

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TCSUB2
POR ENSAIOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E ESPECTROSCÓPICOS.**

Ize de Aguiar Bittencourt

**CURITIBA
MARÇO – 2015**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

Ize de Aguiar Bittencourt

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TCSUB2
POR ENSAIOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E ESPECTROSCÓPICOS.**

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como requisito para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadoras: Andréa R. Ávila
Tatiana de A. Campos Brasil de Souza

**CURITIBA
MARÇO – 2015**

Aos meus pais e irmãs Nei, Lélia, Myla e Lais pela minha formação intelectual e moral e por todo apoio e incentivo, sem os quais não seria possível a realização de mais esta conquista.

A minha irmã emprestada Michele Pires, por mesmo longe, estar presente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Tenho muitas pessoas para agradecer neste momento, são pessoas que fizeram parte da minha jornada até hoje e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Pessoas sem as quais eu não conseguiria.

Os primeiros e mais importantes mercedores da minha gratidão são meus pais Nei e Lélia, agradeço pelo amor incondicional, por apoiarem minhas decisões, me incentivarem a perseguir os meus sonhos e por todas os exemplos de vida que me foram oferecidos até hoje. Agradeço também às minhas irmãs, Myla e Lais, pela amizade, por todas as conversas e parcerias, apesar de eu ser a mais velha, em muitos momentos eu me espelhei em vocês. Agradeço a minha irmã emprestada Michele, por fazer parte da minha vida por tantos anos, ser minha confidente e incentivadora, obrigada por todas as conversas sobre a vida, sobre os problemas, sobre as festas e sobre as alegrias, com certeza me ajudaram a ser o que sou hoje.

Ao final de mais esta etapa eu gostaria de agradecer as pessoas que tornaram o desenvolvimento deste projeto e o progresso da minha vida profissional possível. Agradeço primeiramente a minhas orientadoras, a Dra. Andrea Ávila por me dar esta oportunidade, por me incentivar, pela confiança transmitida e por confiar em mim, mesmo quando às vezes eu duvidava; Agradeço também a Dra. Tatiana Brasil por abraçar este projeto conosco, por se dedicar a ele, pelo otimismo e pela paciência. Agradeço as duas, pela amizade, por me inspirarem, por me ensinarem, por respeitarem, pelos “ótimos” e “fantásticos”, mas também pelas críticas que me fizeram ir além.

A Dra. Daniela Gradia, que me recebeu no ICC e me incentivou.

Ao Dr. Mário Steindel, Dr Edmundo Grisard e Dra Patricia H. Stoco, por terem sido os primeiros “amantes da ciência” nos quais eu me espelhei e por terem me mostrado os primeiros ensinamentos, para sempre serei grata.

As amigas que fiz neste período foram muito importantes para suportar a distância da família e a pressão da vida acadêmica. Por isso agradeço a Jimena, a Priscila e ao Diogo, pelos estudos, pelas viagens, pelos “city tours”, pelas festas, pelos artigos baixados, pelos experimentos compartilhados, pelas caminhadas, pelos ensinamentos, pela ajuda nas horas difíceis, enfim pela amizade sincera.

Agradeço também a todos amigos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica pelas discussões, reuniões, aprendizado e paciência, vocês me ajudaram muito durante estes

dois anos. A Helena, Haruo e Amanda, pelas esperas, conversas no almoço e pelos “happy hours”, além de todo o resto!

A Mariana Serpeloni, pelos ensinamentos, incentivo e otimismo, mesmo estando longe.

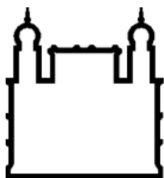
Aos colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, Biologia Celular, Biologia Básica de Células Tronco, Genômica Funcional e Virologia Molecular pelas ajudas e experiências compartilhadas e principalmente aos colegas do Proteômica e Engenharia de Proteínas pois algumas vezes eu era praticamente uma deles!

Ao Laboratório de Preparo de Materiais, pela organização e pela ajuda técnica que facilitou o desenvolvimento deste projeto.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que fizeram parte desta jornada dentro ou fora do meio acadêmico, mesmo que não estejam citados em nomes e que de algum modo compartilharam e incentivaram a minha conquista.

Só existe uma maneira de evitar as críticas: Não fazer nada, não dizer nada e não ser nada.

Aristóteles



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

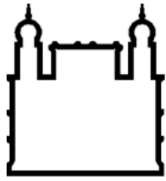
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TCSUB2 POR ENSAIOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E ESPECTROSCÓPICOS.

RESUMO

**Dissertação de mestrado
Ize de Aguiar Bittencourt**

Análises de genômica comparativa mostraram que a conservação dos componentes desta via de exportação de mRNA em espécies de parasitas é baixa quando comparada a outras vias de exportação nuclear. Uma RNA Helicase tipo DEAD box, denominada UAP56 (mamíferos)/Sub2(leveduras), é a mais conservada ao longo da filogenia de eucariotos, sendo essencial para a exportação de mRNA. Ensaios de RNAi em *T.brucei* demonstraram que essa proteína (TbSub2) também é essencial para a exportação de mRNA em tripanosomatídeos. Contudo, apesar de ser bem conservada, não podemos concluir que esta proteína tenha a mesma função em outras espécies de tripanosomatídeos. Infelizmente, não foi possível obter linhagens para o nocaute do gene (TcSub2) em *T.cruzi*, nosso modelo de estudo, provavelmente por ser tratar de uma proteína essencial à sobrevivência do parasita. Por isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a função e estrutura da proteína TcSub2 através de ensaios enzimáticos, espectroscopia de dicroísmo circular, cromatografia de exclusão molecular, modelagem molecular e complementação funcional em *T.brucei*. Esta proteína pertence à família de helicases DEAD box que manipulam RNAs estruturados em complexos de proteína-RNA utilizando hidrólise de ATP como fonte de energia. Os ensaios bioquímicos demonstraram que o domínio ATPase de TcSub2 é funcional e a atividade enzimática influenciada pela ligação ao RNA, independente de sequência do RNA. A caracterização funcional e estrutural da proteína mutante, TcSub2K87N, provou que o resíduo conservado K87 é essencial para a hidrólise de ATP e que sua substituição por uma Asparagina não altera sua estrutura secundária e quaternária. A ausência de atividade é devido, provavelmente, à pequenas alterações na estrutura tridimensional que impossibilitam o correto posicionamento do ATP no sítio ativo de TcSub2. Para os ensaios de complementação funcional, foi estabelecida uma linhagem de *T. brucei* capaz de silenciar a expressão de TbSub2 por RNAi. Esta linhagem será então utilizada para ensaios futuros visando avaliar a semelhança de função e atividade da entre as proteínas de *T. brucei* e *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA PROTEÍNA TCSUB2 POR ENSAIOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E ESPECTROSCÓPICOS.

ABSTRACT

Dissertação de mestrado
Ize de Aguiar Bittencourt

Comparative genomic analyzes have showed that components mRNA export pathway are low conserved in species of parasite as compared to components from other nuclear export pathways. However, the RNA Helicase DEAD box, named UAP56 (mammals) / Sub2 (yeast), is the highest conserved through phylogeny of eukaryotes and essential for the mRNA export. RNAi assays in *T. brucei* have shown that this protein (TbSub2) is also essential for the mRNA export in trypanosomes. However, despite of highly conserved, we cannot conclude that this protein has the same function in other species of trypanosomes. Unfortunately, it was not possible to obtain a knockout line for TcSub2 gene in *T. cruzi*, our study model, since it might be essential for survival of the parasite. Therefore, the main goal of this work was to study the function and structure of TcSub2 protein by enzymatic assays, circular dichroism spectroscopy, molecular exclusion chromatography, molecular modeling and functional complementation in *T. brucei*. This protein is member of DEAD box helicases family that handling structured RNAs in RNA-protein complexes using ATP hydrolysis as an energy source. Biochemical assays have demonstrated that the TcSub2 ATPase domain is functional and RNA binding but not RNA sequence has modified the enzymatic activity. The structural and functional characterization of mutant protein, TcSub2K87N, have proved that the conserved residue K87 is essential for ATP hydrolysis and the exchange for asparagine does not alter its secondary and quaternary structure. The lack of activity is probably due to small changes in tridimensional structure that preclude the correct binding of ATP in the active site of TcSub2. For functional complementation assays, a RNAi *T. brucei* line has been established to knockdown the TcSub2 expression. It will be useful for further analysis in order to evaluate the similarity of function and activity between *T. brucei* and *T. cruzi* proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ciclo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> (simplificado).....	3
Figura 1.2 - Transcrição policistrônica e processamento do pré-mRNA em tripanosomatídeos.....	5
Figura 1.3. Figura esquemática do transporte núcleo-citoplasmático de mRNA.....	8
Figura 1.4: Proposta de mecanismo de desestabilização por helicases DEAD-box.....	13
Figura 1.5: Estrutura das proteínas da família DEAD-Box Helicases.....	14
Figura 1.6: Motivos conservados das proteínas da família DEAD-Box Helicases.....	14
Figura 1.7. Estrutura cristalizada da proteína DEAD box UAP56.....	15
Figura 3.1. Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).....	25
Figura 3.2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação do gene TcSub2 e clonagem em vetor pDONR.....	26
Figura 3.3. Localização da mutação no domínio ATPase.....	27
Figura 3.4. Mapa do vetor pDEST™17 (Invitrogen) de expressão de genes em bactérias.....	28
Figura 3.5. Sequência de bases dos RNAs utilizados nos ensaios enzimáticos.....	32
Figura 3.6. Mapa do vetor p2T7-177 utilizado para ensaios de RNAi.....	35
Figura 3.7. Alinhamento entre as regiões dos mRNAs de TcSub2 e TbSub2 alvo do RNAi..	38
Figura 3.8. Figura esquemática dos iniciadores utilizados para amplificação do gene TcSub2 para clonagem em pAD74.....	39
Figura 3.9. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas TcSub2 e TbSub2.....	39
Figura 3.10. Mapa do vetor pGEM® – Teasy utilizado para as subclonagens.....	40
Figura 3.11. Mapa do vetor pAD74 utilizado para as complementação funcional.....	42
Figura 4.1. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para a confirmação da presença do gene TcSub2 selvagem e mutado nos vetores de entrada pDONR™221 em <i>E. coli</i>	44
Figura 4.2. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para a confirmação da presença do gene TcSub2 selvagem e mutado nos vetores de expressão em <i>E. coli</i>	45
Figura 4.3. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das amostras após indução da proteína recombinante TcSub2 e TcSub2K87N.....	46
Figura 4.4. Perfil eletroforético das amostras obtidas após indução da expressão de TcSub2.....	47

Figura 4.5. Perfil eletroforético das amostras de frações obtidas durante cromatografia em coluna de níquel para purificação de TcSub2.....	48
Figura 4.6. Análise das frações provenientes da cromatografia de TcSub2.....	49
Figura 4.7. Análise do Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações coletadas da cromatografia.....	49
Figura 4.8. Análise por <i>Western Blot</i> das frações obtidas através de cromatografia em resina de níquel por FPLC.....	50
Figura 4.9. Cromatograma de TcSub2 K87N purificada a partir de 4L de cultura em resina de níquel por FPLC, com ênfase no pico de eluição, mostrando a baixa quantidade de proteína.....	50
Figura 4.10. Análise do Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade para purificação de TcSub2K87N.....	51
Figura 4.11. Análise do perfil eletroforético por SDS-PAGE das frações provenientes do ensaio de otimização da indução da expressão da proteína TcSub2 K87N.....	52
Figura 4.12. Análise do perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações da cromatografia de troca iônica de TcSub2 K87N.....	52
Figura 4.13. Cromatograma da purificação de GFP.....	53
Figura 4.14. Análise do perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia de GFP.....	54
Figura 4.15. Curva padrão de fosfato inorgânico puro e equação da reta.....	55
Figura 4.16. Equação de Michaelis-Menten.....	55
Figura 4.17. Gráfico duplo-recíproco demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima TcSub2 no substrato (ATP).....	57
Figura 4.18. Gráfico demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima selagem, mutada e a proteína GFP no substrato (ATP).....	58
Figura 4.19. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar estrutura terciária das proteínas TcSub2 selvagem e mutada.....	59
Figura 4.20. Curvas de desnaturação térmica de Tcsub2 selvagem e Tcsub2K87N.....	61
Figura 4.21. Sobreposição dos modelos estruturais de TcSub2 selvagem e TcSub2 K87N.....	62
Figura 4.22. Gráfico demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima selvagem na presença de 3 diferentes tipos de RNA.....	63
Figura 4.23. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar a estabilidade da estrutura terciária da proteína TcSub2 selvagem na presença de diferentes tipos de RNA.....	64

Figura 4.24. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar estrutura secundária da proteína TcSub2 selvagem na presença de diferentes tipos de RNA....	65
Figura 4.25. Análise de imunofluorescência para avaliar a diferença da expressão de Tbsub2 e nos clones com RNAi induzido.....	67
Figura 4.26: Perfil de decaimento dos níveis de TcSub2 nos clones transfectados.....	68
Figura 4.27: Curva de crescimento dos clones transfectados com o vetor p2T7-177RNAi....	69
Figura 4.28. Análise do perfil eletroforético dos produtos de PCR provenientes do gene TcSub2.....	70
Figura 4.29. Análise do Perfil eletroforético dos produtos de PCR para clonagem das sequencia selvagem e mutada do gene TcSub2 em vetor pGEM T-easy.....	71
Figura 4.30. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmação da digestão dos vetores pGEM T-easy, contendo o gene TcSub2.....	72
Figura 4.31. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmação da presença do gene TcSub2 no vetor pAD74.....	73
Figura 4.32: Curva de crescimento dos clones transfectados com o vetor p2T7-177RNAi e com o vetor de complementação pAD74 - GFP.....	74
Figura 5.1. Representação esquemática dos aminoácidos Lisina e Asparagina.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Concentrações de fosfato inorgânico utilizadas para a construção da Curva Padrão.....	32
Tabela 4.1. Velocidade inicial de reação média da proteína TcSub2 em diferentes concentrações de substrato.....	57
Tabela 4.2. Volume de Eluição e Massa molecular estimada de TcSub2 Selvagem e TcSub2 K87N.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AU: Adenina e Uracila

°C: graus celsius

Å: Ångström

ADP: adenosina 5'-difosfato

ATP: adenosina 5'-trifosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfate

BLASTP- Basic Local Alignment Search Tool

BSA: albumina sérica bovina

CD: Dicroísmo Circular

D.O. - Densidade Óptica

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo

E: Enzima

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetracético

EJC: complexo de junção dos exons, “exon junction complex”

ES: produto da reação enzima/ substrato

F: *foward*

FPLC: Cromatografia líquida rápida de proteínas

g: gravidade

G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina

gDNA: DNA genômico

GFP - Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GTP: guanosina 5'-trifosfato

HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico

ID: identificação

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kcat: Constante catalítica

kDa - kilo-Dalton

kDNA: DNA do cinetoplasto

Km: Constante de dissociação

LB - Meio Luria-Bertani

LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (Liver Infusion Tryptose)

M: molar
mA: miliamperagem
mg: miligrama
MgCl₂: cloreto de magnésio
miRNA: micro RNAs
mL: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
MRW: peso molar por resíduo
MWCO: peso molecular de corte
NaCl: cloreto de sódio
NBT: nitro blue tetrazolium chloride
NES: Nuclear Export Signal
ng: nanograma
Ni-NTA: Ni⁺⁺-nitrilo-tri-acetic-acid
NLS: Nuclear Localization Signal
nm: nanômetro
NPC: complexo poro nuclear
NTP: nucleotídeo 5'-trifosfato
ORF: fase aberta de leitura, "open read frame"
pb: pares de base
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PGC: polycistronic gene clusters
pH: potencial hidrogeniônico
Pi: fosfato inorgânico
pI: ponto isoelétrico
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
Pol: Polimerase
R: *reverse*
RBP: Proteínas de ligação a RNA
RNA: Ácido ribonucléico
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: interferência de RNA

RNase: ribonuclease
RNP: ribonucleoproteína
RPM: rotações por minuto
rpm: rotações por minuto
RRM: domínio de reconhecimento ao RNA.
rRNA: RNA ribossomal
S: Substrato
SBF: soro bovino fetal
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SF: superfamília
SFB: soro fetal bovino
SL RNA: splice leader RNA
snRNA: pequenos RNAs nucleares
ssNA: ácido nucleico simples fita
T: temperatura
TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA
TELT: tris, EDTA, lítio e triton
T_m: temperatura de separação
TRES: transcrição/exportação
TRES: transcrição/exportação
TRIS: Tris-hidroximetil aminometano
tRNA: RNA transportador
TTP: tristetraprolina
Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana
U: unidade
UTR: regiões não traduzidas
V: volts
V_{max}: velocidade máxima
VSG: Glicoproteína variável de superfície (Variable Surface Glycoprotein)
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo
ΔG: Energia livre de Gibbs
ΔH: variação de entalpia

ΔS : variação de deslocamento

μg : micrograma

μL : microlitro

μm : micrômetro

μM : micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Expressão gênica em tripanosomatídeos	3
1.3 Controle da expressão gênica em Tripanosomatídeos	5
1.3.1 Exportação do núcleo para o citoplasma	7
1.4 RNA helicases: A família DEADX-Box	11
2. OBJETIVOS E METAS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Soluções e Tampões	18
3.2 Meios de cultura	19
3.3 Microorganismos	21
3.3.1. <i>Escherichia coli</i>	22
3.3.2. <i>T. cruzi</i> clone Dm28c (GOLDENBERG <i>et al.</i> , 1984)	22
3.3.3. <i>Trypanosoma brucei</i> cepa 29-13 (WIRTZ <i>et al.</i> , 1998)	22
3.4 Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> Dm28c	22
3.5. Preparação de bactérias cálcio-competentes	22
3.6. Transformação de bactérias cálcio-competentes	23
3.7 Transfecção de <i>T. brucei</i> por eletroporação e seleção dos transfectantes.....	24
3.8 Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes	25
3.8.1 Construção do vetor de entrada pDONR TM 221 em sistemas bacterianos.....	25
3.8.2 Obtenção de sequência Mutada do gene TcSub2	27
3.8.3 Construção do vetor de entrada pDEST TM 17	27
3.8.4. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG.....	28
3.8.5. Purificação das proteínas recombinantes	29
3.8.5.1 Purificação de TcSub2	29
3.8.5.1.1 Cromatografia de afinidade	29
3.8.5.1.2 Cromatografia de gel filtração	30
3.8.5.2 Purificação de TcSub2K87N	31
3.8.5.1.2 Cromatografia de troca iônica.....	31
3.9 Ensaio enzimáticos	31
3.9.1 Curva de padrão de fosfato	31

3.9.2 Avaliação da atividade ATPase das proteínas recombinantes	32
3.10 Caracterização estrutural.....	33
3.10.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	33
3.10.2 Modelagem molecular de TcSub2 selvagem e mutada.....	33
3.10.3 Determinação do estado oligomérico de TcSub2 selvagem e mutada.....	34
3.11 Obtenção de linhagem de parasitas <i>T.brucei</i> para silenciamento do gene TbSub2	34
3.11.1 Análise e triagem dos transfectantes.....	35
3.11.3.1 Ensaios de Imunofluorescência.....	35
3.11.3.2 Ensaios de Western Blot através de revelação por fosfatase alcalina.....	36
3.11.3.3 Ensaios de RNAi.....	37
3.12. Obtenção cepa para ensaios de complementação funcional em <i>T. brucei</i>	37
4 RESULTADOS	43
4.1. Avaliação da atividade ATPase da proteína Tcsub2.....	43
4.1.1. Clonagem de TcSub2 e TcSub2 K87N para expressão em <i>E. coli</i>	43
4.1.2. Produção das proteínas recombinantes	44
4.1.2.1 Produção da proteína recombinante TcSub2	46
4.1.2.2. Produção da proteína recombinante TcSub2K87N.....	50
4.1.2.3. Produção da proteína recombinante GFP	53
4.2 Ensaio de atividade ATPase	54
4.2.1. Estabelecimento de curva padrão de fosfato inorgânico.....	54
4.2.2 Ensaio de Atividade ATPase de TcSub2	55
4.3.3. Análise do efeito da mutação K87N na atividade enzimática de TcSub2	58
4.4. Modificações estruturais associadas à mutação K87N	59
4.5. Influência de RNAs na atividade ATPase.	62
4.5.1 Avaliação da interação RNA-TcSub2.....	63
4.6 Avaliar se o gene TcSub2 tem a mesma função que o seu ortólogo em <i>T. brucei</i>	66
4.6.1 Obter populações transfectantes de <i>T.brucei</i> para estabelecer os ensaios de complementação funcional.	66
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e representa um importante problema de saúde pública, pois se estima que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo. É encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2014). A doença apresenta uma fase inicial aguda, onde a parasitemia é elevada e na maioria dos casos é assintomática. Esta é seguida pela fase crônica, onde muitos dos pacientes infectados permanecem assintomáticos, porém uma porção significativa, de 10 a 60%, dependendo da área geográfica, desenvolvem manifestações cardíacas ou digestivas, que são irreversíveis e podem levar a morte (Coura e Borges-Pereira, 2010).

O *T. cruzi* (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista, subreino Protozoa, incluído no filo Euglenozoa Classe Kinetoplastea (CAVALIER-SMITH, 2010) e ordem Kinetoplastida. Esta ordem abrange protozoários flagelados que possuem uma região especializada conhecida como cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também denominado de kDNA (CAVALIER-SMITH, 1993; TELLERIA *et al.*, 2006). É na ordem Kinetoplastida que se encontra a família Trypanosomatidae, O gênero *Trypanosoma* está presente nesta ordem (LEVINE *et al.*, 1980) e constitui um dos mais importantes da família Trypanosomatidae, pois inclui além do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, outras duas subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) que ocasionam doenças em humanos, *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense*, ambos agentes da doença do sono (DUMAS, 2000). Adicionalmente, ainda há *T. brucei brucei*, causador da enfermidade em animais conhecida como Nagana (HIDE, 1999).

O *T. cruzi* exibe uma ampla heterogeneidade, sendo atualmente classificado em seis grupos diferentes. Essas diferenças estão relacionadas à patogenicidade do parasito (ZINGALES *et al.*, 2009). Este é um parasita classificado como heteroxênico, já que alterna entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado. Seu ciclo de vida é complexo na natureza envolvendo pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento e dois hospedeiros filogeneticamente distantes, inseto e mamífero. As formas replicativas epimastigotas e amastigotas dos hospedeiros invertebrado e mamífero, respectivamente, alternam-se com as formas infectivas e não-proliferativas tripomastigotas metacíclicas (proveniente do inseto vetor) e tripomastigotas sanguíneas (originária do mamífero infectado) (DE SOUZA, 1984).

Durante o repasto sanguíneo do vetor, as formas tripomastigotas sanguíneas de um vertebrado infectado são ingeridas. Os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas, que migram para o intestino do vetor onde se dividem por um processo de fissão binária (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Nas regiões mais posteriores do intestino e no reto, os epimastigotas se soltam da superfície intestinal e se transformam em tripomastigotas metacíclicos os quais são, então, liberados juntamente com as fezes e urina do vetor (DE SOUZA, 1984; Kollien; Schaub, 2000). Após serem liberadas pelo vetor, as formas tripomastigotas metacíclicas atingem a corrente sanguínea através de lesões na pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado. Estas formas tripomastigotas podem infectar diferentes tipos celulares. Nas células infectadas, os tripomastigotas metacíclicos permanecem no interior de um compartimento ácido, denominado vacúolo parasitóforo, onde tem início o processo de transformação para as formas replicativas amastigotas com posterior ruptura da membrana do vacúolo (revisto por MORTARA *et al.*, 2005). Após sucessivas divisões no citoplasma da célula, as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas que rompem a célula e são liberadas na corrente sanguínea. Estas podem infectar novas células ou serem ingeridas pelo inseto durante sua alimentação, onde se diferenciam em epimastigotas, fechando assim, o ciclo (CARVALHO; DE SOUZA, 1989; DE SOUZA, 2002) (Figura 1.1).

Os tratamentos atuais para doença de Chagas estão limitados a dois fármacos antigos Benzonidazol (Rochagan LAFEPE and Abarax/ELEA e Nifurtimox (LAMPIT/Bayer). Os efeitos colaterais destes compostos incluem dermatite alérgica, prurido, febre e intolerância gastrointestinal, entre outros bem documentados que limitam a utilização correta, particularmente em adultos. Como consequência, existe uma necessidade por novos fármacos que sejam seguros e eficazes. Entretanto as tarefas de desenhar e desenvolver não são simples devido a distinta biologia do parasito (CHATELAIN, 2015)

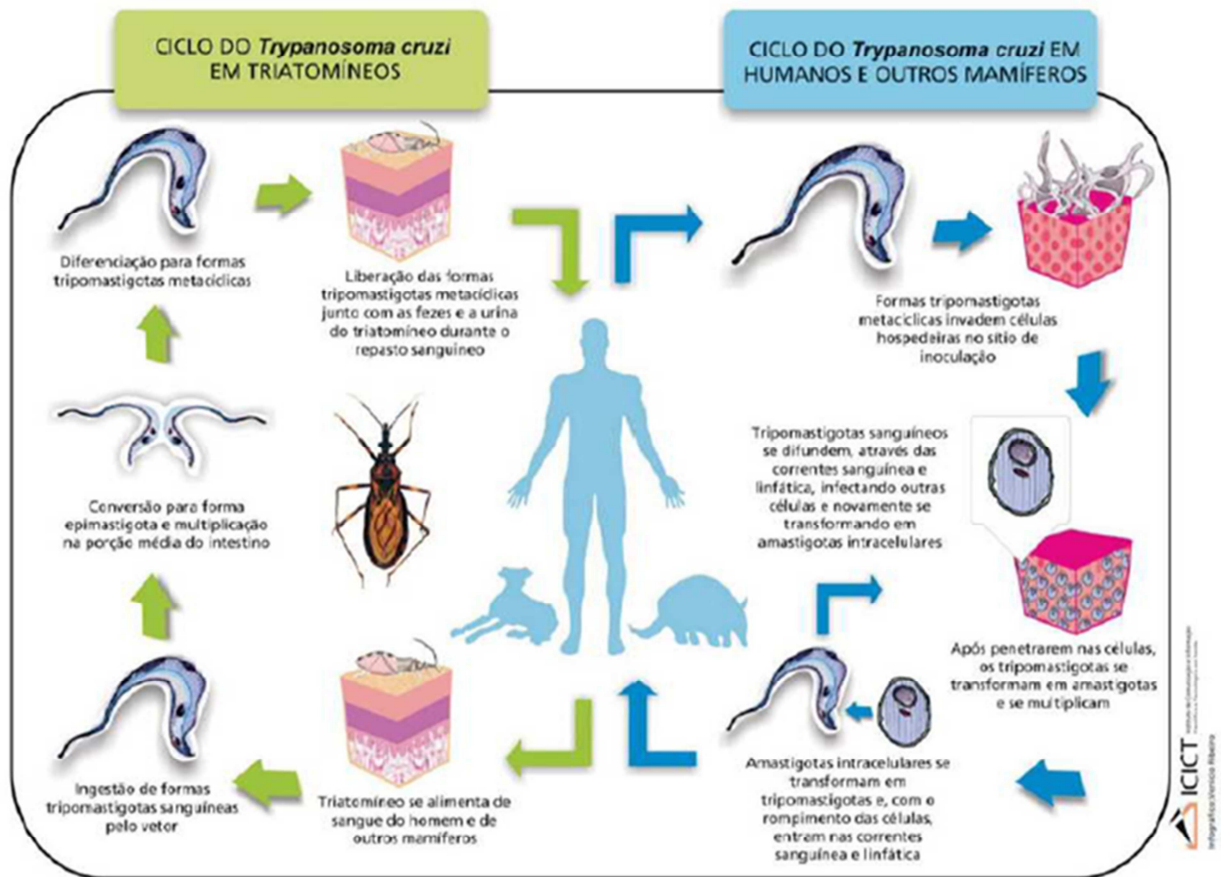


Figura 1.1 – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi* (simplificado). No hospedeiro invertebrado (A), formas epimastigotas (1) se multiplicam no lúmen do intestino. A diferenciação para tripomastigotas metacíclicas (2) ocorre na porção final do intestino. Estas formas infectam o hospedeiro vertebrado (B). Após adesão e penetração nas células hospedeiras (3), os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (4). Estes então se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos e são liberados, podendo infectar outras células (5). O ciclo se fecha quando o indivíduo infectado é picado pelo triatomíneo (Fonte: ARGOLLO *et al.*, 2008).

1.2 Expressão gênica em tripanosomatídeos

A expressão gênica inicia-se por um processo chamado de transcrição. No caso da expressão de proteínas, todas as células transcrevem um RNA mensageiro (mRNA) para servir como código na tradução de proteínas, que estão envolvidas em todos os processos vitais da célula (ALBERTS *et al.*, 2010). A molécula que tem papel principal neste evento de transcrição é a RNA polimerase (RNA Pol). Os eucariotos possuem três diferentes classes de RNA polimerases (Pol): Pol I, Pol II e Pol III (DECKER; HINTON, 2013). Na maioria dos eucariotos, os genes codificadores para proteínas são transcritos individualmente pela RNA polimerase II. O primeiro transcrito é chamado de pré-RNA, pois contém sequências intrônicas, que serão removidas, e sequências exônicas, regiões codificadoras separadas pelos introns. O pré-RNA nascente é processado cotranscricionalmente pelas enzimas associadas à

RNA polimerase II, com a adição do cap 7-metilguanosina (m7G cap) na extremidade 5' do RNA, eliminação dos introns por *cis splicing* e adição da cauda de adenina na extremidade 3', gerando o mRNA. O mRNA é transportado do núcleo para o citoplasma onde pode ser traduzido em uma proteína (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; MICHAELI, 2011).

No caso dos tripanosomatídeos, os genomas são organizados em aglomerados de genes policistrônicos, ou seja, poucos ou milhares de genes estão arranjados em sequência na mesma fita de DNA. (EL-SAYED *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005; WEATHERLY *et al.*, 2009). A maioria de genes codificadores de proteína não possuem íntrons e ainda a maioria dos cromossomos em tripanosomatídeos contém pelo menos dois aglomerados de genes policistrônicos e estes genes não são relacionados funcionalmente (MARTÍNEZ-CALVILLO, *et al.*, 2010). Genes policistrônicos são transcritos em um único pré-mRNA pela Pol II que será processado por *trans-splicing* e poliadenilação (LEBOWITZ *et al.*, 1993), diferentemente da maioria dos outros eucariotos onde o pré-RNA é processado por *cis-splicing*. O *trans-splicing* é um processo que adiciona uma sequência, chamada de sequência líder, na extremidade 5' dos mRNAs. Essa sequência líder é igual para os diferentes mRNAs maduros que estão sendo formados e também é sintetizada pela Pol II. Essa modificação requer duas reações de transesterificação, porém ocorre a formação de uma estrutura em “Y”, diferentemente do que ocorre no *cis-splicing*, que forma uma estrutura em alça (PREUßER *et al.*, 2012). As reações de *trans-splicing* e poliadenilação estão aparentemente acopladas em tripanosomatídeos. Os eventos da transcrição e processamento em tripanosomatídeos estão demonstrados na figura 1.2.

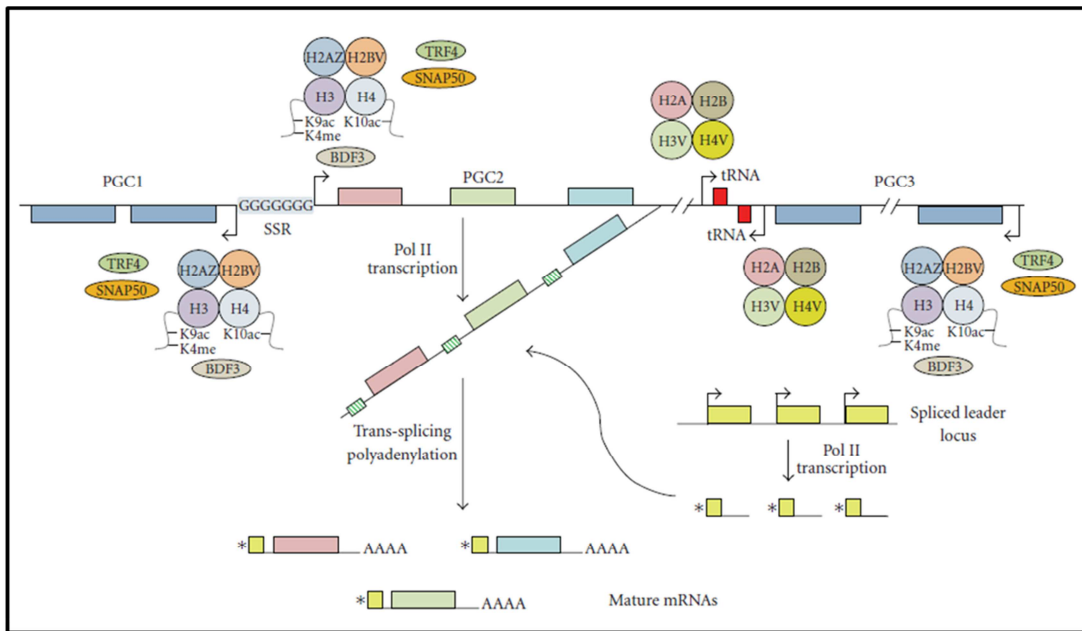


Figura 1.2 - Transcrição policistrônica e processamento do pré-mRNA em tripanosomatídeos. Representação hipotética de um cromossomo contendo grupos de genes policistrônicos que são transcritos pela RNA polimerase II em um único pré-mRNA. Este transcrito é processado por *trans splicing* e poliadenilação para gerar o mRNA. Por *trans splicing*, a sequência líder (*Spliced leader* - amarelo) contendo o cap4 (asterisco) é adicionado à extremidade 5' de cada mRNA. Cada gene que codifica para o SL RNA possui um promotor reconhecido pela RNA polimerase II. A sequência AAAA nos RNAm representa a cauda poli(A) (Fonte: Modificado de MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

A RNA polimerase III em outros eucariotos sintetiza o 5S rRNA, 7SL RNA e tRNAs, em tripanosomatídeos além destas também é responsável por sintetizar todos os snRNAs e a RNA Pol I que na maioria dos organismos produz RNA ribossômico (rRNA) em *Trypanosoma brucei* também está relacionada com a produção das glicoproteínas de superfície VSGs e com as prociclinas do tipo EP/GPEET (NAKAAR *et al.*, 1994; BEN-SHLOMO *et al.*, 1997).

1.3 Controle da expressão gênica em Tripanosomatídeos

A regulação gênica é o mecanismo responsável pelo desenvolvimento, homeostase e adaptação ao meio ambiente do organismo. A eficiência com que as células regulam a expressão dos seus genes é que irá determinar sua sobrevivência no meio em que se encontram. Em eucariotos este controle é exercido em vários níveis da expressão gênica: desde antes da transcrição, ao selecionar o gene a ser transcrito, até o controle da atividade da proteína já formada (ALBERTS *et al.*, 2010).

A família Trypanosomatidae possui mecanismos não usuais de expressão gênica, por exemplo, a presença de aglomerados de genes policistrônicos que são transcritos juntos pela

RNA Pol II. Em eucariotos de modo geral, as sequências promotoras possuem elementos regulatórios que controlam a transcrição de genes. Para tripanosomatídeos, promotores que controlam a ação da RNA Pol I e III são bem conhecidos, porém no que concerne a regulação da RNA Pol II pouco se conhece sobre sequências promotoras e as moléculas que desempenham esta função. Este fato leva a hipótese de que a RNA Pol II tem baixa especificidade e a transcrição pode se iniciar indiscriminadamente em vários sítios ao longo das unidades policistrônicas, transcrevendo todos os genes ali contidos (GOMEZ *et al.*, 2010). Logo, uma peculiaridade dos mecanismos regulatórios em tripanosomatídeos está no fato de que apesar dos genes codificadores de diferentes proteínas serem transcritos em um único RNA policistrônico, o nível de expressão das proteínas será diferente, o que ressalta a ideia de que a expressão gênica nestes organismos é regulada majoritariamente no estágio pós-transcricional.

Logo, a maioria dos genes codificadores de proteínas é cópia única e regulada por um ou mais dos mecanismos que seguem: eficiência da maturação do pré-mRNA, meia vida do mRNA, eficiência da tradução e meia vida da proteína (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). A regulação individual dos genes é uma combinação baseada em interação dos fatores *trans* com elementos *cis* em cada mRNA. A maioria dos fatores que afetam a meia vida do mRNA e a tradução tem sido encontrados nas regiões não traduzidas 3' (3'UTR – do inglês *unslated regions*), mais especificamente em regiões ricas em AU. Os fatores que atuam em *trans* e se ligam em diferentes tipos de domínios estruturais envolvidos na ligação de RNA seriam: proteínas contendo domínio de reconhecimento ao RNA (RRM - do inglês RNA recognition motif), proteínas dedo de zinco e proteínas CCCH PUF (KRAMER; CARRINGTON, 2011). É estimada a presença de mais de uma centena de proteínas de ligação ao RNA (RBPs – do inglês RNA binding protein) em *Trypanosoma* sp. com base nos motivos de reconhecimento ao RNA canônicos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; GAUDENZI *et al.*, 2003). As proteínas dedo de zinco do tipo CCCH, quase exclusivamente se ligam ao RNA de cadeia simples e desempenham papéis reguladores em todos os processos de metabolismo de mRNA. As principais proteínas deste tipo são da família TIS-11, com o membro mais proeminente sendo o tristetraprolina (TTP) (revisto por BAOU, 2009). Estas proteínas se ligam a regiões ricas em AU nas regiões 3'-UTRs de seus alvos e causa deadenilação e, na maioria dos casos, a degradação do mRNA.

Existem evidências diretas de que uma proteína pode diminuir a tradução quando ligada ao mRNA, como o caso da RBP10 em *T. brucei* (WURST *et al.*, 2012). Em um estudo utilizando abordagem genômica foram identificadas várias proteínas RBPs agindo na estabilidade do mRNA e tradução. Porém os mecanismos pelos quais a maioria destas

proteínas RBPs regula a expressão dos genes ainda não são bem conhecidos (ERBREN *et al.*, 2014).

1.3.1 Exportação do núcleo para o citoplasma

A separação espacial da transcrição de genes no núcleo e tradução de proteína no citoplasma faz parte do princípio que define as células eucarióticas: a compartimentalização. Esta compartimentalização impõe a existência de uma rede de transporte de macromoléculas para enviar os mRNAs para o citoplasma, para que assim possa ocorrer a expressão gênica. A exportação de mRNA comumente auxilia no direcionamento para regiões de tradução, sendo um ponto de controle que garante o transporte dos transcritos corretamente processados e a síntese proteica em determinado local ou tempo dentro de uma célula ou organismo (DU *et al.*, 2007). O núcleo é rodeado por um invólucro constituído por duas membranas fosfolípídicas: uma exterior e uma interior que são 30 nm distantes. A membrana nuclear age como uma barreira seletivamente permeável permitindo que macromoléculas possam se deslocar entre o núcleo e o citoplasma através de um complexo chamado de Complexo de Poro Nuclear (NPC – do inglês *Nuclear Pore Complex*)

O NPC funde as membranas interna e externa para formar um canal aquoso que mede cerca de 100-150 nm de diâmetro e 50-70 nm de espessura e é amplamente conservado em eucariotos (LIM *et al.*, 2008; GROSSMAN *et al.*, 2012). NPC é composto por 30 proteínas diferentes denominadas nucleoporinas (NEUMANN *et al.*, 2010) que constituem um complexo cuja a massa molecular é de aproximadamente 125 kDa e o número destes complexos por núcleo é altamente variável entre os organismos (CAUTAIN *et al.*, 2014).

O modelo geral de exportação núcleo-citoplasmática em eucariotos envolve proteínas da família β -carioferina, conhecidas como exportinas e importinas. Para que ocorra a importação ou exportação nuclear, as macromoléculas geralmente estão marcadas com sinais de transporte específicos, denominados sinal de localização nuclear (NLS – do inglês *nuclear localization signal*) ou sinal de exportação nuclear (NES – do inglês *nuclear export signal*). As exportinas, reconhecem essas sequências nas macromoléculas, diretamente ou via moléculas adaptadoras para permitir a liberação do complexo de transporte no final do processo de translocação (LANGE *et al.*, 2007) e cada tipo destas proteínas reconhecem grupos de “proteínas carga” ou RNA (COOK *et al.*, 2007). As exportinas pertencem a uma família de proteínas denominadas carioferinas, proteínas multi-domínio, que contém um domínio de ligação a carga (outra proteína ou RNA) e um domínio de ligação para as proteínas do tipo Ran-GTPases (MACARA *et al.*, 2001). O processo de transporte requer

energia metabólica. Os receptores que carregam ou descarregam os cargos são controlados por proteínas como a Ran-GTPase e requerem hidrólise de GTP (SOROKIN *et al.*, 2007). Ran é uma proteína de 25kDa que hidrolisa GTP e aparece vinculada a dois nucleotídeos diferentes: RanGDP e RanGTP (BOURNE *et al.*, 1991; BISCHOFF *et al.*, 1995).

Diferentes tipos de RNAs transcritos no núcleo são cargos de exportinas e precisam ser exportados para cumprir a sua função na síntese de proteínas ou para amadurecer em partículas funcionais (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Contudo, a exportação de mRNA é na grande maioria dos casos feita via heterodímero Mex67-Mtr2 (em leveduras) e TAP/p15 (em humanos) e não via exportinas. Logo, este transporte não depende de RanGTP. O heterodímero é recrutado via o complexo de transcrição-exportação (TREX) (THAKURTA *et al.*, 2002; KÖHLER *et al.*, 2007; CARMODY, *et al.*, 2009,) que é composto por várias proteínas denominadas UAP56, REF/Aly, CIP29 e THO em humanos (KATAHIRA, 2012). THO é um complexo de subunidades que juntamente com REF/Sly promove a interação dos mRNA maduros com o receptor Nxf1, que se associa com o poro nuclear para permitir a passagem do RNA através do canal. Na face citoplasmática os mRNAs são então liberados e os fatores de exportação são reciclados (REN *et al.*, 2010; RODRIGUEZ-NAVARRO; HURT, 2011). A figura 1.3 representa o modelo de exportação núcleo-citoplasmáticas dos mRNAs.

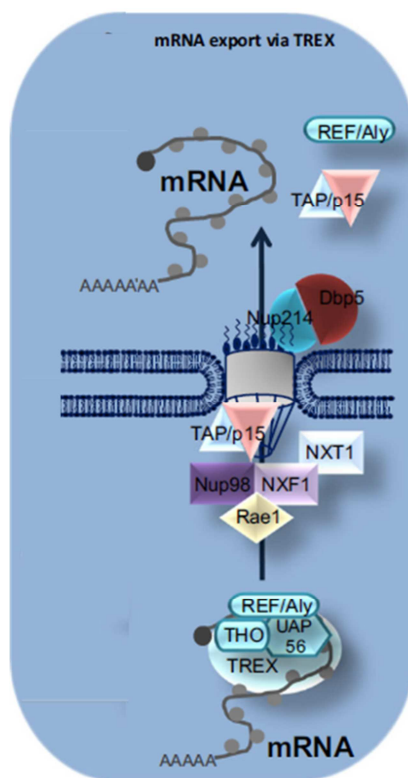


Figura 1.3. Figura esquemática do transporte núcleo-citoplasmático de mRNA.
(Adaptado de CAUTAIN *et al.*, 2014)

.A proteína UAP56 (FLECKNER *et al.*, 1997), também denominada Sub2 em leveduras (ZHANG; GREEN, 2001) é de grande importância para a exportação de mRNA, sendo recrutada para os sítios de transcrição de mRNA dependente de processamento por *Splicing* (CUSTODIO *et al.*, 2004). O processamento do pré-mRNA está acoplado à exportação de RNA (LUO; REED, 1999). Este acoplamento é conseguido pela formação do Complexo de Junção de Exon durante o *Splicing*, contendo UAP56 e outros fatores de *Splicing*.

UAP56 é uma RNA helicase que hidroliza ATP (SHEN *et al.*, 2007), fornecendo assim energia para que o processo ocorra. Esta proteína cumpre uma função chave para a exportação de mRNA celular, interagindo com a proteína adaptadora celular REF (GATFIELD *et al.*, 2001; HEROLD *et al.*, 2003). O fator de exportação de RNA REF se move entre o núcleo e citoplasma e liga o mRNA ao principal receptor de transporte TAP ligando-se diretamente as duas macromoléculas (KATAHIRA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2001). UAP56 é capaz de recrutar pré-mRNA contendo ou não íntrons. No primeiro caso (mRNA com íntrons), UAP56 é um constituinte do complexo de junção de éxon e assim acopla o *splicing* e exportação de mRNA (LUO *et al.*, 2001). No segundo cenário (mRNA sem íntrons), UAP56 como um componente do complexo TREX acopla a elongação da transcrição realizada pela RNA polimerase II com a exportação de mRNA (STRASSER *et al.*, 2001; STRASSER *et al.*, 2002). Em todos os casos o recrutamento é seguido de formação do complexo ternário REF-mRNA-TAP e após metilação o mRNA é transferido para TAP (HAUTBERGUE *et al.*, 2008). UAP56 deixa o complexo ainda no núcleo, enquanto que REF interage com UAP56 ou TAP no núcleo ou citoplasma (ZHOU *et al.*, 2000; HUNG *et al.*, 2010).

Apesar da exportação de mRNA ser bem estudada e compreendida em humanos e leveduras, pouco se sabe sobre esta via em parasitas de modo geral. Por isso, nosso grupo tem investido em pesquisas voltadas a compreender os fatores envolvidos com a exportação de mRNA em parasitas. Um estudo inicial do nosso grupo realizado por Serpeloni e colaboradores em 2011 examinou a conservação das proteínas envolvidas na exportação de RNA ao longo da filogenia dos eucariotos. Através de busca com ferramentas de bioinformática, foi verificado que a via que transporta RNA dependente de RanGTP é bem conservada entre os eucariotos, porém na via que transporta mRNA (Complexo TREX) a conservação é bem mais baixa, provavelmente pelas diferenças no processo de expressão e regulação gênica. De fato, poucas proteínas desta via são conservadas e a proteína UAP56/Sub2 foi a que apresentou maior conservação, inclusive em tripanosomatídeos, porém esta via de transporte de RNA ainda não foi bem estudada nestes organismos.

Além desse trabalho, Serpeloni e colaboradores também em 2011 avaliaram a conservação funcional de Sub2 experimentalmente usando o *T. cruzi* como modelo. Neste caso, verificaram que a proteína de *T. cruzi* (TcSub2), ortóloga a UAP56/Sub2, uma RNA helicase da família DEAD box, está localizada no núcleo associada a regiões correspondentes a sítios de transcrição de RNAPol II e é essencial para exportação de mRNA em tripanosomatídeos. Para demonstrar o papel de Sub2 na exportação foi realizado um experimento de silenciamento da expressão de TcSub2 através de RNAi em *T. brucei*, visto que o nocaute duplo do gene em *T. cruzi* foi inviável. Neste caso, utilizando a técnica de FISH de RNA foi demonstrado que nas primeiras 48 horas de indução o mRNA estava disperso por toda a célula com pouco sinal no interior do núcleo e após 72hrs, quando a concentração da proteína na célula já estava bem mais baixa, todo o mRNA estava concentrado na porção nuclear. Ainda no mesmo trabalho por análise metabólica utilizando metionina radioativa como marcador da tradução foi verificado que após 48hrs de indução de RNAi ocorreu uma drástica diminuição na tradução em relação a taxa de incorporação de metionina nas células não induzidas, demonstrando que a proteína de *T. brucei* (TbSub2) era essencial para o transporte dos mRNA do núcleo para o citoplasma e ainda para a conservação das taxas normais de tradução na célula. Porém, não pode ser confirmada a função desta proteína em *T. cruzi*.

Ensaio de complementação funcional se mostraram bastante confiáveis para determinação funcional de genes diferentes relacionados. Os genes podem ser testados quanto a sua capacidade para codificar a proteína funcional que pode complementar o fenótipo causado pelo silenciamento causado por RNA de interferência (RNAi) (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2005; OHYAMA *et al.*, 2013). Rusconi e colaboradores em 2005 utilizaram esta técnica para verificar a função de genes ortólogos de *T. brucei* e *T. cruzi* que tinham 82% de identidade. Nesta ocasião sistema de RNAi de *T. brucei* não identificou e assim não silenciou o gene da proteína de *T. cruzi* que foi inserido. Os genes das proteínas TcSub2 e TbSub2 tem 79% de identidade e portanto essa diferença seria suficiente para que o mecanismo de RNAi de *T. brucei* não afetasse a expressão do gene de *T. cruzi*. Assim, a técnica de complementação funcional seria uma opção viável para verificarmos a função da proteína TcSub2.

1.4 RNA helicases: A família DEADX-Box

DNA e RNA Helicases constituem um grupo de enzimas que utilizam a energia da hidrólise de nucleosídeo trifosfato (NTP) para catalisar a separação de DNA e RNA dupla fita, respectivamente. Os ácidos nucleicos simples fita (ssNA) resultante são substratos para numerosas reações celulares e conseqüentemente, as helicases estão essencialmente envolvidas em cada etapa do metabolismo de DNA e RNA incluindo a replicação, transcrição, tradução, rearranjo da cromatina, síntese de ribossomos, a maturação do RNA e exportação nuclear (revisto por BYRD; RANEY, 2013).

As helicases foram originalmente identificadas com base em 7 motivos conservados (GORBALENYA *et al.*, 1989) e depois classificadas em superfamílias (SF). Entretanto, somente algumas destas enzimas têm atividade helicase em duplas fitas. O motivo helicase, entretanto, é característico de todas as NTPases dependentes de ácidos nucleicos, dos quais as proteínas helicases fazem parte (CORDIN *et al.*, 2006; FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que algumas são translocases (ou seja: utilizam a energia da hidrólise de NTP para translocação direcional do ácido nucleico), incluindo PcrA (DILLINGHAM *et al.*, 2002), NS3 (RAJAGOPAL *et al.*, 2010) NS3h (YU *et al.*, 2010), e UvrD (TOMKO *et al.*, 2007). Entretanto, nem todas as translocases tem atividade helicase incluindo EcoR124I (SEIDEL *et al.*, 2008) e RIG-I (MYONG *et al.*, 2009) e nem todas as helicases tem atividade translocase, como a Ded1 (Yang *et al.*, 2006). Portanto, nem todas as proteínas que possuem motivos helicases e estrutura do núcleo de helicase, são de fato, helicases (capazes de desenovelar dsDNA ou dsRNA dependente de hidrólise de ADP). Dos motivos conservados, somente Walker A e B (domínios I e II) são comuns a todas as helicases (BYRD; RANEY, 2013).

As superfamílias (SF) 1 e 2 apresentam o mesmo enovelamento com dois domínios RecA-like α - β (CARUTHERS; MCKAY, 2002). Apesar das proteínas RNA Helicases diferirem entre si em sequência primária, a estrutura tridimensional conservada indica que os mecanismos moleculares para desempenho de sua atividade enzimática são bastante semelhantes. As SF3, SF4 e SF5 contêm principalmente helicases hexaméricas que são em sua maioria de origem bacteriana ou viral (PATEL; PICHA, 2000). Os membros destas últimas superfamílias são estruturalmente diferentes das helicases SF1 e SF2, sendo constituídas de apenas um domínio RecA-like e apenas 2 a 5 motivos conservados em superfamília das helicases (CORDIN *et al.*, 2006).

SF2 é a maior e mais diversificada das superfamílias de helicase. Com base em homologia de sequências subdivide-se em famílias, incluindo: RecQ-like; RecG-like;

Rad3/XPD; Ski2-like; RIG-I-like; NS3/NPH-II; deah/RHA; DEAD-box e Swi/Snf (FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010), sendo a proteína TcSub2 um membro da família DEAD-BOX.

A família DEAD-box é a maior família entre as SF2 e é conservada desde as bactérias até os seres humanos (JANKOWSKY; FAIRMAN, 2007). Elas possuem diversas funções no metabolismo de RNA incluindo transcrição, splicing, transporte, biogênese de ribossomos, tradução, montagem de complexos RNA/proteína e degradação (JANKOWSKY; FAIRMAN, 2007; HILBERT *et al.*, 2009). Essas enzimas são nomeadas pela sequência de aminoácidos conservada no motivo B (Asp-Glu-Ala-Asp / D E A D). Elas têm função exclusivamente como chaperonas ATP dependentes que reconfiguram RNA. Diversos substratos são utilizados por estas enzimas, mas eles são mais eficientes quando o domínio de ligação ao RNA, que difere do domínio de atividade helicase, também está ligada ao RNA (JANKOWSKY; FAIRMAN, 2007). Pode ser ssRNA, dsRNA ou qualquer RNA estruturado (Tijerina *et al.*, 2006).

Proteínas da família DEAD-box ligam-se ao RNA de forma dependente de ATP, mas não se movem ao longo do ácido nucleico. Em vez disso, eles rompem estruturas secundárias e terciárias de RNAs estruturados em complexos de proteína-RNA (HILBERT *et al.*, 2009).

O desenovelamento de RNA por proteínas desta família ocorre através da ligação ao dsRNA e consequente separação das fitas em vez de rompimento por translocação em ácido nucleico. Isso permite que o desenovelamento ocorra sem direcionalidade em alguns casos, porém limita a ação destas proteínas a duplas-hélices curtas, geralmente menos de que duas espirais helicoidais (YANG *et al.*, 2007; FEI *et al.*, 2008) (Figura 1.4).

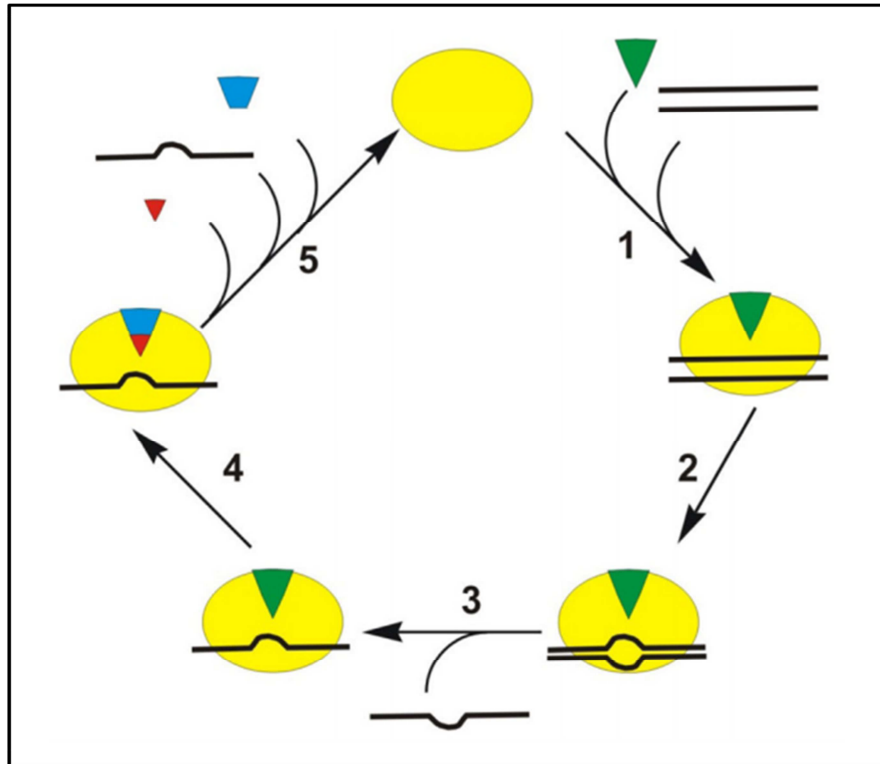


Figura 1.4: Proposta de mecanismo de destabilização por helicases DEAD-box. A proteína helicase (oval amarelo) liga-se ao ATP (triângulo verde) e dsRNA (linhas pretas) (passo 1). Seguindo um rearranjo (passo 2) a cadeia de RNA se dissocia (passo 3). A hidrólise de ATP ocorre depois do desenrolamento (passo 4), e o ciclo é completado com a liberação de fosfato (triângulo vermelho), ssRNA, e ADP (trapézio azul) (passo 5) (Fonte: BYRD; RANEY, 2013).

As únicas proteínas da família DEAD box que tem sua estrutura quase que completamente elucidadas são MjDEAD de *Methanococcus jannashii* (STORY *et al.*, 2001) e o fator de Splicing humano UAP56 (SHI *et al.*, 2004). A flexibilidade entre domínios tem sido etapa limitante para a determinação estrutural, em totalidade, das proteínas dessa família. Além disso, em alguns casos um novo estado conformacional destas proteínas impossibilita a resolução das estruturas por métodos de substituição molecular. Portanto, estruturas de domínios de DEAD box têm sido resolvidos separadamente para a reconstituição da proteína completa. As estruturas dos domínios I e II do fator de iniciação de tradução eIF4A (CARUTHERS *et al.*, 2000), um outro cristal de UAP56 (ZHAO *et al.*, 2004) e o domínio I de BstDEAD (CARMEL; MATTHEWS, 2004) estão disponíveis. Em todas estas proteínas DEAD-box não foi possível determinar a estrutura de uma porção amino- e carboxi-terminal.

O domínio I (n-terminal) contém os motivos de ligação ao ATP, motivos Q (quando presente) que se liga aos nucleotídeos conferindo a especificidade pelo ATP (CORDIN *et al.*, 2006), os motivos I e II RecA-like, o motivo III de hidrólise do ATP, além dos motivos de ligação a RNA Ia e Ib. O Domínio II (c-terminal) contém os motivos de ligação ao RNA VI e V, além do motivo VI que pode coordenar as atividades de desenovelamento (HILBERT *et*

al., 2009, CORDIN *et al.*, 2006). Os domínios desta família estão representados nas figuras 1.5 e 1.6. Quando o ATP e o RNA estão ausentes, as helicases estão em uma conformação aberta e os dois domínios não interagem (Figura 1.7). Quando ocorre a ligação ao ATP os domínios se fecham (COLLINS *et al.*, 2009; ANDERSEN *et al.*, 2006).

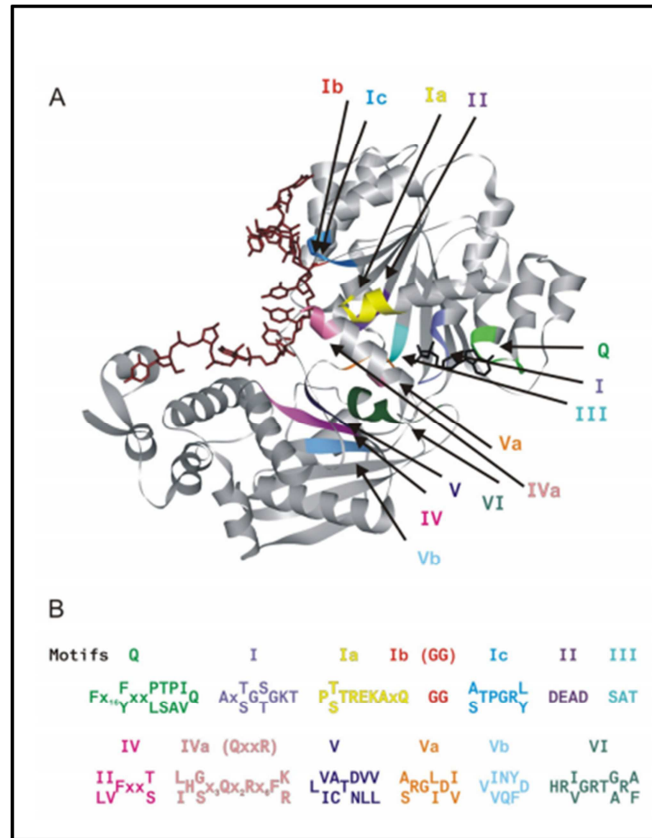


Figura 1.5: Estrutura das proteínas da família DEAD-Box Helicases. A: Estrutura obtida por cristalização (*Protein Data Bank* code 3I61). B: A sequência consenso para os motivos conservados da família DEAD-box. (Fonte: BYRD; RANEY, 2013)

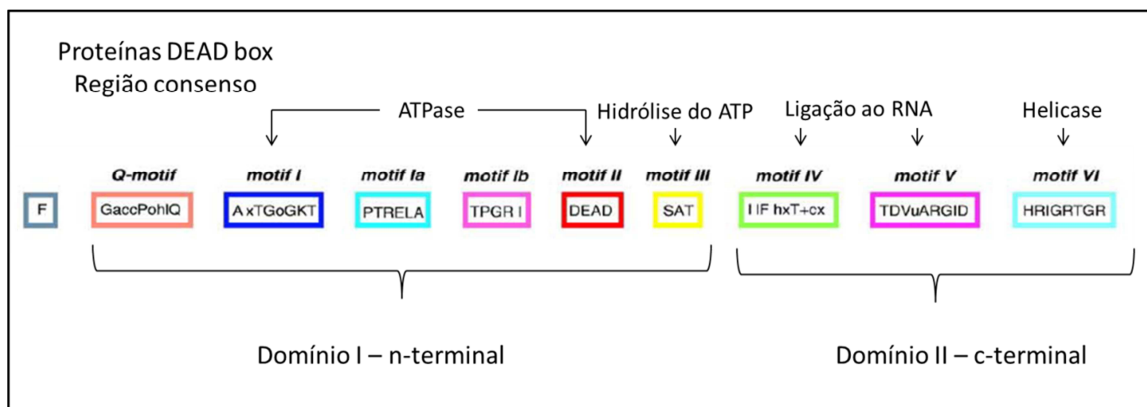


Figura 1.6: Motivos conservados das proteínas da família DEAD-Box Helicases. A: Estrutura obtida por cristalização (*Protein Data Bank* code 3I61). B: A sequência consenso para os motivos conservados da família DEAD-box. (Fonte: Modificado de CORDIN *et al.*, 2006).

Curiosamente, estruturas resolvidas de proteínas de diferentes famílias de SF2 mostram diferenças significativas na distância e orientação dos domínios I e II. Enquanto os domínios I e II estão mais próximos em HCV NS3, MjDEAD e uvrB, a distância entre eles é maior nas estruturas de UAP56 e eIF4A. Além disso, em UAP56, os dois domínios estão rotacionados em mais de cinquenta graus (em relação um ao outro) em comparação ao seu posicionamento em HCV NS3, uvrB ou MjDEAD (SHI *et al.*, 2004). Estas diferenças refletem a flexibilidade das estruturas das helicases SF2 que é provavelmente importante para o desempenho de suas atividades (Figura 1.7).

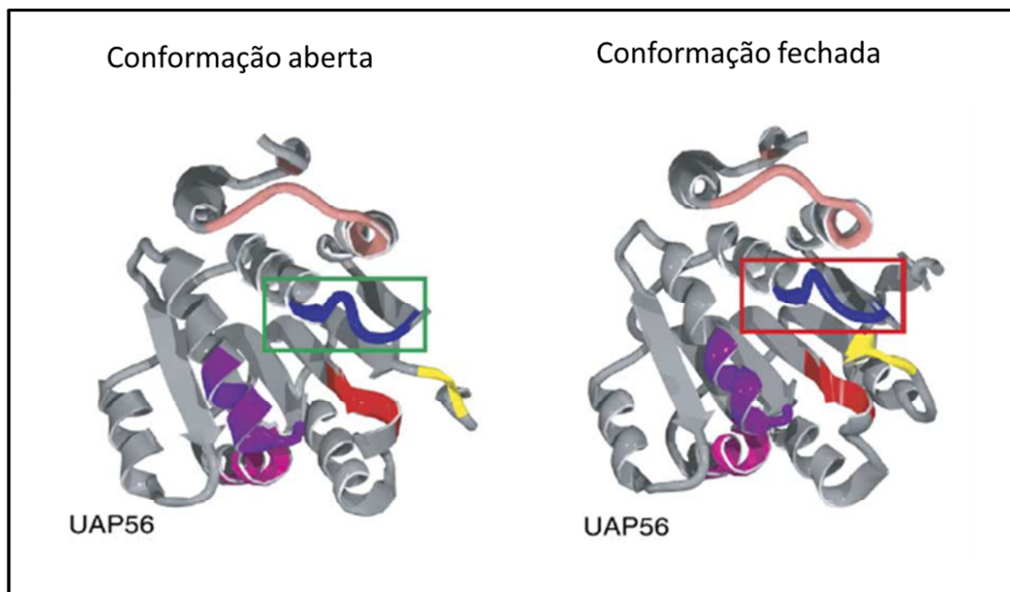


Figura 1.7. Estrutura cristalizada da proteína DEAD box UAP56. Estrutura do domínio 1 de UAP56 com e sem ADP (CORDIN *et al.*, 2006; PDB accession number 1XTI). O nucleotídeo não está representado.

O processo de exportação núcleo-citoplasmática não é bem conhecido em tripanosomatídeos e as peculiaridades destes organismos com relação aos outros eucariotos são evidentes. A expressão gênica, por exemplo, é bastante distinta, principalmente com relação à maturação do mRNA. Por este motivo proteínas como UAP56 e TcSub2 que são ortólogas e tem sua sequência de bases bem conservada (69% de identidade) não necessariamente possuem a mesma função ou a desempenham da mesma maneira. Portanto, apesar de já existir algum conhecimento sobre esta família de proteínas em eucariotos, a análise funcional e estrutural da proteína TcSub2 é relevante para gerar novos dados que permitam a compreensão do modo de ação dessa proteína e identificação de fatores importantes que influenciem a sua atividade na exportação de mRNA.

2. OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivo Geral

Analisar funcionalmente e estruturalmente o domínio ATPase da proteína TcSub2 através de ensaios bioquímicos da atividade ATPase, espectroscópicos e complementação funcional em *T.brucei*.

2.2 Objetivos específicos

Objetivo 1. Analisar a atividade do domínio ATPase de TcSub2 e avaliar se essa atividade é influenciada por diferentes RNAs.

Meta 1.1 Clonar o gene TcSub2 com sequência selvagem (TcSub2) e mutada no domínio ATPase (TcSub2K87N) em vetor de expressão em sistemas bacterianos.

Meta 1.2 Expressar a proteína TcSub2, TcSub2K87N e GFP na fração solúvel do extrato de celular de *E. coli*.

Meta 1.3 Purificar as proteínas recombinantes TcSub2, TcSub2K87N e GFP.

Meta 1.4 Avaliar se a mutação K87N em TcSub2 resulta em alterações conformacionais, oligoméricas e de estabilidade térmica.

Meta 1.5 Realizar a cinética da atividade ATPase de TcSub2, TcSub2 K87N e GFP.

Meta 1.6 Avaliar se a atividade ATPase de TcSub2 é influenciada pela presença de diferentes RNAs.

Meta 1.7 Avaliar se TcSub2 interage com RNA e se esta interação resulta em alterações conformacionais.

Objetivo 2. Avaliar se o gene TcSub2 tem a mesma função e atividade que o seu ortólogo em *T.brucei*.

Meta 2.1 Clonar o gene TcSub2 selvagem e mutado em vetor de complementação;

Meta 2.2 Obter populações transfectantes de *T.brucei* para estabelecer os ensaios de complementação funcional;

Meta 2.3 Realizar os ensaios de complementação funcional

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções e Tampões

AP Buffer (tampão de reação para fosfatase alcalina): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

Fenol - clorofórmio - álcool isoamílico: Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.

Solução de bloqueio para *Western blot*: Tampão PBS, Tween20 0,05% e leite em pó desnatado 5%.

Solução de Brometo de Etídio: 5,0 µg/mL de brometo de etídio em água destilada.

Solução de descoloração de proteínas: Metanol 30%, ácido acético 10%, água 60%.

Solução de hibridação para *Southern blot*: SSC 6x, solução Denhardt 5x, SDS 0,1%, DNA fita simples de esperma de salmão 100 µg/mL.

Solução de Ponceau S: Ponceau S (Sigma P-3504) 0,5%, Ácido acético glacial 1%.

Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Azul de coomassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); água 45%.

Solução TBE para eletroforese de DNA (Tris- Ácido Bórico – EDTA): Tris-base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0.

Solução TE (Tris-EDTA): Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM.

Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x: Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

Tampão de amostra de proteínas: Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

Tampões de lavagem e eluição de proteínas recombinantes em coluna Ni-NTA (Qiagen):

- Tampão A: GuHCl 6 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris·Cl 0,01 M pH 8.0.

- Tampão B: uréia 7 M; NaH₂PO₄ 0,1 M; Tris·Cl 0,1 M pH 8.0.

Tampão de purificação de proteínas em coluna de níquel:

- Tampão A: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% de glicerol e 10mM de Imidazol

- Tampão B.: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% de glicerol e 500mM de Imidazol

Tampão de de gel filtração:

- Tampão C: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 250mM NaCl, 10% de glicerol.

Tampão de purificação de proteínas em coluna de troca iônica:

- Tampão D: 50 mM Tris/HCl pH 8.0

- Tampão E: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% de glicerol

Tampão de suspensão de proteínas para realização do Dicroísmo Circular: NaH₂PO₄ 100 mM, pH 8,0.

Tampão de transferência para *Western blot*: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.

Tampão de corrida para SDS-PAGE: Tris-HCl 0,037 M pH 8,4; Glicina 192 mM pH 8,4; SDS 0,1%.

Tampão PBS - TWEEN 20: PBS -Tween 20 0,05%.

Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*): KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM, NaHPO₄.7H₂O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

Tampão TELT de extração de DNA: 50mM tris-HCl ph 8,0, 62,5mM EDTA, 2,5M LiCl, 4% triton X-100

Tampão ZPFM de eletroporação de *T. brucei*: NaCl 129mM, KH₂PO₄ 1,5mM, KCl 8mM, NaH₂PO₄ 8mM, MgCl₂ 1,5mM, CaCl₂ 90 µM e CH₃COONa 2,4 mM pH 7,0.

3.2 Meios de cultura

Meio LB (Luria-Bertani)	g/l
Bacto-triptona.....	10,0
NaCl.....	5,0
Extrato de levedura.....	5,0
(LB-ágar): adição de 1,5% de agar-ágar.	

Meio LIT	1L
Infusão de fígado	5,0 g
NaCl.....	4,4 g
KCl.....	0,4 g
Glicose.....	2,2 g
Triptose.....	5,0 g
Fosfato básico de sódio.....	11,56 g
Extrato de levedura.....	15,0 g
Hemina.....	0,02 g
Soro fetal bovino.....	10%
Penicilina.....	10.000 U
pH 7,2	

Meio SDM-79	1L
MEM (Minimum Essential Medium).....	7,0 g
Meio 199.....	2,0 g
MOPS.....	5,0 g
HEPES.....	8,0 g
Glicose.....	1,0 g

NaHCO ₃	2,0 g
Piruvato de Sódio	0,1 g
L-Alanina.....	0,2 g
L-Arginina.....	0,1 g
L-Glutamina.....	0,3 g
L-Metionina.....	0,07 g
L-Fenilalanina.....	0,08 g
L-Prolina.....	0,6 g
L-Serina.....	0,06 g
Taurina.....	0,18 g
L-Treonina.....	0,35 g
Adenosina.....	0,1g
Guanosina.....	0,01 g
Glucosamina.....	0,05 g
MEM amino acids solution, 50X.....	10 mL
MEM non essential amino acids 100X	6 mL
Penicilina.....	0,059 g
Streptomicina.....	0,133 g
Ácido Fólico.....	0,004 g
PABA (ácido Para-aminobenzóico).....	0,002 g
Biotina.....	0,0002 g

3.3 Microorganismos

3.3.1. *Escherichia coli*

Genótipo BL21(DE3): {pLysSTM {F- *ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)}.

Genótipo DH5 α TM: {F- *recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*}.

3.3.2. *T. cruzi* clone *Dm28c* (GOLDENBERG *et al.*, 1984)

Formas epimastigotas foram mantidas em cultura axênica de meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada quatro dias.

3.3.3. *Trypanosoma brucei* cepa 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1998)

Foram utilizadas as formas procíclicas que expressam o repressor de tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de genética reversa. Os parasitas foram mantidos em cultura axênica de meio SDM-79 complementado com 10% de Soro Bovino Fetal (BRUN; SCHONONBERGER, 1979) e antibióticos apropriados.

3.4 Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* *Dm28c*

Um total de 5×10^7 parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 350 μ L de tampão TELT e incubadas por 5 minutos a 25 °C. Ao lisado foi adicionado 150 μ L de fenol saturado e centrifugado a 13.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e dois volumes de etanol absoluto foi adicionado para a precipitação do DNA. A mistura foi novamente centrifugada a 13.000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet foi lavado com etanol 70% centrifugando-se a 13.000g por 10 minutos e descartando-se o sobrenadante. O DNA foi suspenso em 50 μ L de água ultrapura.

3.5. Preparação de bactérias cálcio-competentes

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl_2 descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5,0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado [50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, no caso de *E. coli* B121 (DE3)]. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 5 minutos a 4 °C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de CaCl_2 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas no gelo durante 30 minutos. A suspensão foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram suspensas em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução anterior acrescida de 10% de glicerol foram mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliqüotadas e armazenadas a – 70 °C.

3.6. Transformação de bactérias cálcio-competentes

Reações de recombinação ou ligação foram incubadas com 100 μL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 220 rpm a 37 °C por uma hora. Alíquotas de 100 μL e/ou 900 μL foram espalhadas em meio LB-ágar adicionado de antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação de bactérias e incubadas a 37 °C por 18 horas.

No caso de clonagem em pGEM, o meio LB-ágar foi adicionado de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, 0,04 mg/mL de X-gal e 0,4 mM de IPTG. Neste caso, a seleção dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias, devido a presença ou ausência da expressão da enzima β -galactosidase. Esta, cuja expressão é induzida por IPTG, degrada o substrato X-gal produzindo um substrato azul. Caso o fragmento seja incorporado ao vetor, a enzima β -galactosidase não é expressa e as colônias permanecem brancas, facilitando a identificação dos clones positivos, que posteriormente foram sequenciados.

3.7 Transfecção de *T. brucei* por eletroporação e seleção dos transfectantes

Um total de $2,5 \times 10^7$ parasitas em fase logarítmica de crescimento foram utilizados por transfecção. Os vetores p2T7-177-Sub2(RNAi) (item 3.11) e pAD75 (item 3.12) foram utilizados para transfecção dos parasitas pela metodologia descrita abaixo. Os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a $6.000 \times g$ a 10°C , lavados com o mesmo volume de tampão de eletroporação ZPFM e novamente centrifugados nas mesmas condições e suspensos em um volume de 1,5 mL do mesmo tampão. Para cada cubeta de eletroporação de tamanho de 0,4 mm pré-resfriada em gelo foram aliqüotados 500 μL de tampão com parasitas e para cada aliqüota foram adicionados 10 μg de DNA de cada clone de interesse previamente linearizados com *NotI*. Esta mistura foi incubada no gelo por 10 minutos e submetida a dois pulsos de 1,6 kV com capacitância de 25 μF em eletroporador GenePulser® - Apparatus (Bio-Rad). Após a eletroporação dos parasitas, cada mistura foi respectivamente transferida para garrafas de cultura de 25 cm^3 contendo meio SDM-79 suplementado com SFB-10%, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418. A seleção dos parasitas transfectados foi através da adição após 24 horas de cultivo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de blasticidina, dependendo do experimento, resistência conferidas pelos vetores p2T7-177 ou pAD74 respectivamente. A clonagem dos parasitas mutantes foi realizada através de diluição limitante em meio SDM-79 suplementado com SFB-10%, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de blasticidina, este último somente no caso de transfecção com pAD74. Após a seleção dos mutantes, foi realizada a curva de crescimento das culturas dos parasitas transfectados e induzidos com tetraciclina na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguido de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos dias posteriores. Foi realizada a contagem das culturas induzidas e não induzidas em câmara de Neubauer para observação de crescimento e possíveis alterações morfológicas após a indução do silenciamento da expressão do gene TbSub2. Os extratos proteicos das culturas induzidas e não induzidas foram posteriormente analisados quanto à diminuição da proteína TbSub2 por ensaio de *Western blot*.

3.8 Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes

3.8.1 Construção do vetor de entrada pDONRTM221 em sistemas bacterianos.

A amplificação do gene TcSub2 selvagem foi obtida através de reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios de recombinação *attB*, que são responsáveis pela recombinação com a sequência *attP* presente no vetor de entrada pDONRTM221 (Plataforma Gateway - Invitrogen). O mapa deste vetor está ilustrado na figura 3.1.

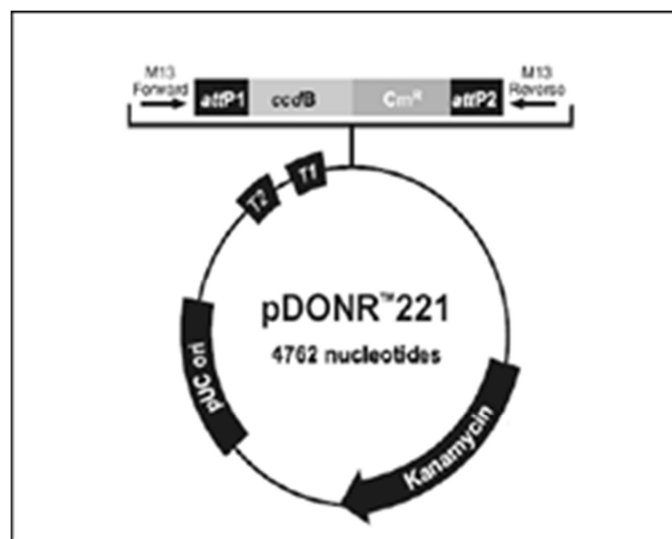


Figura 3.1. Mapa do vetor de entrada pDONRTM221 (Invitrogen). pUC ori: origem de replicação de alta cópia. *attP1/attP2*: sequência de 200 bp presente no pDONOR para recombinação com sítio *attB* presente no produto PCR. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDONOR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio *attB* do produto de PCR. *Kanamycin*: gene de resistência à canamicina. *Cm^R*: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 *Forward* e *Reverse*: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizados para seqüenciamento (FONTE: Catálogo *Gateway® Technology* Invitrogen).

A reação de amplificação do gene de TcSub2 selvagem (GenBank Gene ID: [Tc00.1047053508319.40](#)) foi realizada através de PCR utilizando-se como molde o DNA genômico de *T. cruzi*. Os iniciadores foram desenhados para amplificação do gene que possui 1311 pares de bases. Para permitir a recombinação do produto de PCR com a sequência *attP* do vetor de entrada, pDONRTM221, foram adicionadas sequências *attB* às extremidades 5' dos oligonucleotídeos *Forward* (F) e *Reverse* ®, ilustrados na figura 3.2.



Figura 3.2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação do gene TcSub2 e clonagem em vetor pDONR. *Forward* (F) e *Reverse* (R). Em negrito, a sequência *attB* adicionada à região 5' de ambos oligonucleotídeos.

Para a reação de amplificação de TcSub2 foi utilizada a ciclagem: *holding* de 95 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 30 segundos de 56 °C (anelamento) e 2 minutos a 72 °C (extensão). A reação foi realizada em volume final de 15 µL contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 1U de High Fidelity PFU- polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão comercial para a enzima PFU e água deionizada.

Os produtos da amplificação foram precipitados através de solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl₂, fornecido pelo sistema *Gateway*. Após precipitação o fragmento amplificado, foi recombinado com o vetor pDONRTM221 de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen-Catálogos 12535-019 e 12535-027).

Esta reação de recombinação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5- α cálcio-competente, conforme descrito no item 3.6 e as bactérias foram selecionadas em meio LB-ágar adicionado de 50 µg/mL de canamicina, resistência conferida pelo vetor pDONRTM221. As colônias isoladas foram inoculadas em 2 mL de meio LB adicionado de 50 µg/mL de canamicina, incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante de 220 rpm e então submetidas à centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. A minipreparação dos plasmídeos foi realizada com base no método da lise alcalina, adaptado de Birnboim e Doly (1979), purificados através do sistema *Qiaprep*[®] *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) e utilizados como molde nas reações de PCR para verificação das clonagens utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da sequência de TcSub2 para a confirmação da clonagem. Após a verificação, a sequência clonada foi sequenciada para conferência e vetor foi denominado de pDNOR-TcSub2-WT.

3.8.2 Obtenção de sequência Mutada do gene *TcSub2*

A mutação da sequência *TcSub2* foi realizada anteriormente pela Dr. Mariana Serpeloni durante seu projeto de doutorado utilizando QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (dados não publicados). Neste caso, foi realizada a troca de uma única base para substituir o aminoácido Lisina na posição 87 por uma Asparagina. A mutação está localizada no sítio ATPase que tem sua sequência de bases conservada ao longo da filogenia dos eucariotos conforme demonstrado na figura 3.3. Como molde foi utilizado o vetor pDNOR-*TcSub2* recém construído. Com a utilização do Kit todo o plasmídeo molde é copiado, utilizando uma enzima de alta fidelidade, trocando apenas a base de interesse. A direção da mutação é dada por iniciadores que são construídos especificamente para a mutação desejada. Esta alteração foi confirmada por sequenciamento. O vetor gerado foi denominado pDNOR-*TcSub2*K87N.

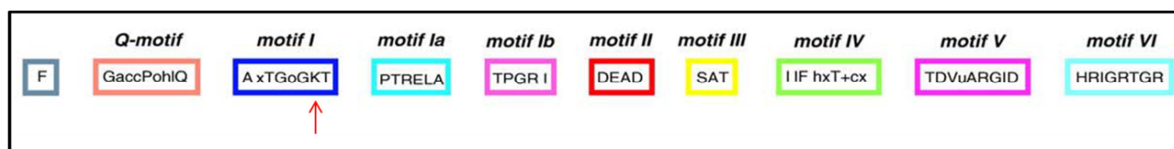


Figura 3.3. Localização da mutação no domínio ATPase. (FONTE: Cordin *et al.*, 2005).

3.8.3 Construção do vetor de entrada pDESTTM17

Os vetores pDONRTM221-*TcSub2* e pDONRTM221-*TcSub2*K87N foram utilizados para a recombinação em vetor pDESTTM17 que é destinado à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Este vetor de expressão fornece altos níveis de proteínas e contém uma etiqueta que consiste em seis resíduos consecutivos de histidina na extremidade amino-terminal, importante para a purificação da proteína através de coluna Ni-NTA (Ni⁺⁺-nitrilo-tri-acetic-acid). A alta afinidade de ligação entre as proteínas recombinantes que contêm esta etiqueta à resina permite a remoção de proteínas inespecíficas em condições estridentes, permitindo a purificação mesmo em condições fortemente desnaturantes (CROWE; MASONE; RIBBE, 1995). Esta etiqueta de histidina também é utilizada para confirmação das proteínas produzidas através de anticorpos monoclonais anti-histidina por ensaio de *Western blot*. O mapa do vetor pDESTTM17 está ilustrado na figura 3.4.

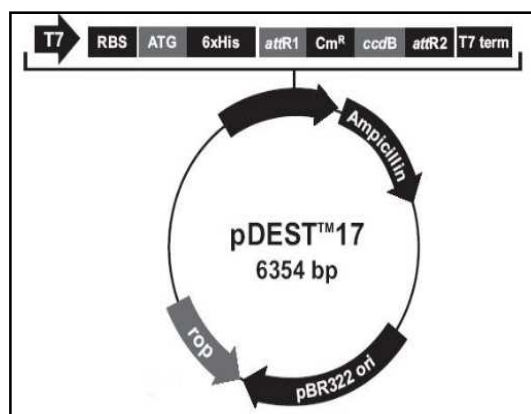


Figura 3.4. Mapa do vetor pDEST™17 (Invitrogen) de expressão de genes em bactérias. T7: Promotor de T7 RNA Polimerase. RBS: Região de ligação ao ribossomo. ATG: Códon de início. 6xHis: Etiqueta de histidinas N-terminal. sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação LR com vetor de entrada pDONR. Cm^R: gene de resistência ao cloranfenicol. *Ampicillin*: gene de resistência à ampicilina. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDEST™17. T7 term: região de término da transcrição (FONTE: Catálogo *Gateway® Technology* Invitrogen).

Os genes de TcSub2 selvagem e mutado, selecionados em pDONR, foram transferidos para o vetor pDEST™17, conforme o manual do fabricante. Após a reação de recombinação, bactérias *E. coli* DH5- α cálcio-competente foram transformadas, conforme descrito no item 3.6 e incubadas por 16 horas a 37 °C em meio LB-ágar adicionado de 100 μ g/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor pDEST™17. Após a obtenção de colônias isoladas os plasmídeos foram purificados através do sistema *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), e utilizados para análise por PCR, nas mesmas condições do item 3.8.1, utilizando os iniciadores da sequência de TcSub2 para a verificação clonagem em vetor pDEST™17.

Após a confirmação da clonagem por PCR, um plasmídeo de cada um dos vetores (selvagem e mutado) foram sequenciados e denominados de pDEST-TcSub2 e pDEST-TcSub2K87N. Estes clones foram utilizados para transformação de *E. coli* da cepa B121 (DE3) pLysS cálcio-competente, apropriada para a expressão de genes produzindo proteínas recombinantes através de indução por IPTG.

3.8.4. Indução da expressão de proteínas recombinantes através de IPTG

Colônias de *E. coli* da cepa B121 (DE3) pLysS transformadas com os vetores pDEST-TcSub2 e pDEST-TcSub2K87N foram inoculadas em 2 mL de meio LB adicionado de 100

$\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação constante de 220 rpm durante 18 horas. Após o período de incubação, 1mL da cultura foi transferido para tubos contendo 10 mL de meio LB adicionado de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ampicilina cada. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até atingir a D.O.₆₀₀ de 0,6 e foi então adicionado 1 mM de IPTG à cultura e a incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições. Para o controle da indução de expressão do gene TcSub2, foi também mantida uma cultura nas mesmas condições mas sem adição de IPTG (cultura não induzida). Células destas culturas foram sedimentadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C , lavadas com PBS e suspensas em tampão de amostra para proteínas e a indução de expressão da proteína recombinante foi analisada em gel SDS-PAGE.

Para a análise de solubilidade da proteína recombinante, a expressão das células foi induzida em condições diferentes. As bactérias contendo o vetor pDEST-TcSub2 foram induzidas em uma D.O.₆₀₀ de 0,4 com a adição de 0,2mM de IPTG. As células foram mantidas a $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas e foram sedimentadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C , lavadas com PBS e suspensas em tampão de A de purificação de proteínas em coluna de níquel. Já as bactérias contendo o vetor pDEST-TcSub2K87N foram induzidas em uma D.O.₆₀₀ inicial de 1,0, com a adição de 0,2mM de IPTG e mantidas a 20°C por 4 horas. Também foram sedimentadas e suspensas em tampão A de purificação de proteínas em coluna de níquel. As células induzidas contendo os vetores selvagem e mutados foram lizadas em um microfluidificador modelo M-110L (Microfluidics) sob uma pressão de 80 psi seguido de centrifugação a 6.000 x g por 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante (fração de proteínas solúveis) e o sedimento (fração de proteínas insolúveis) foram separados por centrifugação a 20.000g por 30 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, e adicionado tampão de amostra de proteínas em uma alíquota de $10\mu\text{L}$ de cada uma das frações. Todos os extratos proteicos foram desnaturados por aquecimento a 100°C por 3 minutos e analisados em gel desnaturante (SDS-PAGE), para a verificação da fração que continha as proteínas estudadas.

3.8.5. Purificação das proteínas recombinantes

3.8.5.1 Purificação de TcSub2

3.8.5.1.1 Cromatografia de afinidade

O vetor de expressão pDEST-TcSub2 permite que a proteína recombinante seja expressa fusionada a uma cauda N-terminal de histidina, o que viabiliza o uso de colunas cromatográficas contendo níquel imobilizado em fase sólida para o processo de purificação,

uma vez que a cauda de histidina apresenta afinidade por este metal. Para realização desse método cromatográfico foram utilizados os tampões A e B, descritos no item 3.1. Bactérias (BL21 pLysS) correspondentes aos clones de expressão das proteínas recombinantes provenientes de 4 L de indução foram suspensas em 40 mL de tampão A. As bactérias foram lisadas em um microfluidificador modelo M-110L (Microfluidics) sob uma pressão de 80 psi e centrifugadas à 20000 g, 4°C por 30 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi separado e filtrado (filtro de 0,22 µm) para a realização de cromatografia de afinidade em coluna de níquel no sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography – Amersham Bioscience) em coluna HiTrap Chelating de 1 mL (GEHealthcare). A coluna foi carregada com solução 100 mM NiSO₄ e equilibrada com tampão A. Durante a purificação foi utilizado um gradiente de 0-100% de tampão de B. As frações provenientes da cromatografia foram coletadas com um fluxo de 1ml por minuto e analisadas através de SDS-PAGE. As frações que continham a proteínas de interesse na sua forma mais pura foram misturadas e concentradas por centrifugação a 3000 g utilizando-se filtros Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore).

3.8.5.1.2 Cromatografia de gel filtração

Para remoção completa dos contaminantes, as frações concentradas na etapa cromatográfica anterior foram submetidas à cromatografia de gel filtração utilizando-se coluna Superdex 200 10/300 (GEHealthcare) em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography - Amersham Bioscience) O volume de amostra aplicado foi de 0,5 ml e a eluição da proteína selvagem foi feita com tampão C, descrito no item 3,1, com fluxo de 0,5 ml por minuto. A cromatografia por exclusão molecular, também chamada de gel filtração, é um método de análise de macromoléculas e que consiste na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho e forma. A coluna neste processo contém um polímero com ligações cruzadas com poros de tamanho definido. As moléculas maiores irão migrar mais rapidamente que os menores, pois não são capazes de penetrar no interior dos poros da resina, eluindo diretamente da coluna. As moléculas menores, por entrarem pelos poros da coluna, e levarem mais tempo percorrendo os poros, são eluídas tardiamente em relação as moléculas que são maiores.

3.8.5.2 *Purificação de TcSub2K87N*

3.8.5.1.2 Cromatografia de troca iônica

Para a total purificação de TcSub2K87N, foi necessária além das cromatografias utilizadas para a proteína TcSub2-WT, a realização da cromatografia de troca iônica em coluna Q Hitrap (GE Healthcare). Para tanto, o tampão da proteína mutada proveniente da cromatografia de gel filtração foi trocado por centrifugação a 3000 g utilizando-se filtros Amicon Ultra 10 (10000 MWCO, Millipore). O tampão de saída da gel filtração continha sal e a proteína foi dialisada para o tampão D. O tampão utilizado foi escolhido considerando que o pI da proteína é de 6,9 e a carga da resina positiva. Quando no tampão D a proteína possui carga negativa e a interação com a coluna é eficiente para a purificação. As frações em que a proteína se encontrava pura foram utilizadas para os ensaios de caracterização estrutural e enzimáticos, descritos nos itens 3.9 e 3.10.

3.9 Ensaio enzimáticos

3.9.1 *Curva de padrão de fosfato*

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando-se o Kit ATPase Assay Kit® Innova Biosciences. Para a calibração da reação dos ensaios enzimáticos, uma curva de fosfato foi obtida através de ensaio utilizando-se 12 poços com concentrações variadas de fosfato (Tabela 1). Foi adicionado um tampão fornecido pelo Kit que ao reagir com o fosfato produz um composto colorido que é detectado pelo sensor do leitor de Elisa entre 590 a 660nm. Maior intensidade da cor, indica maior concentração de Pi.

Poço	Concentração de Pi em μM
1	50
2	45
3	40
4	35
5	30
6	25
7	20
8	15
9	10
10	5
11	2,5
12	0

Tabela 3.1. Concentrações de fosfato inorgânico utilizadas para a construção da Curva Padrão. (Fonte: Manual ATPase Assay Kit® Innova Biosciences)

3.9.2 Avaliação da atividade ATPase das proteínas recombinantes

Após a obtenção da curva padrão de liberação de fosfato, os ensaios de atividade ATPase foram realizados misturando-se 300nM de cada uma das proteínas (TcSub2-WT, TcSub2-K87N e GFP), ao ATP em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2mM) no tampão fornecido pelo Kit. Para o cálculo da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e do coeficiente de Michaelis-Menten (K_m), os valores de Pi foram medidos de 5 em 5 minutos até o tempo final de 30 minutos.

Nos experimentos em que os RNAs foram inseridos na reação a concentração de RNA utilizada foi de 80 μM . As seqüências dos RNAs utilizados estão representadas na figura 3.5.

RNA 1: Poli(U) 25 repetições
RNA 2: AGCCCG(dU)AAAGC
RNA 3: GGGAGAAAAACAAAACAAAACAAAAC(dU)AGCACCG(dU)AAAGCACGC
RNA 4: GC(dU) (dU) (dU)ACGG(dU)GC(dU)

Figura 3.5. Seqüência de bases dos RNAs utilizados nos ensaios enzimáticos

3.10 Caracterização estrutural

3.10.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Este experimento foi realizado para inferir o conteúdo de estruturas secundárias e estimar o correto enovelamento das proteínas recombinantes e também das proteína TcSub2 associadas aos diferentes tipos de RNAs (ítem 3.9.2). O espectro de CD (do inglês *Circular dichroism*) das proteínas purificadas foi coletado usando espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco corporation, Tóquio, Japão). Todos os dados foram coletados variando o comprimento de onda de 190 a 260 nm, com uma velocidade de 100 nm/min, sendo feitas no total 10 leituras com resposta de 1 segundo em varredura contínua. Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipsidade molar por resíduo ($[\theta]MRW$), em miligraus.cm².dmol⁻¹, que é definida pela equação:

$$[\theta] = \theta_{obs} \times MRW \times (10 \times d \times c)^{-1}$$

Onde “ θ_{obs} ” é a elipsidade observada em graus, “MRW” é o peso molecular médio dos resíduos da proteína, “d” é o caminho óptico da cubeta em centímetros e “c” é a concentração da proteína em mg/mL. O MRW é calculado dividindo-se o peso molecular da proteína pelo número de resíduos.

A desnaturação térmica foi realizada variando a temperatura de 4°C a 90°C sendo monitorada a 222 nm, e obtendo um espectro (de 190 nm a 260 nm) a cada variação de 5°C.

3.10.2 Modelagem molecular de TcSub2 selvagem e mutada

As coordenadas atômicas de UAP56 humana (1XTI e 1XTJ) foram usadas como molde para gerar os modelos estruturais de TcSub2 e TcSub2K87N por modelagem baseada em homologia como implementado no programa MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993). Para garantir a amostragem conformacional suficiente, um conjunto de 50 modelos foi construído, a partir do qual o melhor modelo final foi selecionado com base na avaliação da estereoquímica, a função objetivo de MODELLER (score DOPE) e por inspeção visual. Para a análise dos possíveis rotâmeros de N87, utilizamos o programa Coot (EMSLEY *et al.*, 2010).

3.10.3 Determinação do estado oligomérico de TcSub2 selvagem e mutada

Cromatografia de gel filtração com as proteínas purificadas foi realizada para verificar se a proteína mutação K87N inserida em TcSub2 poderia resultar em modificações no estado quaternário da proteína em solução. Utilizou-se a coluna Superdex 200 10/300 (Ge Healthcare) em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography - Amersham Bioscience), nas mesmas condições descritas no ítem 3.8.5.1.2.

Para a obtenção de uma curva de calibração, já que a técnica baseia-se na separação de moléculas de acordo com seu tamanho, utilizou-se proteínas com pesos moleculares conhecidos e dextran (2.000 kDa), polissacarídeo de elevado peso molecular que representa o pico de um possível agregado proteico no cromatograma. As proteínas utilizadas foram albumina (66 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e lisozima (14,31 kDa). Para estimar a massa molecular por gel filtração, calculamos um parâmetro do volume de eluição: K_{av} das proteínas conhecidas e construímos uma curva em função do logaritmo da massa molecular (logMW) destas proteínas.

O K_{av} é calculado de acordo com a fórmula a seguir (onde o volume morto é o volume no qual o Blue Dextran foi eluído):

$$K_{av} = \frac{V_{eluição} - V_{morto}}{V_{coluna} - V_{morto}}$$

Para o cálculo da estimativa da massa molecular, é calculado o K_{av} referente a cada volume eluído e esse valor é colocado na equação da curva, de onde se obtém o logMW de cada pico que é transformado para unidades em kDa.

3.11 Obtenção de linhagem de parasitas *T.brucei* para silenciamento do gene TbSub2

Os ensaios de RNAi foram realizados em *T. brucei*, cepa 29-13, com sistema induzido por tetraciclina utilizando o vetor p2T7-177, ilustrado na figura 3.6. O vetor já tinha sido

construído previamente pela Dra. Mariana Serpeloni (SERPELONI *et al.*, 2011b). A transfeção e clonagem dos mutantes foi realizada de acordo com o item 3.7.

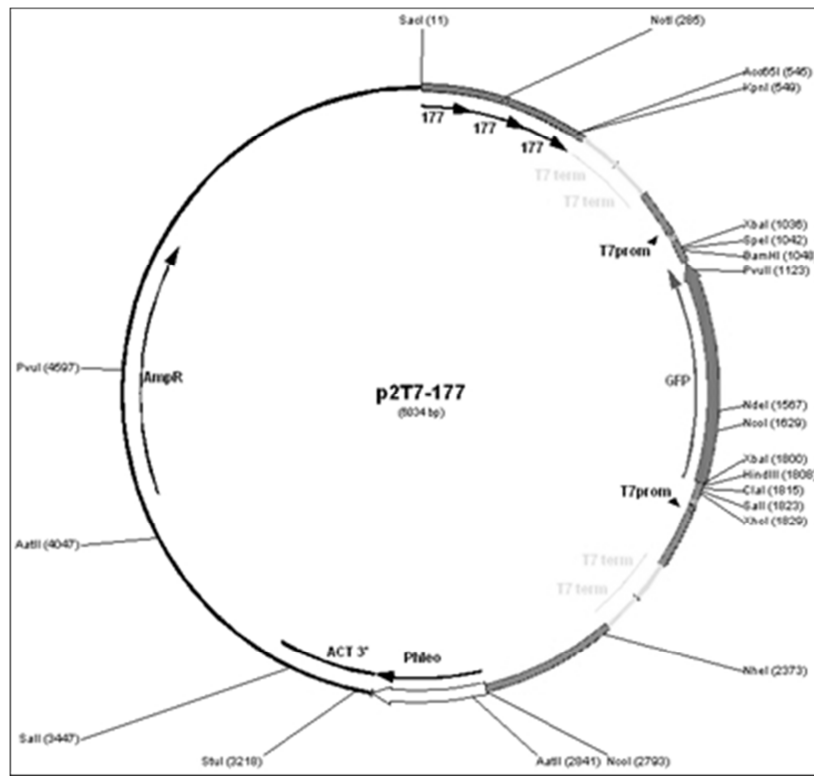


Figura 3.6. Mapa do vetor p2T7-177 utilizado para ensaios de RNAi. T7 prom: Promotor de T7 RNA Polimerase induzido por tetraciclina. T7 term: Terminador de transcrição. 177: Sequência repetitiva de 177 pares de bases para alvo de inserção em micromossomos. Phleo: gene de resistência à fleomicina. GFP: *Green Fluorescent Protein*, os sítios para as enzimas de restrição estão indicados. AmpR: gene de resistência à ampicilina (FONTE: WICKSTEAD *et al.*, 2002).

3.11.1 Análise e triagem dos transfectantes

3.11.3.1 Ensaios de Imunofluorescência

Nove clones selecionados com fleomicina (resistência conferida pelo vetor p2T7-177) após diluição limitante foram escolhidos para os testes iniciais. Um ensaio de imunofluorescência indireta foi utilizado para fazer a triagem inicial dos transfectantes. Os clones selecionados foram induzidos com tetraciclina na concentração de 2 µg/mL, seguido de 1 µg/mL após 24 horas. Após indução de 48 horas formas epimastigotas dos parasitos foram visualizadas diretamente em microscopia ótica de fluorescência em comprimento de onda de 488 nm.

Para esta visualização, lâminas foram incubadas com poli-L-lisina. Após lavagens com PBS para retirar o excesso de poli-L-lisina, os parasitas foram lavados, suspensos em PBS e aderidos por 20 minutos à lamínula. As lâminas foram submetidas a lavagens com PBS e os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 5 minutos. Após a etapa de fixação dos parasitas, foi adicionada uma solução de Triton X-100 0,1% durante 90 segundos para a permeabilização destes. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas por imersão em PBS e bloqueadas albumina sérica bovina (BSA) a 4% por 1 hora em câmara úmida.

Após o período de bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37 °C com antisoro anti-TcSub2, produzido em coelho (SERPELONI *et al.*, 2011), diluído 1:1.000. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora a 37 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (Invitrogen) diluído 1:400. Foi adicionado n-propil-galato como meio de montagem à superfície de lâminas de vidro e em seguida as lamínulas foram vertidas e seladas.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon) e as imagens foram capturadas com câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.11.3.2 Ensaios de Western Blot através de revelação por fosfatase alcalina

Para os ensaios de *Western blotting* (TOWBIN *et al.*, 1979), aproximadamente extrato proteico de epimastigotas equivalentes a 5×10^6 células foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por duas horas a 80 V. Terminada a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau para verificar a qualidade da transferência e, em seguida, descorada em água destilada e incubada em solução de bloqueio por uma hora em temperatura ambiente. Após essa incubação, a membrana foi colocada em solução de PBS, contendo o anticorpo primário (anti-TcSub2) permanecendo por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com PBS. A membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluído em PBS, por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas como descrito acima e, a seguir, foram reveladas com 66 µL de NBT (cromógeno) e 33 µL de BCIP (substrato), diluídos em 10 mL de tampão de revelação para fosfatase alcalina. A reação de revelação foi bloqueada através da lavagem da membrana em 1 mM EDTA e, em seguida, em água.

3.11.3.3 Ensaios de RNAi

Após a triagem inicial dos 9 clones, foram selecionados 3 deles, com base nos resultados obtidos pelas metodologias de imunofluorescência e *Western Blot*, descritos acima. Foi realizada então uma curva de crescimento das culturas dos 3 clones após indução do sistema de RNA de interferência (RNAi), para confirmar a reprodução do fenótipo descrito por Serpeloni e colaboradores em 2011. Os clones selecionados foram induzidos com tetraciclina na concentração de 2 µg/mL, seguido de 1 µg/mL nos dois dias posteriores. A contagem das culturas induzidas e não induzidas foi realizada de 24 em 24 horas até o terceiro dia em câmara de Neubauer. Foi analisado o perfil da curva de crescimento e avaliadas as possíveis alterações morfológicas após a indução do silenciamento da expressão do gene TbSub2.

3.12. Obtenção cepa para ensaios de complementação funcional em *T. brucei*.

Ideia deste ensaio seria de expressar o gene de *T. cruzi* na cepa de *T. brucei* que induz RNAi para avaliar a reversão do fenótipo gerado pelo silenciamento de TbSub2. Para tanto, o vetor pAD74, foi desenhado para expressar um gene de forma induzível. Este vetor foi gentilmente cedido pela Dra. Vivian Bellofatto, pesquisadora da Escola Médica de New Jersey.

Antes da inserção do gene de *T. cruzi* no vetor, foi realizada uma análise de similaridade por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), entre as sequências nucleotídicas de mRNA que são alvos do RNAi dos genes correspondentes a TcSub2, de *T. cruzi* (ID:Tc00.1047053508319.40) e TbSub2, de *T. brucei* (ID:Tb 10.70.7730), demonstrada na figura 3.7. Foi observado que a identidade é de 80%, portanto, acredita-se que a expressão do gene de *T. cruzi* não seja afetada pela indução da expressão do RNA dupla fita direcionado exclusivamente para o gene de *T. brucei*.

Range 1: 348 to 998		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Prev	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
488 bits(264)	1e-136	524/653(80%)	4/653(0%)	Plus/Plus	
Query	25	CCATGCACGCGAGTTGGCATATCAAATTGAGCAGGAGTTCAAGCGTTTCAACAATACTT		84	
Sbjct	348	CCACGCCCGAGAGTTGGCGTACCAGATCGAGCAGGAGTTCAAGCGTTTAAACAAGTATTT		407	
Query	85	GCCGCATTGTACCACCTGGTGTCTTCTTTGGGGGCGTCCCTGAAGACGAGAACATAAAACA		144	
Sbjct	408	GCCGTATTGCACCACCTGGTGTCTTTTTGGTGAATCCAGAGGACGAAAACGTGAAGCA		467	
Query	145	ACTCAAGAAGGAGGTTCCCGCAATAGTGGTGGCCACACCAGGTGCAATTTGTTCCCTCAT		204	
Sbjct	468	GCTCAAAAAGGAAGTCCCGCGATAGTGGTGGGAACACCGGGGCGCCTCAGCGCACTTAT		527	
Query	205	TGAGCGAAAAGCTCTCGACGTGTCGCGTGTAAAGTGGTTTGTGTTGATGAATTCGATCG		264	
Sbjct	528	TCAGCGCAAGGCTCTCGATGTGTCGCGCGTCAAGTGGTTTGTGTTGATGAGTTTGACCG		587	
Query	265	CTGCCTAGAGGATGTGAAAATGCGTCCGCGATGTGCAGACGGCATTCTTAAGACACCGAA		324	
Sbjct	588	CTGTTTAGAGGATGTGAAGATGCGCCGTGATGTACAGACGGTATTCTCAAGACACCCAA		647	
Query	325	GGAAAAACAGGTGATGATGTTCTCAGCCACCATGACGGAGGAGCTGCGGAATGTGGCGAA		384	
Sbjct	648	GGAGAAGCAAGTGAATGATGTTTTCCGCTACAATGACCGATGAACTTCGTAATGTGGCGAA		707	
Query	385	GAAATTTATGTCGAACCCCACTGAAATCTACGTTGACCGGTTCCAAGCTTACACTTCA		444	
Sbjct	708	GAAGTTTATGAACAACCCCAACGGAGATATATGTTGATCAACGGGCAAGCTTACACTGCA		767	
Query	445	CGGGTTGGCGCAATATTACATCAATGTGACGGAGGCACAGAACTTCGTAAGTTGTGCGA		504	
Sbjct	768	TGGGCTCGCACAGTATTACATGAATGTACGGAGGCGCAGAAGCTCCGGAAGCTTTGCGA		827	
Query	505	CATCCTCGACGCTGTTGAGTTCAATCAAGTCATTATATCACTTCCACTGTTGAGCGCTG		564	
Sbjct	828	CATTCTTGATGCTGTGGAATTCAATCAGGCTATTATTTTACATCCTCTGTGGAGCGTTG		887	
Query	565	TGAGGCTCTCAGCCGTGAGCTGCAGGCTCTTAAGTTTCCCTCAA-GGCGATTCACTCTC		623	
Sbjct	888	CGAGGCGCTCAGCCGTGAGCTGCAGGCTCTTAAGTTTCC-TGCAATGGCCATTCACTCTC		946	
Query	624	GCATGGAGCAGGCGGAGCGG-TTGGTTGTGTATGAGAGCTGCAAAACAAACCA		675	
Sbjct	947	GCATGGAACAGCCTGAGCGACTTCG-TGTGTATGAGAGCTGCAAAACAAACCA		998	

Figura 3.7. Alinhamento entre as regiões dos mRNAs de TcSub2 e TbSub2 alvo do RNAi. Identidade de 80%.

Para a amplificação a sequência codificadora de TcSub2 que possui 1311 pares de bases, foram desenhados iniciadores contendo as sequências do sítios de restrição das enzimas *Bstz17I* que também estão presentes no sítio de clonagem do vetor de complementação pAD74 e não clivam a sequência do gene. Além disso, foi adicionada uma sequência com repetições de histidina iniciadores *foward* para que a proteína pudesse ser expressa contendo a etiqueta de histidina na porção N-terminal da proteína. Três iniciadores distintos foram então construídos, conforme demonstrado na figura 3.8. O desenho dos iniciadores foi feito com o auxílio da ferramenta *PrimerSelect* do pacote do DNASTAR (Lasergene®).



Figura 3.8. Figura esquemática dos iniciadores utilizados para amplificação do gene TcSub2 para clonagem em pAD74.

Foi realizado também um alinhamento entre as sequências de aminoácidos de TcSub2 e TbSub2 para observar o grau de semelhança entre elas. O resultado foi de 91% de similaridade entre os aminoácidos, o que pode implicar em possível conservação funcional destas proteínas entre estes tripanosomatídeos. O alinhamento pode ser observado na figura 3.9.

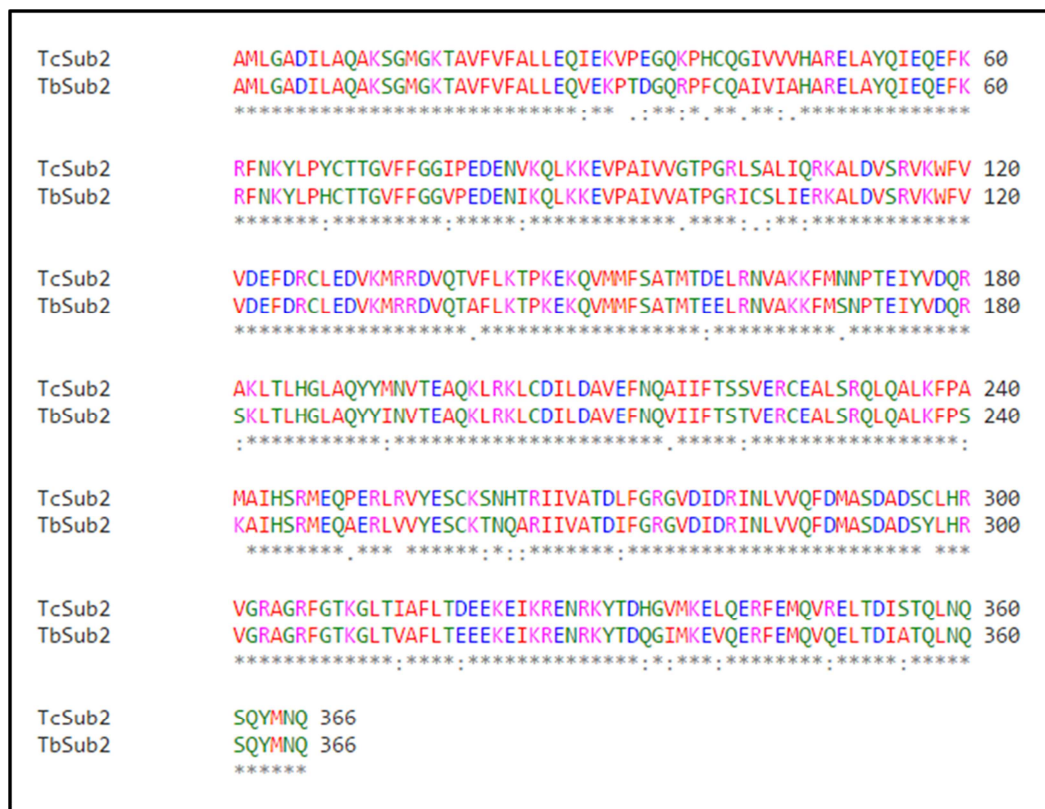


Figura 3.9. Alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas TcSub2 e TbSub2. Similaridade de 91%.

Além da sequência do gene TcSub2 selvagem, foi amplificado também, para posterior inserção em vetor de complementação, a sequência do gene TcSub2 mutado (K87N). Foram utilizados dois conjuntos de iniciadores F1 e R1, além do F2 e R1. Dessa forma 4 insertos foram obtidos contendo TcSub2 selvagem ou mutada, cada um com ou sem a etiqueta de histidina. A amplificação dos genes foi realizada utilizando-se 1U de High Fidelity Taq-DNA polimerase

Para a reação de amplificação foi utilizada a ciclagem: *holding* de 95 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 30 segundos de 56 °C (anelamento) e 2 minutos a 72 °C (extensão). Foi adicionado um tempo de extensão de 10 minutos que permite a adição de adeninas à extremidade 3' do produto da amplificação necessário para subclonagem em vetor pGEM® – T *easy* (Promega), ilustrado na figura 3.10. A ligação do produto de PCR no vetor seguiu as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em volume final de 20 µL contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* ou 30ng do vetor pDNOR-TcSub2-K87N (para a amplificação da sequência do gene mutado), 1U de High Fidelity Taq-DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão para a enzima e água deionizada.

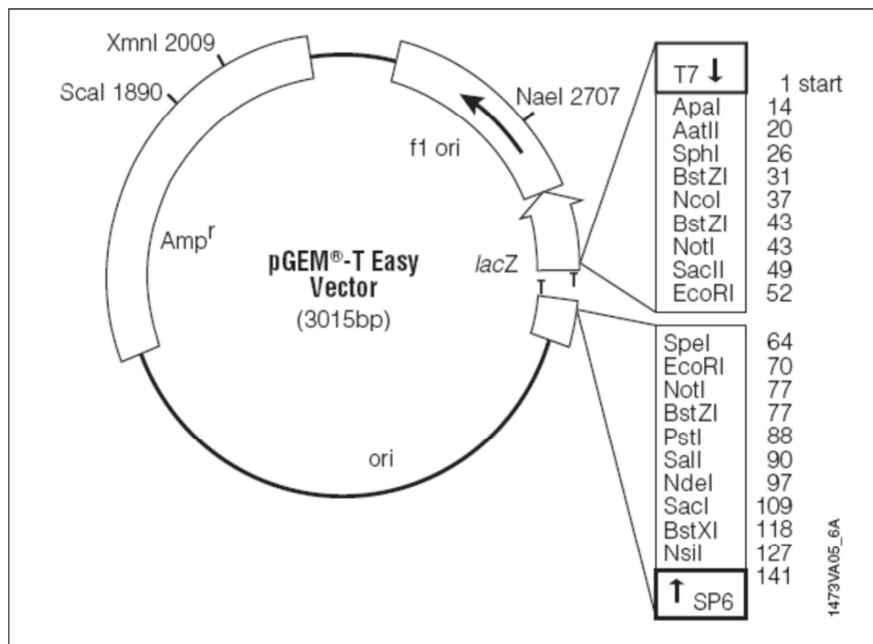


Figura 3.10. Mapa do vetor pGEM® – Teasy utilizado para as subclonagens. T7: Região de iniciação da transcrição por T7 RNA Polimerase. 14-141: Múltiplo sítio de clonagem. SP6: Promotor da SP6 RNA Polimerase. LacZ: Códon inicial de LacZ. Amp^r: Gene de resistência à ampicilina. F1 ori: origem de replicação de bacteriófago filamentosos (FONTE: Manual Promega).

As ligações foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competentes, como descrito no item 3.6. As células transformadas foram cultivadas em meio LB-ágar adicionado

de 100 µg/mL de ampicilina contendo IPTG X-gal. Após o período de incubação, foi observada a formação de colônias brancas isoladas. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB e permaneceram sob agitação por 16hrs. As bactérias foram então centrifugadas a 10.000g por 1 minuto e foram purificados os plasmídeos dessas colônias por Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN), conforme as recomendações do fabricante para a análise de subclonagem, através de digestões. Os insertos nos vetores foram denominados TcSub-Hist, TcSub2, TcSub2K87N-Hist e TcSub2-K87N

Os plasmídeos foram submetidos à análise por sequenciamento, PCR e eletroforese em gel de agarose, para a confirmação da presença do inserto e correta sequência de bases inseridas

Para a liberação dos insertos clonados, cada plasmídeo correspondente aos clones foi digerido com a enzima *Bstz17* (New England Biolabs). Cada reação foi realizada em 30 µL, contendo NEB 3, BSA 0,01%, 5µg de DNA e 5 U de enzima. As reações foram incubadas a 37 °C por 2 horas. A digestão foi submetida a eletroforese em gel de agarose. A região do gel correspondente ao inserto liberado foi excisada e o DNA foi purificado com o auxílio do kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* – GE Healthcare.

Os insertos TcSub2 e TcSub2K87N após purificados, foram ligados ao vetor pAD74 previamente digerido com a mesma enzima. Para a reação de ligação, foi utilizada a relação de 1:10 pmol de vetor e inserto. A reação ocorreu com 1 U de T₄ DNA ligase em um volume final de 10 µL. Esta reação foi incubada a 16°C durante 18 horas e posteriormente utilizada para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competentes, como descrito no item 3.6. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor pAD74. Para a confirmação dos clones positivos, as colônias isoladas foram analisadas por PCR, após prévia minipreparação dos plasmídeos pelo sistema *Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) e denominados de pAD74-TcSub2-WT e pAD74-TcSub2-K87N. Aproximadamente 10µg dos clones pAD74-TcSub2-WT, pAD74-TcSub2-K87N e do vetor controle pAD74-GFP (Figura 3.11) foram linearizados com a enzima *Not I* (New England Biolabs). A reação ocorreu em 60 µL contendo 10 U de enzima *NotI*, 6 µL de tampão 10X e água deionizada. A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas. Após a digestão para linearizar o DNA (plasmídeo) foi precipitado e suspenso em tampão de eletroporação ZPFM para transfecção de *T. brucei*. A transfecção e posterior seleção de *T. brucei* foi realizada conforme descrito no item 3.7.

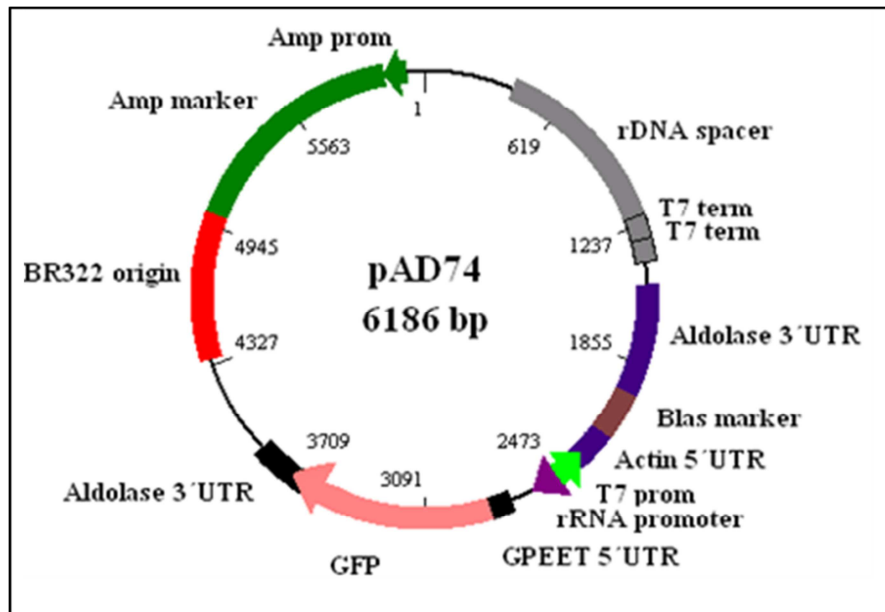


Figura 3.11. Mapa do vetor pAD74 utilizado para as complementação funcional. T7: Região de iniciação da transcrição por T7 RNA Polimerase. GFP: sequencia de bases da proteína GFP que e excisada quando o vetor é digerido com a enzima BsTz17. (Vetor cedido pela Dra. Vivian Bellofatto).

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade ATPase da proteína Tcsub2

Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que a proteína TcSub2 é ortóloga a proteína UAP56/Sub2 de mamíferos/leveduras (SERPELONI *et al.*, 2011). Essas proteínas possuem atividade ATPase já comprovada (SHEN *et al.*, 2007). Foi observado também que os domínios funcionais desta proteína são conservados ao longo da filogenia dos eucariotos. Diante desta perspectiva, o primeiro objetivo deste trabalho busca verificar se a conservação dos domínios funcionais da proteína TcSub2 de *Trypanosoma cruzi* corresponde a uma conservação quanto a atividade ATPase. Para tanto, foi necessário expressar a proteína recombinante e purificá-la para então realizar os ensaios enzimáticos.

4.1.1. Clonagem de TcSub2 e TcSub2 K87N para expressão em *E. coli*

Como controle negativo da reação foi inserida uma mutação no sítio ATPase de TcSub2. De acordo com a literatura a mutação que altera o códon correspondente a uma lisina conservada no domínio ATPase pelo códon da asparagina aboliu a atividade ATPase de UAP56 em mamíferos e como esta Lisina é conservada na sequência de TcSub2, esta mutação foi escolhida para a realizações dos ensaios (SHEN *et al.*, 2007). A alteração foi realizada através de mutagênese com auxílio do QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit. A mutação foi realizada pela Dr. Mariana Serpeloni (dados não publicados) e confirmada por sequenciamento.

Como os vetores utilizados para produção da proteína recombinante pertencem à plataforma *Gateway*, o primeiro passo foi a amplificação da sequência correspondente à região codificadora do gene TcSub2 e TcSub2 mutado (K87N) por PCR e clonagem em vetor pDONR™221, conforme descrito no item 3.8.1. Após a transformação e seleção de bactérias *E. coli* DH5- α resistentes à canamicina, foram extraídos os plasmídeos de algumas colônias. Estes foram utilizados como molde em reações de PCR para a confirmação das clonagens dos dois genes em vetor-pDONR™221. Os resultados desta amplificação podem ser observados na figura 4.1, que mostra um produto da amplificação de aproximadamente 1300 pares de bases, que corresponde ao tamanho do gene de TcSub2 (1311 pares de bases), indicando portanto, a construção de pDNOR-TcSub2 e pDNOR-TcSub2K87N. Os clones foram confirmados por sequenciamento.

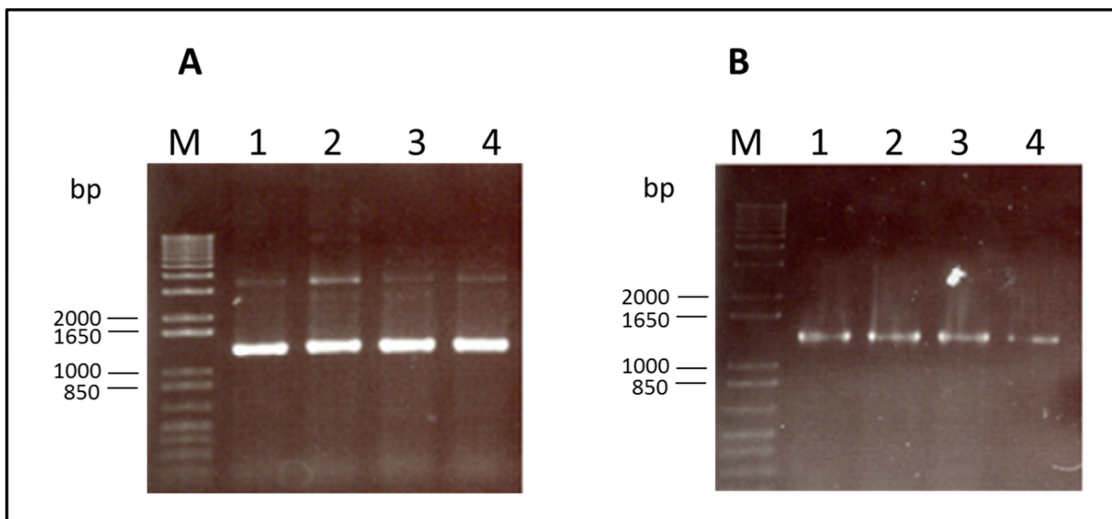


Figura 4.1. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para a confirmação da presença do gene TcSub2 selvagem e mutado nos vetores de entrada pDONRTM221 em *E. coli*. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. **A** - 1 a 4: Produto da amplificação utilizando 4 clones distintos de *E. coli*. do vetor pDNOR-TcSub2 **B** - 1 a 4: Produto da amplificação utilizando 4 clones distintos de *E. coli*.do vetor pDNOR-TcSub2K87N.

Os vetores de entrada pDONRTM221 contendo a sequência de TcSub2 selvagem ou mutada foram utilizados para a transferência do gene para o vetor pDESTTM17 por recombinação. Estes produtos foram usados para transformar bactérias *E. coli* DH5- α e os clones positivos selecionados para purificação dos plasmídeos pDESTTM17-Sub2-selvagem e pDESTTM17-Sub2-K87N. O vetor pDESTTM17 é destinado à expressão de genes em *E. coli* resultando em proteínas recombinantes, fornecendo altos níveis de proteínas contendo uma etiqueta que consiste em seis resíduos consecutivos de histidina na extremidade amino-terminal, importante para a purificação da proteína através de coluna Ni-NTA.

4.1.2. Produção das proteínas recombinantes

pDEST-TcSub2 e pDEST-TcSub2K87N foram usados para transformar *E. coli* B121(DE3) PLYS para expressar as proteínas TcSub2 selvagem e mutada, respectivamente. A análise dos clones positivos foi feita com 10 colônias (5 para TcSub2 e 5 para TcSub2 K87N). Para isso, o DNA plasmidial foi extraído e utilizado como molde para amplificação por PCR utilizando-se iniciadores compatíveis com o gene de interesse. Os clones positivos foram usados para testar a expressão da proteína recombinante (Figura 4.2).

O teste de expressão foi realizado com duas colônias dos clones contendo o vetor contendo os insertos do gene TcSub2 e três dos clones com vetor contendo insertos da sequência mutada. Cada colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB. Após atingir a D.O. de 0,6, uma alíquota de 1ml foi retirada para ser utilizada como controle sem indução. Ao restante das culturas, a expressão da proteína recombinante foi induzida adicionando-se 0,1mM de IPTG. A cultura foi incubada a 37° por 3 horas e o pellet de cada cultura foi analisado por SDS-PAGE. A proteína possui massa molecular de 49kDa e na Figura 4.3 podemos verificar, onde está apontado pela seta, uma quantidade maior de proteínas nas amostras onde a expressão foi induzida quando comparadas a amostra não induzida.

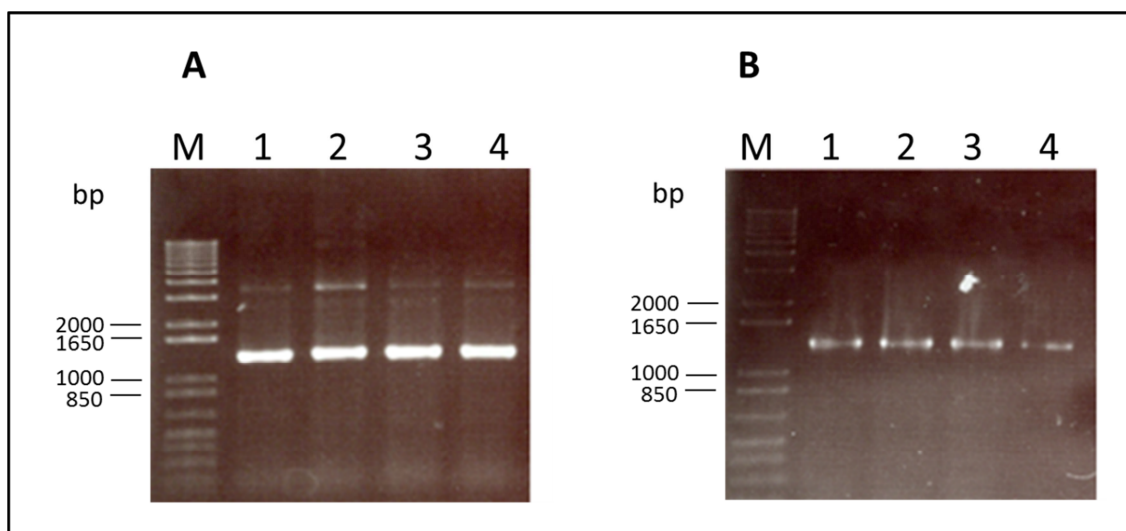


Figura 4.2. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para a confirmação da presença do gene TcSub2 selvagem e mutado nos vetores de expressão em *E. coli*. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. 1 a 5: Colônias de *E. coli*. contendo o vetor pDESTTM17-Sub2-selvagem. 6 a 10: Colônias de *E. coli*. contendo o vetor pDESTTM17-Sub2--K87N.

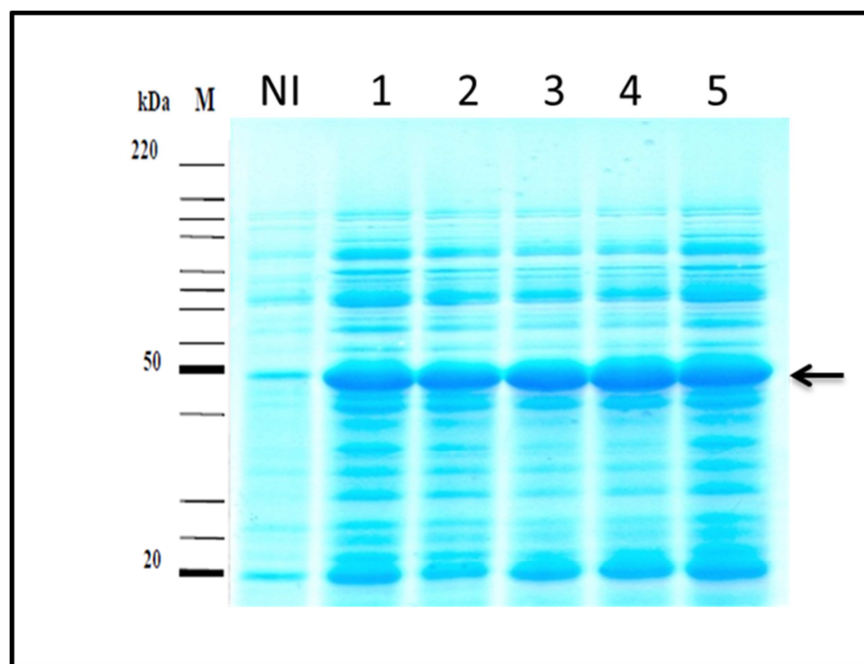


Figura 4.3. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das amostras após indução da proteína recombinante TcSub2 e TcSub2K87N. Gel de poliacrilamida 13% corado com Comassie-Blue. M: marcador de massa molecular. NI: Extrato proteico total de colônia de bactéria não induzido. 1 e 2: Extrato proteico total de colônias de bactérias contendo pDESTTM17-Sub2-selvagem induzidas. 3 a 5: Extrato proteico total de colônias de bactérias contendo pDESTTM17-Sub2-K87N induzidas. A seta indica o local onde a proteína deve estar no gel

Depois de confirmada a expressão de TcSub2 e TcSub2K87N foram realizados testes para padronização das melhores condições para obtenção da proteína na porção solúvel.

4.1.2.1 Produção da proteína recombinante TcSub2

Neste caso, variações de temperaturas, tempos e densidades óticas de indução foram testadas a fim de verificar qual condição era mais favorável para a produção de maior quantidade de proteína solúvel. Ao final, a melhor condição de indução da expressão foi da cultura em densidade ótica de 0,4, com 0,2mM de IPTG, e incubação por 16 horas a 20 ou 25°C. Após indução nestas condições, 100ml de cultura das bactérias contendo o vetor pDESTTM17-TcSub2 foram suspendidas em tampão A adicionado de Lisozima, DNase e

Inibidores de proteases e posteriormente lisadas por sonicação. A fração solúvel foi separada da insolúvel por centrifugação e as frações foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 4.4).

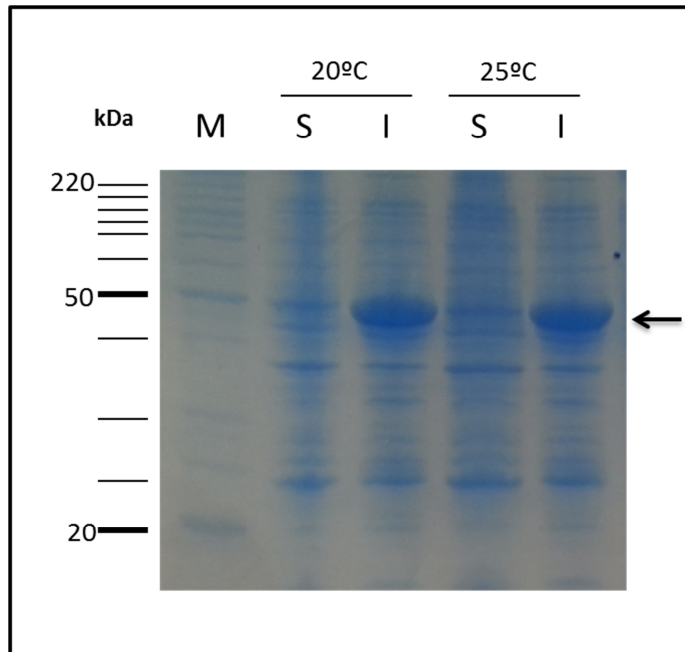


Figura 4.4. Perfil eletroforético das amostras obtidas após indução da expressão de TcSub2. Gel de poliacrilamida 13% corado com Comassie-Blue. M: marcador de massa molecular. S: Extrato proteico total da fração solúvel. I: Extrato proteico total da fração insolúvel. Acima das frações está representado a temperatura em que a proteína foi induzida.

A purificação de TcSub2 foi padronizada através da cromatografia em resina de Ni-NTA em bancada (Figura 4.5) a partir do extrato solúvel proveniente de 1 litro de cultura de bactérias induzidas.

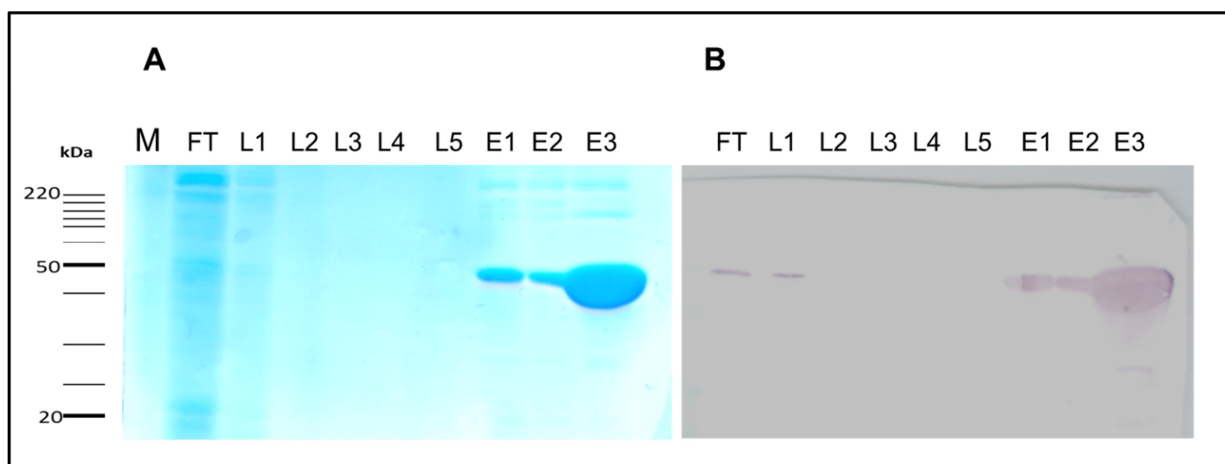


Figura 4.5. Perfil eletroforético das amostras de frações obtidas durante cromatografia em coluna de níquel para purificação de TcSub2. **A** - Gel de poliacrilamida 13% corado com Comassie-Blue. **B** – Western Blot utilizando-se anticorpo α -histidina e revelado com enzima fosfatase alcalina, por detecção cromogênica. M: marcador de massa molecular. FT: flow through, L1 a L5: Lavados, E1 a E3: Eluidos.

Com a metodologia utilizada foi possível obter grau de pureza necessário para os ensaios e para conseguir maior quantidade da proteína este protocolo foi então adaptado para purificação em larga escala (4L de cultura) em sistema *Akta Fast protein liquid chromatography* (FPLC), utilizando a resina HiTrap Chelating de 1 mL (GEHealthcare). Esta coluna foi utilizada, pois o Ni^{2+} tem afinidade pela repetição de Histidina que foi utilizada como etiqueta na proteína recombinante. A coluna foi então equilibrada com tampão contendo 10mM de Imidazol em pH 8. A amostra foi injetada na coluna e devido ao aumento gradativo da concentração de Imidazol, chegando a 500mM, pôde ser realizada a eluição da proteína. O Imidazol compete com a ligação da proteína ao metal, liberando assim a proteína da resina. A análise das frações foi feita para observar a distribuição de TcSub2 ao longo do gradiente, bem como também observar a fração em que TcSub2 está enriquecida, para ser utilizada nos ensaios enzimáticos posteriormente. Obtivemos por esta metodologia uma quantidade de 10mg de proteína por litro de cultura. O cromatograma pode ser observado na figura 4.6.

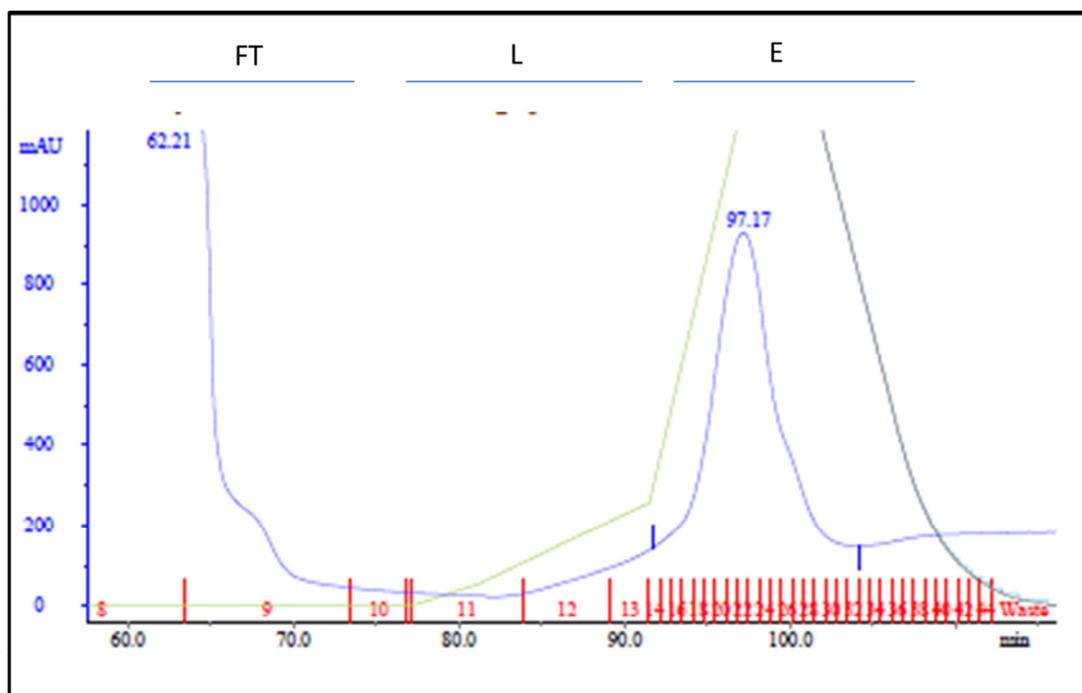


Figura 4.6. Análise das frações provenientes da cromatografia de TcSub2. A partir de extrato de 4l de cultura, foi feita cromatografia em resina de níquel com sistema Akta FPLC. FT: fração de extrato não ligado na resina; L: Lavados; E: Pico de eluição.

Todas as frações foram coletadas e então analisadas em gel de poliacrilamida assim como por *Western Blot*, utilizando-se anticorpo α -histidina, para analisar em que fração pode-se detectar a presença da proteína de interesse (Figuras 4.7 e 4.8). As frações 20 a 24 foram transferidas para um único tubo para serem utilizadas nos ensaios. Como pode ser visto na figura 4.7, as frações possuem apenas uma proteína de aproximadamente 50 kDa, indicando o grau de pureza da proteína. Além disso, foi possível coletar uma quantidade suficiente de TcSub2 para que realizar todos os ensaios enzimáticos e caracterização estrutural.

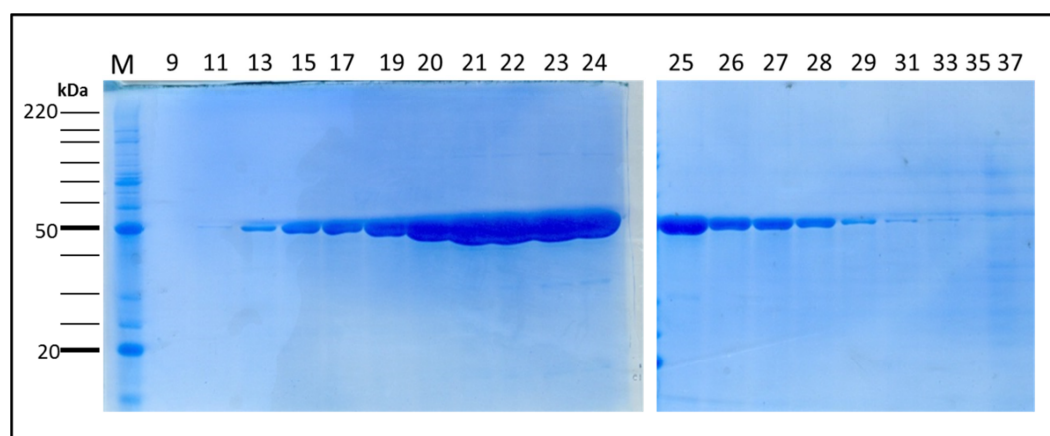


Figura 4.7. Análise do Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações coletadas da cromatografia. Gel de poliacrilamida 13 %. Amostras das frações coletadas foram aplicadas seguindo o gráfico obtido após cromatografia em resina de níquel por FPLC. M: *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); 9 a 37: Frações da cromatografia,

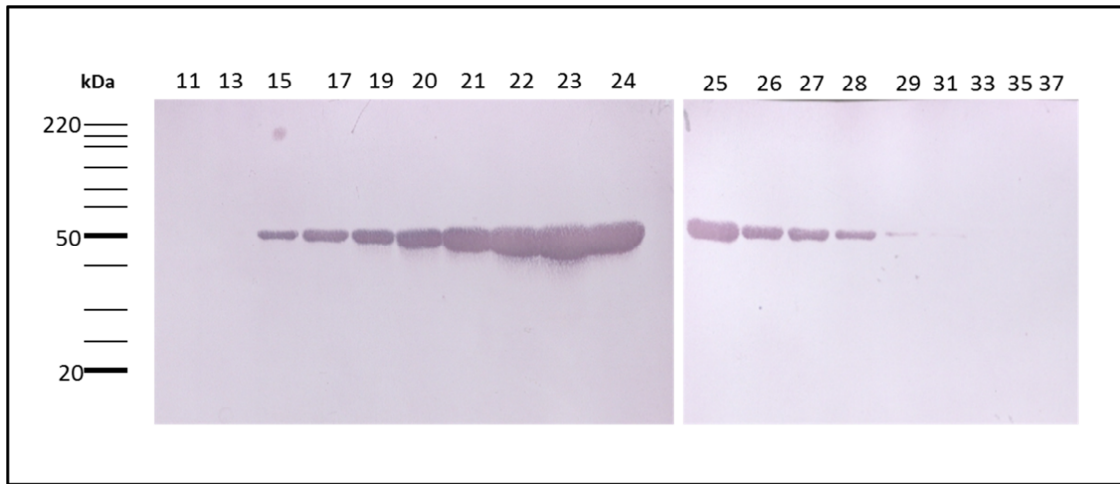


Figura 4.8. Análise por *Western Blot* das frações obtidas através de cromatografia em resina de níquel por FPLC. Foi utilizado anticorpo α -histidina e a detecção feita por método enzimático de fosfatase alcalina, para detecção cromogênica M: *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); 11 a 37: Frações da cromatografia.

4.1.2.2. Produção da proteína recombinante TcSub2K87N

Para obtenção da proteína recombinante TcSub2K87N, a expressão foi induzida nas mesmas condições utilizadas para obtenção da proteína TcSub2. O protocolo foi adaptado para purificação em larga escala (4L de cultura) em sistema Akta *Fast protein liquid chromatography* (FPLC), utilizando a resina HiTrap Chelating de 1 mL. O cromatograma deste ensaio pode ser observado abaixo na figura 4.9.

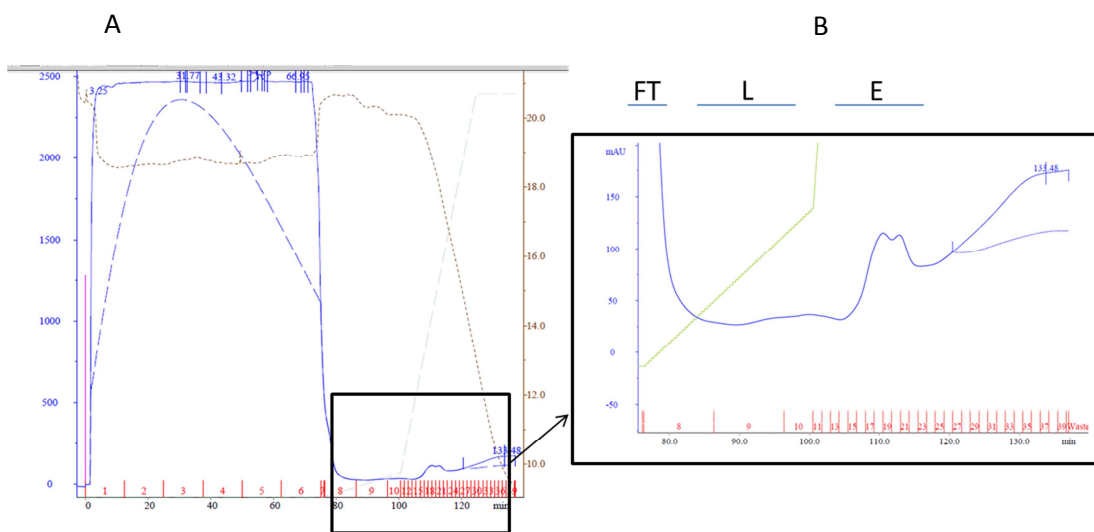


Figura 4.9. Cromatograma de TcSub2K87N purificada a partir de 4 L de cultura em resina de níquel por FPLC, com ênfase no pico de eluição, mostrando a baixa quantidade de proteína. A – Curva total, B – Ênfase no pico de eluição. FT: fração de extrato não ligado na resina; L: Lavados; E: Pico de eluição.

O rendimento obtido na purificação da proteína Tcsub2 K87N foi inferior ao obtido com a proteína selvagem, 0,5mg de proteína por litro de cultura. Ao visualizar o perfil eletroforético das frações em gel de acrilamida (Figura 4.10), foi constatado que além de em menor quantidade de TcSub2K87N, não foi possível uma purificação ideal visto que existem proteínas contaminantes nas amostras eluídas (14-21). Uma explicação para a presença de contaminantes seria de que a menor a quantidade de proteína utilizada provavelmente impossibilitou a saturação da coluna de Níquel (1ml) e desta forma outras proteínas se ligaram a resina e durante a eluição saíram na mesma fração de TcSub2K87N.

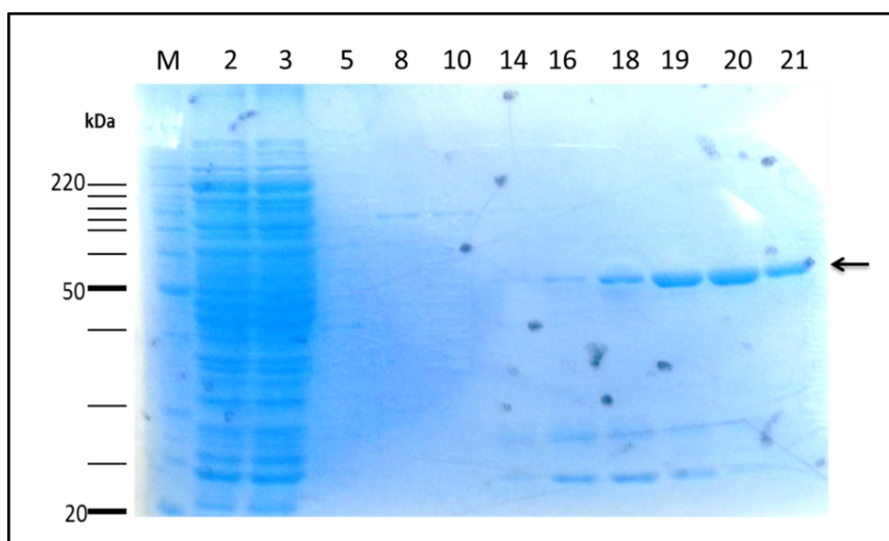


Figura 4.10. Análise do Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade para purificação de TcSub2K87N. Gel de poliacrilamida 13 % com as frações aplicadas correspondentes ao pico do cromatograma M: *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen); 2 a 21: Frações da cromatografia, 18 a 21 correspondem as frações do pico de eluição.

Por isso, iniciamos testes com diferentes condições de indução de TcSub2 K87N para obtenção de maior quantidade de proteína solúvel. Modificamos o tempo de indução e a densidade ótica da cultura, além da temperatura de indução e cepa de bactéria *E. coli*. Foram realizados os ensaios iniciais com 5ml de cultura e o que apresentou maior quantidade de proteína na fração solúvel (Figura 4.11) foi obtido utilizando-se indução em culturas de *E. coli Bl21* (DE3) P_{Lys}S, com densidade ótica inicial de 1,0, adicionando-se 0,5mM de IPTG, temperatura de 25°C por 4 horas.

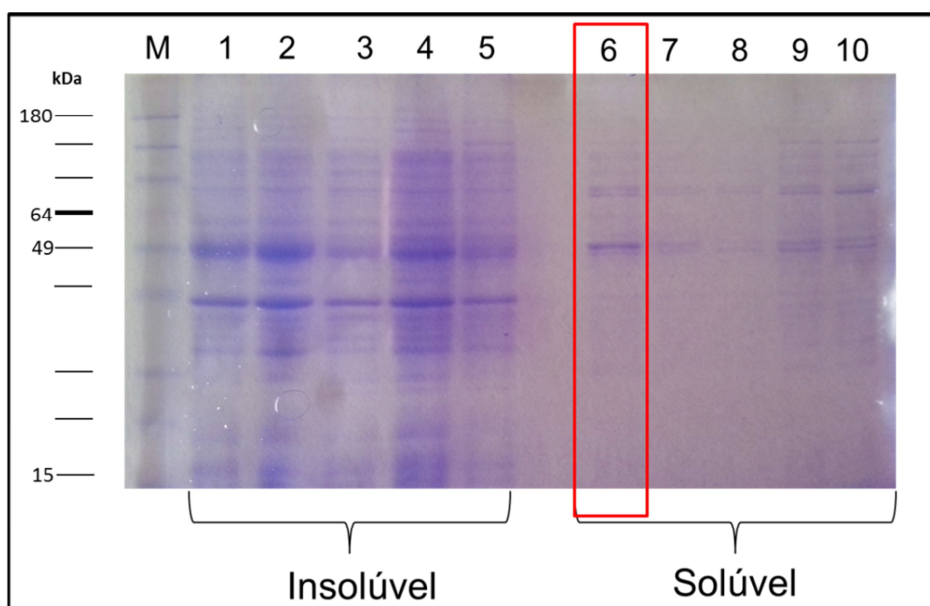


Figura 4.11. Análise do perfil eletroforético por SDS-PAGE das frações provenientes do ensaio de otimização da indução da expressão da proteína TcSub2 K87N. Gel de poliacrilamida 13% corado com Comassie-Blue. M: marcador de massa molecular. 1 a 5: Extratos proteicos totais de bactérias *E. coli*: fração insolúvel, 6 a 10: Extratos protéicos totais de bactérias *E. coli*: fração solúvel. A caixa vermelha sinaliza a o rendimento do ensaio na melhor condição, onde apresentou a maior quantidade de proteína na fração solúvel: 25°C, 4h, D. O. 1,0, 0,5mM de IPTG.

Utilizando a melhor condição estabelecida, realizamos a cromatografia de afinidade e troca iônica com 1L de cultura de bactérias. Após realização das cromatografias, as frações foram analisadas e foi constatado que a quantidade (3mg por litro) e pureza obtidas eram suficientes para os ensaios de bioquímicos e estruturais (Figura 4.12). Foram utilizadas nos ensaios as frações 4 a 6.

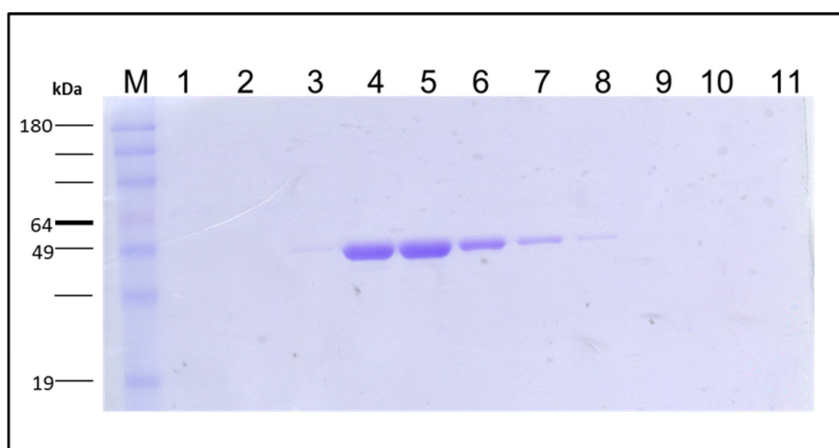


Figura 4.12. Análise do perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações da cromatografia de troca iônica de TcSub2 K87N. Gel de poliacrilamida 13 % corado com comassie-blue correspondentes ao o pico obtido da cromatografia em resina de níquel e troca iônica por FPLC. M: *Benchmark Protein Ladder* (Invitrogen);

4.1.2.3. Produção da proteína recombinante GFP

A proteína GFP, a ser utilizada como controle nos ensaio de atividade ATPase possui 27 kDa e foi purificada seguindo as mesmas condições utilizadas na purificação de TcSub2. A purificação foi realizada em resina de Níquel e obtivemos um rendimento de 30 mg de proteína por litro de cultura. As figuras abaixo mostram o perfil cromatográfico e as frações em gel SDS-PAGE.

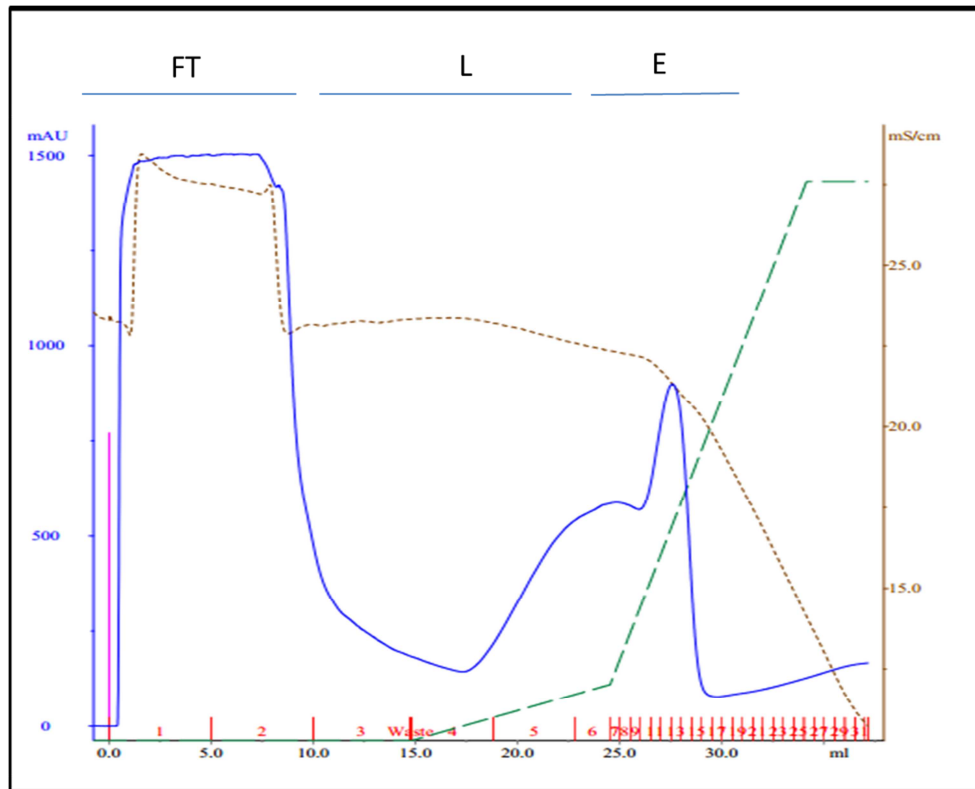


Figura 4.13. Cromatograma da purificação de GFP. A partir de extrato de 1L de cultura, foi feita cromatografia em resina de níquel com sistema Akta FPLC. FT: fração de extrato não ligado na resina; L: Lavados; E: Pico de eluição.

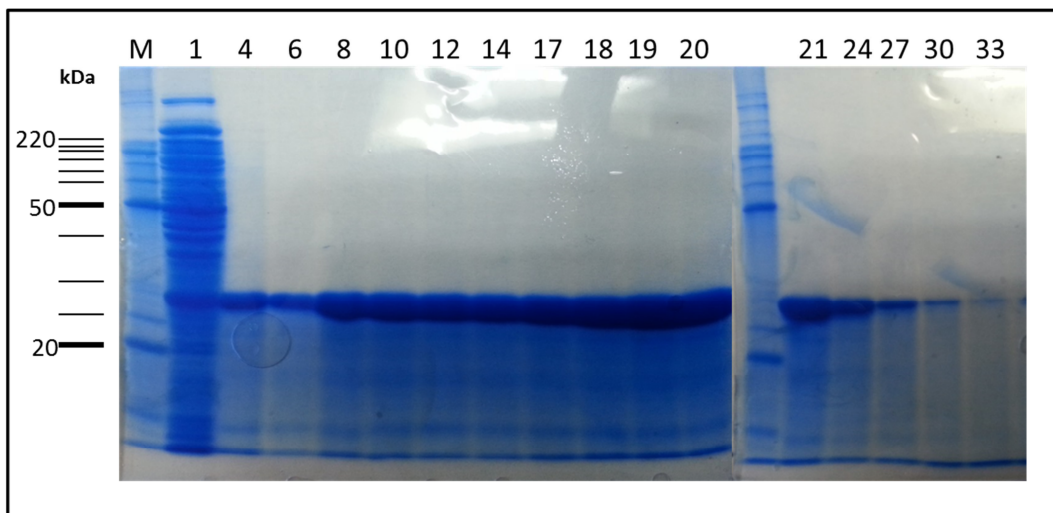


Figura 4.14. Análise do perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia de GFP. Gel de poliacrilamida 13 % corado com comassie-blue as amostras correspondentes as frações do do pico do cromatografia após cromatografia em resina de níquel por FPLC. M: *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

4.2 Ensaio de atividade ATPase

4.2.1. Estabelecimento de curva padrão de fosfato inorgânico

Para análise da atividade ATPase de TcSub2 e TcSub2K87N, foi utilizado o kit de ensaio de atividade ATPase (ATPase assay Kit – Innova Biosciences) que mede a quantidade de fosfato liberada a partir da hidrólise de ATP. Assim, para possibilitar o cálculo da atividade ATPase de uma determinada enzima, se faz necessário, a construção de uma curva padrão de fosfato inorgânico (Pi) onde é possível estimar a concentração de fosfato em função da absorção em 590 nm.

Por isso, antes de realizar os ensaios enzimáticos com as proteínas recombinantes, foi realizada a padronização da curva de fosfato. Para tal, foram utilizadas diferentes concentrações de Pi puro, as quais foi adicionado o tampão de detecção fornecido no kit e distribuídos nos poços de uma placa de elisa conforme descrito no item 3.9.1. A intensidade da absorbância foi medida em leitor de Elisa (Organon Teknika) em comprimento de onda igual a 590 nm (Figura 4.15).

As medidas dos pontos obtidas experimentalmente foram usadas para a construção de uma reta para cálculo da regressão linear. Esta reta apresentou o valor do coeficiente de determinação da regressão (R^2) igual a 0.9971. Esse valor mostra que ao utilizarmos a equação $y=0,0552x + 0,1816$ (onde y é absorbância a 590 nm e x é a concentração de Pi)

podemos estimar a concentração de Pi, com base na absorvância do meio de reação. E devido a determinante de regressão, esse cálculo pode ser feito com 99,71% de confiança.

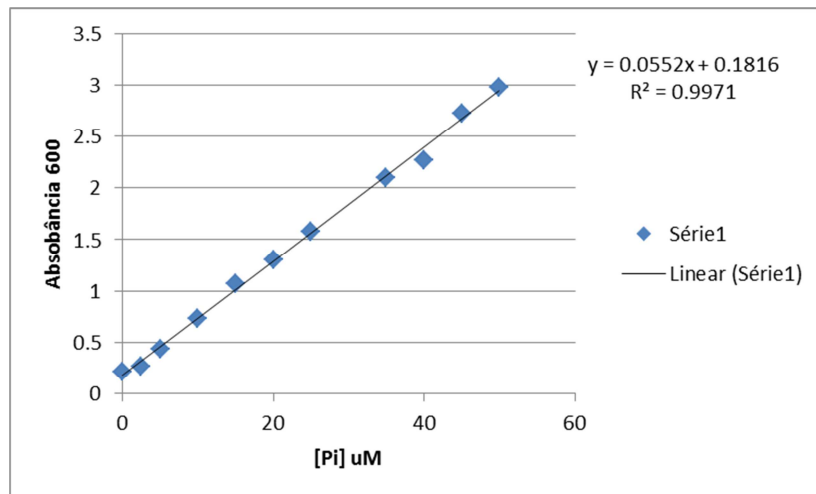


Figura 4.15. Curva padrão de fosfato inorgânico puro e equação da reta.

4.2.2 Ensaio de Atividade ATPase de TcSub2

Para análise da atividade ATPase de TcSub2, utilizamos a proteína recombinante purificada em uma concentração de 0.3 μM com incubação da reação a 22°C e com concentrações variadas de ATP (0,1mM a 2mM). A concentração de ATP hidrolisado foi medido através da concentração de Pi que foi liberada após ação da enzima, conforme gráfico anterior. Os parâmetros (concentração da enzima e ATP) foram definidos com base na atividade ATPase da ortóloga de TcSub2 em mamíferos, a enzima UAP56 (Shen et. al., 2007).

Em bioquímica, cinética de Michaelis-Menten é um dos modelos mais conhecidos da cinética enzimática (Figura 4.16). Esse modelo simples assume que um complexo ES específico (enzima-substrato) é uma condição intermediária necessária na catálise.

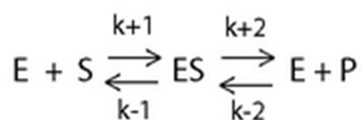


Figura 4.16. Equação de Michaelis-Menten

A enzima E combina com um substrato S para formar um complexo ES com uma taxa constante de $k + 1$. O complexo ES tem dois destinos possíveis. Ele pode dissociar-se em E e

S (taxa constante $k-1$) ou pode produzir o produto P com uma constante de taxa de $k+2$. O complexo ES pode também ser formado a partir de P e E por meio da reação inversa com uma taxa constante $k-2$. Mas quando o equilíbrio da reação é distante de P (o mais baixo nível de energia), a reação inversa é negligenciável ($k-2 \sim 0$).

Quando a velocidade inicial (v_0) é medida a uma concentração constante de enzima e uma concentração crescente de substrato (S), uma representação gráfica da atividade (formação de produto por unidade de tempo) versus a concentração de substrato se encaixa uma hipérbole de acordo com a fórmula: $V_{MAX} * [S] / (K_M + [S])$. Dois parâmetros (V_{max} e K_M) caracterizam essa hipérbole. A velocidade máxima (V_{max}) e a concentração de substrato à qual a velocidade inicial corresponde à metade de V_{max} .

A velocidade máxima revela o número de *turnover* da enzima, que é o número de moléculas de substrato que são convertidas em produto por uma molécula de enzima em uma unidade de tempo quando a enzima está completamente saturada com substrato.

O valor do K_{cat} (constante catalítica) é o número de vezes que cada sítio catalítico de uma enzima converte o substrato em produto, por unidade de tempo. Pode ser calculada dividindo-se a velocidade máxima pela concentração da proteína.

O valor de K_M tem dois significados. Em primeiro lugar, é a concentração de substrato à qual metade dos sítios ativos estão preenchidos, condições de uma catálise significativa. Em segundo lugar, K_M está relacionado para avaliar a força da ligação ES. Quando a taxa de dissociação do complexo ES ($k + 2$) no produto é muito mais baixa do que a dissociação em E e S ($k-1$), o K_M descreve a constante de dissociação do complexo ES, a força do complexo. Um valor de K_M alto significa fraca ligação do substrato para com a enzima, e um valor baixo de K_M significa uma forte ligação.

Para o cálculo de K_M e V_{max} , da proteína TcSub2 a velocidade inicial de reação em diferentes concentrações de substrato foi calculada (Tabela I). A velocidade foi calculada com base na concentração de fosfato liberada (μM) em função do tempo.

	[ATP]				
	0,1 mM	0,25 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM
Vo media	0,199	0,287	0,365	0,464	0,499
Desvio padrão	0,029	0,038	0,044	0,007	0,060

Tabela 4.1. Velocidade inicial de reação média da proteína TcSub2 em diferentes concentrações de substrato.

Ao transferir estes resultados para um gráfico de duplo-recíproco, pode ser calculada então a velocidade máxima (V_{max}) da enzima, que neste caso foi de $0,505 \mu\text{M}/\text{min}$ e o coeficiente de dissociação (K_m), que foi de $0,16 \text{ mM}$ (Figura 4.17). Sabendo-se que foi utilizado $0,3 \mu\text{M}$ de proteína calculamos o valor do K_{cat} em $1,6/\text{min}$. Utilizamos como controle negativo uma mistura de todos os componentes da reação sem a presença da enzima e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As proteínas do tipo DEXD/H-box tem valores de K_{cat} variando de $0,3/\text{min}$ até $600/\text{min}$ e K_m de $0,06$ a 1 mM (CORDIN *et al.*, 2006), portanto os valores encontrados para TcSub2 corroboram com estes dados. O valor da velocidade para a enzima ortóloga de humanos UAP56 é de $0,0063 \mu\text{M}/\text{min}$. (SHEN *et al.*, 2007), ou seja, um valor inferior ao encontrado para TcSub2. Assim sendo poderíamos inferir que a enzima de *T. cruzi* hidrolisa o ATP mais rapidamente que a de humanos.

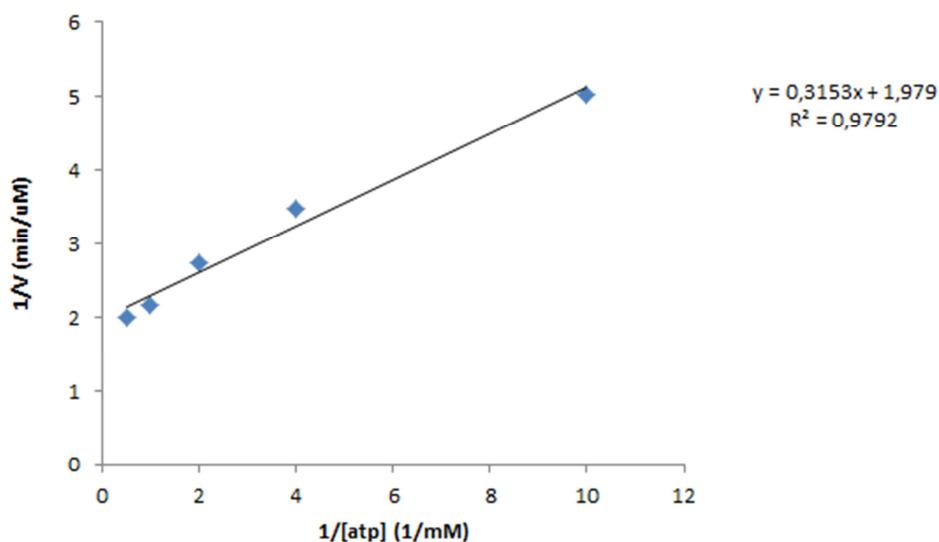


Figura 4.17. Gráfico duplo-recíproco demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima TcSub2 no substrato (ATP). V_{max} e K_m puderam ser calculados com base na equação da reta.

4.3.3. Análise do efeito da mutação K87N na atividade enzimática de TcSub2

Conforme descrito na literatura, o sítio ATPase é essencial entre os ortólogos desta proteína para sua função (CORDIN et al., 2006). Logo, visto que existiu atividade ATPase nos ensaios anteriores, pretende-se aqui verificar se esta atividade enzimática é perdida com as mutações deste sítio. Para tal, um novo ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio anterior utilizando-se a proteína TcSub2 mutada na lisina 87 (K87N) conforme descrito no item 3.9.2. Para análise comparativa a proteína TcSub2 serviu de controle positivo e a proteína GFP de controle negativo. Esta última é uma proteína bem descrita na literatura e comprovadamente não possui nenhuma atividade ATPase (PRASHER *et al.*, 1992; PRASHER, 1995).

Após realização do ensaio, foi verificado que diferentemente de TcSub2 selvagem, nem a proteína GFP, nem TcSub2K87N apresentaram atividade ATPase, já que a quantidade de Pi não aumentou no experimento ao longo do tempo (Figura 4.18).

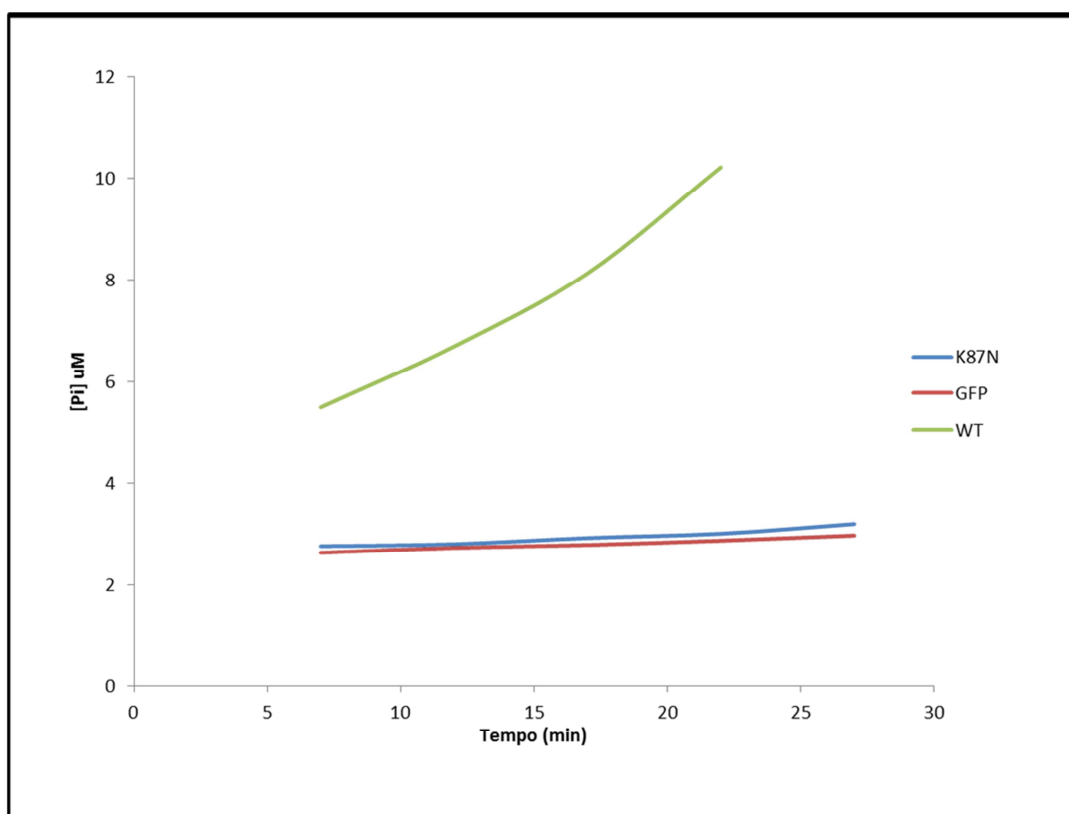


Figura 4.18. Gráfico demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima selvagem, mutada e a proteína GFP no substrato (ATP). A concentração de ATP utilizadas foi de 1μM.

4.4. Modificações estruturais associadas à mutação K87N

Visto a perda de atividade ATPase causada pela mutação, seria relevante investigar se a perda da atividade da enzima foi devido a alterações estruturais e por isso, foram realizados experimentos de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), gel filtração e modelagem molecular.

Através da análise do espectro de dicroísmo circular pode-se verificar o conteúdo de estrutura secundária e inferir o enovelamento da proteína recombinante. A sobreposição dos espectros de TcSub2 e TcSub2K87N (Figura 4.19) mostram que a substituição do aminoácido Lisina por uma Asparagina não resultou em alterações significativas no conteúdo de estrutura secundária da proteína. Observa-se uma pequena alteração em comprimentos de onda menores que 208 nm, provavelmente devido a alterações locais de estruturas α -hélices e alças (*coils*).

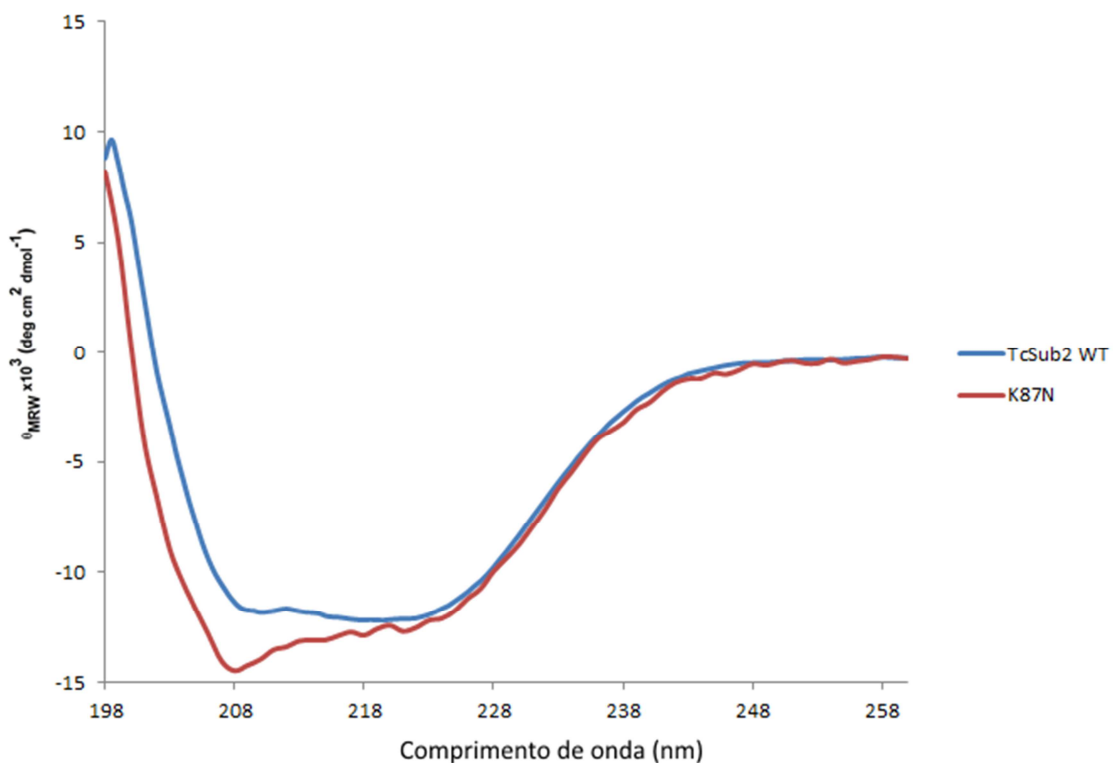


Figura 4.19. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar estrutura terciária das proteínas TcSub2 selvagem e mutada.

Para avaliar se ocorreram mudanças no estado oligomérico da proteína em solução decorrentes da mutação K87N, realizamos uma cromatográfica de gel filtração com TcSub2 selvagem e TcSub2 K87N.

A cromatografia de gel filtração é uma técnica amplamente utilizada para a purificação e determinação do raio hidrodinâmico de polímeros, copolímeros, nanopartículas e proteínas (MORI; BARTH, 1999). Esse método baseia-se na separação das partículas em função do seu tamanho e forma. Esse processo de separação ocorre em colunas empacotadas com material poroso (poros de vários tamanhos) como sílica gel, gel de poliestireno, grânulos de vidro, entre outros (MORI; BARTH, 1999). Moléculas maiores tem maior dificuldade de difusão para o interior dos poros do gel e, portanto, são eluídas mais rapidamente pela fase móvel (solvente). Já as moléculas menores têm maior facilidade de penetrar nos poros do gel, fazendo dessa forma um trajeto mais longo pela coluna e, conseqüentemente, sendo eluídas mais tardiamente.

Como observado na tabela 2, ambas as proteínas foram eluídas com o mesmo volume de eluição e portanto, possuem o mesmo estado oligomérico em solução. Além disso, através do volume de eluição foi possível determinar que a proteína encontra-se na forma monomérica em solução, uma vez que o volume de eluição da proteína corresponde ao volume de eluição de macromoléculas de 49 kDA. É interessante observar que apesar de ambas proteínas serem monoméricas, a mutação K87N provavelmente afeta a distância entre domínio I e II visto que a molécula possui um raio hidrodinâmico maior que TcSub2 selvagem, tal fato é evidenciado pelo menor volume de eluição.

	Ve (mL)	MW (kDA)
TcSub2 K87N	15,57	44,7
TcSub2 Selvagem	16,08	40,1

Tabela 4.2. Volume de Eluição e Massa molecular estimada de TcSub2 Selvagem e TcSub2 K87N. A Massa molecular foi estimada com base na comparação entre o volume de eluição das proteínas em estudo e uma curva de calibração obtida com proteínas que massa molecular conhecidas.

A estabilidade térmica das proteínas selvagem e mutada também foi avaliada utilizando-se a espectroscopia de dicroísmo circular. Espectros de CD foram coletados em diferentes temperaturas e com o aumento da temperatura, nota-se uma mudança de perfil nas

curvas, devido à desnaturação da proteína (Figura 4.20). Através do cálculo da temperatura de *melting* (T_m), temperatura onde 50% da amostra encontram-se enovelada, é possível comparar a estabilidade térmica das duas proteínas. Conforme demonstrado na figura 4.20, o cálculo da T_m para cada proteína foi obtido e pode-se verificar que a proteína mutada é mais estável do que a selvagem, pois apresenta T_m de 55 graus, enquanto a T_m de TcSub2 selvagem é de 50 graus.

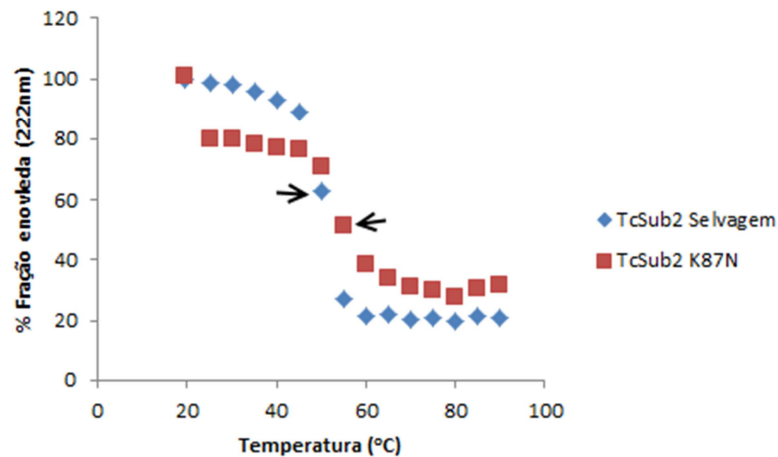


Figura 4.20. Curvas de desnaturação térmica de Tcsub2 selvagem e Tcsub2 K87N. Variou-se a temperatura de 20 a 90 graus e detectou-se o sinal de dicroísmo em 222 nm.

Os espectros de dicroísmo circular mostraram pequena alteração de estrutura secundária de TcSub2K87N em relação à TcSub2 selvagem. Além disso, a mutação também altera a estabilidade térmica da proteína e pequena modificação no raio hidrodinâmico foi observado por cromatografia de exclusão molecular. A fim de investigar quais as possíveis alterações estruturais advindas com essa mutação, um modelo tridimensional foi construído de Tcsub2K87N e TcSub2.

Para que a hidrólise enzimática aconteça, mudanças estruturais acontecem nas proteínas DEAD box (Shi *et al*, 2004) A estrutura de UAP56 humana (pdb id: 1XTJ e IXTI) mostra que o loop em vermelho é descolado após a hidrólise de ATP. A sobreposição dessa estrutura com os modelos de TcSub2 e Tcsub2K87N nos mostram que antes da hidrólise do ATP, a lisina 87 está posicionado à uma distância de 2.9Å de uma molécula de Magnésio (Mg^{2+}) que mimetiza a posição do fosfato gama do ATP que será hidrolisado. Após a hidrólise, o posicionamento desta lisina conservada é de 2.9 Å de fosfato beta do ADP (Figura 4.21).

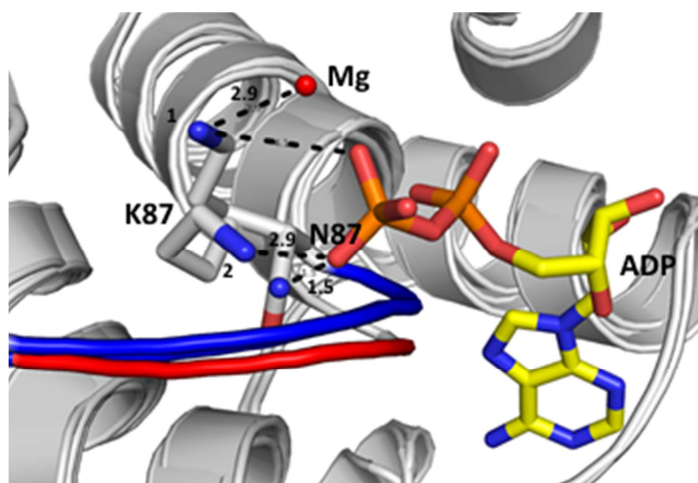


Figura 4.21. Sobreposição dos modelos estruturais de TcSub2 selvagem e TcSub2 K87N. Loop em vermelho modelado com base na estrutura de UAP56 humana anterior a hidrólise de ATP (pdb ID: 1XTJ). Loop em azul modelado com base na estrutura de UAP56 humana após a hidrólise de ATP (pdb ID: 1XTI). 1- indica posicionamento de K87 anterior à hidrólise de ATP, 2 – indica o posicionamento de K87 após a hidrólise de ATP.

A substituição desse resíduo por uma Asparagina parece atrapalhar o posicionamento e ligação de ATP na sua posição correta. Caso o ATP se posicione na mesma posição encontrada nas estruturas cristalográficas previamente resolvidas (PDB ID: 1XTJ), o rotâmetro de N87 mais distante de ATP estaria a uma distância de 1.5Å do fosfato beta do ADP. Essa proximidade caracteriza uma sobreposição e não é encontrada na natureza devido às forças de repulsão de Van der Waals. Portanto, a modificação K87N pode afetar a ligação de ATP e sua hidrólise por não permitir seu posicionamento correto no sítio catalítico.

4.5. Influência de RNAs na atividade ATPase.

A proteína TcSub2 é ortóloga a outras conhecidas RNAs helicases (como a UAP56 de humanos, Sub2 de leveduras e Pfu52 de *Plasmodium falciparum*) que estão envolvidas no transporte de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma (KOTA *et al.*, 2008; NEWO , 2014). Por este motivo, decidiu-se determinar a influência de diferentes tipos de RNAs na atividade de TcSub2, visto que existem dados de que essa interação altera a atividade de outras ATPases (CORDIN, *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2004), assim como a afinidade da reação de quebra do ATP. Foi realizado então um ensaio similar ao descrito no item 4.2.2, acrescentando-se os diferentes tipos de RNAs às reações e calculando a concentração de Pi liberado em função do tempo (Figura 4.22). As condições utilizadas neste trabalho foram

similares as utilizadas por SHEN *et al.* em 2007, quando trabalhou com a proteína UAP56, a ortóloga a TcSub2 em humanos.

Conforme a figura 4.22, foi verificado que a adição de RNAs aumenta a quantidade de Pi liberado após a ação da enzima. Ainda, constatamos que todos os 3 tipos de RNAs testados tiveram um impacto similar na atividade da proteína.

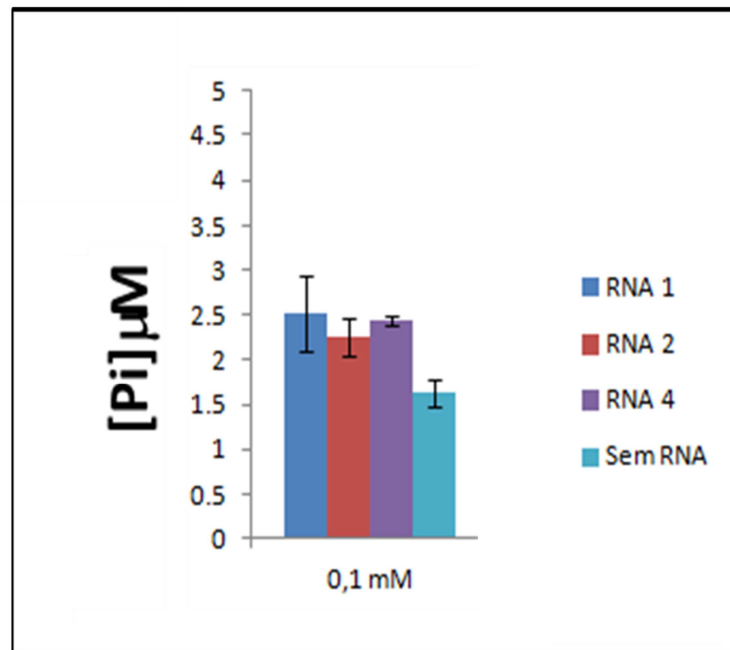


Figura 4.22. Gráfico demonstrando liberação de fosfato após ação da enzima selvagem na presença de 3 diferentes tipos de RNA

4.5.1 Avaliação da interação RNA-TcSub2

Sabe-se que a estabilidade das proteínas está relacionada à sua energia livre de Gibbs durante a desnaturação (ΔG), que é temperatura-dependente. Desta maneira, quanto mais alta a temperatura, menor a estabilidade proteica ($\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$), assim, ΔG encontra-se igual a zero quando as concentrações da proteína em conformação e desnaturadas são iguais, sendo que, neste ponto encontra-se a temperatura de fusão (T_m , melting temperature) (BEADLE, *et al.*, 1999). Quando um composto se liga a uma proteína, gera um aumento na energia livre do complexo, resultando consequentemente em um aumento da T_m .

A fim de demonstrar a interação RNA-TcSub2 e verificar se essa interação confere maior estabilidade à proteína, foram realizados experimentos de desnaturação térmica na presença e ausência dos 3 tipos de RNA utilizados nos ensaios enzimáticos. A sobreposição das curvas de desnaturação indicam que TcSub2 interage com todos os RNAs que

influenciam positivamente em sua atividade ATPase (Figura 4.23). Essa interação é indicada pelo aumento da estabilidade monitorada pelo aumento da T_m . Além disso, parece que a força de interação é a mesma visto que o aumento da T_m é similar na presença de quaisquer dos três RNAs, conforme demonstrado na figura 4.23.

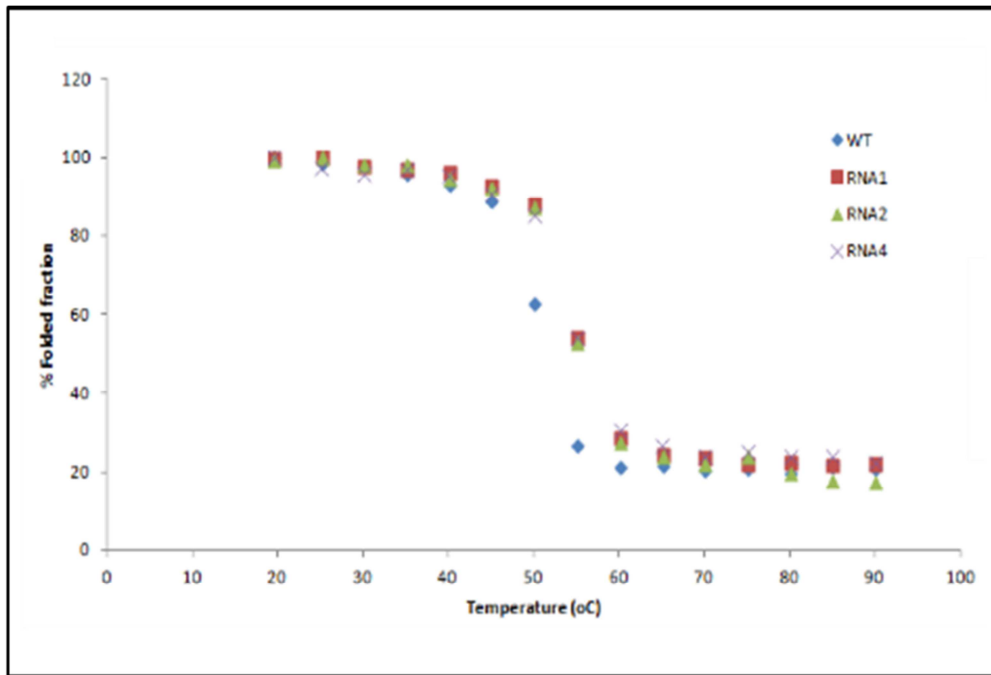


Figura 4.23. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar a estabilidade da estrutura terciária da proteína TcSub2 selvagem na presença de diferentes tipos de RNA. Variou-se a temperatura de 10 a 90 graus. Os diferentes RNAs foram testados na presença da proteína TcSub2 e estão distribuídos no gráfico conforme legenda.

Para avaliar se a interação com o RNA resulta em alterações conformacionais de TcSub2, um experimento de dicroísmo circular da proteína na presença do RNA foi realizado. A sobreposição dos espectros de TcSub2 na presença de RNA obtidos experimentalmente com o espectro teórico (resultante do somatório dos espectros de TcSub2 sozinha e RNA sozinho, ambos obtidos experimentalmente) indica que a associação de TcSub2 com RNA não resulta em modificações ao nível de estrutura secundária, visto que as curvas são muito similares (Figura 4.24). Pequenas alterações a nível de estrutura do tipo α (aumento do sinal em 222 nm) são observadas em TcSub2 na presença de RNA4 (Figura 4.24C).

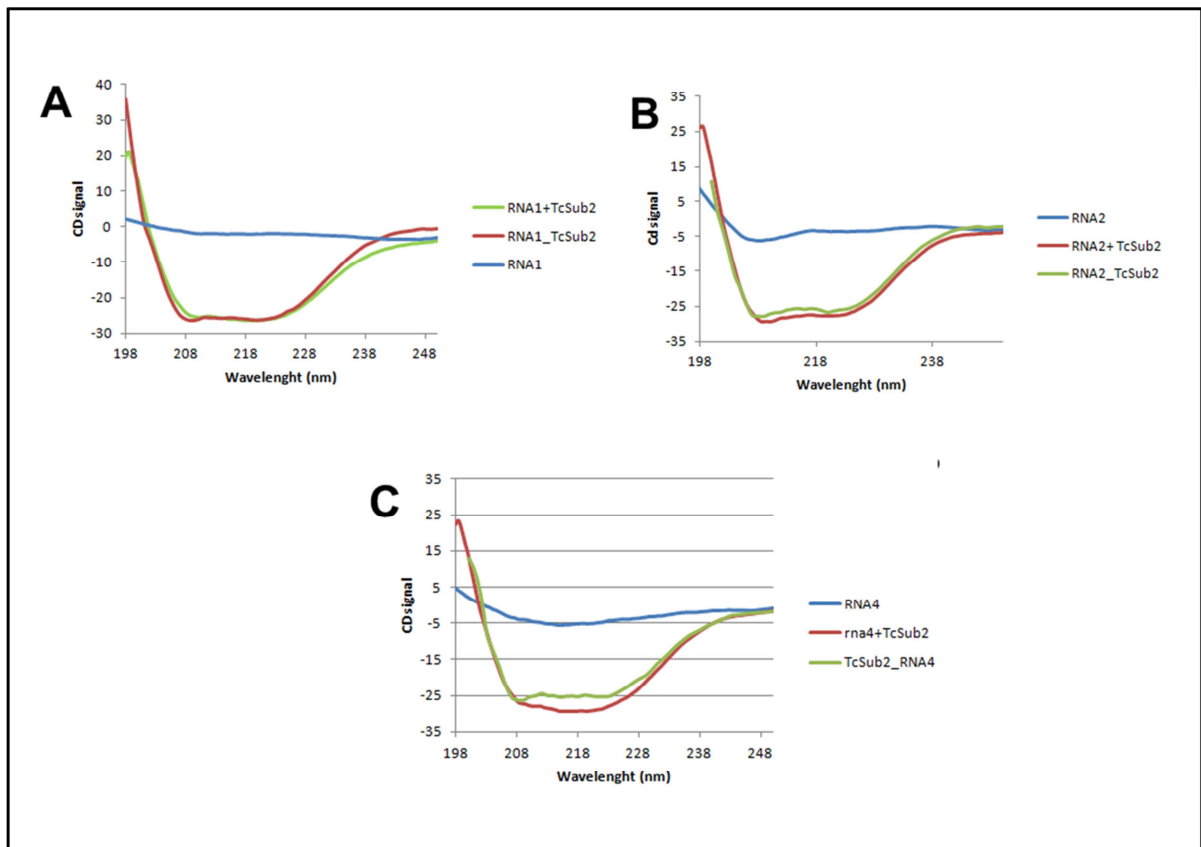


Figura 4.24. Gráfico demonstrando experimento de Dicroísmo Circular para avaliar estrutura secundária da proteína TcSub2 selvagem na presença de diferentes tipos de RNA. A linha Azul representa os perfis do RNA sozinho, a linha verde representa a deconvolução teórica dos perfis obtidos pela leitura da proteína e do RNA em separado, a linha vermelha representa o espectro da proteína e do RNA na mesma amostra. A – RNA 1, B – RNA 2, C – RNA 4.

Para aprofundar os conhecimentos dos mecanismos de interação e ativação de TcSub2 por RNA é preciso a determinação estrutural e estudos de dinâmica molecular dessa proteína na presença de RNAs ou compostos mimetizadores. No entanto, isso poderá ser abordado em estudos futuros. É importante ressaltar que esse trabalho é o primeiro a demonstrar que o sítio ATPase é essencial para a atividade da enzima TcSub2, sua interação com diferentes tipos de RNA bem como o aumento da estabilidade da proteína e também da velocidade de hidrólise de ATP na presença de RNA.

4.6 Avaliar se o gene TcSub2 tem a mesma função que o seu ortólogo em *T. brucei*.

Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que o silenciamento do gene da proteína TbSub2 (ortóloga a TcSub2) por RNAi em *T. brucei*, era letal ao parasita, pois os após 72 horas não eram mais viáveis e acabavam morrendo. Além disso, foi demonstrando também que o mRNAs acumulavam-se no núcleo (SERPELONI *et al.*, 2011), confirmando assim o papel desta proteína como componente essencial da exportação de mRNA em tripanossomas. Contudo, neste mesmo trabalho foi visto que TcSub2 não complementa a funções de Sub2 em mutantes de levedura, sugerindo que cada organismos desenvolveu componentes ou mecanismos peculiares nesta via. Assim, mesmo que *T. brucei* seja mais próximo filogeneticamente de *T. cruzi*, existem diferenças significativas quanto a biologia molecular destes parasitas como a utilização da variação antigênica (VSG) para evasão do sistema imune do hospedeiro e a síntese de mRNAs por RNA Pol I (RUDENKO, 2011; MAREE; PATTERTON, 2014). Sendo assim, a função estabelecida por ensaios em *T. brucei*, apesar da alta conservação de sequência, não pode ser diretamente atribuída para *T. cruzi*. Logo, a idéia desta etapa foi estabelecer um sistema de complementação funcional entre espécies mais próximas filogeneticamente. Assim, seria possível avaliar se a expressão do gene de proveniente de TcSub2 seria suficiente para reverter o fenótipo causado pelo silenciamento do gene de *T. brucei*, isso além de corroborar com conservação da função entre as proteínas de *T. brucei* e *T. cruzi*, também poderia ser usados para avaliar a conservação da função de proteínas ortólogas de outras espécies de Tripanossomatídeos e outros grupos de parasitas.

Para o estabelecimento do ensaio, foi necessária a obtenção da linhagem de *T. brucei* capaz de silenciar o gene ortólogo de TcSub2, além de construir um vetor de complementação contendo o gene de *T. cruzi*.

4.6.1 Obter populações transfectantes de *T. brucei* para estabelecer os ensaios de complementação funcional.

Um clone da cepa 29-13 de *Trypanosoma brucei* que permite que o parasito silencie o gene de TbSub2 havia sido previamente obtido (SERPELONI *et al.*, 2011) no entanto, quando usamos este clone, não conseguimos reproduzir os fenótipos decorrentes do silenciamento de TbSub2 descritos. Por isso, foi necessário obter novamente da linhagem capaz de induzir RNAi para TbSub2.

Logo, uma nova transfecção da cepa 29-13 de *T. brucei* utilizando o vetor p2T7-177TbSub2a, que confere ao parasito a capacidade de silenciar o gene TbSub2 foi realizada. A clonagem dos transfectantes foi feita através da metodologia de *Cell Sorting* em citometria de fluxo. Foram selecionados 9 clones através da adição do antibiótico de seleção Fleomicina. Foram testadas diferentes concentrações de fleomicina para seleção, assim, no fim, foram obtidos 5 clones cultivados na concentração de 5ug/ml e 4 clones na concentração de 10ug/ml.

Uma triagem inicial nestes clones foi realizada induzindo-se o RNAi por 48 horas pela a adição de tetraciclina na concentração de 2ug/ml. O silenciamento foi verificado pela detecção da proteína TcSub2 através da técnica de imunofluorescência indireta. Como visualizado na figura 4.25, os clones 1, 2, 11, 12, 13 e 14 tiveram diminuição considerável na fluorescência de TbSub2 após indução de RNAi, como esperado. Contudo os clones 3, 4 e 5 não apresentaram diferença significativa (dados não mostrados).

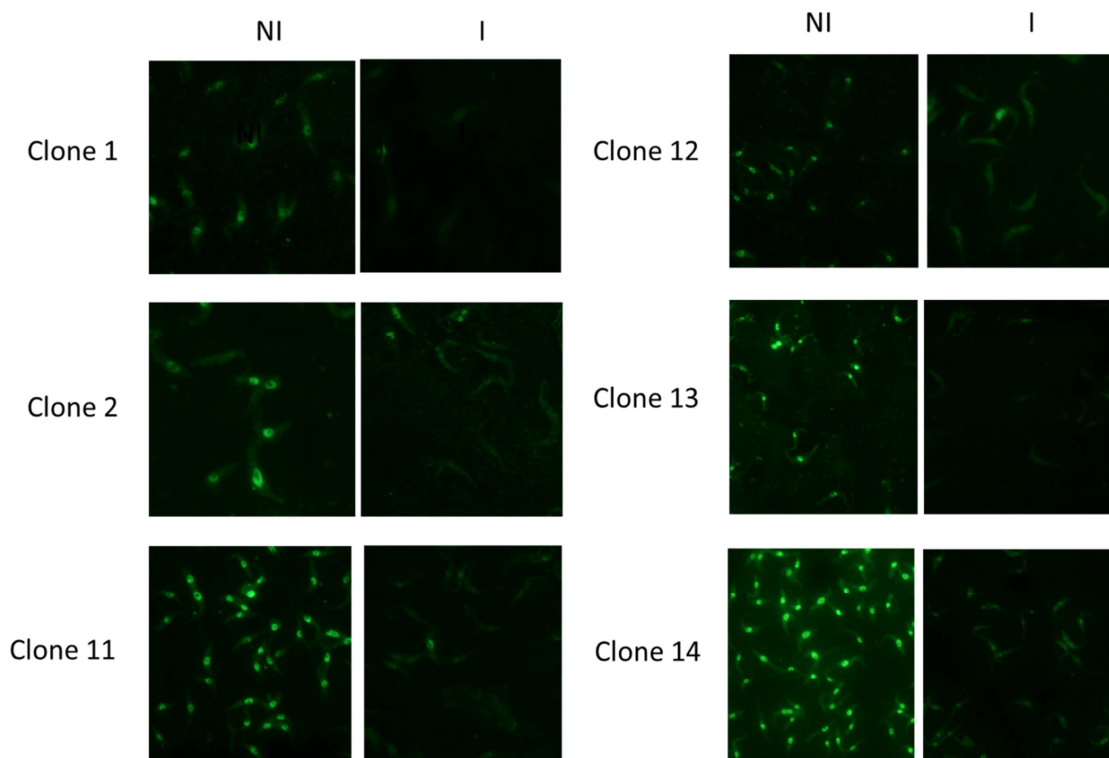


Figura 4.25. Análise de imunofluorescência para avaliar a diferença da expressão de TbSub2 nos clones com RNAi induzido. Anti-corpo utilizado: anti-Sub2 conjugado com alexa 488. NI: controle dos clones onde o RNAi não foi induzido. I: Clones adicionados de tetraciclina.

Paralelamente, foi realizado um ensaio de Western Blot para confirmar a diminuição dos níveis da proteína TcSub2 após indução do RNAi e confirmar a eficiência de silenciamento dos clones previamente selecionados por Imunofluorescência (Figura 4.26).

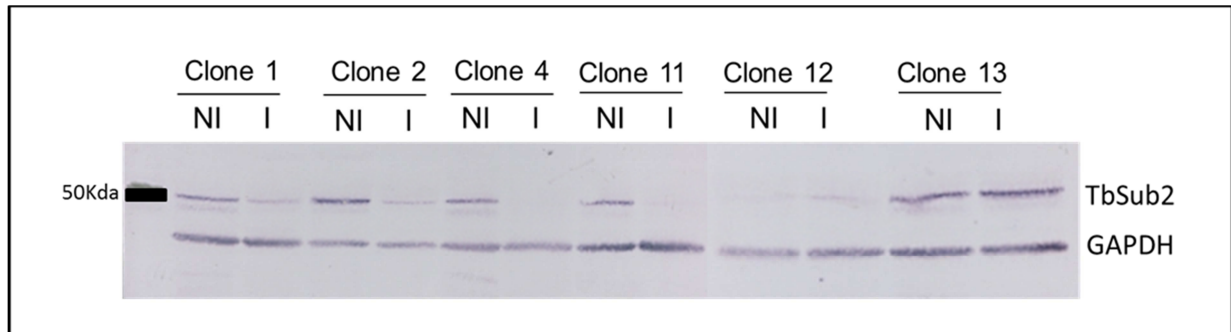


Figura 4.26: Perfil de decaimento dos níveis de TcSub2 nos clones transfectados. Diferentes clones de parasitas transfectantes forma cultivados em meio contendo ou não tetraciclina. I: amostra cujo o RNAi foi induzido por tetraciclina; NI: amostra cujo o RNAi não foi induzido. Wester blot utilizando-se anticorpo α -Sub2 e α -GAPDH revelado com enzima fosfatase alcalina, por detecção cromogênica. A proteína GAPDH foi utilizada como normalizadora.

A partir destes resultados apresentados foi observado que os clones 1, 2 e 11 apresentaram maior diferença na quantidade de proteína entre a amostras de parasitas com RNAi não induzida e induzido. Por isso, estes clones foram selecionados e um novo ensaio para obtenção de curva de crescimento após a indução do silenciamento visando a avaliação da viabilidade dos parasitos, foi realizado. Para isso, foi feito um inóculo inicial de 5.10^5 parasitas por ml com adição de tetraciclina para a indução do RNAi. Esta cultura foi incubada ao longo de 96 horas e as contagens de parasitas foi feita a cada 24h. As curvas de crescimento dos parasitas induzidos e não induzidos são mostradas na figura 4.27. Como pode ser observado, os resultados obtidos com as novas linhagens mostram que indução do RNAi afetou a multiplicação do parasitas já após 24h. Este tipo de resultado reproduz o que foi obtido anteriormente por Serpeloni e colaboradores (2011).

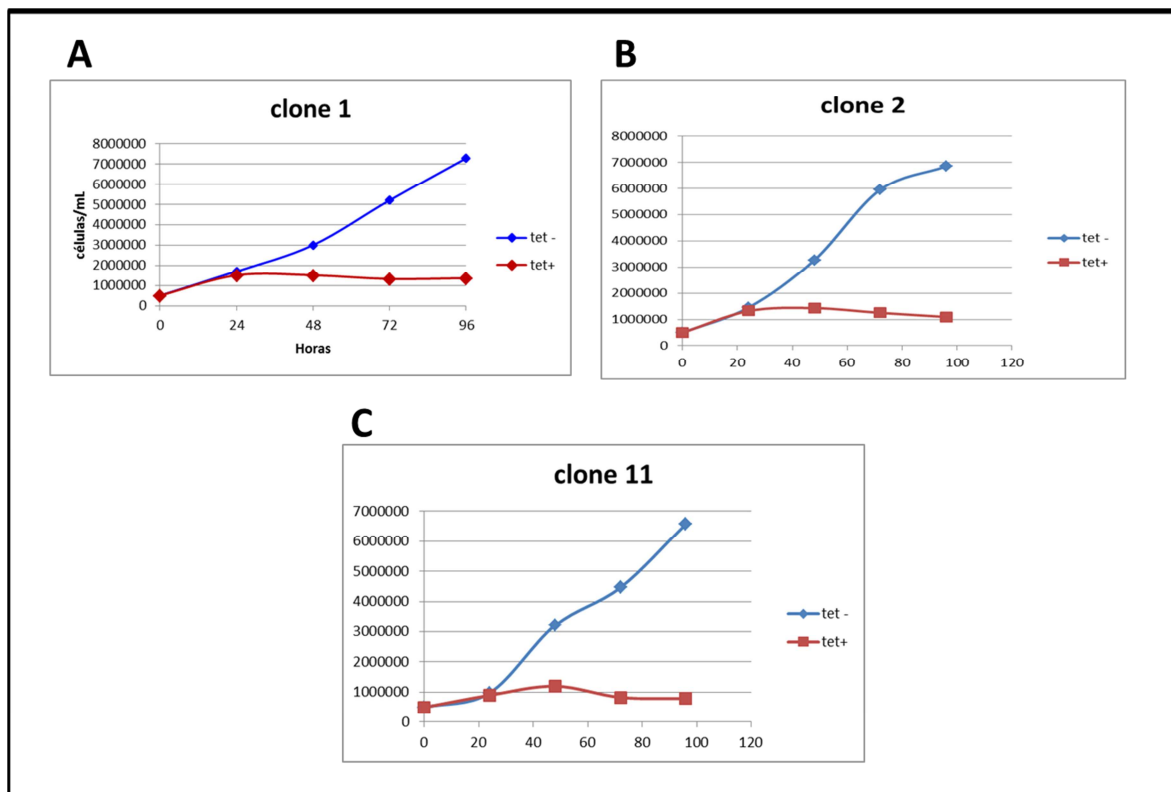


Figura 4.27: Curva de crescimento dos clones transfectados com o vetor p2T7-177RNAi. Linha azul culturas não induzidas com tetraciclina. Linha vermelha: culturas induzidas.

O próximo passo, após a obtenção do clone que silenciava o gene da proteína TbSub2 em *T. brucei*, foi a construção do vetor de complementação pAD74 contendo a sequência do gene de *T. cruzi* selvagem e da sequência mutada (K87N). Foram realizadas as amplificações destes genes por PCR utilizando uma enzima polimerase de alta fidelidade (*Taq DNA Polimerase Platinum Hi-Fi*) e os iniciadores descritos no ítem 3.12. Foram desenhados oligonucleotídeos “forward” contendo sequência de histidinas para codificar a etiqueta His. Como molde foram utilizados o DNA genômico de *T. cruzi* cepa Dm28c para amplificação da sequência do gene selvagem e o vetor pDONRTM221TcSub2K87N previamente construído como molde para a amplificação do gene mutado. Assim, para cada sequência (selvagem e mutada), foram obtidos dois tipos de amplificação, uma com os iniciadores “forward” contendo os códons da etiqueta de histidinas e outro sem os códons de histidina. . As amplificações foram visualizadas em géis de agarose (Figura 4.28).

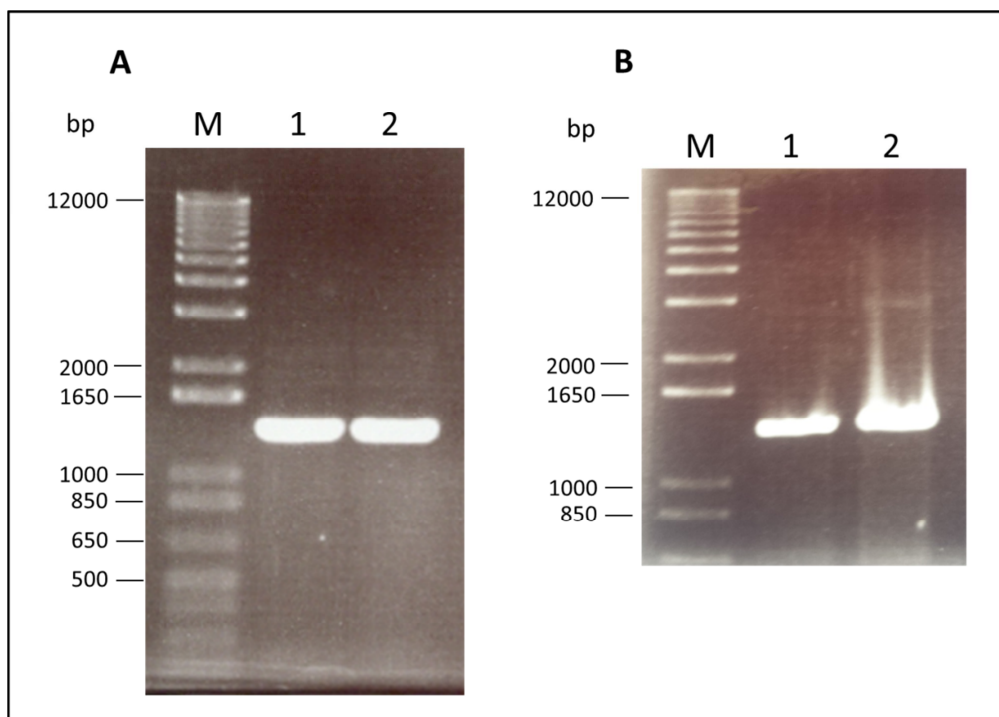


Figura 4.28. Análise do perfil eletroforético dos produtos de PCR provenientes do gene TcSub2. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. A – Amplificação da sequência contendo os códons da etiqueta de histidina. B- Amplificação da sequência sem a os códons da etiqueta de histidina. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. 1: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 selvagem, 2: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 mutado (K87N).

Os produtos amplificados foram utilizados para clonagem em pGEM *T-easy*. A confirmação da clonagem e seleção de alguns clones de bactérias foi realizada conforme descrito no item 3.6. Os plasmídeos foram extraídos utilizando-se o *Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Para analisar a presença do inserto, os plasmídeos foram usados como molde em reações de PCR para todos os casos. A confirmação da presença dos insertos está demonstrada na figura 4.29.

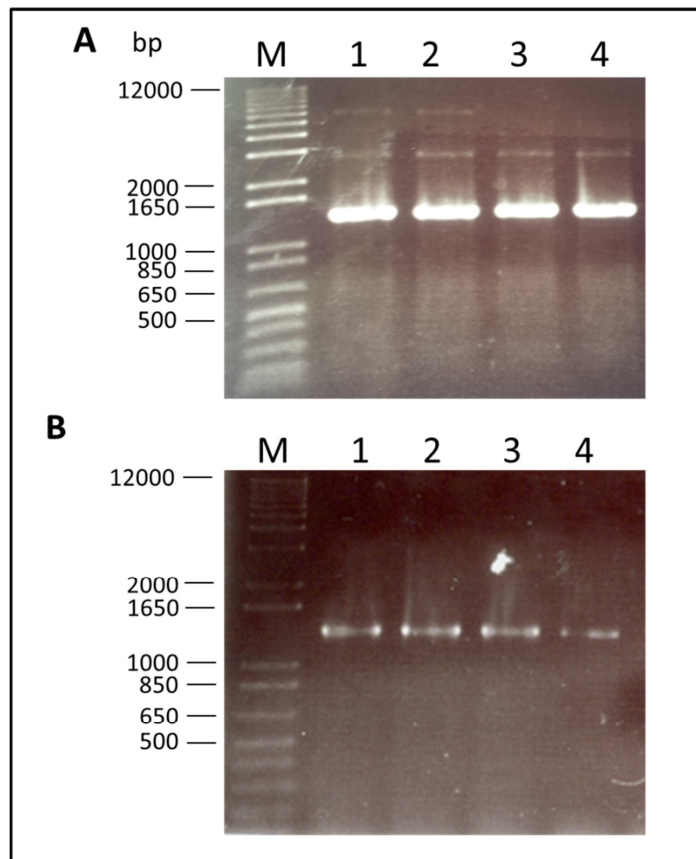


Figura 4.29. Análise do Perfil eletroforético dos produtos de PCR para clonagem das sequencia selvagem e mutada do gene TcSub2 em vetor pGEM T-easy. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. A – Insertos construídos com etiqueta de histidina. B- Inseto construído sem a etiqueta de histidina. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. 1 e 2: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 selvagem, 3 e 4: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2K87N.

Após sequenciamento, foi selecionado então um clone de cada um dos 4 clones testados (selvagem e K87N/ com ou sem a etiqueta de histidina) e realizada então a digestão dos vetores purificados com a enzima Bstz17, para liberação do inserto e posterior clonagem no vetor de complementação pAD74. O observado foi que os vetores contendo os insertos de TcSub2 anexado a etiqueta de histidina não foram digeridos completamente e não houve liberação dos mesmos. Já nos vetores que continham o inserto sem a etiqueta, houve a liberação dos mesmos (Figura 4.30).

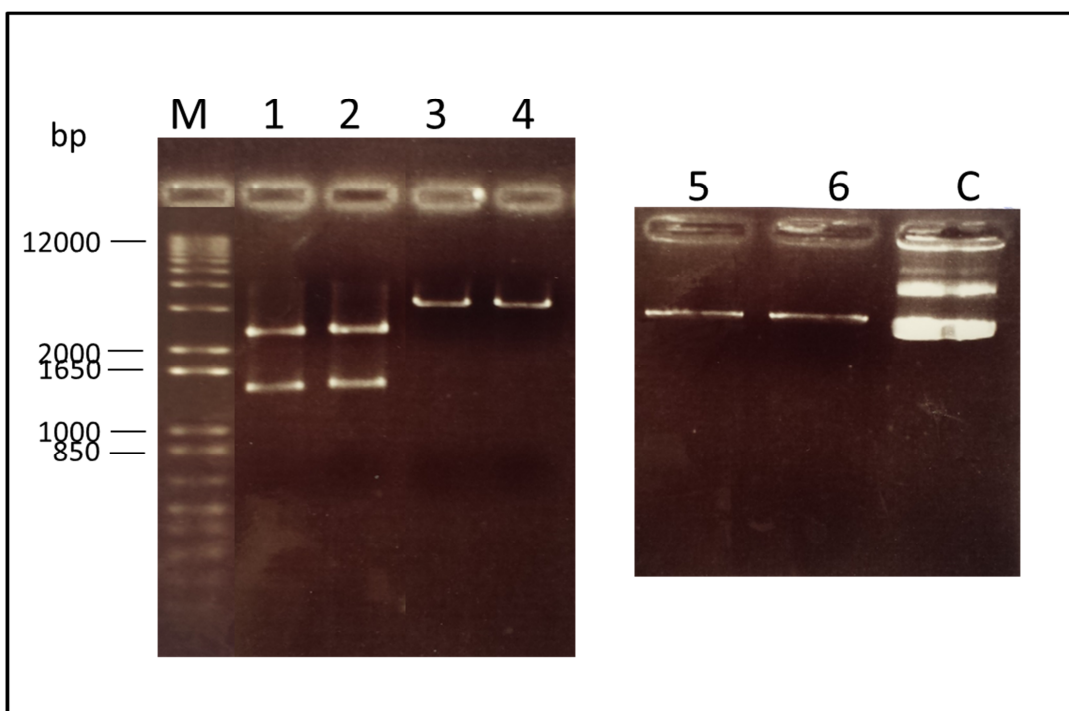


Figura 4.30. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmação da digestão dos vetores pGEM T-easy, contendo o gene TcSub2. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. 1: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 selvagem sem etiqueta de histidina, 2: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 mutado sem etiqueta de histidina, 3 e 4: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 selvagem com etiqueta de histidina, 5 e 6: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 mutado com etiqueta de histidina, C: Controle - pGEM T-easy não digerido.

Foram realizadas várias tentativas de clonagem do inserto com a etiqueta de histidina e com outras etiquetas, porém em nenhuma delas foi possível liberar o inserto após digestão das construções em pGEM T-easy. Dessa forma, os insertos correspondentes as sequências sem etiqueta foram utilizados para a clonagem em vetor de complementação pAD74. A confirmação dos clones positivos está na figura abaixo (figura 4.31). Todos os clones analisados tiveram o inserto amplificado.

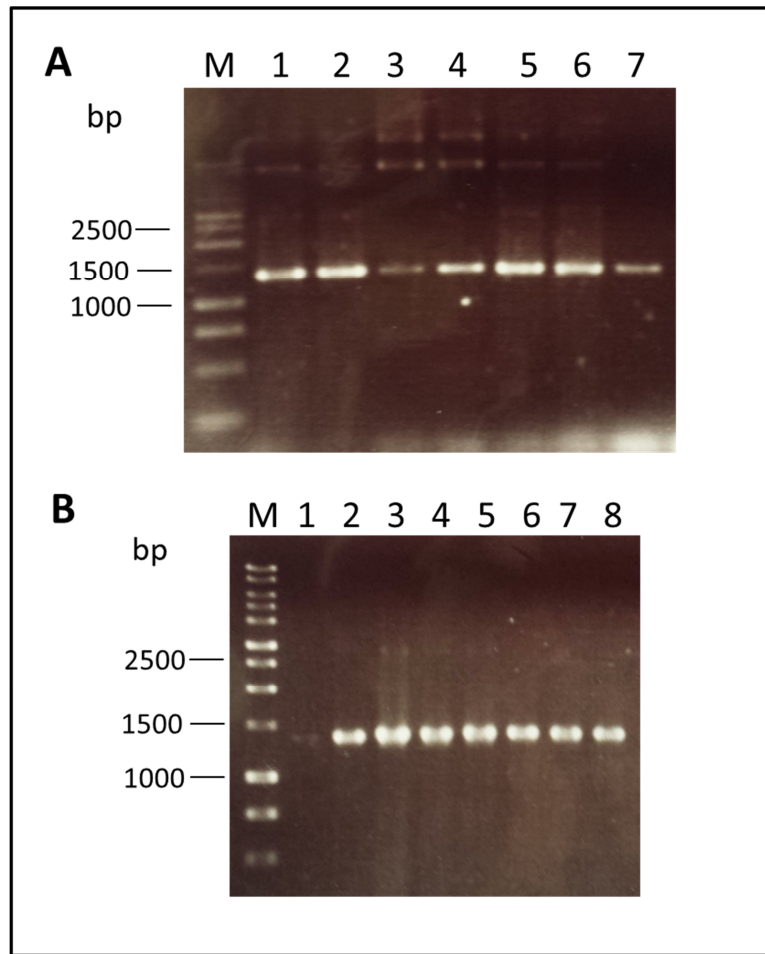


Figura 4.31. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para confirmação da presença do gene TcSub2 no vetor pAD74. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. M: marcador de massa molecular representado em pares de bases. A: Clones contendo vetor + inserto TcSub2 selvagem, B: Clones contendo vetor + inseto TcSub2 mutada. 1 a 8: produto de PCR correspondente ao gene TcSub2 provenientes de diferentes clones de bactérias *E. coli* Dh5 α .

Os vetores foram transfectados em *T. brucei* cepa 29-13 com a habilidade de silenciar o gene TbSub2 conforme o descrito no item 3.7. Além destes o vetor pAD74 contendo o vetor sem o inserto (com GFP, conforme mapa do vetor) também foi transfectado para ser utilizado com controle negativo. Os parasitos foram selecionado com basticidina, resistência conferida pelo vetor pAD74. Após seleção dos transfectantes estes foram congelados utilizando-se 10% de glicerol em meio LIT suplementado com 30% de SBF.

A fim de confirmar se a inserção do vetor de complementação mudaria o perfil de crescimento do parasito, realizamos uma curva de crescimento no parasito que continha o vetor sem inserto (contendo GFP) e foi verificado que este não atrapalha o crescimento, além disso a GFP não altera este fenótipo no parasito após indução com tetraciclina. Assim sendo

este transfectante pode ser utilizado como controle negativo nos ensaios de complementação funcional (Figura 4.32).

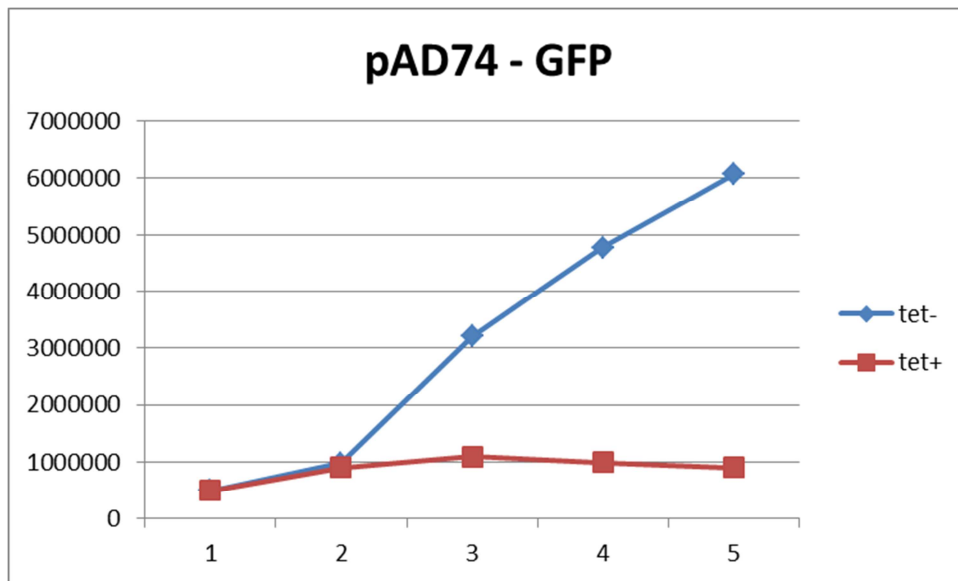


Figura 4.32: Curva de crescimento dos clones transfectados com o vetor p2T7-177RNAi e com o vetor de complementação pAD74 - GFP. Linha azul culturas não induzidas com tetraciclina. Linha vermelha: culturas induzidas.

O próximo passo seria realizar os ensaios de complementação, porém devido aos problemas gerados na construção do vetor (não foi possível digerir o inserto contendo a etiqueta de histidina, que era prioridade) não foi possível realizar os ensaios a tempo. Porém as ferramentas estão prontas e os ensaios serão realizados no intuito de estabelecer um sistema de complementação funcional que possa ser utilizado posteriormente para testar genes ortólogos de outros tripanosomatídeos e assim tentar estabelecer um padrão entre estes organismos.

5. DISCUSSÃO

A ausência de controle gene-específico durante a transcrição em tripanossomatídeos torna os eventos pós-transcricionais importantes para a regulação da expressão gênica nestes organismos. Dentre as etapas pós-transcricionais, a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma ainda é carente de informações quanto ao seu mecanismo. Há poucas evidências funcionais sobre proteínas envolvidas neste evento e muitos dos dados publicados estão relacionados com estudos apenas em organismos-modelo (KÖHLER; HURT, 2007). Em tripanosomatídeos ainda não se tem estudos desvendando os processos pelo qual o mRNA maduro consegue atravessar a membrana nuclear. As várias diferenças na expressão gênica destes organismos nos leva a acreditar que o processo de exportação de mRNA também tenha suas peculiaridades quando se comparado ao dos outros eucariotos. Levando isto em consideração, este estudo teve como objetivo estudar a função e estrutura de TcSub2, uma proteína essencial para exportação de mRNA em tripanosomatídeos e altamente conservada ao longo da filogenia de eucariotos (SERPELONI *et al.*, 2011).

A proteína TcSub2 é uma proteína RNA helicase da família DEAD box. Esta família é formada por proteínas que normalmente utilizam ATP como fonte de energia. Por isso o primeiro passo foi verificar se a proteína TcSub2 tinha este sítio ATPse funcional. Para tanto, foram realizados ensaios de atividade com o auxílio do kit ATPase Kit Assay (Innova Biosciences), que mede a liberação de fosfato via reação colorimétrica, quando é misturada a proteína e ATP. Constatamos que a proteína TcSub2 tem seu domínio ATPase funcional com velocidade máxima de ação de $0.505\mu\text{M}/\text{min}$, coeficiente de dissociação (K_m) de $160\mu\text{M}$ e o valor de *turned over* (K_{cat}) de $1,6/\text{min}$. O valor de K_m , nos mostrou a afinidade que a proteína tem pelo substrato (ATP), representando a concentração de substrato à qual metade dos sítios ativos estão preenchidos, conseqüentemente, onde a velocidade da reação é igual a metade de V_{max} . Além disso, o K_m está relacionado para avaliar constantes de dissociação. Quando a taxa de dissociação do complexo ES ($k + 2$) no produto é muito mais baixa do que a dissociação em E e S ($k-1$), o K_m descreve a constante de dissociação do complexo ES, a força do complexo. Sendo assim, quanto maior o valor de K_m , menor afinidade da enzima pelo substrato. A afinidade de TcSub2 por ATP pode ser considerada alta, quando comparada a outras proteínas dentro da família DEAD box, como por exemplo, a proteína humana p68, que possui um K_m de $1000\mu\text{M}$ (IGGO; LANE, 1989) e do fator de tradução eIF4A que possui um K_m de $470\mu\text{M}$ (BLUM *et al.*, 1992), ou outras proteínas que não helicases como a β -galactosidase, cujo o substrato é a Lactose que tem um K_m de $224\mu\text{M}$ (HELD, 2007).

As helicases da família DEAD box possuem um Km variando de 80 μ M a 1mM e um Kcat variando de 0,3 (ROGERS *et al.*, 1999; ROGERS *et al.*, 2001) a 600/min (CORDIN *et al.*, 2004), portanto os valores encontrados para TcSub2 estão de acordo com o que já foi descrito na literatura para proteínas desta família. A velocidade máxima da reação catalisada pela enzima TcSub2 é alta com relação aos outros membros da mesma família de proteínas, visto que o valor da velocidade para a enzima ortóloga de humanos UAP56 é de 0,0063 μ M/min e valor do Kcat na presença de ATP em associação com o RNA é de aproximadamente 0,3/min (SHEN *et al.*, 2007), ou seja, valores inferiores ao encontrado para TcSub2 (505 μ M/min e 1,6/min) . Assim sendo poderíamos inferir que a enzima de *T. cruzi* hidrolisa o ATP mais rapidamente que a sua ortóloga em humanos. Além disso, o valor de Kcat encontrado para UAP56 na presença de RNA além do ATP é de 0,25/min (SHEN *et al.*, 2007), similar ao descrito para eIF4A (0,3/min) (ROGERS *et al.*, 1999; ROGERS *et al.*, 2001) e também inferior ao encontrado para a proteína de *T. cruzi*.

TcSub2 é uma proteína de ligação a RNA dependente de ATP. Quando foi analisada a cinética da reação da enzima TcSub2 na presença de diferentes tipos de RNA, foi verificado que a proteína não é estimulada preferencialmente por nenhum dos tipos de RNAs testados. Na literatura, com a exceção de DbpA (que deve estar envolvida na montagem da subunidade maior do ribossomo em bactérias) e proteínas relacionadas (FULLER-PACE *et al.*, 1993;. KOSSEN; UHLENBECK, 1999), não existe relato de alguma proteína helicase da família DEAD box que seja especificamente estimulada por um tipo de RNA (CORDIN *et al.*, 2007). No presente trabalho, usamos como base para execução do ensaios os mesmos parâmetros e sequências de RNAs descritos nos ensaios publicados para UAP56 (SHEN *et al.*, 2007) e os resultados encontrados para a proteína UAP56, corroboraram com os descritos aqui, onde não foram encontrados RNAs específicos que alterem consideravelmente a atividade ATPase. De modo geral, a presença de qualquer dos RNAs testados neste trabalho contribuíram para um sensível aumento da velocidade da enzima, sendo este de até 40% da atividade enzimática.. Estes mesmos resultados foram encontrados por outros grupos, porém o grau de aumento desta atividade devido a ligação ao RNA entre as proteínas desta família parece variar, de proteína para proteína. Cordin e colaboradores em 2004 demonstraram que a presença de RNA aumenta a atividade enzimática de Ded1, que é um fator de iniciação de tradução e Rocak e colaboradores em 2005 demonstraram essa mesma alteração na proteína Has1, que está envolvida na maturação de RNA ribossomal. Da mesma forma, para a proteína UAP56 a adição do RNA na reação causou uma diferença ainda maior na sua atividade enzimática, que foi aumentada em até 20 vezes (SHEN *et al.*, 2007). Isto é bastante interessante pois essa análise comparativa entre as proteínas TcSub2 e UAP56 mostra que TcSub2 possui maior

afinidade ao substrato ATP do que a UAP56 e por outro lado, que a atividade ATPase de UAP56 é bastante influenciada pela presença de RNA. Na presença de 50uM de RNA, a velocidade máxima da reação catalisada por UAP56 é 3,8 vezes menor que a velocidade máxima da reação catalisada por Tcsub2.

Vale lembrar que nem todas as proteínas da família DEAD box são estimuladas por RNA. Surpreendentemente, foi encontrado que Dbp9 é inibida pela presença de RNA e estimulado por DNA (KIKUMA *et al.*, 2004). Esta proteína é necessária na biogênese da subunidade 60S do ribossomo (DAUGERON *et al.*, 2001), porém os autores discutem que estes resultados precisariam ser confirmados e analisados no contexto biológico. A presença de cofatores e diferentes parceiros também podem contribuir para a atividade ATPase destas enzimas. No entanto no caso da família DEAD box parece haver uma relação direta entre a atividade ATPase e o estabelecimento de diversas interações proteína-proteína e proteína-RNA.

Os tripanosomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, possuem grandes diferenças em seus mecanismos de expressão gênica, por exemplo, utilizam o trans-splicing para processar seus mRNAs ao invés do cis-splicing utilizado pela maioria dos eucariotos, e essas diferenças em eventos moleculares poderia justificar papéis diferentes entre as proteínas TcSub2 e UAP56, apesar da similaridade de sequência de aminoácidos entre essas proteínas ser de 69% .

A família DEAD box possui várias regiões consenso. Dentre elas, o motivo I, localizado no domínio I é responsável pela ligação ao ATP. Esse motivo possui uma sequência de aminoácidos muito conservada ao longo de toda a filogenia (DE LA CRUZ *et al.*, 1999). Essa conservação pode refletir a conservação na atividade ATPase. Shen e colaboradores em 2007 realizaram uma mutação neste sítio de UAP56 (K97N) e constataram a perda da função ATPase da enzima, como verificamos que este domínio é muito conservado em TcSub2 (K87) nosso grupo com o interesse de verificar se mutações nesse sítios poderiam abolir a atividade ATPase da proteína de *T.cruzi*, realizou uma mutação em TcSub2 no mesmo local. Foi então, da mesma forma que nas análises de UAP56, realizada a substituição de um nucleotídeo que modificou o códon de um aminoácido Lisina para uma Asparagina na posição 87 da sequência de aminoácidos da proteína TcSub2 (K87N). A proteína mutada TcSub2K87N foi purificada e ensaios de atividade enzimática mostraram que a mutação causou perda da atividade ATPase. Esse resultado não é surpreendente, visto que o mesmo aconteceu para outras proteínas da família DEAD box que tiveram este mesmo aminoácido modificado: UAP56, DbpA, eIF4A, Ded1 (SHEN *et al.* 2007; BLUM *et al.*, 1992; PUGH *et al.*, 1999, CORDIN *et al.*, 2004). Logo, isso reforça a conservação dos resíduos do sítio ativo e sua importância para a atividade da proteína TcSub2.

Enzimas que tem suas sequências de aminoácidos alteradas podem apresentar modificações na sua estrutura terciária, impossibilidade de fazer interações com outras moléculas (estrutura quaternária), além de poderem perder afinidade ao seu substrato levando a perda de sua função. Além disso, proteínas recombinantes são produzidas em organismos diferentes do natural, o que poderia afetar o enovelamento correto de proteínas. O Dicroísmo circular (CD) na região espectral UV distante é provavelmente a técnica mais amplamente reconhecida na aplicação da espectroscopia de absorção polarizada para o estudo das biomoléculas e por isso, pode ser aplicada para verificar o correto enovelamento de proteínas e assim averiguar alterações na estrutura terciária das proteínas causadas por uma mutação realizada sinteticamente (BEROVA, *et al.*, 2000; GOZDEK *et al.*, 2007; NAYAK *et al.*, 2013) ou pela expressão heteróloga. Por isso, este ensaio foi utilizado para comparar o conteúdo de estrutura secundária de TcSub2 e TcSub2K87N e assim verificar se a produção em bactérias *E. coli* poderia ter alterado o enovelamento das proteínas assim como se a ausência de atividade por TcSub2K87N é resultante de alterações estruturais induzidas pela mutação. Os resultados mostram que ambas as proteínas apresentavam espectro de dicroísmo circular condizente com estruturas ricas em α -hélices, o que nos indica o seu correto enovelamento. Portanto, essas análises foram importantes para constatar que apesar de TcSub2 ter sido expressada em um organismo procarioto, a estrutura da proteína é muito provavelmente similar à proteína nativa. Além disso, foi possível verificar que apesar da mutação realizada no sítio de ligação ao ATP, a proteína TcSub2K87N manteve sua estrutura terciária muito similar a proteína selvagem. Sendo assim, a alteração do aminoácido em questão não resultou em perda da estrutura terciária da proteína e sim em alterações locais no sítio ativo, que provocaram a perda da sua função.

Para tentar elucidar esta hipótese foi realizada uma modelagem molecular das proteínas TcSub2 e TcSub2K87N, o observado foi que antes da hidrólise do ATP, a lisina 87 está posicionada à uma distância de 2.9Å de uma molécula de Magnésio (Mg^{2+}) que mimetiza a posição do fosfato gama do ATP que será hidrolisado. Já quando verificamos a modelagem da proteína mutada, constatamos que o rotâmero de N87 mais distante de ATP estaria a uma distancia de 1.5Å do fosfato beta do ADP. Assim a substituição desse resíduo por uma Asparagina parece atrapalhar o posicionamento e ligação de ATP na sua posição correta, caso o ATP se posicione na mesma posição encontrada na estruturas cristalográfica previamente resolvidas (PDB ID: IXTJ). Essa proximidade caracteriza uma sobreposição e não é encontrada na natureza devido às forças de repulsão de Van der Waals. Portanto, a modificação K87N pode afetar a ligação de ATP e sua hidrólise por não permitir seu posicionamento correto no sítio catalítico. Na proteína UAP56, o resíduo de Lisina está

localizado na posição 95, e devido a resolução da sua estrutura cristalizada sabe-se que os átomos de oxigênio do fosfato do ATP/ADP fazem 3 ligações de hidrogênio com os grupos amida de Gli-92, Gli-94, Lis-95. Além disso, átomo O² do fosfato faz uma ligação adicional com o nitrogênio (N) do grupamento amida da Lis 95 (SHI *et al.*, 2004), estas ligações também foram observadas em Prp5p (proteína envolvida no splicing) (ZHANG *et al.*, 2013). Se pensarmos na importância da posição do átomo N, poderemos inferir que a modificação por uma Asparagina, no local onde deveria ser uma Lisina, corrobora com o que encontramos na modelagem molecular, pois este átomo está localizado em posição diferente na Asparagina, o que faria com que a dinâmica de ligação ao ATP/ADP seja modificada e não seja eficiente. Este resultado acrescido da constatação que a estrutura terciária da proteína mutada não é alterada corroboram com a hipótese de que a perda da atividade ATPase é devido a alterações nas interações realizadas pelo sítio da proteína com o substrato ATP.

Para avaliar a estabilidade da proteína, existem métodos baseados em desnaturação térmica que são cada vez mais utilizados para estudar isso, além de rastrear condições que possam estabilizar proteínas, identificando possíveis ligantes (RICHARD *et al.*, 2006; VEDADI *et al.*, 2006; CROWTHER *et al.*, 2009). Por isso utilizamos espectros de CD coletados em diferentes temperaturas para avaliar a estabilidade térmica das proteínas. Foi possível verificar que mutação não alterou a estabilidade de TcSub2, na verdade a proteína contendo a mutação tem maior estabilidade do que a selvagem. É bem conhecido que são várias as forças que contribuem para a estabilidade de uma proteína e as interações que contribuem para o maior empacotamento (ROSE; WOLFENDEN, 1993; LAZARIDIS *et al.*, 1995). Dentre elas, interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio são as ligações que mais contribuem para a estabilidade da proteína (Pace *et al.*, 2014), além disso grupos –OH, mesmo que não estejam formando pontes de hidrogênio também fazem considerável contribuição (PACE *et al.*, 2001). Trocamos um aminoácido Lisina (Lys ou K) por uma Asparagina (Asn ou N). Os dois aminoácidos são polares, porém a Asparagina possui um sítio a mais que fica disponível para formar pontes de hidrogênio e isto poderia justificar então a maior estabilidade térmica da proteína TcSub2K87N (Figura 5.1).

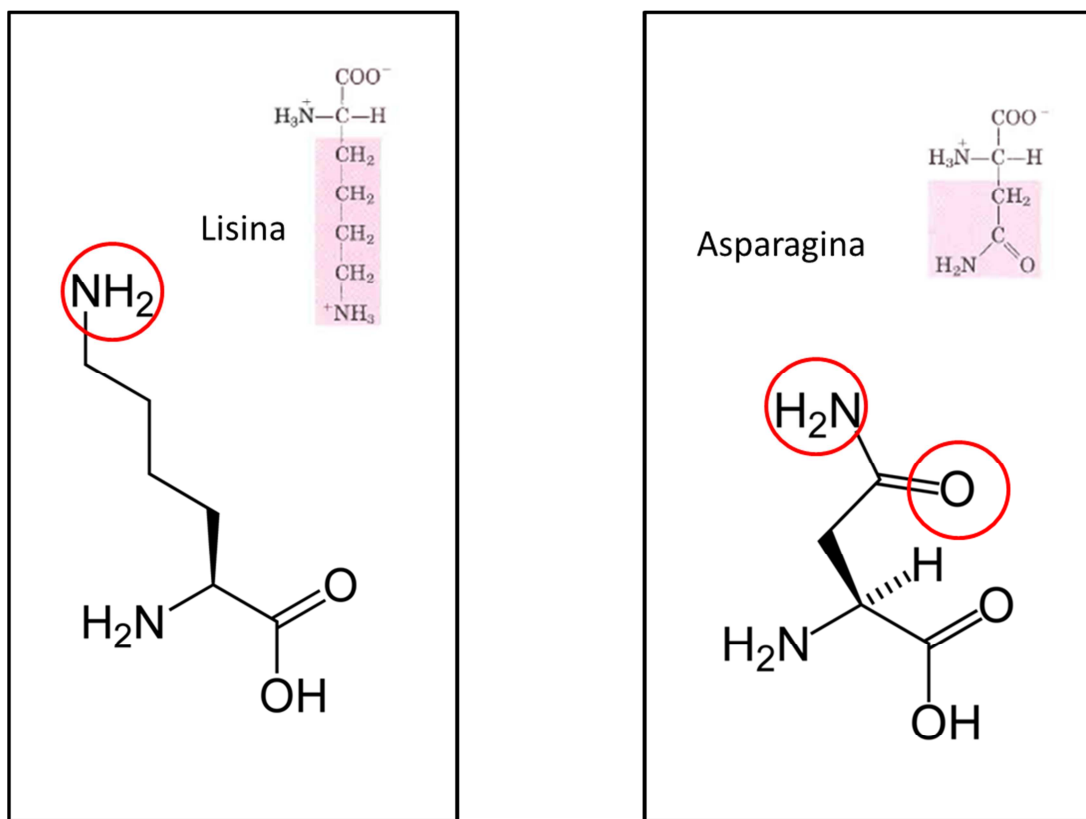


Figura 5.1. Representação esquemática dos aminoácidos Lisina e Asparagina. No círculo vermelho estão apontados os átomos da cadeia lateral capazes de fazer ligação de hidrogênio.

Vários grupos utilizam a técnica de CD também para verificar possíveis interações entre proteína-ligante, determinando em qual estado a proteína está mais estável (SCHÖN *et al.*, 2006; CORDEIRO *et al.*, 2001). Quando foi verificada a estabilidade da proteína TcSub2 na presença dos diferentes RNAs, observamos que em todos os casos, a presença do RNA fez com que a proteína perdesse estrutura terciária a uma temperatura maior, ou seja, reflexo do aumento de sua estabilidade. Isso acontece pois a estabilidade de uma proteína é maior quando ela está complexada com o seu ligante (PANTOLIANO *et al.*, 2001). Além disso, este resultado também mostrou que a alteração na estabilidade da proteína não depende do tipo RNA utilizado. Neste caso, quaisquer dos RNAs testados contribuiu na mesma proporção para o aumento da estabilidade de TcSub2. Logo este fato complementa o resultado observado nos ensaios de atividade ATPase de que a enzima não tem preferência por tipos ou sequências de RNAs para sua função. Foi possível verificar que a sobreposição dos espectros de TcSub2 na presença de RNA obtidos experimentalmente com o espectro teórico (resultante do somatório dos espectros de TcSub2 sozinha e RNA sozinha, ambos

obtidos experimentalmente) não apresentou diferença, sugerindo que a associação de TcSub2 com RNA não resulta em modificações em nível de estrutura secundária, visto que as curvas ficaram muito similares. Contudo, uma pequena alteração na estrutura tipo α foi observada na curva de TcSub2 com o RNA4. Para tentar elucidar o motivo da alteração precisaria ser determinada a estrutura de TcSub2 na ausência e presença do RNA, já que as técnicas usadas nesse trabalho não possuem resolução para tais interpretações e não é bem determinado a forma como estes diferentes RNAs se ligam ao sítio de ligação em TcSub2.

Os dados obtidos *in vitro* tem sugerido que Tcsub2 tenha atividade diferentes de seus homólogos, mas para elucidar o papel exato da proteína na via de exportação de mRNA, são necessários mais estudos funcionais, que abordem a função da proteína completa e não apenas o sítio ATPase. Após a confirmação de que TcSub2 hidrolisa ATP e interage com diferentes RNA, é lógico pensar que o domínio desta proteína é essencial em tripanosomatídeos para prover uma fonte alternativa de energia na via que transporta mRNA através do complexo TREX, já que é bem conhecido em outros eucariotos que a via de exportação de mRNA não utiliza RanGTP e sim ATP. Além disso, com base nos estudos prévios do grupo realizados por Serpeloni e colaboradores em 2011, TcSub2 é essencial para a exportação de mRNA localizada em sítios onde ocorrem a transcrição pela RNA pol II, polimerase responsável pela síntese da maioria dos mRNA. Visto isso, seria razoável pensar que em tripanosomatídeos TcSub2, assim como as proteínas homólogas de outros eucariotos, possa também estar envolvidas neste mecanismo provendo uma fonte de energia para que este processo ocorra, assim ensaios funcionais *in vivo* poderiam ajudar a sustentar esta ideia.

Como citado anteriormente, a função da proteína ortóloga de UAP56/Sub2 em tripanosomatídeos foi confirmada através de ensaios *in vivo* de RNAi em *T.brucei* (TbSub2), onde a diminuição da expressão da proteína causou o acúmulo de mRNA no núcleo com consequente morte do parasita (SERPELONI *et al.*, 2011). Portanto, um ensaio de complementação funcional, inserindo-se o gene de *T. cruzi* (TcSub2) para reverter o fenótipo causado pelo RNAi de TbSub2 forneceria uma metodologia adequada para verificar se as duas proteínas teriam a mesma função, visto a possibilidade de avaliar atividade da proteína em um contexto celular. Adicionalmente, os ensaios de complementação poderiam ser feitos com a proteína mutada em diferentes motivos, tornando este um ensaio apropriado para dissecar os fatores essenciais para atividades desta proteína no contexto celular.

Logo, a técnica de RNAi é uma metodologia que vem sendo bastante utilizada como em análises de genética reversa (FRASER *et al.*, 2000; MORRIS *et al.*, 2002; Kamath *et al.*, 2003; PFLANZ *et al.*, 2015). Da mesma forma, ensaios de complementação funcional podem ajudar a entender a função de uma proteína pois visam avaliar se expressão de uma

determinada proteína consegue restaurar o fenótipo causado pelo nocaute de um gene de função semelhante, como comumente utilizado em leveduras (YADAV *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014). Este tipo de ensaio também pode ser feito em tripanossomatídeos, e neste caso visa então restaurar o fenótipo de silenciamento de um gene após indução do RNAi, (RUSCONI *et al.*, 2005; PEDROSA *et al.*, 2002).

Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho seria estabelecer um ensaio de complementação funcional para estudo da função de Sub2 em tripanossomatídeos. Um dos motivos que nós levou a investir neste tipo de abordagem foi o fato de que apesar de serem organismos filogeneticamente relacionados, alguns mecanismos genéticos são bastante diferentes, como por exemplo, a presença maquinaria de RNAi apenas em *T. brucei* e não em *T. cruzi* (KOLEV *et al.*, 2011; DAROCHA *et al.*, 2004) ou a presença de mecanismos de regulação transcricional de proteínas de superfície (VSGs) (MANNA *et al.*, 2014) para evasão do sistema imune em *T. brucei* que não existe em *T. cruzi*. Por isso, não podemos inferir diretamente que as duas proteínas tem a mesma função nestes dois organismos. De fato, alguns trabalhos anteriores já demonstraram que proteínas com sequência similares nestes dois organismos (*T. cruzi* e *T. brucei*) não apresentavam a mesma função (RUSCONI *et al.*, 2005). Dessa forma estes ensaios de complementação ajudariam a confirmar a função desta proteína em *T. cruzi*, já que o nocaute não foi viável inviabilizando avaliar o fenótipo causado pela perda da proteína no próprio organismo. Além disso, como mencionado acima, este tipo de ensaio poderia ser usado em análises de regiões essenciais da proteína. Outra utilidade seria a avaliação da conservação de função de genes de outras espécies de parasitas. De modo geral, ensaios de complementação funcional envolvendo organismos filogeneticamente próximos, poderia ajudar a ampliar contribuição desta abordagem no caso de estudos de vias e mecanismos mais específicos de parasitas, pois apesar de levedura ser um organismo modelo e bem apropriado para esta abordagem, ele é filogeneticamente divergente de muitas espécies de parasitas o que dificulta seu uso para análises mais detalhadas na identificação de componentes de uma via. Esse, foi o caso por exemplo da própria Sub2 (ortóloga a UAP56 e TcSub2), pois quando foi realizado ensaio de complementação funcional com a expressão do gene de TcSub2 em uma cepa de levedura nocaute de Sub2, não foi possível restaurar o fenótipo letal.

Assim, para estabelecer esta abordagem de complementação funcional em tripanossomatídeos, primeiro avaliamos a similaridade da sequência alvo do gene de *T. brucei*. com a sequência correspondente do gene de *T. cruzi*. Neste caso, verificamos que a região alvo de *T. brucei* possui identidade de 80% com a sequência do gene de *T. cruzi* e de acordo com trabalhos anteriores (RUSCONI *et al.*, 2005), esta diferença seria suficiente para que a

maquinaria de RNAi de *T. brucei* não reconhecesse o mRNA codificado pelo gene de *T. cruzi* e assim apenas o mRNA alvo codificado pelo gene de *T. brucei* seria degradado pela . Posteriormente, partirmos para a etapa de obter uma linhagem de *T. brucei* capaz de reproduzir o fenótipo letal e de acúmulo de mRNA no núcleo após o silenciamento da proteína TbSub2 como publicado anteriormente por Serpeloni e colaboradores em 2011. Vale ressaltar que a linhagem obtida neste trabalho não pode ser usadas . por algum motivo, não foi possível reproduzir os experimentos com essa linhagem. Com isso, foi preciso gerar nova linhagem para o objetivo proposto.

Enfim, foi possível obter a linhagem dos parasitos *T. brucei* 29-23-RNAi, contendo os vetores pAD74TcSub2, pAD74TcSub2K87N ou pAD74GFP. Após transfecção do vetor para expressão do RNA dupla fita, os parasitos foram selecionados e clonados. Análises tipo *Western Blot* foram executadas com amostras de diferentes clones para verificar e quais clones a indução do RNAi foi eficiente, causando a diminuição dos níveis da proteína alvo. No fim, um dos clones com maior eficiência no silenciamento foi escolhido para uso nos ensaios futuros. Um curva de crescimento obtida com este clone, mostrou que após 48 horas de indução com tetraciclina, os parasitos morreram, reproduzindo assim o fenótipo letal obtido anteriormente por Serpeloni e colaboradores em 2011. Posteriormente, esta linhagem foi transfectada com o vetor de complementação contendo o gene GFP (pAD74GFP) para gerar uma linhagem controle. Após seleção desta linhagem, foi realizado um ensaio de indução de RNAi a fim de verificar se o vetor sozinho poderia interferir no fenótipo obtido anteriormente após a indução do RNAi. Foi observado que sem indução com tetraciclina os parasitos contendo o vetor de complementação sem TcSub2 se dividiram normalmente e ao serem induzidos com tetraciclina os parasitos morreram. Isso prova que o vetor escolhido para a complementação pode ser utilizado como controle negativo e que o vetor por si só não muda o fenótipo obtido com o silenciamento do gene TbSub2. Assim, a linhagem de RNAi foi transfectada então com o vetor de complementação pAD74TcSub2 e pAD74TcSub2K87N e os parasitos foram selecionados com antibiótico apropriado. Com estas linhagem, pretendemos realizar os ensaios de complementação funcional, para analisar se ocorrerá o acúmulo do mRNA no núcleo e morte dos parasitos ou se a expressão do gene de *T. cruzi* será suficiente para reverter o fenótipo causado pelo silenciamento do gene de *T. brucei*. Esses resultados além de nos fornecer a prova de princípio desta abordagem, nos ajudará a confirmar que a função do gene em *T. cruzi* está conservada. E futuramente, esta abordagem será utilizada para análises funcionais mais detalhadas desta proteína e de outras da via, como exemplificado mais acima.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A determinação da atividade APTase da proteína TcSub2, nos permitiu confirmar que este sítio, característico das proteínas helicases da família DEAD box é funcional nesta proteína. Também foi possível determinar que ela tem velocidade alta de ação em relação a outras proteínas da família.
- ✓ A presença de RNA na reação causou um aumento da velocidade de ação de TcSub2, no entanto, a sequência de RNA não alterou os valores determinados. Ou seja, a ligação de RNA melhora a atividade da proteína, no entanto, a alteração não é específica da sequência do RNA.
- ✓ A mutação realizada em TcSub2 no sítio ATPase, gerando TcSub2K87N, acarretou a perda da função de hidrólise de ATP da proteína, comprovando que a região em que foi feita a mutação é o sítio ativo da proteína.
- ✓ O experimento de Dicroísmo Circular mostrou que a mutação realizada em TcSub2 não levou a perda da estrutura terciária, mas aumentou a estabilidade da proteína .
- ✓ O teste de estabilidade (desnaturação por temperatura) mostrou que a proteína TcSub2 é mais estável quando ligada RNA, independente da sequência do RNA.
- ✓ A modelagem molecular de TcSub2 e TcSub2K87N mostrou que a substituição do resíduo de Lisina por uma Asparagina modificou o sítio ativo de tal forma que o ATP não pode mais se posicionar da mesma forma que em TcSub2 ao menos que modificações estruturais aconteçam.
- ✓ Foi possível obter a cepa de *T. brucei* 29-14 RNAi*TbSub2*, transfectada com os vetores de complementação pAD74TcSub2, pAD74TcSub2K87N e pAD74GFP que serão utilizados para futuros ensaios de complementação funcional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula. Atmed*. 5ª edição, p. 411 a 453, 2010.

ANDERSEN, C. B.F.; BALLUT, L.; JOHANSEN, J. S.; CHAMIEH, H.; NIELSEN, K. H.; OLIVEIRA, C. L.P.; PEDERSEN, J. S.; SERAPHIN, B.; HIR, H. LE; ANDERSEN, G. R.. Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA. *Science*. v.313, p. 1968–1972, 2006.

ARGOLO, A. M; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

BAOU, M; JEWELL, A.; MURPHY, J.J. TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *J. Biomed. Biotechnol.* artigo 634520, 2009.

BEN-SHLOMO, H.; LEVITAN, A.; BEJA, O.; MICHAELI, S. The trypanosomatid *leptomonas collosoma* 7SL RNA gene. Analysis of elements controlling its expression, *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p. 4977-4984, 1997.

BEADLE, B.M.; BAASE, W.A.; WILSON, D.B.; GILKES, N.R.; SHOICHET, B.K. Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. *Biochemistry*, v. 38, p. 2570-2576, 1999.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. Circular dichroism: Principles and applications. **Wiley-VCH**. v. 2, 2000.

BISCHOFF, F.R.; KREBBER, H.; SMIRNOVA, E.; DONG, W.; PONSTINGL, H. Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J*. v. 14, p.705–715, 1995.

BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. v.349, p.117–127, 1991.

BLUM, S.; SCHMID, S.R.; PAUSE, A.; BUSER, P.; LINDER, P.; SONENBERG, N.; TRACHSEL, H. 1992. ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.89, p. 7664–7668, 1992.

BRUN, R.; SCHONONBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Short Communication - Acta Trop**. v. 36, p. 289-292, 1979.

BYRD, A. K.; RANEY, K. D. Superfamily 2 helicases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. v.17, p. 2070–2088, 2013

CARMODY, S.R.; WENTE, S.R. mRNA nuclear export at a glance. *J Cell Sci*. v. 122, p. 1933–1937, 2009.

- CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Struct. Funct.**, v. 14, p. 383 – 392, 1989.
- CARUTHERS, J.M.; MCKAY, D.B. Helicase structure and mechanism. **Curr. Opin. tract. Biol.** v. 12, p. 123-133, 2002.
- CAUTAIN, B.; HILL, R.; DE PEDRO, N.; LINK, W. Components and regulation of nuclear transport processes. **FEBS Journal**. Artigo 13163, 2014.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 953-994, 1993
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biol. Lett.** v.6, p. 342-345, 2010.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159 – 218, 1909.
- CARMEL, A.B.; MATTHEWS, B.W. Crystal structure of the BstDEAD N-terminal domain: a novel DEAD protein from *Bacillus stearothermophilus*. **RNA**. v. 10, n. 1, p. 66-74, 2004
- CARUTHERS, J.M.; JOHNSON, E.R.; MCKAY, D.B. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**. v.97, p. 3080-3085, 2000.
- CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **J. Biomol. Screening**. v. 20 n.1, p. 22–35, 2015.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 156, p. 93-101. 2007.
- COOK, A.; BONO, F.; JINEK, M.; CONTI, E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu. Rev. Biochem.** v. 76, p. 647–671, 2007
- COLLINS, R.; KARLBERG, T.; LEHTIO, L.; SCHUTZ, P.; VAN DEN BERG, S.; DAHLGREN, L. G.; HAMMARSTROM, M.; WEIGELT, J.; SCHULER, H. The DEXD/H-box RNA Helicase DDX19 Is Regulated by an alpha-Helical Switch. **J Biol Chem**. v.284, p.10296–10300, 2009.
- CORDEIRO, Y.; MACHADO, F.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; BRENTANI, R.R.; FOGUEL, D.; SILVA, J.L. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. **J Biol Chem**. v.276, n. 52, p. 49400-9, 2001.
- CORDIN, O.; TANNER, N.K.; DOERE, M.; LINDER, P.; BANROQUES, J. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. **EMBO J**. v.23, p.2478–2487, 2004.
- CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N. K.; LINDER P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**. v. 367, p. 17–37, 2006.

- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review, **Acta Tropica**, v.115, p. 5–13, 2010.
- CROWTHER, G.J.; NAPULI, A.J.; THOMAS, A.P. *et al.* Buffer optimization of thermal melt assays of Plasmodium proteins for detection of small-molecule ligands. **J Biomol Screen**. v.14, p.700–707, 2009.
- CUSTÓDIO, N.; CARVALHO, C.; CONDADO, I.; ANTONIOU, M.; BLENCOWE, B.J.; CARMO-FONSECA, M. In vivo recruitment of exon junction complex proteins to transcription sites in mammalian cell nuclei. **RNA**. v. 10, n. 4, p. 622-33. 2004.
- DAUGERON, M.C.; KRESSLER, D.; LINDER, P. Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p. **RNA**. v.7, n.9, p. 1317-34, 2001.
- DAROCHA, W.D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S.M.; DONELSON, J.E.; **Mol Biochem Parasitol**. v. 133, n.2, p. 175-86, 2004.
- DECKER, K. B.; HINTON, D.M. Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 67, p. 113-39, 2013.
- DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A.C. RNA Recognition Motif-type RNA-binding Proteins in *Trypanosoma cruzi* Form a Family Involved in the Interaction with Specific Transcripts *in vivo*. **J. Biol Chem**. v. 278, p. 18884-18894. 2003.
- DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; LINDER, P. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. **Trends Biochem Sci**. v.24, n. 25, p.192-198, 1999.
- DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt.**, v. 86, p. 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, p. 269–285, 2002.
- DILLINGHAM, M. S.; WIGLEY, D. B.; WEBB, M. R. Direct measurement of single-stranded DNA translocation by PcrA helicase using the fluorescent base analogue 2-minopurine. **Biochemistry**. v. 41, p. 643–651, 2002.
- DU, T.G.; SCHIMD, M.; JANSEN, R.P. Why cells move messages: The biological functions of mRNA localization. **Semin. Cell. Dev. Biol.** v. 18, p. 171-177. 2007.
- LIM, R.Y.; ULLMAN, K.S.; FAHRENKROG, B. Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.** v. 267, p. 299–342, 2008.
- DUMAS, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 184, p. 1867-1885, 2000.
- EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.
- EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and Development of Coot. **Acta Crystallographica**. V.66, p. 466-501, 2010.

ERBEN, E. D.; FADDA, A.; LUEONG, S.; HOHEISEL, J. D.; CLAYTON, C. A Genome-Wide Tethering Screen Reveals Novel Potential Post-Transcriptional Regulators in *Trypanosoma brucei*. **PLOS Pathogens**. v.10, n. 6, 2014.

FAIRMAN-WILLIAMS M. E.; GUENTHER, U.; JANKOWSKY, E. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Curr Opin Struct Biol**. v. 20, p. 313–324, 2010.

FEI Q.; PUTNAM, A; JANKOWSKY, E. ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.105, p. 20209– 20214, 2008.

FRASER A, KAMATH R, ZIPPERLEN P, MARTINEZ-CAMPOS M, SOHRMANN M, AHRINGER J: Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. **Nature**.v. 408, n. 6810, p.325-330, 2000.

FULLER-PACE, F.V.; NICOL, S.M.; REID, A.D.; LANE, D.P. DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23S rRNA. **EMBO J**. v.12, p. 3619–3626, 1993.

FLECKNER, J.; ZHANG, M.; VALCARCEL, J.; GREEN, M. R. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. **Genes Dev**. v.11, p. 1864-1872, 1997.

GATFIELD, D.; LE HIR, H; SCHMITT, C; BRAUN, I.C.; KOCHER, T. *et al.* The DExH/ D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. **Curr Biol**. v. 11, p.1716–1721, 2001.

GOZDEK, A.; ZHUKOV, I.; POLKOWSKA, A.; POZNANSKI, J.; STANKIEWICZ-DROGON, A.; PAWLOWICZ, J.M.; ZAGÓRSKI-OSTOJA, W.; BOROWSKI, P.; BOGUSZEWSKA-CHACHULSKA, A.M. NS3 Peptide, a novel potent hepatitis C virus NS3 helicase inhibitor: its mechanism of action and antiviral activity in the replicon system. **Antimicrob Agents Chemother**. v.52, n. 2, p. 393-401, 2008.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; FRANCO, M.P.A.L.; BONALDO, M.C.; VALLE, D.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Perspectives of vaccination against Chagas Disease through biotechnology. II – Gene expression in *T. cruzi* trypomastigotes and cell-free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. In: **New Appro. Vac. Develop.** TORRIGIANI, O. (Ed). Schwabe e Co.,Basel, Switzerland, p. 442-459, 1984.

GOMEZ, C.; ESTHER RAMIREZ, M.; CALIXTO-GALVEZ, M.; MEDEL, O.; RODRÍGUEZ, M. A. Regulation of gene expression in protozoa parasites. **J. Biomed. Biotechnol.** Artigo 726045, 2010.

GORBALENYA, A. E.; KOONIN, E. V.; DONCHENKO, A. P.; BLINOV, V M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic Acids Res**. v.17, p. 4713–4730, 1989.

GROSSMAN, E.; MEDALIA, O.; ZWERGER, M. Functional architecture of the nuclear pore complex. **Annu. Rev. Biophys.** v. 41, p. 557–584, 2012.

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

HAUTBERGUE, G.M.; HUNG, M.L.; GOLOVANOV, A.P.; LIAN, L.Y.; WILSON, S.A. Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.105, p. 5154–5159, 2008.

HELD P. Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity using the PowerWave™ HT and Gen5™ Data Analysis Software. **BioTek Instruments**, Application note, 2007

HEROLD, A.; TEIXEIRA, L.; IZAURRALDE, E. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. **EMBO J**. v. 22, p. 2472–2483, 2003.

HIDE, G. History of Sleeping Sickness in East Africa. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12, n. 1, p. 112-25. 1999.

HILBERT, M.; KAROW, A. R.; KLOSTERMEIER, D. The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. **Biol Chem**. v. 390, p. 1237–1250, 2009.

HUNG, M.L.; HAUTBERGUE, G.M.; SNIJDERS, A.P.; DICKMAN, M.J.; WILSON, S.A. Arginine methylation of REF/ALY promotes efficient handover of mRNA to TAP/NXF1. **Nucleic Acids.Res.** v.38, p. 3351–3361, 2010.

IGGO, R.D., LANE, D.P. Nuclear protein p68 is an RNA-dependent ATPase. **EMBO J**. v.8, p. 1827–1831, 1989.

IVENS, A.C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**. v.15, n. 309, p.436-442. 2005.

JANKOWSKY. E.; FAIRMAN, M. E. RNA helicases - one fold for many functions. **Curr Opin Struct Biol**. v. 17p. 316–324, 2007.

KATAHIRA, J.; STRASSER, K.; PODTELEJNIKOV, A.; MANN, M.; JUNG, J.U. *et al.* The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. **EMBO J**. v.18, p. 2593–2609, 1999.

KATAHIRA, J. mRNA export and the TREX complex. **Biochim Biophys Acta**. v. 1819, p. 507–513, 2012.

KIKUMA, T.; OHTSU, M.; UTSUGI, T.; KOGA. S; OKUHARA, K.; EKI, T.; FUJIMORI F.; MURAKAMI, Y. Dbp9p, a member of the DEAD box protein family, exhibits DNA helicase activity. **J Biol Chem**. v. 279, n. 20, p. 20692-29698, 2004.

KOSSEN, K.; UHLENBECK, O.C. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. **Nucleic Acids Res.** v.27, p. 3811–3820, 1999.

KAMATH, R.; FRASER, A.; DONG, Y.; POULIN, G.; DURBIN, R.; GOTTA, M.; KANAPIN, A.; LE BOT, N.; MORENO, S.; SOHRMANN, M.; WELCHMAN, D.; ZIPPERLEN, P.; AHRINGER, J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. **Nature**. v.421, n. 6920, p. 231-7, 2003.

KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature reviews**. v. 8, n.,. 10, p. 761-73. 2007.

- KOLEV NG¹, TSCHUDI C, ULLU E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryot Cell**. v. 10, n. 9, p.1156-1163, 2011.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 381–387, 2000.
- KOTA, K. P.; WAGNER, S. R.; HUERTA E.; UNDERWOOD, J. M.; NICKERSON, J. A. Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA Export. **J. Cell Science**. v.121, p. 1526-1537, 2008.
- KRAMER, S.; CARRINGTON, M. *Trans*-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol**. v.27, p. 23-30, 2011.
- LANGE. A.; MILLS, R.E.; LANGE, C.J.; STEWART, M.; DEVINE, S.E.; CORBETT, A.H. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. **J. Biol. Chem**. v. 282, p. 5101–5105, 2007.
- LAZARIDIS, T.; ARCHONTIS, G.;KARPLUS, M. Enthalpic contribution to protein stability: insights from atom-based calculations and statistical mechanics. **Adv. Protein Chem**. v.47, p. 231–306, 1995.
- LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE. L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*, **Genes and Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, 1993.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLIANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool**. v. 27, n. 1, p. 37-58. 1980.
- LUO,M.; REED, R. *Splicing* is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. **Proc. Nat. Acad. of Scien. USA**. v. 96, n. 26, p. 14937–14942, 1999.
- LUO, M.L.; ZHOU, Z.; MAGNI, K.; CHRISTOFORIDES, C.; RAPPSILBER, J. *et al.* Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. **Nature**. v.413, p. 644–647, 2001
- MACARA, I.G. Transport into and out of the nucleus. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v. 65, p.570–594, 2001.
- MANNA, P.T.; BOEHM, C.; LEUNG, K.F.; NATESAN, S.K.; FIELD, M.C.; Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. **Trends Parasitol**. v. 30, n. 5, p. 251-258, 2014.
- MAREE, J.P.; PATTERTON, H.G. The epigenome of *Trypanosoma brucei*: a regulatory interface to an unconventional transcriptional machine. **Biochim Biophys Acta**. V. 1839, n. 9, p.743-50, 2014.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ÂNGULO, E. E. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **J. Biomed. and Biotech**. 15 p. , 2010.

- MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiol.** v. 6, p. 459–474, 2011.
- MORI, S.; BARTH, H. G. Size Exclusion Chromatography. Berlim. 1st Edição. Editora **Springer Verlag Pod.** 248p., 1999.
- MORRIS, J.; WANG, Z.; DREW, M.; ENGLUND, P.; Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. **EMBO J.** v. 21, n. 17, p. 4429-38, 2002
- MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; DA SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C. D. C.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Annals Braz. Acad. Sciences**, v. 77, n. 1, p. 77-94, 2005.
- MYONG, S.; CUI, S.; CORNISH, P. V.; KIRCHHOFER, A.; GACK, M. U.; JUNG, J. U.; HOPFNER, K.; HA, T. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. **Science**. 2009; 323:1070–1074, 2009.
- NAKAAR, V.; DARE, A. O.; HONG, D., ULLU, E., TSCHUDI, C. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 10, p. 6736-6742, 1994.
- NAYAK, N.R.; PUTNAM, A.A.; ADDEPALLI, B.; LOWENSON, J.D.; CHEN, T.; JANKOWSKY, E.; PERRY, S.E.; DINKINS, R.D.; LIMBACH, P.A.; CLARKE, S.G.; DOWNIE, A.B. An Arabidopsis ATP-dependent, DEAD-box RNA helicase loses activity upon IsoAsp formation but is restored by protein Isoaspartyl Methyltransferase. **Plant Cell**. v.25, n. 7, p. 2573-2586, 2013.
- NEUMANN, N.; LUNDIN, D.; POOLE, A. M. Comparative genomic evidence for a complete nuclear pore complex in the last eukaryotic common ancestor. **PLoS One**. v. 5, artigo 13241, 2010.
- NEWO, A.N. Molecular modeling of the Plasmodium falciparum pre-mRNA splicing and nuclear export factor PfU52. **Protein J.** v. 33, n. 4, p. 354-68, 2014.
- OHYAMA, Y.; ITO, H.; KOBAYASHI, Y.; IKKA, T.; MORITA, A.; KOBAYASHI, M.; IMAIZUMI, R.; AOKI, T.; KOMATSU, K.; SAKATA, Y.; IUCHI, S.; KOYAMA, H. Characterization of AtSTOP1 orthologous genes in tobacco and other plant species. **Plant Physiol.** v.162, n. 4, p. 1937-46, 2013.
- PACE, C.N.; HORN, G.; HEBERT, E.J.; BECHERT, J.; SHAW, K.; URBANIKOVA, L.; SCHOLTZ, J.M.; SEVCIK, J. Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability. **J. Mol. Biol.** v.312, p. 393–404, 2001.
- PANTOLIANO, M.W.; PETRELLA, E.C.; KWASNOSKI, J.D.; LOBANOV, V.S.; MYSLIK, J.; GRAF, E.; CARVER, T.; ASEL, E.; SPRINGER, B.A.; LANE, P.; SALEMME, F.R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, p. 429-440, 2001.
- PATEL, S.S.; PICHA, K.M. Structure and function of hexameric helicases. **Annu. Rev. Biochem.** v.69, p. 651-697, 2000.

- PEDROSA, A.L.; CRUZ, A.K. The effect of location and direction of an episomal gene on the restoration of a phenotype by functional complementation in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol.** v.122, n. 2, p. 141-148, 2002.
- PFLANZ, R.; VOIGT, A.; YAKULOV, T.; JÄCKLE, H. *Drosophila* gene *tao-1* encodes proteins with and without a Ste20 kinase domain that affect cytoskeletal architecture and cell migration differently. **Open Biol.** v.5, n. 1, artigo 140161, 2015.
- PRASHER, D.C.; ECKENRODE, V.K.; WARD, W.W.; PRENDERGAST, G.; CORMIER, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene.** v.111, n.2, p. 229-33, 1992.
- PRASHER, D.C. Using GFP to see the light. **Trends Genet.** v. 11, n. 8, p. 320-3, 1995
- PREUßER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 302, p. 221-4, 2012.
- PUGH, G.E.; NICOL, S.M.; FULLER-PACE, F.V. Interaction of the *Escherichia coli* DEAD box protein DbpA with 23 S ribosomal RNA. **J. Mol. Biol.** v. 292, p. 771–778, 1999.
- RAJAGOPAL, V.; GURJAR, M.; LEVIN, M. K.; PATEL, S. S. The Protease Domain Increases the Translocation Stepping Efficiency of the Hepatitis C Virus NS3-4A helicase. **J Biol Chem.** v. 285, p.17821–17832, 2010.
- REN, Y.; SEO, H.S.; BLOBEL, G.; HOELZ, A. Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.107, p. 10406–10411, 2010.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, S.; HURT, E. Linking gene regulation to mRNA production and export. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v.23, p. 302–309, 2011.
- RICHARD, A.J.; LIU, C.C.; KLINGER, A.L.; TODD, M.J.; MEZZASALMA, T.M.; LICATA, V.J. Thermal stability landscape for Klenow DNA polymerase as a function of pH and salt concentration. **Biochim Biophys Acta** v.1764, p. 1546–1552, 2006.
- RODRIGUES, J.P.; RODE, M.; GATFIELD, D.; BLENCOWE, B.; CARMO-FONSECA, M. *et al.* REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.98, p. 1030–1035, 2001.
- RODRIGUEZ, M.S.; DARGEMONT, C.; STUTZ, F. Nuclear export of RNA. **BIOL CELL.** v. 96, p. 639–655, 2004
SOROKIN, A.V.; KIM, E.R.; OVCHINNIKOV, L.P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. **Biochemistry (Mosc)** v.72, p.1439–1457, 2007.
- ROGERS, G.W.J.; RICHTER, N.J.; MERRICK, W.C. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. **J. Biol. Chem.** v.274, p. 12236–12244. 1999.
- ROGERS, G.W.J.; LIMA, W.F.; MERRICK, W.C. Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. **J. Biol. Chem.** v.276, p. 12598–12608, 2001.
- ROSE, G.D.; WOLFENDEN, R. Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v.22, p. 381–415, 1993.

- RUSCONI, F.; DURAND-DUBIEF, M.; BASTIN, P. Functional complementation of RNA interference mutants in trypanosomes. **BMC Biotechnol.** v.9, n. 5, p.6, 2005
- RUDENKO, G.; African trypanosomes: the genome and adaptations for immune evasion. *Essays Biochem.* v.51, p. 47-62, 2011.
- SALI A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, **J. Mol. Biol.** v. 234, p. 779–815, 1993.
- SEIDEL, R.; BLOOM, L. G.; DEKKER, C.; SZCZELKUN, M. D. Motor step size and ATP coupling efficiency of the dsDNA translocase EcoR124I. **EMBO J.** v.27, p. 1388–1398, 2008.
- SERPELONI, M.; VIDAL, N. M.; GOLDENBERG, S.; ÁVILA, A. R; HOFFMANN, F. G. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC Evolutionary Biology.** v.11, p. 7, 2011a.
- SERPELONI, M.; MORAES, C.B.; MUNIZ, J.R.; MOTTA, M.C.; RAMOS, A.S.; KESSLER, R.L.; INOUE, A.H.; et al. An Essential Nuclear Protein in Trypanosomes Is a Component of mRNA Transcription/Export Pathway. **PLoS ONE.** v.6, artigo 20730, 2011b.
- SHEN, J.; ZHANG, L.; ZHAO R. Biochemical Characterization of the ATPase and Helicase Activity of UAP56, an Essential Pre-mRNA Splicing and mRNA Export Factor. **J. Bio. Chem.** v. 282, n. 31, p. 22544–22550, 2007.
- SHI, H.; CORDIN, O.; MINDER M.; LINDER, P.; MING XU R. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. **PNAS.** v.101, n. 51, p. 17628–17633, 2004.
- SCHÖN, A.; MADANI, N.; KLEIN, J.C.; HUBICKI, A.; NG, D.; YANG, X.; SMITH, A.B.; SODROSKI, J.; FREIRE, E.; Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. **Biochemistry.** v. 45, n. 36, p.10973-10980, 2006.
- STRASSER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature** v.413, p. 648–652, 2001.
- STRASSER, K.; MASUDA, S.; MASON, P.; PFANNSTIEL, J.; OPPIZZI, M. et al. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. **Nature** 417: 304–308, 2002.
- STORY, R.M.; LI, H.; ABELSON, J.N. Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.98, p.1465–1470, 2001.
- STUDART-GUIMARÃES, C.; GIBON, Y.; FRANKEL, N.; WOOD, C.C.; ZANORI, M.I.; FERNIE, A.R.; CARRARI, F. Identification and characterization of the α and β subunits of succinyl CoA ligase of tomato. **Plant Molecular Biology.** v.59, p. 781-791, 2005.
- SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Exp. Parasitol.** v. 114, p. 279–88. 2006.

- THAKURTA, A.G.; WHALEN, W.A.; YOON, J.H.; BHARATHI, A.; KOZAK, L.; WHITEFORD, C.; LOVE D.C.; HANOVER, J.A.; DHAR, R. Crp79p, like Mex67p, is an auxiliary mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol Biol Cell**. v. 13, n. 8, p.2571-84. 2002.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; WEATHERLY, C.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* Genome. **BMC Genomics**, vol. 10, artigo 255, 2009.
- TOMKO, E. J.; FISCHER, C. J.; NIEDZIELA-MAJKA, A.; LOHMAN, T. M. Anonuniform stepping mechanism for E. coli UvrD monomer translocation along single-stranded DNA. **Mol .Cell**. v. 26, p. 335–347, 2007.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J.; GAY, N.J. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO J**. v. 1, p. 945–951, 1982.
- WANG, X.Y.; GUO, Y.Q.; ZHANG, W.J.; SHAO, X.X.; LIU, Y.L.; XU, Z.G.; GUO, Z.Y. The electrostatic interactions of relaxin-3 with receptor RXFP4 and the influence of its B-chain C-terminal conformation. **FEBS J**.v. 281, n. 13, p.2927-2936, 2014.
- WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 125, p. 211–216, 2002.
- WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G.A.M. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 99, p. 89–101. 1998.
- World Health Organization – WHO. **Chagas disease**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acessado em 03 jan 2015.
- WURST, M.; SELIGER, B.; JHA, B.A.; KLEIN, C. *et al.* Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream-form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol**. v.83, p. 1048–1063, 2012.
- YADAV, A.; SINGH, S.L.; YADAV, B.; KOMATH, S.S. Saccharomyces cerevisiae Gpi2, an accessory subunit of the enzyme catalyzing the first step of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, selectively complements some of the functions of its homolog in Candida albicans. **Glycoconj J**. v. 31, p.497-507, 2014.
- YANG, Q.; JANKOWSKY, E. The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. **Nat Struct Mol Biol**. v.13, p.981–986, 2006.
- YANG, Q.; CAMPO, M. D.; LAMBOWITZ, A. M.; JANKOWSKY, E. DEAD-Box Proteins Unwind Duplexes by Local Strand Separation. **Mol Cell**. v.28, p.253–263, 2007.
- YU, J.; CHENG, W.; BUSTAMANTE, C.; OSTER, G. Coupling Translocation with Nucleic Acid Unwinding by NS3 Helicase. **J Mol Biol**. v. 404, p. 439–455, 2010

VEDADI, M.; NIESEN, F.H.; ALLALI-HASSANI, A.; FEDOROV, O.Y.; FINERTY, P.J.; WASNEY, G.A.; YEUNG, R.; ARROWSMITH, C.; BALL, L.J.; BERGLUND, H.; HUI, R.; MARSDEN, B.D.; NORDLUND, P.; SUNDSTROM, M.; WEIGELT, J.; EDWARDS, A.M. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.103, p. 15835–15840, 2006.

ZHAO, R.; SHEN, J.; GREEN, M.R.; MACMORRIS, M.; BLUMENTHAL, T. Crystal structure of UAP56, a DExD/H-box protein involved in pre-mRNA splicing and mRNA export. **Structure**. v.12, p.1373–1381, 2004.

ZHANG, M.; GREEN, M. R. Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. **Genes Dev**. v.15, p. 30-35, 2001.

ZHANG Z. M.; YANG, F.; ZHANG J.; TANG Q.; LI, J.; GU, J.; ZHOU, J.; XU Y. Crystal Structure of Prp5p Reveals Interdomain Interactions that Impact Spliceosome Assembly. **Cell Reports**. v.5, p. 1269–1278, 2013.

ZHOU, Z.; LUO, M.J.; STRAESSER, K.; KATAHIRA, J.; HURT, E. *et al.* The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. **Nature**. v.407, p. 401–405, 2000.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. “A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI,” **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, no. 7, p. 1051–1054, 2009.