

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

JOÃO RAMOS DA CRUZ SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS DE
LIGAÇÃO A RNA EM *LEISHMANIA INFANTUM*

RECIFE

2014

JOÃO RAMOS DA CRUZ SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS COM
DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO A RNA EM *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Co-orientadora: Dra. Tamara De'Carli da Costa Lima

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S586a Silva, João Ramos da Cruz.
Análise da expressão heteróloga de proteínas com domínios de ligação a RNA em *Leishmania infantum* / João Ramos da Cruz Silva. - Recife: R. M. Campos, 2007.
69 p.: il.
Dissertação (mestrado acadêmico em biociências e biotecnologia em saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto. Co-orientadora: Tamara De'Carli da Costa Lima.
1. Regulação da Expressão Gênica. 2. Proteínas de Ligação a RNA. 3. *Leishmania infantum* - genética. 4. Transdução de sinal - genética. 5. Genômica. 6. Proteínas. 7. Modelos teóricos. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio. ths. II. Lima, Tamara De'Carli da Costa. III. Título.

CDU 616.993.161

JOÃO RAMOS DA CRUZ SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS COM DOMÍNIOS DE
LIGAÇÃO A RNA EM *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em ciências.

Aprovado em: 31 /07/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Departamento de Microbiologia/CPqAM

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Departamento de Imunologia/CPqAM

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Departamento de Entomologia /CPqAM
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pelo conhecimento repassado durante a execução deste trabalho.

A Dra. Tamara De'Carli da Costa Lima não só pelo conhecimento repassado, como também pela paciência e apoio no trabalho e nos momentos mais turbulentos.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e disponibilidade de recursos, aos funcionários e alunos Departamento de Microbiologia pelo apoio técnico proporcionado. Em especial a Camylla Carvalho e Bruna Santos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio Financeiro.

A Bruna Caiado e José Valter do departamento de Virologia e Terapia Experimental, meu muito obrigado.

A todos os colegas do Grupo de Biologia Molecular de Tripanosomatídeo (BIOMOLTRIP/prof. Osvaldo), em especial a Ludmila Arruda, pela grande colaboração para a realização desse trabalho, pelo convívio diário, pelos choros e pelas felicidades, pessoas as quais nunca esquecerei.

À minha família e aos meus amigos pela compreensão. Em especial a minha Mãe Noemia e meu avô Joaquim (*in memoriam*) que sempre me ensinaram a importância da educação.

Aos mestres que tanto contribuíram para minha formação.

Aos colegas de sala na pós-graduação de Biociências e Biotecnologia em Saúde

À banca examinadora pela disponibilidade e gentileza em aceitar o convite.

Agradeço a todos,

João Ramos da Cruz Silva

“...Se Choro, quando choro e minha lágrima
cai, é para regar o capim que alimenta a vida.
Chorando eu refaço as nascentes que você
secou...”

Maria Bethânia

SILVA, João Ramos da Cruz. **Análise da expressão heteróloga de proteínas com domínios de ligação a RNA em *Leishmania infantum***. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

Os tripanossomatídeos possuem uma combinação não usual de mecanismos moleculares, e seus processos de regulação de expressão gênica ocorreram a nível pós-transcricional. Acredita-se que essa regulação envolva tanto o controle da estabilidade dos mRNAs, como sua tradução em proteínas, eventos em que atua a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP – *Poly-A Binding Protein*), uma das principais proteínas de ligação a RNAs em eucariotos. Um grande número destas proteínas está presente nos tripanossomatídeos, se caracterizando por possuírem domínios típicos de ligação a RNA, como o domínio RRM (*RNA Recognition Motif*). Dentre estas se destacam as proteínas de ligação a sequências ricas em uridina (UBPs), que se mostraram capazes de interagir com homólogos de PABP. Outras proteínas hipotéticas contendo domínios de ligação a RNA foram identificadas em ensaios que buscavam parceiros diferenciais para os três homólogos de PABP de *Leishmania*. Este trabalho se propôs a contribuir na caracterização funcional das proteínas UBPs e das proteínas hipotéticas, através da otimização de sua expressão de forma heteróloga em *L. infantum*, fusionadas ao epítopo HA. Para isto, os genes codificantes dos três homólogos de UBPs, e de cinco outras proteínas de ligação a RNA que parecem interagir com PABPs, foram amplificados e clonados em vetor de expressão de *Leishmania*. As construções geradas foram transfectadas em *L. infantum* e a expressão de seis destas proteínas avaliada. Os resultados obtidos mostram uma variação no reconhecimento das proteínas geradas com anticorpos comerciais anti-HA, que parecem depender da sequência de aminoácidos da sua extremidade C-terminal. Diferenças significativas nos seus níveis de expressão também foram observadas. Entre os três homólogos de UBP, dois destes se mostraram mais abundantes enquanto que os três são representados por mais de uma banda, indicando possíveis modificações pós-traducionais.

Palavras chave: regulação da expressão gênica, proteína de ligação à cauda poli-A, proteínas de ligação a RNA, RRM.

SILVA, João Ramos da Cruz, **Expression analysis of heterologous proteins with RNA-binding domains in *Leishmania infantum***. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The trypanosomatids possess an unusual combination of molecular mechanisms, where the processes of regulation of their gene expression occur mainly at the post-transcriptional level. It is believed that this regulation involves both the control of mRNA stability as well as translation into proteins, events where the Poly-A Binding Protein (PABP), the major eukaryotic RNA binding protein, participates. A large number of RNA binding proteins are found in trypanosomatids, all characterized by having typical RNA-binding domains, such as the RRM (RNA Recognition Motif) domain. Prominent among these are proteins binding to uridine-rich sequences (UBPs), which have been shown to interact with PABP homologues. Other hypothetical proteins containing RNA-binding domains have been identified seeking differential partners for the three homologues of *Leishmania* PABPs. This study proposes to contribute to the functional characterization of UBPs proteins and hypothetical proteins, by optimizing their heterologous expression fused to the HA epitope in *L. infantum*. The genes encoding homologues of the three UBPs and five other RNA-binding proteins which appear to interact with PABPs were amplified and cloned into a *Leishmania* expression vector. The generated constructs were transfected into *L. infantum* and the expression of six of these proteins evaluated. The results show a variation on the recognition of the proteins generated with commercially available anti-HA antibodies, which seem to depend upon their C-terminal amino acid sequences. Significant differences in their expression levels were also observed. Amongst the three UBP homologues, two of these were more abundant while all three were represented by more than one band, indicating possible post-translational modifications.

Keywords: regulation of gene expression, poly-A binding protein, RNA binding proteins, RRM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida dos tripanossomatídeos.....	15
Figura 2- Insetos vetores da leishmaniose.....	16
Figura 3- Morfologia da <i>Leishmania</i>.....	17
Figura 4- Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>.....	20
Figura 5- Mecanismos de iniciação da tradução cap-dependente.....	24
Figura 6- Esquema de proteína PABP citoplasmática.....	25
Figura 7- Estrutura das proteínas TcUBP1 e TcUBP2.....	30
Figura 8- Esquematização do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa.....	38
Figura 9- Sequência do epítipo HA integrado a genes que codificam proteínas do estudo.....	39
Figura 10- Representação de proteínas contendo domínio de ligação aos RNAs.....	44
Figura 11- Amplificação dos genes de UBPs e genes hipotéticos.....	45
Figura 12- Confirmação das clonagens no vetor pGemT-Easy.....	46
Figura 13- Genes com domínio RRM inseridos em plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA.....	48
Figura 14- Western-blot de análise de expressão protéica	49
Figura 15- Imunodeteccção das proteínas com anticorpos monoclonais anti-HA comerciais.....	50
Figura 16- quantificação da expressão de proteínas fusionadas ao marcador HA através de imunotecção.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Oligonucleotídeos utilizados para amplificar sequências alvo.....	35
Quadro 2- Identificação de genes com seus tamanhos preditos.....	36
Quadro 3- Análise dos parceiros funcionais das PABPs.....	43
Quadro 4- Análise da região C-terminal de proteínas não reagentes a anticorpo anti-HA.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elementos ricos em adenina e uracila
ATP	Adenosina Trifosfato
CPSF	Fator específico de clivagem-poliadenilação
dATP	2'-deoxiadenosina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECL	Enhanced luminol-based
eIFs	Fator de iniciação eucariótico
eRFs	Fator de liberação eucarioto
FAZ	Zona de Ligação Flagelar
GP63	Glicoproteína de 63kDa
HA-tag	<i>Human influenza Hemagglutinin tag</i>
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Complexo Glicofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral ou Calazar
mRNA	RNA mensageiro
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
PABP	Proteína de ligação à cauda Poli-A
PABPC	Proteína de ligação à cauda poli-A citoplasmática
PABPN	Proteína de ligação à cauda poli-A Nuclear
PAP	Poli-A-polimerase
Pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de cadeia polimerase
pGEM T- EASY	Vetor T de Clonagem Comercial
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minute
RRM	Motivos de reconhecimento ao RNA
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SBF	Soro fetal bovino
SL	<i>Spliced leader</i>
SMUG	Elemento localizado na região 3'-não traduzida das mucinas
tRNAi	RNA transportador iniciador
UTR	Região não traduzida
UBP	Proteínas de ligação a sequências ricas em uridina
WHO	Organização Mundial de Saúde
X-GAL	<i>5-bromo-4-chloro-3-iodolyl-β-D-galactopyranoside</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MARCO TEÓRICO	14
2.1 Tripanossomatídeos	14
2.2 O gênero <i>Leishmania</i>, as leishmanioses e sua epidemiologia	15
2.3 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	18
2.4 Genoma da <i>Leishmania</i>	20
2.5 Mecanismos da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos	21
2.6 Síntese de proteínas em eucariotos	22
2.6.1 <u>Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F</u>	22
2.6.2 <u>Proteína de ligação a cauda poli-A</u>	24
2.6.2.1 <i>Estrutura da PABP</i>	25
2.6.2.2 <i>Papel da PABP na tradução</i>	26
2.6.2.3 <i>Funções diversas das PABPs</i>	27
2.6.2.4 <i>Múltiplos homólogos de PABPs citoplasmáticas nos tripanossomatídeos</i>	28
2.7 Proteínas de ligação a sequências ricas em uridinas em tripanossomatídeos	29
2.8 Proteínas com domínio de ligação ao mRNA	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	34
5.1 Extração de DNA genômico	34
5.2 Amplificação e purificação dos fragmentos gênicos de interesse	34
5.3 Clonagem em plasmídeo pGEM T-Easy	35
5.4 Sequenciamentos dos fragmentos amplificados	37
5.5 Subclonagem em plasmídeo pSPBT1-Y-Neo-Alfa	37
5.6 Cultivo e eletroporação de células de <i>L. infantum</i>	39
5.7 Obtenção de extrato bruto e lizado de células de <i>L. infantum</i>	40
5.8 Western-blot	41
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
7 RESULTADOS	43

7.1 Resultados preliminares que deram origem a essa proposta.....	43
7.2 Amplificação dos genes pertencentes a família com domínio RRM.....	45
7.3 Clonagem em vetor da série pGEM T-Easy.....	46
7.4 Subclonagem no vetor pSPBT1-Y-Neo-Alfa.....	47
7.5 Análise da superexpressão das proteínas fusionadas a HA em <i>L. infantum</i>.....	48
7.6 Avaliação da detecção de proteínas por diferentes anticorpos anti-HA.....	50
7.7 Quantificação dos níveis de expressão das proteínas heterólogas fusionadas a HA...	51
8 DISCUSSÃO.....	53
9 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A- Identificação das proteínas com os seus pesos moleculares	66
ANEXO B- Especificação do anticorpo monoclonal anti-HA SIGMA.....	67
ANEXO C- Especificação do anticorpo monoclonal anti-HA Abcam.....	68

1 INTRODUÇÃO

Os principais representantes da família Trypanosomatidae são os microorganismos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, parasitas flagelados responsáveis por enfermidades de impacto mundial, como as várias formas de leishmaniose, a doença de Chagas e a doença do sono. A leishmaniose constitui um elevado problema de saúde pública sendo endêmica em 99 países, onde afeta cerca de 1,5 milhões de pessoas atualmente, com cerca de 500 mil novos casos por ano. Este agente etiológico é transmitida aos mamíferos pela picada do inseto hematófago e, por estar presente em dois hospedeiros, possui um complexo ciclo de vida envolvendo várias formas de desenvolvimento. Este ciclo de vida exige respostas rápidas dos seus mecanismos de regulação da expressão gênica para que o patógeno possa se adaptar eficientemente a mudanças de condições ambientais em diferentes hospedeiros.

Os tripanossomatídeos apresentam características bioquímicas, celulares e moleculares específicas que os diferenciam dos demais eucariotos. Várias destas características dizem respeito à transcrição policistrônica, onde os genes são transcritos como um longo mRNA precursor e seu processamento se dá por um mecanismo diferenciado denominado *trans-splicing*, no qual o pré-mRNA policistrônico é dividido em vários mRNAs maduros representando sequências codificadoras individuais. A transcrição policistrônica dos genes dos tripanossomatídeos é uma consequência da quase total ausência de promotores para RNA polimerase II, o que implica na ausência de controle transcricional. Desse modo a regulação da expressão gênica nesses organismos ocorre através do controle da estabilidade dos mRNAs e por eventos regulatórios que atuam durante a sua tradução em proteínas. Até o momento, vários exemplos de mRNAs cuja estabilidade é regulada já foram descritos para diversos tripanossomatídeos, embora se conheça pouco sobre os mecanismos moleculares envolvidos. A iniciação da tradução é a etapa mais complexa do processo de síntese de proteínas e o principal alvo de mecanismos de regulação pois, nesse momento, ocorre o reconhecimento dos mRNAs a serem traduzidos pelos ribossomos. Este é um evento altamente controlado e regido pelos fatores de iniciação da tradução (eIFs – *eukaryotic initiation factors*), porém

pouco se conhece a seu respeito nos tripanosomatídeos e quais elementos estariam sujeitos à regulação.

A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) é uma das principais proteínas de ligação ao mRNA nos eucariotos, cujo papel vem sendo demonstrado como crítico na iniciação da tradução e sua regulação. Esta proteína se liga a cauda poli-A presente na extremidade 3' dos mRNAs e promove a interação entre suas extremidades 3' e 5', através da ligação com fatores de tradução específicos, reforçando assim a iniciação da tradução e a estabilidade do mRNA. Nos tripanosomatídeos, dois homólogos de PABP (PABP1 e 2) foram identificados conservados nas suas diferentes espécies e um terceiro homólogo foi encontrado apenas em espécies de *Leishmania* (PABP3). Dados indicam que em *Leishmania* a PABP1 parece ter um papel mais geral na tradução, enquanto que as PABPs 2 e 3, que se ligam aos mesmos mRNAs, podem ter funções diferenciadas.

Do ponto de vista de mecanismos de regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos, elementos ricos em adenina e uracila (*AU-rich elements* ou ARE) localizados na região 3'UTR de mRNAs foram identificados como tendo um papel chave no controle de sua estabilidade. Dentre os fatores proteicos que se ligam a estes elementos destacam-se as proteínas de ligação a sequências ricas em uridina (UBPs). As UBPs são proteínas de baixo peso molecular contendo um único domínio RRM (*RNA recognition motifs*) de ligação ao RNA, que foram originalmente identificadas em *T. cruzi*. Estudos neste patógeno demonstraram a ocorrência de interações diretas entre homólogos de UBP e a PABP2, sugerindo um possível modo de ação tanto das UBPs como da PABP2. Outras proteínas contendo RRMs únicos de função desconhecida também foram identificadas em experimentos preliminares se ligando diferencialmente a um ou outro homólogo de PABP de *Leishmania*.

Tendo em vista os dados preliminares indicando uma atuação das UBPs e outras proteínas hipotéticas de ligação a RNA mediada pelas PABPs, e uma vez que as PABPs tem um papel crítico na tradução e em várias etapas do controle da expressão gênica, este projeto

buscou criar ferramentas para que se possa entender como estariam envolvidas no processo de síntese proteica nos tripanossomatídeos.

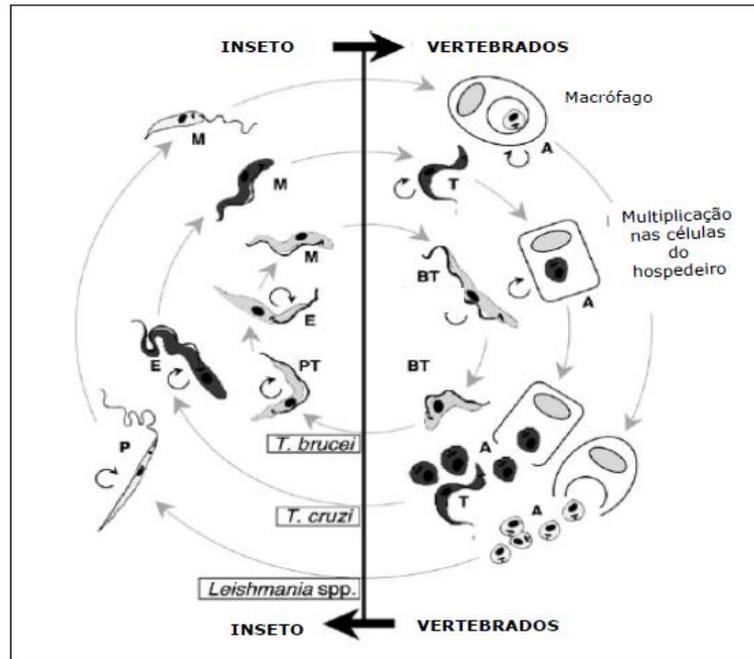
2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tripanossomatídeos

A família Tripanosomatidae, da ordem Kinetoplastida, é constituída por nove gêneros de parasitas obrigatórios, com destaque para os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (SIMPSON *et al.*, 2006), de grande importância médica e veterinária e causadores de doenças de impacto mundial, tais como a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*) e as várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp.*). Estes protozoários apresentam mudanças morfológicas significativas durante seu ciclo de vida (Figura 1), visto que habitam dois hospedeiros diferentes e são transmitidos aos humanos por diferentes insetos vetores (STUART *et al.*, 2008).

As enfermidades causadas pelos tripanossomatídeos são classificadas como doenças tropicais negligenciadas que necessitam de tratamento quimioterápico de alta toxicidade para humanos e capazes de gerar resistência parasitária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). Os protozoários pertencentes a esse grupo apresentam características comuns incluindo estruturas subcelulares como o cinetoplasto e os glicossomos e, entre outras peculiaridades, possuem sítios-alvos e patogênese diferentes nos hospedeiros vertebrados, além da capacidade de evasão do sistema imune através de variações na antigenicidade de sua superfície (EL-SAYED *et al.*, 2005). Os tripanossomatídeos apresentam uma importante edição de RNAs mitocondriais por inserções/deleções de uridina (STUART *et al.*, 2005), e apresentam um sistema de ancoramento de proteínas de membrana utilizando glucosil fosfatidil inositol (GPI) (CAMPBELL *et al.*, 2003).

Figura 1 - Ciclo de vida dos tripanossomatídeos.



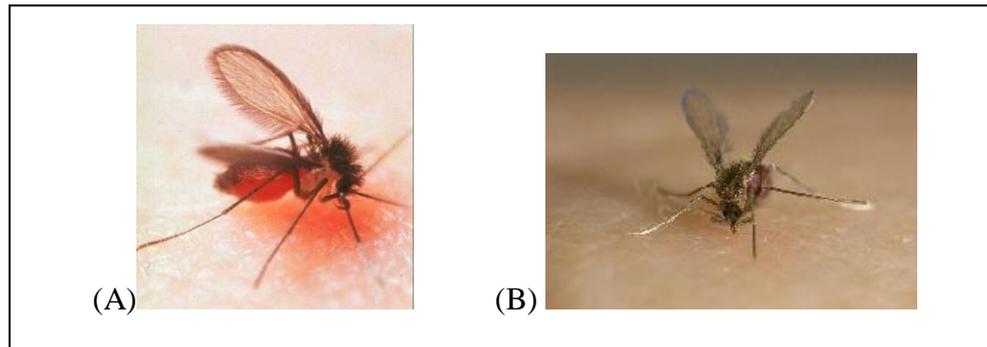
Fonte: Modificado de Bringau de et al. (2006).

Nota: Representação de diferentes formas celulares durante a transição entre o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado.

A, amastigota; BT, tripomastigota sanguínea; E, epimastigota; M, tripomastigota metacíclica; P, promastigota; PT, tripomastigota procíclica; T, tripomastigota.

2.2 O gênero *Leishmania*, as leishmanioses e sua epidemiologia

O gênero *Leishmania* compreende protozoários flagelados causadoras de doenças infecciosas, que são transmitidos ao homem pela picada de insetos flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Figura 2) (SELVAPARDIYAN, 2012) Existem aproximadamente 30 espécies conhecidas de *Leishmania*, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e outras 20 no Novo Mundo. Dentre todas estas espécies, cerca de 20 infectam o homem e 10 tem relevância médica (BATES, 2007).

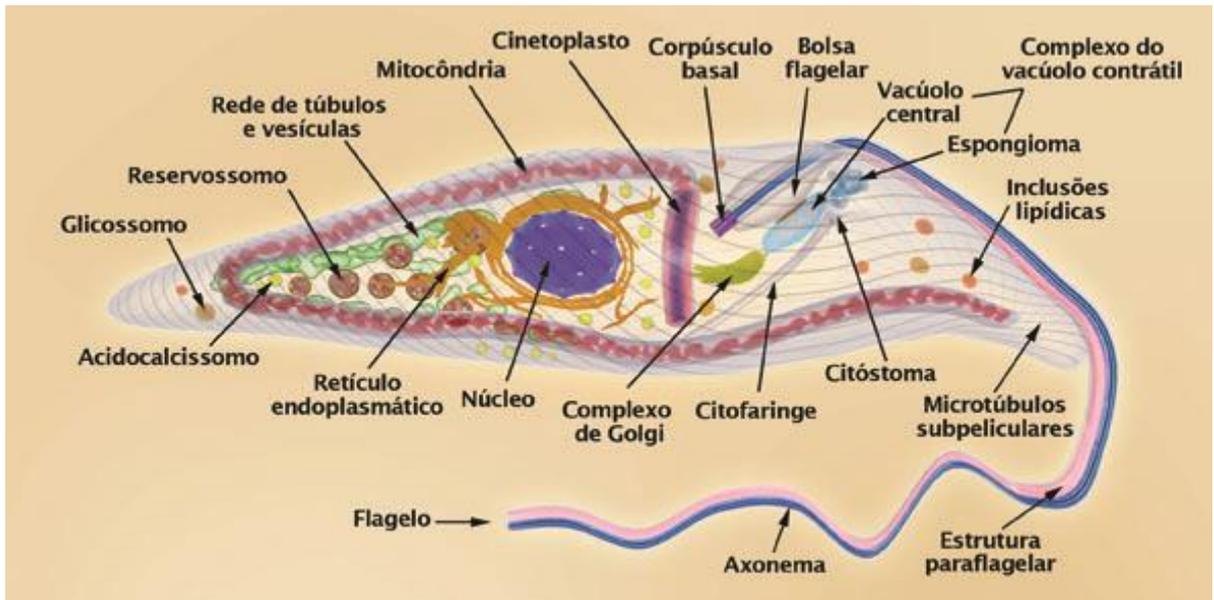
Figura 2 - Insetos vetores da leishmaniose

Fonte: Vectorbase (ORGANISMS, 2014).

Nota: Gêneros *Phlebotomus* (A) e *Lutzomya* (B).

Nos hospedeiros vertebrados, os microorganismos do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Ao longo do seu ciclo de vida possuem duas formas evolutivas principais, uma com o flagelo não aparente ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e outra com o flagelo livre ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (BRASIL, 2010). As formas promastigotas possuem uma variabilidade muito grande nas suas dimensões, entre 10 e 20 μm de comprimento. Já a forma amastigota intracelular é arredondada com dimensões de 3 a 7 μm de diâmetro. A estrutura celular dos tripanossomatídeos é definida por um arcabouço de microtúbulos subpeliculares disposto em um arranjo de hélices ao longo do eixo longitudinal da célula. Um único flagelo reside anexado ao corpo celular através da zona de junção do flagelo ou FAZ (*Flagellum Attachment Zone*), localizada no bolsão flagelar (*Flagellar Pocket*). Junto à zona de junção do flagelo está localizado o corpo basal, importante para divisão celular, e próximo a ele reside o cinetoplasto (Figura 3), localizado dentro de uma grande mitocôndria que percorre quase todo o corpo celular (LACOMBLE, 2012).

Figura 3: Morfologia de *Leishmania*.



Fonte: LABSPACE (2014).

Nota: Figura esquemática mostrando o corpo celular da forma epimastigota que apresenta organelas comuns a todos os eucariotos, além de apresentar organelas específicas da família Trypanosomatidae. Com destaque para a Bolsa Flagelar, Cinetoplasto e Glicossomos.

Várias classificações já foram propostas para os subgêneros de *Leishmania*, classificações estas baseadas não só na morfologia e desenvolvimento do protozoário dentro do inseto vetor/hospedeiro como também em métodos de caracterização genética (SHAW, 1994). Atualmente, existem três grupos de parasitos, classificados em diferentes subgêneros e estes variam de acordo com a localização do parasito no intestino do inseto vetor, são eles: subgênero *Leishmania*, constituído pelas espécies que são encontradas no intestino médio do vetor; subgênero *Viannia*, constituído pelas espécies que se desenvolvem na região pilórica do intestino médio do inseto vetor; e subgênero *Sauroleishmania*, constituído pelas espécies que se desenvolvem no intestino posterior do inseto vetor (CROAN, 1997; NOYES, 1997).

As possíveis formas clínicas ocasionadas pela infecção com as diferentes espécies de *Leishmania* são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). Essa diversidade clínica deve-se às diferentes espécies do parasita bem como as variações na resposta imune do hospedeiro (SELVAPANDIYAN, 2012). A LC pode ser causada por *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L.*

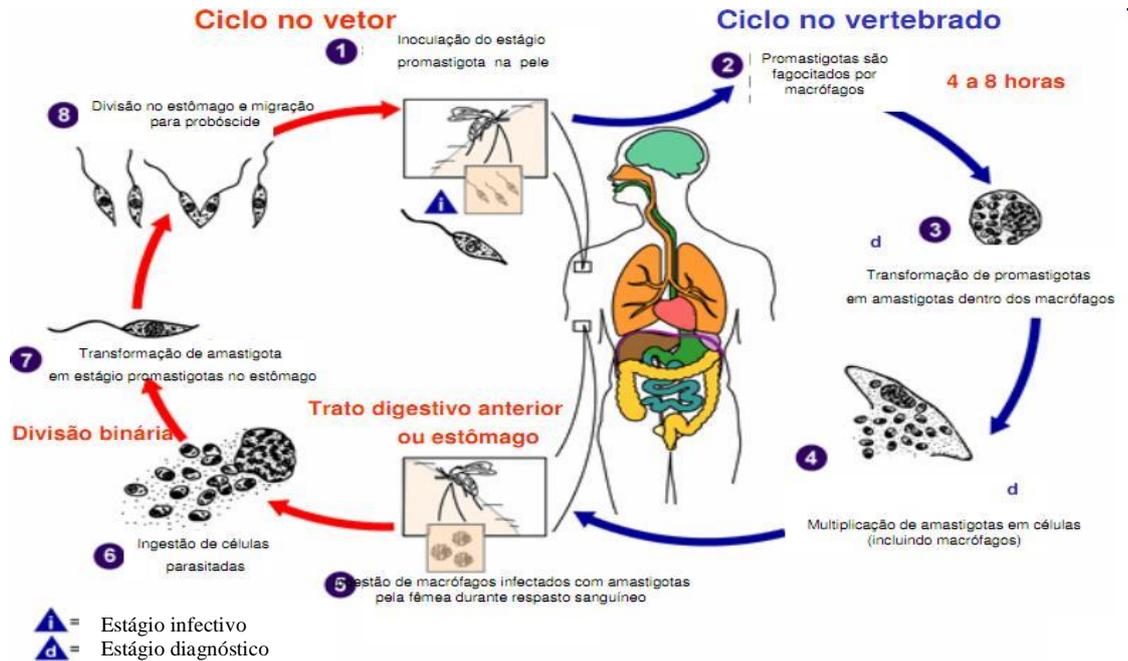
peruviana, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi* e *L. shawi* (GRIMALDI, 2001), ALC é a forma mais comum e que causa úlcera indolor, porém capaz de provocar cicatrizes profundas (BRASIL, 2010). Na forma difusa da LC, encontram-se lesões nodulares de tamanho variável irrompendo em vários locais, muitas vezes, distantes do local de exposição. Lesões cutâneas simples são mais frequentemente autocuradas, mas em alguns casos pode evoluir para a forma mucocutânea (GOTO, 2012). A LMC é causada por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, tipicamente encontrado nas Américas (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensi*, e *L. guyanensis*). São lesões que duram por um longo período que se disseminam para as membranas mucosas. Em contraste com a LC padrão, a LMC pode ser fatal e requer tratamento (DAVID; CRAFT, 2009). As principais espécies causadoras da LV são *L. donovani* e *L. infantum*. A LV se caracteriza por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e ao óbito, se o paciente não for tratado (BRASIL, 2010). As leishmanioses apresentam uma incidência anual de cerca de 1,5 milhões de casos para as variedades LC e de 500 mil para a forma LV, afetando 12 milhões de pessoas em diferentes países do mundo incluindo o Brasil. Em todo o mundo aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em área de risco. Um dado relevante é que o Brasil, a Índia e o Sudão apresentam 90% das ocorrências de LV do mundo e que no Brasil a região Nordeste registra 80% dos casos desta doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013).

2.3 Ciclo biológico da *Leishmania*

O ciclo biológico da *Leishmania* começa com a infecção dos hospedeiros vertebrados pelas formas promastigotas metacíclicas infectantes, durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos insetos vetores (Figura 4). As formas promastigotas metacíclicas utilizam mecanismos que permitem resistir à ação de elementos do soro do hospedeiro vertebrado. Por outro lado, algumas moléculas da superfície do parasito facilitam a sua endocitose pelos macrófagos. Moléculas de superfície das promastigotas, como a GP63 (glicoproteína de 63kDa) e LPG (complexo glicofosfoglicano) são considerados importantes nesse processo (KULKARNI *et*

al., 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Quando o parasita é interiorizado, o macrófago promove a formação do fagolisossomo e o parasito pode se adaptar às condições do novo ambiente, passando para a forma amastigota. Esta é capaz de se desenvolver e multiplicar-se no meio ácido do vacúolo digestivo. Após inúmeras multiplicações por divisão binária, os amastigotas são liberados pelo rompimento da célula hospedeira e fagocitados por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre pela ingestão das formas amastigotas durante o repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado. No inseto, os parasitas se transformam em promastigotas e podem ser vistos, em processo de multiplicação, aderidos à parede intestinal ou livres no lúmen. Devido à intensa multiplicação ocorre uma obstrução mecânica, a qual dificulta a ingestão de sangue pelo inseto. Após cada novo repasto sanguíneo, os músculos responsáveis pela sucção relaxam provocando o refluxo das formas promastigotas que, assim, infectam um novo hospedeiro (BATES, 2007). As formas infectantes podem ser observadas livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal do inseto. A fêmea, ao se alimentar, inocula no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas infectantes, permitindo a perpetuação do ciclo (WILSON *et al.*, 2010).

Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania sp.*



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2014).

Nota: A imagem mostra a transferência do parasita que passa do hospedeiro invertebrado para o hospedeiro vertebrado (número 1). Observa-se também as diversas formas morfológicas do microorganismo, bem como a transformação das formas promastigotas em amastigotas dentro do macrófago (número 3) e a transformação das células amastigota em promastigotas no estômago do vetor (número 7).

2.4 Genoma de *Leishmania*

Os tripanossomatídeos atuais divergiram muito cedo a partir de um ancestral comum (cerca de 200 a 500 milhões de anos) mas, apesar desse fato, suas espécies apresentam uma elevada conservação da ordem dos seus genes e um grande número de genes em comum (GHEDIN et al., 2004; KISSINGER, 2006). Já a divergência das espécies de *Leishmania* está estimada entre 15 a 20 milhões de anos atrás (LUKES et al., 2007). Os genomas das espécies de *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum* têm em média 33 Mpb distribuídos em 36 cromossomos, para *L. major* e *L. infantum*, e 35 cromossomos, para *L. braziliensis*. É possível observar que de um total de 8.300 genes, apenas 200 são distribuídos diferencialmente entre as três espécies. Observa-se também que a *L. braziliensis* possui 47 genes que estão ausentes

nas outras espécies, esse fato torna a *L. braziliensis* a mais divergente de todas, ao passo que a *L. infantum* tem 27 genes específicos e a *L. major* apenas 5 genes (PEACOCK *et al.*, 2007). No que se refere ao nível de conservação dos aminoácidos nas suas diferentes proteínas, *L. infantum* e *L. major* apresentam 92% de conservação enquanto que as de *L. braziliensis* apresentam 77% de conservação quando comparada com as outras duas (PEACOCK *et al.*, 2007). O genoma de *Leishmania* é altamente estável e não sofreu grandes mudanças durante a evolução por não apresentar perdas relacionadas a elementos móveis, embora *L. braziliensis* apresente elementos transponíveis únicos (SMITH *et al.*, 2007).

2.5 Mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

Os protozoários da família Tripanosomatidae, divergiram precocemente da linhagem evolutiva eucariótica e, por esse motivo, possuem características biológicas específicas (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Os tripanossomatídeos são organismos diplóides e seu genoma é organizado em grandes blocos gênicos policistrônicos, ou seja, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas organizados na mesma fita do DNA (DANIELS *et al.*, 2010; MARTINÉZ-CALVILLO *et al.*, 2009; SIMPSON *et al.*, 2006). Outra característica é que esses organismos não apresentam promotores típicos para a RNA polimerase II e assim a regulação da sua expressão gênica é pós-transcricional (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Após o processo de transcrição ocorre a maturação dos mRNAs pelo processo de *trans-splicing*. Durante esse processamento, os RNAs primários (policistrônicos) são clivados em mRNAs monocistrônicos e recebem na sua extremidade 5' uma sequência de 39 nucleotídeos denominada *Spliced-Leader* – SL ou mini-éxon. A presença da sequência SL ocorre em todos os mRNAs dos tripanossomatídeos e sua adição tem por finalidade posicionar o *cap4* (estrutura de 7-metil guanosina com metilação nos quatro primeiros nucleotídeos da sequência SL) na extremidade 5' dos mRNAs. Esse processamento, juntamente com a poliadenilação na região 3' dos mRNAs, leva a formação de mRNAs maduros monocistrônicos (HAILE; PAPADOPOULOU *et al.*, 2007; KRAMER; CARRINGTON, 2011).

2.6 Síntese de proteínas em eucariotos

O processo de síntese proteica ou tradução pode ser dividido em iniciação, alongação, terminação e reciclagem dos ribossomos (ACKER; LORSCH, 2008; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Enquanto as fases de alongação e terminação envolvem a atuação de um número limitado de fatores de tradução, a etapa da iniciação em eucariotos é um evento complexo que é assistido por mais de 25 polipeptídeos, denominados fatores de iniciação da tradução ou eIFs, de *eukaryotic Initiation Factors* (GEBAUER; HENTZE, 2004). Dentre todos os fatores relacionados com a iniciação da tradução podemos destacar os do complexo eIF4F, formado por três subunidades polipeptídicas e auxiliado pelos fatores eIF4B, eIF4H e pela PABP. Este complexo é um dos principais responsáveis pela etapa de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo (GINGRAS et al., 1999).

2.6.1 Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F

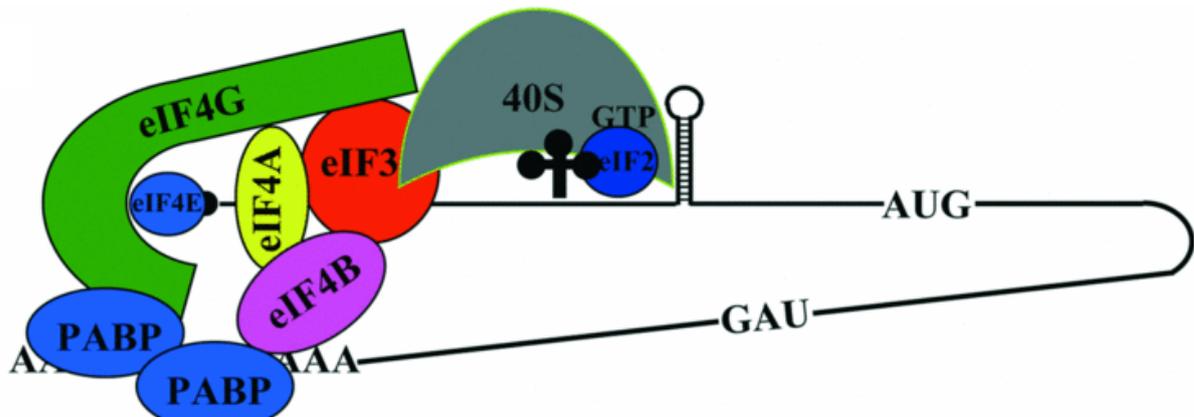
A iniciação da tradução compreende o processo de montagem das partículas ribossomais 80S, onde o códon inicial do mRNA é pareado com o anticódon do tRNA iniciador (Met-tRNA^{Met}) no sítio P ribossomal. Esta fase requer no mínimo nove fatores de iniciação da tradução (eIFs) e compreende algumas etapas que envolvem a formação do complexo de iniciação 43S e a união do mesmo com a subunidade 60S (JACKSON *et al.*, 2010):

- a) **Formação do complexo pré-iniciação 43S:** o complexo 43S é formado pela união da subunidade 40S com o complexo ternário formado pelos eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met};

- b) **Ligação do complexo 43S ao mRNA:** o recrutamento do complexo 43S ao mRNA é resultado de uma cadeia de interações entre *cap*-eIF4E-eIF4G-eIF3-43S, formando o complexo 48S;
- c) **Varredura da 5'UTR do mRNA pelo ribossomo:** após a formação do complexo 48S, a subunidade menor ribossomal faz uma varredura na porção do mRNA situada entre o *cap* e o códon de iniciação da tradução, com o intuito de eliminar estruturas secundárias e movimentar a subunidade ribossomal ao longo da 5'UTR. Nesta etapa são requeridos ATP e fatores como o eIF4A, eIF4G, e eIF4B, porém o mecanismo pelo qual esses fatores auxiliam o processo de varredura permanece pouco claro;
- d) **Reconhecimento do códon de iniciação AUG pelo ribossomo:** uma etapa fundamental para assegurar a fidelidade da iniciação e prevenir pareamentos errôneos do tRNA_i;
- e) **Formação da partícula ribossomal completa:** a união da unidade ribossomal maior 60S é seguida da dissociação dos fatores eIF1A, eIF3 e do eIF2-GDP residual num processo mediado pelo eIF5B.

O principal responsável pelo recrutamento da subunidade 40S ribossomal à extremidade 5' dos mRNAs, o complexo eIF4F (Figura 5) é composto por três polipeptídeos distintos: (1) eIF4A, uma RNA helicase ATP-dependente que remove as estruturas secundárias ao longo da região 5'UTR do mRNA, permitindo o recrutamento da subunidade ribossomal 40S e seu deslocamento até o códon de iniciação da tradução; (2) eIF4E, responsável pelo reconhecimento específico do *cap* na extremidade 5' do mRNA e (3) eIF4G, proteína que possui sítios de ligação para o eIF4E, eIF4A, PABP e eIF3. Desta forma, o eIF4F interage tanto com o *cap* (através do eIF4E) quanto com um segundo complexo, denominado eIF3, associado à subunidade 40S ribossomal (através do eIF4G), o que permite a ligação entre o mRNA e o ribossomo (BROOK et al., 2009; DEVER; SONENBERG, 2003; GINGRAS *et al.*, 1999).

Figura 5: Mecanismo da iniciação da tradução *cap*-dependente.



Fonte: Wormbook (2014).

Nota: Representação esquemática do modelo de circuito fechado de iniciação da tradução. Neste modelo, o complexo eIF4F interage tanto com a extremidade 5' do mRNA (via eIF4E) quanto com a cauda poli (A) na sua extremidade 3' (via PABP) e recruta a subunidade 40S ribossomal através da sua interação com o eIF3. Fonte:

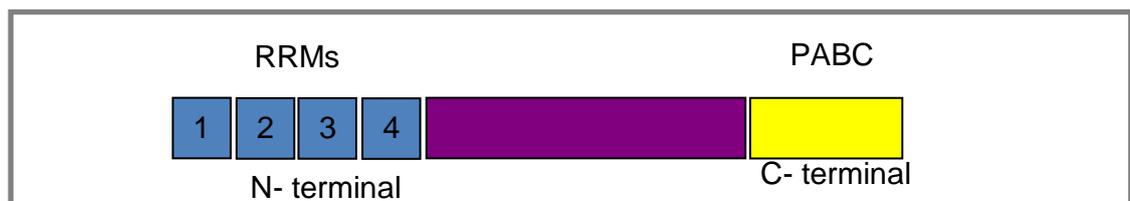
2.6.2 Proteína de ligação à cauda poli-A

A proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) representa uma classe principal de proteínas reguladoras de ligação a RNA que interagem especificamente com a cauda poli-A da região 3' dos mRNAs, estando presente apenas em eucariotos (GOSS; KLEIMAN, 2013). A PABP é considerada atualmente como um típico fator de iniciação da tradução, uma vez que possui um papel fundamental na etapa de iniciação da síntese proteica através da interação com o complexo eIF4F (MARINTCHEV; WAGNER, 2004), que promove a circularização do mRNA (WELLS *et al*, 1998). Esta interação estimula a tradução, pois facilita a reciclagem dos ribossomos pela interação direta da PABP com fatores de terminação (UCHIDA *et al*, 2002). A PABP está ainda envolvida em diferentes processos celulares relacionado ao metabolismo do mRNA, tais como processamento de pré-mRNA, transporte de mRNA maduro do núcleo para o citoplasma, regulação da estabilidade dos mRNAs, e na iniciação e terminação da tradução (WANG; GRUMET, 2004).

2.6.2.1 Estrutura da PABP

Dois tipos de PABPs conservadas evolutivamente já foram descritas, a PABP citoplasmática (PABPC) ou simplesmente PABP e a PABP nuclear (PABPN). Estruturalmente a PABP citoplasmática canônica é dividida em uma porção N-terminal, formada de quatro domínios de ligação ao RNA (RRM) altamente conservados e uma extremidade C-terminal variável com um domínio de interação proteína-proteína conservado (KUHN; WAHLE, 2004), como apresentado na figura 6. Os dois primeiros RRM da PABP são específicos para a ligação da PABP com a cauda poli-A do mRNA e tem sido relacionados com a interação da PABP com o eIF4G (KÜHN, 1996). Os RRM 3 e 4 tem uma baixa capacidade de ligação com a cauda poli-A e podem estar envolvidos no reconhecimento de sequências não poli-A (KHANAM *et al.*, 2006). Para que a PABP citoplasmática interaja com a cauda poli-A via RRM é necessário um sítio com um número mínimo de 12 adenosinas e múltiplas PABP podem se ligar ao mesmo poli-A (GOSS; KLEIMAN, 2013).

Figura 6: Representação esquemática da proteína PABP citoplasmática.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Destaque para a região N-terminal com quatro domínios de ligação ao mRNA, a extremidade C-terminal que possui um domínio chamado de PABC e entre essas duas regiões um domínio rico em prolina menos conservado.

A PABP nuclear é funcionalmente e estruturalmente diferente da PABP citoplasmática. Ela possui apenas um domínio RRM e um domínio C-terminal rico em arginina. Acredita-se que a PABPN tenha função de estimulação da maturação do mRNA e de sua exportação (GOSS; KLEIMAN., 2013).

2.6.2.2 *Papel da PABP na tradução*

O papel da PABP citoplasmática no complexo de iniciação da tradução ainda não é muito bem compreendido embora se saiba que a PABP se associa tanto com a cauda poli-A do mRNA quanto com o eIF4G. A interação entre PABP, eIF4G e eIF4E (*cap*-poli-A) é o modelo mais difundido para explicar os efeitos sinérgicos na tradução que se conhece quando o mRNA possui *cap* e encontra-se poliadenilado. O modelo da “circularização do mRNA” onde a PABP citoplasmática liga-se a cauda poli-A, interagindo com o eIF4F possibilitando a aproximação com o *cap* não ilustra totalmente a complexidade desse mecanismo. Achados recentes sugerem que a ligação PABP-eIF4G serve essencialmente para estabilizar a ligação do eIF4G com o eIF4E e, desse fator com o mRNA, o que seria necessário para a eficiência do recrutamento do complexo ribossômico 43S (GOSS; KLEIMAN., 2013). Vários estudos demonstraram que a interação PABP-eIF4G ocorre mesmo na ausência de cauda poli-A, porém de forma menos eficiente (WANG; GRUMET, 2004).

Um segundo modelo propõe que a circularização dos mRNAs estimula a reciclagem dos ribossomos. Isso se deve ao fato de que através da circularização é esperado um aumento na concentração de ribossomos terminais próximos a extremidade 5' do mesmo mRNA, assim facilitando a reciclagem do ribossomo para nova etapa de tradução (KAHVEJIAN *et al.*, 2001). Esse modelo é respaldado por achados que estabelecem a existência de uma interação entre a iniciação e a etapa de terminação da tradução, pois se observou que fatores de terminação eRF1 e eRF3 se ligam a região C-terminal da PABP (UCHIDA *et al.*, 2002). Isto indica que fatores de terminação e a PABP podem proporcionar aos ribossomos que terminam a tradução a possibilidade de participar de um próximo evento de síntese proteica no mesmo mRNA.

2.6.2.3 Funções diversas das PABPs

A PABP possui funções variadas em diferentes processos biológicos. A PABP citoplasmática atua na iniciação da tradução e na regulação da estabilidade dos mRNAs, funções que dependem de uma interação com o *cap* na extremidade 5' dos mRNAs (KUHN; WAHLE, 2004). Esta proteína atua ainda no processamento de pré-mRNAs, transporte do núcleo para o citoplasma e na terminação da tradução (WANG; GRUMET, 2004). Além do seu papel na iniciação da tradução, a interação da PABP com a cauda poli-A e o complexo eIF4F de iniciação da tradução parece proteger os mRNAs contra ações de deadenilases e de enzimas envolvidas com a remoção do *cap* (SANCHS; DAVIS, 1989). É possível também que a presença da PABP afeta a localização dos transcritos dentro da célula, uma vez que ao se ligar a esses a proteína não permitiria sua inclusão nos corpos de processamentos onde ocorre a degradação das moléculas de mRNA (KUHN; WAHLE, 2004).

Já a PABPN está envolvida na síntese da cauda poli (A), auxiliando no aumento da processabilidade da poli-A polimerase e contribuindo para definir o comprimento da cauda poli-A recém sintetizada (KUHN; WAHLE, 2004). A poliadenilação dos mRNAs acontece em dois passos, sendo o primeiro o de clivagem que define a região 3' do mRNA. O segundo passo é a adição de resíduos da cauda de adenosina que pode variar em comprimento em diferentes organismos. Para que haja a poliadenilação é necessária uma sequência de sinais específicos presentes no pré-mRNA, bem como a montagem de um grande número de fatores proteicos. Em mamíferos o fator CPSF liga-se ao sinal de poliadenilação para clivar o mRNA e em seguida ele se associa a poli-A polimerase (PAP) e a proteína de ligação a cauda poli-A nuclear (PABPN) para que ocorra a síntese da cauda poli-A (GOSS; KLEIMAN, 2013).

Estudos recentes demonstram que PABPs citoplasmáticas também têm funções nucleares, sugerindo uma dinâmica mais funcional e um intercâmbio entre as diferentes formas de PABPs. Nesse aspecto, embora pouco se saiba sobre o modo como a PABP participa na exportação de mRNAs do núcleo para o citoplasma, em leveduras foi observado

que, apesar da localização citoplasmática da PABP, a mesma esta dinamicamente mudando para o núcleo e poderia participar desse processo (BRUNE *et al.*, 2005).

2.6.2.4 Múltiplos homólogos de PABPs citoplasmáticas nos tripanosomatídeos

Homólogos da PABP em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* já foram há algum tempo identificados (BATES *et al.*, 2000). O primeiro destes foi a PABP1 de *T. cruzi*, codificada por dois genes adjacentes, e expressa constitutivamente durante o ciclo de vida do parasita (BATISTA *et al.*, 1994). Nos tripanosomatídeos, dois homólogos conservados de PABP (PABP1 e 2) foram identificados nas suas diferentes espécies e um terceiro homólogo foi encontrado apenas em espécies de *Leishmania* (PABP3) (COSTA LIMA *et al.*, 2010). A proteína PABP1 em *T. brucei* também é codificada por dois genes e apresenta 86,4% de identidade com sua correspondente em *T. cruzi* (HOTCHKISS *et al.*, 1999). A proteína PABP1 de *L. major* é codificada por apenas um gene sendo expressa constitutivamente durante o ciclo de vida do parasita. Dados indicam que em *Leishmania* a PABP1 parece ter um papel mais geral na tradução, enquanto que as PABPs 2 e 3, que se ligam aos mesmos mRNAs, podem ter funções diferenciadas em relação ao que se conhece em outros eucariotos (da COSTA LIMA *et al.*, 2010). Os três homólogos são simultaneamente expressos como proteínas citoplasmáticas na forma promastigota de *L. major*, enquanto que as PABPs 2 e 3 são visualizadas como bandas únicas em gel SDS-PAGE, a PABP1 se encontra representada por múltiplas isoformas produto de vários eventos de fosforilação. Na presença de inibidores transcricionais as PABPs 2 e 3 são transportadas para o núcleo enquanto a PABP1 permanece predominantemente no citoplasma (da COSTA LIMA *et al.*, 2010), comportamento semelhante ao ocorrido com proteínas de ligação a sequências ricas em uridina de *T. cruzi* (CASSOLA; FRASCH, 2009).

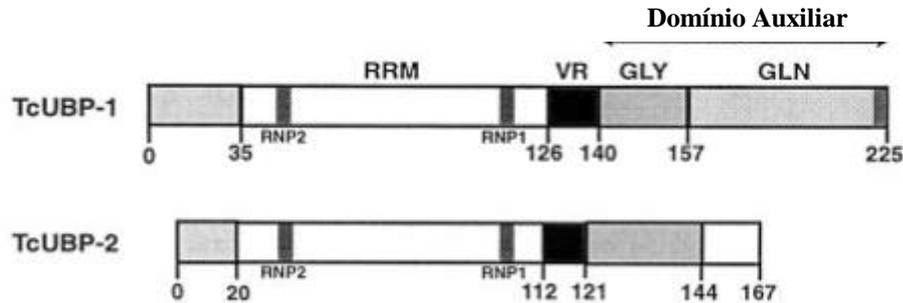
2.7 Proteínas de ligação a sequências ricas em uridinas em tripanossomatídeos

As UBPs (*U-rich RNA-binding proteins*) de tripanossomatídeos são proteínas envolvidas no controle da estabilidade do mRNA e, assim como a PABP, possuem uma região N-terminal envolvida no reconhecimento do RNA e uma região carboxi-terminal com domínios auxiliares. Contudo, enquanto a PABP possui quatro domínios RRM's associados ao reconhecimento dos mRNAs, todas as UBPs possuem um único domínio RRM. Primeiramente descrita em *T. cruzi* a TcUBP1 é uma proteína com peso molecular de 25 kDa que pode sofrer modificações pós-traducionais do tipo fosforilação ou metilação e também tem a capacidade de formar homo ou hetero-oligômeros. Essas modificações pós-traducionais podem melhorar, reduzir ou eliminar a especificidade de ligação ou a afinidade para elementos ricos em adenina e uracila, alterando suas interações com fatores auxiliares necessários para o reconhecimento dos substratos (D'ORSO, 2001).

Até o momento foi evidenciado a existência de dois homólogos conservados da proteína UBP em *T. cruzi* e *T. brucei*, denominadas UBP1 e UBP2 (D'ORSO; FRASCH, 2002; HARTMANN et al., 2007). Os dois homólogos possuem um único RRM, idêntico nas duas sequências, porém apresentam regiões N e C terminais distintas (VOLPON et al., 2005) como demonstrado na figura 7. Estudos em *T. cruzi* demonstraram que a TcUBP1 interage *in vivo* com a região 3' não traduzível dos mRNAs das mucinas (TcSMUG) e que esta interação ocorre de maneira estágio-específica. Foi determinado que os dois homólogos possuem a capacidade de se homo e heterodimerizar através de um domínio rico em glicina presente na TcUBP1. Também foi demonstrado a existência de um complexo ribonucleoproteico de 450 kDa onde participam tanto as UBPs 1 e 2 como também o ortólogo da PABP2. Posteriormente se observou a ocorrência de interações diretas entre homólogos de UBP e a PABP2, sugerindo um possível modo de ação para essas duas classes de proteínas (D'ORSO; FRASCH, 2002). Três genes codificando para homólogos de UBPs estão presentes de forma conservada nos genomas sequenciados de diferentes espécies de tripanossomatídeos. Estes

genes estão dispostos em sequência um ao lado do outro sendo que dois codificam para os ortólogos das UBPs 1 e 2 e o terceiro para um parálogo ainda não investigado.

Figura 7: Representação da estrutura das proteínas TcUBP1 e TcUBP2.



Fonte: D'orso (2002).

Nota: Comparação das duas proteínas derivadas de seqüências de cDNA. A figura mostra os domínios de ligação ao mRNA (RRMs) e as seqüências ribonucleoproteicas RNP1 e RNP2 que ajudam a defini-los, assim como os diferentes domínios auxiliares

2.8 Proteínas com domínio de ligação ao mRNA

Proteínas de ligação ao RNA são de vital importância para o metabolismo das células. Entre essas, as PABPs são de especial interesse devido à sua participação em praticamente todos os eventos mRNA-dependentes, uma consequência de sua alta afinidade às seqüências de adenosina presentes nos mRNA. Além de mRNAs, PABPs interagem com muitas outras proteínas, promovendo assim o seu envolvimento em vários eventos celulares. No núcleo, as PABPs desempenham um papel na poliadenilação, determinando o comprimento da cauda poli-A e podem estar envolvidas na exportação de mRNAs. No citoplasma, participam na iniciação da tradução além de agir combatendo a degradação dos mRNAs, através da ligação a sua cauda poli-A, ou estimulando seu decaimento, através de interações do mRNA com complexos proteicos com função de deadenilase (ELISEEVA et al., 2013).

Elementos ricos em adenina e uracila (ARE), encontrados na região 3'UTR de mRNAs de vida curta, são elementos em *cis* que regulam a estabilidade do mRNA assim como exercem um efeito tanto positivo quanto negativo na eficiência da tradução. Esses efeitos estão diretamente ligados a proteínas que em geral possuem o domínio RRM de

ligação a RNA. Um grande número de proteínas contendo este domínio foi identificado em tripanossomatídeos, porém em sua maior parte estas proteínas não foram caracterizadas funcionalmente (D'ORSO, 2001). Análises preliminares de espectrometria de massa realizadas previamente por trabalho que precedeu esta proposta de mestrado identificaram proteínas contendo domínios de ligação a RNA (como os RRM) diferencialmente associadas as três PABPs de *Leishmania* e distintas das UBPs. Estas diferentes proteínas parceiras sugerem comportamento e funções únicas para os três homólogos de PABP (da COSTA LIMA, 2012). Na presente proposta, cinco das proteínas identificadas (codificadas pelos genes Linj.04.1190, Linj.09.1180, Linj.17.0610, Linj.32.0790 e Linj.35.2240), junto com as três UBPs, foram selecionadas para criar ferramentas para futuras avaliações de interações com homólogos de PABP, visando contribuir no entendimento de como essas proteínas funcionam na síntese proteica e no metabolismo dos mRNAs como um todo nos tripanossomatídeos.

3 JUSTIFICATIVA

Este projeto contribui com o conhecimento da biologia básica ,em especial o processo de iniciação da síntese proteica, dos tripanossomatídeos responsáveis por diferentes enfermidades de impacto na saúde pública mundial e que atingem um grande número de indivíduos no nordeste brasileiro. O projeto em questão buscou contribuir no estudo de mecanismos essenciais para a sobrevivência dos tripanossomatídeos, além da caracterização de proteínas essenciais no processo de tradução destes organismos. Essas diferenças podem balizar futuramente o desenho de ferramentas quimioterápicas que possam especificamente ser usadas no controle destes patógenos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão e caracterizar proteínas com domínios de ligação a RNA em *L. infantum*, contribuindo para o entendimento de como estas proteínas atuam ao nível do controle da tradução e estabilidade de mRNAs.

4.2 Objetivos específicos

- a) Gerar construções plasmidiais contendo os genes codificantes de oito proteínas de ligação a RNA, possíveis parceiras dos homólogos de PABP de *Leishmania*, em vetor competente para a transfecção e expressão proteica em *L. infantum*;
- b) Expressar em as diferentes proteínas de ligação a RNA selecionadas, fusionadas ao epítipo HA *L. infantum*, avaliando as melhores condições para a detecção desta expressão;
- c) Analisar o perfil de expressão das proteínas selecionadas, investigando diferenças qualitativas e quantitativas.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Extração de DNA genômico

O DNA cromossomal de *L. infantum* foi extraído a partir de tratamento de formas promastigotas (10^8 - 10^9 células) com DNAzol® (Genomic DNA Isolation Reagent-Invitrogen). Para isto o sedimento de células foi submetido a lise com o reagente DNAzol e o DNA resultante posteriormente precipitado em etanol 100%. Uma etapa de lavagem do DNA precipitado foi efetuada usando-se etanol 70% e em seguida o DNA foi solubilizado em água conforme orientação do fabricante. A integridade do DNA genômico foi avaliada por meio de análise em gel de agarose, estas amostras serviram como molde para a amplificação dos genes de interesse.

5.2 Amplificação e purificação dos fragmentos gênicos de interesse

As sequências codificantes para os genes UBP1, 2 e 3, assim como para os demais genes que codificam proteínas hipotéticas foram obtidas por PCR, utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir de sequências identificadas no genoma de *L. infantum* (www.genedb.org) (Tabela 1). Os fragmentos gerados foram obtidos flanqueadas pelos sítios de restrição BamHI/HindIII. Para a amplificação foi utilizada a enzima Pfx DNA Polymerase (2,5 U/ μ L, Invitrogen), seu tampão específico, MgSO₂ para uma concentração final de 1mM, 10mM de dNTPS e uma solução *Enhancer*, de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR foi conduzida para o termociclador para a amplificação do material genético requerido. As condições da reação foram de 94°C por 3 minutos, para desnaturação do DNA, 50°C por 1 minuto, para anelamento dos primers e 70°C por 1 minuto, para a extensão do fragmento com um total de 30 ciclos.

Após amplificação os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe e utilizou-se um aparelho emissor de luz ultravioleta de ondas longas para visualizar as bandas. Em seguida os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados utilizando o *GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das sequências de genes alvo.

UBP1 <i>Forward</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>GGATCC</u> ATGTCTCAGCAGATGACCCCTCCTC 3'
UBP1 <i>Reverse</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>AAGCTT</u> CTGGCGGGGCTGCTGTCCCGG 3'
UBP2 <i>Forward</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>GGATCC</u> ATGGCGCAGCACATGGCCCCTC 3'
UBP2 <i>Reverse</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>AAGCTT</u> CTGGCGGGGCTGCTGTCCCGG 3'
UBP3 <i>Forward</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>GGATCC</u> ATGTCCGCCGCGCAGAACGGGAG 3'
UBP3 <i>Reverse</i> de <i>L infantum</i> :	5' <u>AAGCTT</u> GAAGCCGATCGGAGCAATGGCAGGG 3'
LinJ.04.1190 <i>Forward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGTACGGCCAGCAGTTCGTGCC 3'
LinJ.04.1190 <i>Reverse</i>	5' <u>AAGCTT</u> GCTCCACCCATCGGCGGATAC 3'
LinJ.09.1180 <i>Forward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGCTTCATCGTGTCCCCACTCTGTG 3'
LinJ.09.1180 <i>Reverse</i>	5' <u>AAGCTT</u> CACTTTTCGGGAAAAACCAGTGTATAATG3'
LinJ.17.0610 <i>Forward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGGACGGCCGACTTGTGCAGACG 3'
LinJ.17.0610 <i>Reverse</i>	5' <u>AAGCTT</u> AACACCCATCTGGATTGCTACGCTGCC 3'
LinJ.32.0790 <i>Forward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGCCCCGCAAGGCCGCGCTAAG 3'
LinJ.32.0790 <i>Reverse</i>	5' <u>AAGCTT</u> CTGACGCTCATGCACCTTGTAGTGG 3'
LinJ.35.2240 <i>Forward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGATGGAGGAGCGCCACTCGCAC 3'
LinJ.35.2240 <i>Reverse</i>	5' <u>AAGCTT</u> CAATGTCTTGTGTCGAGGCGCACGTT 3'

Fonte: o autor

Nota: Oligonucleotídeos usados para amplificar e clonar os genes de UBP1, UBP2, UBP3 e os demais genes que codificam proteínas hipotéticas (os sítios de restrição BamHI/HindIII estão sublinhados).

5.3 Clonagem em plasmídeo pGEM T-Easy

Para a etapa de clonagem, os fragmentos gênicos gerados passaram por um tratamento para a adição de dATP nas extremidades das sequências amplificadas a 72°C por 25 minutos em uma reação de adição em que se utilizou a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e seu respectivo tampão (10X *PCR buffer*), acrescido de sulfato de magnésio na concentração de 50 mM. Em seguida, foi feita ligação dos fragmentos ao vetor comercial pelo kit pGEMT-Easy (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante, que permaneceu a 4°C por 16 horas.

As construções foram utilizadas para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B através de choque térmico. Para isso, a um tubo contendo 50 µl de células quimiocompetentes foi acrescido de 500 ng do DNA a ser transformado, imerso no gelo por 30 minutos e logo após transferido para um banho-maria à 37°C, por 5 minutos. Em seguida, essas células foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, e foram submetidas ao sistema de seleção IPTG/Xgal. Para essa seleção, antes do plaqueamento foi adicionado 1 mM de IPTG ao meio e 5 µg/µl de X-gal. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias brancas obtidas na placa foram isoladas e inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C, por aproximadamente 18 horas. Depois do crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos para a obtenção de um sedimento através de centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos.

A partir desse sedimento foi realizado o protocolo de extração de DNA plasmidial em pequena escala (minipreparações), segundo Sambrook e Russel (2001). O DNA plasmidial da minipreparação foi verificado em gel de agarose 1% e a eficiência das clonagens foi confirmada por digestão com a enzima de restrição Eco RI (*New England Biolabs*) a 37°C por 2 horas em banho-maria. Os clones que liberaram o DNA inserido no plasmídeo no tamanho esperado (Tabela 2) foram encaminhados para o sequenciamento, conforme descrito a seguir.

Quadro 2: identificação dos genes com os seus tamanhos preditos

Identificação do gene	Tamanho do gene pb.
UBP1	532
UBP2	503
UBP3	722
Linj.04.1190	935
Linj.09.1180	728
Linj.17.0610	887
Linj.32.0790	707
Linj.35.2240	824

Fonte: O autor

5.4 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para a reação de sequenciamento do plasmídeo pGEM T-easy contendo os diferentes insertos de *L. infantum*, foi utilizado o kit *big Dye* reagentes da Applied Biosystems. Na reação foram utilizados 1 µL [3,2 pmoles/µL] de iniciadores de DNA (M13F e M13R), 0,5 µL de *big Dye*, 1 µL de tampão [200 mM Tris-HCl e 5 mM MgCl₂, pH 9,0], 300 a 500ng de DNA plasmidial e quantidade suficiente de água para completar 10 µL. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos, e mantidas em gelo, para em seguida serem submetidas a 35 ciclos de amplificação [desnaturação (96°C por 45 segundos), anelamento (50°C por 30 segundos) e extensão (60°C por 4 minutos)]. A realização do sequenciamento foi feita no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM-FIOCRUZ com o uso do equipamento ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequencias obtidas a partir dos eletroferogramas gerados nas reações de sequenciamento foram editadas no programa EditSeq v 5.0 e analisadas com o auxílio de programas como o SeqMan II e Megalign, pacotes de programas (Lasergene-DNASTAR® Inc., Madison, WI). Em seguida as sequencias foram alinhadas no programa Bioedit para serem comparadas com as sequencias equivalentes das regiões flangeadora (5' e 3' UTRs) dos genes alvos.

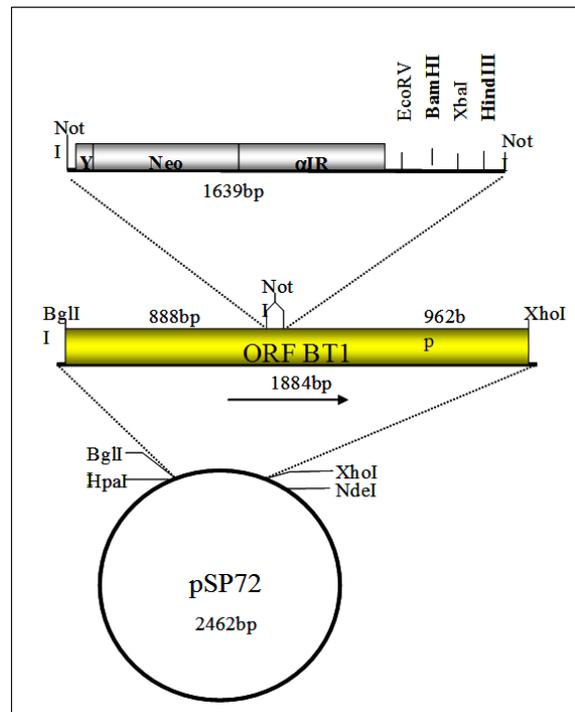
Após a confirmação pelo sequenciamento, as minipreparações dos clones plasmidiais selecionados foram transformados em *E. coli* e uma das colônias obtidas foi utilizada para fazer um inóculo em meio de 5 mL LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). O inóculo foi incubado sob agitação a 37°C, por 18 horas e a partir da centrifugação desse meio, foram obtidas bactérias para a realização do protocolo de extração de DNA plasmidial em média escala (midpreparação), segundo Sambrook e Russel (2001). A verificação do DNA plasmidial obtido foi feita em gel de agarose 1% e as midpreparações foram utilizadas na etapa seguinte de subclonagem.

5.5 Subclonagem em plasmídeo de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa

Como descrito no item 5.1, os genes das UBPs 1, 2 e 3 e os demais genes que codificam proteínas hipotéticas foram produzidos flanqueados com sequências de sítios de restrição *BamHI/HindIII*. Desta forma, para subclonagem destes fragmentos no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA (pSPBT1-HA), os respectivos plasmídeos derivados do pGEMT-easy

foram submetidos a uma etapa de digestão com as enzimas de restrições relacionadas aos sítios acima citado. A Escolha do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa, figura 8, foi feita devida a possibilidade de trabalhar com um bom vetor de expressão o qual possuía um uso bem estabelecido e padronizado por nosso grupo de pesquisa.

Figura 8: Esquemática do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa.



Fonte: Adaptado de Promega (2008)

Nota: Dentro da ORF BT1 está inserida a sequência de um gene de resistência ao antibiótico Neomicina, o plasmídeo utilizado neste estudo continha uma sequência que codificava o epítipo HA o que possibilitava a formação de proteínas heterólogas.

O marcador de HA (figura 9), derivada da molécula de uma glicoproteína de superfície que é necessária para a infecciosidade do vírus da influenza humano, Tem sido amplamente utilizado como uma etiqueta de epítipo geral em vetores de expressão. Muitas proteínas recombinantes foram manipuladas para expressar o tag de HA, o qual não parece interferir com a bioatividade ou a biodistribuição da proteína recombinante. Esta etiqueta facilita a detecção, isolamento e purificação das proteínas recombinantes.

Cada fragmento obtido individualmente foi purificado pelo *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e posteriormente ligado ao vetor plasmidial de expressão pSPBT1, seguindo etapas de subclonagens onde o vetor é previamente clivado com as mesmas enzimas e purificado pelo *GFX kit* (GE Healthcare). Para a ligação os fragmentos

e o vetor foram ligados com 0,5 µl a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs®) e 0,5 µl de seu respectivo tampão, por um período de 18 horas em temperatura ambiente.

Figura 9: Sequência do epítipo HA integrado a sequência dos genes e proteínas estudados.



Fonte: o autor

Nota: A confirmação da clonagem após o sequenciamento foi analisada pelo programa MegAlign (DNA star). No Box amarelo a sequência de oligonucleotídeos que codificam o epítipo HA, no Box verde sequência de aminoácidos que compõem o Tag-HA.

Para a etapa de transformação bacteriana em células quimiocompetentes, as construções foram inseridas em bactérias *E. coli* cepa DH10B por choque térmico e os clones positivos confirmados por padrão de digestão e por sequenciamento de DNA. Os clones confirmados foram selecionados para midpreparação dos DNAs plasmidiais, segundo Sambrook e Russel (2001).

5.6 Cultivo e eletroporação de células de *L. infantum*

O cultivo das formas promastigotas de *L. infantum* foi realizado em 3 mL de meio Schneider, pH 7,2, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF), 0,1% de antibióticos (estreptomicina/penicilina) e 0,1% de hemina, e incubados a 26°C. Para cada eletroporação, 10 mL de cultura (para a obtenção de um sedimento celular de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células) de forma promastigota na fase logarítmica foram centrifugados a 1.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuscitado em 1 mL do tampão HEPES-NaCl pH 7,05 (Hepes 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na₂PO₄ 0,7 mM e glicose 20 mM). Repetiu-se a etapa de centrifugação nas condições já citadas e o sedimento foi

ressuspendido em 400 µl de tampão HEPES-NaCl. As amostras foram transferidas para cuvetas de eletroporação (0,2 cm), nas quais foi adicionado o DNA plasmidial (pSPBT1-HA + gene de interesse) numa quantidade de 1 a 2 µg. As cuvetas permaneceram no gelo por um período de 10 a 15 minutos. Para o controle Negativo foram adicionados apenas os parasitas, sem a presença de qualquer DNA e com água em seu lugar.

A eletroporação foi realizada utilizando o aparelho BioRad Gene Pulser II, com o um pulso elétrico de 450 volts, com capacitância de 500 µF (*microfarads*). Imediatamente após o choque, o material transfetado foi acondicionado em uma garrafa de cultura contendo 5 ml de meio de cultura Schneider pH 7,2 e incubado a 26°C por 24 horas. Em seguida, uma etapa de pré-seleção foi realizada adicionando-se 5 mL de meio de Schneider pH 7,2 nas garrafas juntamente com 50 µg/ml de Neomicina. A cultura foi incubada novamente a 26°C por mais 24 horas. Na etapa de seleção, 1 ml da cultura pré-selecionada foi transferida para uma nova garrafa contendo 9 ml do meio Schneider pH 7,2 juntamente com 100 µg/ml de Neomicina. As culturas foram incubadas em estufa a 26°C por aproximadamente 10 a 15 dias, até se tornarem viáveis para um repasse celular, atingirem a densidade adequada.

5.7 Obtenção de extrato bruto e lisado celular de *L. infantum*

Para a preparação de extratos brutos de *L. infantum* um pré-inóculo de aproximadamente 5 a 10 ml de cultura de células da forma promastigota com concentração inicial de 2×10^6 células/mL (células de cultura de manutenção) teve seu crescimento acompanhado até atingir a concentração característica de fase estacionária da célula (aproximadamente 1×10^7 células/mL). Nesse momento foram retiradas alíquotas para a expansão da cultura para um volume de 20 mL de forma a ajustar a concentração inicial da cultura para um volume de 5×10^5 células/mL. Em seguida, o crescimento foi novamente acompanhado até uma nova fase estacionária onde as alíquotas eram retiradas para a produção de extratos proteicos totais, sendo as células coletadas através de centrifugação durante 5 minutos, a 4°C a 1.000 xg. O sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com 1 mL de PBS e o sedimento ressuspendido em tampão de gel SDS-PAGE desnaturante (*Laemmli 2X*) em volume adequado para atingir uma concentração celular de 1×10^5 células por µl. Em seguida os extratos foram fracionados em SDS-PAGE 15% e utilizados nos experimentos de *Western-blot* com os soros comerciais contra o epítipo HÁ, conforme descrito no item 5.8.

Para a obtenção da fração citoplasmática, 2×10^8 células da cultura em fase estacionária foram coletadas por centrifugação a 2.000 xg por 5 minutos e lavadas com PBS suplementado com inibidores de proteases. As células foram novamente centrifugadas e então ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 5 mM acetato de potássio, 4 mM acetato de Magnésio, 2 mM DTT) suplementado com inibidores de proteases. A lise foi realizada por ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após cerca de 10 ciclos a lise foi monitorada por microscopia ótica e, no caso de não ter sido suficientemente eficiente, novos ciclos de congelamento e descongelamento foram realizados. Com a ausência de células íntegras, o lisado foi centrifugado a 4.000 xg por 15 minutos e posteriormente o sobrenadante foi armazenado a -80°C . Esses lisados foram utilizados em experimentos posteriores como análises de *Western-blot* utilizando anticorpo anti-HA e tem por perspectiva procedimentos de imunoprecipitação. Os lisados produzidos nessa etapa foram estocados a -80°C .

5.8 Western-blot.

Amostras dos lisados e dos extratos dos parasitas diluídas em tampão de proteína (*Laemmli 2X*) foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de PVDF. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de leite 5%/ TBS-T (constituído de NaCl, TRIS e o pH equilibrado com HCl) Tween-20 e em seguida incubada em solução de leite 2,5-5%/ TBS Tween-20 1%, incubadas com anticorpo comercial monoclonal anti-HA, em diluições variadas por um período de cerca de 16 horas. A membrana foi lavada três vezes com TBS Tween-20 1% por 10 minutos e incubada em solução de leite 2,5-5%/ TBS-T 1% com segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo para material tratado com anticorpo anti-HA comercial) conjugado à peroxidase na diluição de 1:10.000. Após três lavagens de 10 minutos com TBS Tween-20 1%, foi adicionada à membrana uma mistura de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM (em DMSO) e peróxido de hidrogênio 0,03% para a reação de quimioluminescência (ECL). Após incubação de 1 minuto nessa mistura, a membrana foi seca e exposta a um filme (Hyperfilm – Amersham Biosciences) por 1 e 10 minutos, que então foi revelado por uma solução de dektol (1:2) e fixado em solução de ácido acético.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Quanto aos aspectos éticos, os microrganismos foram obtidos a partir de demanda espontânea de estoque celular pertencente ao laboratório de microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães não havendo implicação ética, pois não existiu envolvimento de pacientes ou animais nos procedimentos. Conclui-se que o projeto em questão não fez uso de procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

7 RESULTADOS

7.1 Resultados preliminares que deram origem a essa proposta

A proposta desse estudo visou dar continuidade a caracterização de homólogos de PABP assim como expandir os estudos referentes a proteínas já descritas na literatura como as UBPs e proteínas nunca antes estudadas também classificadas na família de proteínas com domínio RRM (figura 8). Em estudos anteriores feitos por da Costa Lima (da COSTA LIMA, 2012), imunoprecipitações seguidas de análise em espectrometria de massa, realizadas na Universidade de Laval (Canadá) identificaram novas interações que parecem indicar possíveis mecanismos de ação inéditos, ao menos para as PABPs 2 e 3. Inúmeras proteínas foram identificadas diferencialmente ligadas ou a PABP1 ou as PABPs 2 e 3. Dentre elas foram identificadas várias hipotéticas, mas que contém, como as UBPs, domínios conhecidos de ligação a RNA. A tabela abaixo mostra a dinâmica de ligação entre as proteínas hipotéticas encontradas e as respectivas PABPs de *Leishmania* as quais elas poderiam se ligar.

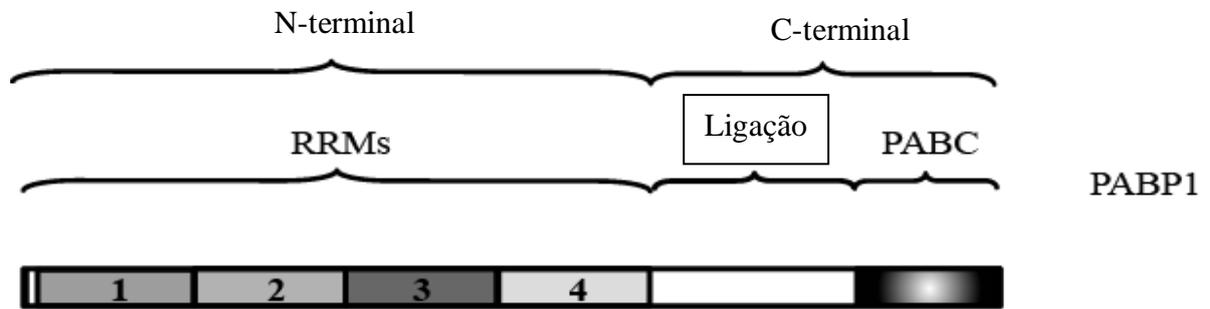
Quadro 3: Análises de parceiros funcionais das PABPs

PABP1	Linj.04.1190, Linj.17.0610
PABP2	Linj.09.1180, Linj.32.0790 e Linj.35.2240
PABP3	Linj.35.2240

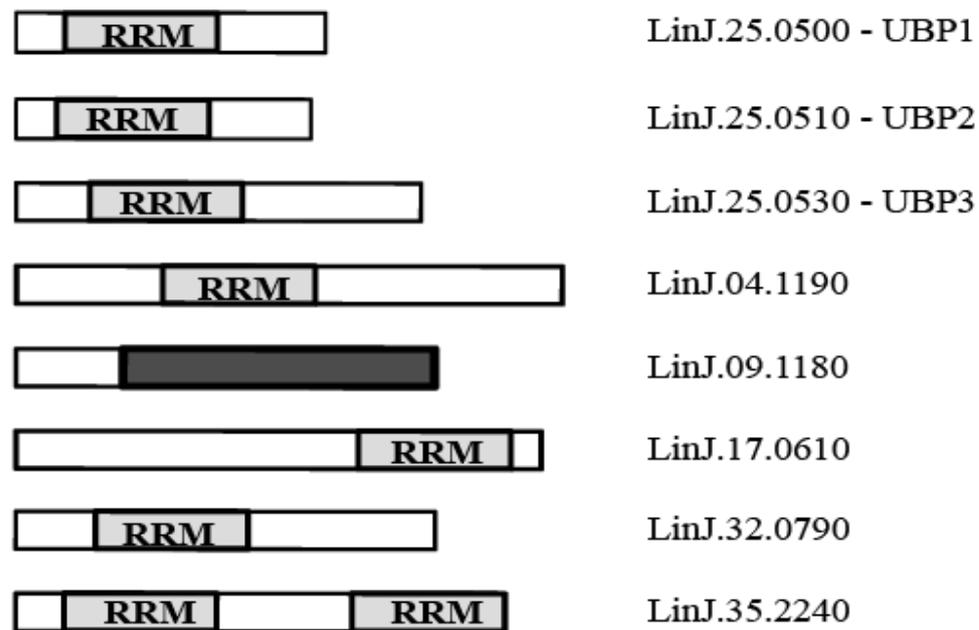
Fonte: O autor

Figura 10: Representação esquemática de proteínas contendo domínios de ligação a RNA.

A



B



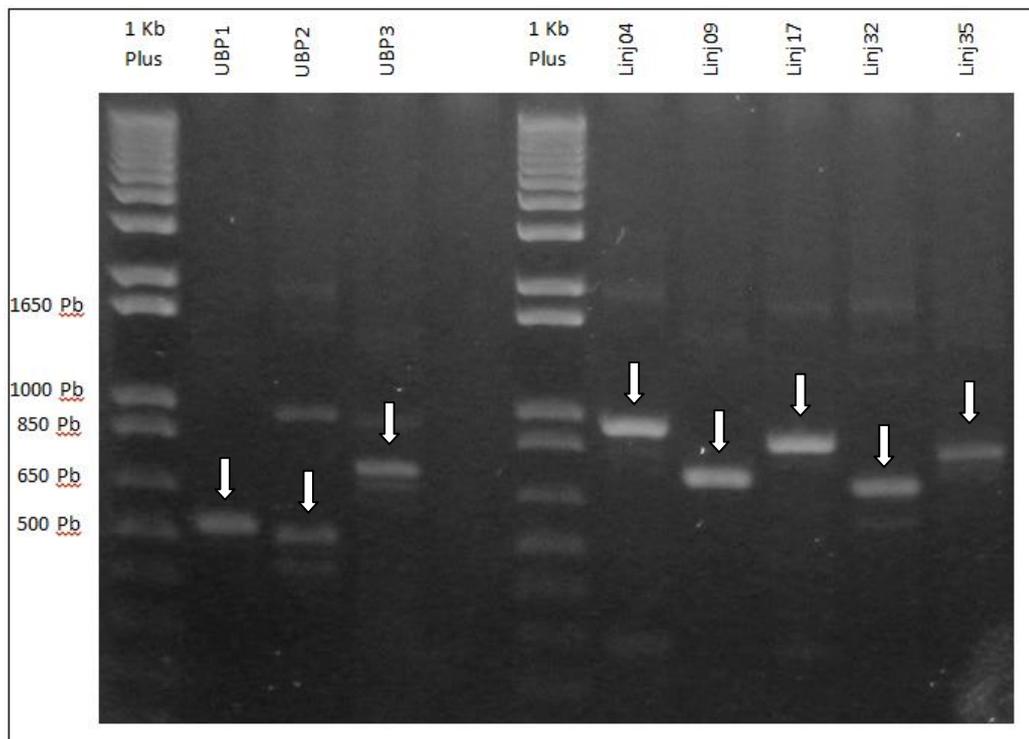
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Em (A), ilustração da proteína PABP1. Pode-se observar na sua região N-terminal quatro domínios de ligação ao RNA altamente conservados e uma extremidade C-terminal variável contendo um domínio de interação proteína-proteína igualmente bem conservada (KUHN AND WAHLE, 2004). Em (B), representação de proteínas hipotéticas com seus respectivos domínios RRM, excetuando-se a proteína LinJ.09.1180 (uma proteína de ligação ao RNA mitocondrial com domínio de ligação a RNA distinto).

7.2 Amplificação dos genes codificantes de proteínas de ligação a RNA

Os genes das UBPs e os genes que codificam proteínas hipotéticas de ligação a RNA selecionadas para este estudo foram inicialmente amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. infantum*, sendo que todos os fragmentos foram flanqueados pelos sítios das enzimas de restrição HindIII e BamHI. A amplificação de cada gene produziu seus respectivos fragmentos em tamanho esperado (UBP1 - 507 pb; UBP2 - 503 pb; UBP3 - 722 pb; Linj.04.1190 - 935 pb; Linj.09.1180 - 728 pb; Linj.17.0610 - 887 pb; Linj.32.0790 - 707 pb; e Linj.35.2240 - 824 pb), como mostrado na figura 9. Em seguida foi realizada a purificação dos fragmentos, com o intuito de dar confiabilidade, garantindo que apenas os fragmentos desejados fossem adicionados ao vetor.

Figura 11: Amplificação de genes de UBPs e genes hipotéticos.



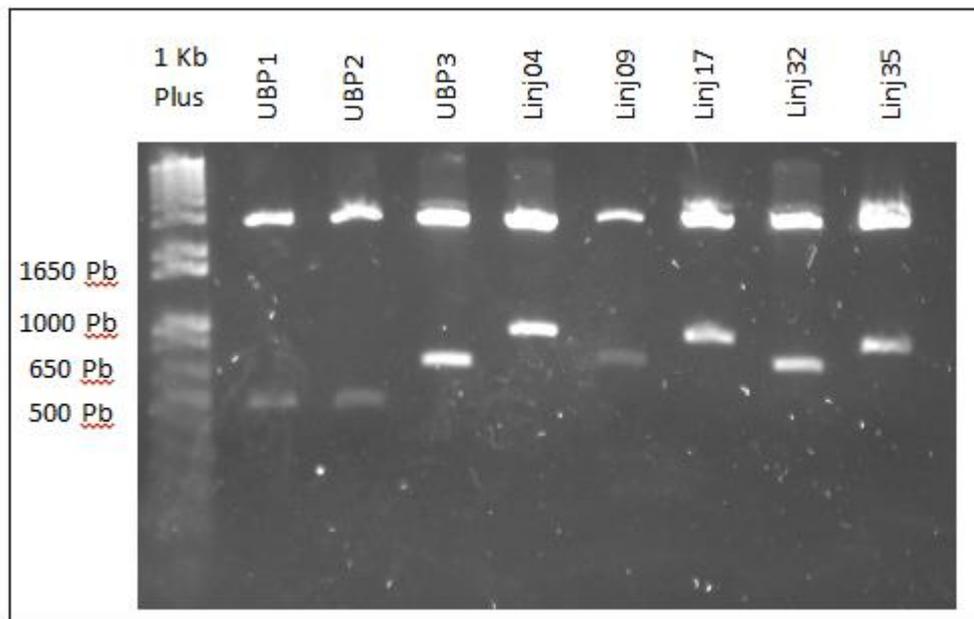
Fonte: O autor

Nota: Gel de agarose 1% mostra os fragmentos amplificados nos seus tamanhos preditos (indicados por seta).

7.3 Clonagem em vetor da série pGEM T-easy

Os genes purificados foram individualmente clonados no vetor comercial pGEM T-Easy (Invitrogen). A clonagem foi confirmada através da digestão dos plasmídeos resultantes pela enzima de restrição EcoRI. A ação da enzima de restrição sobre os plasmídeos obteve como produto fragmentos correspondentes aos tamanhos dos já referidos genes. Após a confirmação das clonagens dos oito genes estudados (Figura 10), as amostras foram enviadas para sequenciamento, com subsequente confirmação da identidade dos diferentes fragmentos, bem como da ausência de mutações introduzidas pela reação de amplificação. Esta etapa foi necessária tendo em vista que nem sempre a atividade revisora das polimerases é eficiente ao ponto de evitar mutações introduzidas pelas reações de PCR.

Figura 12: Confirmação das clonagens no vetor pGEM T-Easy.



Fonte: O autor

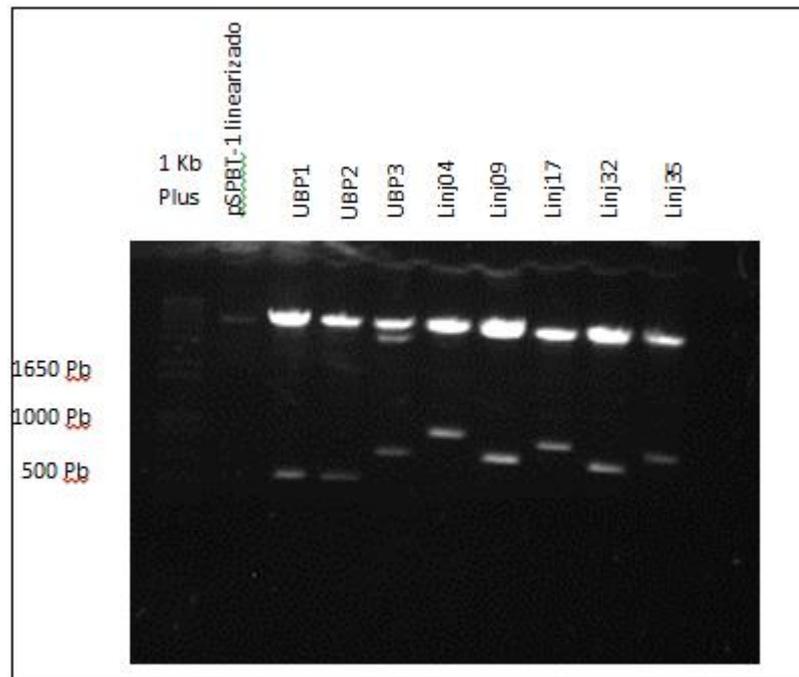
Nota: Digestão dos genes de UBPs e genes hipotéticos em gel de agarose 1%. Nessa etapa a digestão em questão utilizou a enzima de restrição EcoRI.

7.4 Subclonagem no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa

Para realizar a superexpressão das proteínas de interesse em *L. infantum* foi escolhido um plasmídeo derivado do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa (Padmanabhan et al, 2012), modificado pela inserção de oligonucleotídeos codificando para o peptídeo HA imediatamente após o sítio de HindIII. Este plasmídeo pode ser utilizado com sequencias codificadoras onde o sítio desta enzima tenha sido adicionado imediatamente antes do códon de parada, de forma que este codon esteja ausente do fragmento amplificado. O referido vetor permite a integração de genes heterólogos dentro do gene BT1 de *L. infantum*, conferindo resistência à neomicina e expressão constitutiva das proteínas de interesses. Com isso, as células de *L. infantum* transfectadas expressam tanto as proteínas endógenas quanto as proteínas contendo as seqüências marcadoras possibilitando a análise dos efeitos desta superexpressão.

A subclonagem dos genes de interesse entre os sítios BamHI/HindIII do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA permitiu então a obtenção das seguintes construções plasmidiais a partir do pSP72 (promega); UBP1/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, UBP2/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, UBP3/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, Linj.04.1190/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, Linj.09.1180/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, Linj.17.0610/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, Linj.32.0790/pSP-BT1-Y-Neo-alfa e Linj.35.2240/pSP-BT1-Y-Neo-alfa. Estas foram confirmadas por digestão utilizando as enzimas BamHI/HindIII, liberando assim os fragmentos esperados (Tabela 3) e observados na (Figura 11). As amostras quantificadas foram enviadas mais uma vez para o sequenciamento de DNA para confirmar a identidade e qualidade das sequencias.

Figura 13: genes com domínio RRM inseridos no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA – confirmação de subclonagem.



Fonte: O autor

Nota: Gel de agarose mostrando construções plasmidiais em vetor de expressão após a digestão por enzimas BamHI/HindIII.

Após a confirmação de que os insertos foram adequadamente adicionados ao vetor de expressão, o passo seguinte foi a obtenção das linhagens transfectante que se deu entre 7 e 14 dias após a eletroporação e o início da etapa de seleção. Por problemas técnicos as construções Linj.32.0790/pSP-BT1-Y-Neo-alfa e Linj.35.2240/pSP-BT1-Y-Neo-alfa não passaram para a execução da fase de superexpressão gênica. As transfecções dessas construções sofreram sucessivas contaminações impossibilitando o processamento da amostra.

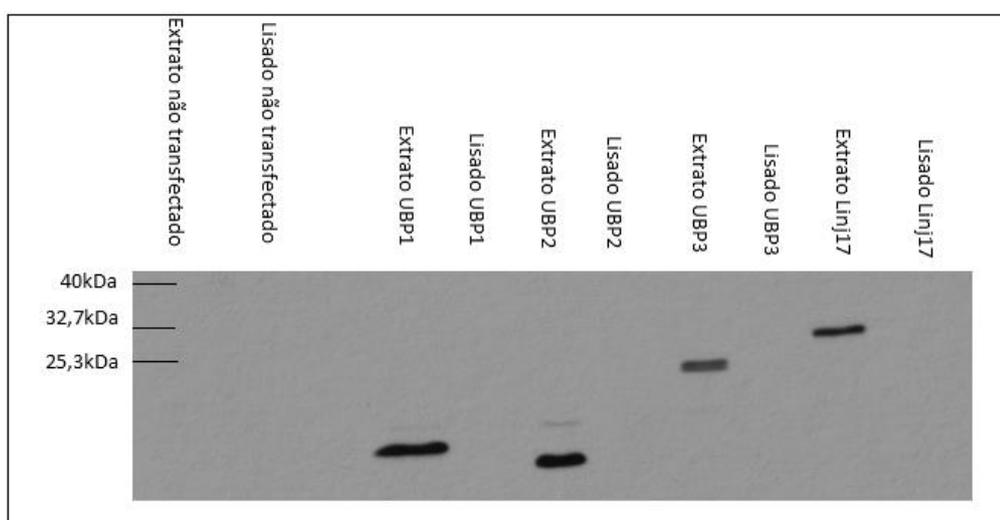
7.5 Análise da superexpressão das proteínas fusionadas a HA em *L. infantum*

O plasmídeo pSPBT1YneoαIR permite a expressão constitutiva das respectivas proteínas em níveis significativos. Após a seleção da transfecção, as células foram repassadas em meio Schneider pH 7,2 e seu crescimento foi acompanhado diariamente por visualização em microscópio invertido. Células na fase estacionária foram utilizadas na preparação de extratos celulares para fracionamento em gel SDS-PAGE e lisados, para uso futuro em

ensaios de imunoprecipitação. Aparentemente as células transfectadas não sofreram nenhuma mudança morfológica ou de motilidade que pudesse ser observada em visualização em microscópio óptico.

Em uma primeira avaliação, no extrato celular, as proteínas UBP1-HA e UBP2-HA foram mais claramente observadas através da imunodeteção do que as proteínas UBP3-HA e Linj.17.0610-HA (Figura 12).

Figura 14: Western Blot de análise da expressão protéica.



Fonte: O autor

Nota: A imagem mostra o reconhecimento do Tag-HA nos extratos das *Leishmania* transfectadas. O extrato foi fracionado em gel SDS-PAGE 15% e a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HA Abcam®, na diluição de 1:3000.

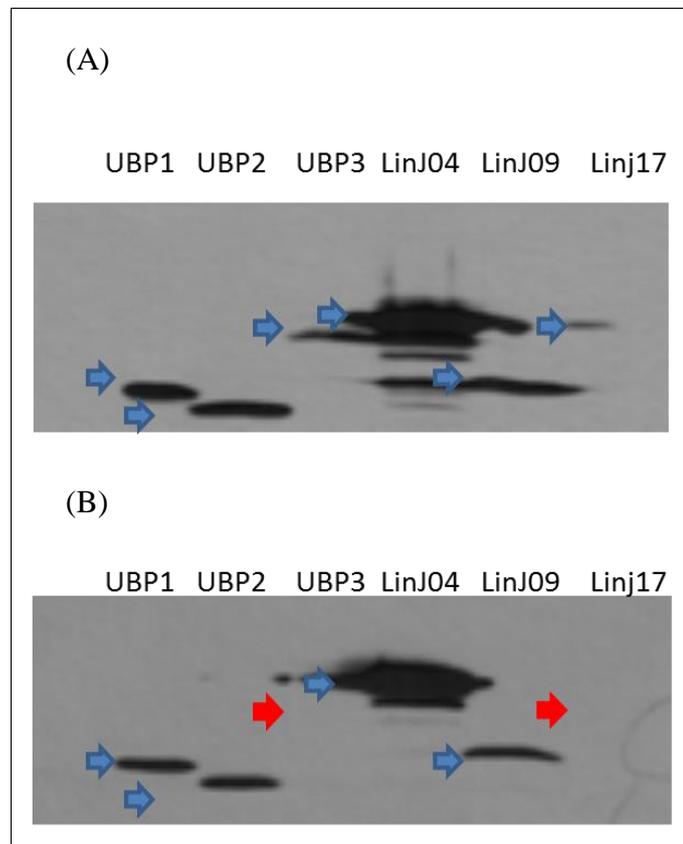
A expressão gênica diferencial da UBP3 é observada quando comparada com a expressão das outras proteínas, a UBP3 é aparentemente menos expressa do que as demais proteínas com domínio RRM fracionadas nesse estudo. Outra observação interessante é a existência de duas bandas distintas para essa proteína, o que sugere uma possível modificação química de sua cadeia proteica depois de sua tradução.

7.6 Avaliação da detecção de proteínas por diferentes anticorpos anti-HA

Existem diversos fabricantes de anticorpo monoclonal anti-HA e sistemas de imunoprecipitação com utilização de resinas comercializadas para detecção e purificação de

proteínas fusionadas a esse epítipo. Frente a essa realidade, se faz necessária a escolha do chamado “reagente ideal”, o qual suas propriedades e uso não mascarem resultados da pesquisa, revelando a real condição do fato pesquisado. Nessa etapa do estudo, foram confrontados os resultados da expressão proteica dos seis genes desse trabalho obtidos com dois diferentes anticorpos monoclonais anti-HA das marcas SIGMA® e ABCAM®. O resultado revelou que o anticorpo Sigma® não é capaz de reconhecer as proteínas UBP3 e Linj.17.0610, diferentemente do que ocorre com o anticorpo da marca Abcam®, como se observa na figura 13.

Figura15: Imunodeteção das proteínas com anticorpos monoclonais anti-HA comerciais.



Fonte: O autor

Nota: A imagem mostra o resultado da expressão de três proteínas UBPs e das outras três proteínas hipotéticas com domínio de ligação ao RNA, todas estas proteínas recombinantes com etiqueta HA. As setas azuis indicam o reconhecimento por meio de extrato das proteínas pelo anticorpo anti-HA, as setas vermelhas o não reconhecimento. Em A anticorpo Abcam diluído 1:5000; em B anticorpo Sigma diluído 1:3000.

Análises das sequências não reconhecidas pelo anticorpo Sigma, aminoácidos indicam que na região C-terminal das proteínas UBP3 e Linj.17.0610 os últimos aminoácidos são hidrofóbicos e antecedidos por outro de estrutura molecular de menor tamanho (glicina), diferentes daqueles presentes nas proteínas reconhecidas pelos dois anticorpo. Esse dado fornece um indício do que pode estar ocorrendo na falha do reconhecimento pelo anticorpo dessas duas proteínas.

Quadro 4: Análise da região C-terminal de proteínas não reagente a anticorpo anti-HA

Análise das regiões C-terminal das proteínas estudadas

LinJ.25.0500 C-terminus – MQQPGQQPRQ Sigma +
 LinJ.25.0510 C-terminus – MQQPGQQPRQ Sigma +
 LinJ.25.0530 C-terminus – ITPAIAPICF Sigma -
 LinJ.04.1190 C-terminus – TGMYPMPGWS Sigma +
 LinJ.09.1180 C-terminus – HYNTGFSRKV Sigma +
 LinJ.17.0610 C-terminus – PGSVAIQMGV Sigma -

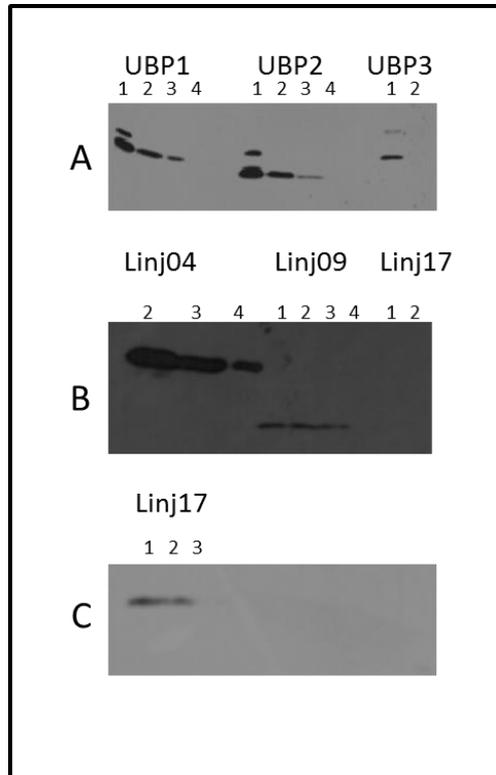
Fonte: O autor

Nota: Em destaque regiões C-terminal das proteínas que não foram capazes de reagir com o composto Sigma.

7.7 Quantificação dos níveis de expressão das proteínas heterólogas fusionadas a HA.

Para se quantificar a expressão das diferentes proteínas em *L. infantum*, foi realizada uma curva de diluição dos extratos proteicos, submetidos a fracionamento em gel SDS-PAGE e *Western-Blot*. O resultado visto na figura 14 mostra que as UBPs 1 e 2 apresentam níveis de expressão semelhantes ao longo da curva de diluição, enquanto que a UBP3 se apresentam em níveis cerca de 10 a 15 vezes menores. Continuando com a análise relativa através de curvas de diluição, observamos que a Linj.09.1180 se apresenta aproximadamente expressa em níveis 50 vezes menos que a Linj.04.1190, e a Linj.17.0610 está presente em níveis ainda menores, mostrando assim uma grande variação nos níveis de expressão de proteínas flanqueadas pelas mesmas sequencias não traduzíveis fornecidas pelo vetor.

Figura 16: Quantificação da expressão das proteínas fusionadas ao marcador HA através de imunodeteção.



Fonte: O autor

Nota: A figura ilustra curvas de diluição das proteínas fusionadas ao marcador-HA. Para isso, os extratos proteicos foram fracionados, diluídos ou não, em gel SDS-PAGE e a metodologia de *Western-Blot* realizada com anticorpo comercial anti-HA Abcam®. Os números indicam: 1-extrato não diluído; 2-diluição 1:4(25%); 3-diluição 1:16 (93,75%) e 4-diluição 1:64 (98,43%). Fracionamento das UBPs em A, fracionamento das Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.17.0610 em B, fracionamento da Linj.17.0610 em C (confirmação da expressão da proteína).

8 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, o genoma de tripanossomatídeos tem revelado um grande número de candidatos a proteínas de ligação a RNA. Entre esses, podem ser citados genes que codificam proteínas contendo RRM (DE et al., 2005), domínio Pumilio (PUF) e domínios *Zinc Fingers*. No entanto, muitos problemas têm surgido na tentativa de isolar essas proteínas utilizando sequências regulatórias presentes na 3'-UTR, com poucos exemplos demonstrados experimentalmente. Bons exemplos bem descritos em *T. cruzi* são os das UBP1 e UBP2 relacionados à regulação estágio-específica de mRNAs de mucina (D'ORSO; FRASCH, 2002). Estas proteínas foram identificadas a partir de uma busca em sequências genômicas de novos genes de *T. cruzi*, onde uma sequência de cDNA que possui na sua região codificadora 638 pares de bases foi identificada codificando uma proteína hipotética, subsequentemente chamada de TcUBP1 (D'ORSO,2001). Em trabalhos posteriores foi visto que a TcUBP1 está envolvida em processos de maturação do mRNA, e foi definindo, em parte, seus ligantes proteicos. Foi identificado um complexo ribonucleoprotéico contendo TcUBP1 que interage especificamente com duas proteínas de ligação ao RNA do tipo RRM. O primeiro ligante identificado foi TcPABP1 (atual TcPABP2), enquanto o segundo ligante foi uma nova proteína de 18 kDa chamada TcUBP-2, também possuidora do domínio RRM (D'ORSO, 2002). A partir de análises genômicas realizadas por nosso grupo de pesquisa, foi possível identificar os genes de *Leishmania sp.* ortólogos das UBP1 e UBP2 e um terceiro parálogo, denominado nesse estudo de UBP3.

As UBPs se ligam a mRNAs com motivos ricos em repetições dos nucleotídeos AU nas regiões 3'UTR (AREs) e estudos observaram uma interação destas com homólogos da PABP em *T. cruzi*. Sabe-se que proteínas que ligam as AREs influenciam a taxa de degradação do mRNA em mamíferos e que têm motivos de reconhecimento de RNA do tipo RRM (RNA recognition motif), motivos *Zinc Fingers* ou domínios KH (BARREAU et al., 2005). Dados da literatura mostram que a TcPABP2 e a TcUBP1 interagem na forma epimastigota e tripomastigota e não dependem de RNA no estágio epimastigota, o que leva a crer em um contato direto entre essas proteínas, enquanto a ligação TcPABP2 e a TcUBP2 acontece unicamente em epimastigota (D'ORSO; FRASCH, 2002). Experimentos *in vitro* mostraram que a interação da TcUBP1 com a TcPABP2 é capaz de impossibilitar a formação de dímeros da TcUBP1, não ocorrendo o mesmo com a TcUBP2. Existe um forte indício de que a ligação da TcUBP1 com a TcPABP2 possa diminuir a afinidade desta pela cauda

poli(A). Foi sugerido ainda que, na forma epimastigota, a presença da TcUBP2 em conjunto com outros fatores, ajude na estabilização da interação TcUBP1-TcPABP2.

De posse dessas informações esse trabalho teve como objetivo principal contribuir para a análise da expressão heteróloga de proteínas com domínio RRM, visando o melhor entendimento de processos biológicos básicos de *Leishmania sp.* pois essas proteínas são possíveis parceiros funcionais da proteína PABP. Além das UBPs outro conjunto de proteínas de ligação a RNA foi investigado, e que compreende proteínas identificadas por meio de ensaios de espectrometria de massa e posteriores análises de sequências genômicas de proteínas contendo domínios de ligação a RNA (predominantemente do tipo RRM) e candidatas a parceiras funcionais das PABPs de *Leishmania*. Nesse trabalho os genes codificantes destas proteínas foram amplificados purificados e clonados. Todos os genes amplificaram em seus tamanhos preditos e as clonagens foram devidamente confirmadas por sequenciamento. Após etapas subsequentes de transfecção e expressão gênica, houve a necessidade de se estabelecer o melhor método de detecção das proteínas fusionadas ao epítopo HA, utilizando-se anticorpo monoclonal comercial direcionado a esse epítopo. O conhecimento dos reagentes laboratoriais merece um amplo destaque na área científica. A escolha dos insumos tem que proceder de maneira cuidadosa e com uma atenção redobrada para que os mesmos cumpram com as exigências de qualidade e possuam o padrão estabelecido pelo fabricante. No presente estudo avaliamos a qualidade do reconhecimento do anticorpo anti-HA comercial de duas empresas de insumos laboratoriais. Segundo os fabricantes o marcador-HA não aparenta interferir com a bioatividade ou a biodistribuição da proteína recombinante. Contudo neste trabalho foi observado que o reconhecimento das proteínas UBP3 e Linj.17.0610 não se deu de forma satisfatória quando utilizado o anticorpo da empresa SIGMA®. Podemos atribuir esse fato a dois possíveis motivos: o primeiro é a baixa afinidade do anti-HA SIGMA® ao epítopo alvo, observamos isso quando comparamos as intensidades das bandas apresentadas entre os *western-blots* da figura 13, a segunda possibilidade é que no caso da UBP3 e da Linj.17.0610, ambas possuem um aminoácido hidrofóbico na sua porção C-terminal seguido de um aminoácido de estrutura molecular menor. Uma hipótese levantada é que a hidrofobicidade desse aminoácido pode levar a uma modificação conformacional da proteína que impossibilite o reconhecimento deste anticorpo do epítopo alvo.

Estabelecida a melhor condição para a detecção da proteína heteróloga, o próximo passo foi analisar a expressão das diferentes proteínas de fusão. O *T. brucei* apresenta

aproximadamente 70 diferentes proteínas com domínio RRM e praticamente a metade delas são essenciais para o crescimento ou para determinado momento no seu ciclo de vida. Em *T. cruzi* foi demonstrado que UBP1 e UBP2 são essenciais, contudo em análises de microarranjo foi detectado pouco efeito no transcriptoma quando as UBP1 e UBP2 foram alvos de RNAi (CLAYTON, 2013). Estudos mostraram que a superexpressão desses genes causaram mudanças no transcriptoma, porém os resultados de superexpressão devem ser vistos com muito cuidado devido à probabilidade de artefatos (CLAYTON, 2013). Nossos estudos demonstraram uma expressão acentuada das UBPs 1 e 2 e das Linj.04.1190 e Linj.09.1180 quando comparadas com o observado na UBP3 e na Linj.17.0610. Um fato interessante a ser observado foi a presença de uma segunda banda nas UBPs (Figuras 12 e 14), indicando possíveis modificações pós-traducionais. Essa possível modificação pós-traducional poderia em parte explicar o baixo reconhecimento dos anticorpos monoclonais, no caso da UBP3, onde aparece melhor definida. Dependendo da alteração química que a proteína sofreu a hidrofobicidade pode ter sido alterada. Caso a mudança tenha sido um evento de fosforilação, e sabendo que o grupo fosfato é fortemente negativo, a adição deste grupo poderia estar exercendo uma força na cadeia protéica que levaria a modificações conformacionais. Dessa forma a proteína poderia interiorizar o epítipo, e dificultar o seu reconhecimento (MALAKHOVA, 2003).

A quantificação da expressão das proteínas heterólogas revelou que a UBP3, apesar de sua homologia com as UBPs 1 e 2, é bem menos expressa que as demais UBPs. Diferença ainda maior de expressão é observada entre a Linj.09.1180, muito abundante, em relação as Linj.04.1190 e Linj.17.0610. Tendo em vista que todas as construções são derivadas do mesmo plasmídeo com os mRNAs resultantes sendo provavelmente flanqueados pelas mesmas regiões não traduzíveis, e uma vez que o mesmo anticorpo é utilizado para o reconhecimento do marcador de HA em todas as proteínas, o perfil da expressão observado sugere uma regulação controlada por elementos existentes na região codificadora. Esses elementos ainda não foram estudados mas podem estar associados a uma maior eficiência na tradução das diferentes proteínas ou a uma maior ou menor susceptibilidade a degradação proteolítica.

Os estudos relacionados a essas proteínas com domínios de ligação ao RNA ainda são deveras fragmentados. Entretanto, esse trabalho contribuiu como passo inicial para caracterização dessas proteínas e possibilitará novos caminhos para a investigação de

interações proteicas existente nesse grupo, dentre outras possibilidades. Esse trabalho é, portanto, relevante ao estudo da síntese proteica em eucariotos e nos tripanosomatídeos.

9 CONCLUSÕES

- a) Foi constatada a viabilidade das construções plasmidiais geradas, já que os produtos clonados foram confirmadamente expressos em *L. infantum*, com exceção da Linj.35.2240 e da Linj.32.0790;
- b) Foi possível observar diferenças no reconhecimento das proteínas expressas por diferentes marcas de anticorpo comercial anti-HA que podem estar correlacionadas com a sequência da extremidade C-terminal da proteína;
- c) As UBPs 1 e 2 heterólogas possuem praticamente o mesmo nível de expressão enquanto que a UBP3 apresenta níveis bem mais baixo de expressão. Da mesma forma, a Linj.04.1190 apresenta uma expressão muito superior quando comparada com as Linj.09.1180 e Linj.17.0610;
- d) Análise da expressão das UBPs sugere possíveis modificações pós-traducionais.

REFERÊNCIAS

ACKER, M. G.; LORSCH, J. R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 36, p. 653-657, 2008.

AMRANI, N. *et al.* Yeast Pab 1 interacts with Rna15 and Participates in the Control of the Poly(A) Tail Length in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 17, p. 3694-258, 1997.

AMIT, A.; RAM, K. M.; BHASKAR, S. Immune response to Leishmania infection. **J. Med. Res.**, Pune, v. 119, p. 238-258, 2004

BATES, P. A. Transmission of leishmania metacyclic promastigote by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.** New York, v. 37, n. 10/13, p. 1097-1106, 2007.

BATES, E.; KNUPFER, E.; SMITH, D. Poly(A)- binding protein I of leishmania: functional analysis and localization in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 28, p.1211-1220, 2000.

BATISTA, J. A. *et al.* Characterization of a Trypanosoma Cruzi poly(A)-binding protein and its genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 67, p. 301-312. 1994

BARREAU, C.; PAILLARD, L.; OSBORNE, H. B. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 33, p. 7138-7150, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. atual. Brasília, DF, 2010.

BRUNE, C. *et al.* Yeast poly(A)-binding protein Pab1 have different RNA-binding activities. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 11, p. 3419-3424, 2005.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 149, p. 1-9, 2006.

BROOK, M.; SMITH, J. W.; GRAY N, K. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. **Reproduction.**, Cambridge, v. 137, p. 595-617, 2009.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in Kinetoplastid Protozoa: why be normal? **Microbes infect.**, Paris, v. 5, p. 1231-1240, 2003.

CASSOLA, A.; FRASCH, A. C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 11, p. 35015-28, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites - Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

CLAYTON, C. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. **PLOS pathog.**, San Francisco, v. 9, n.11, p.2035-47, 2013.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v.156, p. 93-101,2007.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, Oxford, v. 21, p. 1881-1888, 2002.

CROAN D, G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Molec. and Bioch. Parasitol.**, Amsterdam, v. 89, p. 149-159, 1997.

CROAN, D.; ELLIS J. T. "Monophyletic origin of the genus *Sauroleishmania*". **Archiv für Protistenkunde.**, Jena, v. 148, p. 269-275, 1997.

DANIELS, J.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell biology of the trypanosome genome. **Mmicrobiol. Mol. Biol.**, New York, v.74, p. 552-569, 2010.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermat. Ther.**, Copenhagen, v. 22, p. 491–502, 2009.

DA COSTA LIMA, T. D. *et al.* Functional Characterization of Three Leishmania Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. **Eukaryot. Cell.**, Washington, v.9, p.1484 – 1494, 2010.

DE, G. J.; FRASCH A, C.; CLAYTON, C. RNA-binding domain proteins in kinetoplastids: a comparative analysis. **Eukaryot. Cell.**, Washington, v. 4, p. 2106-2114, 2005.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, p. 50520-50528 2002.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA-binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 37, p. 34801–34809, 2001.

EL-SAYED, N. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasite protozoa. **Science (Wash.)**, Washington, v. 309, p. 404-409, 2005

ELISEEVA, I. A.; LYABIN, D. N.; OVCHINNIKOV L, P. Poly(A)-Binding Proteins: Structure, Domain Organization, and Activity Regulation. **Biochemistry. Mosc.**, New York, v. 78, n. 13, p. 1377-1391. 2013.

GEBAUER, F.; HENTZE, M. W. Molecular mechanisms of translational control. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.**, London, v. 5, p. 827-835, 2004.

GHEDIN, E. *et al.* Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 156, p. 93-101, 2007.

GHEDIN, E. *et al.* Gene Synteny and evolution of Genome Architecture in Trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** Amsterdam, v. 134, p. 183-191, 2004.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 68, p. 913-963, 1999.

GRIMALDJ, G.; SCHOTTELIUS, J. LEISHMANIASIS: Their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. **Med. Microbiol. and Immunol.**, Berlin, v. 190, p. 3-8, 2001

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.**, Philadelphia, v. 26, p. 293–307, 2012.

GOSS, D. J.; KLEIMAN, E. F. Poly(A) binding Proteins: are they all created equal? **WIREs RNA.**, Hoboken, v. 4, p. 167-179, 2013.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 10, p. 569-577, 2007

HARTMANN, C. *et al.* Small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of F-box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes. **Eukaryot. Cell.**, Washington, v. 6, p. 1964-1978, 2007.

HOTCHKISS, T. *et al.* Trypanosoma bruceipoli(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslatade region sequence elements. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 98, p. 117-129, 1999.

IVENS, A. C. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, Leishmania major. **Science**, Washington, v. 309, p. 436-442, 2005.

JACKSON, R.; HELLEN, C.; PESTOVA, T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v.11, p.113-127, 2010.

KAHVEJIAN, A.; ROY, G.; SONENBERG, N. The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in MRNA translation. **Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.**, New York, v. 66, p. 293-300, 2001.

KISSINGER, J. C. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, p. 2040-243, 2006.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 23-30, 2011.

KHANAM, T. *et al.* Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. **RNA Biol.**, Georgetown, v. 3, n. 4, p. 170-7, 2006.

KÜHN, U.; PIELER, T. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. **J. Mol. Biol.** London, v. 16, n. 256, p. 20-30, 1996.

KÜHN, U.; WAHLE, E. structure and function of Poly(A) Binding Proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1678, p. 67-84, 2004.

KULKARNI, M. M. *et al.* The major surface-metalloprotease of the parasitic Protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 62, p.1484-1497, 2006.

LABSPACE. **Organização estrutural Leishmania**. Disponível em:
<<http://labspace.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=459544>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

LACOMBLE, S. *et al.* A Trypanosoma brucei protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains. **Protist**, Jena, v. 163, p. 602–615, 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. **Parasitol.**, London, p. 313–349. 2006

LIANG, X. H. *et al.* Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot. Cell.**, Washington, v. 2, p. 830-840, 2003.

- LUKES, J. *et al.* evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.104, p. 9375-9380, 2007.
- MALAKHOVA, O. A. *et al.* Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. **Genes Dev.**, New York, v. 17, p. 455-460, 2003.
- MARTINEZ-CALVILLO, S. *et al.* Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Mol. Cell.**, Cambridge, v. 11, p. 1291-1299, 2003.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, Cairo, v. 2010, p. 1-15, 2009.
- MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Q. Rev. Biophys.**, London, v. 37, p.197-284, 2004.
- NOYES, H. A. *et al.* The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a Neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. **Euk. Microbiol.**, Lawrence, v. 44, p. 511-517, 1997.
- PADMANABHAN P, K. *et al.* Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan *Leishmania*. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1372-1381, 2012.
- PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse disease. **Nat. Genet.**, New York, v. 39, p. 839-847, 2007.
- SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. **C. Spring Harb. Lab. Press**, New York, v.3,p. 33-34, 2001.
- SACHS, A. B.; DAVIS, R. W. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. **Cell**, Cambridge, v. 58, p. 857-67, 1989.

SANTOS, A. L.; BRANQUINHA, M. H.; VILA-LEVY, C. M. The ubiquitous Gp63-Like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.78, p. 687-714. 2006.

SELVAPANDIYAN, A. *et al.* Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. **Jour. of Trop. Med.**, Cairo, v. 20, p.1687-1686, 2012.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, p. 168-174, 2006.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 37, p. 1173-1186, 2007.

SONENBERG, N.; DEVER, T. E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 13, p. 56-63, 2003.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 731-745, 2009.

STUART K, *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** New York, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

STUART, K. *et al.* Complex management: RNA editing in tripanosomes. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v. 30, p. 97-105, 2005.

UCHIDA, N. *et al.* A novel role of the mammalian GPST/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, p. 720-725, 2002.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 13, p. 720-725. 1993

ULLU, E.; TSCHUDI, C. 2'-O-methyl RNA oligonucleotides identify two functional elements in the trypanosome spliced leader ribonucleoprotein particle. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v. 268, p. 13068-13073, 1993.

VOLPON, L. *et al.* NMR structural study of TcUBP1, a single RRM domain protein from *Trypanosoma cruzi*: contribution of a beta hairpin to RNA binding. **Biochemistry**, Washington, v. 44, p. 3708-3717, 2005.

WANG, X.; GRUMET, R. Identification and Characterization of Proteins that interact with the Carboxy Terminus of Poly(A)-binding Protein and Inhibit Translational in Vitro. **Plant. Mol. Biol.**, Dordrecht , v.54, p. 85-98, 2004.

WELLS, S. E. *et al.* Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. **Mol. Cell.**, Cambridge, v. 2, p. 135-140, 1998.

WILSON, R. *et al.* **PLoS Negl Trop.**, San Francisco, p. 1935-2735, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=532&action=archive>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

WORMBOOK, Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_mechregultranslation/mechregultranslation.html> . Acesso em 23 fev. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

**ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM OS SEUS PESOS
MOLECULARES.**

Quadro 1: Identificação das proteínas com os seus pesos moleculares

Proteína	UBP1 *	UBP2	UBP3	Linj04	Linj09	Linj17	Linj32	Linj35
Tamanho em kDa	26,60 kDa	19,00 kDa	25,33 kDa	34,53 kDa	26,96 kDa	32,31 kDa	25,20 kDa	30,25 kDa

*Peso molecular referente a proteína traduzida pelo gene selvagem

ANEXO B – ESPECIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-HA SIGMA.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Email USA: techserv@sigma.com Outside USA: eurtechserv@sigma.com

Product Specifications

Product name:

Monoclonal Anti-HA antibody produced in mouse

purified immunoglobulin, ~ 1mg/mL, monoclonal HA-7

Product no: **H3663**

Test:

Specifications:

Immunoglobulin Isotype

Immunoglobulin isotype

Mouse IgG1

Country of origin

Antibody origin

Israel

BSA Origin

Australia

Appearance

Form

Liquid

Clarity

Clear

Color

Colorless

Odor

None

Protein Concentration

Antibody concentration

1 - 1.2 mg/ml

Immunoblotting (chemiluminescent)

Cell extract/antigen

293-T cells expressing N-Terminal HA

E. Coli Control lysate expressing HA

A9917 Anti Mouse IgG (Fab)-Peroxidase

0.25 - 1 µg/ml

Second antibody

Working concentration

MW detected (specific band) approx.

Immunoprecipitation Assay

Agarose

P3296-Protein G sepharose

Cell extract/lysate

293-T cells expressing-HA

E.coli expressing HA tag

H6533 Monoclonal Anti HA-Peroxidase

0.5 - 2 µg

Detection antibody

Antibody precipitation amount

Immunocytochemistry (IFT)

Cell type

293-T cells expressing C-Terminal HA

293-T cells expressing N-Terminal HA

Fixation reagent 1

Methanol

Fixation reagent 2

Acetone

Secondary antibody

F5262 Anti Mouse IgG (Fab)-FITC

Working concentration

1 - 2 µg/ml

Recommended Retest

Recommended Retest period

4 Years

FXO97150 - 0200

Page 1 of 1

May 19, 2014

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO C – ESPECIFICAÇÕES DO ANTICORPO ANTI-HA Abcam.

[Product Datasheet](#)

Anti-HA tag antibody [HA.C5] ab18181

abcam[®]
discover more

★★★★☆ 14 Abreviews | 20 References | 5 Images

Overview

Product name	Anti-HA tag antibody [HA.C5]
Description	Mouse monoclonal [HA.C5] to HA tag
Specificity	Recognizes HA-tagged proteins overexpressed in cells, including both amino- and carboxy-termini of targeted proteins in transfected mammalian cells.
Tested applications	ChIP/Chip, Flow Cyt, WB, ICC, IP, ICC/IF
Immunogen	Synthetic peptide from Influenza hemagglutinin epitope: YPYDVPDYA conjugated to KLH

[Run BLAST with NCBI](#) [Run BLAST with ExPASy](#)

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C or -80°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	Preservative: 0.05% Sodium Azide Constituents: PBS, pH 7.4
Purity	IgG fraction
Clonality	Monoclonal
Clone number	HA.C5
Isotype	IgG3

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab18181** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
ChIP/Chip		Use at an assay dependent concentration.
Flow Cyt		Use at an assay dependent concentration. PubMed: 24644289
WB	★★★★☆	1/1000.
ICC		1/200.
IP	★★★★☆	Use at an assay dependent concentration.
ICC/IF	★★★★☆	Use at an assay dependent concentration.

Target

Relevance	Human influenza hemagglutinin (HA) is a surface glycoprotein required for the infectivity of the human virus. The HA tag is derived from the HA molecule corresponding to amino acids 98-106 has been extensively used as a general epitope tag in expression vectors. Many recombinant proteins have been engineered to express the HA tag, which does not appear to interfere with the bioactivity or the biodistribution of the recombinant protein. This tag facilitates the detection, isolation, and purification of the proteins.
------------------	--

Anti-HA tag antibody [HA.C5] images

<http://www.abcam.com/HA-tag-antibody-HAC5-ab18181.html>

