

GISELLE GUIMARÃES GOMES

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A RNA EM *TRYPANOSOMA*
*CRUZI***

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
RIO DE JANEIRO 2003**

Gomes, Giselle G.

Identificação e Caracterização de Duas Proteínas de Ligação a RNA em *Trypanosoma cruzi*

Giselle Guimarães Gomes. Rio de Janeiro: UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2003.

vii, 86p. il.

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

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

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

“Nothing in Biology Makes Sense Except in The Light of Evolution”.

Theodosius Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

A todas as minhas mães, poucas pessoas têm esta sorte;

À mãe orientadora, Rosane, minha mommy querida, por toda a ajuda carinho e compreensão. Pelas inúmeras dúvidas que ela resolveu, pela paciência nos momentos críticos de tensão, pelo bom humor inigualável, por me receber na sua casa para discutir tese, por atender todos os meus telefonemas mesmo aqueles nos horários mais esdrúxulos;

À minha mãe Lurdinha e ao meu pai Marino. Nenhum problema na vida é grande o suficiente pra ser levado em consideração quando se tem a certeza de que se é amado e muito amado! Eu também os amo principalmente por todo o apoio que me dão mesmo quando não fazem a menor idéia dos meus propósitos e decisões;

À minha mãe-tia perua, à minha madrinha, à minha afilhada, à minha vó, às minhas outras tias e à toda a minha família que não fazem a menor idéia do que eu faço e ainda assim têm orgulho de mim;

Ao meu ex-namorado; ex-noivo, atual qualquer coisa, eterno melhor amigo. Por me entender sempre. E olha que isso não é nem um pouco fácil.

Ao LÊMÊMÊ, com certeza ganhador do premio de melhor lugar de trabalho do mundo (talvez à exceção de alguma praia deserta e paradisíaca do Pacífico, mas...) Agradeço a sua existência;

Ao Edson, pela postura de chefe que ele consegue ter sem deixar de ser amigo. Rígido e brincalhão. Ríspido e bem-humorado. Estupidamente grosso e sempre com razão. Enfim, chefe e amigo. Ao Turán, por todas a conversas,

dúvidas esclarecidas (e olha que as dúvidas eram realmente das mais variadas possíveis) Que a estrela de Eärendil te proteja!;

Ao Marcelo Alex, obrigada por me ouvir (ou me ler), obrigada pelos conselhos (nem sempre seguidos, mas..); obrigada pelo seu jeito grosso-sincero de ser que me faz nunca ter medo de falar com você; obrigada por você ser o promotor LÊMÊMÊ; Ao Marcelo Fernandes, obrigada por prestar atenção em mim (e me dizer, ainda que às vezes exagere); Ao Deivid, obrigada por manter o clima zen no laboratório (tirando quando ele acha defeitos em mim e implica com o meu francês) ; Ao Elielton, obrigada por realizar o meu sonho de infância de ter um irmão (o irmão mais legal que alguém poderia ter e que eu admiro muito); Ao Léo, obrigada por fazer parte da equipe e pelo apoio pré-apresentações; Ao César e ao Bill por todo apoio técnico essencial e imprescindível sem o qual não teria tese nem laboratório.

À Sylvia, por ter se tornado uma grande amiga nestes últimos anos, por me dar força pra não desistir de ser feliz; À Fabi, por sempre me oferecer ajuda (mesmo quando essa ajuda significava um caderno de protocolo de 500 páginas!); À Isabel, por mostrar que é possível ser vaidosa sem ser perua (se bem que no meu caso não adiantou muito, né?); À Julinha, por sempre almoçar comigo, mesmo quando isso significava ir no quentão até a Bio-Rio ou até o Nova América e ainda assim me dar força de vontade pra comer alface com gelo!; À Mariana, por me dar a coragem de ainda fazer algumas loucuras; À Gisele, por ser minha companheira, mesmo quando eu decido ir ao cinema às 7:15 (na sessão das 7:40).

À galerinha mais nova, por perpetuarem o clima do laboratório.

Aos vizinhos de todos os laboratórios pelo bom-humor e apoio. E também pela enzima, pelo gelo, pelos churrascos, festas, viagens...

À Marcinha pelas conversas, pelas saídas, por sempre ter tempo pra mim, por ser a minha amiga de todas as horas, mesmo morando assim tão longe...

Ao Lelo, à Chris, à Dri, à Silvinha, à Lalá, à Vivi e à Flavinha, muito obrigada pelas lembranças de todos os momentos legais que passamos juntos.

Ao pessoal de Campo Grande: Marina, Aline, Mel, Carine e Renatinha por me fazerem ter certeza de que amizade de infância pode ser duradoura e por me fazer ter orgulho de dizer: “meus amigos de escola”.

Ao Darwin, por fazer silêncio e ficar quietinho, enquanto eu estava escrevendo estas coisas.

ABREVIATURAS

μg – micrograma
 μl – microlitro
 μM - micromolar
Abs - Absorbância
APS – persulfato de amônio
ARE – elemento rico em adenina e uridina
ARM – motivo rico em arginina
ATP - adenosina trifosfato
BSA – albumina de soro bovino
cDNA – DNA complementar
CPM – contagem por minuto
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – deoxirribonucleotídeos trifosfatos
DsRBM – motivo de ligação a RNA fita dupla
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EST – marcadores de seqüências expressas
GRE – elemento rico em guanina
GST – glutationa peptidil S-transferase
HRP – Horseradish Peroxidase
HSP - Proteínas de choque térmico
IPTG – isopropil-1-tio-(β -D-galactopiranosídeo)
Kb - quilobases
kDa – quilodaltons
kDNA – DNA de cinetoplasto
KH – domínio de homologia K
M - molar
mg – miligrama
mL – mililitro

mM – milimolar
MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
mRNA – RNA mensageiro
ng - nanograma
NMR - ressonância nuclear magnética
nt - nucleotídeos
°C – graus Celsius
ORF – fase aberta de leitura
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS – tampão salina-fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH - potencial hidrogeniônico
RAPD – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RBP – proteínas de ligação a RNA
rDNA – DNA ribossomal
RGG – domínio rico em glicina
RNA – ácido ribonucléico
RNAbp – proteínas de ligação a RNA
rpm – rotações por minuto
RRM – motivo de reconhecimento do RNA
rRNA – RNA ribossomal
RT-PCR – PCR com transcriptase reversa
SDS – dodecil sulfato de sódio
SSC – salina-citrato de sódio
ssDNA – DNA fita simples
TBE – tris-borato EDTA
TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
TNE – tris-NaCl EDTA
Tris – tris (hidroximetil) aminometano
U - Unidades
UTR – região não traduzida
V – volts

Os tripanossomas são um grupo de organismos eucarióticos com várias características incomuns em sua biologia molecular. Estas características, em adição à diferenciação celular que apresentam ao longo do ciclo de vida, tornam a identificação e caracterização de proteínas de ligação a RNA muito importante já que elas têm papel chave na regulação da expressão gênica.

Neste trabalho, duas proteínas apresentando domínios de ligação a RNA (RBD ou RRM) foram identificadas através de pesquisa no banco de dados de EST de *Trypanosoma cruzi*. Elas foram nomeadas TcRBP1 e TcRBP2 e são muito similares em sua seqüência de aminoácidos. Os genes RBP estão organizados em tandem com pelo menos sete cópias dos genes RBP alternados por cópias de TcP14, um gene que não apresenta homologia com nenhuma seqüência caracterizada. Os transcritos RBP estão presentes em todas as formas celulares do parasito, principalmente no estágio esferomastigota, sugerindo regulação ao longo do ciclo. Análise de *western blot* utilizando anticorpos heterólogos, gerados contra os genes homólogos Tbp34 e Tbp37, de *T.brucei*, revelaram as proteínas RBP. Elas estão também presentes em *Leishmania braziliensis* e em *Crithidia fasciculata*. Ensaio de imunofluorescência preliminares localizam as proteínas RBP no citoplasma sugerindo que podem ter função distinta da apresentada pelas proteínas de *T.brucei*, que acredita-se participam da biogênese do ribossomo. Ambos os genes RBP foram expressos em *Escherichia coli* como proteínas de fusão para futuros ensaios de localização e função.

ABSTRACT

Trypanosomes are a group of eukaryotic organisms with many unusual characteristics in their molecular biology. Genes are transcribed in polycistronic transcripts, and most of the regulation is post-transcriptional. These characteristics, and the cell differentiation along the Trypanosome life cycle, make the identification and characterization of RNA binding proteins very important, as they play key roles in the regulation of gene expression.

In this work, two proteins presenting RNA binding domains (RBD or RRM) were identified in a search on the *Trypanosoma cruzi* EST database. They were named TcRBP1 and 2 and are very similar in their aminoacid sequence. The RBP genes are organized in tandem, with at least 7 copies of the RBP genes alternated by copies of *Tcp14*, a gene that does not present homology with any characterized sequence in GenBank. The RBP transcripts are present in all parasite cell forms, mainly in the spheromastigote stage suggesting a developmental regulation. Western blot analysis using heterologous antibodies, raised against the homolog genes *Tbp34* and *Tbp37*, from *T.brucei*, revealed the two *T. cruzi* RBP proteins. They are also present in *Leishmania braziliensis* and *Crithidia fasciculata*. Preliminary immunofluorescence assays localized the *T. cruzi* RBP gene products in the cytoplasm of epimastigote, spheromastigote and metacyclic trypomastigote forms, suggesting a function distinct from the one presented by the *T.brucei* genes, which are thought to participate in ribosome biogenesis. Both TcRBP genes were expressed in *Escherichia coli* as fusion proteins, for future localization and functional assays.

AGRADECIMENTOS	V
ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
ÍNDICE	XII
INTRODUÇÃO	- 1 -
O <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 2 -
A família <i>Trypanosomatidae</i>	- 2 -
Formas celulares do Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma. cruzi</i>	- 5 -
A Biologia Molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 7 -
O Papel da Molécula de RNA na Expressão gênica	- 9 -
O Reconhecimento do RNA por RNAbps	- 10 -
O domínio de ligação ao RNA (RBD)	- 10 -
O domínio rico em arginina (<i>Arginin Rich Motif</i> - ARM)	- 11 -
O domínio rico em glicina (RGG)	- 11 -
O domínio de homologia K (KH)	- 12 -
O domínio de ligação a RNA dupla-fita (<i>double strand RNA binding motif</i> - dsRBM)	- 12 -
RNAbp's e os modelos tripanosomatídeos	- 13 -
OBJETIVOS	- 15 -
Objetivo Geral	- 16 -
Objetivos Específicos	- 16 -
MATERIAIS E MÉTODOS	- 17 -
Microorganismos	- 18 -
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	- 18 -
Oligonucleotídeos	- 18 -
Clones Utilizados	- 18 -

Meios de cultura	- 19 -
Soluções:	- 20 -
Cultura de Tripanossomatídeos	- 23 -
Extração de Ácidos Nucléicos	- 23 -
Extração de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 23 -
Extração de RNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 23 -
Obtenção de Extratos Celulares de tripanossomatídeos	- 24 -
Clonagem de fragmentos de DNA em cepas de <i>E. coli</i>	- 24 -
Indução de competência em <i>E. coli</i>	- 24 -
Transformação bacteriana	- 25 -
Extração de DNA plasmidial em pequena escala	- 25 -
Eletroforeses	- 26 -
Eletroforese de DNA em gel de agarose	- 26 -
Eletroforese desnaturante de RNA em gel de agarose	- 26 -
Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS – PAGE)	- 27 -
Transferência de macromoléculas para membranas	- 28 -
Transferência de DNA para membranas de nylon – <i>Southern blot</i>	- 28 -
Transferência de RNA para membranas de nylon – <i>northern blot</i>	- 28 -
Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose – <i>western blot</i>	- 28 -
Hibridização a sondas moleculares	- 29 -
Marcação de sondas por iniciação randômica	- 29 -
Reação de hibridização à sonda homóloga	- 29 -
Imunoblot	- 30 -
Reação de digestão com enzimas de restrição	- 30 -
Digestão total de DNA genômico	- 30 -
Digestão Parcial de DNA genômico	- 31 -
Obtenção dos clones	- 31 -
Reação em Cadeia da Polimerase	- 31 -
Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose	- 31 -
Reação de ligação do vetor ao produto de PCR	- 32 -
Sequenciamento de DNA	- 32 -
Produção de proteínas recombinantes	- 32 -
Imunofluorescência	- 33 -
RESULTADOS	- 35 -
Identificação de <i>TcRBP 1</i> e <i>TcRBP 2</i>	- 36 -
Arranjo Estrutural dos genes RBP	- 42 -
Os genes <i>TcRBP1</i> e <i>TcRBP2</i> estão arrançados em tandem no genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 42 -
Identificação e clonagem da região Intergênica (InterRBPs)	- 42 -
A região InterRBPs apresenta um gene de função desconhecida	- 45 -

O arranjo em tandem é confirmado por mapa de restrição	- 48 -
<i>TcRBP1</i> e <i>TcRBP2</i> apresentam-se em mais de 1 cópia no genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	- 48 -
Expressão dos Genes RBP	- 51 -
RNA mensageiros dos genes RBP são detectados nas três formas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 51 -
<i>TcRBP 1</i> e <i>TcRBP 2</i> são reconhecidas por anticorpo antiTbp34/Tbp37 em diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e em diferentes espécies de <i>kinetoplastidae</i>	- 53 -
Os anticorpos antiTbp34/Tbp37 reconhecem proteínas localizadas no citoplasma dos diferentes tipos celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	- 56 -
Produção de <i>TcRBP 1</i> e <i>TcRBP 2</i> recombinantes	- 58 -
DISCUSSÃO	- 66 -
BIBLIOGRAFIA	- 75 -

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi*

O grupo taxonômico *Kinetoplastidae* é de alta relevância médica e econômica. Espécies deste grupo, dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, são agentes causadores de doenças severas em hospedeiros vertebrados. Dentro deste contexto, pode-se destacar o *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas, mal que afeta 14 milhões de pessoas no mundo de acordo com a Organização Mundial de Saúde (www.who.org). O *T. cruzi* é um protozoário da família *Trypanosomatidae* assim como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani*, causadores, respectivamente, da doença do sono e da leishmaniose, duas importantes parasitoses mundiais (de Souza, 2002).

A família *Trypanosomatidae*

A família *Trypanosomatidae* é bastante divergente evolutivamente (Figura 1). Lukes e colaboradores evidenciaram em 1997, através de análise de genes de rRNA, que os tripanossomas compreendem um grupo monofilético, o que não descarta o fato de que o ciclo de vida digenético e o parasitismo tenham evoluído independentemente em várias linhagens de tripanossomatídeos (Stevens e Gibson, 1999).

Apesar de diversos estudos, ainda há bastante controvérsia na taxonomia das linhagens de *T. cruzi* (Momen, 1999, 2002). No entanto, avanços recentes em biologia molecular e análise filogenética estão permitindo um melhor entendimento das relações entre as espécies do gênero *Trypanosoma* (Souto *et al.*, 1996; Brisse *et al.*, 2001; Machado e Ayala, 2001). O parasita apresenta bastante heterogeneidade nas propriedades biológicas infectando diferentes hospedeiros e originando diversas manifestações clínicas. A propagação preferencialmente clonal pode ter resultado em grande parte da

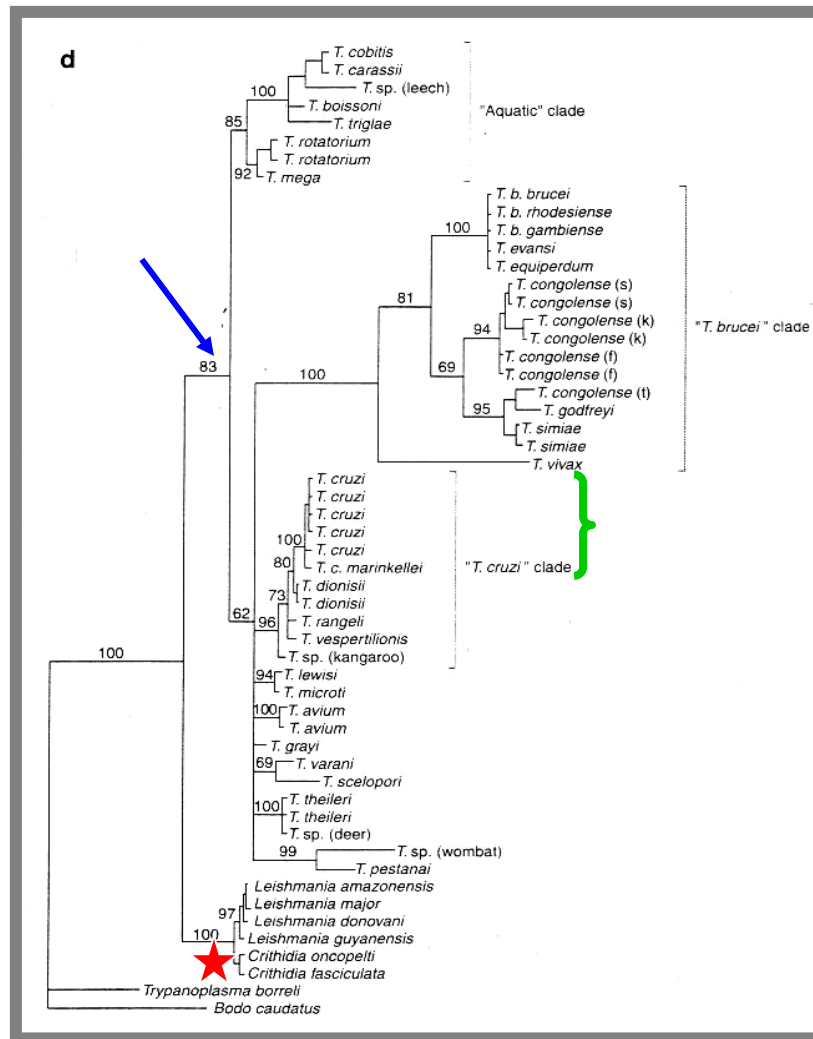


Figura 1 – A Família Trypanosomatidae – Filogenia da família Trypanosomatidae. A seta azul aponta para a origem do gênero *Trypanosoma*; A chave verde aponta para as linhagens de *Trypanosoma cruzi*; A estrela vermelha indica as espécies do gênero *Leishmania* e *Crithidia*. Adaptado de Stevens e Gibson, 1999

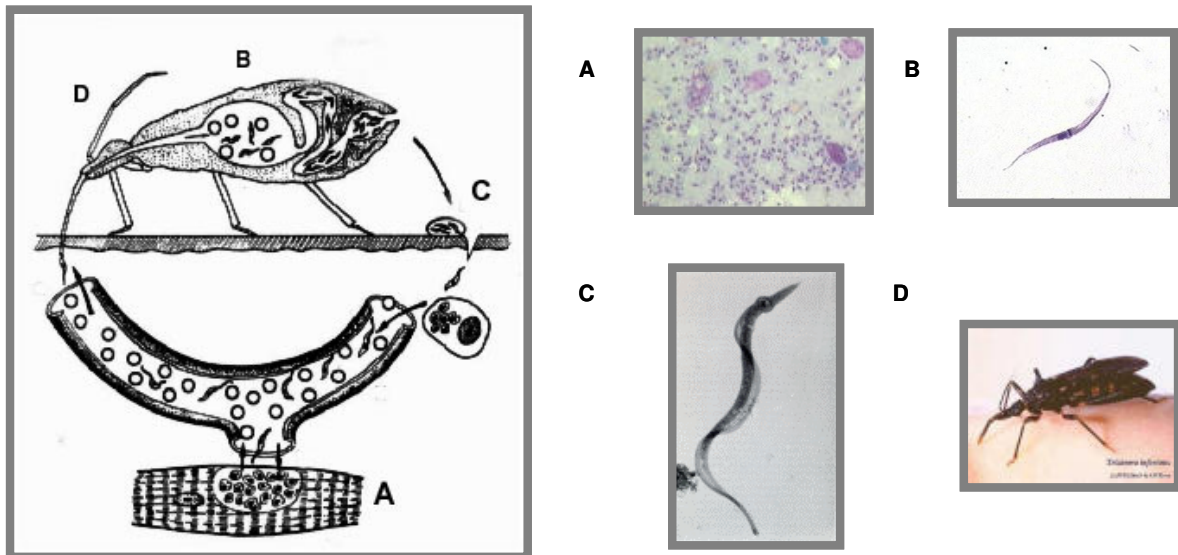


Figura 2 – Ciclo biológico do *T. cruzi* – À esquerda, ciclo de vida natural do *Trypanosoma cruzi*. À direita, tipos celulares e hospedeiro invertebrado – A – Formas amastigotas; B – formas epimastigotas; C – Formas tripomastigotas; D – inseto da família reduviidae.

variação encontrada (Tibayrenc, 1995). Souto e colaboradores definiram em 1996 duas linhagens filogenéticas principais utilizando perfis de RAPD e marcadores de rDNA e de mini-exon. Utilizando os mesmos marcadores, Brisse e colaboradores subdividiram a linhagem 2 em cinco linhagens diferentes.

O consórcio de Iniciativa Genômica de *T. cruzi* elegeu o clone CL Brener, derivado da linhagem CL como linhagem referência (The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium, 1997).

Formas celulares do Ciclo Biológico do *Trypanosoma. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta ao longo do seu ciclo biológico diferentes formas celulares definidas pelo aspecto geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de emergência do flagelo. As formas amastigotas possuem formato arredondado e um pequeno flagelo não visível em microscopia óptica convencional; as formas epimastigotas possuem o corpo celular alongado e são capazes de divisão, assim como os amastigotas, possuindo o cinetoplasto localizado anterior ao núcleo. As formas tripomastigotas metacíclicas ou sangüícolas têm o cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo sendo estas formas incapazes de divisão (Figura 2) (revisado por de Souza, 2002).

A transmissão da doença de Chagas se dá por insetos da família Reduviidae, que após ingestão de sangue defecam e eliminam estágios infectivos do parasito perto da ferida (Figura 2). As formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes são capazes de penetrar nas células do hospedeiro, onde se transformam em amastigotas. A multiplicação inicial nos macrófagos no sítio de picada do inseto origina uma reação inflamatória característica, o Chagoma. No citoplasma das células do hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas se dividem por fissão binária e se transformam em tripomastigotas sangüícolas que, após a ruptura da célula são liberados na corrente sangüínea onde poderão penetrar em novas células do

Domínio	Proteína	Função/Desordem
RBD ou RRM	hnRNPA1 mRNA PABP Sex lethal U2AF ⁶⁵	Biogênese do RNAm Tradução/estabilidade do RNA Splicing alternativo Splicing do pré-mRNA
Arg-rich	HIV Rev	Exportação do RNAm
RGG box	Nucleolin hnRNP U	Biossíntese do RNAr Biogênese do RNAm
Motivo KH	FMR-1 Ribosomal S3	Síndrome do X-frágil Tradução
dsRBD	Staufen Vaccinia E3L	Formação do eixo Antero-posterior Regulação da tradução

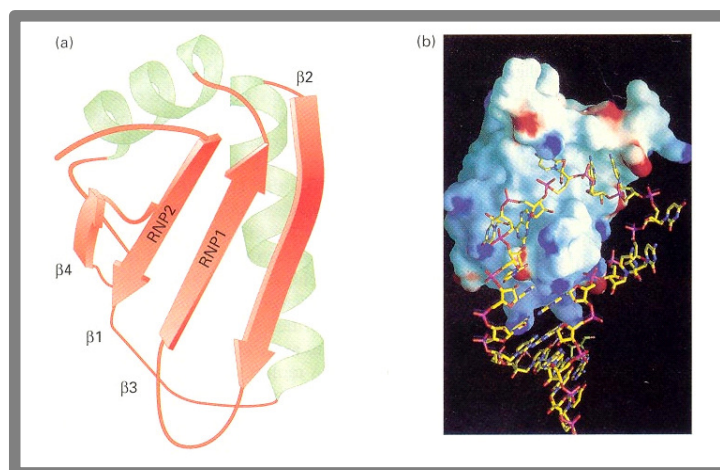


Figura 3 – Proteínas de ligação a RNA – À esquerda, tabela mostrando algumas proteínas de ligação a RNA já descritas e suas respectivas funções (Adaptado de Burd e Dreyfuss, 1994) – À direita, estrutura terciária do domínio de ligação a RNA do tipo RRM da proteína A do complexo ribonucleoproteico

mesmo hospedeiro ou poderão infestar outros insetos. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas sangüícolas, se diferenciam em epimastigotas que se dividem por fissão binária no intestino e se transformam em tripomastigotas metacíclicos no reto, onde poderão reiniciar o ciclo infectando novo hospedeiro (revisto por Vickerman, 1985; Burleigh e Andrews, 1995; Kollien e Schaub, 2000; Tyler e Engman, 2001 e De Souza, 2002).

A Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*

Dada a divergência inicial na linhagem evolutiva eucariótica, os tripanossomatídeos apresentam várias características em sua biologia que os tornam bastante interessantes como modelo de estudo na biologia celular e molecular. Além do ciclo de vida complexo com diferentes formas celulares adaptadas ao hospedeiro invertebrado e ao hospedeiro mamífero, podemos ressaltar diversas peculiaridades no nível molecular.

Os genes em tripanossomatídeos descritos até hoje são transcritos em unidades policistrônicas separados por pequenas regiões intergênicas. Estas unidades podem conter cópias de um mesmo gene, como é o caso dos genes da família mucina *TcMUC* e *TcSMUG* (Di Noia *et al.*, 1998 e 2000) e os genes da proteína de choque térmico HSP70 (Requena *et al.*, 1988), ou ainda genes de funções e padrão de expressão distintos como o tandem contendo os genes Amastina/Tuzina (Teixeira *et al.*, 1995); o tandem contendo os genes metacicloproteína/Tripanredoxina Peroxidase/Gene Associado (Mtc/TryP/AG) (Ávila *et al.*, 2001) e o tandem contendo os genes de α - e β -tubulina (Soares *et al.*; 1989)

Aliado ao fato de apenas poucos promotores terem sido descritos, acredita-se que o controle da expressão gênica seja basicamente pós-transcricional, sendo que as regiões não-traduzidas 5'UTR e 3'UTR contém os elementos de regulação da meia-vida e tradução dos RNAs mensageiros (revisto por Vanhamme e Pays, 1995 e por Teixeira, 1998). Vários elementos reguladores em *cis* alteram a meia-vida dos RNAs mensageiros maduros, a maioria localizada na região 3'UTR (Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000;

Dallagiovanna *et al.*, 2001). Proteínas capazes de interagir em *trans* com estes elementos foram identificadas por D'Orso e Frasch (2001b; 2002), mas o mecanismo pelo qual elas agem permanece ainda indefinido.

A família gênica amastina, identificada por Teixeira e colaboradores em 1994, codifica proteínas de superfície cujos genes se organizam num arranjo em tandem intercalados por cópias do gene tuzina, sendo ambos transcritos numa unidade policistrônica (Teixeira *et al.*, 1995). Ambos os genes são regulados pós-transcricionalmente apresentando padrão de expressão distinto, a proteína amastina é 69 vezes mais abundante na forma celular amastigota (Teixeira *et al.*, 1999 e Coughlin, *et al.*, 2000).

O gene metacicloproteína, que é diferencialmente expresso durante a metacicloproteína do *T. cruzi*, foi identificado por Ávila e colaboradores em 2001. Este gene está presente em pelo menos três cópias num tandem que contém ainda o gene que codifica para a trypanredoxina peroxidase e ainda um terceiro gene cuja função é desconhecida. Os três genes apresentam padrão de expressão distintos. (Ávila *et al.*, 2001)

Os genes da família de mucinas *TcSMUG* de *T. cruzi*, identificados por Di Noia *et al.* em 2000, estão arranjados num tandem estimado de 74 cópias e são regulados pós-transcricionalmente por elementos em *cis* ricos em guanina (GRE) e em adenosina e uridina (ARE) que estabilizam e desestabilizam o mRNA destas proteínas nas diferentes etapas do ciclo biológico pela interação com proteínas de ligação a RNA específicas (D'Orso e Frasch, 2001a).

As unidades policistrônicas transcritas são posteriormente individualizadas pelos mecanismos de poliadenilação e de *trans-splicing*. Este último foi inicialmente descrito por Boothroyd e Cross em 1982. Neste trabalho, os autores evidenciaram que uma seqüência idêntica de 39 nucleotídeos estava presente em todos os transcritos de glicoproteínas de superfície de *T. brucei*. Mais tarde foi verificado que todos os mRNAs contém a seqüência, chamada de mini-exon. Mini-exons estão presentes em todos os tripanossomatídeos, e sua seqüência é espécie-específica. O mecanismo de *trans-splicing* envolve a junção de dois exons de dois RNAs transcritos separadamente, e sua função primordial em tripanossomatídeos é a maturação

da porção final 5' dos RNAs mensageiros codificados nas unidades policistrônicas (revisto por Nilsen, 1995).

Este mecanismo também é encontrado nos protozoários do filo *Euglenozoa* (Tessier *et al.*, 1991) e nos metazoários dos filos Nematoda (Krause e Hirsh, 1987) e Platyhelminthes (Rajkovic, *et al.*, 1990). Já se sabia que os euglenóides, os nematódeos e os trematódeos possuíam tanto o mecanismo de *trans-splicing* quanto o de *cis-splicing*. No entanto, em tripanossomatídeos, um único gene foi descrito apresentando *cis-splicing*. Mair e colaboradores publicaram em 2000 um trabalho demonstrando a presença de um íntron no gene da Poli (A) polimerase (PAP) de *T. brucei* e de *T. cruzi*.

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

O Papel da Molécula de RNA na Expressão gênica

A molécula de RNA possui considerável importância na perpetuação e manifestação de informação contida no genoma. RNAs são utilizados na replicação, transcrição, processamento, transporte e tradução. No controle da expressão gênica, RNAs reguladores participam na modulação da heterocromatina e da meia-vida e tradução de mRNAs.

Na maioria dos processos acima, as moléculas de RNA não se encontram livres, mas associadas a diversas proteínas que medeiam, por exemplo, o seu processamento, o seu transporte, o seu tempo de vida e a sua tradução. Estas proteínas são chamadas de proteínas de ligação ao RNA, ou RNAbps (*RNA binding proteins*).

O Reconhecimento do RNA por RNAbps

O RNA está quase que invariavelmente associado a proteínas. Algumas proteínas são capazes de reconhecer qualquer molécula de RNA pela simples presença da hidroxila 2' na ribose; outras são capazes de reconhecimento específico de um único RNA ou seqüências nele presentes. Proteínas de ligação a RNAs específicos podem reconhecer um único RNA através de estruturas secundárias derivadas do pareamento de bases complementares presentes na fita simples que levam à formação de, por exemplo, grampos e pseudo-nós (Cusack, 1999),

Em geral, as proteínas de ligação ao RNA apresentam estrutura modular (Varani e Nagai, 1998) e compartilham similaridade de seqüência podendo ser agrupadas em famílias de acordo com seus domínios funcionais e estruturais (Biamonti e Riva, 1994). Vários domínios já foram identificados e são utilizados inclusive na caracterização de RNAbps (Pérez-Cañadillas e Varani, 2001).

O domínio de ligação ao RNA (RBD)

O motivo de ligação a RNA mais comum nas proteínas já descritas é o do tipo RBD (*RNA binding domain*) também conhecido como RRM (*RNA recognition motif*). Este domínio consiste de uma região em torno de 80 aminoácidos contendo vários resíduos bastante conservados, alguns destes agrupando-se em dois pequenos submotivos, RNP-1 (octâmero) e RNP-2 (hexâmero) (Birney *et al.*, 1993). Este motivo pode estar presente em uma ou até quatro cópias em proteínas que apresentam diversas funções (Figura 3) que variam desde a biogênese do RNA mensageiro e do ribossomo até a seleção de sítios alternativos de *splicing* (revisto por Biamonti e Riva, 1994; Burd e Dreyfuss, 1994; Nagai *et al.*, 1995; Cusack, 1999 e Pérez-Cañadillas e Varani, 2001).

A estrutura terciária do domínio RBD da proteína A do complexo ribonucleoprotéico U1 que está envolvido em *splicing* foi determinada (Nagai *et*

al., 1990). Esta consiste em quatro folhas β -pregueadas antiparalelas agrupadas contra duas α -hélices orientadas perpendicularmente (Figura 3). Os dois submotivos ficam justapostos nas duas folhas β centrais onde fazem contato direto com a molécula de RNA (revisto por Varani e Nagai, 1998)

O domínio rico em arginina (*Arginin Rich Motif* - ARM)

O motivo rico em arginina consiste em uma pequena região compreendendo geralmente de 8 a 20 resíduos, contendo aminoácidos básicos, particularmente arginina. Apesar da preponderância dos resíduos de arginina, existe pouca identidade entre seqüências ARM (Tan e Frankel, 1995).

Este motivo já foi descrito em proteínas ribossomais, proteínas de superfície de vírus de genoma RNA e nas proteínas Tat e REV do vírus da imunodeficiência humana HIV (Lazinski *et al.*, 1989) Acredita-se que esse domínio tenha duas funções principais. A primeira deve-se à carga positiva da arginina que aumenta afinidade por RNA sem especificidade, facilitando a procura por sítios de ligação de alta afinidade. A segunda função seria realizar redes de ligação específica aos hidrogênios do esqueleto de ribose-fosfato da molécula de RNA, o que explicaria a preponderância de arginina, que possui um potencial maior de ligação a átomos de hidrogênio quando comparada à lisina (revisto por Burd e Dreyfuss, 1994).

O domínio rico em glicina (RGG)

O box RGG consiste num motivo de 20 a 25 aminoácidos tipicamente encontrado em combinação a outros tipos de domínios de ligação ao RNA. É definido pela repetição Arg-Gly-Gly (RGG) (revisto por Burd e Dreyfuss, 1994). Na proteína nucleolina, que apresenta quatro motivos RBP, a ligação específica ao RNA ribossomal requer estes domínios RBP; no entanto, o domínio RGG é responsável pelo aumento de sua afinidade pelo RNA (Ghisolfi, 1992).

O domínio de homologia K (KH)

O domínio de homologia K foi identificado a partir da proteína hnRNP K humana. É o segundo domínio de ligação a RNA mais comum. A estrutura de um dos domínios KH da proteína Nova, recentemente determinada, revelou que este domínio apresenta uma estrutura bastante parecida a do domínio RBD, sendo apenas menor. Este consiste de três folhas β -pregueadas suportadas por uma única α -hélice (revisto por Pérez-Cañadillas e Varani, 2001).

FMR1, proteína responsável pela síndrome do X-frágil, é uma proteína de ligação a RNA e apresenta 2 domínios KH, além de 1 box RGG (Siomi, 1993)

O domínio de ligação a RNA dupla-fita (*double strand RNA binding motif* - dsRBM)

Algumas proteínas de ligação a RNA têm em comum uma ou mais cópias de uma região de aproximadamente 70 aminoácidos que liga RNA fita dupla (Burd e Dreyfuss, 1994). Recentemente, esta estrutura dsRBM foi determinada em duas diferentes proteínas utilizando duas técnicas diferentes. A estrutura cristalizada da proteína de ligação ao RNA A de *Xenopus laevis* (Xlrbpa) ligada ao RNA fita dupla foi determinada por cristalografia de raio X (Ryter e Schultz, 1998) e o terceiro dsRBD da proteína Staufen de *Drosophila* ligada a um grampo (*hairpin*) de RNA foi determinado por NMR (Ramos, *et al.* 2000). Este domínio é capaz de ligar somente o RNA fita dupla e não é capaz de se ligar ao DNA fita dupla nem RNA fita simples. Duas alças básicas altamente conservadas ordenadas no complexo Staufen-RNA são responsáveis pela discriminação entre RNA fita dupla e DNA fita dupla (Ramos, *et al.* 2000). No entanto ainda são necessários experimentos que expliquem e comprovem a organização dos complexos RNP formados por proteínas com múltiplos domínios dsRBD (revisto por Pérez-Cañadillas e Varani, 2001)

RNAbp's e os modelos tripanosomatídeos

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

Em 1998, Manger e Boothroyd identificaram em *T. brucei* RRM1, uma proteína essencial de localização nuclear, cujo gene apresenta três domínios RBD arranjados em tandem (Manger e Boothroyd, 1998) e cuja função ainda é desconhecida (Manger e Boothroyd, 2001). Em 2001, Xu *et al.* identificaram em *T. cruzi* a proteína XB1 utilizando um sistema de três híbridos em levedura que selecionava proteínas que interagem com o siRNA (mini-exon) (Xu *et al.*, 2001). Em 2001, D'Orso e Frasch descreveram a proteína TcUBP-1, que apresenta os domínios de ligação ao RNA do tipo RBD e RGG, e é regulada ao longo do ciclo. TcUBP-1 é capaz de formar um complexo ribonucleoprotéico com TcUBP-2 e TcPABP e é capaz de ligar regiões da molécula de RNA ricas em adenosina uridina (ARE), diminuindo conseqüentemente a meia-vida dos RNAs mensageiros de TcSMUG (D'Orso e Frasch, 2002)

As proteínas de ligação à cauda poli(A), altamente conservadas em eucariotos, também foram identificadas em tripanossomatídeos, tanto em *T. cruzi* (Batista *et al.*, 1994) quanto em *T. brucei* (Pitula *et al.*, 1998). Batista *et al.* identificaram em *T. cruzi* PABP1, a partir de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose poli(A). Zhang e Williams identificaram três proteínas de ligação ao RNA através da afinidade por ssDNA (Zhang e Williams, 1997). Uma

delas demonstrou ser a ortóloga em *T. brucei* de PABP 1 (Pitula *et al.*, 1998) enquanto as outras duas, denominadas Tbp34 e Tbp37, demonstraram ligação ao RNA ribossomal 5S (Pitula *et al.*, 2002a). As proteínas Tbp34 e Tbp37 são altamente homólogas entre si à exceção de uma inserção de 18 aminoácidos em Tbp37. Três grandes motivos puderam ser determinados: um domínio N-terminal rico em alanina, prolina e lisina, um domínio e meio interno de ligação ao RNA do tipo RBD e uma região repetitiva C-terminal KKDX (Zhang e Williams, 1997) A expressão destas proteínas é regulada durante o desenvolvimento, sendo Tbp34 predominantemente presente na forma procíclica e Tbp37 presente quase que exclusivamente na forma sangüínea do parasito (Zhang *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

O *Trypanosoma cruzi* tem um ciclo de vida complexo com diferentes tipos celulares adaptados a dois hospedeiros diferentes: o hospedeiro invertebrado, inseto da família Reduviidae e o hospedeiro vertebrado. Desta forma, a expressão de diversos genes deve ser regulada especificamente ao longo do ciclo do parasita permitindo a sua adaptação a diferentes ambientes. O controle da expressão gênica em tripanossomatídeos é basicamente pós-transcricional com a presença de várias proteínas de ligação a RNA agindo em *trans* desde o processamento dos RNAs mensageiros (Xu *et al.* 2001) até a sua tradução (Pitula *et al.*,2002a) e atuando também no controle da meia-vida da molécula de RNA (D'Orso e Frasch, 2001b e 2002). Por isso, a identificação de proteínas que se ligam a RNA em tripanossomatídeos é de importância central para a compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica destes organismos. Assim, os objetivos deste trabalho são:

Objetivo Geral

- ✓ Identificar e caracterizar em *Trypanosoma cruzi* proteínas que apresentavam domínios de ligação a RNA do tipo RBD.

Objetivos Específicos

- ✓ Identificar os genes *TcRBP1* e *TcRBP2* em *T. cruzi* CL brenner;
- ✓ Caracterizar o arranjo genômico de *TcRBP1* e *TcRBP2* em *T. cruzi*;
- ✓ Verificar a expressão de *TcRBP1* e *TcRBP2*;
- ✓ Estudar a possível regulação da expressão de *TcRBP1* e *TcRBP2* nos diferentes tipos celulares do parasito;
- ✓ Determinar a localização celular de *TcRBP1* e *TcRBP2*;

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos

Cepas de *Escherichia coli*

DH5 α F'IQ (Hanahan, 1983)

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

BL-21 (Studier e Moffatt, 1986)

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

Oligonucleotídeos

- RBP-RACE 5'- CAU CAU CAU CAU CAA gAC gAC TCC gAA g –
3'
- RBP-Eco 5'- CAC Cgg AAT TCA TgC CCg CCA AgT CTg CCA
AC – 3'
- RBP-Not 5'- AAg gAA AAA AgC ggC CgC TTA CTT CgT gTg
gTT CTT – 3'
- RBP-NH₂ 5'- CgC ggA TCC ggC AgA CTT ggC ggg CAT – 3'
- RBP-COOH 5'- CCg gAA TTC AAg AAC CAC ACg AAg TAA – 3'
- COOHBP – 5'- CAU CAU CAU CAU AAg AAC CAC ACg AAg TAA
RACE – 3'
- Tcp14 – NH₂ 5'- CgC gCg gAT CCg ATA CAA TCg CCg TAC AT –
3'
- ME-CRUZI ggA Tgg AAT TCA gTT TCT gTA CTA TAT Tg

Clones Utilizados

Nome	Origem-	Nº Acesso GenBank	Tamanho do inserto	Vetor
40°22	Porcel, B. <i>et al</i> , 2000a	AW329912	1Kb	pT7T3
18h2	Porcel, B. <i>et al</i> , 2000a	AW324803	1Kb	pT7T3
InterRBPs	-	-	1,3Kb	pBluescript II KS
ME/Tcp14	-	-	600pb	pBluescript II KS
RBP1/GST	-	-	800pb	pGEX 4T1
RBP2/GST	-	-	800pb	pGEX 4T1

Meios de cultura

- Meio LIT (Infusão de fígado-tripticase)
 - NaCl 75mM
 - KCl 5,4mM
 - Na₂HPO₄(12H₂O) 62mM
 - Glicose 0,2%
 - Bacto-triptona 0,5%
 - Infusão de fígado 0,5%
 - pH ajustado a 7,2 com NaOH 1N

- Meio LB (Luria Bertani)
 - Bacto-triptona 1%
 - Extrato de levedura 0,5%
 - NaCl 85mM
 - pH ajustado a 7 com NaOH 5N

- Meio LB-agar
 - Meio LB
 - Agar 1,5%p

- Meio 2xYT-G
 - Bacto-triptona 1,6%
 - Extrato de Levedura 1%

NaCl 86mM
Glicose 2%
pH ajustado a 7 com NaOH 5N

Todos os meios de cultura eram autoclavados a 120°C por 20 minutos

Soluções:

- Acri-bis 30%
 - Acrilamida 29,2% (w/v)
 - Bisacrilamida 0,8% (w/v)
- GET
 - Tris-HCl pH8,0 25mM
 - EDTA 10mM
 - Glicose 50mM
- MOPS 10x
 - MOPS 20mM
 - Acetato de sódio 5mM
 - EDTA 1mM
 - pH ajustado a 7,5
- PBS
 - NaCl 140mM
 - KCl 2,7mM
 - Na₂HPO₄ 8mM
 - KH₂PO₄ 1,5mM
 - Glicose 5,5mM
 - pH ajustado a 7,5
- PBS-T
 - PBS 1x
 - Tween 0,05% (v/v)
- Solução de Azul de Comassie
 - Metanol 45% (v/v)
 - Ácido acético 10% (v/v)
 - Azul de comassie R250 0,2% (w/v)
- Solução de bloqueio
 - PBS-T
 - 0,05% leite em pó Molico
- Solução de Denhardt 5x
 - Ficol 400 1% 50x
 - Polivinilpirrolidona 1%
 - BSA 1%

- Solução de desnaturação NaOH 0,5M
NaCl 1,5M
- Solução de extração de RNA 1 Solução de hidrocloreto de guanidina
99,92% (V/V)
2-mercaptoetanol 0,08% (V/V)
- Solução de extração de RNA 2 Solução de Isotiocianato de guanidina
92% (V/V)
2-mercaptoetanol 8% (V/V)
- Solução de hidrocloreto de guanidina Hidrocloreto de guanidina 6M pH 7,5
EDTA 25mM
- Solução de isotiocianato de guanidina Tris-HCl 50mM pH 7,5
Isotiocianato de guanidina 4M
EDTA 25mM
- Solução de lavagem 1 SSC 1% (v/v)
SDS 0,1% (v/v)
- Solução de lavagem 2 SSC 0,1% (v/v)
SDS 0,1% (v/v)
- Solução de neutralização Tris-HCl pH 8,0 0,5M
NaCl 1,5M
- Solução de pré-hibridização Formamida 50% (v/v)
DNA de esperma de salmão 100ng/mL
Tampão fosfato 50mM
SSC 5x
Denhardt 5x
- Solução de ressuspensão Tris-HCl 50mM pH 7,5
EDTA 2mM
NaCl 0,1M
- Solução de transferência Glicina 190mM
Metanol 20%(v/v)
Tris 25mM
- Solução de vermelho de Ponceau Vermelho de Ponceau 0,025% (w/v)
Ácido Tricloroacético 3%
- Solução descorante para SDS-PAGE Metanol 5% (v/v)
Ácido acético 7%(v/v)

➤ Solução encolhedora para SDS-PAGE	Metanol 65%(v/v) Glicerol 0,5%(v/v)
➤ SSC 10x	NaCl 3M Citrato de Sódio 0,3M
➤ Tampão de Amostra para gel de agarose 6x	Azul de bromofenol 0,025%(w/v) Xileno-cianol 0,025%(w/v) Glicerol 30%(v/v)
➤ Tampão de amostra de RNA	Formamida deionizada 50%(v/v) Formaldeído 6%(v/v) tampão MOPS 1x
➤ Tampão de amostra de proteína 6x	SDS 2%(v/v) DTT 10mM Azul de bromofenol 0,02%(w/v) Glicerol 10%(v/v)
➤ Tampão Fosfato 10x	Na ₂ HPO ₄ 0,3mM Na H ₂ PO ₄ 5mM NaCl 72,6mM
➤ Tampão Tris-Glicina	Tris-HCl 0,1M Glicina 0,7%(v/v)
➤ TBE	Tris-borato 90mM EDTA 1mM pH8,0 pH ajustado a 7,5
➤ TE-4	Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA 0,1mM
➤ TE	Tris-HCl 10mM pH8,0 EDTA 1mM
➤ TNE	Tris-HCl 1M pH 7,6 NaCl 5M EDTA 0,5M pH8,0

Cultura de Tripanossomatídeos

Utilizamos células de *Trypanosoma cruzi* das cepas CL e Y e os clones de *T. cruzi* CL Brenner (Cano *et al.*, 1995) e Dm28c (Contreras *et al.*, 1988). Formas epimastigotas eram mantidas em meio LIT (Camargo, 1964) a 29°C, com repiques semanais para a densidade populacional de 1×10^7 células/mL. Foram utilizadas também células de *Trypanosoma brucei* cepa 427, *Leishmania braziliensis* e *Crithidia fasciculata*.

Extração de Ácidos Nucléicos

Extração de DNA de *Trypanosoma cruzi*

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

Extração de RNA total de *Trypanosoma cruzi*

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

Obtenção de Extratos Celulares de tripanossomatídeos

As células eram primeiramente contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as mesmas eram sedimentadas através de centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm. O sedimentado era lavado com PBS e as células ressuspensas em tampão de amostra de proteína 2x para uma concentração de 10^5 células/ μ L. Os extratos celulares totais eram aliquoteados e armazenados a -20°C até a sua utilização (Sambrook *et al.*, 2001).

Clonagem de fragmentos de DNA em cepas de *E. coli*

Indução de competência em *E. coli*

A cultura bacteriana era inoculada, com alça de platina ou ponteira estéril, diretamente do estoque congelado em 3mL de meio LB e cultivada por 18 horas sob agitação a 37°C. Em seguida, a cultura era repicada retirando-se 1mL e inoculando-se em 50mL de meio LB. A cultura era cultivada até que

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

Transformação bacteriana

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

Extração de DNA plasmidial em pequena escala

As bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse eram cultivadas em 2mL de meio LB com ampicilina a 50µg/mL por toda a noite sob agitação a 37°C. As células eram posteriormente sedimentadas por

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

Eletroforeses

Eletroforese de DNA em gel de agarose

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

Eletroforese desnaturante de RNA em gel de agarose

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

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

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

Para a montagem do gel de separação, preparava-se uma solução contendo acri-bis 12-16%, TrisHCl pH8,8 0,375M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1% e vertia-se em aparato apropriado para eletroforese vertical. Cobria-se o gel com 1mL de H₂O e deixava-se polimerizando por 30 minutos. Após a polimerização, retirava-se a H₂O com uma folha de papel de filtro e cobria-se o gel de separação com a solução para o gel de empacotamento que continha acri-bis 4%, Tris HCl pH6,8 0,125M, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED 0,1%. Colocava-se o pente e deixava-se polimerizando por 30 minutos.

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

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

Após a corrida eletroforética, os géis eram corados e fixados mergulhando-os em solução de Azul de Coomassie por no mínimo 4 horas. Posteriormente, os géis eram mergulhados na solução descorante até que o fundo do gel clareasse e as bandas pudessem ser visualizadas com nitidez. Para a secagem do gel, este era mergulhado em solução encolhedora por 1

hora e posteriormente colocado entre duas folhas de papel celofane presas a grampos por aproximadamente 48hs (Weber e Osborne, 1969).

Transferência de macromoléculas para membranas

Transferência de DNA para membranas de *nylon* – *Southern blot*

O gel de agarose previamente corado com brometo de etídeo era mergulhado em solução de desnaturação e deixado por 30 minutos sob agitação. Posteriormente, esta solução era desprezada e o gel era mergulhado em solução de neutralização por 30 minutos.

Para a transferência, uma cuba de transferência era devidamente preenchida com SSC 10x e o gel era colocado invertido sob a cuba seguido pela membrana de *nylon* previamente mergulhada em SSC 10x por 10 minutos e devidamente marcada para orientação posterior. A membrana era coberta com um volume de 5 cm de papel de filtro e guarnecida com um peso de papel. Toda a cuba era coberta com filme plástico e a transferência se dava por 18 horas à temperatura ambiente.

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

Transferência de RNA para membranas de *nylon* – *northern blot*

Os géis de agarose de RNA para transferência eram sempre feitos em duplicata. Uma cópia era corada com brometo de etídeo e a outra usada para transferência sem tratamento prévio. A transferência de dava sob as mesmas condições dos géis de agarose para DNA.

Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose – *western blot*

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

A transferência se dava em aparato apropriado para eletrotransferência. O gel e a membrana de nitrocelulose eram posicionados entre duas folhas de papel de filtro e este conjunto era fixado em grades especiais. O aparato era mergulhado em solução de transferência de forma que o gel ficasse no pólo negativo e a membrana no pólo positivo. A transferência das proteínas para a membrana acontecia a 50mA constantes por 16 horas a 4°C.

A membrana era armazenada a -20°C até a sua utilização. A verificação da transferência era feita através da coloração da membrana com solução de vermelho de Ponceau. A membrana era mergulhada nesta solução por 5 minutos e o excesso de corante retirado com PBS até a visualização das bandas (Sambrook *et al.*, 2001.).

Hibridização a sondas moleculares

Marcação de sondas por iniciação randômica

Os clones utilizados como sonda eram previamente digeridos com enzimas de restrição para a liberação do inserto. Após a digestão, o inserto era purificado através de eletroforese em gel de agarose de onde a banda relativa ao inserto era excisada e purificada com o kit *Consert™ Gel Extraction Systems*, da GibcoBRL. O material eluído era posteriormente dosado em espectrofotômetro a 260nm

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

Reação de hibridização à sonda homóloga

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

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

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

Imunoblot

A membrana contendo as proteínas transferidas do gel de poliacrilamida com SDS era mergulhada em solução de bloqueio e mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, retirava-se a solução de bloqueio inicial e adicionava-se nova solução de bloqueio contendo o anticorpo primário, diluído 800 vezes. A incubação se dava a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora quando a membrana era, então, lavada por duas vezes com PBS-T por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. À membrana, então, adicionava-se nova solução de bloqueio, desta vez contendo o anticorpo secundário, anti -IgG de coelho conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*). A incubação e a lavagem ocorriam da mesma forma que com o anticorpo primário.

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

Reação de digestão com enzimas de restrição

Digestão total de DNA genômico

5 μ g de DNA genômico eram misturados a 20U de enzima da restrição de interesse, a tampão de reação 1x que acompanha a enzima e mantidos a 37°C por 18 horas. Posteriormente o DNA era precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto.

Digestão Parcial de DNA genômico

5 μ g de DNA genômico eram misturados a diferentes concentrações de enzimas de restrição (0,1U/ μ g, 1U/ μ g, 2U/ μ g e 4U/ μ g) As amostras eram incubadas a 37°C por 30 minutos e posteriormente precipitadas com adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. Um controle positivo era feito com 4U de enzima de restrição para cada μ g de DNA com incubação a 37°C por 2 horas.

Obtenção dos clones

Reação em Cadeia da Polimerase

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

Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose

O fragmento de DNA era purificado do gel pelo *Kit Consert Gel Extraction System* da GibcoBRL® de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de ligação do vetor ao produto de PCR

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

Sequenciamento de DNA

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

Produção de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes eram purificadas de acordo com as recomendações do fabricante com algumas modificações (*Bulk GST Purification Modules – Amershan Pharmacia®*). Os clones recombinantes de *E. coli* eram inoculados em 4mL de meio 2xYT-G contendo 100 μ g/mL de ampicilina e cultivados por 18 horas sob agitação a 37°C. Posteriormente, o volume era elevado adicionando-se 36mL de meio 2xYTG – Ampicilina e a cultura era crescida sob as mesmas condições até que atingisse Abs_{600nm} 1-2 quando então era adicionado IPTG para uma concentração final de 0,1 μ g/mL. A indução da expressão da proteína de fusão se dava por 3 horas e 30

minutos. A cultura era, então, centrifugada a 5000rpm em rotor SS-34 (Sorvall) por 10 minutos e o sedimentado de bactérias era ressuspenss em 3mL de solução de ressuspensão. Adicionava-se lisozima para uma concentração final de 10µg/mL e deixava-se sob agitação a 30°C por 15 minutos. Adicionava-se então triton X-100 para concentração final de 1% e incubava-se em gelo por 30 minutos. Centrifugava-se por 10 minutos a 12.000 rpm para retirada dos debris celulares e transferia-se o sobrenadante para outro tubo. Ao sobrenadante adicionava-se a matriz glutationa sefarose preparada de acordo com o kit *Bulk GST purification module*, da Amersham Pharmacia® e deixava-se sob agitação por 20 minutos. A retirada da proteína recombinante se dava por uma das duas formas: ou a proteína de fusão era eluída 3 vezes com tampão de eluição acrescido de NaCl 0,2N por 10 minutos, ou adicionava-se 90µL de tampão PBS à matriz juntamente com 10U de trombina e deixava-se sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente.

Imunofluorescência

As células eram contadas em câmara de Newbauer, lavadas com PBS e ressuspensas em solução contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,32%. A fixação se dava por 30 minutos a temperatura ambiente, quando um volume contendo 10⁶ células era colocado sobre lamínulas novas e secas previamente tratadas. O tratamento das lamínulas consistia em lavagem com acetona, e tratamento com poli-L-lisina por 30 minutos a temperatura ambiente. As lamínulas eram posteriormente lavadas com PBS e secas em estufa a 37°C. A adesão das células às lamínulas se dava a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos.

Para a permeabilização das células, as lamínulas contendo as células aderidas eram mergulhadas em acetona gelada, mantidas a 4°C por 10 minutos e posteriormente lavadas com PBS, quando eram tratadas com Cloreto de amônio 150mM por 20 minutos. Após lavagem das lamínulas com PBS, estas eram tratadas com solução contendo PBS 1x e BSA 3% por 16 horas a 4°C. RNase A para concentração de 20µg/mL era adicionada à

solução de PBS/BSA e as lamínulas mantidas em estufa a 37°C por 1 hora. Após retirada da solução PBS/BSA/RNase, com a solução PBS/BSA, adicionava-se a solução contendo o anticorpo antip34p37 diluído 100x em PBS. A reação de ligação antígeno-anticorpo se dava a temperatura ambiente por 1 hora. As lamínulas eram lavadas com PBS e tratadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à fluoresceína diluído 500x e com iodeto de propídio 10µg/mL por 1 hora a temperatura ambiente em ambiente de iluminação indireta. As lâminas eram montadas colocando-se sobre elas 1 gota de N-propil galacto e posteriormente a lamínula era selada com esmalte. As lâminas prontas eram congeladas a -20°C protegidas da luz. A análise das lâminas foi feita em microscópio confocal de fluorescência em colaboração com o Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer/IBCCF.

RESULTADOS

Identificação de *TcRBP 1* e *TcRBP 2*

A Iniciativa Genômica de *T. cruzi* permitiu a disponibilização de vários marcadores de seqüências expressas (ESTs) nos bancos de dados oriundos do clone CL Brener (The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium, 1997). A análise de seqüências deste banco nos permitiu a identificação de diversos clones que apresentavam homologia a dois genes de *T. brucei* previamente identificados, Tbp34 e Tbp37, que codificam proteínas de ligação a RNA (Zhang e Williams, 1997). Os insertos destes clones foram completamente seqüenciados. As seqüências de nucleotídeos obtidas nos permitiram a sua classificação em dois grupos distintos. Um destes grupos correspondia à seqüência do clone 40o22 e o outro à do clone 18h2 (números de acesso ao GenBank AW329912 e AW324803, respectivamente) que foram tomados como modelo.

As seqüências destes clones contêm a fase aberta de leitura (ORF) completa de dois genes, além de parte da seqüência mini-exon e da região 3' não-traduzida (3'UTR) (Figura 1).

A seqüência obtida para o clone *TcRBP1* contém 905 pares de base, sendo 51 pares de base de região 5'UTR, 18 pares de base de região 3'UTR e 792 pares de base de região codificante para uma proteína de 263 aminoácidos. O clone *TcRBP2* apresentava 863 pares de base, sendo 39 pares de base de região 5'UTR, 26 pares de base de região 3'UTR e 768 pares de base de região codificante para uma proteína de 255 aminoácidos (Figura 1).

As duas ORFs se mostraram altamente homólogas com identidade de nucleotídeos de 88,2% (Figura 2_(A)). Assim, foram nomeadas *TcRBP1* e *TcRBP2* de *Trypanosoma cruzi RNA binding protein* de acordo com a nomenclatura definida no *Woods Hole Molecular Parasitology Meeting*, Massachusetts, USA (Clayton *et al.*, 1998).

A comparação das regiões 5' não-traduzidas mostrou dois sítios de inserção de mini-exon diferentes para os dois genes (Figura 2_(A)), como também

A

```

1          gcaacgaggggtttcttggtaactatattgcaattt
33 agcaataacttcgacctcgaacttcgagtaataaaatcaaggaagc
78 ATGcccgccaagtctgccaacaagcctgcacccaagcctgccaac
M P A K S A N K P A S K P A N
123 aagcctgcaccaagcctgccgccaagcccgcctgccaagcctgcc
K P A P K P A A K P A A K P A
168 gccaaaggctcccgcaccgaaggcggagaagaagggcgctgccaag
A K A P A P K A E K K G A A K
213 gccccgcacccaaagctgctgcggtgcgccaagcccgcctgtg
A P A P K A A A A A P K P A V
258 agggacgcaaagcagcgcttctgatgccgccaatcacaacgcttg
R D A K Q R S D A A N H N G L
303 tacgtgaagaactggggccagggtttctgtggacgacgccaggcg
Y V K N W G Q V F C G R R Q A
348 ctttttggcactgctgggaaggttgtgggtgtgagagtgcctcgt
L F G T A G K V V G V R V R R
393 cgccgttacgccattatcttttctttgagaacgcagcggctgtgaag
R R Y A I I F F E N A A A V K
438 aaggcattgattttctcaacgggaaagaatattatgggcaatgtt
K A I D F L N G K E F M G N V
483 ttgtccgttgttcccgccaagacgactccgaagccggatccgcat
L S V V P A K T T P K P D P H
528 gcgaactcctctgttgtgtttgtttccccgatattccgcgcgtcg
A N S S V V F V S P I F R A S
573 actacaaagaagcagattcttgagcttttttcaggcatgaaggta
T T K K Q I L E L F S G M K V
618 ctgcgctgcgcacgtaccgcaacaactacgcatacgtctatctg
L R L R T Y R N N Y A Y V Y L
663 gacaccccgcctgccgcgcaaagggctgtgaaggagaagaacggt
D T P A A A Q R A V K E K N G
708 gcggagtccgtggcaagcaactcagagttgctctctcgactcgt
A E F R G K Q L R V A L S T R
753 tctcttgcaaggacagggctcgtgaggagcgtgcaagacttctt
S L A K D R A R A E R A R L L
798 atggccgccc aaagtccaacagagaaagaaccacacgaagtaaga
M A A Q S S T E K E P H E V R
843 gaggagtctgttttaattcatttttaaaatcttttttattcttttta
E E C C F N R L *
888 aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

B

```

1  atattgactttgacctcgaacttcgagtaataaaatcaaggaagc
50  atgcccgccaagtctgccacaagcctgcatccaagcccgctgcg
M P A K S A N K P A S K P A A
95  aagccagccgccaaggctcccgcgccgaaggcggagaagaagggc
K P A A K A P A P K A E K K G
140  gctgccaaggcccccgcaaccaaagctgctgccccctgctcccaag
A A K A P A P K A A A P A P K
185  gctgctgcggtgctgccccagcccgctgtgagggacgcaaagcaa
A A A A A P K P A V R D A K Q
230  cgctctgatgctgccaatcacaacggctgtacgtgaagaactgg
R S D A A N H N G L Y V K N W
275  ggccaggggtctgtggacgacgccagggcgctttttggcactgct
G Q G S V D D A R A L F G T A
320  gggaaggttgtgggtgtgagagtgcgtcgccgcttacgccatt
G K V V G V R V R R R R Y A I
365  atcttctttgagaacgcagcggctgtgaagaaggccattgatctt
I F F E N A A A V K K A I D L
410  ttcaacgggaaagaatattatgggcaatgttttgcggttgttccc
F N G K E F M G N V L S V V P
455  gccaaagacgactccaaagccggatccgcatgccaactcctctggt
A K T T P K P D P H A N S S V
500  gtggttgtttccccgatattccgcgcgctcgactacaagaagcag
V F V S P I F R A S T T K K Q
545  attcttgagcttttttcagggatgaaggactgcccctgcccacg
I L E L F S G M K V L R L R T
590  taccgcaacaactacgcatacgtctatctggacacccccgctgcc
Y R N N Y A Y V Y L D T P A A
635  gcgcaaagggctgtgaaggagaagaacgggtgcagagttccggtgc
A Q R A V K E K N G A E F R G
680  aagcaactcagagttgccctctcgaccggttctcttgccaaggac
K Q L R V A L S T R S L A K D
725  aaggctcgtgcggagcgtgcagacttcttaatggccgccccaaagt
K A R A E R A D F L M A A Q S
770  ttaaccagagaaagaaccacacgaagtaagagaggagtgtgttt
L T R E R T T R S K R G V L F
815  taattgtttttaatttttttattcttttttaaaaaaaaaaaaaaaaa
*
```

Figura 4 - Seqüência completa dos clones de cDNA *TcRBP1* e *TcRBP2* – Em A, seqüência de nucleotídeos completa do clone 40o22, mostrando a seqüência predita da proteína *TcRBP1*. Em B, clone 18h2 com a seqüência predita de *TcRBP 2*. Em verde parte da seqüência mini-exon; em vermelho códon de iniciação; em rosa, códon de terminação; em cinza, seqüências disponíveis no GenBank sob os números de acesso AW329912 e AW324803. Os nucleotídeos sublinhados indicam a região de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR. O sublinhado laranja indica a região dos oligonucleotídeos RBP-Eco e RBP-NH₂; o sublinhado roxo indica a região dos oligonucleotídeos RBP-Not, RBP-COOH e COOH-RACE. A caixa vermelha indica diferenças específicas na porção 3'. O asterisco indica o fim da proteína.

ocorre com os genes de *T.brucei*. Sítios alternativos de *trans-splicing* não foram investigados.

A região C-terminal da proteína TcRBP1 é um pouco maior que a da proteína *TcRBP2* (Figura 2_(A)). Esta diferença se deve à uma mutação que altera a fase de leitura (caixa vermelha na figura 2_(A)) e faz com que o códon de parada de *TcRBP1* seja 10 nucleotídeos acima de *TcRBP2*. Diversas diferenças de seqüência existem entre TcRBP1 e TcRBP2, sendo que algumas tornam as seqüências de aminoácidos destas proteínas diferentes. Estas diferenças se concentram na porção C-terminal e na região indicada pela chave azul na figura 2 (A e B).

A comparação das seqüências de aminoácidos preditas para os genes *TcRBP1* e *TcRBP2* mostrou identidade de 83,7%. A análise *in silico* das seqüências de *TcRBP1* e *TcRBP2* pelo programa PROSITE (www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite) nos mostrou a existência de dois domínios de ligação a RNA do tipo RBD nas duas proteínas (linhas laranja e azul na figura 2_(B)), além de um domínio C-terminal de localização para microcorpos em *TcRBP1* (caixa verde na figura 2_(B)).

A principal diferença encontrada entre as proteínas RBP foi uma deleção na porção N-terminal de *TcRBP2* tornando-a 6 aminoácidos menor do que *TcRBP1* (Figura 2_(B)). Uma deleção de 18 aminoácidos na porção N-terminal de Tbp34 de *T. brucei* também é observada levando à redução de seu tamanho em relação à Tbp37 (Figura 2_(B)).

A comparação entre as seqüências de aminoácidos preditas de *TcRBP 1* e *TcRBP 2* com as ortólogas em *T. brucei* (Figura 2_(B)) revelou alto grau de similaridade, com identidade de 50,8%. Assim como as proteínas de *T. brucei*, as proteínas RBP de *T. cruzi* apresentam uma região rica no aminoácido Alanina (Ala-rich) na porção N-terminal, onde *TcRBP1* apresenta uma inserção de 6 aminoácidos. As quatro proteínas apresentam também dois domínios de ligação a RNA do tipo RBD, onde está concentrada a maior parte da homologia. As proteínas Tbp34 e bp37 de *T.brucei* são maiores que as proteínas de *T. cruzi* apresentando respectivamente 262 e 279 aminoácidos. Esta diferença de tamanho se concentra na porção C-terminal onde as

A



```

rbp1      SCACGAGGGTTTCTGTACTATATTGCAATTTAGCAATACTTCGACCTCGAACTTCGAGT 60
rbp2      -----TACTATATTG-----ACTTTGACCTCGAACTTCGAGT 32

rbp1      AATAAAATCAAGGAAGCATGCCCGCCAAGTCTGCCAACAAGCCTGCATCCAAGCCTGCCA 120
rbp2      AATAAAATCAAGGAAGCATGCCCGCCAAGTCTGCCAACAAGCCTGCATCCAAGCCCGCTG 92

rbp1      ACAAGCCTGCACCCAAGCCTGCCGC---AAGCCCGCTGCGAAGCCTGCCGCAAGGCTC 177
rbp2      CGAAGCCAGCCGCAAGGCTCCCGCGCCGAAAGCGGAGAAAGAGGCGCTGCCAAGGCC 152

rbp1      CCGCACCGAAGGCGGAGAAGAAGGGCGCTGCAAGGCCCGCACCCAAAGCTGCTGCGG 237
rbp2      CCGCACCCAAAGC-----TGT---GCCCCGTGCCCAAAGCTGCTGCGG 194

rbp1      CTGCGCCCAAGCCCGCTGTGAGGGACGCAAAGCAGCGTCTGTATGCTGCCAATCACAACG 297
rbp2      CTGCGCCCAAGCCCGCTGTGAGGGACGCAAAGCAACGCTCTGTATGCTGCCAATCACAACG 254

rbp1      GCTTGTACGTGAAGAACTGGGGCCAGGTTTCTGTGGACGACGCCAGGCGCTTTTTGGC 356
rbp2      GCTTGTACGTGAAGAACTGGGGCCAGGTTCTGTGGACGACGCCAGGCGCTTTTTGGC 313

rbp1      ACTGCTGGGAAGGTTGTGGGTGTGAGAGTGCCTCGTCGCCGTTACGCCATTATTTCTTT 416
rbp2      ACTGCTGGGAAGGTTGTGGGTGTGAGAGTGCCTCGTCGCCGTTACGCCATTATCTCTTT 373

rbp1      GAGAACGCAGCGGCTGTGAAGAAGGCCATTGATTTTCTCAACGGGAAAGAATTTATGGGC 476
rbp2      GAGAACGCAGCGGCTGTGAAGAAGGCCATTGATCTTTCTCAACGGGAAAGAATTTATGGGC 433

rbp1      AATGTTTTGTCCGTTGTTCCCGCCAAGACGACTCCGAAGCCGGATCCGCATGCCAAGTCC 536
rbp2      AATGTTTTGTCCGTTGTTCCCGCCAAGACGACTCCAAAGCCGGATCCGCATGCCAAGTCC 493

rbp1      TCTGTTGTGTTTGTTCCTCCGATATTCCGCGCGTTCGACTACAAAGAAGCAGATTCTTGAG 596
rbp2      TCTGTTGTGTTTGTTCCTCCGATATTCCGCGCGTTCGACTACAAAGAAGCAGATTCTTGAG 553

rbp1      CTTTTTTCAGGCATGAAGGTACTGCGCCTGCGCACGTACCGCAACAACACTACGCATACGTC 656
rbp2      CTTTTTTCAGGCATGAAGGTACTGCGCCTGCGCACGTACCGCAACAACACTACGCATACGTC 613

rbp1      TATCTGGACACCCCCGCTGCCGCGCAAAGGCTGTGAAGGAGAAGAACGGTGCGGAGTTTC 716
rbp2      TATCTGGACACCCCCGCTGCCGCGCAAAGGCTGTGAAGGAGAAGAACGGTGCGGAGTTTC 673

rbp1      CGTGGAAGCAACTCAGAGTTGCTCTCTCGACTCGTTCTCTTGCGAAGGACAGGGCTCGT 776
rbp2      CGTGGAAGCAACTCAGAGTTGCTCTCTCGACTCGTTCTCTTGCGAAGGACAAGGCTCGT 733

rbp1      GCGGAGCGTGCAAGACTTCTTATGGCCGCCAAAGTTTCAACAGAGAAAGAACCACACGA 835
rbp2      GCGGAGCGTGCAAGACTTCTTAAATGGCCGCCAAAGTTTCAACAGAGAAAGAACCACACGA 793

rbp1      AGTAAGAGAGGAGTGCTGTTTTAATCGTTGTAAATTTTTTATCTTTTTTAAAAA 895
rbp2      AGTAAGAGAGGAGTGCTGTTTTAATGTTTAAATTTTTTATCTTTTTTAAAAA 852

rbp1      AAAAAAAAAA- 905
rbp2      AAAAAAAAAA 863

```


proteínas de *T.brucei* apresentam um sinal consenso de localização nuclear definido por Dingwall e Laskey em 1991 (caixa rosa na figura 2(B)).

Arranjo Estrutural dos genes RBP

Os genes *TcRBP1* e *TcRBP2* estão arranjos em tandem no genoma de *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de determinar o arranjo dos genes *TcRBP1* e *TcRBP2* no genoma do *T. cruzi*, realizamos experimentos de *Southern blot*. Para isso digerimos DNA genômico de *T. cruzi* com as enzimas de restrição mostradas na figura 3(A), escolhidas de acordo com a seqüência de nucleotídeos dos genes RBP e ao acaso dentre as enzimas que reconhecem seis nucleotídeos. Estes fragmentos foram separados em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo e posteriormente hibridizados a sonda *TcRBP1*. Dada a alta homologia apresentada pelas seqüências de nucleotídeos de *TcRBP1* e *TcRBP2* (88,2% de identidade), esta sonda é capaz de reconhecer ambos os genes. O resultado deste experimento é mostrado na figura 3.

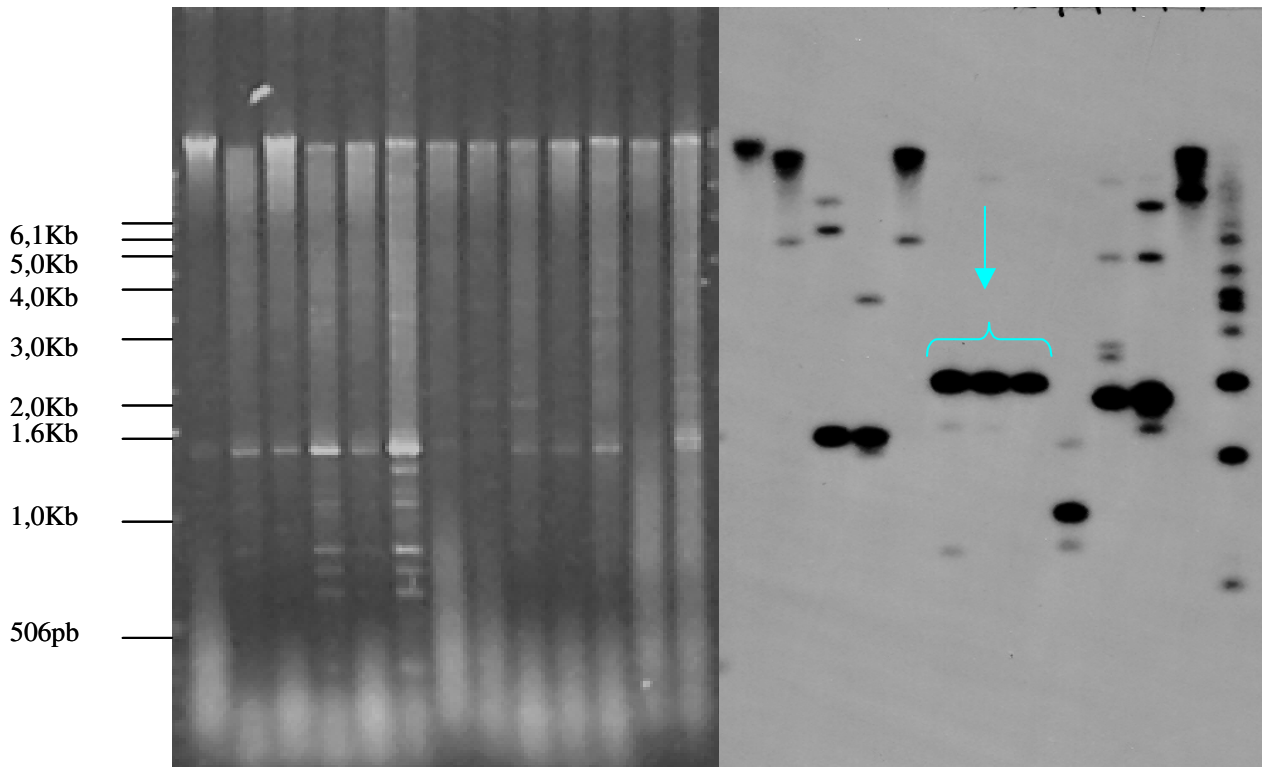
A observação de um fragmento de digestão produzido tanto pela enzima *Sall* quanto por *BamHI*, presente na região codificante dos genes RBP, que apresenta o mesmo tamanho de 2,1Kb nos sugere que estes genes estejam organizados em tandem no genoma de *T. cruzi*. (chaves azuis na Figura 3(A) e 3(B)). Este mesmo fragmento de 2,1 Kb também é gerado quando da dupla digestão *BamHI/EcoRI*. Como a região que compreende a sonda não possui sítio para a enzima *EcoRI*, este é provavelmente o mesmo fragmento gerado pela digestão somente com *BamHI*.

Baseado no tamanho da seqüência de nucleotídeos que codifica *TcRBP1* e *TcRBP2* e as distâncias dos sítios de *BamHI* e *Sall* pudemos verificar que a região intergênica é de aproximadamente 1,3Kb (Figura 2(B)).

Identificação e clonagem da região Intergênica (InterRBPs)

A

S E/S H E/H E E/B B S S/C C Nc/C Nc E9 S E/S H E/H E E/B B S S/C C Nc/C Nc E9



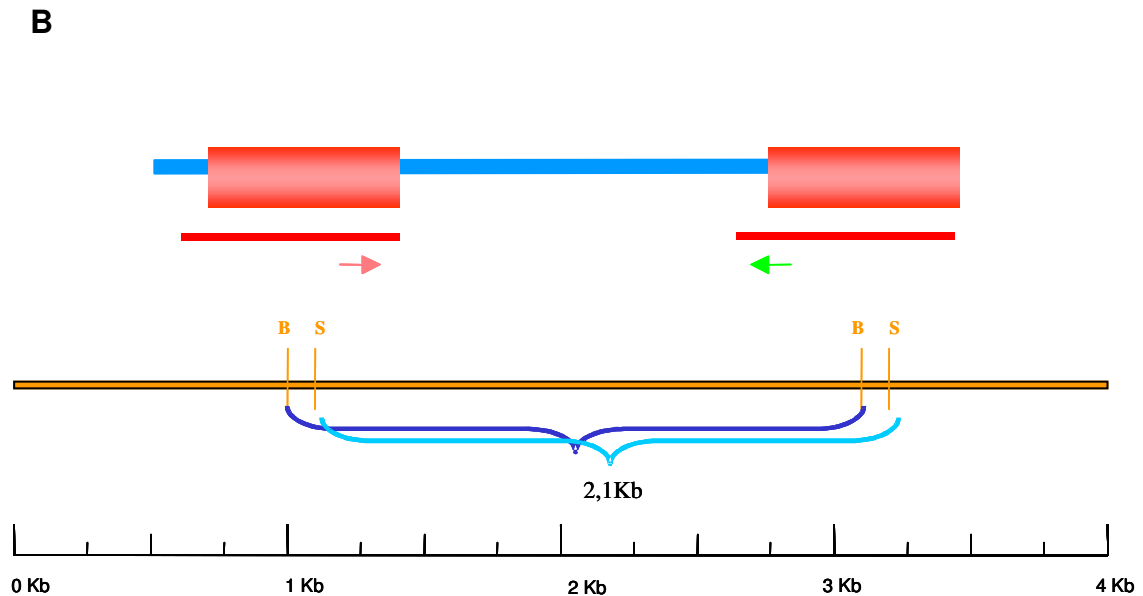


Figura 6 – Análise dos fragmentos de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* que contem os genes RBPs– Em A, Southern blot utilizando-se 5µg do DNA genômico de *T. cruzi* digerido com 4U/µg de diferentes enzimas de restrição utilizando-se o clone 40o22 como sonda. À esquerda gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, À direita autoradiografia. A seta azul aponta para os fragmentos de 2,1Kb obtidos com a digestão do DNA genômico por *Bam*HI e *Sal*I. Sc *Sac* I. E – *Eco*RI, H – *Hind* III, B – *Bam*H I, S – *Sal* I, C – *Cla* I, Nc – *Nco* I, E9 – *Eco* 0109IE. A esquerda, indicação do padrão de peso molecular 1Kb ladder, da GibcoBRL®. Em B, esquema mostrando o tandem verificado com a digestão por *Bam*HI e *Sal* I – Os retângulos vermelhos indicam *TcRBP1* ou *TcRBP2*; A barra mostarda, indica a posição dos sítios de *Bam*HI (B) e *Sal* I (S). As chaves azuis indicam os fragmentos 2,1Kb gerados pela digestão com *Bam*H1 e *Sal*I. As setas rosa e verde indicam os oligonucleotídeos RBP-COOHBP e RBP-NH₂, respectivamente.

Para validar a hipótese de que *TcRBP1* e *TcRBP2* estivessem arranjados em tandem no genoma de *T. cruzi*, clonamos a região intergênica empregando os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da região compreendida entre a região C-terminal do gene RBP e a região N-terminal do gene RBP seguinte. A PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos RBP-NH₂ e RBP – COOH (Figura 1) que pareiam na região codificante de ambos os genes RBP. Esta reação na presença de 100ng de DNA genômico gerou um fragmento de 1,3Kb e um outro de 600pb (Figura 4(B)).

Através da seqüência dos sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI acrescidos aos oligonucleotídeos utilizados na PCR, os fragmentos foram clonados em vetor pKS. Os clones obtidos foram seqüenciados. A seqüência de nucleotídeos do fragmento de 600pb revelou uma seqüência não relacionada à região de interesse. Um único clone do fragmento de 1,3Kb foi obtido e a seqüência do mesmo foi analisada. A análise revelou que este fragmento contém a porção 3'UTR e 5'UTR dos genes RBP e toda a região intergênica (Figura 4(A)) o que nos permitiu desenhar o esquema mostrado na figura 4(C).

A região InterRBPs apresenta um gene de função desconhecida

A análise da seqüência encontrada entre *TcRBP1* e *TcRBP2* revelou uma ORF, cuja seqüência predita contém 123 aminoácidos. Esta seqüência de nucleotídeos foi analisada no banco de dados de ESTs, o dbEST, e revelou homologia a um único clone de cDNA disponível: TENG0695.

Utilizando o programa TblastX (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), que é capaz de comparar as seis possíveis ORFs de uma determinada seqüência de nucleotídeos com as seis possíveis ORFs das seqüências disponíveis no banco de dados, pudemos concluir que esta ORF não apresenta homologia a nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados caracterizando-se assim, como uma ORF hipotética provavelmente exclusiva de *Trypanosoma cruzi*. Este possível gene foi nomeado *Tcp14*, de acordo com o peso molecular predito para a proteína (Figura 4(A)).

A

1 taagagaggagtgctggttcaattgtcaattttttat
 39 tctttttaatcttfaattttttcaactttcatctgtagcagttt
 84 tactttctacacgtgttgaatgagtataatctctctggtgcgc
 129 attgtttggtttttattccttctttatagtagtatgataac
 174 atataacgctatatacatgttctatatacgtgctgtgtacgcat
 219 gttatctttttagtggagctcttctgaatttacattgtgacgctg
 264 cacacggctgtgatgggcctgaaaaggccttaggcattgctgtgg
 309 agaaagccttctggtgtacgaggggttcttggctttgcaccggg
 354 tttacgacctgatcgtattccttccgaattgagggaaacgagttg
 399 aggcacngcctgtgaatcatcaaagccgtacgtcctttcgcgcc
 444 gcgtcagcggctctttcattgtcactgaaggctccatttctggtt
 489 gtgggtagcagagaggaggcgcgaaaatacggagccaatctctca
 534 ctttctcatgaagatgcagtgggtggtgcagtggcatggtgtgat
 579 aatgtgccattcgtttttggtatcgatgctggtgatgaaagcag
 624 ttagctcgtgttaggcgacgatttccccattttgcccgcgcttgc
 669 atgccctgttgtcagcctcgtatgttggacgccggtgaattgtg
 M P C C Q P R M L D A V E L L
 714 aaggtccagacgatgtacggcgattgtatcgatccttccgatgta
 K V Q T M Y G D C I D P S D V
 759 gttttggcacaacattggggccttcgagtggttgcgcaagctt
 V L A Q H W G L R E C C V K L
 804 gttggtattttggggcgtcattcccatttgactgcttctggtgg
 V G I L G R S F P F D C F R G
 849 cctatcgcgatgttttcccgagcgttttgaagcacacatcgtggga
 P I A M F P E R F E A H I V G
 894 agtggacgcgaggcactgccattctgctggtctccattcgaaact
 S G R E A L P F C W S P F E T
 939 tttttgtcactttttgcccccaagttgtgcggtgccattccgg
 F L S L F A P Q V V R L P F R
 984 gagcaaagaccctttgtgataattggtgggctgccttggcccta
 E Q R P V C D N W W A A L P L
 1029 aattttcattaaattttcattaactgggctgcttgcctaagtta
 N F H *
 1074 catcaaacactgcctctgatatgcatttatttagtgcttttgctgc
 1119 tatcgccacatgtttgtttgatgatactggtgcttgattgattgg
 1164 tgagagccgaaaaaactaacacgagaaacgaaaaaaaggtagaa
 1209 tgatgagaaaaaaatgggggtggtttttctgatttaaattgtcaa
 1254 ataccttacttttatgcctttttcttcatttgaacatatagcaat
 1299 ttagcaatacttcgacctcgacttcgagtaataaaatcaaggac
 1344 atg

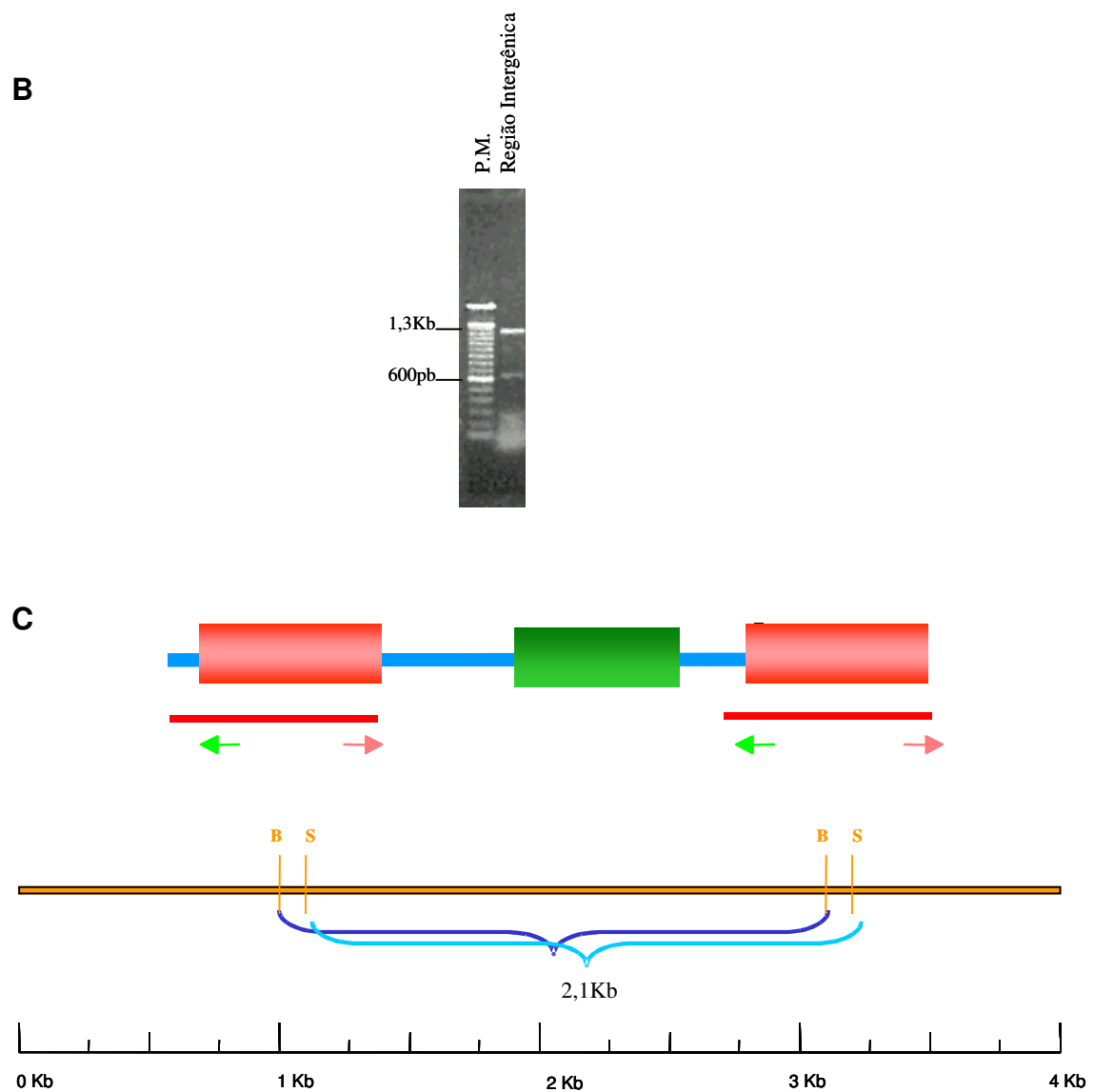


Figura 7 – Seqüência da Região InterRBPs – Em A, Seqüência obtida para o fragmento interRBPs. Em cinza região de homologia ao clone TENG0695 disponível no GenBank (AI664712); a região 5'UTR está indicada em amarelo e azul. Em azul, possíveis códons de terminação (TAA). Em vermelho, sítios de poliadenilação. **Em B, Amplificação da região intergênica** – Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo indicando o fragmento de 1,3Kb cuja seqüência está contida em A. Peso molecular: 100pb *ladder* GibcoBRL® **Em C, esquema indicando localização da ORF na região intergênica RBP e abordagem utilizada para a amplificação do fragmento InterRBPs.** O fragmento presente entre os genes RBPs foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos RBP-NH2(setas laranja) e RBP-COOH (setas verdes). O fragmento de 1,3Kb obtido foi clonado em vetor pBluescript II KS utilizando-se os sítios de restrição para BamHI e EcoRI presentes nos oligonucleotídeos. Os retângulos vermelhos, indicam os genes RBP, o retângulo verde indica região de homologia ao EST TENG 0695

A determinação dos diferentes sítios de poliadenilação e a confirmação do sítio de parada diferencial dos dois genes RBP se deu pela técnica de 3'RACE (GibcoBRL®) utilizando o oligonucleotídeo COOH-RACE indicado na figura 1. A reação de RT-PCR gerou um fragmento de 150 pb que foi clonado em vetor pAMP. Cinco clones foram seqüenciados e três diferentes sítios de poliadenilação foram identificados (nucleotídeos em vermelho na figura 4_(A)).

O arranjo em tandem é confirmado por mapa de restrição

Para confirmar o arranjo em tandem e a presença de uma ORF na região entre os genes que codificam TcRBP 2 e TcRBP 1, analisamos através de experimentos de *Southern blot* os fragmentos de DNA genômico digeridos por enzimas de restrição com uma sonda que revela somente o gene TcP14. A partir da análise dos fragmentos reconhecidos pela sonda TcRBP1 (Figura 3_(A)) e ME-TcP14 (Figura 5_(A)) montamos o mapa de restrição mostrado na figura 5_(B).

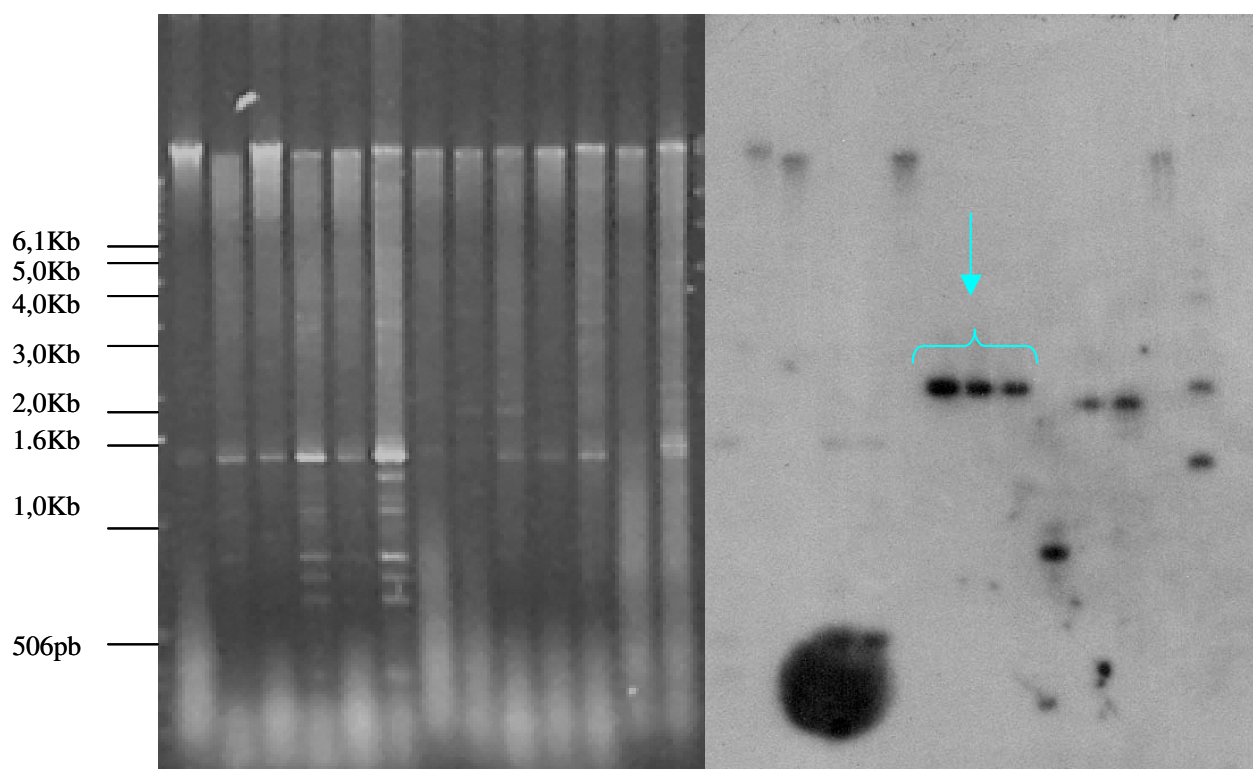
A sonda ME-TcP14 foi obtida através de experimento de RT-PCR utilizando-se um oligonucleotídeo específico para a região do mini-exon e um outro oligonucleotídeo interno a TcP14 (sublinhado vermelho na figura 4_(A)). O fragmento de 500pb obtido foi clonado em vetor pBluescript II KS e posteriormente sequenciado. Esta sonda contém a porção 5'UTR de TcP14 além de parte da seqüência codificante. (barra azul na figura 5_(B)).

***TcRBP1 e TcRBP2* apresentam-se em mais de 1 cópia no genoma de *Trypanosoma cruzi*.**

Com o objetivo de determinar, no genoma de *T. cruzi*, o número de cópias de genes RBP no tandem, realizamos experimentos de *Southern blot* utilizando digestão parcial do DNA genômico com enzimas de restrição. Para digestão parcial escolhemos o sítio de restrição para a enzima *Sal I*, que está unicamente representado na região codificante que compreende a sonda

A

S E/S H E/H E E/B B S S/C C Nc/C Nc E9 S E/S H E/H E E/B B S S/C C Nc/C Nc E9



B

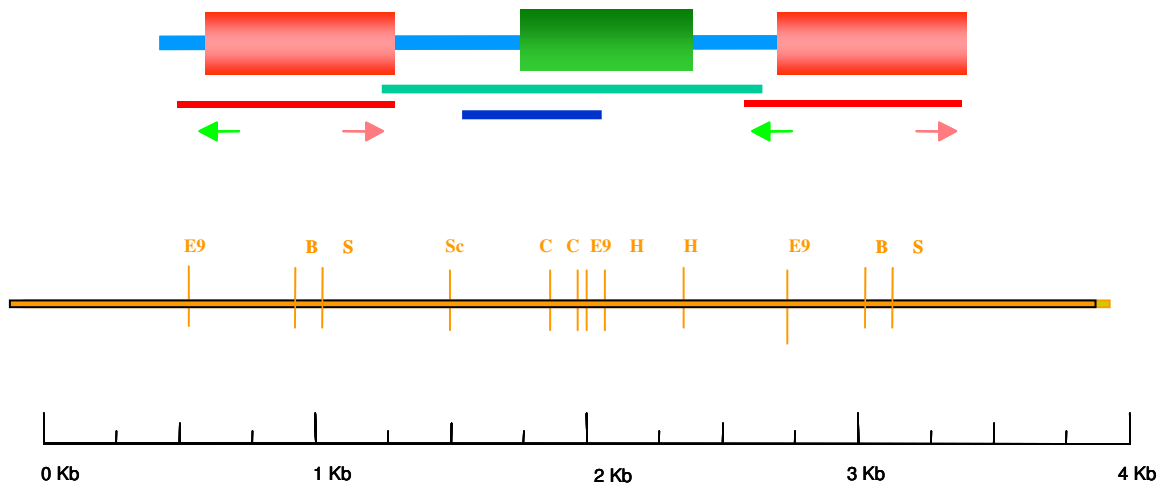


Figura 8 – Arranjo genômico dos genes *RBP*– Em A, *Southern blot* utilizando-se 5µg do DNA genômico de *T. cruzi* digerido com 4U/µg de enzima de restrição. À esquerda gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo; À direita autoradiografia de hibridização com a sonda ME-Tcp14. A seta e a chave azul indicam os fragmentos de 2,1Kb. Sc *Sac* I, E – *Eco*RI, H – *Hind* III, B – *Bam*H I, S – *Sal* I, C – *Cla* I, Nc – *Nco* I, E9 – *Eco* 0109IE. Os pesos moleculares estão indicados a esquerda. **Em B, esquema indicando as sondas utilizadas e o mapa de restrição obtido - Os retângulos vermelhos, indicam os genes RBP, o retângulo verde indica região de homologia ao EST TENG 0695, as barras indicam as sondas: em vermelho sonda TcRBP1; em verde, sonda InterRBPs, em azul, sonda ME-Tcp14 Em verde região compreendida pela sonda InterRBPs. Em azul a região compreendida pela sonda ME - Tcp14. A barra mostarda indica a posição dos sítios de restrição para as enzimas indicadas em A.**

TcRBP1. Assim, variamos a concentração da enzima de restrição e o tempo da reação de digestão.

O filtro contendo os fragmentos parcialmente digeridos foi hibridizado com a sonda *TcRBP1* (Figura 6_(A)). Podemos observar um fragmento de 2,1Kb, além de outros fragmentos de 4,2kb, 6,3Kb, 8,4Kb e 10,5Kb, tamanhos múltiplos de 2,1Kb. O fragmento de 2,1Kb compreende a digestão completa do DNA genômico também observado nas figuras 3_(A) e 5_(A). A figura 6_(A) mostra o resultado obtido para a sonda InterRBPs (Seqüência na Figura 4_(A) e barra verde na figura 4_(B)).

O mesmo resultado obtido para as duas sondas já citadas foi também encontrado para a sonda ME/*Tcp14* (barra azul na figura 5_(B)) que não apresenta as regiões não traduzidas dos genes RBPs e quando a digestão parcial se dava com a enzima *Bam*HI, que assim como *Sal*I está unicamente representada nos genes RBP (resultados não mostrados).

A presença de pelo menos 8 fragmentos detectáveis nas raias de digestão parcial nos sugere a ocorrência de pelo menos sete cópias de genes RBP no genoma. Este arranjo está esquematizado na figura 6_(B).

Expressão dos Genes RBP

RNA mensageiros dos genes RBP são detectados nas três formas de *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de determinar o padrão de expressão gênica destes genes, verificamos a abundância relativa de RNAs mensageiros dos mesmos através de *northern blot* utilizando RNA total extraído das três diferentes formas de *T. cruzi* (Figura 7). As formas esferomastigotas foram obtidas de cultura axênica (Rondinelli *et al.*, 1988) e as formas tripomastigotas metacíclicas foram purificadas em coluna de troca iônica (Al Albassy *et al.*, 1972). Pudemos com isso verificar que a sonda *TcRBP1* é capaz de reconhecer transcritos de 1Kb, nas raias correspondentes a RNA totais das formas esferomastigotas, tripomastigotas metacíclicas, e epimastigotas. Esta sonda é capaz de

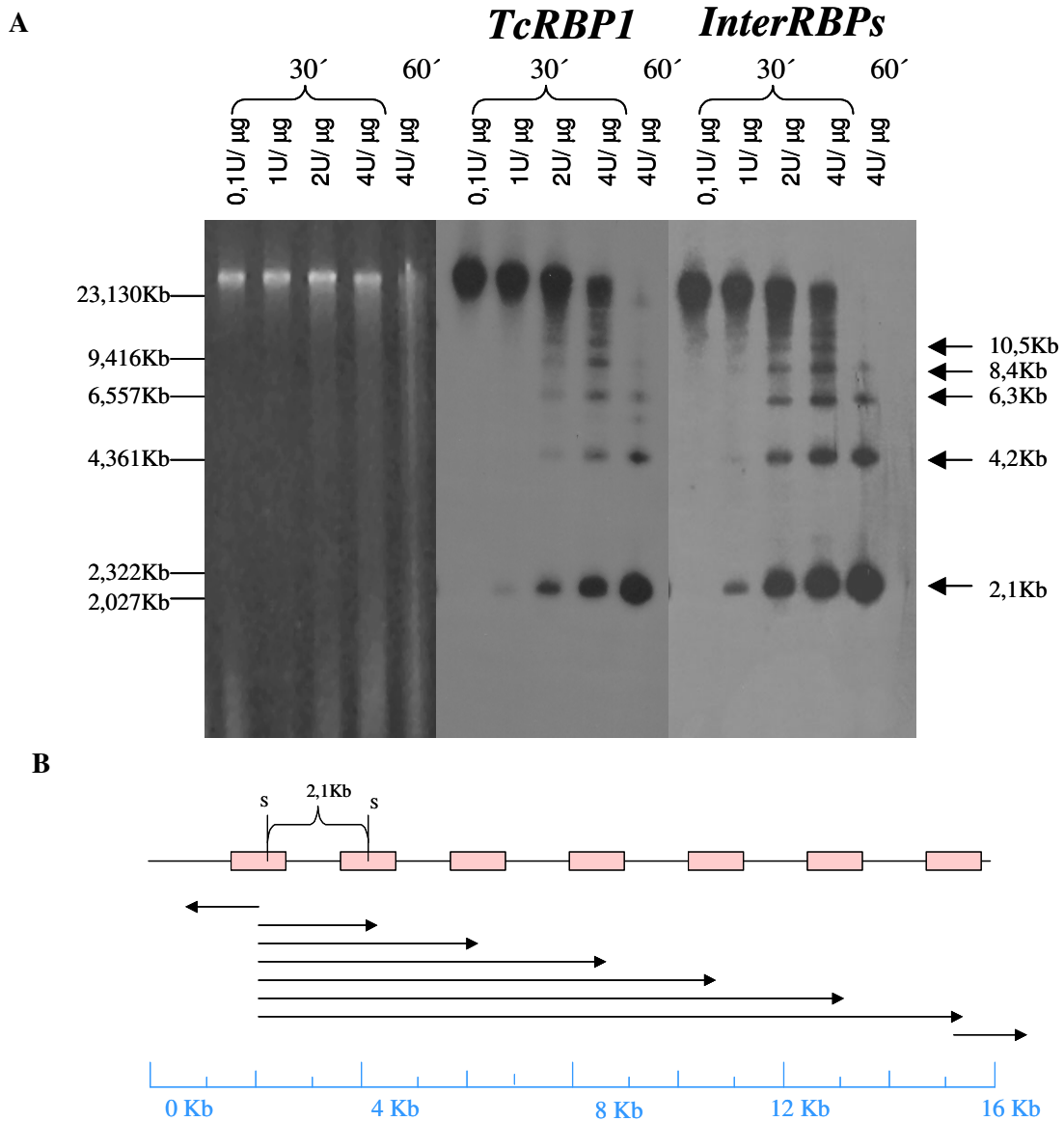


Figura 9 - Análise dos fragmentos de DNA genômico de *T. cruzi* parcialmente digeridos com enzimas de restrição – Em A, Southern blot indicando repetições em tandem de TcRBPs. A esquerda, gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo; no centro, autoradiografia do filtro hibridizado com a sonda TcRBP1; à direita, hibridização do filtro com a sonda InterRBPs. Padrão de peso molecular λ /HindIII GibcoBRL® indicado à esquerda. Tamanho calculado para os fragmentos indicados à direita. Acima de cada raia concentração enzimática e tempo da reação de digestão. Em B, esquema indicando o arranjo genômico de TcRBPs. Em rosa, os genes RBP; as setas representam os fragmentos de digestão parcial visualizados acima.

reconhecer ambos os genes RBP descritos, *TcRBP1* e *TcRBP2*. Para a quantificação, a intensidade média de cada banda de RBP foi comparada com a intensidade média dos três tamanhos dos RNA's ribossomais visíveis na coloração com brometo de etídeo.

O resultado da análise, indicado na figura 7, nos mostrou que há um acúmulo maior de transcritos nas formas replicativas do parasito quando comparadas com a forma infectante tripomastigota. Este acúmulo é ainda maior na forma esferomastigota.

O gene *Tcp14*, presente em cópias intercaladas a RBP é expresso em formas epimastigotas como demonstrado no experimento de *northern blot* (Figura 8) em que RNA total extraído de células epimastigotas foi hibridizado com a sonda ME-*Tcp14* obtida através de RT-PCR (barra azul na figura 5(B)). Este experimento revelou um único RNA de 1Kb, tamanho este compatível com a seqüência inicialmente obtida.

TcRBP 1 e TcRBP 2 são reconhecidas por anticorpo antiTbp34/Tbp37 em diferentes cepas de Trypanosoma cruzi e em diferentes espécies de kinetoplastidae

Uma vez que as proteínas RBP estão presentes em *T. cruzi* e se mostram altamente conservadas, avaliamos o padrão de expressão dos genes RBP em extratos celulares de clones e cepas de *T. cruzi* e de outros organismos filogeneticamente relacionados. Para isso empregamos a técnica de *western blot* utilizando anticorpos gerados contra as proteínas Tbp34 e Tbp37 de *T.brucei* que nos foram gentilmente cedidos pela Dra. Noreen Williams, da Universidade Estadual de Nova York em Búffalo (Figura 9). Estes anticorpos são capazes de reconhecer as duas proteínas de *T.brucei*, dada a alta homologia entre elas (Zhang e Williams, 1997)

A figura 9 mostra extratos celulares de formas epimastigotas dos clones CL Brener e Dm28c, além das cepas CL e Y do *T. cruzi*, formas tripomastigotas sangüícolas wt cepa 427 de *T. brucei* (gentilmente cedida pela Dra. Simone Leal do Instituto Rockefeller), *Crithidia fasciculata* e formas promastigotas de

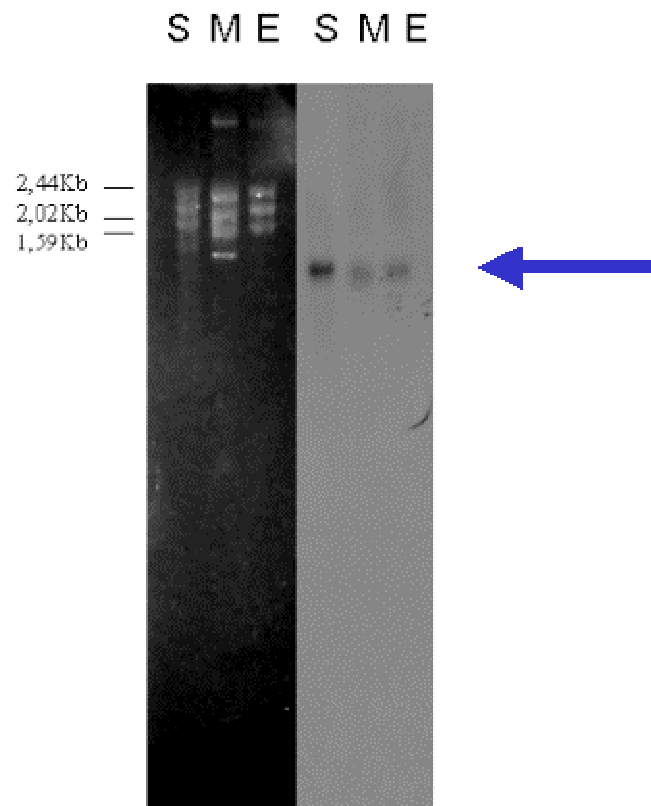


Figura 10 – Acúmulo de RNAs mensageiros dos genes RBP nas diferentes formas celulares de *T. cruzi* – Northern blot mostrando os níveis de RNA detectados. À esquerda, gel de agarose-formaldeído 2% de 5µg de RNA total corado com brometo de etídio; a direita, autoradiografia do filtro hibridizado com a sonda TcRBP1; S – esferomastigotas; M – tripomastigotas metacíclicos; E – epimastigotas. A seta azul aponta o RNA reconhecido pela sonda TcRBP1. Os sinais obtidos foram analisados pelo programa de análise de imagem 1D Kodak Digital Science™. A intensidade média de cada sinal de RBP foi comparada com a média dos três tamanhos dos RNAs ribossomais visíveis na coloração com brometo de etídeo.

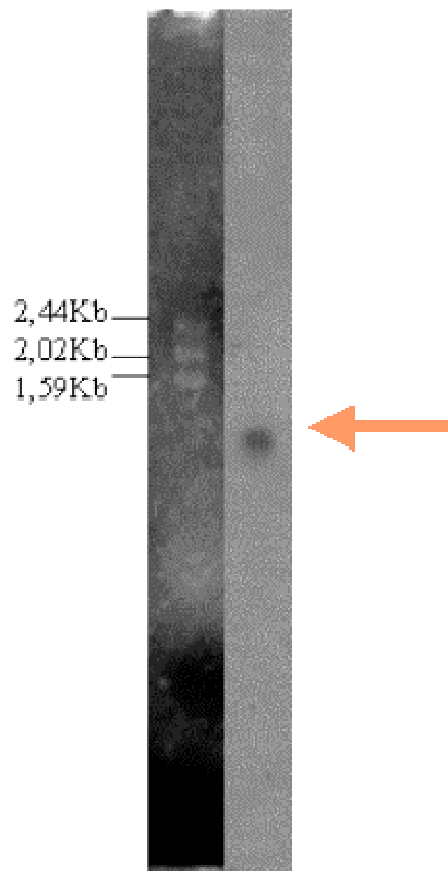


Figura 11 – Acúmulo de RNAs mensageiros de *Tcp14* em formas epimastigotas – Northern blot mostrando níveis de RNA mensageiros reconhecidos pela sonda ME-Tcp14. À esquerda, gel de agarose-formaldeído 1,2% de 5 μ g de RNA total de formas epimastigotas. À direita, autoradiografia do filtro hibridizado a sonda ME-Tcp14. A seta laranja indica um mRNA de 1Kb.

Leishmania braziliensis. Como se pode observar, o anticorpo anti-p34/p37 é capaz de reconhecer duas proteínas na raia de controle positivo contendo extrato celular de *T.brucei*. A proteína de 34KD é mais abundante que a proteína de 37KD, indicando que a expressão destas proteínas é regulada ao longo do ciclo do *T. brucei*. Nos extratos celulares dos outros organismos utilizados, estes anticorpos reconheceram proteínas de 33 e 35 KD (Figura 9). Pode ser observada variação na intensidade relativa das duas proteínas nos diferentes extratos celulares analisados. A proteína de 35KD é mais intensa nas cepas Y e CL do *T. cruzi* e em *L. braziliensis*, enquanto nos clones CL Brenner e Dm28c de *T. cruzi* e em *C. fasciculata*, a variação na intensidade relativa das duas proteínas é menos aparente.

Este mesmo anticorpo reconheceu uma proteína de 60KD que possivelmente se trata da proteína poli(A)Bp que também possui domínios de ligação a RNA do tipo RBD.

Os anticorpos antiTbp34/Tbp37 reconhecem proteínas localizadas no citoplasma dos diferentes tipos celulares de *Trypanosoma cruzi*

Como indicado na figura 1, as proteínas RBP não apresentam a seqüência consenso de localização nuclear definida por Dingwall e Laskey em 1991. As proteínas de *T.brucei* que apresentam esta seqüência (Zhang e Williams, 1997), se localizam de fato no núcleo (Zhang, *et al.*1998) e possivelmente participam da biogênese do ribossomo (Pitula, *et al.* 2002b). Conseqüentemente, investigamos a localização subcelular das proteínas RBP nas três diferentes formas do *T. cruzi* por imunofluorescência

A figura 10 mostra micrografias confocais que indicam que os anticorpos heterólogos são capazes de reconhecer proteínas localizadas no citoplasma das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Nas formas tripomastigotas metacíclicas (seta branca) a fluorescência demonstrando a presença do anticorpo em B,C e D é bem menos intensa do que nas formas epimastigotas (seta vermelha), indicando uma menor expressão destas

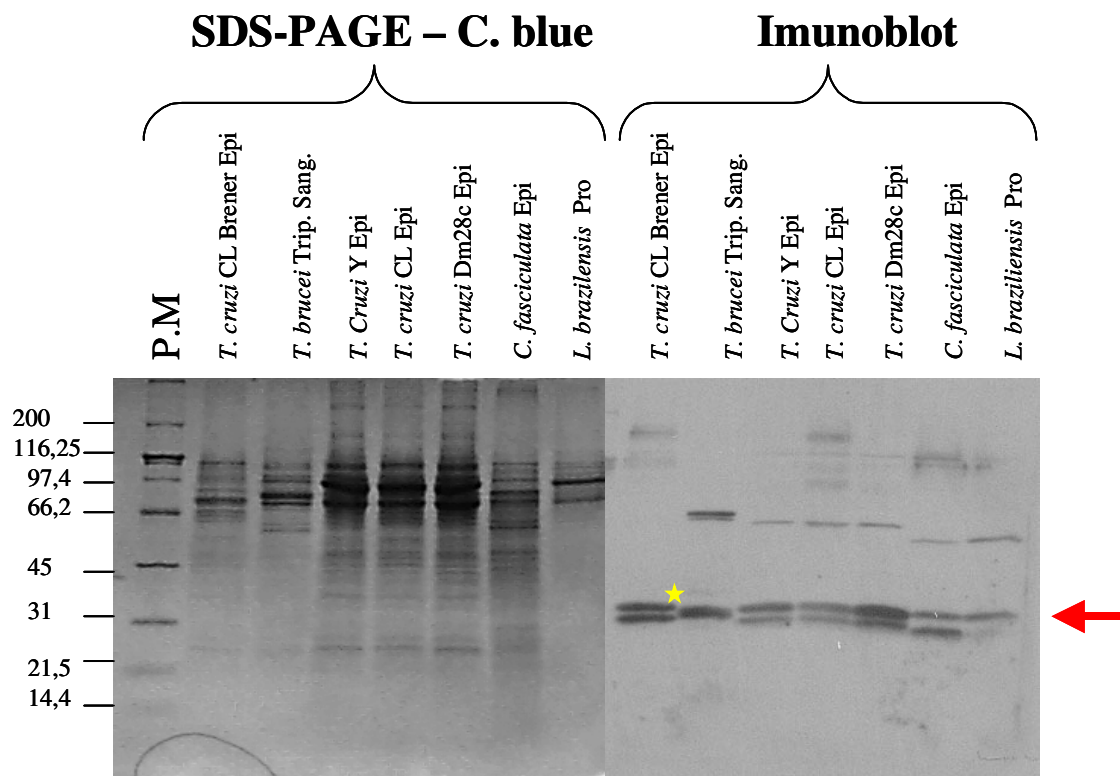


Figura 12 – Padrão de Expressão de TcRBP 1 e TcRBP 2 em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* e espécies de Kinetoplastidae – Análise de imunoblot mostrando proteínas reconhecidas em extratos celulares totais pelos anticorpos policlonais gerados contra as proteínas de *T.brucei*, Tbp34 e Tbp37. A esquerda, SDS-PAGE 16% corado com Comassie blue. Foram utilizados 10^6 células/raia; A direita, proteínas reconhecidas por anti-p34/p37 reveladas pelo protocolo de ECL. Os extratos celulares utilizados estão demarcados no topo da figura. A seta vermelha indica as proteínas RBP. O padrão de peso molecular está indicado a esquerda em KDa. A estrela amarela indica o sinal correspondente a Tbp37.

proteínas nas formas metacíclicas. Nas formas epimastigotas a fluorescência que indica a presença de RBP é basicamente perinuclear.

Em contraste, nas formas esferomastigotas, a localização obtida também é citoplasmática, mas preferencialmente na face interna da membrana plasmática (Figura 11).

Como uma referência estrutural interna, as células foram tratadas com iodeto de propídeo que cora DNA, e de forma mais intensa o DNA do cinetoplasto (Figuras 10_(D) e 11_(D)).

Produção de TcRBP 1 e TcRBP 2 recombinantes

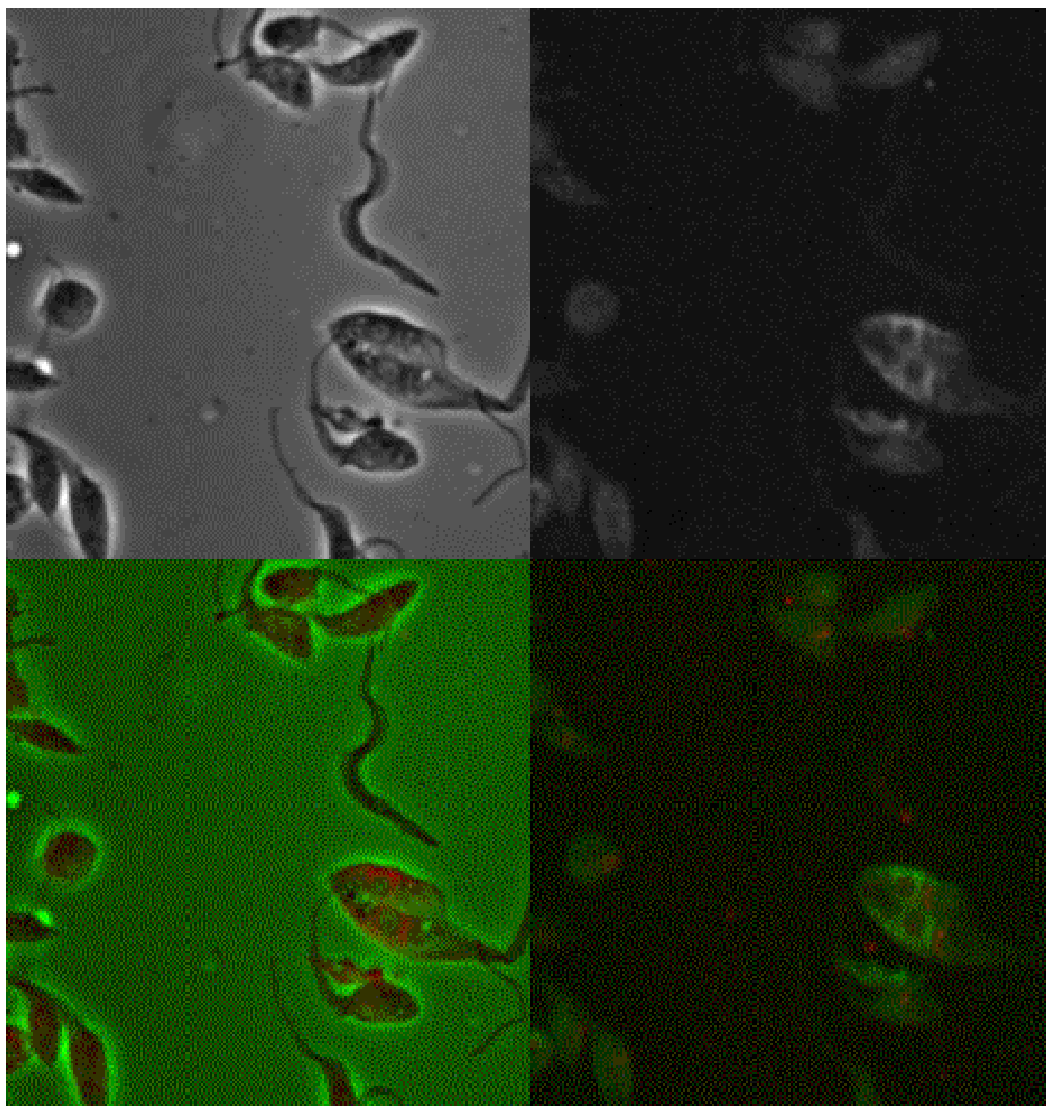
Para a realização de futuros estudos funcionais, a região codificante dos genes RBP foi amplificada com os oligonucleotídeos RBP-Eco e RBP-Not, indicados na figura 1, a partir dos clones de cDNA TcRBP1 e TcRBP2. As seqüências obtidas foram clonadas em vetor pGEX 4T1 na mesma fase de leitura do gene *GST*, que codifica para a proteína Glutathione S transferase de acordo com o esquema mostrado na figura 12_(A). Após transformação em células *E.coli* BI-21, estas proteínas foram expressas fusionadas a GST e posteriormente purificadas através de cromatografia de afinidade por glutathione. Para a liberação das proteínas recombinantes, as proteínas de fusão ainda ligadas à matriz foram digeridas com a enzima trombina que libera a proteína de interesse da proteína GST.

A separação das proteínas para visualização se deu em gel de poliacrilamida 12% com SDS corado com Comassie blue (Figura 12_(B)). As proteínas obtidas apresentam o mesmo peso molecular aparente daquelas visualizadas no extrato celular total (Figura 9), que é um pouco maior do que aquele predito pelo programa ProtParam (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>), de 28,5KD e 27,4KD, respectivamente, para *TcRBP1* e *TcRBP2*. Esta diferença de tamanho observado também ocorre com as proteínas de *T.brucei*, para as quais o peso molecular previsto pelo mesmo programa é de 28,8KD para p34 e de 30,3KD para p37.

Figura 13 – Localização subcelular por imunofluorescência e microscopia confocal das proteínas RBP nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de T.cruzi – Em A, micrografia de contraste de fase; Em B, micrografia confocal de fluorescência com o filtro para a fluoresceína indicando RBP; Em C, sobreposição das duas imagens acima com a fluoresceína em vermelho e o contraste de fase em verde; Em D, sobreposição das micrografias de fluorescência com os filtros para a fluoresceína (verde) e para o iodeto de propídeo revelando DNA (vermelho). A seta branca aponta para uma célula tripomastigota; a seta vermelha para formas epimastigotas.

A

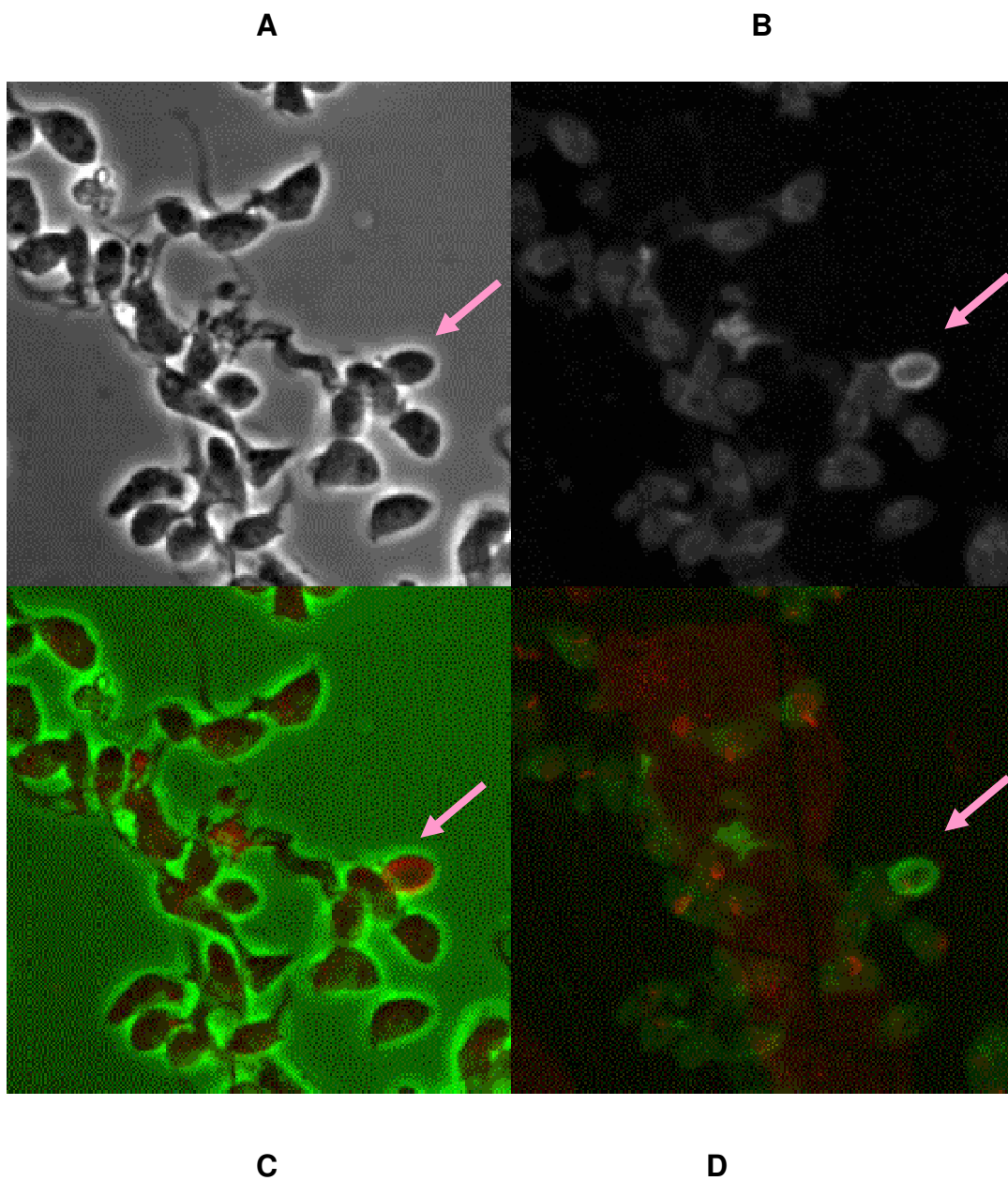
B



C

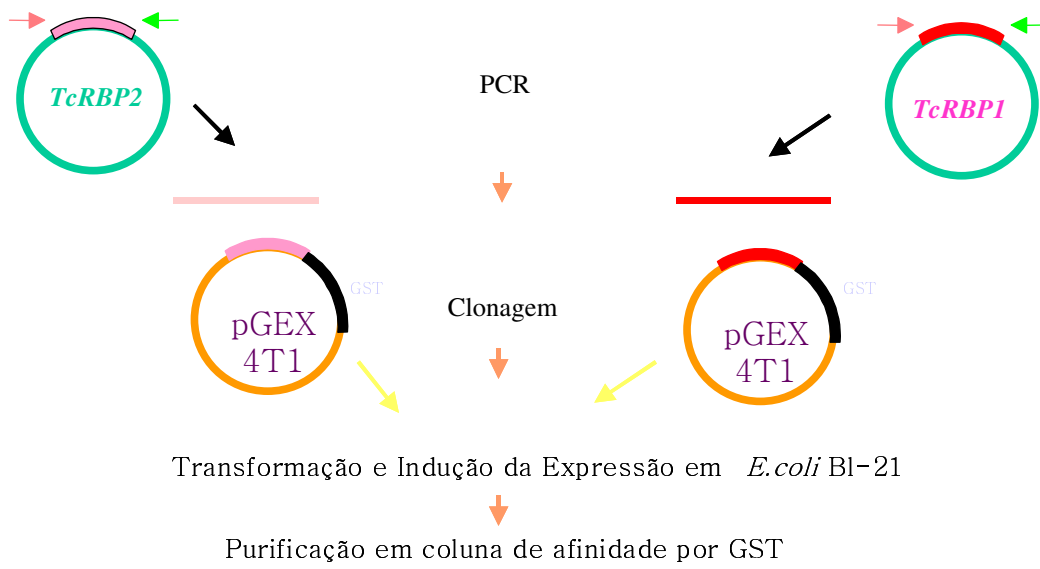
D

Figura 14 – Localização subcelular por imunofluorescência e microscopia confocal das proteínas RBP nas formas esferomastigotas de T.cruzi – Em A, micrografia de contraste de fase; Em B, micrografia confocal de fluorescência com o filtro para a fluoresceína; Em C, sobreposição das duas imagens acima com a fluoresceína em vermelho e o contraste de fase em verde; Em D, sobreposição das micrografias de fluorescência com os filtros para a fluoresceína (verde) e para o iodeto de propídeo revelando DNA (vermelho). A seta rosa aponta uma forma esferomastigota.



A reação das proteínas recombinantes com os anticorpos heterólogos anti-Tbp34 e Tbp37 mostrou que tanto as proteínas isoladas quanto as proteínas de fusão são reconhecidas por estes anticorpos (Figura 12(B)). Algumas proteínas de peso molecular inferior também são reconhecidas no imunoblot indicando talvez produtos de degradação das proteínas recombinantes. Estas proteínas recombinantes serão importantes para futuros ensaios funcionais de ligação à molécula de RNA.

A



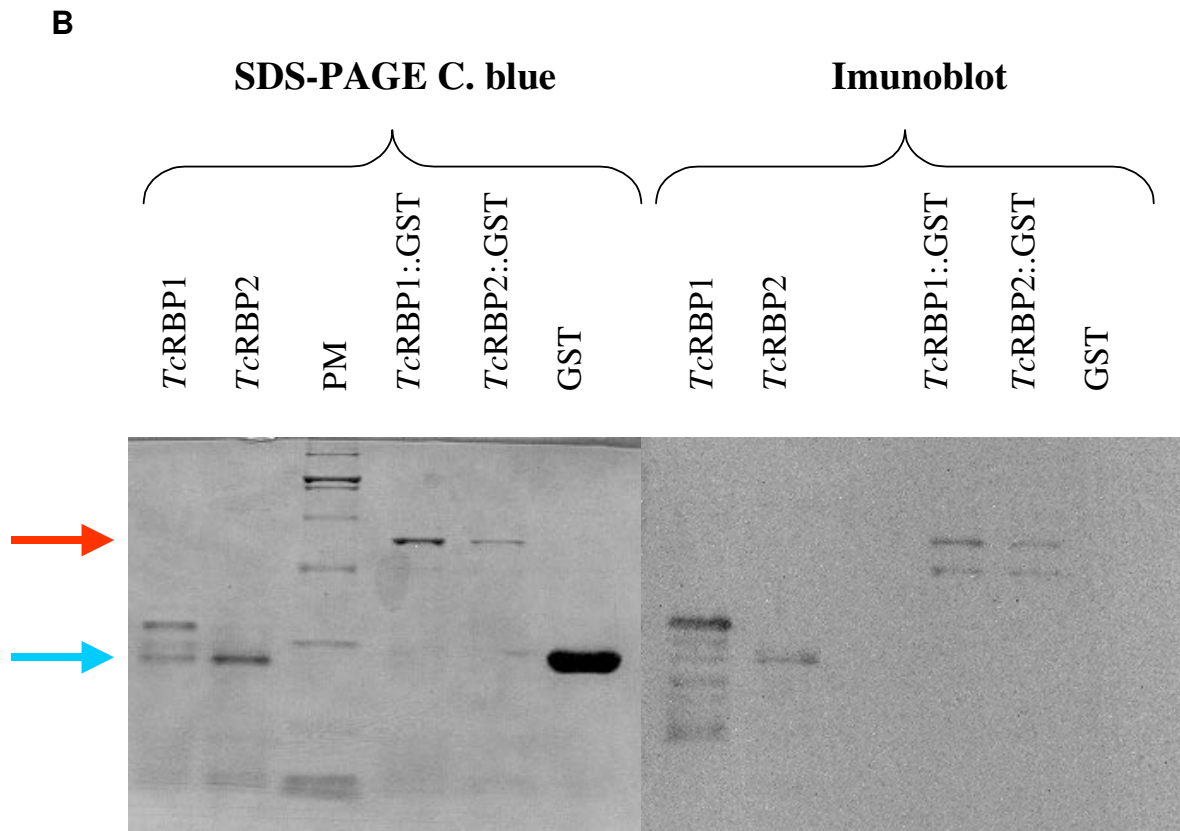


Figura 15 - Produção de TcRBP 1 e TcRBP 2 recombinantes em *E. coli*- Em A, esquema de clonagem das proteínas recombinantes TcRBP1 e TcRBP2. As setas laranjas e verdes representam os oligonucleotídeos RBP-Eco e RBP-Not respectivamente. Em B, visualização das proteínas RBP recombinantes - À esquerda, SDS-PAGE 12% corado com comassie blue. A seta vermelha indica as proteínas de fusão; a seta azul indica as proteínas RBP recombinantes isoladas. PM: padrão de peso molecular BioRad (200KD, 116,25KD, 97,4KD., 66,2 KD, 45KD, 31KD, 21,5KD, 14,4KD). À direita, *imunoblot* com os anticorpos heterólogos anti-Tbp34/Tbp37

O controle da expressão gênica em tripanossomatídeos é bastante complexo. Apesar de as três classes de RNA polimerase já terem sido identificadas com base na sua resistência à α -amanitina e na identificação dos respectivos genes, apenas poucos promotores foram caracterizados, sendo a transcrição de genes que codificam proteínas basicamente policistrônica. A regulação transcricional já foi descrita, mas apenas para os genes com promotores característicos da RNA polimerase I, como os genes VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) e PARP (*Procyclic Acidic Repetitive Protein*) (Vanhamme e Pays, 1995). Este último foi recentemente subdividido em dois grupos, EP e GPEET, de acordo com o número e o tipo de repetição (Roditi e Clayton, 1999). Assim, a regulação pós-transcricional é essencial, sendo a expressão da maioria dos genes que codificam proteína controlada durante o processamento e tradução do RNA e não na iniciação da transcrição. As regiões intergênicas e não-traduzidas são responsáveis pelo controle da meia vida e estabilidade do mRNA, pois apresentam seqüências que são reconhecidas por proteínas de ligação a RNA como já descrito por diversos autores (Nozaki e Cross, 1995; Di Noia *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 2000; Dallagiovanna *et al.*, 2001) Daí a importância da identificação de novas proteínas de ligação a RNA que possam controlar a estabilidade e assim, a meia-vida destas moléculas.

Neste trabalho, nós identificamos os genes *TcRBP1* e *TcRBP2*, que codificam duas novas putativas proteínas de ligação a RNA, através da análise das seqüências expressas disponibilizadas nos bancos de dados pelo Projeto Genoma de *T. cruzi*, lançado em 1994. Este projeto tinha como objetivo principal permitir o acesso global às seqüências do parasita para a identificação de novos genes (The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium, 1997) através da análise de seqüências-alvo de expressão (ESTs - *Expressed Sequence Tags*) (Verdun *et al.*;1998). A identificação dos genes PDZ-5 (Coelho *et al.*, submetido) e *TcRABT* (Ramos, *et al.*, manuscrito em preparação) em nosso laboratório e dos genes que codificam para a subunidade F da ATP sintase e a protease prenil CAAX identificados em 2000(b) por Porcel *et al.* exemplificam esta abordagem.

A procura por proteínas de ligação a RNA no banco de dados de ESTs nos permitiu detectar 17 clones, que foram analisados e subdivididos em dois grupos distintos, cada um codificando para uma isoforma diferente nomeadas TcRBP1 e TcRBP2. Esta subdivisão foi baseada na presença ou ausência de uma seqüência de 18 nucleotídeos na porção 5' do gene. (números de acesso ao Genbank para o Grupo. 1: AW329912; AA426663; AI717881; AI562263; AA426683; AW325316; AI066220; AI562269 e para o Grupo 2: AW324961; AI043259; AW324803; AW325312; AI026385; AA556060; AI053335; AW325287; AW325283)

As seqüências destas proteínas apresentam a estrutura modular característica das proteínas de ligação a RNA (Pérez-Cañadillas e Varani, 2001), cada uma delas apresentando dois domínios de ligação a RNA do tipo RBD. Este domínio é comumente encontrado em proteínas de ligação a RNA envolvidas em processos variados (sintetizados na Introdução – Figura 3), como por exemplo a proteína TcUBP1 que é responsável por modular os níveis de RNA mensageiro em *T. cruzi* e apresenta um domínio do tipo RBD (D'Orso e Frasch, 2001b). A presença de mais de um domínio RBD já foi relatada para outras proteínas como a proteína Sxl, de *Drosophila*, que apresenta dois domínios deste tipo, e para a proteína ubíqua PABP, que apresenta quatro (Burd e Dreyfuss, 1994). A presença de mais de um domínio de ligação a RNA aumenta a afinidade da proteína pela molécula de RNA (Shamoo *et al.*, 1995) e pode estar envolvida em interações proteína-proteína (Pitula *et al.*, 2002b).

Além do domínio RBD, estas proteínas apresentam também um domínio N-terminal rico nos aminoácidos alanina, prolina e lisina (APK), como já descrito para os genes de histona (Maeder e Bohm, 1991), conferindo um domínio básico que pode interagir com regiões acídicas de outras moléculas.

As proteínas TcRBP1 e TcRBP2 são altamente homólogas entre si apresentando identidade de aminoácidos de 83,7%, com as principais diferenças se concentrando em três pontos principais: na porção N-terminal, onde TcRBP2 apresenta uma deleção de 6 aminoácidos; em uma porção central com 7 aminoácidos diferentes e na porção C-terminal, onde uma alteração na fase aberta de leitura diferencia TcRBP1 de TcRBP2. Esta

modificação faz com que TcRBP1 apresente uma seqüência consenso de localização para microcorpos. Esta seqüência foi definida como sendo [STAGCN]-[RKH]-[LIVMAFY] e é encontrada na porção C-terminal de proteínas localizadas nos peroxissomos, glioxissomos e glicossomos (De Hoop e Ab, 1992). Como esta seqüência consenso é muito geral, é possível que ela ocorra em proteínas que não possuem tal localização.

Comparando a seqüência de nucleotídeos dos genes RBP com as seqüências disponíveis no banco de dados, verificamos homologia de TcRBP1 com TcAG48, antígeno identificado por DaRocha *et al.*, (2001) através de rastreamento de uma biblioteca de expressão de cDNA de amastigotas com soro chagásico humano. A seqüência parcial desta proteína está disponível no GenBank sob o número de acesso AF316151.

A comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas RBP de *T. cruzi* com as seqüências presentes nos bancos de dados mostrou homologia a duas proteínas de *T. brucei* já descritas: Tbp34 e Tbp37 (Zhang e Williams, 1997) com identidade de 50,8%. Estas proteínas apresentam, assim como as proteínas RBP de *T. cruzi*, uma região rica nos aminoácidos alanina, prolina e lisina (APK) e dois domínios de ligação a RNA do tipo RBD, onde se concentra a maior parte da homologia. As proteínas de *T. brucei* também apresentam tamanhos diferentes. A proteína Tbp34 possui uma deleção de 18 aminoácidos na porção N-terminal que a torna menor em relação a Tbp37. Ambas as proteínas de *T. brucei* também apresentam uma região C-terminal consenso de localização nuclear definida por Dingwal e Laskey em 1991 como sendo composta por dois aminoácidos básicos, uma região espaçadora contendo 10 aminoácidos quaisquer e um grupo de aminoácidos básicos onde três dos cinco aminoácidos seguintes devem ser básicos. Foi demonstrado que as proteínas de *T. brucei* estão localizadas no núcleo (Zhang *et al.*, 1998), são capazes de ligar RNA ribossomal 5S (Pitula *et al.*, 2002a) e de interagir com as proteínas nucleolares Nopp44/46, estando provavelmente envolvidas na biogênese do ribossomo (Pitula *et al.*, 2002b). A ausência desta região nas proteínas de *T. cruzi* pode refletir uma função diferente da descrita para as proteínas de *T. brucei*.

De acordo com os dados de *Southern blot*, os genes RBP estão arranjados em tandem, uma organização comum em tripanossomatídeos (Soares *et al.*; 1989; Teixeira *et al.*, 1995; Di Noia *et al.*, 1998 e 2000; Ávila *et al.*, 2001). Experimentos de digestão parcial revelaram que existem pelo menos sete cópias dos genes RBP. No entanto, não é possível afirmar a ordem em que estes genes estão arranjados uma vez que um clone genômico não foi isolado. Assim, não é possível afirmar o número de cópias de TcRBP1 nem de TcRBP2 presente no tandem. Caso haja alterações nas outras cópias dos genes RBP que reflitam diferenças na proteína, não visualizadas no experimento da figura 9, estas isoformas poderiam ser elucidadas através de Imunoblot bidimensional.

A região presente entre os genes RBP (InterRBPs) foi amplificada e clonada a partir do DNA genômico. Apenas um único clone foi obtido e a seqüência completa do mesmo mostrou uma fase aberta de leitura. A análise *in silico* desta ORF revelou que ela não apresenta similaridade a nenhuma proteína já descrita nem a domínios conservados. Este gene, denominado Tcp14, pode constituir um gene exclusivo de *T. cruzi*, não tendo sido encontrados homólogos nos genomas parcialmente anotados de *L. major* e *T. brucei* (www.sanger.ac.uk). A procura por homologia de seqüência no banco de dados de EST revelou um único clone de cDNA. Isto indica a expressão deste gene nas células de *T. cruzi*. Uma forte banda em torno de 1Kb é vista em experimentos de *northern blot* quando se utiliza a sonda ME-Tcp14, que é específica para este gene. Este gene é expresso nas formas epimastigotas, como foi mostrado através de *northern blot* e RT-PCR e está localizado na região de 1,3Kb entre os genes RBP. Alternância de genes com função e padrão de expressão distintos é comum nos arranjos em tandem descritos para tripanossomatídeos (Teixeira *et al.*, 1998 e Ávila *et al.*, 2001). Foi proposto, inclusive, que todos os genes sejam transcritos em grandes unidades policistrônicas, como para o cromossoma 1 de *L. major* (Myler *et al.*, 1999).

Os genes RBP apresentam níveis de RNA mensageiro detectáveis nos três diferentes estágios do ciclo do *T. cruzi*, sendo o teor menor na forma infectante, maior nas formas replicativas, e maior ainda na forma

esferomastigota. Este resultado significa que há regulação da expressão destas proteínas no nível do RNA mensageiro, sendo uma delas mais abundante nos estágios replicativos. Para afirmar se há também regulação pós-traducional é necessária a detecção destas proteínas em extratos celulares dos três diferentes estágios principalmente porque a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é basicamente pós-transcricional. Além disso, experimentos de *western blot* utilizando formas predominantes no hospedeiro invertebrado de algumas espécies de tripanossomatídeos sugerem que haja expressão diferencial das proteínas RBP.

Utilizando os anticorpos gerados contra as proteínas Tbp34 e Tbp37, é possível detectar proteínas RBP nas formas epimastigotas do *T. cruzi*. Estas mesmas proteínas são também detectadas em todas as cepas e clones de *T. cruzi* utilizados, além das espécies relacionadas *Leishmania braziliensis* e *Crithida fasciculata*. A análise densitométrica do experimento de *western blot* mostra que há possivelmente uma expressão diferencial das proteínas RBP, principalmente em *L. braziliensis*. Essa diferença de expressão é menos aparente para o clone CL brenner de *T. cruzi*, mas não podemos excluir a possibilidade de contaminação por outras formas celulares presentes na cultura. Dados de microscopia ótica indicaram que a cultura de onde se obteve o extrato celular utilizado neste experimento continha pelo menos 10% de formas tripomastigotas metacíclicas e outros 10% de formas arredondadas resistentes a soro humano como as células esferomastigotas típicas (Rondinelli, *et al.*, 1988). A detecção de duas proteínas de teor diferente, correspondentes a TcRBP1 e a TcRBP2 em *L. braziliensis*, sugere que existe regulação da expressão desta proteína neste parasita. Comparamos a seqüência das proteínas RBP com as seqüências homólogas a RBP no banco de dados do projeto genoma parcialmente anotado de *Leishmania major* disponível na página do Instituto Sanger (www.sanger.ac.uk). A seqüência analisada mostrou alta homologia às proteínas RBP tanto de *T. cruzi* quanto de *T. brucei* o que indica que estas proteínas devem exercer uma função bastante conservada na ordem Kinetoplastidae.

A ausência da seqüência consenso de localização nuclear na seqüência de *L. major*, quando comparada com as proteínas RBP, nos sugere que é possível que a adição desta seqüência à porção C-terminal das proteínas de *T. brucei* deve ter sido um fato isolado neste clado.

Uma vez que as proteínas RBP não apresentam sinal de localização nuclear e muito provavelmente apresentam acúmulo diferencial de mRNA ao longo do ciclo, realizamos experimentos de localização subcelular. Dados preliminares de microscopia de fluorescência mostraram localização citoplasmática para as proteínas RBP, sendo que a fluorescência visualizada é menos intensa nas formas tripomastigotas.

Os resultados obtidos indicam que as proteínas RBP de *T. cruzi* possam ter uma função diferente da apresentada pelas proteínas de *T. brucei*. A função desempenhada pelas proteínas RBP deve ser conservada nos gêneros *Leishmania* e *Crithidia* podendo ter divergido somente no clado de *T. brucei*, única espécie analisada onde estas proteínas apresentam a seqüência de localização nuclear que as tornam maiores. A confirmação desta hipótese só se dará quando da realização deste mesmo experimento com um número maior de espécies da ordem *Kinetoplastidae*.

Como os genes RBP possivelmente têm a sua expressão regulada durante o desenvolvimento, analisamos também as seqüências não-traduzidas destes genes, já que estas seqüências comprovadamente estão envolvidas na regulação da expressão gênica em eucariotos. Elementos em *cis* já foram identificados em diversos genes de tripanossomatídeos tanto na região 5'UTR (Teixeira *et al.*, 1999 e Pasion *et al.*, 1996) quanto na região 3'UTR (Wilson *et al.*, 1999; Di Noia *et al.*, 2000 e D'Orso e Frasch, 2001a).

As seqüências de nucleotídeos da 5'UTR dos genes RBP de *T. cruzi* são idênticas sugerindo que estes genes tiveram uma origem comum existindo conservação destes resíduos. A seqüência da 5'UTR de *T. brucei* também é bastante semelhante com identidade de nucleotídeos de 38%. À semelhança dos genes RBP de *T. cruzi*, a 5'UTR dos genes de *T. brucei* se mostrou altamente conservada apresentando também os mesmos dois sítios alternativos de *trans-splicing* identificados neste trabalho para os genes RBP. É

interessante o sítio de *trans-splicing* apresentado por *TcRBP2* é o mesmo encontrado para *Tbp34*, tornando menor a região 5'UTR destes genes. Como não foram identificados outros sítios de inserção de mini-exon nem em nosso trabalho e nem pelo grupo responsável pelo projeto em *T. brucei*, não é possível afirmar se estes são os únicos sítios possíveis e nem se há correlação do sítio de *trans-splicing* com o respectivo RBP. Alternativamente, a presença dos mesmos sítios de adição de mini-exon pode ser resquício da provável origem comum destas proteínas já que o gênero *Trypanosoma* é monofilético (Lukes *et al.*, 1997).

A região 3'UTR destes genes também foi analisada neste trabalho e se mostrou curta quando comparada com outras seqüências disponíveis. Alguns genes apresentam 3'UTR muito longas como é o caso do gene *amastina* que apresenta uma 3'UTR de 630 nucleotídeos. Já foram descritos genes com ausência de região 3'UTR como o gene *tuzina*, cujo códon de terminação pode ser formado pela adição da cauda poli A (Teixeira *et al.*, 1995).

Três diferentes sítios de poliadenilação foram identificados distantes entre si 17 nucleotídeos, mas não foi possível identificá-los como sendo pertencentes a *TcRBP1* ou *TcRBP2*.

É interessante que o polimorfismo de nucleotídeos presentes ao longo da região codificante dos genes *TcRBP1* e *TcRBP2* muda a fase aberta de leitura e altera o sítio de parada destes dois genes. Esta mudança na fase de leitura faz com que a 3'UTR do gene *TcRBP2* seja 10 nucleotídeos maior que a do gene *TcRBP1*. A 3'UTR destes genes apresenta uma seqüência rica nos resíduos adenina e uridina (ARE). Diversos genes que são regulados pós-transcricionalmente apresentam a região ARE no 3'UTR, por exemplo, os genes da família de mucinas *TcSMUG* (D'Orso e Frash, 2001a). Esta região está implicada na desestabilização dos RNAs mensageiros em eucariotos superiores e recentemente foi observado que a proteína *TcUBP1* é capaz de reconhecer esta região em *T. cruzi*, participando, assim, do controle da meia-vida do RNA mensageiro (D'Orso e Frash, 2001b). É possível que a expressão dos genes RBP também seja controlada desta forma.

Uma vez que os resultados sugerem que os genes RBP de *T. cruzi* tenham funções diferentes das apresentadas em *T. brucei*, experimentos funcionais são de grande importância. Para estes futuros ensaios de ligação proteína-RNA, produzimos as proteínas recombinantes TcRBP1:GST e TcRBP2:GST. O reconhecimento específico destas proteínas pelos anticorpos heterólogos utilizados neste trabalho respaldam o seu uso em futuros ensaios de ligação à molécula de RNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler, B.K.; Hadjuk, S.L. Mechanisms and Origins of RNA Editing (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:316-322;
2. Al Albassy, S.N.; Seed, T.M.; Kreier, J.P.; Isolation of the Trypomastigote Form of *Trypanosoma cruzi* from a Mixture of the Trypomastigote and Epimastigote Forms of the Parasite by Use of a DEAE-Cellulose Column. (1972) *J. Parasitol.* 58:631-632;
3. Alfonzo, J.D.; Thiemann, O.; Simpson, L The Mechanism of U Insertion/Deletion RNA Editing in Kinetoplastid Mitochondria. (1997) *Nuc. Acids Res* 25(19): 3751-3759;
4. Ávila, A.R.; Yamada-Ogatta, S.F.; Monteiro, V.S.; Krieger, M.A.; Nakamura, C.V. de Souza, W; Goldenberg, S. Cloning and Characterization of The Metaciclogenin Gene, Which Is Specifically Expressed During *Trypanosoma cruzi* Metaciclogenesis. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol* 117:169-177;
5. Batista, J.A.N.; Teixeira, S.M.R.; Donelson, J.E.; Kirchhoff, L.V.; Sá, C.M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Poly (A)-Binding Protein and Its Genes. (1994) *Mol Biochem Parasitol.* 67:301-312
6. Benne, R.; Van Den Burg, J.; Brakenhoff, J.P. J.; Sloof, P.; Van Boom, J.H.; Tromp, M.C. Major Transcript of The Frameshifted CoxII Gene From Trypanosome Mitochondria Contains Four Nucleotides That Are Not Encoded in The DNA (1986) *Cell* 46: 819-826;
7. Biamonti, G.; Riva, S. New Insights into The Auxiliary Domains of Eukariotic RNA Binding Proteins (1994) *FEBS Lett* 340:1-8

8. Birney, E.; Kumar, S.; Kraine, A. R. Analysis Of The RNA-Recognition Motif And RS And RGG Domains: Conservation In Metazoan Pre-mRNA Splicing Factors. (1993) *Nuc. Acids Res.* 21(25):5803-5816;
9. Boothroyd, J.C.; Cross, G.A. Transcripts Coding For Variant Surface Glycoproteins Of *Trypanosoma brucei* Have A Short Identical Exon At Their 5'End. (1982) *Gene* 20:281-289
10. Brisse, S.; Verhoel, J. Tibayrenc, M. Characterization of Large and Small Subunit rRNA and Mini-Exon Genes Further Supports the Distinction of Six *Trypanosoma cruzi* Lineages. (2001) *Int. J. Parasitol.* 31:1218-1226;
11. Burd, C.; Dreyfuss, G.; Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins (1994) *Science* 265:615-621
12. Burleigh, B.A.; Andrews, N.W. The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200
13. Camargo, E.P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi* (1964) *Rev. Inst. Med. Trop.* 6:93-100;
14. Cano, M.I.; Gruber, A.; Vazquez, M.; Cortés, A.; Levin, M.J.; González, A.; Degrave, W.; Rondinelli, E.; Zingales, B.; Ramirez, J.L.; Alonso, C.; Requena, J.; M.; Silveira, J.F. Molecular Karyotype of Clone CL Brener Chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project (1995) *Mol Biochem. Parasitol* 71:273-278
15. Clayton, C; Adams, M.; Almeida, R.; Baltz, T.; Barret, M.; Bastien, P.; Belli, S.; Beverly, S.; Biteau, N.; Blacwell, J.; Blaineau, C.; Boshart, M.; Bringaud, F.; Cross, G.; Cruz, A.; Degrave, W.; Donelson, J.; El-Sayed, N.; Fu, G.; Ersfeld, K.; Gibson, W.; Gull, K.; Ivens, A.; Kelly, J.; Lawson, D.; Lebowitz, J.; Majiwa, P.; Matthews, K.; Melville, S.; Merlin, G.;

- Michels, P.; Myler, P.; Norrish, A.; Opperdoes, F.; Papadopoulou, B.; Parsons, M.; Seebeck, T.; Smith, D.; Stuart, D.; Turner, M.; Ullu, E.; Vanhamme, L. Genetic Nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. (1998) Mol. Biochem. Parasitol. 97:221-224
16. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction (1987) An. Biochem. 162:156-159;
17. Coelho, E.R.;
18. Contreras, V.T.; Araujo-Jorge, T.C.; Bonaldo, M.C.; Thomas, N.; Barbosa, H.S.; Meirelles, M.N.L.; Goldenberg, S.; Biological Aspects of the Dm28c Clone of *Trypanosoma cruzi* after Metacyclogenesis in Chemically Defined Media. (1988) Mem. Inst. Osw. Cruz. 83:123-33;
19. Coughlin, B.C.; Teixeira, S.M.R.; Kirchhoff, L.V.; Donelson, J.E. Amastin mRNA Abundance in *Trypanosoma cruzi* Is Controlled By a 3'-Untranslated Region Position-Dependent *Cis*-Element and an Untranslated Region-Binding Protein. (2000) J. Biol. Chem. 276(16): 12051-12060;
20. Cusack, S. RNA-Protein Complexes (1999) Curr. Opin. Struc. Biol. 9:66-73;
21. Dallagiovanna, B. Plazanet-Menut, C; Ogatta, S.F.Y.; Ávila, A.R.; Krieger, M.A.; Goldenberg, S. *Trypanosoma cruzi*: A Gene Family Encoding Chitin-Binding-Like Proteins is Posttranscriptionally Regulated During Metacyclogenesis (2001) Exp. Parasitol 99(7):7-16;
22. Da Rocha, W.D.; Bartholomeu, D.C.; Macêdo, C.D.S.; Horta, M.; F.; Cunha-Neto, E.; Donelson, J.E.; Teixeira, S.M.R. Characterization Of

- cDNA Clones Encoding Ribonucleoprotein Antigens Expressed In *Trypanosoma cruzi* Amastigotes (2002) Parasitol Res 88(4):292-300;
23. De Hoop, M.J.; Ab, G. Import Of Proteins Into Peroxisomes And Other Microbodies (1992) Biochem J. 286 (3): 657-69;
24. de Souza, W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. (2002) Kinetop. Biol. Dis.1:3-24;
25. Dingwall, C.; Laskey, R.A. Nuclear Targeting Sequences – a Consensus? (1991) Trends Biochem Sci 16:478-481;
26. Di Noia, J.M.; D'Orso, I.; Aslund, L.; Sánchez, D.O.; Frach, A.C.C.; The *Trypanosoma cruzi* Mucin Family Is Transcribed From Hundreds Of Genes Having Hypervariable Regions. (1998) J. Biol. Chem. 273(18):10843-10850;
27. Di Noia, J.M.; D'Orso, I.; Sánchez, D.O.; Frach, A.C.C.; AU-rich Elements in the 3'-Untranslated Region of a New Mucin-type Gene Family of *Trypanosoma cruzi* Confers mRNA Instability and Modulates Translation Efficiency. (2000) J. Biol. Chem. 275(14):10218-10227;
28. D'Orso, I.; Frach, A.C.C. Functionally Different AU- And G-Rich *Cis*-Elements Confer Developmentally Regulated mRNA Stability In *Trypanosoma cruzi* By Interactions With Specific RNA-Binding Proteins (2001a) J. Biol. Chem. 276(19):15.783-15.793;
29. D'Orso, I.; Frach, A.C.C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA binding Protein Involved in Selective mRNA Desestabilization in Trypanosomes (2001b) J. Biol. Chem 276(37):34801-34809;

-
30. D'Orso, I.; Frasch, A.C.C. TcUBP-1, a mRNA Destabilizing Factor from Trypanosomes Homodimerizes and Interacts with Novel AU-rich Element and Poly(A) binding Proteins Forming a Ribonucleoprotein Complex (2002) *J. Biol. Chem* 277(52):50520-50528;
31. Estévez, A.M.; Simpson, L. Uridine insertion/deletion RNA Editing in Trypanosome Mitochondria – a review (1999) *Gene* 240:247-260;
32. Ghisolfi, L.; Joseph, G.; Amalric, F.; Erard, M The glycine-rich Domain of Nucleolin Has an Usual Supersecondary Structure Responsible for its RNA-Helix – Destabilizing Properties. (1992) *J. Biol. Chem.* 267(5):2955-2959;
33. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. (1983) *J. Mol. Biol.* 166:557;
34. Kollien, A.H.; Schaub, G.A The Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatominae*. (2000) *Parasitol. Today* 16(9): 381-387;
35. Krause, M; Hirsh, D. A Trans-Spliced Leader Sequence on Actin mRNA In *C. elegans*. (1987) *Cell* 49:753-761;
36. Lazinski, D.; Grzadzielska, E; Das, A. Sequence-Specific Recognition Of RNA Hairpins By Bacteriophage Antiterminators Requires A Conserved Arginine-Rich Motif. (1989) *Cell* 59:207-218;
37. Lukes, J.; Jirku, M.; Dolezel, D.; Kralova, I.; Hollar, L.; Maslov, D.A Analysis Of Ribosomal RNA Genes Suggests That Trypanosomes Are Monophyletic (1997) *J. Mol. Evol.* 44:521-527;

38. Machado, C. A.; Ayala, F.J. Nucleotide Sequences Provide Evidence Of Genetic Exchange Among Distantly Related Lineages Of *Trypanosoma cruzi*. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci 98(13) 7396-7401;
39. Maeder, D. L.; Bohm, L. The C-domain in the H1 Histone Is Structurally Conserved. (1991) Biochim Biophys Acta. 1076(2): 233-8;
40. Mair, G.; Shi, H.; Li, H.; Djikeng, A.; Aviles, H.O.; Bishop, J.R.; Falcone, F.H.; Gavrilescu, C.; Montgomery, J.L.; Santori, M.I.; Stern, L.S.; Wang, Z.; Ullu, E.; Tschudi, C. A New Twist In Trypanosome RNA Metabolism: *Cis*-Splicing Of Pre-mRNA. (2000) RNA 6:163-169;
41. Manger, I.; Boothroyd, J.C.; Identification Of A Nuclear Protein In *Trypanosoma brucei* With Homology To RNA-Binding Proteins From *Cis*-Splicing Systems. (1998) Mol. Biochem. Parasitol. 97:1-11
42. Manger, I.; Boothroyd, J.C. Targeted Disruption Of An Essential RNA-Binding Protein Perturbs Cell Division In *Trypanosoma brucei*. (2001) Mol. Biochem. Parasitol. 116:239-245;
43. Myler, P. J. ; Audleman, L.; deVos, T.; Hixson, G.; Kiser, P.; Lemley, C.; Magness, C.; Rickel, E.; Sisk, E.; Sunkin, S.; Swartzell, S.; Westlake, T.; Bastien, P.; Fu, G.; Ivens, A.; Stuart, K. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 (6): 2902–2906;
44. Momen, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature. (1999) Mem. Inst. Osw. Cruz 94 Sup 1: 181-184;
45. Momen, H Molecular Taxonomy of Trypanosomatids: Some Problems and Pitfalls (2002) Arch. Med. Res. 33:413-415;

46. Nagai, K.; Oubridge, C.; Jessen, T.H.; Li, J.; Evans, P. Crystal Structure Of The RNA-Binding Domain Of The U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein A . (1990) *Nature* 348: 515-520;
47. Nagai, K.; Oubridge, C.; Ito, N.; Avis, J.; Evans, P. The RNP Domain: A Sequence-Specific RNA-Binding Domain Involved In Processing And Transport Of RNA. (1995) *TIBS* 20:235-240
48. Nilsen, T.W. Trans-Splicing: An Update (1995) *Mol. Biochem. Parasitol* 73:1-6;
49. Nozaki, T.; Cross, G.A. Effects of 3' Untranslated and Intergenic Regions on Gene Expression in *Trypanosoma cruzi* (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* 75:55-97;
50. Pérez-Cañadillas, J.M.; Varani, G. Recent Advances In RNA-Protein Recognition (2001) *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11-53-58
51. Pasion, S.G.; Hines, J.C.; Ou, X.; Mahmood, R.; Ray, D.S. Sequences Within The 5' Untranslated Region Regulate The Levels Of Kinetoplast DNA Topoisomerase mRNA During The Cell Cycle (1996) *Mol. Cel. Biol.* 16(12):6724-6735;
52. Pitula, J.; Ruyechan, W.T.; Williams, N. *Trypanosoma brucei*: Identification And Purification Of A Poly(A) – Binding Protein. (1998) *Exp Parasitol* 88:157-160;
53. Pitula, J.; Ruyechan, W.T.; Williams, N. Two Novel RNA Binding Proteins From *Trypanosoma brucei* Are Associated With 5S rRNA (2002a) *Biochem. Biophys. Res* 290:569-576;

-
54. Pitula, J.S.; Park, J.; Parsons, M.; Ruyechan, W.T.; Williams, N.; Two Families Of RNA Binding Proteins From *Trypanosoma brucei* Associate In A Direct Protein-Protein Interaction. (2002b) Mol. Biochem. Parasitol. 122(1):81-9;
55. Porcel, B. M.; Tran, A. N.; Tammi, M.; Nyarady, Z.; Rydaker, M.; Ürményi, T.P.; Rondinelli, E.; Pettersson, U.; Andersson, B.; Aslund, L. Gene Survey Of The Pathogenic Protozoan *Trypanosoma cruzi*. (2000a) Genome Res. 10(8):1103-1107;
56. Porcel, B.M.; Aslund, L.; Pettersson, V.; Andersson, B. *Trypanosoma cruzi*: A Putative Vacuolar ATP Sintase Subunit And CAAX Prenyl Protease – Encoding Gene, As Examples Of Gene Identification In Genome Projects (2000b). Exp. Parasitol. 95(3):176-86;
57. Rajkovic, A.; Davis, R.E.; Simonsen, J.N.; Rottman, F.M. A Spliced Leader Is Present On A Subset Of mRNAs From The Human Parasite *Schistosoma mansoni* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:8879-8883;
58. Ramos, A.; Grunert, S.; Adams, J.; Micklen, D.; Proktor, M.; Bycroft, M.; St Johnston, D.; Varani, G. RNA Recognition By A Staufen Double-Stranded RNA Binding Domain. (2000) EMBO J. 19:997-1009.
59. Ramos F. P.; Araripe, J.R.; Cunha e silva, N.L.; Urményi, T. P.; Silva, R.; de Souza, W.; Rondinelli, E. The First *Trypanosoma cruzi* Rab-Like encoding gene with Regulated Expression during Endocytic Pathway (manuscrito em preparação)
60. Requena, J. M.; Lopez, M.C.; Jimenez-Ruiz, A.; De La Torre, J.C.; Alonzo, C. A Head-To-Tail Tandem Organization Of Hsp70 Genes In *Trypanosoma cruzi*. (1988) Nuc. Acids Res 16:1393-1406;

-
61. Rondinelli, E.; Silva, R.; Carvalho, J.F.O.; Soares, C.M.A.; de Carvalho, E.F.; de Castro, F.T. *Trypanosoma cruzi*: An In Vitro Cycle Of Cell Differentiation In Axenic Culture. (1988) *Exp. Parasitol.* 66:197-204;
62. Ryter, J.M.; Schultz, S.C. Molecular Basis Of Double-Stranded RNA-Protein Interactions: Structure Of A dsRNA-Binding Domain Complexed With dsRNA (1998) *EMBO J.* 17:7505-7513;
63. Sambrook J.; Russel, D.W.; Sambook, J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory 3rd Ed. (2001);
64. Shamo, Y.; Abdul-Manan; Williams, K.R. Multiple RNA Binding Domains (RBDs) Just Don't Add Up (1995) *Nuc. Acid Res.* 23(5)735-728;
65. Siomi, H; Siomi, M.C.; Nussbaum, R.L.; Dreyfuss, G. The Protein Product Of The Fragile X Gene, FMR 1, Has Characteristics Of An RNA-Binding Protein. (1993) *Cell* 74:291-298;
66. Soares, C.M.A.; Carvalho, E.F.; Ürményi, T.P.; Carvalho, J.F.^o; Castro, F.T.; Rondinelli, E. Alpha- And Beta-Tubulin mRNAs Of *Trypanosoma cruzi* Originate From A Single Multicistronic Transcript. (1989) *FEBS Lett.* 250,497-502;
67. Souto, R.P.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell, D.A.; Zingales, B. DNA Markers Define Two Major Phylogenetic Lineages Of *Trypanosoma cruzi* (1996) *Mol Biochem. Parasitol* 83:141-152;
68. Stevens, J.R.; Gibson, W. The Molecular Evolution of Trypanosomes (1999) *Parasitol. Today* 15(11):432-7;

69. Studier, F.W.; Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. (1986) J Mol Biol. 189(1):113-30;
70. Tan, R.; Frankel, A.D.; Structural Variety Of Arginine-Rich RNA Binding Peptides. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:5282-5286;
71. Teixeira, S.M.R.; Russel, D.G.; Kirchhoff, L.V.; Donelson, J.E. A differentially Expressed Gene Family Encoding "Amastin," a Surface Protein of *Trypanosoma cruzi* Amastigotes (1994) J. Biol. Chem 269(32):20509-20516;
72. Teixeira, SM.R.; Kirchhoff, L.V.; Donelson, J.E. Post-transcriptional Elements Regulating Expression of mRNAs from Amastin/Tuzin Gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. (1995) J. Biol. Chem. 279(38):22586-22594;
73. Teixeira, S.M.R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz. (1998) J. Med. Biol. Res. 31: 1503-1516;
74. Teixeira, S.M.R.; Kirchhoff, L.K.; Donelson, J.E. *Trypanosoma cruzi*: Suppression of Tuzin Gene Expression by its 5'UTR and Spliced Leader Addition Site. (1999) Exp. Parasitol. 93:143-151;
75. Tessier, LH.; Keller, M.; Chan, R.L.; Fournier, R.; Well, J.H.; Imbault, P.; Short-Leader Sequences May Be Transferred From Small Rnas To Pre-Mature Mrnas By Trans-Splicing In *Euglena*. (1991) EMBO J. 10:2621-2625;
76. The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium. The *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative (1997) Parasitol. Today 13(1):16-22;

-
77. Tibayrenc, M. Population Genetics Of Parasitic Protozoa And Other Microorganisms. (1995) *Adv. Parasitol.* 36:48-115;
78. Tyler, K.M.; Engman, D.M. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi* Revisited (2001) *Int. J. Parasitol.* 31:472-481;
79. Vanhamme, L.; Pays, E. Control Of Gene Expression In Trypanosomes (1995) *Microbiol. Rev.* 59(2):223-240;
80. Varani, G.; Nagai, K. RNA Recognition By RNP Proteins During RNA Processing. (1998) *Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.* 27:407-45;
81. Verdun, R. E.; Di Paolo, N.; Urmenyi, T. P.; Rondinelli, E.; Frasch, A. C.; Sanchez, D. O.; Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. (1998) *Infect Immun.* 66(11): 5393-8;
82. Vickerman, K. Developmental Cycles And Biology Of Pathogenesis Trypanosomes. (1985) *Br. Med. Bull* 41(2):105-114;
83. Weber K, Osborne, M. The Of Molecular Weight Determinations By Dodecil-Sulfate-Polyacrilamide Electrophoresis (1969) *J. Biol. Chem* 244:4406-4422;
84. Wilson, K.; Uyetake, I.; Boothroyd, J. *Trypanosoma brucei*: *Cis*-Acting Sequences Involved in the Developmental Regulation of PARP Expression. (1999) *Exp. Parasitol.* 91:222-230;
85. Xu, P.; Wen, L.; Benegal, G.; Wang, X.; Buck, G.A. Identification Of A Spliced Leader RNA Binding Protein From *Trypanosoma cruzi* (2001) *Mol. Biochem. Parasitol* 112:39-49

86. Zhang, J.; Williams, N. Purification, Cloning, And Expression Of Two Closely Related *Trypanosoma brucei* Nucleic Acid Binding Proteins (1997) Mol. Biochem. Parasit. 87: 145-158
87. Zhang, J.; Ruyechan, W.; Williams, N. Developmental Regulation Of Two Nuclear RNA Binding Proteins, P34 And P37, From *Trypanosoma brucei* (1998) Mol. Biochem. Parasitol. 92:79-88