* (1:250) e anti-soro de camundongo contra a proteína RPN10 da subunidade 19S do proteassomo do *T. cruzi* (1:250).

3.18. ENSAIO REVERSO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO (CONTROLE)

Os soros produzidos contra as proteínas S7 e L26 das subunidades ribossomais e contra as proteínas RPN 7 e RPN 10 da subunidade não catalítica 19S do proteassomo, foram utilizados para imunoprecipitar estas proteínas de extratos citoplasmáticos de *T. cruzi*. O procedimento foi o mesmo do ensaio descrito no item 3.17, substituindo a resina de proteína A-Sepharose pela resina de proteína G-Sepharose (SIGMA), que tem mais afinidade do que a proteína A pelos anticorpos da classe IgG de camundongo. O material imunoprecipitado foi analisado por “western blotting” com o anti-soro de coelho dirigido contra a TcYchF (1:2000).

3.19. SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE TbYchF.

3.19.1. Amplificação dos fragmentos gênicos

Os ensaios de RNA de interferência foram feitos em *Trypanosoma brucei*, cepa 29-13. Um fragmento de 400 pb a partir da porção 3' do do gene TbYchF foi amplificado por PCR usando como molde o DNA total destes parasitas (100 ng/reação), 10 pmol dos “primers” SFTbYchFF (5' - GGGGGA TCCGGATCGACAAGCATACC - 3') e SFTbYchFR (5'- CCGAAGCTTT CACCGTCCCTTACCTCATAGTT - 3'), dNTPs 200 µM, de MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi aquecida por 4 min a 94 °C, e então submetida a 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min.

Os “primers” utilizados apresentam sítio para enzima de restrição *Bam*HI (F) e *Hind*III (R). Os produtos de PCR foram purificados com fenol-clorofórmio e digeridos com as referentes enzimas.

3.19.2. Clonagem da porção carboxi-terminal do gene *TbYchF* e transfecção do *T. brucei*

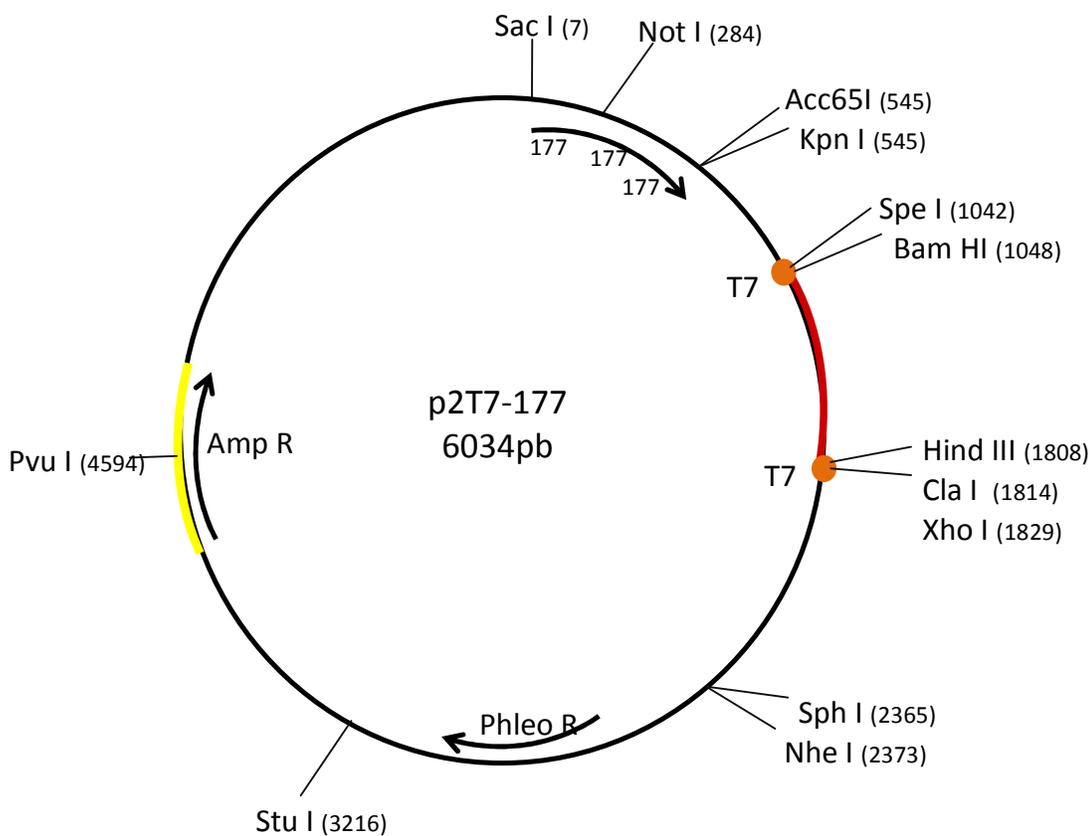
O fragmento amplificado foi clonado no vetor p2T7-177 (cedido gentilmente pela Dra. Noreen Williams da Universidade Estadual de Nova Iorque em Búffalo, EUA). Este vetor, quando transfetado no parasita, integra-se aos micromossomos do *T. brucei*, região de repetições 177 (Foldynova-Trantirkova e cols., 2005). As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia segundo condições descritas no item 3.19.1.

Os plasmídeos foram purificados pelo kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Após purificação, aproximadamente 20 µg dos plasmídeos foram linearizados com a enzima *Not*I (Amersham), conforme descrito pelo fabricante. O DNA foi precipitado e ressuspenso em 50 µl de meio de eletroporação ZPFM para transfecção do *T. brucei*.

Para cada transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^7$ parasitas/ml foram necessários. Os parasitas foram obtidos por centrifugação (5.000 x g por 10 min A 4 °C) lavados em meio ZPFM e ressuspenso em 500 µl do mesmo meio. A transfecção

foi feita em cubetas de eletroporação (4 mm), usando o eletroporador da BioRad (GenePulser II Electroporator). As condições utilizadas foram dois pulsos de 1.600 V e 25 μ F. Os parasitas foram então transferidos para garrafas contendo meio SDM-79, SFB 10 %, higromicina 50 μ g/ml e geneticina 15 μ g/ml.

Figura 3.1: Mapa do vetor p2T7-177-*Tbychf*



177: região de integração do vetor aos minicromossomos; T7prom: sítios promotores da polimerase;
Phleo: seqüência do gene para resistência à fleomicina.

3.19.3. Seleção e clonagem dos parasitas

A seleção foi feita através da adição de fleomicina 5 µg/ml, após 24 horas de cultivo. Aqueles parasitas que incorporaram o plasmídeo foram clonados por meio de diluição seriada em placas de 24 poços (Falcon). As placas foram incubadas a 28 °C. O tempo para seleção foi entre duas e três semanas. Decorrido esse período, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura com meio SDM-79 acrescido dos antibióticos higromicina 50 µg/ml, geneticina 15 µg/ml e fleomicina 5 µg/ml. Um dos clones foi selecionado para os experimentos de RNA de interferência.

3.19.4. Indução do RNA dupla fita

A indução da expressão de RNA dupla fita referente a porção do gene *TbYchF* clonado no plasmídeo p2T7-177 deu-se pela adição de tetraciclina 2 µg/ml a uma cultura transfectada de *T. brucei* em fase de crescimento exponencial (~2 x 10⁶ parasitas/ml). Nos dias que se seguiram, 1 µg/ml de tetraciclina foi adicionada diariamente às culturas.

A observação dos efeitos na curva de crescimento causada por RNAi em *T. brucei*, foi realizada ao longo de uma semana com a contagem de células e adição diária de tetraciclina 1µg/ml.

3.20. ENSAIOS DE ATIVIDADE ATPase e GTPase.

A capacidade da proteína TcYchF em hidrolisar ATP e GTP foi medida por um ensaio colorimétrico capaz de determinar a presença de fósforo inorgânico (Pi) livre na amostra (Lanzetta *et al.*, 1979; Hoenig *et al.*, 1989 e Yim *et al.*, 2003).

Para este ensaio foi utilizada a proteína recombinante TcYchF fusionada à GST. A proteína purificada (4µM) foi incubada em tampão de ligação (o mesmo onde a proteína recombinante foi dialisada, livre de fosfato) com concentrações crescentes (2,5–50 mM) de ATP ou GTP (Sigma), em um volume final de 50 µl. Estas amostras foram aplicadas em placas de ELISA com o fundo plano e mantidas a 30 °C durante 60 minutos. Os ensaios foram feitos em triplicata para cada nucleotídeo.

As reações de hidrólise foram interrompidas pela adição de 200 μ l de reagente verde malaquita preparado no mesmo dia. Após dois minutos à temperatura ambiente, 25 μ l de citrato de sódio (34%) foram adicionados para interromper a reação de ligação do reagente ao Pi livre presente na amostra.

As amostras foram lidas nos 15 minutos subseqüentes, pelo leitor de placas Star Fax -2100 Awareness usando um filtro de 630 nm.

Amostras controle foram feitas usando-se as correspondentes concentrações de cada nucleotídeo em tampão de ligação (50 μ l), mantidos durante o mesmo período em incubação e submetidos ao reagente verde malaquita e ao citrato de sódio nas mesmas condições do experimento. Para avaliar as quantidades de Pi liberado enzimaticamente, as amostras foram comparadas a uma curva padrão preparada com diluições seriadas de uma solução estoque de 500 μ M KH_2PO_4 , que correspondiam de 0 a 5 nmol de fosfato inorgânico. Para determinar os valores de V_{max} e K_m , os dados foram submetidos à equação de Michaelis-Menten (GraphPad Prism versão 3.00 para Windows; GraphPad Software, Inc.).

3.21. ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR ELETRONSPRAY

A análise do perfil protéico obtido nos ensaios de imunoprecipitação realizados com a TcYchF e com a proteína ribossomal S7 foi feita em colaboração com o Dr. Gregory Buck da Virginia Commonwealth University (VCU) em Richmond, EUA.

O conteúdo protéico ligado à resina foi eluído com 150 μ L de glicina (0,2 M pH 2,5) e após a eluição o pH desta solução foi ajustado para 7,5 – 8,0. Após esta etapa, foram adicionados 150 μ L de tampão para proteômica e inibidores de proteases (Amershan) à amostra e o conteúdo protéico foi dosado em fluorímetro. As amostras foram estocadas à -80 °C e enviadas para a análise por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta resolução.

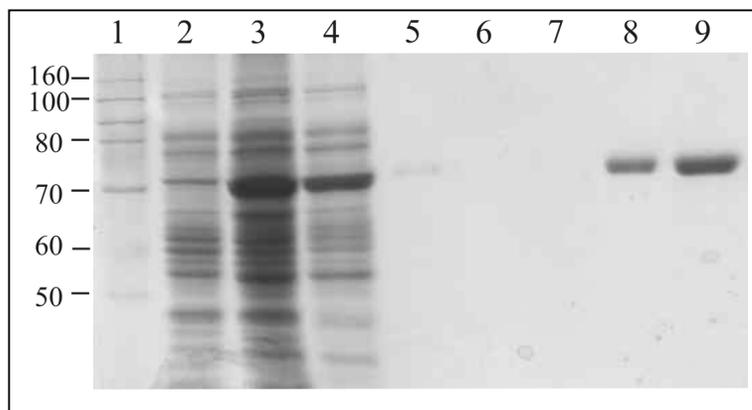
4. RESULTADOS

4.1. CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA TcYchF:

Através do sequenciamento de ESTs de *T. cruzi* e análises de BlastX, fomos capazes de identificar um clone de cDNA contendo um fragmento de DNA (0,7 kB) que codifica um domínio de uma proteína hipotética de ligação à guanina (YchF). A proteína foi então denominada TcYchF. O cDNA completo do gene da TcYchF (GenBank número de acesso AY178827) foi obtido por PCR do lisado da biblioteca de cDNA de *T. cruzi* no fago λ gt11. O gene *tychf* apresenta uma região codante de 1185 pb e codifica uma proteína de 44,3 kDa, assumindo que o primeiro ATG após a sequência do mini-éxon seja usada na iniciação da tradução. O sequenciamento de um clone contendo a extremidade 5' do cDNA da TcYchF mostrou que a sequência do mini-éxon está localizada 35 nucleotídeos a montante do primeiro códon de iniciação, definindo assim a região 5' não traduzida do transcrito. O sítio de poliadenilação foi determinado por PCR do lisado da biblioteca de cDNA do *T. cruzi*, usando um iniciador interno da ORF do TcYchF e um iniciador oligo-dT. O produto da PCR foi sequenciado e o sítio 3' de poliadenilação identificado a 62 nucleotídeos a jusante do códon de parada. Estes dados são consistentes com os resultados de northern blot que mostram um transcrito de 1,3 kb. Análises de "Southern blot" indicam que o gene *tychf* está presente em cópia única no genoma de *T. cruzi* Dm28c (Rau, 2004).

O gene *tychf* foi inserido no vetor de expressão bacteriano pGEXB (fusão com o gene que codifica a enzima glutathione-S-transferase, GST) e, após transformação bacteriana e indução com IPTG, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de glutathione-sepharose (Figura 4.1). A fusão da TcYchF (44,3 kDa) com a GST (26 kDa) gera uma proteína de cerca de 70 kDa.

Figura 4.1: Purificação da proteína TcYchF através de cromatografia por afinidade com glutathiona-sepharose.



1: Marcador, 2: cultura não induzida, 3: fração solúvel obtida após sonicação de cultura induzida com IPTG, 4: fração do material não ligado à resina após cromatografia, 5-7: frações do lavado, 8 e 9: frações do material eluído com glutathiona reduzida 10 mM.

4.2. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA TcYchF:

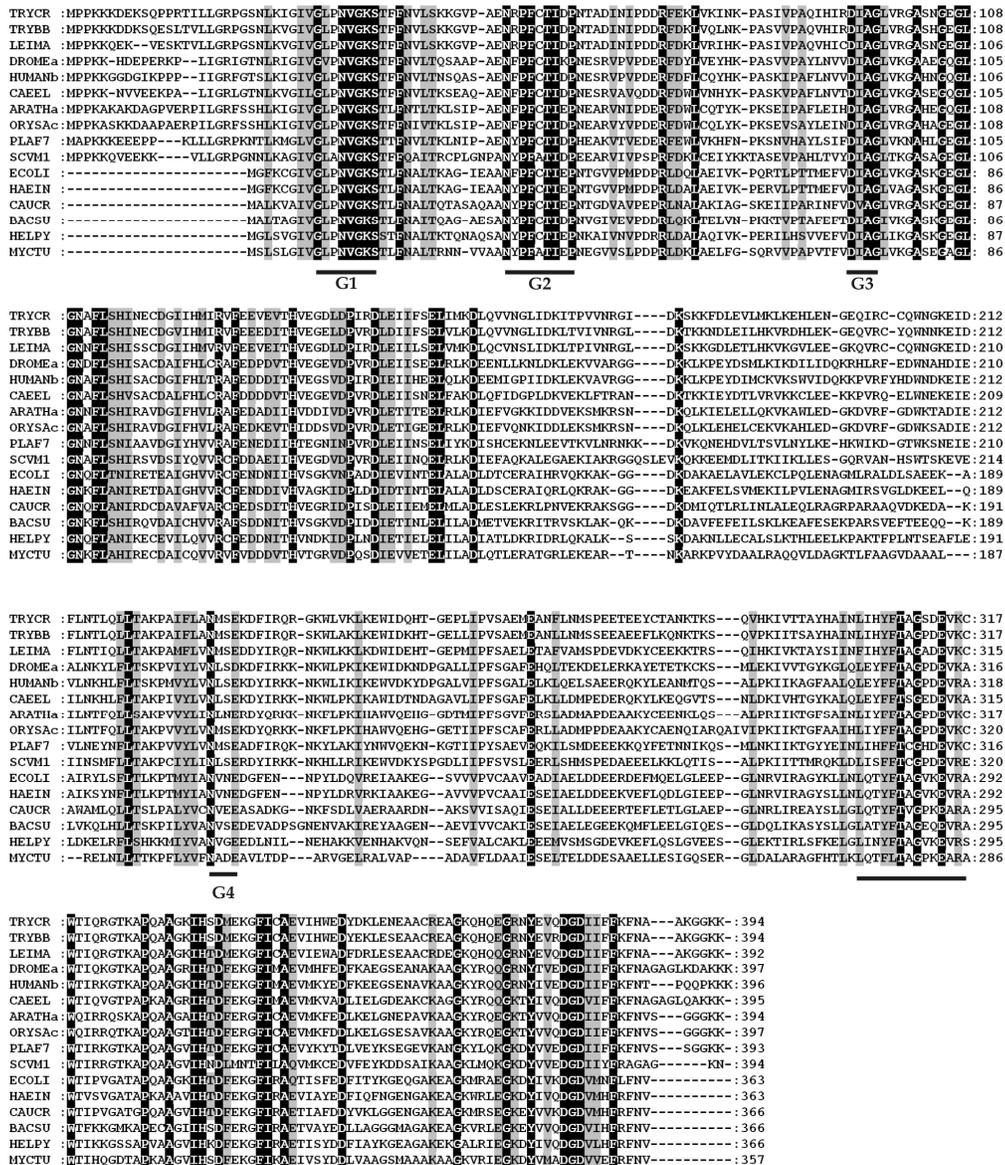
Fazendo buscas em bancos de dados de sequências, encontramos que a TcYchF é bastante similar (45% a 86% de similaridade) à outras proteínas de ligação à GTP hipotéticas de eucariotos, incluindo algumas espécies de tripanossomatídeos (*Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*). A sequência de aminoácidos da TcYchF também mostra similaridade significativa (38% a 46%) com GTPases bacterianas (Figura 4.2). Características importantes das GTPases da família Obg foram encontradas na TcYchF. Estas características incluem o domínio G1 (³¹GLPNVGKS³⁸) e a presença de um motivo rico em glicina (¹⁰¹GASNGEGLGNAFL¹¹³) situado após o motivo denominado Walker B (⁹⁴DIAG⁹⁷). No entanto, o motivo altamente conservado contendo o resíduo de treonina do domínio G2 (domínio efetor) da TcYchF (⁵³NXPXXTIXP⁶¹) e outros ortólogos eucarióticos diferem consideravelmente daquele na proteína YchF bacteriana (YXFXTX₅G) (Leipe, 2002). O motivo efetor e o domínio Walker B revelam uma mudança conformacional na hidrólise de GTP e ambos são responsáveis por interações com proteínas efetoras (Sprang, 1997). A

especificidade das proteínas G pelo nucleotídeo guanina é determinada pelo motivo conservado NKXD, também conhecido como G4 (Bourne, 1991). A proteína bacteriana YchF não apresenta o resíduo de lisina desta seqüência e mostra a substituição do aspartato por um resíduo de glutamato (Leipe, 2002), levantando questões sobre a especificidade da YchF à guanina.

A estrutura tridimensional da YchF de *H. influenzae* (HiYchF) foi determinada a uma resolução de 2.4-Å e indicou que a arquitetura do sítio de ligação à guanina (motivo G4) da YchF não era usual em relação à outras GTPases. Na proteína HiYchF, o motivo canônico G4 (NKXD) é substituído pelo motivo ²⁰⁷NVNE²¹⁰, onde os resíduos asn207 e glu210 são invariantes em relação à outras GTPases (Teplyakov, 2003). Similarmente, a TcYchF não apresenta o motivo canônico G4. O alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de TcYchF e HiYchF sugere que o motivo G4 da TcYchF parece ser o ²³⁰NMSE²³³ (Figura 4.2).

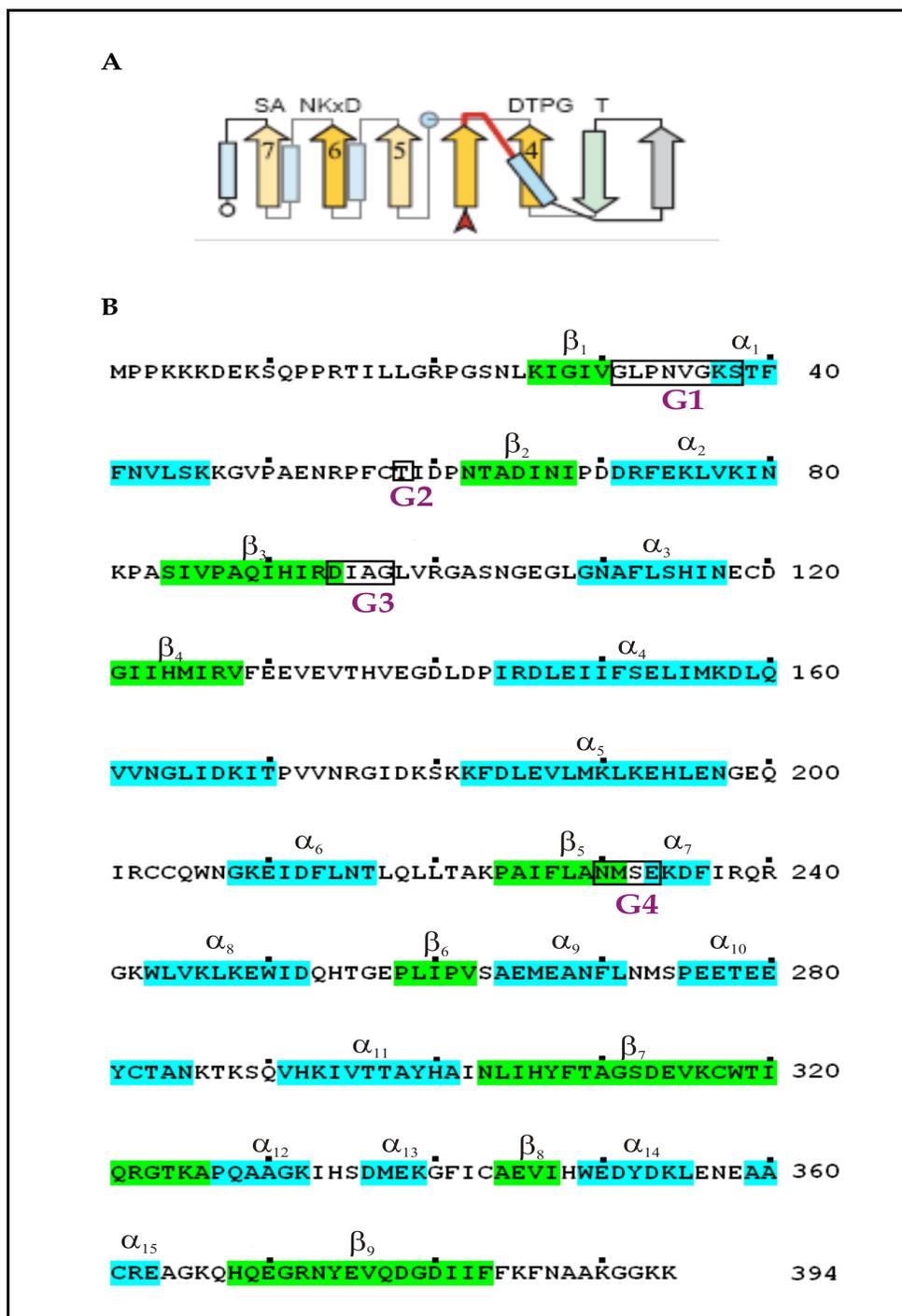
Além da conservação de seqüência, o arranjo das estruturas secundárias (α -hélice e fitas β) mostra que a TcYchF apresenta a estrutura característica das P-loop NTPases. Isto pode ser visto quando se compara a organização das estruturas secundárias das proteínas da classe TRAFAC (Era) com as estruturas da TcYchF (Figura 4.3).

Figura 4.2: Comparação das seqüências da TcYchF com GTPases relacionadas de bactérias e eucariotos.



Resíduos idênticos são representados em preto e resíduos conservados em todas as seqüências estão marcados em cinza. Os domínios conservados de ligação ao nucleotídeo, ao magnésio e ao RNA estão assinalados (G1 a G4 e domínio "TGS-like"). As seqüências usadas no alinhamento foram de: *Escherichia coli* (ECOLI NP_309735.1), *Haemophilus influenzae* (HAEIN ZP_00156230.2), *Caulobacter crescentus* (CAUCR NP_419298.1), *Bacillus subtilis* (BACSU NP_391972.1), *Helicobacter pylori* (HELPI NP_223234.1), *Mycobacterium tuberculosis* (MYCTU NP_215628.1), *Arabidopsis thaliana* (ARATH NP_174346.1), *Oryza sativa* (ORYSAC NP_001061206.1), *Plasmodium falciparum* (PLAF7 NP_704155.1), *Trypanosoma cruzi* (TRYCR AAO26205.1), *Trypanosoma brucei* (TRYBB XP_951682.1), *Leishmania major* (LEIMA XP_848192.1), *Drosophila melanogaster* (DROMEa NP_572580.1), *Homo sapiens* (HUMANb ENSP00000352986), *Caenorhabditis elegans* (CAEEL NP_493349.1), *Saccharomyces cerevisiae* (SCVM1 NP_009581.1).

Figura 4.3: Comparação entre a organização do domínio G de uma GTPase da classe TRAFAC com as estruturas secundárias da TcYchF

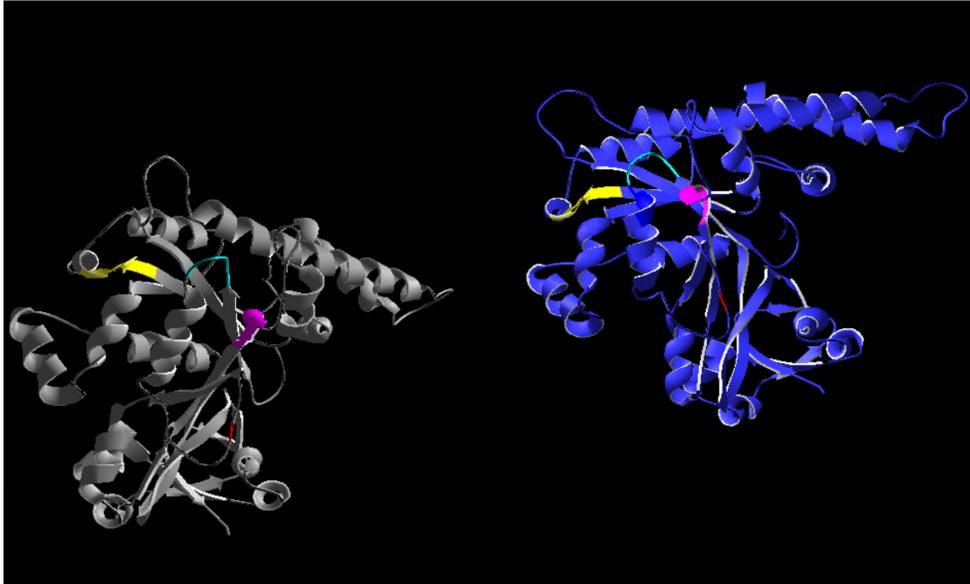


Em A: Modelo esquemático do domínio G da GTPase Era de *Thermus aquaticus*. Fitas são mostradas como setas com a ponta na direção C-terminal e numeradas de 1 a 7. Fitas 1, 4 e 7 que apresentam os motivos conservados GxxxGK[ST] (Walker A), DxxG (Walker B), e[NT]KxD são anotadas em laranja. As demais fitas, presumivelmente ausentes no domínio GTP ancestral estão em cinza. Hélices são mostradas em retângulos azuis. O P-loop é mostrado como uma linha vermelha, uma seta vermelha marca o N terminal do domínio GTPase e o C terminal é mostrado como um anel. Sequências altamente conservadas são mostradas acima ou abaixo de sua respectiva fita com a família consenso. Modificado de Leipe *et al*, 2002. Em B: Sequência aminoacídica de TcYchF. As regiões correspondentes às estruturas em alfa-hélice e folhas-beta estão representadas em azul e verde, respectivamente. As regiões assinaladas com uma moldura correspondem aos domínios G1 a G4 como anotados em roxo.

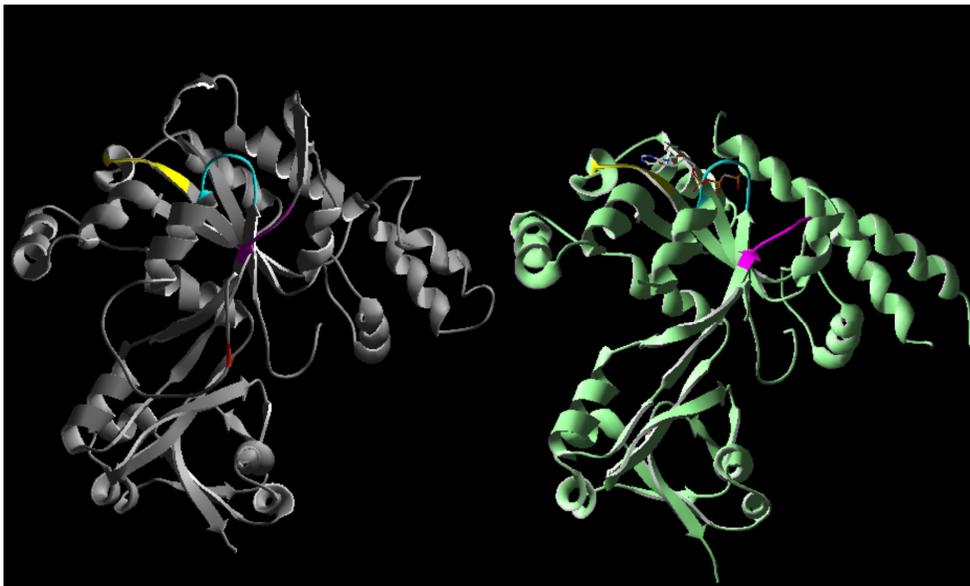
A estrutura cristalográfica de ortólogos da TcYchF em *Schizosaccharomyces pombe* (PDB - 1NI34) e em humanos (PDB - 2OHFA) foi determinada. Devido a grande similaridade da TcYchF com esses dois ortólogos foi possível fazer a modelagem da estrutura tridimensional da TcYchF. Observa-se na figura 4.4 (principalmente na figura 4.4.b) a disposição das fitas β ocupando a região central da proteína, bem como a disposição característica dos três elementos mais conservados do domínio G. Essa modelagem será importante para avaliarmos quais as possíveis mutações nos motivos conservados que alteram significativamente a estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente, a sua atividade. Além disso, poderemos também avaliar quais as melhores modificações na proteína para a construir sistemas para a expressão de mutantes negativos dominantes em *T. cruzi.*, a fim de verificar o papel dessa proteína na maquinaria de tradução e dimensionar sua importância para a multiplicação e diferenciação do parasita.

Figura 4.4: Modelagem da TcYchF comparada com seu ortólogo em *S. pombe* e em *Homo sapiens*

A



B



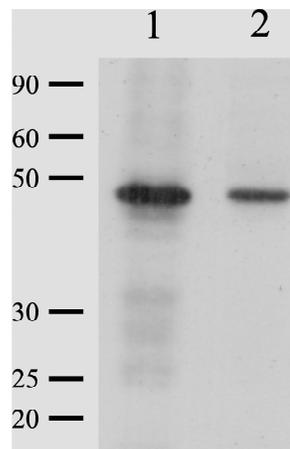
A: Em cinza está representada a TcYchF e em azul o ortólogo em *S. pombe*. Domínios P-loop (G1) em azul, o DIAG (G2) em magenta, a tirosina conservada (G3) em vermelho e o NMSE (G4) em amarelo.

B: Em cinza está representada a TcYchF e em verde o ortólogo em humano. Os domínios estão assinalados como na figura A.

4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA TcYchF POR “WESTERN BLOT”:

Anti-soro gerado contra a TcYchF recombinante foi usado para a detecção da proteína em extratos celulares de *T. cruzi*. Um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 45 kDa foi detectado por “western blot” em extratos de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.5), indicando que *tychf* não é um gene estágio-específico e que seu produto pode ser necessário ao menos durante estes estágios do ciclo de vida do parasita, mesmo que em concentrações diferentes.

Figura 4.5: Análise da expressão da TcYchF



1: Epimastigotas, 2: Tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*. A membrana foi incubada com anti-soro policlonal produzido contra a TcYchF recombinante em coelho (diluição 1: 1.000).

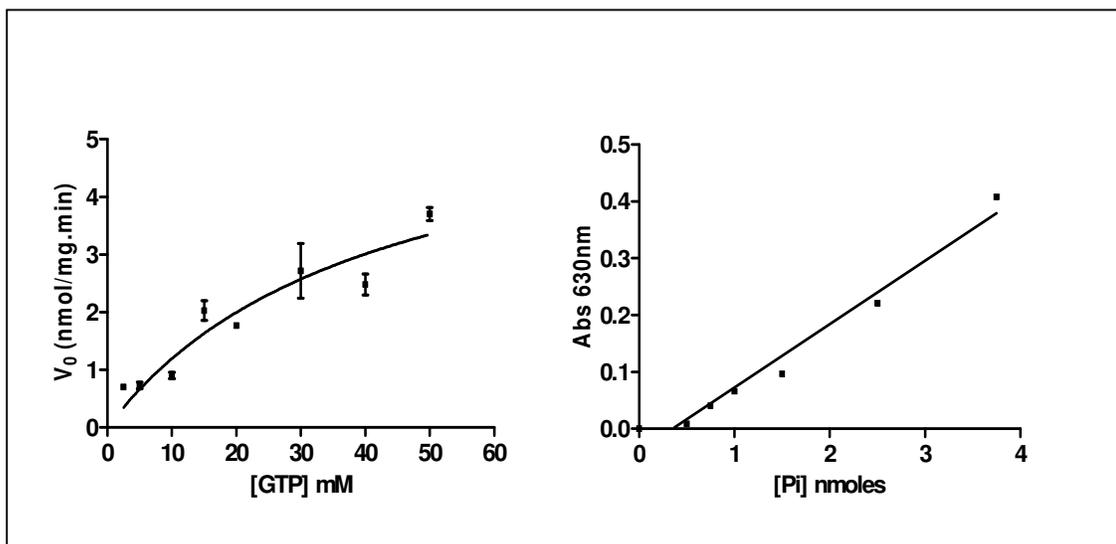
4.4. ATIVIDADE GTPase DA TcYchF:

Com base nos dados que mostravam a presença de motivos conservados indicativos de uma função GTPase na TcYchF, investigamos a capacidade desta proteína de hidrolisar a GTP. Para tanto, a proteína recombinante TcYchF fusionada à GST foi purificada (Fig 4.1) e analisada em ensaio de liberação de fosfato inorgânico gerado pela hidrólise do nucleotídeo. Observa-se que, de fato, com o aumento de concentração de GTP *in vitro* vê-se um crescente na curva indicativa da formação do produto, determinado pela concentração de fosfato inorgânico na amostra (figura 4.6A). Para avaliar as quantidades de Pi liberado, as amostras foram comparadas a

uma curva padrão preparada com diluições seriadas de uma solução de KH_2PO_4 , que variavam de 0 a 5 nmol de fosfato inorgânico (4.6.B).

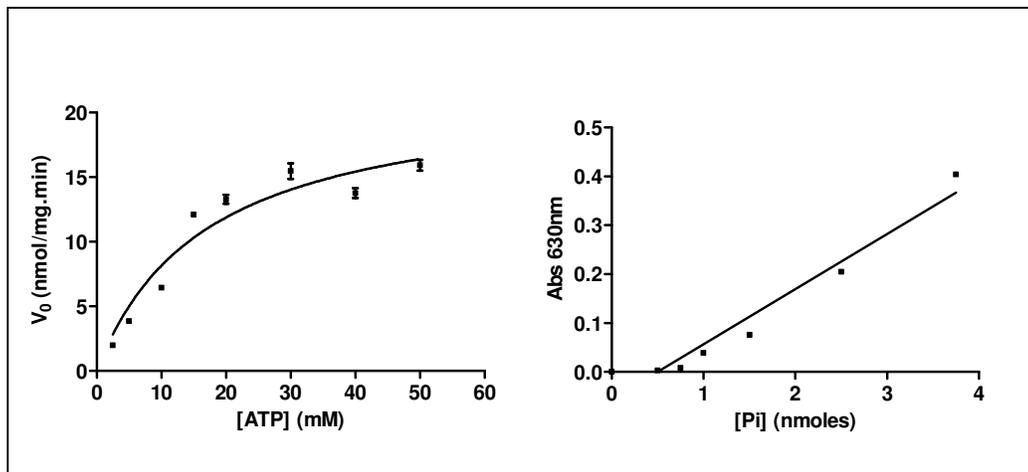
Em um trabalho recente, (Koller-Eichhorn *et al*, 2007), foi mostrado que dois homólogos eucarióticos da YchF (em humanos e levedura) e a YchF de *H. influenzae* (HiYchF) são capazes de hidrolizar preferencialmente ATP em relação à GTP, sugerindo que essas proteínas sejam de fato ligadoras de ATP mais do que GTP. Elas foram descritas como **Obg-like ATPases 1 (OLA1)**. Em um ensaio que seguiu os mesmos parâmetros usados para avaliar a capacidade de hidrólise de GTP, testamos a atividade ATPásica da TcYchF (Fig: 4.7.A) comparada a uma curva-padrão (Fig: 4.7.B). Apesar da taxa de hidrólise e de afinidade da TcYchF recombinante a ambos nucleotídeos ter sido baixa, a proteína foi capaz de hidrolizar ATP ($V_{\text{max}} = 22 \pm 1.8$ nmol/mg.min and $K_m = 17 \pm 3,4$ mM) com mais eficiência em relação à GTP ($V_{\text{max}} = 6,1 \pm 1.3$ nmol/mg.min and $K_m = 41,1 \pm 16$ mM) (Fig. 4.8), assim como seus ortólogos em bactéria, levedura e humanos (Koller-Eichhorn *et al*, 2007) sugerindo que esta propriedade seja talvez uma característica desta subfamília de Obg-like ATPases.

Figura 4.6: Avaliação da atividade GTPase “*in vitro*” da GST-TcYchF

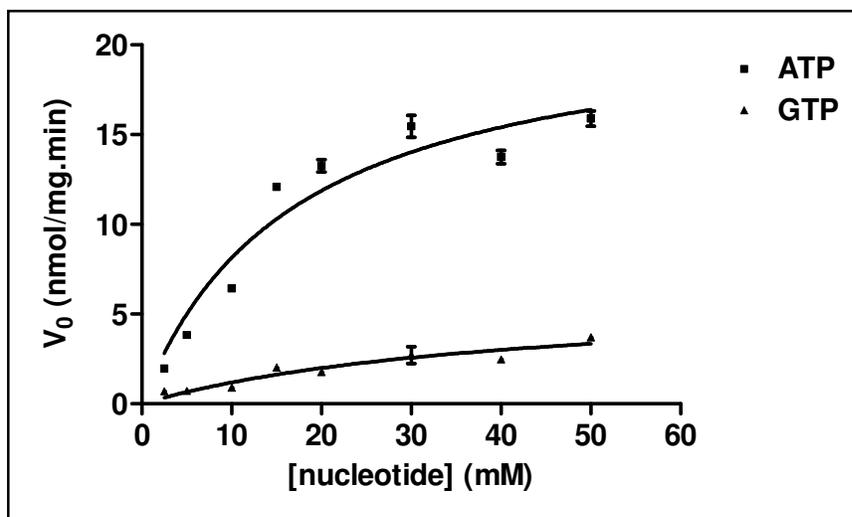


A: A proteína recombinante TcYchF-GST (4 μM) foi incubada com concentrações crescentes de GTP durante uma hora a 30 °C. B: diluições seriadas de uma solução de KH_2PO_4 de 0 a 5 nmol de fosfato inorgânico A quantidade de fosfato inorgânico na amostra foi quantificada através de um ensaio colorimétrico (verde-malaquita).

Figura 4.7: Avaliação da atividade ATPase "in vitro" da GST-TcYchF



A: A proteína recombinante TcYchF-GST (4 μ M) foi incubada com concentrações crescentes de ATP durante uma hora a 30 °C. B: diluições seriadas de uma solução de KH_2PO_4 de 0 a 5 nmol de fosfato inorgânico. A quantidade de fosfato inorgânico na amostra foi quantificada através de um ensaio colorimétrico (verde-malaquita).

Figura 4.8: Comparação da atividade ATPase e GTPase *in vitro* da TcYchF-GST.

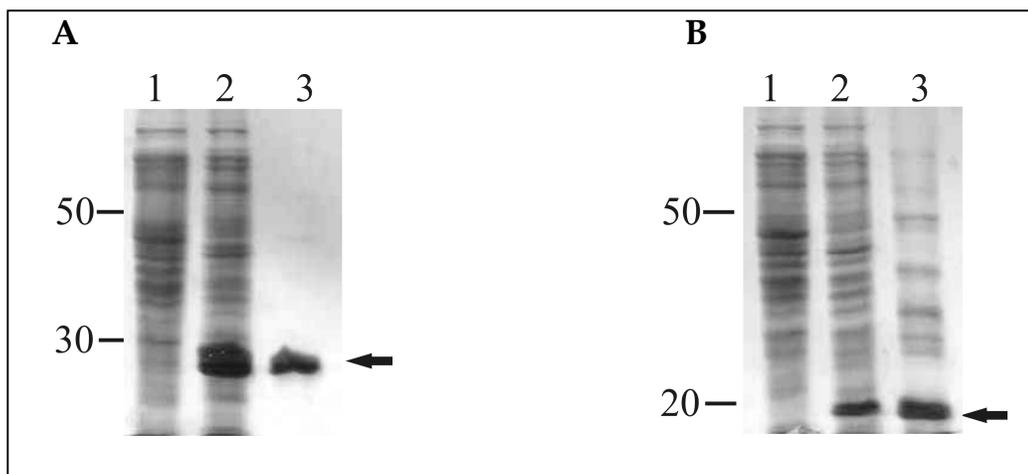
A proteína recombinante TcYchF-GST (4 μ M) foi incubada com concentrações crescentes de GTP (\blacktriangle) ou ATP (\blacksquare), durante uma hora a 30 °C. A quantidade de fosfato inorgânico liberado foi quantificada através de um ensaio colorimétrico (verde-malaquita).

4.5. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL DAS PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS S7 E L26:

Os genes TcS7 e TcL26 foram expressos em *E. coli*, a partir da clonagem no vetor de expressão pQE30. As proteínas recombinantes foram purificadas e utilizadas para a obtenção anticorpo policlonal específico para posterior estudo de interação proteína-proteína.

Como a proteína encontrava-se na forma de corpúsculos de inclusão, a opção escolhida foi a de purificação dos corpúsculos e posterior eletroeluição. Por meio dessa metodologia foi possível obter quantidade suficiente das proteínas purificadas (Figura 4.9) para imunização de camundongos para produção de anticorpos policlonais específicos contra as proteínas recombinantes (Figura 4.13).

Figura 4.9.: Expressão e purificação das proteínas ribossomais S7 e L26



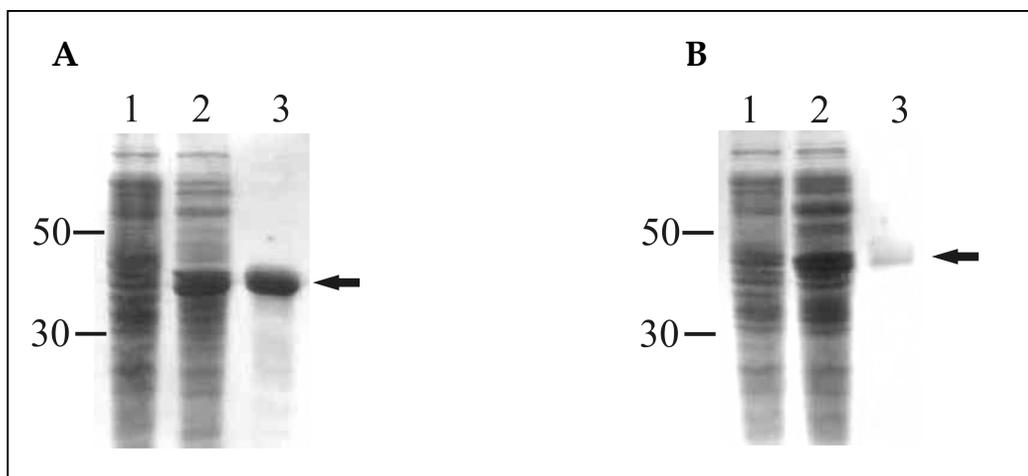
Purificação das proteínas recombinantes. SDS-PAGE 13% contendo extrato da cultura não induzida (1A e 1B), induzido com IPTG 1 mM (2A e 2B) e as proteína purificadas S7 (3A) e L26 (3B) por gel preparativo e eletroeluição.

4.6. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL DOS GENES RPN7 E RPN10 DA SUBUNIDADE REGULATÓRIA 19S DO PROTEASSOMO.:

Os genes TcRPN7 e TcRPN10 foram expressos em *E. coli*, a partir da clonagem no vetor de expressão pQE30. As proteínas recombinantes foram purificadas e utilizadas para a obtenção anticorpo policlonal específico para posterior estudo de interação proteína-proteína.

Os procedimentos para purificação destas proteínas foram os mesmos aplicados à S7 e L26. Foi possível assim, obter quantidade suficiente das proteínas purificadas (Figura 4.10) para imunização de camundongos para produção de anticorpos policlonais específicos contra as proteínas recombinantes (Figura 4.15).

Figura 4.10: Expressão e purificação das proteínas RPN7 e RPN10 do proteassomo.



Purificação das proteínas recombinantes. SDS-PAGE 13% contendo extrato da cultura não induzida (1A e 1B), induzido com IPTG 1 mM (2A e 2B) e as proteínas purificadas RPN7 (3A) e RPN10 (3B) por gel preparativo e eletroeluição.

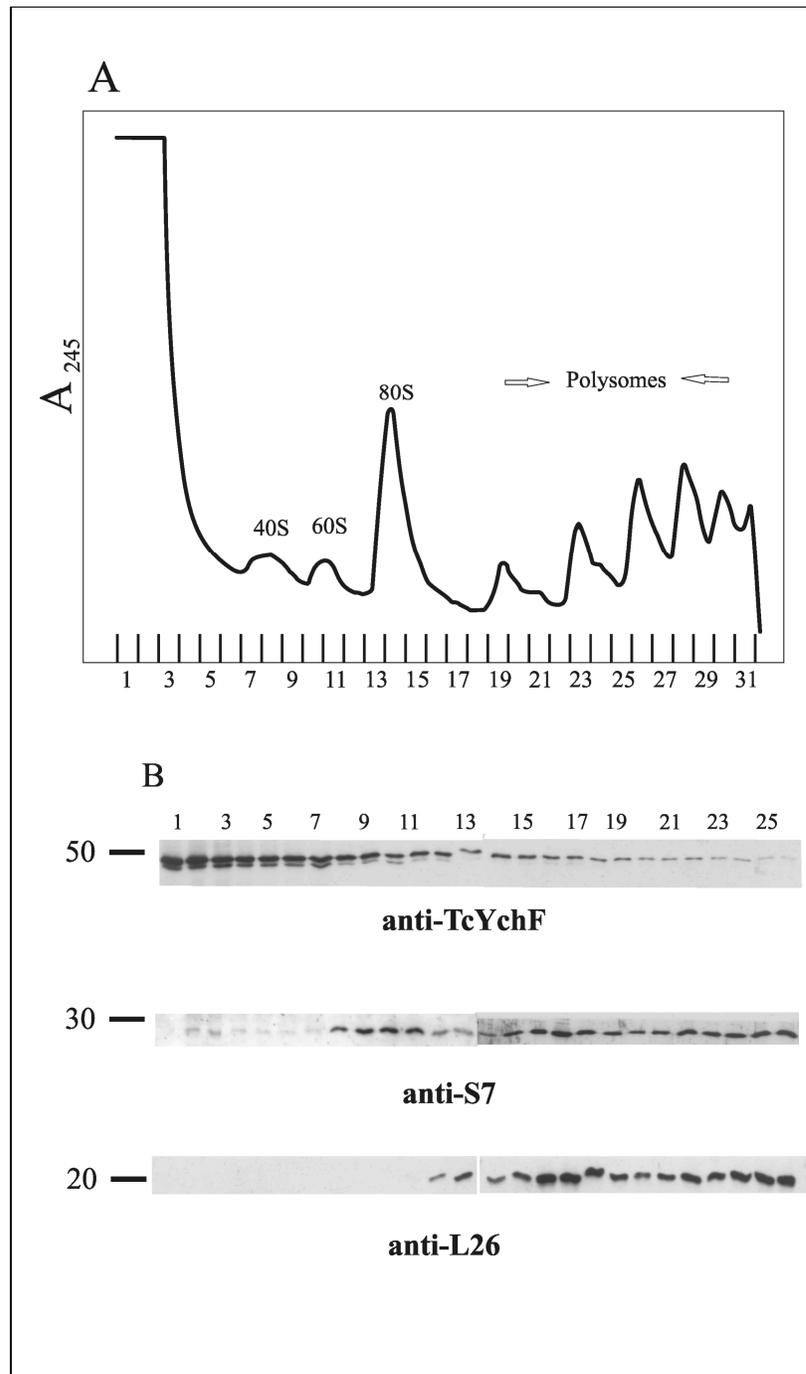
4.7. TcYchF CO-SEDIMENTA COM AMBAS SUBUNIDADES RIBOSSOMAIS E POLISSOMOS

GTPases das famílias Era e Obg estão associadas com ribossomos em bactérias (Meier, 2000; Scott, 2000; Wout, 2004), mas seu papel preciso na célula ainda não está claro. Recentemente mostrou-se que uma GTPase eucariótica denominada NOG1, da família das Obg é necessária para a biogênese da subunidade ribossomal 60S tanto em levedura (Kallstrom, 2003) quanto em *T. brucei* (Jensen, 2003).

Decidimos então investigar as possíveis interações da TcYchF com as subunidades ribossomais de *T. cruzi*. O perfil polissomal foi obtido por fracionamento do lisado celular de *T. cruzi* em gradiente de sacarose (Figura 4.11 A) e as frações obtidas foram analisadas por “immunoblotting”. A TcYchF foi detectada em todas as frações do gradiente, incluindo as frações correspondentes às subunidades 40S, 60S, 80S e polissomos (Figura 4.11 B), indicando que ela também está associada à maquinaria de tradução.

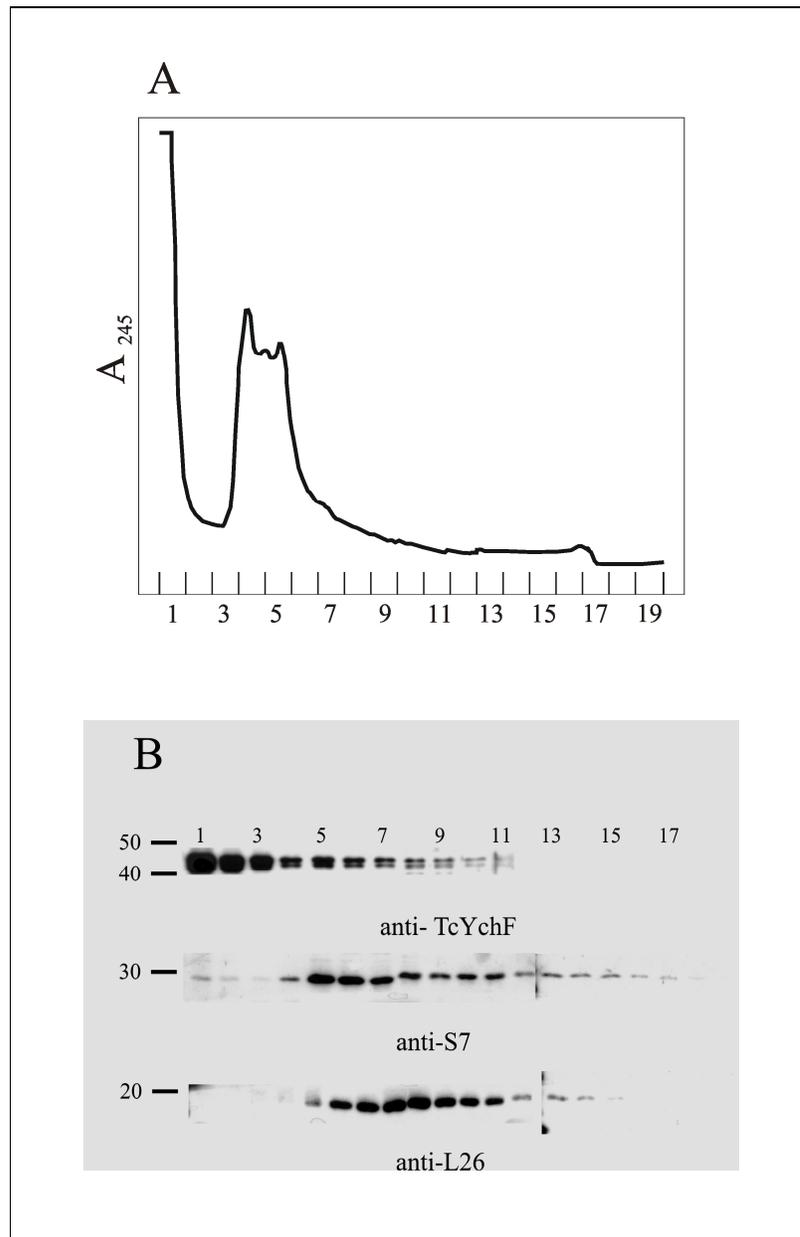
Para avaliar se a TcYchF estava associada aos polissomos ou a outros complexos de alto peso molecular, os lisados citoplasmáticos de *T. cruzi* foram tratados com puromicina antes de serem submetidos à ultra-centrifugação em gradiente de sacarose. Esta droga promove a desassociação dos polissomos permitindo assim verificar se a distribuição da TcYchF no gradiente mantinha-se ou acompanhava a distribuição dos ribossomos desassociados.

Os extratos tratados com puromicina continham muito poucos polissomos comparados aos estratos não tratados (Figura 4.12 A). “Immunoblotting” das frações do gradiente mostraram que a TcYchF foi encontrada apenas nas frações leves, sugerindo assim que a desassociação dos polissomos levou à desassociação da TcYchF (Figura 4.12 B).

Figura 4.11: Perfil polissomal de epimastigotas de *T. cruzi*

(A) O extrato citoplasmático de 1×10^9 epimastigotas foi depositado sobre um gradiente linear de sacarose de 10 a 40% e centrifugado a 4°C por 2,5 horas a $230.000 \times g$. (B) “western blot” das frações do gradiente usando antisoros contra TcYchF (1:1.000), proteínas ribossomais do *T. cruzi* S7 (1:250) e L26 (1:250).

Figura 4.12: Perfil polissomal de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com puromicina



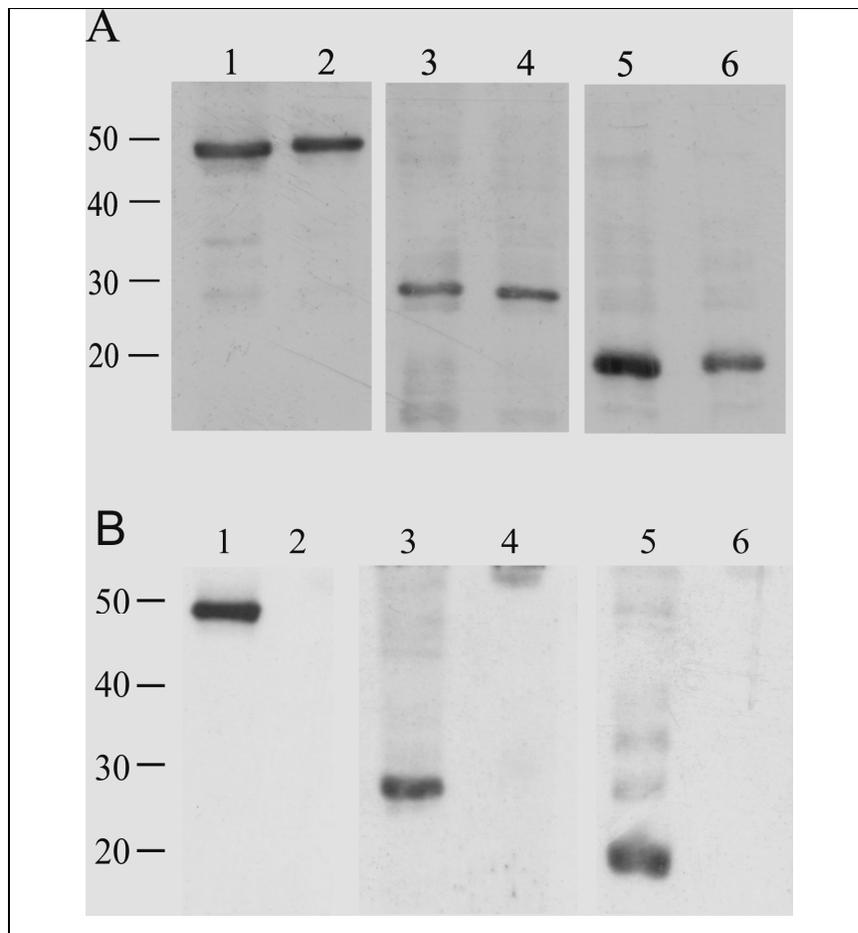
(A) O extrato citoplasmático de 1×10^9 epimastigotas foi depositado sobre um gradiente linear de sacarose de 15% a 55% e centrifugado a 4° por 2,5 horas a $230.000 \times g$. (B) "western blot" das frações do gradiente usando antisoros contra TcYchF (1:1.000), proteínas ribossomais do *T. cruzi* S7 (1:250) e L26 (1:250).

4.8. TcYchF CO-IMUNOPRECIPITA COM PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS:

Com o intuito de se confirmar a associação entre a TcYchF e as subunidades ribossomais, extratos citoplasmáticos de epimastigotass de *T. cruzi* foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação, usando anti-soro contra a TcYchF. Com o material imunoprecipitado foram realizados ensaios de “western blot” com anti-soros contra as proteínas ribossomais da subunidade menor (anti S7) e da subunidade maior (anti L26). Ambas co-precipitaram com a TcYchF (Figura 4.13 A), indicando que a mesma encontra-se associada aos ribossomos. O experimento controle foi realizado nas mesmas condições do ensaio experimental, substituindo-se anti-soro do coelho imunizado, pelo anti-soro deste animal pré-imune, mostrando a ausência de ligação da TcYchF e das proteínas ribossomais de modo inespecífico (Figura 4.13 B).

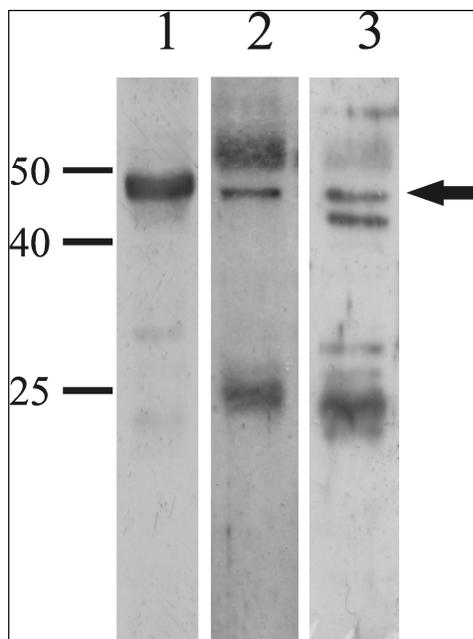
Em um experimento inverso, extratos citoplasmáticos de epimastigotass de *T. cruzi* foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação, usando anti-soros contra as proteínas ribossomais S7 e L26 em experimentos independentes. Com este material foram realizados ensaios de western blot com antisoro contra a TcYchF que co-precipitou com as duas proteínas ribossomais (Figura 4.14), indicando que a interação da TcYchF com as subunidades ribossomais é bastante estável.

Figura 4.13: Imunoprecipitação da TcYchF.



Análise da imunoprecipitação da TcYchF por “western blot”. Resina de proteína A-sepharose foi incubada com soro de coelho Anti-TcYchF (Painel A) ou soro de coelho pré-imune (Painel B) e usada para imunoprecipitar TcYchF a partir de extrato citosólico de *T. cruzi* (5×10^8 células). Alíquotas (equivalente a 5×10^5 células) de extrato celular total de *T. cruzi* (linhas 1, 3 e 5) e do material imunoprecipitado (linhas 2, 4 e 6) foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas com anti-soros de camundongo contra TcYchF (linhas 1 e 2), contra a proteína ribossomal S7 de *T. cruzi* (linhas 3 e 4) e contra proteína ribossomal L26 de *T. cruzi* (linhas 5 e 6).

Figura 4.14: Imunoprecipitação das proteínas ribossomais S7 e L26



Análise da imunoprecipitação das proteínas ribossomais S7 e L26 por “western blot”. Resina de proteína G-sepharose foi incubada com soro de camundongo anti-S7 ou anti-L26 e usada para imunoprecipitar as respectivas proteínas ribossomais a partir de extrato citosólico de *T. cruzi* (5×10^8 células). Uma alíquota (equivalente a 5×10^5 células) do extrato celular total de *T. cruzi* (linha 1) e do material imunoprecipitado com soro anti-S7 (linha 2) e do material imunoprecipitado com soro anti-L26 (linha 3) foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas com anti- soro de coelho contra a TcYchF. A seta indica a proteína TcYchF.

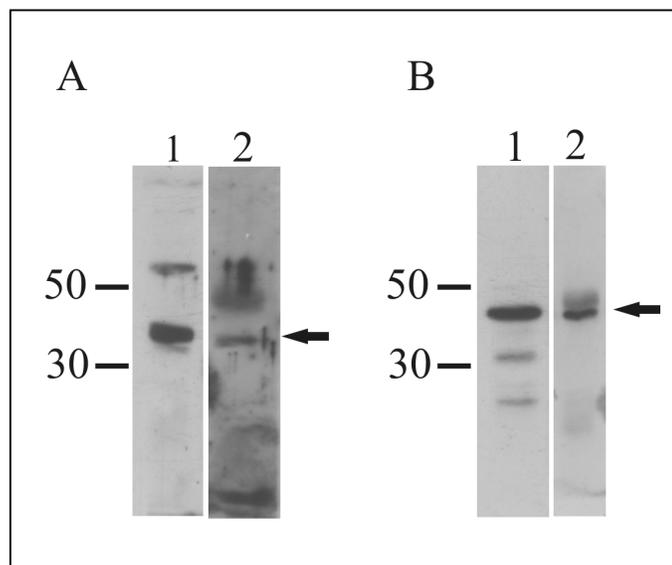
4.9. TcYchF CO-IMUNOPRECIPITA COM PROTEÍNAS DO PROTEASSOMO:

Além da associação com os ribossomos, foi demonstrada a associação do ortólogo da YchF em levedura (YBr025c) com o proteassomo através da purificação de complexos imobilizados *in vivo* e validado através de coimunoprecipitação - TapTag (Guerrero *et al*, 2006). Na tentativa de analisar a ocorrência desta associação

em *T. cruzi*, utilizamos o mesmo procedimento experimental adotado com as proteínas ribossomais na investigação deste evento.

Extratos citoplasmáticos de epimastigotass de *T. cruzi* foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação, usando anti-soro contra a TcYchF. Com o material imunoprecipitado foram realizados ensaios de “western blot” com anti-soros contra as proteínas da subunidade reguladora 19S do proteassomo (anti-RPN 7 e anti-RPN 10). Ambas co-precipitaram com a TcYchF (Figura 4.15), indicando que a mesma encontra-se associada à estas subunidades do proteassomo.

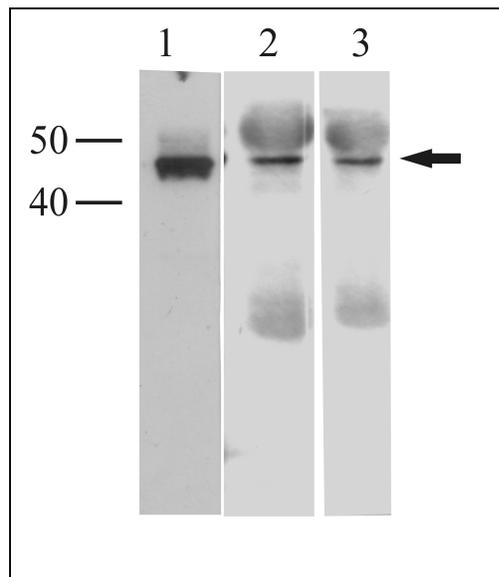
Figura 4.15: Imunoprecipitação da TcYchF.



Análise da imunoprecipitação da TcYchF por “western blot”. Resina de proteína A-sepharose foi incubada com soro de coelho anti-TcYchF e usada para imunoprecipitar TcYchF a partir de extrato citosólico de *T. cruzi* (5×10^8 células). Aliquotas (equivalente a 5×10^5 células) de extrato celular total de *T. cruzi* (Linhas 1A e 1B) e do material imunoprecipitado (linhas 2A e 2B) foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidos com anti-soro de camundongo contra a proteína RPN7 (Painel A) ou com anti-soro de camundongo contra a proteína RPN10 de *T. cruzi* (Painel B). As setas indicam as respectivas proteínas do proteassomo identificadas por Western blot.

No experimento reverso, extratos citoplasmáticos de epimastigotass de *T. cruzi* foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação, usando anti-soros contra as proteínas RPN7 e RPN10 em experimentos independentes. Com este material foram realizados ensaios de western blot com antisoro contra a TcYchF que co-precipitou com as duas proteínas do proteassomo (Figura 4.16), indicando que a interação da TcYchF com estas proteínas é estável.

Figura 4.16: Imunoprecipitação das proteínas RPN7 E RPN10



Análise da imunoprecipitação das proteínas RPN7 e RPN10 do proteassomo de *T. cruzi* por “western blot”. Resina de proteína G-sepharose foi incubada com anti-soro de camundongo contra RPN7 ou contra a RPN10 e usada para imunoprecipitar as respectivas proteínas do proteassomo a partir de extrato citosólico de *T. cruzi* (5×10^8 células). Uma alíquota (equivalente a 5×10^5 células) do extrato celular total de *T. cruzi* (linha 1) e do material imunoprecipitado com soro anti-RPN7 (linha 2) e do material imunoprecipitado com soro anti-RPN10 (linha 3) foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas com anti-soro de coelho contra a TcYchF. A seta indica a proteína TcYchF.

4.10. PROTEÍNAS DETECTADAS POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS DE AMOSTRAS OBTIDAS DE ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO.

Além da observação da presença das proteínas ribossomais S7, L26, RPN7 e RPN10 no material imunoprecipitado com a TcYchF, buscamos detectar que outras proteínas apareciam neste contexto através de análise por espectrometria de massas. As amostras usadas foram do ensaio de imunoprecipitação com o anti-soro contra a TcYchF e com o anti-soro contra a subunidade ribossomal S7 além de um controle com soro pré-imune. Os experimentos foram realizados em duplicata analisados pela equipe do Dr. Gregory Buck da Virginia Commonwealth University (VCU) em Richmond, EUA, através da técnica de espectrometria de massas por ionização por eletron spray. Seguem-se abaixo dados obtidos em ambos nos experimentos (Quadros 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4).

Quadro 4.1: Proteínas detectadas tanto no ensaio de imunoprecipitação da TcYchF quanto da proteína ribossomal S7.

Nº de acesso Gene DB	
Tc00.1047053509541.19	Proteína maior vault, putativa
Tc00.1047053506529.360	Subunidade IV da citocromo C oxidase, putativa.
Tc00.1047053504741.20	Proteína de ligação à GTP, putativa.
Tc00.1047053487507.10	Triparedoxina peroxidase, putativa.
Tc00.1047053511815.40	Proteína hipotética conservada
Tc00.1047053506297.190	Piruvato fosfato dikinase, putativa
Tc00.1047053509683.117	Proteína ribossomal S4 (40S), putativa.
Tc00.1047053504013.11	Proteína ribossomal L13 (60S), putativa.
Tc00.1047053506357.40	Fator de elongação TU, putativa.
Tc00.1047053508349.39	Proteína de ligação ao RNA, putativa.
Tc00.1047053508461.140	Proteína de ligação a poli (A), putativa.
Tc00.1047053506413.20	Proteína ribossomal S33 (40S), putativa.
Tc00.1047053508413.68	Proteína de membrana de kinetoplastídeos KMP-11

Quadro 4.2: Proteínas detectadas apenas no ensaio de imunoprecipitação da TcYchF

Nº. de acesso Gene DB	
Tc00.1047053506469.110	Proteína hipotética
Tc00.1047053508355.250	Proteína ácida ribossomal P0 (P0 60S)
Tc00.1047053506513.40	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053508707.90	Proteína 7 não ATPase da subunidade regulatória do proteassomo, putativa.
Tc00.1047053507975.80	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053511867.140	Proteína acil-transportadora, precursora mitocondrial, putativa.
Tc00.1047053511837.120	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053508153.180	Aspartil aminopeptidase, putativa.
Tc00.1047053511303.60	Fator de iniciação da tradução, putativa.
Tc00.1047053508321.40	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053508175.370	Glutamino sintetase, putativa.
Tc00.1047053510679.40	Proteína hipotética.
Tc00.1047053508473.10	Proteína de “hot spot” de retrotransposon (RHS), putativa.
Tc00.1047053508169.20	Fator de alongação 2, putativa.

Quadro 4.3: Proteínas detectadas apenas no ensaio de imunoprecipitação de S7.

Nº. de acesso Gene DB	
Tc00.1047053511515.40	Proteína heat shock 70 kDa, precursor mitocondrial, putativa.
Tc00.1047053506563.40	Beta-tubulina (putativa).
Tc00.1047053510119.9	Fator de alongação alfa-1 (EF-1-alpha), putativa.
Tc00.1047053507029.30	Proteína heat shock 70 kDa, precursor mitocondrial, putativa.
Tc00.1047053511261.140	Proteína ribossomal 60S L34, putativa.
Tc00.1047053508299.60	Proteína ribossomal 60S L2, putativa.
Tc00.1047053503643.3	Proteína ribossomal 60S L4, putativa.
Tc00.1047053432677.20	Proteína heat shock 70 kDa, precursor mitocondrial, putativa
Tc00.1047053507929.20	Co-chaperona GrpE, putativa.
Tc00.1047053506925.319	Isocitrato desidrogenase, putativa.
Tc00.1047053506801.80	Inibidor da cisteína peptidase; Chagasi.
Tc00.1047053506943.50	Gliceraldeído trifosfato desidrogenase, putativa.
Tc00.1047053455721.9	Citocromo c oxidase subunidade 10, putativa.
Tc00.1047053511389.140	Proteína hipotética conservada.

Tc00.1047053503671.10	Chagasina
Tc00.1047053503781.80	Proteína de ligação à seqüência universal de minicírculo (UMSBP), proteína zinc finger PD.
Tc00.1047053506247.220	Histidina amônia-liase, putativa.
Tc00.1047053411235.9	Alfa tubulina, putativa.
Tc00.1047053506503.160	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053418069.10	Proteína heat shock 70 (HSP70), putativa.
Tc00.1047053509733.170	ATPase transicional de retículo endoplasmático, putativa.
Tc00.1047053508827.40	Acil-CoA desidrogenase, putativa.
Tc00.1047053511139.20	Proteína ribossomal 40S S11, putativa.
Tc00.1047053508595.50	Cisteína peptidase, putativa; catepsina L-like, putativa.
Tc00.1047053506963.10	Proteína ribossomal 60S L10a, putativa.
Tc00.1047053506679.140	Proteína ribossomal 40S S10, putativa.
Tc00.1047053505977.26	Proteína acídica P2 ribossomal 60S, putativa.
Tc00.1047053508263.5	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053510397.10	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053503793.10	Subunidade 2-oxoglutarato desidrogenase, putativa.
Tc00.1047053509167.140	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053503833.50	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053508823.120	Proteína ribossomal S20, putativa.
Tc00.1047053401469.10	Proteína "zinc finger" 2, putativa.
Tc00.1047053505989.82	DNA helicase RuvB-like, putativa.
Tc00.1047053509233.180	Beta subunidade ATPase, putativa.
Tc00.1047053508711.30	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053504105.94	Proteína ribossomal S25, putativa.
Tc00.1047053506443.150	Proteína de hot spot de retrotransposon (RHS), putativa.
Tc00.1047053509601.30	Proteína hipotética.
Tc00.1047053506593.19	Proteína ribossomal 40S S7, putativa.
Tc00.1047053506201.20	Proteína ribossomal 60S L13a, putativa.
Tc00.1047053507765.60	Proteína ribossomal 40S S21, putativa.
Tc00.1047053508175.146	Proteína ribossomal 60S L23a, putativa.
Tc00.1047053506885.14	Proteína ribossomal 60S L37, putativa.
Tc00.1047053508177.70	Proteína hipotética.
Tc00.1047053503801.9	Proteína RAD50 de reparo de DNA, putativa.
Tc00.1047053511293.69	Glicossomal malato desidrogenase, putativa.
Tc00.1047053508355.340	Proteína hipotética conservada.

Tc00.1047053503819.30	Subunidade 2 de fator de iniciação de tradução eucariótico, putativa.
Tc00.1047053503709.20	Proteína ribossomal 60S L44, putativa.
Tc00.1047053507713.30	Proteína “heat shock” 85, putativa.
Tc00.1047053504163.40	Frutose-bifosfato aldolase, glicossomal, putativa.
Tc00.1047053506247.210	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053503611.20	Proteína ribossomal 60S L24, putativa.
Tc00.1047053508231.20	Proteína 40S ribossomal S12, putativa.

Quadro 4.4: Proteínas detectadas no experimento controle.

Nº. de acesso Gene DB	
Tc00.1047053503407.20	SUMO1/Ulp2, putativa; cisteína peptidase, Clan CA, família C48, putativa.
Tc00.1047053508569.70	Proteína hipotética conservada.
Tc00.1047053508461.160	Proteína hipotética conservada.

4.11. O ORTÓLOGO DE TcYchF EM *T. brucei* É IMPORTANTE PARA O CRESCIMENTO CELULAR

Em levedura, foi observado que a deleção do ortólogo do gene *tzychf* leva a uma diminuição da capacidade adaptativa destes organismos, diminuindo o crescimento celular. Para averiguar a importância da proteína TcYchF na biologia do parasita, recorreremos a ensaios de RNA de interferência (RNAi). A via de RNA de interferência consiste em um mecanismo de silenciamento gênico que para a célula funciona como sistema de defesa. O mecanismo inicia-se através da expressão de um RNA dupla fita (dsRNA) contendo uma sequência complementar ao gene de interesse. Este dsRNA será então clivado em pequenos fragmentos de cerca de 22 a 25 nucleotídeos através da atividade de uma ribonuclease do tipo III, denominada Dicer. Estes pequenos RNAs serão direcionados e permanecerão unidos a um complexo protéico denominado RISC (“RNA-Induced Silencing Complex”). Nesse complexo, os pequenos RNAs de interferência (siRNA), ligam-se por complementaridade ao RNA

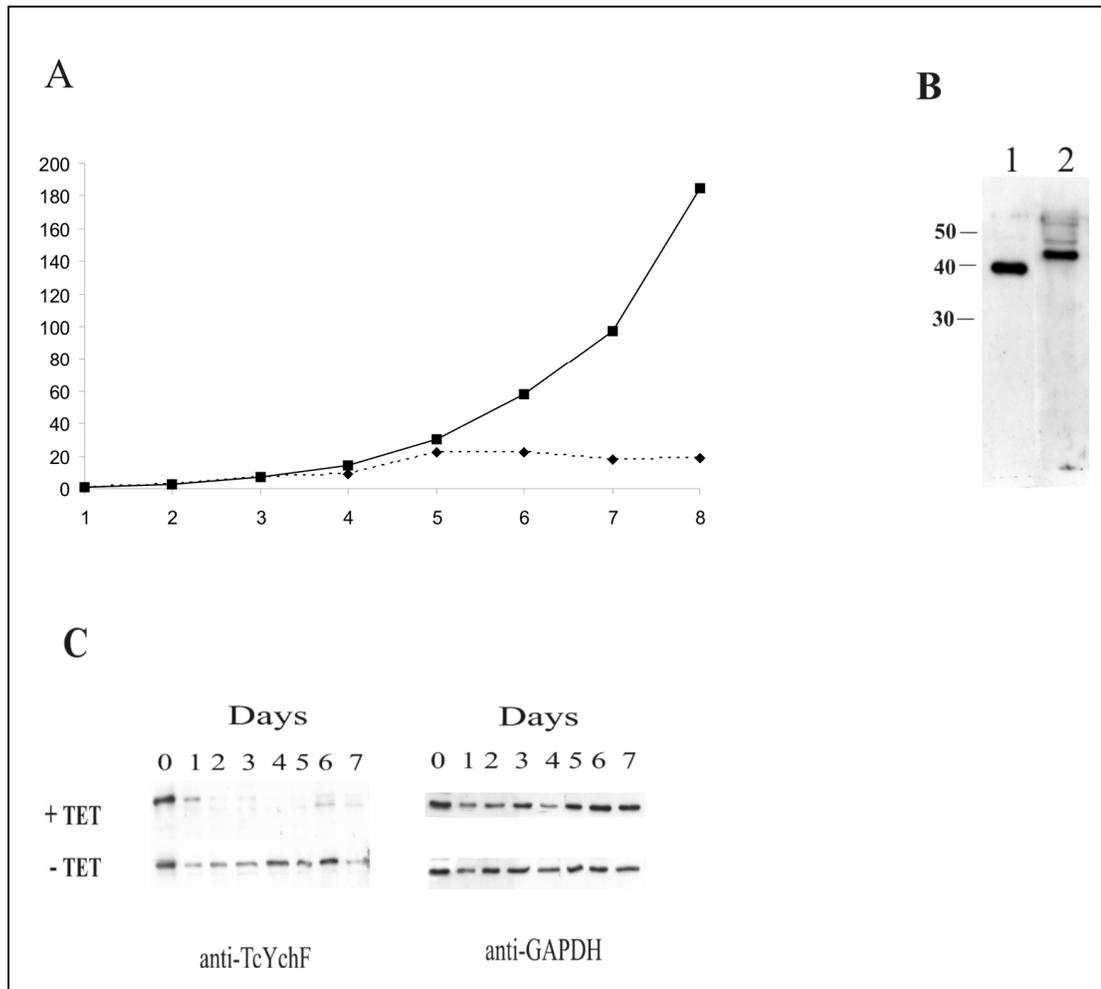
mensageiro do gene a ser inativado, guiando-os para degradação pelas nucleases presentes no complexo, impedindo a síntese da respectiva proteína (Ullu *et al*, 2002)

Como o *T. cruzi* não apresenta essa via de degradação de mRNA, realizamos este ensaio a partir do silenciamento de seu ortólogo em *T. brucei*, já que a identidade em termos de nucleotídeos entre os genes das duas espécies é de 86%.

O vetor utilizado para promover o silenciamento do gene *tbychf* foi o p2T7-177. Este plasmídeo integra-se aos minicromossomos do *T. brucei*, região de repetições 177 (Foldynova-Trantirkova *et al*, 2005). Este vetor apresenta dois promotores de polimerase em oposição, induzíveis por tetraciclina, flanqueando a seqüência de interesse. Desta forma, são geradas duas moléculas de mRNA que pareadas, formam a molécula de RNA fita dupla capaz de induzir a maquinaria de degradação.

A indução da inibição da TbYchF através de RNAi levou a uma diminuição da multiplicação celular do parasita a partir do quarto dia do experimento (Fig. 4.17 A). Para confirmar se o fenótipo resultante era de fato consequência do silenciamento do referente RNA, ensaios de “western blot” foram realizados utilizando um anti-soro contra a TcYchF para assegurar que a proteína TbYchF não estava mais sendo sintetizada. A utilização do anti-soro contra a proteína de *T. cruzi* foi possível, pois este é capaz de detectar seu ortólogo em *T. brucei* como verificado através de “imunoblotting” realizado com lisados celulares deste parasita (Fig. 4.17 B). Como controle dos dados obtidos para a TbYchF, usamos o anti-soro contra a TcGAPDH, que também é capaz de detectar seu ortólogo em *T. brucei* (Fig. 4.17 B).

A análise dos lisados celulares das culturas induzidas (+ Tet) com o anti-soro contra a TcYchF mostrou que a concentração da TbYchF no extrato celular mostrou-se reduzida a partir de 24 horas do início da adição e tetraciclina à cultura. O mesmo não foi constatado quando se observa a concentração de TbGAPDH nas amostras silenciadas. As culturas não tratadas com tetraciclina não indicaram alteração no perfil protéico do parasita (Fig. 4.15 C). A inibição da proliferação celular observada após o silenciamento de *tbychf* sugere que a proteína resultante da expressão deste gene é essencial ao metabolismo do protozoário.

Figura 4.17: RNAi de TbYchF inibe o crescimento das formas procíclicas de *T. brucei*.

(A) Curva de crescimento de linhagem celular de RNAi de TbYchF em *T. brucei* induzido por tetraciclina. As células foram diluídas a uma densidade celular inicial de 1×10^6 ml na presença e ausência de tetraciclina. As densidades celulares foram determinadas pela contagem de células a intervalos de 24 horas durante oito dias após início de adição de tetraciclina. A linha com quadrados mostra a curva de crescimento celular na ausência de tetraciclina (- TET). A linha com losangos mostra a curva de crescimento celular na presença de tetraciclina (+ TET). (B) Lisados celulares de *T. brucei* (1×10^5 células por linha) foram fracionados por SDS-PAGE, e transferidos para uma membrana de nitrocelulose e reagidos com anti-soro contra TcGAPDH (linha 1) ou contra TcYchF (linha 2). (C) "western blot" para avaliar a síntese da TbYchF durante o ensaio de silenciamento por RNAi. Amostras correspondentes a 5×10^6 parasitas foram retiradas das culturas (-TET e +TET) em intervalos de 24 horas durante oito dias para obtenção do lisado. Aliquotas (1×10^6) foram submetidas a SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reagidas com anti-soro contra TcYchF ou contra TcGAPDH.

5. DISCUSSÃO

5.1. DISTRIBUIÇÃO DA YchF

Nós identificamos um gene de *T. cruzi* que codifica uma proteína de ligação a ATP/GTP, a qual denominamos de TcYchF, pois tem grande similaridade com proteínas da sub-família YchF, que por sua vez faz parte da família Obg de GTPases. A similaridade da TcYchF com proteínas ortólogas eucarióticas está entre 45 a 86% e a conservação de seqüência entre seus ortólogos procarióticos é também bastante significativa e está entre 38 to 43%.

Em bactérias a proteína codificada pelo gene *ychF* é uma das onze GTPases universalmente conservadas (Caldon *et al.*, 2001; Leipe *et al.*, 2002) mas muito pouco se conhece sobre a sua função. Esse fato é mais surpreendente sabendo-se que os seus ortólogos estão presentes nos três grandes reinos: Arquea, Bacteria e Eukaria (Caldon *et al.*, 2001). O gene *ychF* é co-transcrito com o gene *pth* em *E. coli* (Cruz-Vera *et al.*, 2002) e esta organização é mantida em vários genomas bacterianos (Caldon e March, 2003). O gene *ychf* foi também identificado em genomas de bacterias patogênicas, tais como *Yersinia pseudotuberculosis* bacilo causador de gastroenterites (Garbon, 2004) e *Neisseria meningitides* agente causador de meningite (Sun, 2000). Ortólogos da YchF também foram descritos em duas espécies de micoplasmas, o *Mycoplasma hypponeumoniae*, agente causador da micoplasmose suína e o *Mycoplasma synoviae*, responsável por infecções de vias aéreas em aves (Borges, 2007).

Proteínas relacionadas à YchF bacteriana estão presentes em eucariotos desde leveduras como em *S. cerevisiae* até a espécie humana. O presente trabalho é o primeiro a caracterizar esta proteína em um protozoário.

A distribuição ubíqua da família YchF e a sua grande conservação em distintos organismos são compatíveis com a hipótese de que estas proteínas evoluíram a partir de um ancestral presente muito antes da divisão dos três grandes reinos (Caldon *et al.*, 2001) e que devem participar de um via metabólica conservada.

5.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA TcYchF .

Com base nas características estruturais e de seqüência, as proteínas YchF estão incluídas na classe TRAFAC (“Translation Factors-related”) das GTPases, que compreende os fatores de tradução universais e reino-específicos, as proteínas G heterotriméricas, a extensa família Ras, as septinas, as dinaminas e algumas ATPases, tais como a kinesina e a miosina (Leipe *et al.*, 2002). Podemos observar pela análise da seqüência da TcYchF, que esta proteína tem todas as características de proteínas da grande família Obg (Obg, DRG, YchF, Ygr210 e NOG1), incluindo o domínio G (motivos G1, G2, G3 e G4) e uma seqüência rica em glicina conservada, logo após o motivo Walker B. Com o uso de programas de modelagem foi possível observar que a homologia estrutural entre a TcYchF e seus ortólogos em *S. pombe* e em humanos é evidente. A proteína TcYchF também possui um domínio estrutural conhecido como TGS (ThrRS, GTPase, e SpoT) na sua porção C-terminal. O domínio TGS, não tenha função conhecida, está presente em algumas proteínas ligadoras de RNA (Wolf *et al.*, 1999). A recente análise da estrutura tridimensional da YchF de *H. influenzae* (Teplyakov *et al.*, 2003) mostra que existe um domínio central na proteína que juntamente com o TGS C-terminal gera um domínio de ligação a ácidos nucléicos. Essa característica, mais o fato dessas proteínas serem conservadas durante a evolução e participarem da família Obg, onde vários membros já foram encontradas em associação com proteínas ribossomais, sugere que a proteína YchF seja um dos fatores envolvidos em etapas do processo de tradução, ainda não caracterizados.

5.3. ATIVIDADE GTPase E ATPase

Como salientado anteriormente, a classificação das proteínas YchF como GTPases pertencentes à família Obg foi obtida a partir de dados de similaridade de seus motivos em relação aos demais membros de seu grupo. Assim como as demais proteínas da família Obg, esta subfamília apresenta os motivos que a definem como uma GTPase da classe TRAFAC, no entanto algumas GTPases desta classe não apresentam uma estrita conservação do motivo NKxD, responsável pelo reconhecimento do GTP, o que sugere uma perda ou diminuição da especificidade

por esse nucleotídeo, como observado por exemplo na miosina e kinesina. A ausência do motivo NKxD também foi observada na seqüência das proteínas YchF, o que suscita questões sobre sua especificidade por GTP.

A estrutura cristalina da YchF de *Haemophilus influenzae* (Teplyakov *et al.*, 2003) e *Schizosaccharomyces pombe* [não publicada, mas depositada no banco de dados de proteínas (Protein Data Bank, PDB) sob o número de acesso 1NI3] foram determinadas. Como já salientado, o motivo G4 do domínio G dessas proteínas é um pouco divergente daquele presente nas proteínas G da superfamília Ras (NKxD). Teplyakov e colaboradores (2003) mostraram que este motivo é substituído, espacialmente pelo motivo ${}_{207}NVNE_{210}$, onde o resíduo de glutamato (E) substitui o aspartato (D) presente no motivo NKxD e, junto com o resíduo de asparagina (N), posiciona-se para interagir com os grupamentos amino da guanina. Por meio do alinhamento da seqüência da TcYchF com as proteínas YchF cristalizadas de *H. influenzae* e *S. pombe*, podemos observar que esse motivo corresponde aos aminoácidos ${}_{230}NMSE_{233}$ na proteína de *T. cruzi* e ${}_{232}NMSE_{235}$ na proteína de *S. pombe*. Nas três proteínas, os resíduos invariantes desse motivo são, portanto, a asparagina (N) e o ácido glutâmico (E).

Até o momento não há estrutura cristalográfica publicada de uma proteína desta subfamília ligada a um nucleotídeo trifosfato. A estrutura da YchF de *H. influenzae* e *S. pombe* foram resolvidas apenas na sua forma livre.

Tentativas para se obter cristais da YchF de *H. influenzae* complexada com GTP ou GDP não obtiveram êxito. Uma possível explicação é que as mudanças conformacionais que acompanham a ligação do nucleotídeo são inconsistentes com a forma do cristal obtido (Teplayakov *et al.*, 2003). Contudo, a ligação de GTP pela YchF de *H. influenzae* pode ser observada pela medição da fluorescência do GTP marcado com TNP (2'[3']-O-[2,4,6-trinitrofenil]).

Em estudos mais recentes, ficou demonstrado que ortólogos da YchF em humanos, levedura e *H. influenzae* são na realidade ATPases, por serem capazes de hidrolisar ATP muito mais eficientemente do que GTP (Koller-Eichhorn *et al.*, 2007). Este novo dado explicaria a falha em se obter cristais da YchF de *H. influenzae* complexada com GTP ou GDP.

A denominação OLA1 (Obg Like ATPases 1) foi proposta para referenciar as YchF (Koller-Eichhorn *et al.*, 2007), referindo-se assim à similaridade que estas ATPases apresentam em relação às GTPases da família Obg.

Partimos então para a avaliação da atividade da TcYchF usando um ensaio colorimétrico que determinava a capacidade de hidrólise de GTP em GDP, com a quantificação do fosfato livre na amostra. Um ensaio nas mesmas condições foi realizado usando o ATP. Apesar da baixa atividade da TcYchF em ambos os experimentos, ficou evidente que a taxa de hidrólise do ATP mostrava-se mais acentuada que a de GTP, corroborando os resultados apresentados por Koller-Eichhorn e colaboradores (2007) que mostram claramente que a associação entre os homólogos de YchF com o ATP é preferida em relação à GTP, mas que a associação com GTP pode ser forçada a ocorrer caso haja uma elevada concentração deste nucleotídeo *in vitro*.

Os dados da literatura mostram que Obg, NOG1 e Ola1/YchF não são muito ativas na hidrólise de nucleotídeos *in vitro* (Welsh *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 2003 e Koller-Eichhorn *et al.*, 2007), observação também feita em nossos ensaios com a TcYchF. Acredita-se que, por isso, essas proteínas funcionem como sensores dos níveis de ATP ou GTP na célula, cujo aumento ou diminuição tem efeito positivo ou negativo, respectivamente, nas interações dessas proteínas com outras proteínas efetoras das vias biossintéticas nas quais estão envolvidas.

5.4. ASSOCIAÇÃO DA TcYchF COM RIBOSSOMOS

Vários trabalhos em distintos organismos têm mostrado que de algum modo a proteína YchF encontra-se relacionada à maquinaria de tradução, seja ligada aos ribossomos, a fatores de tradução ou envolvida em processos onde há uma regulação na síntese de proteínas.

Em *E. coli* foi mostrado que o gene *ychf* é co-transcrito com o gene *pth* (Cruz-Vera *et al.*, 2002). O gene *pth* codifica a peptidil-tRNA hidrolase, uma enzima que cliva o peptidil-tRNA que foi liberado abortivamente do ribossomo durante a síntese protéica. A organização deste *operon* é mantida em vários genomas bacterianos

(Caldon e March, 2003), o que liga, embora de maneira indireta, a proteína YchF com a regulação da síntese protéica e a função do ribossomo. A proteína Obg de *B. subtilis* e seu ortólogo CgtA em *Caulobacter crescentus* são codificadas por genes essenciais e estão envolvidas na iniciação da esporulação e da replicação do DNA, contudo, sua exata função molecular ainda permanece obscura. A Obg de *Bacillus subtilis* é necessária para a ativação do fator de transcrição σ^B , em condições de estresse (Scott; Haldenwang, 1999) e também foi encontrada associada com a subunidade ribossomal 50S (Scott *et al.*, 2000). Ortólogos da Obg foram encontrados em outros procariotos e alguns deles estão envolvidos com diferenciação morfológica (Okamoto *et al.*, 1997, Okamoto *et al.*, 1998).

Em dois trabalhos distintos envolvendo bactérias patogênicas, a virulência do microrganismo foi atenuada quando os correspondentes ortólogos da YchF eram alvo de ensaios de mutagênese. Em trabalhos distintos, um em *Yersinia pseudotuberculosis*, e outro em *Neisseria meningitidis*, os mutantes para a *ychf* não tinham seu crescimento afetado, mas a virulência foi bastante atenuada quando comparada ao fenótipo selvagem (Garbon *et al.*, 2004 e Sun *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que ortólogos da YchF em patógenos estão relacionados à regulação dos genes que produzem o fenótipo virulento nestas espécies.

O fato de alguns membros da superfamília Obg interagirem com as subunidades ribossomais e possuírem o domínio TGS, observado em algumas proteínas que se ligam à RNA (Wolf *et al.*, 1999), indicam que essas GTPases podem agir como fatores de tradução, cujas funções específicas ainda precisam ser melhor caracterizadas.

Outra indicação de que as YchF estão envolvidas com o processo de tradução vem da caracterização de complexos multiprotéicos em *S. cerevisiae* (Gavin *et al.*, 2002), no qual se mostrou, usando a técnica "Tandem-Affinity Purification" (TAP), que o ortólogo da YchF, YBR025c, interage com o fator de alongação eEF1.

Da família Obg apenas outra proteína, a NOG1, foi caracterizada em tripanossomatídeos, mais precisamente em *T. brucei*. A NOG1 de *T. brucei* tem uma massa molecular de 75 kDa e está associada com o nucléolo (Park *et al.*, 2001). Estudos de RNA interferência mostram que o silenciamento do gene *nog1* causa defeitos na biogênese da subunidade ribossomal 60S. De fato, a análise do perfil de

polissomos fracionados em gradiente de sacarose, mostra que a proteína NOG1 está associada com a subunidade 60S (Jensen *et al.*, 2003).

Nossos dados mostram claramente a associação da TcYchF, tanto com as subunidades ribossomais quanto com os polissomos através das análises do fracionamento em gradiente de sacarose. Neste experimento a TcYchF se mostrou distribuída desde as frações mais leves, indicando moléculas desassociadas dos ribossomos, passando pelas frações correspondentes às subunidades menor (40S), maior (60S), o ribossomo (80S) até os polissomos. Anti-soros contra a proteína ribossomal S7 (subunidade 40S) e contra a proteína ribossomal L26 (subunidade 60S), foram produzidos para que um controle destas frações fosse realizado.

A presença da TcYchF nas frações mais leves indica que nem toda a proteína está associada ao ribossomo. Não sabemos, no entanto, se estas moléculas estão livres no citoplasma ou associadas a algum outro complexo menor.

A distribuição ao longo do gradiente poderia, contudo, ser resultante da associação da TcYchF com outros complexos celulares que co-migravam com as frações polissomais. O tratamento dos extratos celulares com puromicina provoca a dissociação dos polissomos alterando a distribuição das subunidades ao longo do gradiente de sacarose. Forma-se assim um grande pico de detecção de RNA no gráfico, que corresponde às subunidades livres 40S, 60S e ao ribossomo 80S. Neste ensaio, a TcYchF mostrou um padrão de distribuição diferente daquele observado no experimento sem puromicina, aparecendo agora muito mais enriquecida nas frações mais leves. Esse resultado indica que a desestabilização dos polissomos pela puromicina também desestabiliza a TcYchF, alterando o seu perfil no gradiente de sacarose, muito provavelmente porque esta proteína encontrava-se associada aos polissomos.

Mostramos também que proteínas de ambas as subunidades ribossomais coimunoprecipitaram com a TcYchF e vice-versa, permitindo-nos novamente concluir que a proteína TcYchF forma complexos com o ribossomo.

Além disto, a análise por espectrometria de massas do conjunto de proteínas obtidas através da imunoprecipitação da TcYchF, mostrou a presença de algumas proteínas ribossomais (S4, S33, L13, P0) e de fatores de tradução (fator de alongação TU, fator de iniciação da tradução, fator de alongação 2). Somando-se estes dados

temos um panorama bastante convincente da estreita relação desta proteína à maquinaria de tradução.

5.5. ASSOCIAÇÃO DA TcYchF COM O PROTEASSOMO

Estudos recentes de proteômica (Guerrero *et al.*, 2006), usando a tecnologia de Tap-tag (“tandem affinity purification”) combinada com análises de espectrometria, mostram que um grupo de proteínas estava associado especificamente com o proteassomo de *S. cerevisiae*. Estas proteínas foram denominadas genericamente de PIPs (do inglês, “Proteasome-Interacting Proteins”). Entre as PIPs está o ortólogo da YchF em levedura (YBR025c), bem como chaperonas, fatores de transcrição, fatores de tradução (EF-1, Yef3/Hef3, Eft1/2, tef4) e diversas proteínas ribossomais (Rps2, Rpl 13/A/B, Rps24 A/B, Rps2, Rps 11A/B, Rps0A/B).

Outro interessante dado vem do trabalho que avaliou a expressão diferencial de certos genes durante a resposta ao estresse oxidativo provocado pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em levedura (Godon *et al.*, 1998). Este trabalho mostrou um aumento na expressão dos genes que codificam a YBR025c, chaperonas e muitas subunidades do proteassomo. Esses dados, juntamente com os dados de proteômica do proteassomo, sugerem que YBR025c participa de complexos protéicos envolvidos na degradação de proteínas oxidadas em células sujeitas ao estresse oxidativo.

Em *T. cruzi*, a proteína TcYchF também está associada ao proteassomo como indicado pelos resultados da proteômica dos imunocomplexos associados à esta proteína, onde observamos a presença da proteína RPN7 (“Regulatory Protein Non-ATPase 7”) da subunidade regulatória do proteassomo. Os ensaios de imunoprecipitação usando anti-soros contra as proteínas RPN7 e RPN10 também confirmam a interação entre TcYchF e o proteassomo.

Baseado nos nossos dados e naqueles obtidos com a YBR025c e levando em conta a elevada similaridade entre estas proteínas, é pertinente propor que uma ligação entre a maquinaria de tradução e o proteassomo esteja sendo mediado pelos ortólogos de YchF. Por esse processo, proteínas em fase de síntese nos polissomos, quando alteradas por eventos tais como oxidação ou por apresentarem estrutura

incorreta, poderiam ser degradadas ainda nos polissomos pelo proteassomo, recrutado pela YchF.

5.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR

A partir da proposta que a TcYchF participa de uma via de ligação entre mecanismos celulares tão fundamentais, veio a idéia de avaliar a viabilidade do *T. cruzi* na ausência do gene *TcychF*. Técnicas de nocaute gênico em *T. cruzi* são bastante demoradas e dependentes da viabilidade do fenótipo mutante. Além disso, ainda não é possível realizar ensaios de silenciamento gênico através de RNA de interferência em *T. cruzi*. Contudo, técnicas de RNAi são rotineiramente utilizadas em experimentos de silenciamento gênico em *T. brucei*. Portanto, resolvemos analisar o papel do ortólogo da TcYchF em *T. brucei*, já que ambas as proteínas apresentam grande similaridade.

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que a participação da TbYchF no metabolismo do *T. brucei* é essencial, já que o silenciamento do gene *Tbychf* levou à redução da proliferação celular do parasita.

Com base em todos os dados relatados, podemos propor uma participação da TcYchF na ligação das vias de tradução e degradação protéica. Pode-se supor que o silenciamento de TbychF produziu um acúmulo de proteínas mal estruturadas ou oxidadas no citoplasma do *T. brucei*, levando à interrupção/deficiência das vias metabólicas em que atuam, por competição com as proteínas viáveis para estes processos, gerando assim a redução na proliferação deste parasita.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados neste trabalho, foi possível concluir:

1 - A proteína TcYchF possui todas as características de proteínas da grande família Obg incluindo o domínio G (motivos G1, G2, G3 e G4) e uma sequência rica em glicina conservada, logo após o motivo Walker B.

2 - A homologia estrutural é evidente tanto quando comparamos com os ortólogos da TcYchF em levedura e humanos.

3 - TcYchF não é estágio-específica.

4 - A proteína TcYchF hidroliza preferencialmente ATP em relação ao GTP.

5 - Nossos dados mostram claramente a associação da TcYchF, tanto com as subunidades ribossomais quanto com os polissomos através das análises do fracionamento em gradiente de sacarose.

6 - A proteína TcYchF também está associada ao proteassomo como indicado pelos resultados da proteômica dos imunocomplexos associados à esta proteína.

7 - A participação da TbYchF no metabolismo do *T. brucei* é essencial já que o silenciamento do gene *Tbychf* levou à redução da proliferação celular do parasita.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados desse trabalho abrem novas perspectivas de investigação da ação da TcYchF no metabolismo do *T. cruzi*, entre as quais estão:

1. Obtenção de cristais da TcYchF para determinação de sua estrutura tridimensional e dos domínios envolvidos com a ligação do ATP.
2. Realização de experimentos de imunoprecipitação usando soros contra proteínas da subunidade catalítica (20S) do proteassomo, com o objetivo de determinar se este complexo coimunoprecipita com a TcYchF assim como a subunidade regulatória.
3. Usando os parasitas com a TbYchF silenciada, avaliar se há mudanças significativas em seu perfil polissomal que reflitam alguma anormalidade no processo de tradução.
4. Transfecção de *T. cruzi* com plasmídeos que super-expressem mutantes dominantes negativos da TcYchF com o objetivo de interferir na função da proteína nativa pela substituição pela proteína mutante, avaliando que eventos biológicos resultam desta modificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agabian N. *Trans* splicing of nuclear pré-mRNAs. *Cell*. 1990 61: 1157-1160.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.
- Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res*. 2002 30(7): 1427-1464.
- Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. *Amer Heart J*. 1978 95: 316-324.
- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* . 1990 61: 1277-87.
- Ausubel FM, Brent R., Kingston RE *et al*. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons, 1987.
- Ávila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Góes V, Fragoso SP, Krieger MA, Goldenberg S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res*. 2003 2(1): 159-68.
- Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV, de Souza W, Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 117: 169-77.
- Aymerich S, Goldenberg S. The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and Trypanosomatids. *Exp Parasitol*. 1989 69: 107-15.
- Baev D, England R, Kuramitsu HK: Stress-induced membrane association of the *Streptococcus mutans* GTP-binding protein, an essential G protein, and investigation of its physiological role by utilising an antisense RNA strategy. *Infect Immun* 1999, 67:4510-4516.
- Barhoumi M, Tanner NK, Banroques J, Linder P, Guizani I. *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J*. 2006 273(22): 5086-5100.

- Berberof M, Vanhamme L, Tebabi P, Pays A, Jefferies D, Welburn S e Pays E. The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Embo J*. 1995 14: 2925-34.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C *et al*. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 2005 309: 416-22.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, De Souza W e Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol* . 1988 106: 1349-58.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dubé M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem*. 2002 277 (19): 511-20.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: The GTPase superfamily: a conserved switch of diverse cell functions. *Nature* 1990, 348:125-132.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991, 349:117-127.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan. 2º edição. 2000.
- Brecht M, Parsons M. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1-2):189-98.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev of Microbiology*. 1973 27: 347-82.
- Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1999 104(2): 219-232.
- Brun R, Schonenberger. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop*. 1979 Sep;36(3):289-92.
- Caldon CE, Yoong P, March PE: Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol. Microbiol*. 2001 41: 289-297.
- Caldon, C. E., and P. E. March. Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003 6: 135-139.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964 May-Jun;12:93-100.

Campbell DA, Thomas S, Sturm N. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? Microbes Infect. 2003 5: 1231-40.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzalez A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL *et al*. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol. 1995 71: 273-8.

Cassola A, De Gaudenzi J, Frasch AC. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. Mol. Microbiol. 2007 65(3): 655-670.

Chagas C. Nova tripanozomiasse humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909 1:159-218.

Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. Science. 2004 27; 303(5662):1336.

Chen, F., A. J. Mackey, C. J. Stoeckert, and D. S. Roos. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of orthologous groups. Nucleic Acids Res. 2006 34: D363-368.

Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. EMBO J. 2002 21: 1881-8.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol. 2007 156: 93-101.

Contreras, V. T., J. M. Salles, N. Thomas, C. M. Morel, and S. Goldenberg. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. 1985 16: 315-327.

Contreras VT, Araque WH, Delgado VS. Biological properties of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: usefulness for studying Chagas' disease. Biol Res. 1993 26(1-2): 315-6.

Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomas N, Barbosa, HS, Meirelles MNL, Goldenberg S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988 83: 123-33.

Coura JR & Castro SL. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 97(1): 3-24.

Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, Santos L, Devera R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. A new cross-sectional study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002 44: 159-65.

Cruz-Vera LR, Galindo JM, Guarneros G: Transcriptional analysis of the gene encoding peptidyl-tRNA hydrolase in *E. coli*. Microbiology 2002, 148:3457-3466.

Curotto de Lafaille MA, Wirth DA. Creation of null/+ mutants of the alpha-tubulin gene in *Leishmania enriettii* by gene cluster deletion. J Biol Chem. 1992 75: 145-57.

Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta SF, Avila AR, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. Exp Parasitol. 2001 Sep;99(1): 7-16.

De Carvalho TM, de Souza W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell Struct Funct 1989 14: 383-92.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 2002; 8(4): 269-85.

Devera R, Fernandes O, Coura, JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in Vitro* culturing and mice infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003 98(1): 1-12.

Dhalia R, Marinsek, N, Reis CRS, Katz R, Muniz JRC, Standart N, Carrington M, Melo Neto OP. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. Nucleic Acids Res. 2006 34(9): 2495-2507.

Dias JCP. Globalization, inequity and Chagas disease. Cad. Saúde Pública. 2007 Rio de Janeiro. 23 Sup 1:S13-S22,

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. Science. 2005a 309: 409-15.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G *et al*. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science. 2005b 309: 404-8.

Foldynova-Trantirkova S, Paris Z, Sturm NR, Campbell DA, Lukes J. The *Trypanosoma brucei* La protein is a candidate poly(U) shield that impacts spliced

leader RNA maturation and tRNA intron removal. *Int J Parasitol.* 2005 Apr 1;35(4):359-66.

Fragoso SP, Goldenberg S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Oct;55(1-2):127-34.

Fragoso SP, Mattei D, Hines JC, Ray D, Goldenberg S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 94: 197-204.

Fragoso SP, Plazanet-Menut C, Carreira MA, Motta MC, Dallagiovana B, Krieger MA, Goldenberg S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Jan; 126(1):113-7.

Galperin MY, Koonin EV. Conserved hypothetical proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Research.* 2004 32(18): 5452-5463.

Garbom S, Forsberg A, Wolf-Watz H, Kihlberg BM. Identification of Novel Virulence-Associated Genes via Genome Analysis of Hypothetical Genes. *Infection and Immunity.* 2004 72(3): 1333-1340.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Tothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, Rojas de Arias A, Miles MA Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 2003 421: 936-9.

Gavin A, Boèsche M, Krause R, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature.* 2002 (415):141-147.

Gillinger G, Bellofatto V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 2001 29: 1556-64.

Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 1985 Jan 28;180(2): 265-70.

Gomes LI, Silva RLA, Stolf BS, Cristo EB, Hirata Jr R, Soares FA, Reis LFL, Neves EJ, Carvalho AF. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Anal Biochem.* 2003 321: 244-51.

Godon CG, Lagniel J, Lee JM, Buhler S, Kieffer M, Perrot H, Boucherie MB, Toledano, Labarre J. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1998 273: 22480-22489.

Graham SV. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitology Today*. 1995 11: 217-33.

Guerrero C, Tagwerker T, Kaiser P, Huang L. An Integrated Mass Spectrometry-based Proteomic Approach. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006 5: 366-378.

Guex N, Peitsch MC. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 1997 18:2714-2723.

Haile S, Est'vez AM, Clayton C. A role for the exosome in the initiation of degradation of unstable mRNAs. *RNA*. 2003 9:1491-501.

Hang JQ, Meirer TI, Zhao G: Analysis of the interaction of 16S rRNA and cytoplasmic membrane with the C-terminal part of *Streptococcus pneumoniae* Era GTPase. *Eur J Biochem* 2001, 268:5570-5577.

Hartzell PL: Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:9881-9886.

Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 91, 370-4.

Hendriks EF, Robinson DR, Hinkins M, Matthews KR. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *The EMBO Journal*. 2001 20: 6700-6711.

Hendriks EF, Matthews KR. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. *Molecular Microbiology*. 2005 57(3):706-716.

Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Cazzulo JJ, Frasch ACC, Petersson U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 37: 64-73.

Hoenig M, Lee J, Ferguson DC. A microtiter plate assay for inorganic phosphate. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1989. 19: 249-252

Holetz FB, Correa A, Ávila AR, Nakamura CV, Krieger MA, Goldenberg S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *BBRC*. 2007 356 (4):1062-1067.

Hulo N, Sigrist CJA, Le Saux V *et al*. Recent improvements to the PROSITE database. *Nucl. Acids. Res*. 2004 (32):D134-D137.

Ivens AC, Peacock C, Worthey EA *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005 309: 436-42.

Jensen, BC, Wang Q, Kifer CT, Parsons M. The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 2003 78: 32204-32211.

Johnson PJ, Kooter, JM, Borst P. Inactivation of transcription unit by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*. 1987 51: 273-281.

Kallstrom G, Hedges J, Johnson A. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol and Cel Biology*. 2003 23 (12): 4344-4355.

Kleffmann T, Schmidt J, Schaub GA. Attachment of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes to Hydrophobic Substrates and Use of this Property to Separate Stages and Promote Metacyclogenesis. *J Euk Microbiol*. 1998 45 (5):548-555

Kobayashi G, Moriya S, Wada C: Deficiency of essential GTPbinding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol Microbiol* 2001, 41:1037-1051.

Koller-Eichhorn R, Marquardt T, Gail R, Wittinghofer A, Kostrewa D, Ulrike Kutay U, Kambach C. Human OLA1 defines an ATPase subfamily in the Obg family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem*. 2007 282 (27):19928-19937.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000 16: 381-7.

Koonin EV, Aravind L, Galperin MY. A Comparative-Genomic View of the Microbial Stress Response In: *Bacterial Stress Responses*, 2000 - books.google.com.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 227: 680-685.

Laird PW, Kooter JM, Loosbroek N e Borst P. Mature mRNAs of *Trypanosoma brucei* possess a 5' cap acquired by discontinuous RNA synthesis. *Nucleic Acids Res*. 1985 13: 4253-66.

Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem*. 1979 100: 95-97

- Laufer G, Günzl A . *In vitro* competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2001 113: 55–65.
- Laufer G, Schaaf G, Bollgonn S, Günzl A. *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol. 1999 19: 5466–5473.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. Genes & Development. 1993 7: 996–1007.
- Lee MGS, Van der Ploeg MHT. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. Ann Rev Microbiol. 1997 51: 463–89.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J Mol Biol. 2002, 317:41–72.
- Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. Evolution and Classification of P-loop Kinases and Related Proteins. Journal of Molecular Biology. 2003 333 (4): 781–815.
- Li CH, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D, *et al.* Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→3' exoribonuclease homologue in mRNA degradation. RNA. 2006 12: 2171–86.
- Li, L., Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Res. 2003 13: 2178–2189.
- Lukes J, Paris Z, Regmi S, *et al.* Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. Mol Biochem Parasitol 2006;148:125–32.
- Lupas AN, Martin J. AAA proteins. Current Opinion in Structural Biology. 2002 12(6): 746–753.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Nat Acad Sci USA. 2001 98: 7396–401.
- Maddock J, Bhatt A, Koch M *et al.* Identification of an essential *Caulobacter crescentus* gene encoding a member of the Obg family of GTP-binding proteins. J. Bacteriol. 1997 179 (20): 6426–6431.
- Madison-Antenucci S, Grams J, Hajduk SL. Editing machines: The complexities of trypanosome RNA editing. Cell. 2002 108: 435–8.

Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*. 2000 Feb; 6(2):163-9.

Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*. 2004 3: 506-17.

Martínez-Cavillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both direction within a single region. *Mol Cell*. 2003 11: 1291-9.

Matthews KR, Tschui C, Ullu E. A common pyrimidine- rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*. 1994; 8, 491-501.

Meier, T. I., R. B. Peery, K. A. McAllister, and G. Zhao. Era GTPase of *Escherichia coli*: binding to 16S rRNA and modulation of GTPase activity by RNA and carbohydrates. *Microbiology* 2000 146: 1071-1083.

Milner-White EJ, Coggins JR, Anton IA. Evidence for an ancestral core structure in nucleotide-binding proteins with the type A motif. *Journal of molecular biology*. 1991 221 (3): 751-754

Mittenhuber G: Comparative genomics of prokaryotic GTPbinding proteins (the Era, Obg, EngA, ThdF (TrmE), YchF and YihA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, RAN, RAS and RHO families). *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001, 3:21-35.

Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Alasdair I, Stuart K. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 96: 2902-6.

Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 95: 14687-92.

Nozaki T, Cross GAM. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995 75(1): 55-57.

Okamoto S, Itoh M, Ochi K. Molecular cloning and characterization of the obg gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. *J. Bacteriol*. 1997 179:170-179.

- Okamoto S, Ochi K. An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*. 1998 30:107-119.
- Orphanides G, Reinberg D. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell* 2002 108 (4): 439 - 451.
- Park JH, Jensen BC, Kifer CT, Parsons M. A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes. *J. Cell Sci*. 2001 114:173-185.
- Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 11:121-7.
- Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*. 1984 38: 309-16.
- Pasion SG, Hines JC, Ou X, Mahmood R, Ray DS. Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 1996 16: 6724-35.
- Pays E, Coquelet H, Pays A, Tebabi P, Stainert M. *Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol Cell Biol*. 1989 9: 4018-21.
- Pereira ME, Zhang K, Gong Y, Herrera EM, Ming M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun*. 1996 Sep 64(9): 3884-92.
- Preiss T, Hentze MW. From factors to mechanisms: translation and translational
- Rau K. Clonagem e caracterização de um gene que codifica uma nova gtpase em *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Paraná. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2004.
- Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005 433:477-80.
- Sack S, Kull FJ, Mandelkow E. Motor proteins of the kinesin family: structures, variations, and nucleotide binding sites. *European journal of biochemistry*. 1999 262(1): 1-11
- Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci*. 1990 15: 430-434.
- Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol*. 1994 48: 499-523.

Schmuñis GA. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas 2000. In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 1-15.

Schurch N, Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol*. 1994 14: 3668-75.

Scott JM, Ju J, Mitchell T, Haldenwang WG. The *Bacillus subtilis* GTP binding protein obg and regulators of the sigma(B) stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J. Bacteriol*. 2000 182: 2771-2777.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol*. 1995 49: 117-43.

Silveira JF (2000) In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 127-152.

Slominska M, Konopa G, Wegrzyn G, Czyz A: Impaired chromosome partitioning and synchronization of DNA replication initiation in an insertional mutant in the *Vibrio harveyi* *cgta* gene coding for a common GTP-binding protein. *Biochem J* 2002, 362:579-584.

Smith, D. B., K. S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 1988 67: 31- 40.

Sprang SR: G-protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*. 1997, 66: 639-678.

Sun YH, Bakshi S, Chalmers R, Tang CM. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med*. 2000 6: 1269-1273.

Sutton RE, Boothroyd JC. Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell*. 1986 14: 527-35.

Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC. Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 2003 31, 3381-3385.

Tan J, Jakob U, Bardwell JCA: Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* 2002, 184: 2692-2698.

Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J. Biol. Chem* 1994 269 (32): 20509-20516.

- Teixeira SM, daRocha WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res.* 2003 Mar 31; 2(1):148-58.
- Teplyakov A, Obmolova G, Chu SY, Toedt J, Eisentein E, Howard AJ, Gilliland GL. Crystal structure of the YchF protein reveals binding sites for GTP and nucleic acid. *J. Bacteriol.* 2003 185: 4031- 4037.
- Thomasson B, Link J, Stassinopoulos AG, Burke N, Plamann L, Hartzell PL: MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 2002, 46:1399-1413.
- Tomás AM, Kelly JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 76: 91-103.
- Tomás AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem.* 1997 244: 596-603.
- Tovar J, Fairlamb AH. (1996) Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* 24, 2942-Tybayrenc, 2003
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4. 1979.
- Tschudi C, Ullu E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J.* 1988 7: 455-463.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6): 472-81.
- Ullu E, Djikeng A, Shi H, Tschudi C. RNA interference: advances and questions. *Phil Trans R Soc Lond B.* 2002 357: 65-70.
- Ullu E, Matthews KR, Tschudi C. Temporal order of RNA processing reactions in trypanosomes: rapid *trans* splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13, 720-725.
- Vanhamme L, Pays E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev.* 1995 59: 223-40.

Vetter IR, Nowak C, Nishimoto T, Kuhlmann J, Wittinghofer A. Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*. 1999 398: 39-46.

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001 294: 1299-1304.

Vickerman K, Tetley L. Recent ultra structural studies on trypanosomes. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1977 57: 441-57.

Walker JE, Saraste MJ, Runswick JJ & Gay NJ. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATPase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide-binding fold. *EMBO J*. 1982 1:945-951.

Welsh KM, Trach KA, Folger C, Hoch JA. Bacterial characterization of the essential GTP-binding protein Obg of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 1994 176: 7161-7168.

Weston D, La Flamme AC, and Voorhis WCV. Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999 102(1): 53-66

Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt, and G. A. Cross. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1999 99: 89-101.

Wolf, Y. I., L. Aravind, V. Grishin, and E.V. Koonin. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases - analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res*. 1999 9: 689-710.

Worthey EA, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, Fong C, Fu G, Hassebrock M, Hixson G, Ivens AC, Kiser P, Marsolini F, Rickel E, Salavati R, Sisk E, Sunkin SM, Stuart KD, Myler PJ. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res*. 2003 31: 4201-10.

Wout, P., K. Pu, S. M. Sullivan, V. Reese, S. Zhou, B. Lin, and J. R. Maddock.. The *Escherichia coli* GTPase CgtAE cofractionates with the 50S ribosomal subunit and interacts with SpoT, a ppGpp synthetase/hydrolase. *J. Bacteriol*. 2004 186: 5249-5257.

Yim L, Martínez-Vicente M, Villarroya M, Aguado C, Knecht E, Armengod M E. The GTPase Activity and C-terminal Cysteine of the *Escherichia coli* MnmE

protein are Essential for its tRNA Modifying Function. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003 278: 28378, 28387.

Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E, Shapira M. Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in *Leishmania*. *EUKARYOTIC CELL* 2006 5(12): 1969–1979.

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, *et al.* Cap-binding activity of an eIF4E
Zeledon R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 94(1): 217-8.

Zeledon R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 94(1): 217-8.

Zwierzynski TA, Buck GA. RNA-protein complexes mediate in vitro capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 88: 5626-30.

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](#)