



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA



**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS QUE
COMPÕEM O COMPLEXO *SPLICEOSOMAL* EM
TRIPANOSOMATÍDEOS”**

DANIELA LUZ AMBRÓSIO



ARARAQUARA

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS QUE
COMPÕEM O COMPLEXO *SPLICEOSOMAL* EM
TRIPANOSOMATÍDEOS”**

DANIELA LUZ AMBRÓSIO

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de doutor em Biociências e

Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração Biologia Molecular

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

ARARAQUARA

2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas, pertencente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara e na *University of Connecticut Health Center*, Farmington, CT, USA (sob supervisão do Prof. Dr. Arthur Günzl), com apoio da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através da concessão de uma bolsa de doutorado e uma bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE, proc. BEX1338/06-4), e auxílio à pesquisa FAPESP (proc. 2007/07476-0).

A Deus que sempre está ao meu lado, iluminando meu caminho.

*Aos meus pais Cíntia e Hamilton, minhas irmãs Rafaela e Marcela,
ao meu sobrinho Enzo e ao Andy, pelo amor, incentivo e
compreensão, principalmente durante o período no exterior.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Regina Cicarelli por todo apoio e incentivo, que foram fundamentais para o meu crescimento científico, profissional e pessoal, e pela amizade.

Ao Prof. Arthur Günzl por ter me recebido em seu laboratório, pelo incentivo e pelas discussões científicas, e aos seus alunos Ju, Tu, Schimi e Jens pelo apoio técnico e amizade.

Ao Aswini Panigrahi, PhD. pelas análises de espectrometria de massas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil e no exterior (Capes/PD/E.E).

Às funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia e Laura pelos serviços prestados e atenção.

Às minhas queridas amigas Aline, Mirela e Tati que sempre estiveram ao meu lado dando apoio em todos os momentos.

À todos do meu laboratório, todos estagiários e pós-graduandos, Gabi, Joyce, Greici e em especial ao Marco Túlio pelas discussões científicas, apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório de parasitologia (Júlio, Cláudia, Sueli, Vagner, Márcia, Aristeu, etc) pela convivência maravilhosa e pelo apoio técnico.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, o meu muito obrigada!

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”

(Pasteur)

ÍNDICE

	página
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. Tripanosomatídeos e Tripanosomíases.....	1
1.1. Ordem <i>Kinetoplastida</i> , Família <i>Trypanosomatidae</i>	1
1.1.1. Organização estrutural.....	1
1.1.2. Morfologia.....	3
1.2. <i>Trypanosoma brucei</i> e Doença do Sono.....	5
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas.....	8
1.4. Leishmanias e Leishmanioses.....	12
1.5. Doenças Negligenciadas.....	15
2. Parasitologia Molecular.....	17
2.1. Processamento dos RNAs.....	17
2.1.1. <i>Cis-splicing</i>	18
2.1.2. <i>Trans-splicing</i>	23
2.2. Ribonucleoproteínas (snRNPs).....	27
2.2.1. U1 snRNP.....	31
2.2.2. U2 snRNP.....	33
2.2.3. U4/U6 snRNP e U4/U6.U5 tri-snRNP.....	34
2.2.4. U5 snRNP.....	36
2.2.5. SL RNP.....	37
2.3. Fatores de <i>splicing</i>	38
OBJETIVOS.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
1. Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	41

2. Amplificação por PCR e clonagem em vetores.....	41
2.1. Construção dos oligonucleotídeos para PTP- <i>tag</i>	41
2.2. Amplificação por PCR e purificação do produto.....	42
2.3. Reação de ligação e transformação.....	44
2.4. Confirmação da clonagem, obtenção do plasmídeo recombinado e sequenciamento.....	46
2.5. Subclonagem em vetor pC-PTP-neo.....	46
3. Transfecção dos plasmídios pC-PTP-neo recombinados em <i>T. brucei</i> e confirmação dos clones.....	47
3.1. Preparo do DNA.....	48
3.2. Preparo dos parasitas.....	48
3.3. Transfecção.....	48
3.4. Confirmação dos clones positivos.....	49
3.4.1. Obtenção rápida de DNA genômico de <i>T. brucei</i>	49
3.4.2. Reação de PCR.....	50
3.4.3. <i>Western blot</i>	50
4. Preparação do extrato para a purificação das proteínas contendo PTP- <i>tag</i>	51
5. Purificação do PTP- <i>tag</i>	52
5.1. Análise da eficiência da purificação.....	54
6. Espectrometria de massas.....	55
7. Análise da ligação aos snRNAs pela reação de <i>primer extension</i>	55
7.1. Marcação radioativa dos oligonucleotídeos.....	56
7.2. Obtenção do RNA.....	56
7.3. <i>Primer Extension</i>	57
8. Imunolocalização das proteínas fusionadas ao PTP.....	58
 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 60
 CONCLUSÕES.....	 82
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas identificadas após purificação de SmD1-PTP.

Tabela 2: Porcentagem de identidade entre seqüências de *T. brucei* quando comparadas com *T. cruzi* e *L. major*.

Tabela 3: Resumo dos dados obtidos com as proteínas estudadas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema geral da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*
- Figura 2:** Formas amastigotas
- Figura 3:** Forma promastigota
- Figura 4:** Formas epimastigotas
- Figura 5:** Formas tripomastigotas
- Figura 6:** David Bruce
- Figura 7:** Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono
- Figura 8:** Carlos Chagas
- Figura 9:** Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas
- Figura 10:** Manifestações clínicas da doença de Chagas
- Figura 11:** Willian Leishman e Charles Donovan
- Figura 12:** Ciclo biológico da transmissão da Leishmaniose
- Figura 13:** Leishmanioses
- Figura 14:** Sinalização para reação de *cis-splicing*
- Figura 15:** Reação de *cis-splicing*
- Figura 16:** Formação do spliceosomo U2-dependente
- Figura 17:** Sinalização para reação de *trans-splicing*
- Figura 18:** Comparação entre os mecanismos de *cis* e *trans-splicing*
- Figura 19:** Modelo do core Sm e sua variação em U2 e U4 snRNPs
- Figura 20:** Biogênese de U1, U2, U4 e U5 snRNPs
- Figura 21:** Biogênese de U6 snRNP
- Figura 22:** Estrutura de U1 snRNP
- Figura 23:** Modelo esquemático da interação das proteínas específicas de U4/U6 snRNPs

Figura 24: Modelo esquemático da interação proteína-proteína no tri-snRNP

Figura 25: Esquema da construção dos oligonucleotídeos

Figura 26: Mapa do vetor pTz18U

Figura 27: Mapa do vetor PC-PTP-neo

Figura 28: Esquema da purificação do PTP-*tag*

Figura 29: *Western blot* do clone PCR-positivo para a transfecção de SmD1-PTP

Figura 30: *Western blot* das etapas de purificação de SmD1-PTP e eletroforese em gel Tris-HCl 10-20% gradiente

Figura 31: Reação de *Primer extension* das proteínas p18; p16,2; p35; p65,5 e p13,2

Figura 32: Alinhamento da sequência de p18 dos tripanosomatídeos com outras seqüências de U1-A conhecidas

Figura 33: Alinhamento da sequência de p16,2 dos tripanosomatídeos e com seqüências de SRRM2 de outros organismos

Figura 34: Reação de *primer extension* das proteínas p87,7; p42; p31; p17 e p92,2

Figura 35: Imunolocalização das proteínas PTP-tagged

ABREVIATURAS E SIGLAS

aas	aminoácidos
dATP	desoxiriboadenosina trifosfatada
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfatados
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ETOH	alcool etílico
FT	<i>flow-through</i>
IFI	imunofluorescência indireta
LB	Luria-Bertani
2-Me	2-mercaptoetanol
NaAc	Acetato de sódio
nt	nucleotídeo
Oligos S	oligonucleotídeo (<i>primer</i>) sense
Oligo AS	oligonucleotídeo (<i>primer</i>) antisense
PAGE	gel de poliacrilamida
PCR	reação de polimerase em cadeia
PE	Reação de " <i>Primer Extension</i> "
PNK	polinucleotídeo quinase
PTP	P roteína C, sítio de clivagem TEV protease, P roteína A
q.s.p.	quantidade suficiente para
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida com SDS
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	temperatura ambiente
ZPMF	<i>Zimmerman Post-Fusion medium</i>
WB	<i>western blot</i>

RESUMO

Em tripanosomatídeos, o processo de *trans-splicing* é responsável pelo processamento dos pré-mRNAs policistrônicos, resultando na individualização de cada gene, de modo que cada mRNA contenha a seqüência *spliced leader* (SL) na extremidade 5'. Esse processo requer a participação das ribonucleoproteínas (snRNPs) U2, U4/U6, U5 e SL RNP, que são constituídas por snRNAs, sete proteínas Sm (comuns a todos) e proteínas específicas de cada partícula. Neste trabalho, a proteína SmD1-PTP *tagged* foi produzida *in vivo* em formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, purificada e as proteínas ligadas a ela foram analisadas por espectrometria de massas (LC/MS/MS), tendo sido identificadas 41 proteínas que interagem com essa partícula, das quais 16 foram anotadas como proteínas conservadas hipotéticas. Dez proteínas conservadas hipotéticas foram PTP-*tagged* para a análise de ligação aos snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6 e SL), utilizando a reação de *primer extension*, após a purificação com *beads* de IgG e extração do RNA. Dentre as proteínas estudadas, identificou-se um homólogo de proteína específica U1-A, uma proteína Lsm, duas proteínas U5 específicas, uma proteína U4/U6 específica e três proteínas que não se ligam diretamente a esses snRNAs, mas que provavelmente participam do mecanismo como fatores de *splicing*.

Palavras-chave: ribonucleoproteínas, snRNP, snRNA, tripanosomatídeos, *splicing*

ABSTRACT

In trypanosomatids, the trans-splicing reaction is responsible for the polycistronic pre-mRNA processing to generate individual genes which contain the 5' end spliced leader (SL) sequence. The ribonucleoproteins (snRNPs) U2, U4/U6, U5 and SL RNP, which consist of snRNAs, seven Sm proteins (common for all) and specific proteins for each particle, participate in the process. In this work, the protein SmD1-PTP tagged was produced *in vivo* in procyclic forms of *Trypanosoma brucei*, it was purified and the binding proteins were identified by mass spectrometry (LC/MS/MS). It was possible the identification of 41 proteins that interact with this particle. Among them, 16 proteins were annotated as conserved hypothetical proteins. Ten conserved hypothetical proteins were PTP-tagged for the snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6 e SL) binding analysis using the primer extension reaction, after the IgG purification and RNA extraction. Among the proteins analysed, it was possible the identification of a homolog of the specific protein U1-A, one LSm protein, two U5 specific proteins, one U4/U6 specific protein and three proteins that did not present direct binding with the snRNAs analyzed that do not bind any of these snRNAs directly, but probably participate in the processing as splicing factors.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Tripanosomatídeos e Tripanosomíases

1.1. Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae

A ordem Kinetoplastida é composta por protozoários flagelados que apresentam cinetoplasto, porção de DNA circular presente na mitocôndria única dos parasitas (REY, 2001).

A família Trypanosomatidae reúne parasitas que infectam uma variedade de organismos e que possuem um único flagelo, com tamanhos que variam de 2-130 μm . Dentre os membros dessa família destacam-se, pela sua importância médica e econômica, os agentes causais das leishmanioses e tripanosomíases humanas (doença de Chagas e doença do sono) e de animais domésticos (nagana, surra, durina, mal-de-cadeiras, etc). A família *Trypanosomatidae* subdivide-se em vários gêneros, sendo mais estudados os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (REY, 2001).

1.1.1. Organização estrutural

A Fig. 1 mostra as principais estruturas celulares presentes nos tripanosomatídeos. Além das organelas presentes em todos os organismos eucariotos, destacamos a presença de uma única mitocôndria, que se ramifica por todo o corpo e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar. A mitocôndria, além de possuir o DNA mitocondrial como em outros

organismos, apresenta também um DNA que se organiza na forma de minicírculos (30% do DNA total da célula). Esse DNA se concentra em uma determinada região da mitocôndria, dando origem a uma estrutura chamada de cinetoplasto, importante na diferenciação das formas em que os parasitas podem ser encontrados durante o ciclo biológico (REY, 2001).

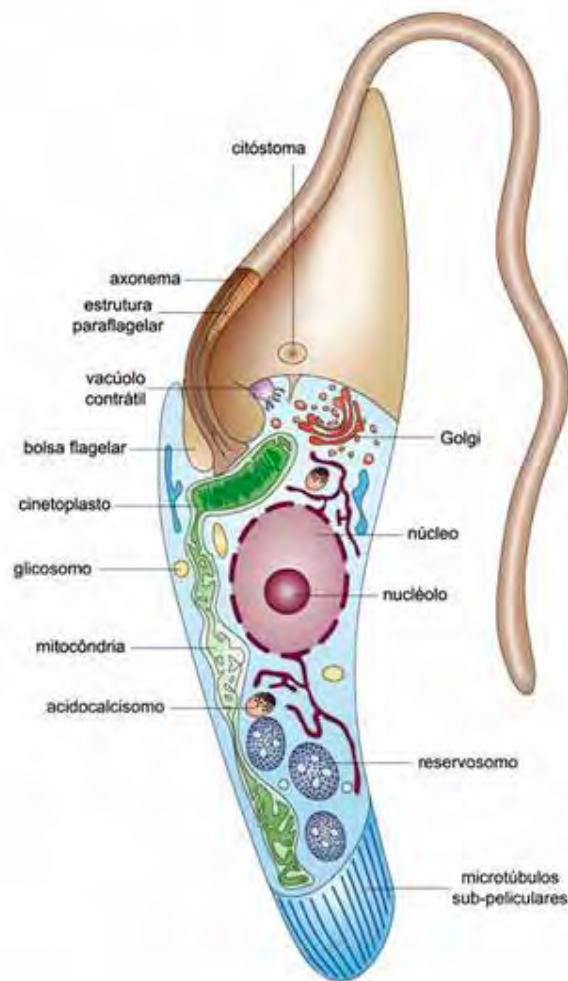


Figura 1: Esquema geral da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* ([http:// www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13](http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13)).

1.1.2. Morfologia

A morfologia dos parasitos da família Trypanosomatidae é diversa, dependendo da fase do ciclo biológico ou circunstâncias do meio em que se encontram (REY, 2001).

A forma amastigota apresenta pequenas dimensões e uma forma circular, ovóide ou fusiforme (Fig. 2). Apresenta pouco citoplasma, núcleo relativamente grande e redondo, cinetoplasto visível e flagelo curto que não se exterioriza (REY, 2001).

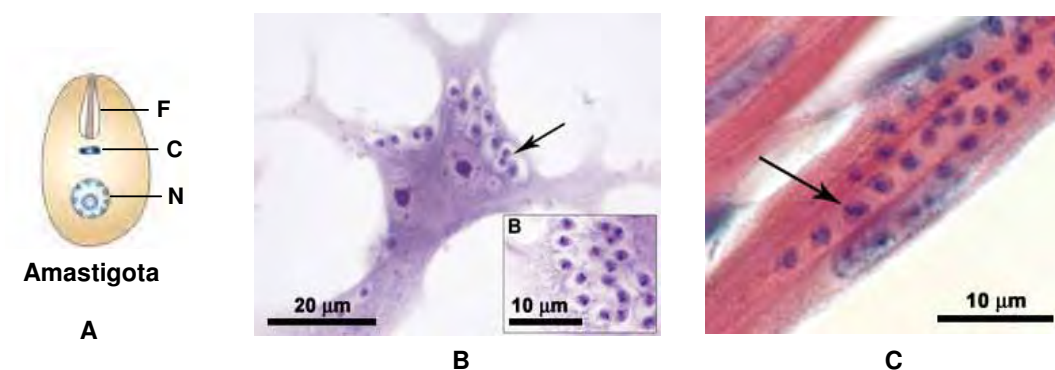


Figura 2: A) Forma esquemática de uma amastigota, N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo. B) Formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* (seta). C) Músculo cardíaco de camundongo infectado com formas amastigotas *T. cruzi* (seta).

A forma promastigota é longa e achatada, com núcleo situado na porção média e cinetoplasto anterior ao núcleo, de onde emerge o flagelo, na porção anterior da célula (Fig. 3) (REY, 2001).

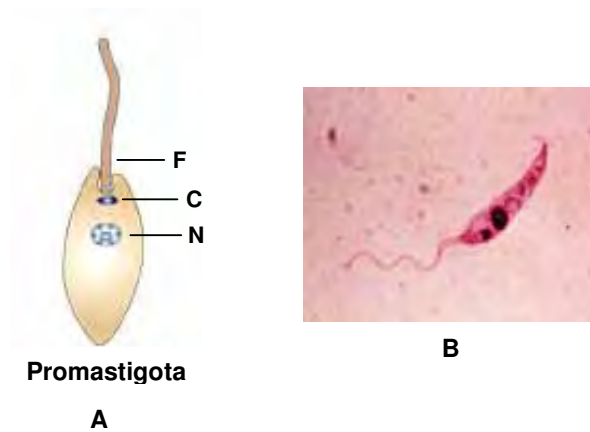


Figura 3: A) Forma esquemática de uma promastigota, N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo. B) Promastigota de *Leishmania* sp.

Já a forma epimastigota é mais alongada, com núcleo situado na porção média, com cinetoplasto justanuclear, na região anterior do parasita (Fig. 4). O flagelo emerge da região do cinetoplasto, formando uma membrana ondulante, que se torna livre na porção anterior (REY, 2001).

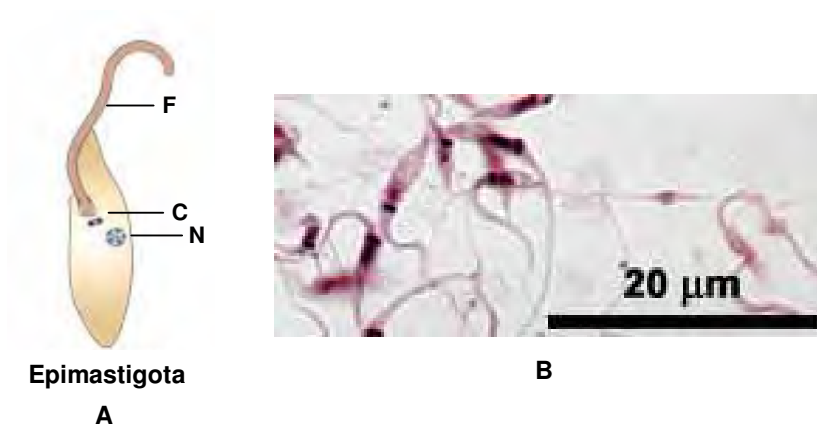


Figura 4: A) Forma esquemática de uma epimastigota, N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo. B) Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultura.

A forma tripomastigota assemelha-se à epimastigota, mas com o cinetoplasto posterior ao núcleo, próximo da extremidade posterior do parasita e

com flagelo que se estende por toda a célula, tornando-se livre na porção anterior (Fig. 5) (REY, 2001).

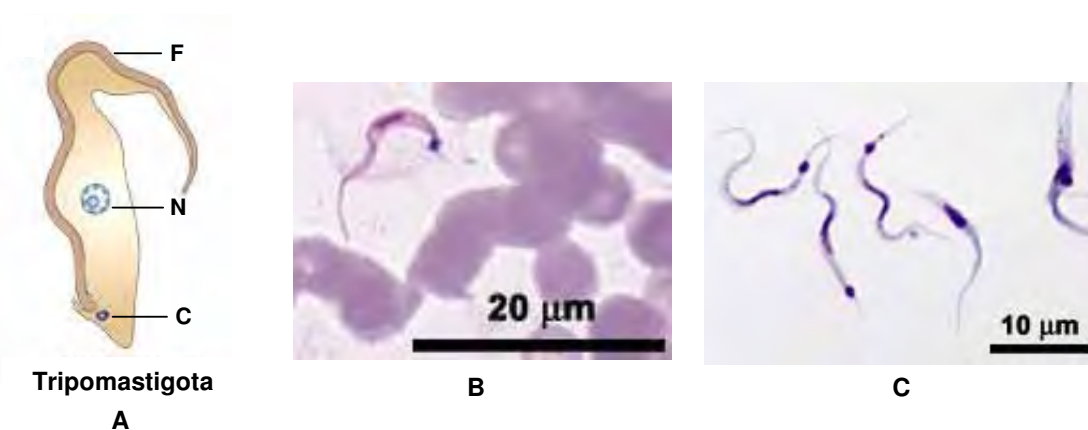


Figura 5: A) Forma esquemática de uma tripomastigota, N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo. B) Formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*. C) Formas tripomastigotas metacíclicas (*in vitro*).

1.2. *Trypanosoma brucei* e Doença do Sono

A tripanosomíase africana ou doença do sono é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subspécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*, espécie encontrada em animais domésticos, relacionada à doença denominada de nagana. A distribuição desses tripanosomas é exclusiva da África, sendo transmitido por moscas do gênero *Glossina*, mais conhecidas como moscas tsé-tsé (COX, 2004). A Organização Mundial da Saúde estima que o número de pessoas infectadas esteja entre 300.000 e 500.000, mas não existe um número exato (WHO, 2005).

O *T. b. gambiense*, encontrado no oeste e região central da África, causa a doença do sono crônica ou gambiense, geralmente transmitida por moscas do

grupo *G. morsitans* que se alimentam de animais silvestres, representando mais de 90% dos casos (COX, 2004).

O *T. b. rhodesiense*, encontrado no leste da África, é o mais perigoso, causando a doença do sono aguda ou rhodesiense, geralmente transmitido por moscas do grupo *G. palpalis* que se alimentaram de outro humano, entretanto, cães e porcos também podem servir de reservatório. A doença se desenvolve rapidamente e representa menos de 10% dos casos (COX, 2004).

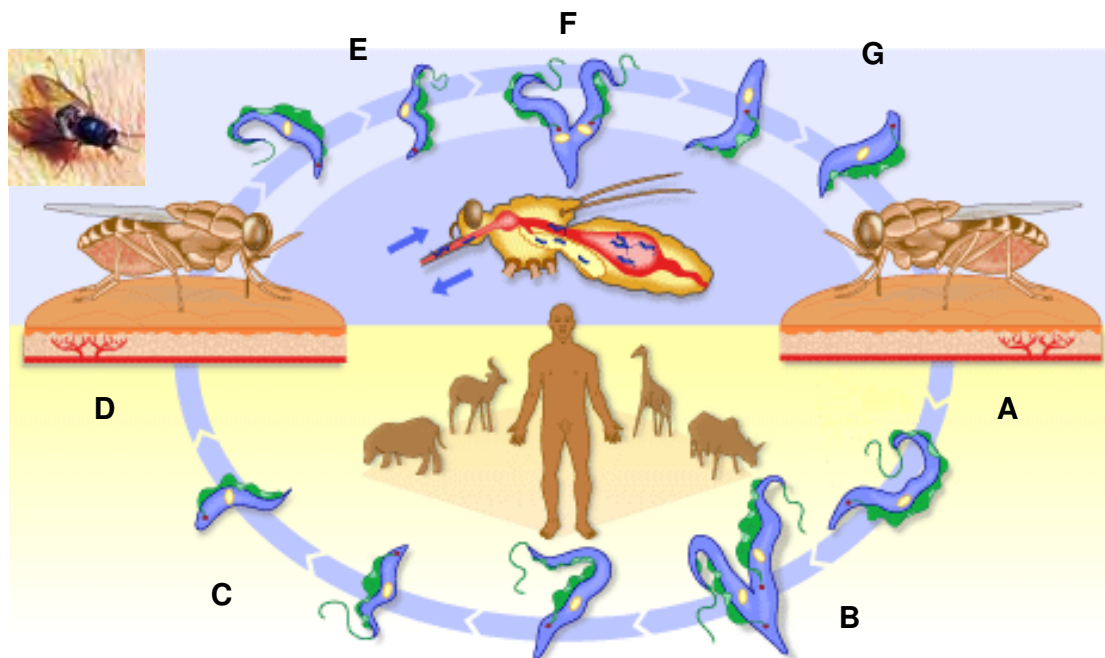
O *Trypanosoma brucei brucei* foi descoberto por David Bruce em 1894 (Fig. 6), associado a doenças em gado e outros animais domésticos e selvagens na África. Em 1902, após a observação de tripanosomas no sangue de um paciente por R. M. Forde, um cirurgião, J. E. Dutton identificou e descreveu o *T. gambiense* (atualmente *T. b. gambiense*). Mais tarde, em 1910, o *T. rhodesiense* (atualmente *T. b. rhodesiense*) foi descrito por Stevens & Fantham (COX, 2004).



Figura 6: David Bruce (1855-1931)

O ciclo completo da doença foi então descrito por David Bruce em 1914 (Fig. 7). Durante o ciclo da tripanosomíase africana, a mosca contaminada (*Glossina* sp) injeta formas tripomastigotas metacíclicas (A) durante a picada. O parasita se diferencia em forma tripomastigota sanguínea, que se multiplica na corrente sanguínea (B). Os parasitas se espalham pela corrente sanguínea, podendo atingir o sistema nervoso central. Com a alta parasitemia, essas formas se tornam mais curtas e largas (C). Outra mosca ingere essas formas tripomastigotas, contaminando-se (D). As formas tripomastigotas se diferenciam em formas procíclicas (E) e em seguida em epimastigotas que se multiplicam na

glândula salivar (F). Em seguida, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (G) e o ciclo inicia-se novamente.



<http://www.who.int/tdr/diseases/trypan/lifecycle.htm>

Figura 7: Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono. Ver explicação no texto anterior.

A sintomatologia da doença do sono pode ser variada, mas existem dois estágios clínicos que podem ser reconhecidos durante a infecção, o estágio hemolinfático inicial e o estágio encefálico tardio. O primeiro geralmente ocorre após 1-3 semanas após a picada, apresentando episódios de febre com linfadenopatia generalizada, seguidos de sintomas não específicos como vertigens, dores de cabeça, fraqueza generalizada e perda de peso. Vários órgãos podem ser atacados, como fígado, rins, coração, pele, sistema endócrino e olhos. Já no estágio encefálico tardio, observam-se sintomas neurológicos que envolvem anormalidades psiquiátricas, motoras, sensoriais e distúrbios do sono, podendo causar morte (KENNEDY, 2004).

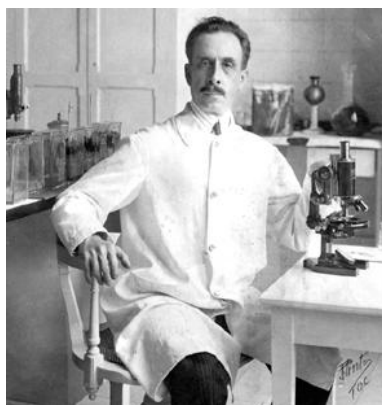
O diagnóstico da doença do sono é feito pela observação dos sinais clínicos, localização geográfica do paciente e exames laboratoriais. A determinação de *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* é de fundamental importância para o tratamento. O diagnóstico laboratorial compreende os métodos parasitológicos (lâmina corada de sangue, mais para *T. b. rhodesiense*; lâmina corada de punção do gânglio, para *T. b. gambiense*; e exame do líquido para a fase crônica), imunológicos (hemaglutinação, IFI, ELISA) e PCR (KENNEDY, 2004).

O tratamento do estágio inicial é feito com pentamidina (introduzida em 1940), para *T. b. gambiense* e, suramina (introduzida em 1920), para *T. b. rhodesiense*. A fase crônica possui um tratamento mais difícil, pois é necessário que o fármaco atravesse a barreira do SNC. São utilizados o melarprosol (introduzido em 1949), eficiente para ambas as espécies de *T. brucei* e eflortinina (introduzida em 1981), com ação sobre *T. b. gambiense* (KENNEDY, 2004; COX, 2004). Vários esforços estão sendo feitos na busca de uma vacina para a doença do sono, mas, devido à variação antigênica, dificilmente será obtida uma vacina eficaz (COX, 2004).

1.3. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas é causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelo inseto triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro. A doença foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (Fig. 8), pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, que também

identificou o agente causal (tripanosoma) e o vetor (triatomíneo) (CHAGAS, 1909; CHAGAS, 1911).



Existem mais de 40 espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*. O *Triatoma* sp. constitui-se um dos maiores transmissores dessa infecção, pela sua

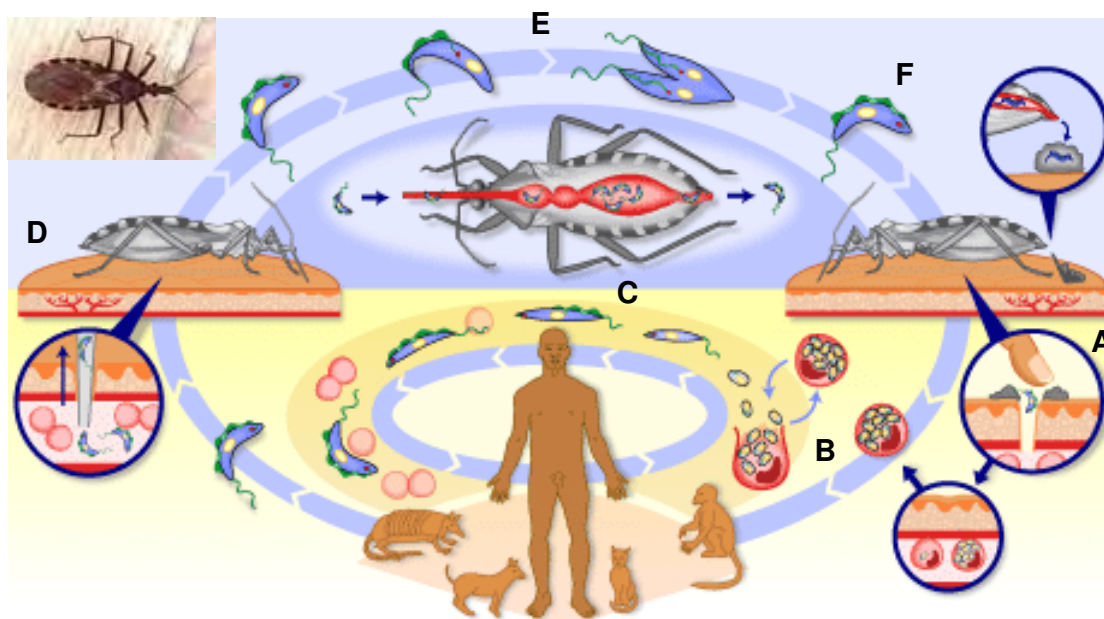
Figura 8: Carlos Chagas (1879-1934)

adaptação ao peri-domicílio rural e domicílio de ecossistemas secos da América Central e do Sul. Em seguida são destacados *Rhodnius* sp. e *Panstrongylus* sp. com importância epidemiológica (TEIXEIRA et al., 2006).

Estima-se que 13 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* na América central e do Sul. A incidência anual estimada de novos casos tem caído de 700-800 mil em 1980s para aproximadamente 200 mil, entretanto, a doença de Chagas ainda é um problema sério e necessita continuamente de medidas de controle e busca de tratamentos efetivos (WHO, 2005).

O ciclo biológico descrito por Carlos Chagas encontra-se a seguir (Fig. 9). Durante a picada, o triatomíneo contaminado com *T. cruzi* defeca próximo ao local e as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado pelo orifício da picada (A). Os parasitas invadem células do sistema fagocítico mononuclear cutâneo e se diferenciam em formas amastigotas, capazes de replicação (B). Essas formas são liberadas na corrente sanguínea, diferenciam-se em formas tripomastigotas que vão se disseminar pelo organismo, atacando músculos e tecidos (C). Um triatomíneo não infectado adquire as formas tripomastigotas ao picar um hospedeiro vertebrado contaminado (D). Essas formas se diferenciam em formas epimastigotas, capazes

de multiplicação no intestino posterior do vetor (E). Na ampola retal, os parasitas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes (F).



<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

Figura 9: Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas. Ver explicação no texto anterior.

O *T. cruzi* também pode ser transmitido através de transfusões sanguíneas que, com a migração de indivíduos contaminados de áreas endêmicas para outros países, tornou a doença uma ameaça, principalmente nos Estados Unidos, Canadá, Europa oriental, Austrália e Japão. A transmissão transplacentária tem sido reportada nos países da América Latina (prevalência de 2,5-9,5%) (TEIXEIRA et al., 2006). A via de transmissão oral tem chamado a atenção nos últimos anos, observando-se que entre 1968 e 2000, mais de 50% dos casos da doença de Chagas aguda tem sido atribuído a essa via de transmissão, principalmente pelo consumo de caldo de cana-de-açúcar e sucos de bacaba e

açai contaminados pelo parasita quando os triatomíneos contaminados são triturados juntamente com as frutas (COURA et al., 2002).

Na fase aguda, cerca de 95% dos pacientes são assintomáticos. Nos casos sintomáticos, observa-se a presença de sinal de Romanã (na conjuntiva) (Fig. 10) ou chagoma de inoculação (na pele) no local da picada, febre, dores nos músculos e nas juntas, sonolência, diarreia, edema, distúrbios respiratórios, cianose e até coma, podendo levar a morte. A fase aguda termina após 3-4 meses, quando se inicia a fase crônica. Apenas 1/3 dos pacientes chagásicos crônicos desenvolvem a sintomatologia da doença, sendo relatados que aproximadamente 94,5% apresentam problemas cardíacos (insuficiência cardíaca e arritmias) e os 5,5% restantes apresentam manifestações gastrointestinais (megacólon e megaesôfago) (Fig. 10), podendo resultar em morte (TEIXEIRA et al., 2006).

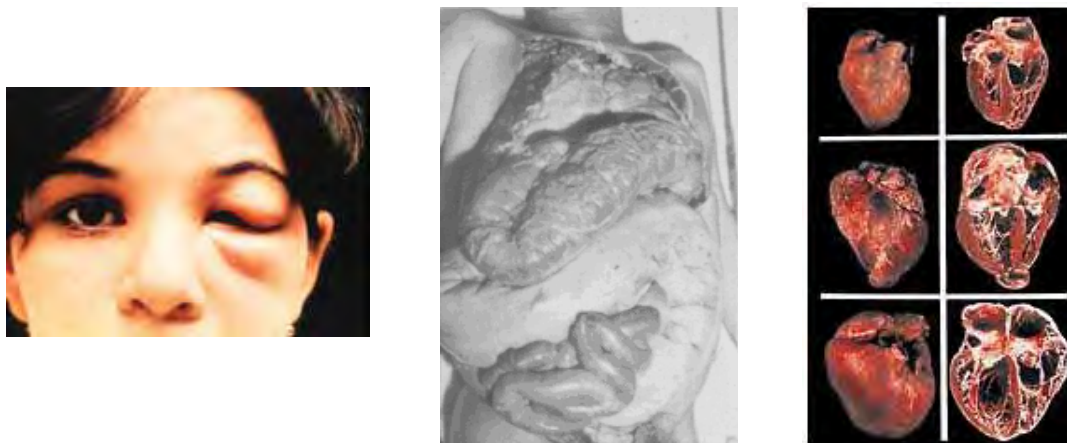


Figura 10: Sinais clínicos da doença de Chagas. A) sinal de Romanã. B) Manifestações gastrointestinais (megacólon e megaesôfago). C) Manifestações cardíacas (aumento do volume cardíaco).

O diagnóstico da fase aguda da doença pode ser realizado através da observação por microscopia óptica dos tripanosomas em amostras de sangue. Já

na fase crônica são necessários testes mais sensíveis como xenodiagnóstico, hemocultura e testes imunológicos como hemaglutinação indireta, IFI, ELISA e *imunoblot*. Os testes imunológicos podem apresentar reações cruzadas com outras infecções por kinetoplastidas e outras doenças como malária, toxoplasmose, tuberculose, etc; e com algumas condições de autoimunidade (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, etc). Os diagnósticos podem também ser confirmados por reações de PCR. Para a confirmação do diagnóstico de doença de Chagas, são necessários ao menos dois testes imunológicos positivos (TEIXEIRA et al., 2006).

Dois fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença, o nifurtimox e o benznidazol, que possuem efeitos citotóxicos e genotóxicos associados à sua estrutura química e que são parcialmente efetivos somente na fase aguda da doença (TEIXEIRA et al., 2006).

1.4. Leishmanias e Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por pelo menos 20 diferentes espécies de *Leishmania*, transmitidas por insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A



Figura 11: Willian Leishman e Charles Donovan
(1865-1936) (1863-1951)

Leishmania donovani foi observada em pacientes sofrendo de Kala-azar e foi descrita em 1903 por Leishman e Donovan (Fig. 11), simultaneamente, e assim esses parasitas foram classificados

como pertencentes ao gênero *Leishmania*. Mais tarde, entre 1904 e 1908, foi observado um parasita semelhante em crianças da região do Mediterrâneo que foi denominado de *Leishmania infantum*. Somente em 1941 foi demonstrada, por Adler e Ber, a transmissão da leishmaniose por flebotomíneos.

Durante o ciclo da doença (Fig. 12), o flebotomíneo inocula formas promastigotas de leishmania no hospedeiro vertebrado durante a picada (A). Essas formas invadem o sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em amastigotas, capazes de proliferação no interior dessas células (B). Após o rompimento da célula, as formas amastigotas são liberadas e parasitam outras células (C). Outro flebotomíneo infecta-se durante a picada do hospedeiro vertebrado contaminado ao ingerir macrófagos parasitados (D). As formas amastigotas são liberadas após o rompimento dos macrófagos no estômago do vetor, se diferenciam em promastigotas e multiplicam-se (E).

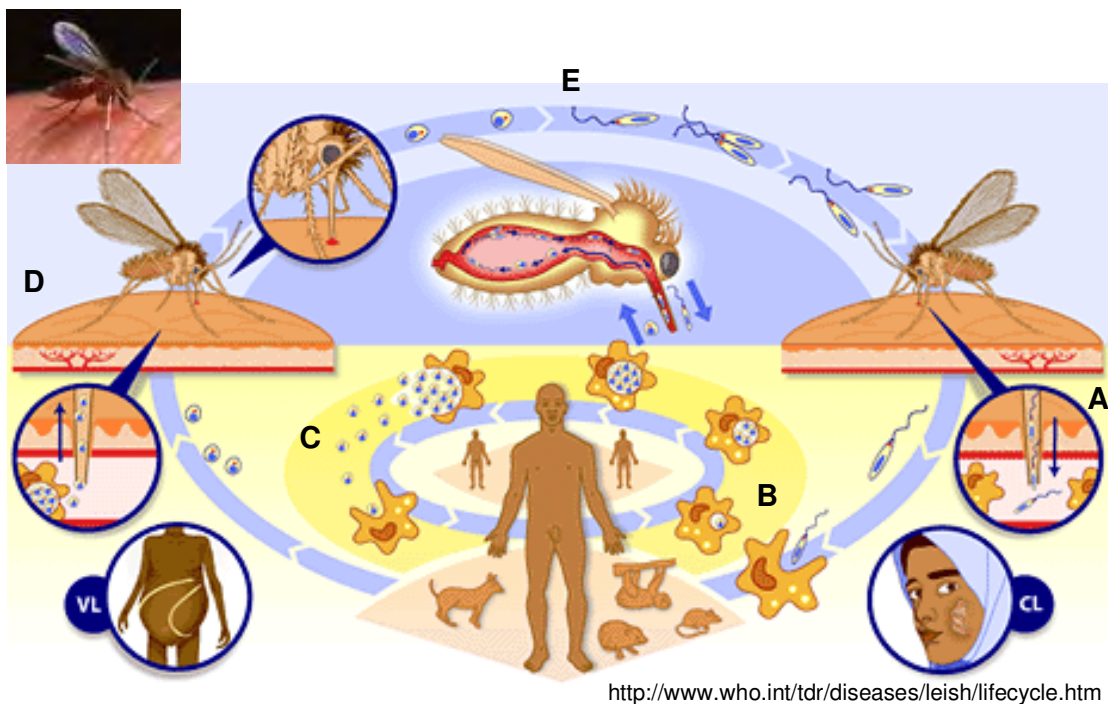


Figura 12: Ciclo biológico da transmissão das Leishmanioses. Ver explicação no texto anterior.

As leishmanioses são endêmicas em mais de 60 países, incluindo Sul da Europa, África do Norte, Oriente Médio, América central e do Sul, e subcontinente indiano (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Sabe-se que mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas e a cada ano surgem aproximadamente 1,5 milhões de novos casos da leishmaniose cutânea e 500 mil da visceral (WHO, 2005).

Três principais tipos de leishmaniose podem ser observados, a leishmaniose visceral, cutânea ou mucocutânea, que dependem da espécie e do zimodema a que pertence o parasita (Fig. 13). Na leishmaniose visceral são observados sintomas como febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pigmentação da pele, ou pode ser assintomática. Geralmente infecções bacterianas secundárias levam à morte em casos mais avançados da doença. A leishmaniose cutânea inicia-se com uma pápula no local da picada do inseto, que aumenta de tamanho, forma uma crosta e eventualmente ulcera. Já na mucocutânea há o envolvimento da mucosa do nariz, cavidade oral e faringe (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

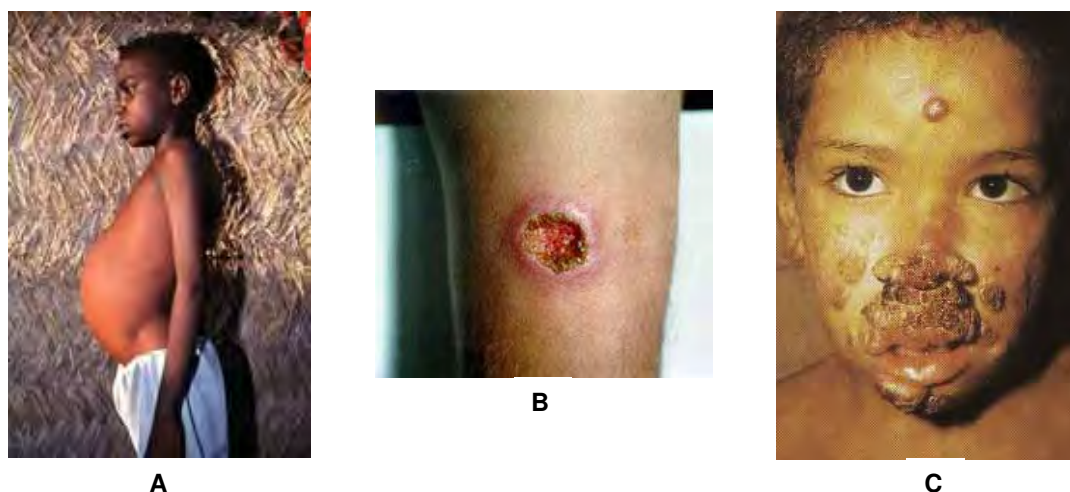


Figura 13: Diferentes tipos de leishmanioses. A) Leishmaniose visceral. B) Leishmaniose cutânea. C) Leishmaniose mucocutânea.

O diagnóstico da leishmaniose visceral é basicamente a detecção das formas amastigotas em aspirados de tecido ou biópsias (medula óssea, linfonodos e baço). Testes imunológicos podem ser utilizados, mas podem resultar em reação cruzada com outras doenças como Chagas, lepra, malária e esquistossomose. Para o diagnóstico de leishmaniose cutânea, o material retirado das lesões é analisado por microscopia ou então cultivado em meio de cultura para análises moleculares (mais sensível, mas mais difícil). Os métodos imunológicos não são sensíveis, mas o teste de Montenegro, que detecta reação de hipersensibilidade tardia, pode ser utilizado, mas não é possível a distinção entre uma infecção recente ou passada (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

O tratamento da leishmaniose visceral é baseado nos antimoniais pentavalentes, mas que possuem efeitos colaterais e observa-se resistência em vários casos. A anfotericina B é utilizada nos casos de resistência, mas é tóxico. A miltefosina é um fármaco efetivo administrado por via oral, sendo hoje a opção mais efetiva e segura de tratamento. Na leishmaniose cutânea, o tratamento pode ser local ou sistêmico, dependendo do tipo de leishmania presente. No tratamento local são utilizados paromomicina-metilbenzetonio e imiquimod. Para o tratamento sistêmico podem ser utilizadas pentamidina, fluconazol, cetoconazol, miltefosina e alopurinol (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

1.5. Doenças negligenciadas

As doenças negligenciadas são doenças que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças tropicais infecciosas que afetam

principalmente pessoas pobres, a exemplo da leishmaniose, doença do sono, malária e doença de Chagas, que geram um impacto devastador sobre a humanidade. Como resultado, por se tratarem de doenças que afetam pessoas pobres, não oferece um retorno lucrativo suficiente para que a indústria farmacêutica invista em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos voltados para as mesmas. Fica claro, portanto, que a crise de falta de medicamentos para doenças negligenciadas não chegou às atuais proporções por falta de conhecimento científico, e nem pela falta de interação entre a pesquisa básica e a pré-clínica. Esta crise é o resultado tanto das insuficientes políticas públicas voltadas para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos de interesse nacional dos países em desenvolvimento, quanto da falha de mercado, provocada pelo baixo interesse econômico que esses pacientes representam para a indústria. Associado a esses fatores comente-se a necessidade de formação de recursos humanos qualificados e de muitos estudos sobre a temática.

Diante desse panorama, foi criada a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi - *Drugs for Neglected Diseases initiative*), uma iniciativa sem fins lucrativos com o objetivo de criar e estimular esforços para a Pesquisa e o Desenvolvimento (P&D) de medicamentos para as doenças negligenciadas. Essa iniciativa foi criada em 2003 com o objetivo de iniciar e coordenar a P&D de medicamentos em parceria com a comunidade internacional de pesquisa, o setor público, a indústria farmacêutica, e outros parceiros relevantes. São parceiros dessa iniciativa a FIOCRUZ no Brasil, Conselho Indiano de Pesquisa Médica, Ministério da Saúde da Malásia, Instituto de Pesquisa Médica do Quênia, Instituto Pasteur da França, PNUD/Banco Mundial/Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização

Mundial de Saúde (OMS/TDR) e Médicos Sem Fronteiras (MSF) (www.dndi.org.br).

Além disso, podemos contar com o empenho de vários institutos de pesquisa e universidades que continuam na busca de novos alvos parasita-específicos e moléculas ativas, com a esperança de que, num futuro próximo, haja tratamentos eficazes para a cura de milhares de pessoas que sofrem com essas doenças.

2. Parasitologia Molecular

Denomina-se como parasitologia molecular o estudo dos parasitas e suas interações com seus hospedeiros, em nível molecular, para o entendimento dos mecanismos que permitem a esses organismos a sobrevivência, proliferação e interferência na saúde do hospedeiro. Dentre os vários mecanismos moleculares peculiares dos tripanosomatídeos, podemos citar o processamento dos RNAs por *trans-splicing* que, por ser um mecanismo não usual e não estar presente em mamíferos (somente *cis-splicing*) torna esse processamento e suas proteínas participantes importantes alvos parasita-específicos.

2.1. Processamento dos RNAs

A maioria dos genes eucarióticos são expressos na forma de um mRNA precursor, chamado de pré-mRNA, que é convertido em um mRNA maduro pelo mecanismo de *splicing*. Nos eucariotos superiores, cada seqüência que codifica

para uma proteína é transcrita independentemente, contendo a (s) sequência (s) de íntrons, regiões não codificadoras que serão removidas, e éxons, sequências codificadoras que serão unidas durante o *cis-splicing*. Já em tripanosomatídeos e outros eucariotos inferiores, são produzidos pré-mRNAs policistrônicos, ou seja, um único pré-mRNA codifica para vários genes (éxons), separados por sequências intergênicas (também denominados de íntrons) não codificantes que, em sua maioria, serão removidos por *trans-splicing* e os genes serão individualizados. O processamento dos pré-mRNAs por *cis* e *trans-splicing* é catalizado pelo spliceosomo, uma maquinaria de alto peso molecular composta por ribonucleoproteínas (RNPs) e outras proteínas. As ribonucleoproteínas (U1, U2, U4/U6, U5 e SL) se apresentam na forma de complexos de pequenos RNAs (snRNAs) e proteínas, capazes de catálise de RNA. Até o momento foram caracterizados dois tipos de spliceosomos, o maior U2-dependente e o U12-dependente (menos abundante) (LIANG et al., 2003; MAYER & FLOETER-WINTER, 2005; TYCOWSKI et al., 2006). Neste trabalho, abordamos o spliceosomo maior U2-dependente, que ocorre no processamento da maioria dos mRNAs.

2.1.1. *Cis-splicing*

Em síntese, no processamento do pré-mRNA por *cis-splicing* os íntrons são removidos e liberados na forma de uma estrutura em laço e os éxons unidos em uma mesma molécula de mRNA (LIANG et al., 2003; MAYER & FLOETER-WINTER, 2005). Para que haja o correto processamento do pré-mRNA é necessário o reconhecimento e pareamento dos sítios corretos de *splicing* 5' e 3'

e a definição das extremidades do íntron no início do processamento; para isso são utilizados nts que serão responsáveis por essa sinalização, como o GU no sítio de *splicing* 5' (sítio de clivagem 5'), AG no sítio de *splicing* 3' (sítio de clivagem 3'), A do *branch point* (sítio de ligação da extremidade 5' do íntron durante o processamento) e o trato de polipirimidinas (reconhecimento do *branch point*, seleção do sítio de *splicing* 3' e poliadenilação) (Fig. 14).

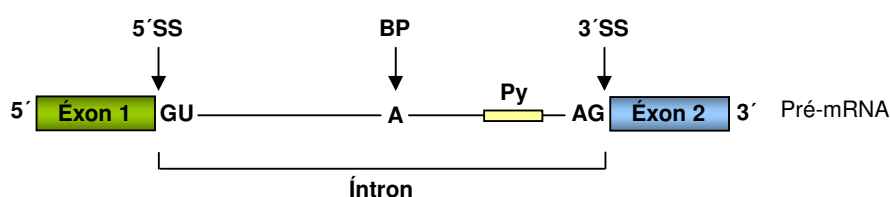


Figura 14: Sinalização para reação de *cis-splicing*. 5'SS: sítio de *splicing* 5', BP: *branch point*, Py: trato de polipirimidinas, 3'SS: sítio de *splicing* 3'.

Durante o *cis-splicing* (Fig. 15), U1 snRNP reconhece o sítio de *splicing* 5' (ATP-dependente), formando um complexo que compromete o pré-mRNA para a montagem do spliceossomo. Esse reconhecimento envolve o pareamento de bases entre os nts conservados na extremidade 5' de U1 snRNA e o sítio de *splicing* 5'. Após a ligação de U1 snRNP, U2 snRNP reconhece o *branch point* do pré-mRNA, com o auxílio das proteínas BPS, SF3a e SF3b, para a formação do complexo de *pré-splicing*, também pelo pareamento de bases de U2 snRNA (REED, 1996). U2AF, um heterodímero de U2AF35 e U2AF65, é requerido para a associação estável de U2 snRNP com BPS durante a formação do pré-spliceossomo. U2AF35 interage diretamente com o dinucleotídeo AG do sítio de *splicing* 3' (MERENDINO et al., 1999; WU et al., 1999). O U4/U5/U6 tri-snRNP se liga ao complexo, estabelecendo o conjunto do spliceossomo. Em seguida, há o

rearranjo de interações RNA-RNA que induz ao estado catalítico do spliceosomo. U6 se dissocia de U4, produz uma nova interação com U2 snRNA e desloca U1 snRNP que estava interagindo com a extremidade 5' do íntron. A primeira reação de transesterificação ocorre, gerando um laço intermediário e o corte do éxon 5'. Em seguida, ocorrem modificações conformacionais no spliceosomo que permitem a segunda reação de transesterificação. Neste passo, o éxon 5' é alinhado com o éxon 3', com auxílio de U5 snRNP, permitindo o ataque nucleofílico do 3'OH do éxon 5' no sítio de *splicing* 3'. Por fim, o íntron é liberado na forma de uma estrutura em laço e os éxons estão unidos formando o mRNA maduro. Toda a formação do spliceosomo e os rearranjos conformacionais das interações RNA-RNA são mediados por um grande número de fatores protéicos não-snRNPs (TYCOWSKI et al., 2006).

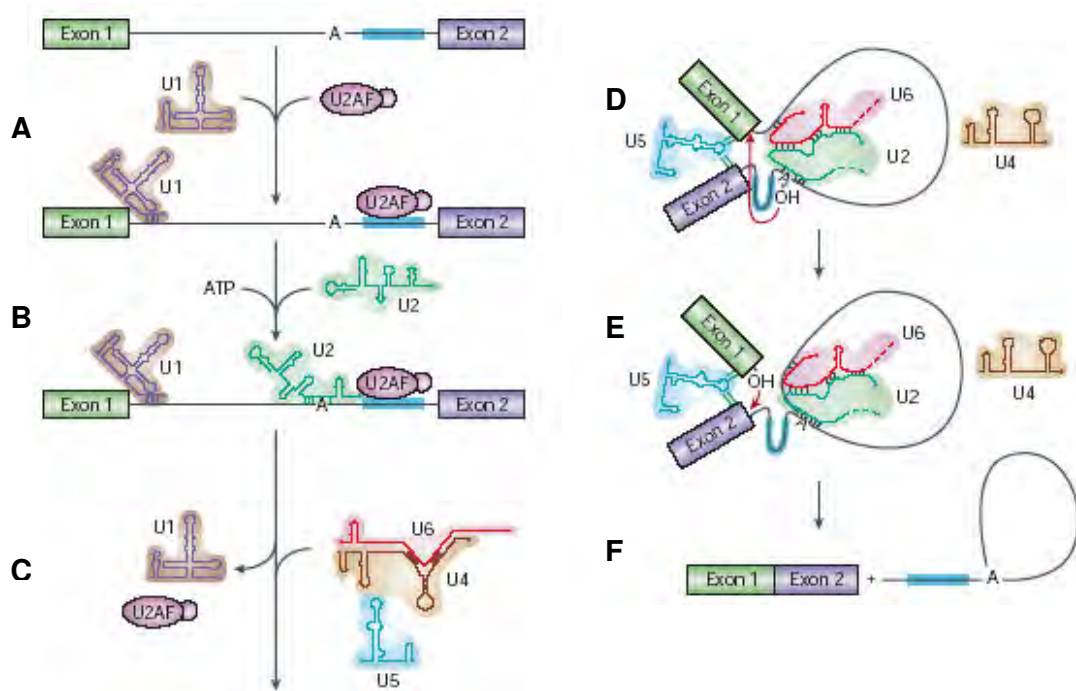


Figura 15: Reação de *cis-splicing*. A) Reconhecimento do 5'SS por U1 snRNP. B) Reconhecimento do BP por U2 snRNP. C) Interação do tri-snRNP, liberação de U1 snRNP e dissociação de U4/U6 snRNP. D) Associação de U6/U2 e primeira reação de transesterificação. E) Segunda reação de transesterificação. F) Liberação do mRNA maduro e íntron na forma de laço. As snRNPs estão representadas pelas estruturas de seus snRNAs. U2AF: fator auxiliar de U2. Trato de polipirimidina em azul. Patel & Steitz 2003.

Intermediários da formação do spliceossomo durante o *cis-splicing* são observados e denominam-se de complexos E, A, B, B* e C (Fig. 16). O complexo E é formado pela ligação de U1 snRNP ao pré-mRNA e em seguida U2 snRNP se liga ao *branch point* formando o complexo A. O tri-snRNP U4/U6.U5 pré-formado liga-se para a formação do complexo B que, após rearranjos e liberação de U1 e U4 snRNP, é chamado de B* e está ativado para a catálise. Após a primeira reação catalítica é formado o complexo C. Após a segunda catálise, o spliceossomo se dissocia e as snRNPs ficam livres para o processamento de outro RNA (WILL & LÜHRMANN, 2006).

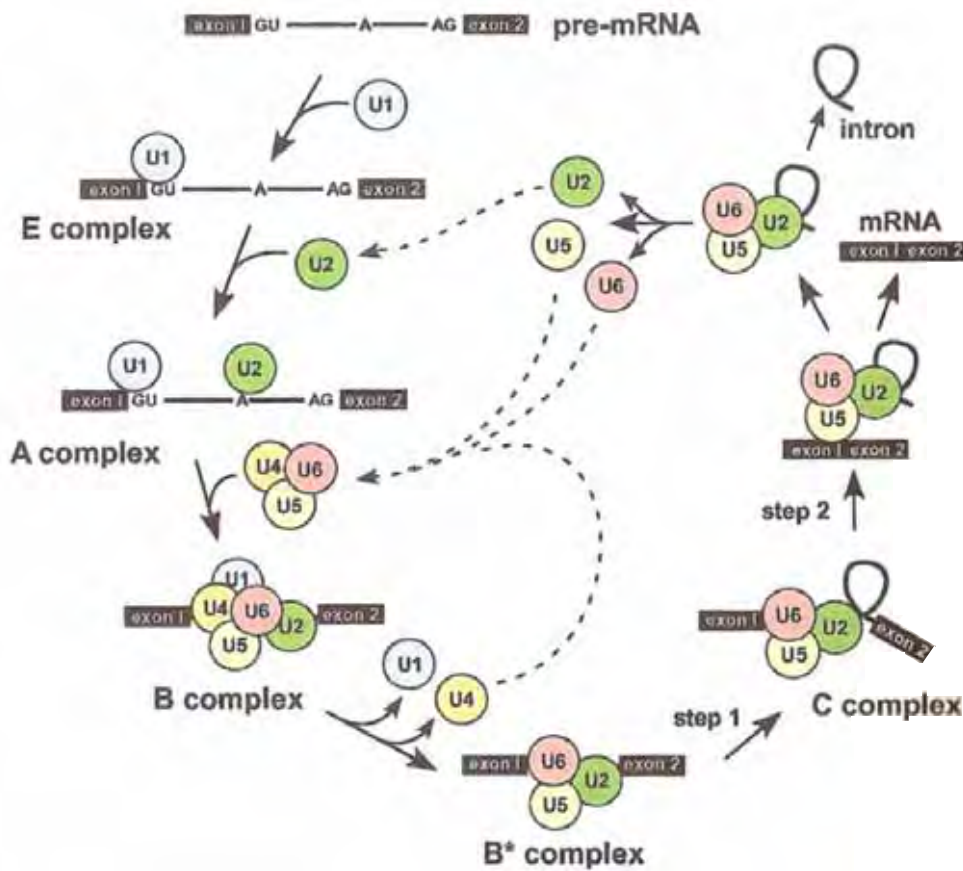


Figura 16: Formação dos complexos intermediários do spliceosomo U2-dependente durante o *cis-splicing*. Step 1 e 2: primeira e segunda reações de transesterificação. As setas pontilhadas indicam a reciclagem das snRNPs. Will & Lührmann 2006.

Após o processamento por *cis-splicing*, o mRNA recebe um resíduo modificado na extremidade 5' chamado de *cap* (resíduo de metilguanossina) e a extremidade 3' é clivada e 80-250 resíduos de adenina são adicionados para criar uma cauda de poli-A. O *cap* tem a função de proteção contra ribonucleases e também participa na ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução. A cauda de poli-A serve como sítio de ligação para uma ou mais proteínas específicas e acredita-se que também participe na proteção do mRNA contra destruição enzimática (LEHNINGER et al., 2006).

Análises de espectrometria de massas de uma mistura de complexos do spliceossomo humano revelaram não somente a presença das snRNPs, mas a presença de mais de 200 proteínas associadas (RAPPSILBER et al., 2002; ZHOU et al., 2002). Um grande número de proteínas desconhecidas também foi identificado por espectrometria de massas dos complexos A, B Δ U1, B* e C (HARTMUTH et al., 2002; JURICA et al., 2002; MAKAROV et al., 2002; MAKAROVA et al., 2004). Segundo Chen e colaboradores (2007), o número de fatores relacionados ao processamento de RNA compreende mais de 300.

Até 2000, acreditava-se que em tripanosomas todos os mRNAs eram processados por *trans-splicing*, mas Mair e colaboradores (2000) evidenciaram também a presença de *cis-splicing* nesses organismos ao encontrarem sequências intervenientes no gene que codifica para poli-A polimerase (PAP), e sendo assim, pela presença desse mecanismo, mais tarde foi identificada a partícula de U1 snRNP em tripanosomas (DJKENG et al., 2001; PALFI et al., 2002; PALFI et al., 2005).

2.1.2) *Trans-splicing*

O processamento dos pré-mRNAs por *trans-splicing* é considerado não usual por estar presente em somente alguns organismos. Esse processamento foi descoberto em 1982, quando foi observado que os mRNAs de *T. brucei* para diferentes glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) possuíam uma sequência comum de 39 nt, denominada de *spliced leader* (SL) (BOOTHROYD & CROSS, 1982). Mais tarde foi determinado que todos os mRNAs em tripanosomas eram processados por *trans-splicing* (AGABIAN, 1990), mas com a exceção do gene da

poli-A polimerase (MAIR et al., 2000). Inicialmente, acreditava-se que somente os tripanosomas apresentavam esse processamento, mas mais tarde o mesmo foi observado em nemátodos (KRAUSE & HIRSH, 1987), euglenóides (TESSIER et al., 1991), trematodos (RAJKOVIC et al., 1990), cordados (VANDENBERGHE et al., 2001), entre outros.

Nesses organismos, os pré-mRNAs são transcritos em unidades policistrônicas, ou seja, um único pré-mRNA contendo a sequência que codifica para proteínas diferentes, intercaladas por regiões intergênicas não codificantes, que são denominadas de íntrons (JOHNSON et al., 1987). No processamento por *trans-splicing*, cada sequência codificante é individualizada e unida a outro transcrito independente, o SL, de forma que todo mRNA maduro inicia com a mesma sequência de SL (aproximadamente 39 nts) e o íntron é liberado na forma de uma estrutura em Y, diferentemente da estrutura em laço observada no *cis-splicing* (BOOTHROYD & CROSS, 1982; DE LANGE et al., 1984; MURPHY et al., 1986; LIANG et al., 2003; MAYER & FLOETER-WINTER, 2005) (Fig. 18). Da mesma forma que no *cis-splicing*, o *trans-splicing* necessita de elementos sinalizadores para o correto reconhecimento e catálise, mas neste caso, o sítio de *splicing* 5' encontra-se no SL RNA (Fig. 17). Parece não existir uma sequência consenso específica para a sinalização da poliadenilação nos tripanosomatídeos, mas a escolha do sítio de poliadenilação está relacionada ao trato de polipirimidina (BOOTHROYD & CROSS, 1982; AGABIAN, 1990; LIANG et al., 2003; MAYER & FLOETER-WINTER, 2005). Em leishmanias, o requerimento mínimo para que ocorra o *trans-splicing* é a presença do AG no sítio de *splicing* 3' e um trato de polipirimidina sintético (CUROTTO DE LAFAILLE et al., 1992).

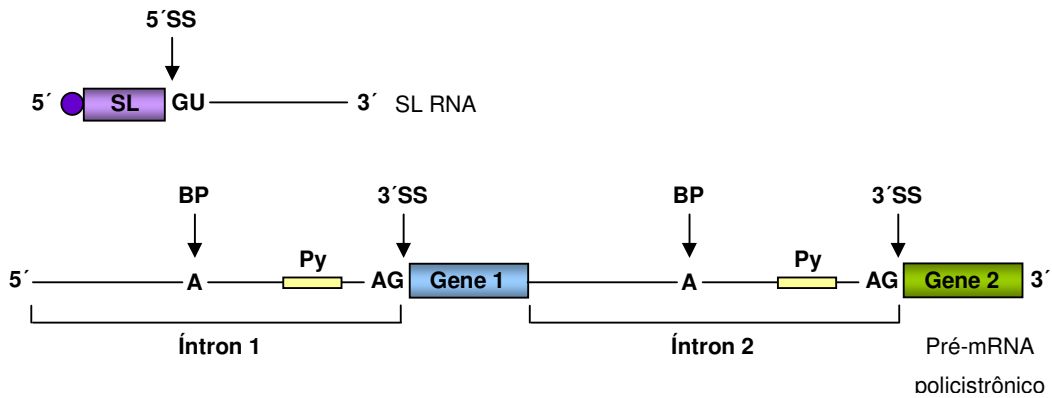


Figura 17: Sinalização para reação de *trans-splicing*. 5'SS: sítio de *splicing* 5', BP: *branch point*, Py: trato de polipirimidinas, 3'SS: sítio de *splicing* 3', SL: *spliced leader*, círculo: *cap*. Liang et al. 2003 modificado.

Exceto pela natureza intermolecular, o *trans-splicing* apresenta as mesmas etapas do *cis-splicing* (Fig. 18), com duas reações de transesterificação; na primeira etapa, ocorre clivagem no sítio doador do SL (5'SS), gerando 5' SL éxon (Fig. 18B, a); o SL remanescente liga-se à adenosina do íntron no pré-mRNA acceptor para formar o Y-intermediário (correspondente ao laço do *cis-splicing*) (Fig. 18B, b). Na segunda etapa, a clivagem no sítio de *splicing* 3' e ligação do éxon geram o RNA maduro e um Y-íntron excisado (Fig. 18B, c) (MURPHY et al., 1986; ULLU & TSCHUDI, 1995). Como no *cis-splicing*, o *trans-splicing* é catalisado pelo spliceosomo, incluindo U2, U4/U6, U5 e SL RNPs, mas na ausência de U1 snRNP (HANNON et al., 1991). O SL RNA existe também na forma de uma snRNP (BLUMENTHAL & STEWARD, 1997; HASTINGS, 2005).

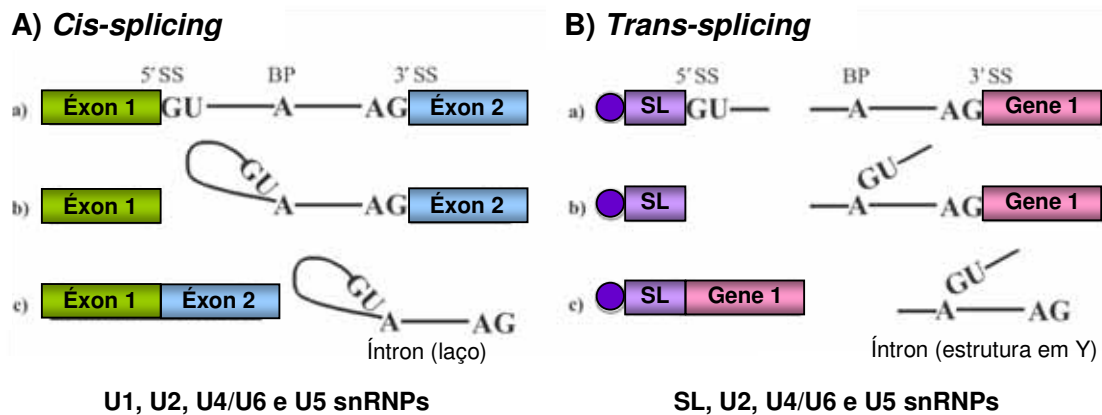


Figura 18: Comparação entre os mecanismos de *cis* (A) e *trans-splicing* (B). Mayer & Floeter-Winter, 2005 modificado.

A sequência de SL em tripanosomatídeos apresenta uma estrutura não usual do *cap*, chamado de *cap4* por possuir uma 7-metilguanossina ligada a quatro nucleotídeos modificados. Foi verificado que a metilação do *cap* é um passo essencial para que a reação de *trans-splicing* ocorra (ULLU & TSCHUDI, 1991; MCNALLY & AGABIAN, 1992).

A adição de SL possui dois propósitos: participa na individualização de cada gene contido no pré-mRNA policistrônico, juntamente com a poliadenilação e fornece o *cap* (capacete de metilguanossina), pela adição do SL RNA *capped*, para a extremidade 5' de cada mRNA maduro (AGABIAN, 1990).

Estudos de cinética sugerem que o processamento da extremidade 5' dos pré-mRNAs por *trans-splicing* com o SL RNA ocorre muito rapidamente, já que a meia-vida do SL RNA é de aproximadamente 4-6 min, sendo assim, foi observado que os processos de transcrição e *trans-splicing* ocorrem acoplados, sendo os pré-mRNAs transcritos e rapidamente processados. Os processos de *trans-*

splicing e poliadenilação ocorrem coordenados, sendo que a poliadenilação parece ocorrer após o processamento do pré-mRNA (ULLU et al., 1993).

Até o momento, verificou-se a presença e função de catálise das ribonucleoproteínas no processo de *trans-splicing* como componentes do spliceossomo, mas a dinâmica de interação entre elas durante esse processamento ainda é desconhecida, principalmente pela falta de um sistema de estudo *in vitro* eficiente.

2.2. Ribonucleoproteínas (snRNPs)

As ribonucleoproteínas (RNPs) são definidas como complexos de uma ou mais proteínas unidas firmemente a uma molécula curta de RNA (60-300 nt) rica em uridina, chamadas de snRNA, presentes em todos os compartimentos de células eucarióticas. Aquelas presentes no núcleo, as ribonucleoproteínas pequenas (snRNPs), são divididas em várias famílias, a maioria envolvidas na expressão gênica. As snRNPs envolvidas no processamento dos pré-mRNAs, abordadas neste trabalho, são constituintes da família Sm pois apresentam, além de proteínas específicas de cada partícula, um *core* comum de proteínas Sm unidas ao snRNA. Esses snRNAs possuem um *cap* de trimetilguanossina (TMG) e formam estruturas secundárias conservadas (TYCOWSKI et al., 2006).

As snRNPs (U1, U2, U4, U5 e SL) apresentam em comum um conjunto de sete proteínas, denominadas de proteínas Sm, que apresentam-se interligadas formando uma estrutura em forma de anel, na região do sítio Sm (AAUUUUUGA) (SERAPHIN et al., 1995; KAMBACH et al., 1999). As proteínas Sm são denominadas de Sm-B, -D1, -D2, -D3, -E, -F e -G (Fig. 19A), apresentando em *T.*

brucei pesos moleculares de 12,3; 11,7; 12,5; 12,4; 9,6; 8,4 e 8,9 kDa, respectivamente (CROSS et al., 1991; PALFI et al., 2000). Uma exceção é a partícula de U6 snRNP, onde o U6 snRNA não apresenta a região Sm e proteínas Sm, mas contém um trato de uridina próximo da extremidade 3' no qual se liga um conjunto de proteínas Sm-like (LSm), denominadas de LSm-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, também formando uma estrutura em anel (LIU et al., 2004; TKACZ et al., 2008). Recentemente foram observadas algumas variações em tripanosomas no *core* Sm da partícula de U2 snRNP (Fig. 19B), que apresenta as proteínas U2-15k/ Ssm 2-1 e U2-16,5k/ Ssm 2-2 ao invés de Sm-B e D3, respectivamente (WANG et al., 2006; TKACZ et al., 2007) e U4 snRNP (Fig. 19C) que apresenta a proteína Ssm-4 substituindo Sm-D3 (TKACZ et al., 2007).

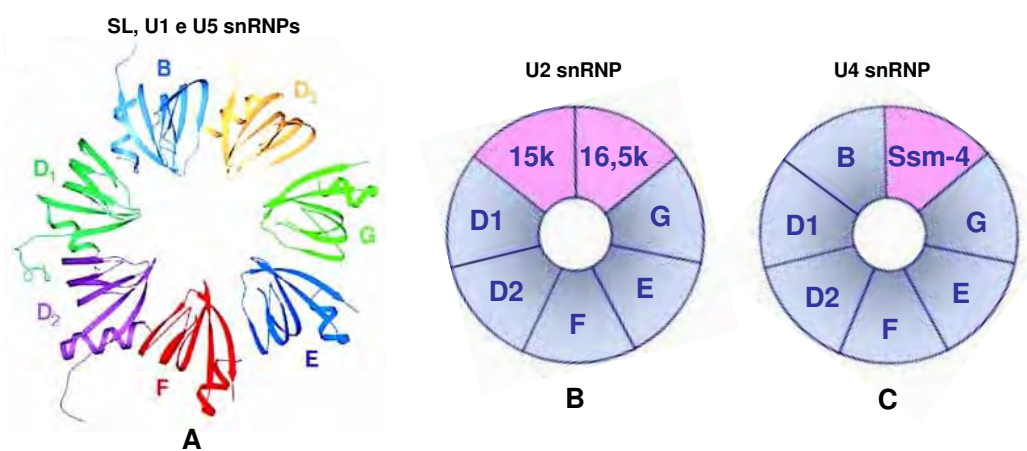


Figura 19: A) Modelo do *core* Sm. B) Variação do *core* Sm em U2 snRNP de *T. brucei*. C) Variação do *core* Sm em U4 snRNP em *T. brucei*. Kambach et al. 1999, Wang et al. 2006 modificado.

Além das proteínas Sm, as snRNPs possuem um conjunto de proteínas específicas para cada partícula, localizadas na extremidade 5' do snRNA. Em tripanosomas, algumas proteínas que compõem as partículas de U1, U2 e U5

snRNPs já foram identificadas, mas até o momento nenhuma proteína específica de U4/U6 e SL RNP (CROSS et al., 1993; LUCKE et al., 1997; PALFI et al., 2002; PALFI et al., 2005; IVENS et al., 2005).

Na biogênese de U1, U2, U4 e U5 snRNPs em mamíferos (Fig. 20), os snRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e adquirem um *cap* de metilguanossina no núcleo (A). Para a exportação dessa molécula para o citoplasma, o complexo de ligação ao *cap* (CBC), PHAX (adaptador fosforilado para exportação do RNA) e Xpo1/CRM1 (exportina 1/região de manutenção do cromossomo 1) são ligados e a molécula atravessa a membrana nuclear (B). Após a entrada no citoplasma, PHAX é defosforilado e continua associado à CBC/pré-snRNA, até a hipermetilação do *cap* (C). O complexo SMN (*survival motor neuron protein*), que consiste de sete proteínas Gemin (Gemin 2-8), é o responsável pela ligação das proteínas Sm (B-D3, D1-D2 e E-F-G) ao sítio Sm (D), hipermetilação do *cap* e corte da extremidade 3' do snRNA (E). Em seguida, a partícula é importada para o núcleo através da associação da Imp β (importina β) e SPN1 (snuportina-1) (F). Essa fase nuclear é a menos entendida na biogênese das snRNPs, mas foi observado que a modificação por 2'-O-metilação e pseudouridinações dos snRNAs pelos scaRNAs (*cajal bodies* (CBs) ligados a um gRNA) é necessária para que a partícula de snRNP seja funcional (G). Os CBs também parecem estar envolvidos na ligação das proteínas específicas e formação dos complexos U4/U6 e U4/U6.U5. As SFCs (compartimento de fatores de *splicing*) seriam as responsáveis pelo armazenamento das snRNPs e liberação das mesmas para montagem do spliceossomo (H) (PATEL & BELLINI, 2008).

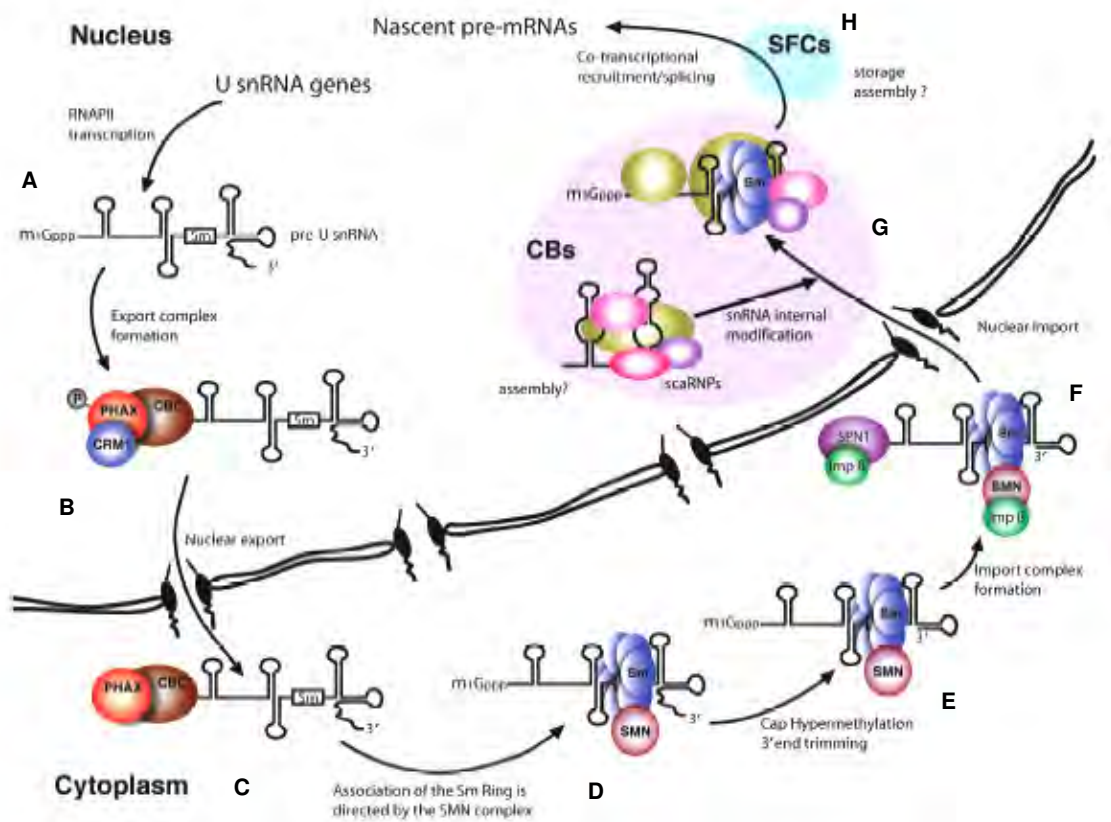


Figura 20: Biogênese de U1, U2, U4 e U5 snRNPs em mamíferos. A) Transcrição do snRNA. B) Ligação ao complexo de exportação. C) Transporte para o citoplasma. D) Associação das proteínas Sm. E) Hipermetilação do *cap* e corte na extremidade 3'. F) Ligação ao complexo de importação e transporte para o núcleo. G) Modificações no snRNA. H) Armazenamento e liberação das snRNPs para montagem do spliceossomo. RNAPII: RNA polimerase II. Patel & Bellini 2008.

A biogênese de U6 snRNP em mamíferos (Fig. 21) diferencia-se das outras snRNPs por ser transcrita pela RNA polimerase III e adquire o *cap* de γ -monometilguanossina, sendo o U6 snRNP formado no núcleo (A). O auto-antígeno La se liga ao *cap* e ao trato de uridina 3', o que parece proteger o snRNA contra a ação de ribonucleases e sinalizar a partícula para entrada no nucléolo (B). No nucléolo, um grupo metil é adicionado ao *cap* (C). Em seguida, com o auxílio das snoRNAs (RNA nucleolar pequeno), a extremidade 3' do snRNA é modificada, o

snRNA é 2'-O-metilado e pseudouridinado e as proteínas LSm são adicionadas formando uma estrutura em anel (D). A partícula é então transportada para fora do nucléolo e da mesma forma que na biogênese das outras snRNPs, os CBs estariam envolvidos na ligação das proteínas específicas e formação dos complexos U4/U6 e U4/U6.U5 (E) e as SFCs armazenariam as snRNPs e liberariam as mesmas para montagem do spliceosomo (F) (PATEL & BELLINI, 2008).

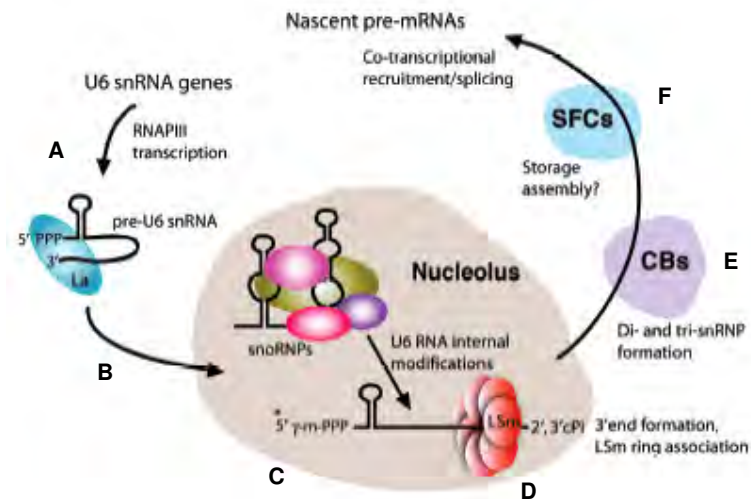


Figura 21: Biogênese de U6 snRNP em mamíferos. A) Transcrição de U6 snRNA. B) Ligação de La sinaliza para entrada no nucléolo. C) Adição do grupo metil ao cap. D) Ligação das proteínas LSm. E) Transporte para fora do nucléolo e formação dos complexos U4/U6 e U4/U6.U5. F) Armazenamento e liberação das snRNPs para montagem do spliceosomo. RNAPIII: RNA polimerase III. Patel & Bellini 2008.

2.2.1. U1 snRNP

Dentre as partículas de ribonucleoproteínas, U1 snRNP é a melhor caracterizada, contendo um total 10 proteínas altamente conservadas desde leveduras até humanos, sendo sete proteínas Sm e três proteínas específicas,

U1-70K, U1A e U1C, chamadas de SNP1, MUD1 e YHC1 em leveduras, respectivamente (KAMBACH et al., 1999; STARK et al., 2001).

U1 snRNP participa no reconhecimento do sítio de *splicing* 5' pela interação RNA-RNA, com a participação de U1-C (HEINRICHS et al., 1990; MUTO et al., 2004), havendo a evidência em leveduras de que U1-C sozinha é capaz de reconhecer o sítio de *splicing* 5' sem a necessidade da partícula de U1 intacta (DU & ROSBASH, 2002; LUND & KJEMS, 2002; ROSSI et al., 1996). Em contraste, U1-A não é essencial no complexo spliceosomal, consistente com a observação de que na ausência do sítio de ligação de 70K (*stem-loop I*) ou U1-A (*stem-loop II*), a partícula de U1 snRNP continua ativa na reação de *splicing in vitro* (WILL et al., 1996). U1-A também participa na comunicação entre os sítios de *splicing* 5' e 3' (TARN & STEITZ, 1995) e na regulação da poliadenilação (GUNDERSON et al., 1994; O'CONNOR et al., 1997; PHILLIPS et al., 2004).

Em tripanosomas, o U1 snRNA é mais curto que nos mamíferos (75 nt em tripanosomas e 164 nt em mamíferos) e com uma estrutura secundária simples (ausência dos *stem-loops* II e III) (Fig. 22). Como em outros organismos, U1 snRNP possui proteínas específicas U1-70K e U1-C. Além disso, foi identificada a proteína específica U1-24K e U1-A parecia estar ausente. A evidência da ausência do sítio de ligação de U1-A e uma provável substituição de U1-A pela nova proteína U1-24K contribuíram para a hipótese de ausência dessa proteína, sendo a validade deste dado discutido posteriormente nesta tese (DJIKENG et al., 2001; PALFI et al., 2002; PALFI et al., 2005).

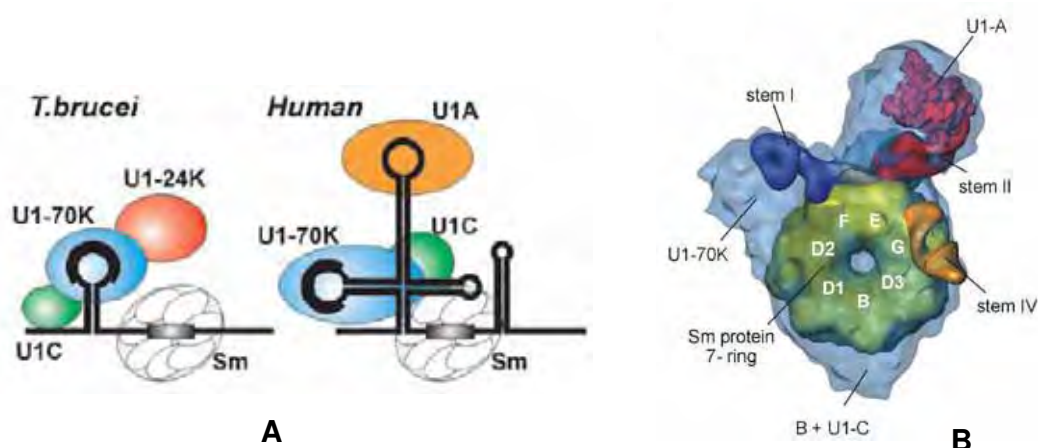


Figura 22: A) Comparação entre as estruturas de U1 snRNP de *T. brucei* e humanos. Palfi et al. 2005. B) Estrutura tridimensional de U1 snRNP humana. Stark et al. 2001.

2.2.2. U2 snRNP

Várias proteínas específicas de U2 snRNP são conhecidas em mamíferos e leveduras (entre parênteses), são elas A' (LEA1), B' (MSL1), SF3a120 (PRP21), SF3a66 (PRP11), SF3a60 (PRP9), SF3b155 (HSH155), SF3b145 (CUS1), SF3b130 (RSE1), SF3b125, SF3b49 (HSH49), SF3b14b (RDS3) e SF3b10. Além disso, são conhecidas proteínas que estão presentes em purificações de U2 snRNP, mas que apresentam uma ligação fraca, sendo denominadas de proteínas U2-relacionadas. Algumas delas são Prp5, SR140, CHERP, PRP43/DDX15, SPF45, SPF31 e SPF30 (WILL & LÜHRMANN, 2006; CHEN et al., 2007).

A PRP5, uma proteína DEAD-box e U2 relacionada, parece estar implicada na aproximação de U1 e U2 snRNPs durante o *splicing* (XU et al., 2004).

Em tripanosomas são conhecidas as proteínas específicas U2-40K e U2-B. A U2-40K apresenta 31% de identidade (aas) com U2-A' de humanos e os pontos

de interação específica com o U2 snRNA e geral com os outros snRNAs foram identificados (CROSS et al., 1993).

2.2.3. U4/U6 snRNP e U4/U6.U5 tri-snRNP

In vivo, U4 e U6 snRNPs não existem na forma de mono-snRNP, mas formam um complexo U4/U6, pelo pareamento de seus snRNAs e adição de proteínas específicas dessa di-snRNP. Acredita-se que a proteína SART3 (p110, ortólogo de Prp24 em leveduras) esteja envolvida na união de U4 e U6 snRNPs em humanos (NOTTROT et al., 2002; BELL et al., 2002; RADER & GUTHRIE, 2002). A forma de tri-snRNP, U4/U6.U5, é observada em maior quantidade por ser a forma funcional (Fig. 23). No tri-snRNP humano, além de U4, U6 e U5, são observadas mais 30 proteínas que compõem esse complexo, entre elas é observada a proteína Prp31 como a responsável pela ligação de U5 a U4/U6 (LIU et al., 2006).

Em humanos (e em *Saccharomyces cerevisiae*, entre parênteses), são conhecidas as proteínas específicas 90K (PRP3), 60K (PRP4), 61K (PRP31), 20K (USA-CypP) e 15,5K (SNU13) de U4/U6 di-snRNP, enquanto que o tri-snRNP apresenta 110K (SNU66), 65K (SAD1) e 27K (LIU et al., 2006; CHEN et al., 2007). As ciclofilinas (peptidil-prolil isomerasas) catalizam mudanças conformacionais em proteínas. USA-CypP (20K), uma ciclofilina associada a U4/U6, tem importância na segunda reação do *splicing* (HOROWITZ et al., 2002). Sabe-se que a proteína 15,5K se liga à região do *stem-loop* 5' do U4 snRNA e que a sua presença é de essencial importância para a ligação de 61K com U4 e U4/U6 snRNAs e com o complexo 20/60/90K. Experimentos indicam que a

Em tripanosomatídeos, até o momento não foram identificadas proteínas específicas de U4 e U6 snRNPs experimentalmente, somente algumas proteínas apresentaram baixa identidade com as proteínas específicas já conhecidas em outros organismos, por análises de bioinformática.

2.2.4. U5 snRNP

São conhecidas oito proteínas específicas de U5 snRNP em humanos, com suas respectivas denominações em *S. cerevisiae* entre parênteses: 220K (PRP8), 200K (BRR2), 116K (SNU114), 102K (PRP6), 100K (PRP28), 52K (LIN1 ou SNU40), 40K e 15K (DIB1) (CHEN et al., 2007).

Com PRP8, um dos maiores e mais conservados fatores de *splicing*, tem sido observada interação física e funcional com o dinucleotídeo GU do sítio de *splicing* 5' e com sítio de *splicing* 3' (TEIGELKAMP et al., 1995a,b; REYES et al., 1996; SIATECKA et al., 1999; MARONEY et al., 2000). Além disso, também faz contato com BPS e o trato de polipirimidina (MACMILLAN et al., 1994; TEIGELKAMP et al., 1995a,b; MCPHEETERS & MUHLENKAMP, 2003). PRP8 também está relacionada ao reconhecimento do sítio de *splicing* 5' e parece ter uma posição específica neste sítio durante a primeira reação catalítica. Acredita-se que após essa reação, PRP8 alinha os sítios 5' e 3' para a segunda reação de catálise (COLLINS & GUTHRIE, 1999). PRP8 pode auxiliar no reconhecimento do sítio de *splicing* 3'. A região de PRP8 em levedura relacionada com o reconhecimento do sítio de *splicing* 3' apresenta-se conservada na proteína de tripanosoma (LÜCKE et al., 1997).

A U5-116K está relacionada com a separação do duplex U4/U6 durante a ativação do spliceossomo (BARTELS et al., 2002; 2003). As proteínas U5-220K, -200K, -116K e -40K formam um complexo heteromérico na ausência do RNA, sugerindo um complexo pré-formado antes da montagem da partícula de U5 (ACHSEL et al., 1998).

2.2.5. SL RNP

Como mencionado anteriormente, a sequência *spliced leader* transferida para os mRNAs existe na forma de uma ribonucleoproteína, possuindo as proteínas Sm e proteínas específicas (BLUMENTHAL & STEWARD, 1997; HASTINGS, 2005). O SL RNA é composto por dois domínios, o domínio 5' SL, composto pelo 5' éxon de 22 nts em nemátodes e 39 nts em tripanosomas, e o domínio 3', composto pela porção do íntron. A estrutura secundária dos SL RNAs são similares entre as espécies, com sequências de 5' SL altamente conservadas (com exceção do sítio Sm em nemátodes) e as sequências do SL íntron divergentes.

A interação entre SL, U5 e U6 tem sido relatada por estudos com *T. brucei* (XU et al., 2000). A interação SL e U6 é observada em nemátodes, mas pode não ocorrer em tripanosomas (HANNON et al., 1992; MANDELBOIM et al., 2002).

Proteínas ligantes de SL RNA tem sido relatadas na literatura, mas até o momento nenhuma proteína específica de SL RNP foi isolada e identificada nos tripanosomatídeos. No nemátode *Ascaris*, em adição ao Sm *core*, foram identificadas proteínas de 30K e 175K na partícula de SL RNP, elementos essenciais durante o mecanismo de *trans-splicing*, mas não no *cis-splicing*.

Análises foram realizadas utilizando ferramentas de bioinformática para a procura de proteínas homólogas em outros organismos, mas nenhuma similaridade foi encontrada entre os tripanosomatídeos. Foi verificado ainda que 30K interage com SF1/BBP, sendo essa interação essencial para a reação de *trans-splicing* (DENKER et al., 2002).

2.3. Fatores de *splicing*

Uma vasta lista de fatores relacionados ao *cis-splicing* é conhecida (aproximadamente 300 proteínas), além das proteínas que compõem as ribonucleoproteínas. Essas proteínas foram identificadas por diversas purificações do spliceosomo em diversos estágios do processamento de alguns organismos. Entre elas estão proteínas são denominadas de SAPs (proteínas associadas ao spliceosomo) conhecidas, RNA helicases-*like*, hnRNPs (RNP heterogênea nuclear), proteínas SR (ricas em serina), ciclofilinas, RBPs (proteínas ligantes de RNA), entre outras (CHEN et al., 2007).

Diante de todas essas informações podemos observar que pouco se conhece da dinâmica dos complexos durante o *trans-splicing* em tripanosomatídeos, bem como as proteínas que compõem as ribonucleoproteínas e o spliceosomo, quando em comparação ao *cis-splicing* em mamíferos e leveduras, que possui grande parte do mecanismo desvendado e aproximadamente 300 proteínas que participam desse processamento conhecidas. Sendo assim, este trabalho propôs a identificação de novas proteínas que compõem o spliceosomo em tripanosomas, seja como proteínas específicas

presentes em RNPs individuais ou como fatores de *trans-splicing*, essenciais para a reação. Desse modo, esses dados poderão auxiliar na busca de alvos de ação imunológica ou farmacológica, relacionados ao mecanismo de *trans-splicing*, que não estejam presentes nas células humanas, e que possam servir, futuramente, para atenuação ou destruição dos parasitas e, também, na verificação de eventual expressão diferencial de algumas proteínas nos diferentes estágios e/ou formas dos parasitas.

OBJETIVOS

Os objetivos desse projeto foram:

- 1) Amplificação e clonagem da sequência que codifica para a proteína SmD1 de *Trypanosoma brucei* em vetor PC-PTP-neo;
- 2) Estabelecimento da linhagem de *T. brucei* que expresse a proteína SmD1 fusionada ao *PTP-tag* para a obtenção de proteínas que compõem o spliceossomo após a purificação;
- 3) Identificação das proteínas obtidas, após a purificação de SmD1-PTP, utilizando espectrometria de massa (*fingerprint* de massa) e análise em bancos de dados específicos;
- 4) Amplificação e clonagem de 10 proteínas conservadas hipotéticas em vetor PC-PTP-neo;
- 5) Estabelecimento de linhagens de *T. brucei* que expressem cada uma das 10 proteínas conservadas hipotéticas;
- 6) Análise das 10 proteínas conservadas hipotéticas para a ligação com os snRNAs (SL, U1, U2, U4, U5 e U6) utilizando reação de *primer extension*, após precipitação com resina de IgG;
- 7) Imunolocalização das proteínas fusionadas ao *PTP-tag* em *T. brucei*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultivo de *Trypanosoma brucei*

As formas procíclicas de *Trypanosoma brucei brucei*, cepa 427 (CROSS & MANNING, 1973) foram cultivadas em meio SDM-79 (BRUN & SCHONENBERGER, 1979) contendo 10% de soro fetal bovino, em estufa à 26°C.

2. Amplificação por PCR e clonagem em vetores

2.1. Construção dos oligonucleotídeos para PTP-tag C-terminal

Todos os oligonucleotídeos para o PTP-tag foram construídos para a adição do tag na porção C-terminal de cada proteína alvo. Para isso, o oligonucleotídeo antisense (AS) sempre foi complementar à porção terminal da região 3' da seqüência de DNA que codifica para a proteína alvo, sem a trinca de bases para o stop códon (2, na Fig. 25), e contendo o sítio de restrição para *Eag* I. Em seguida foi necessário localizar um sítio de restrição único na seqüência da proteína alvo e que não estivesse presente no vetor pC-PTP-neo, para ser utilizado na linearização do plasmídeo recombinado. Este sítio deveria estar numa posição de no mínimo 150 pb do stop códon, em direção à extremidade 5'. O oligonucleotídeo sense (S) foi então construído com numa região de, no mínimo, 150 pb do sítio de restrição em direção à extremidade 5' (1, na Fig. 25), e contendo o sítio de restrição de *Apa* I. Para a confirmação dos parasitas transfectados, um oligonucleotídeo S 5'out foi construído fora da seqüência

amplificada, em direção à extremidade 5' (3, na Fig. 25). Esse oligonucleotídeo, juntamente com o oligonucleotídeo para a seqüência de proteína C (protC-TAP3') permitiram a verificação da inserção do vetor na posição correta no genoma do parasita. Todos os oligonucleotídeos utilizados encontram-se no anexo.

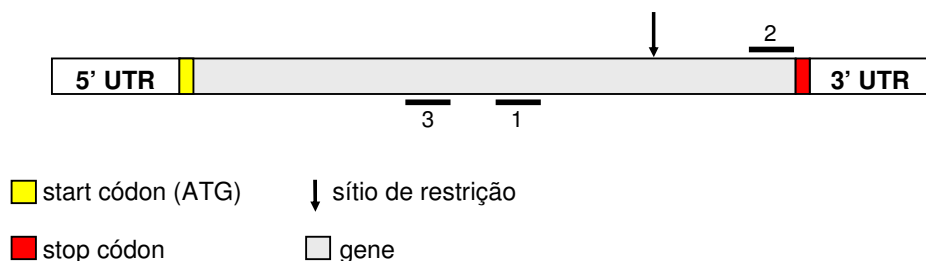


Figura 25: Esquema da construção dos oligonucleotídeos para PTP-tag. 1) oligo S com sítio de restrição para *Apa* I. 2) oligo AS com sítio de restrição para *Eag* I. 3) oligo 5' out.

Somente para p18 foi utilizado o sítio de *Not* I ao invés de *Eag* I no oligonucleotídeo, pois a seqüência da proteína já possuía um sítio interno para *Eag* I.

Os sítios de restrição únicos para a digestão de SmD1-PTP e das proteínas hipotéticas conservadas encontram-se a seguir:

SmD1 – <i>Sna</i> B I	p13,2 – <i>Bsm</i> I	p16,2 – <i>Psh</i> A I	p17 – <i>Bcl</i> I
p18 – <i>Bsm</i> I	p31 – <i>Sal</i> I	p35 – <i>Bsi</i> W I	p42 – <i>Sma</i> I
p65,5 – <i>Bsm</i> I	p87,7 – <i>Aat</i> II	p92,2 – <i>Xho</i> I	

2.2. Amplificação por PCR e purificação do produto

A seqüência de SmD1 utilizada inicialmente e as seqüências de p13,2; p16,2; p17; p18; p31; p35; p42; p65,5; p87,7 e p92,2*, identificadas neste trabalho; foram amplificadas por PCR utilizando 1 µl de DNA genômico de *T.*

brucei (cepa 427) 50 ng/μl, 5 μl tampão Taq *HiFi* 10X, 2 μl MgSO₄ 50 mM, 1 μl dNTP 10 mM, 1 μl oligo S 100 ng/μl, 1 μl oligo AS 100 ng/μl, 0,2 μl *Platinum Taq* DNA polimerase *High Fidelity* 5 U/μl (Invitrogen), H₂O q.s.p. 50 μl. Os oligonucleotídeos (IDT) utilizados encontram-se a seguir.

Ciclo de amplificação: 94 °C – 1 min 30 seg

94 °C – 30 seg	}	30X
56 °C – 30 seg		
68 °C – 45 seg		
4 °C - ∞		

* para p92,2 foi necessária a mutação de um sítio de *Apa* I que estava presente no interior da sequência, utilizando-se PCR por *overlapping*.

SmD1-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCCGCGGCGGAGTCATCGACGCTCATCG-3'
SmD1-PTP <i>Not</i> I AS	5'-ATGCGGCCGCTCATTGATCGCTCCGTCCTTTGCTTCCGGTCTCGCCTTCGCGGCGGCAGC-3'
p13,2-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCCCACTCGAAACATTGAAGGC-3'
p13,2-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGATCCTGAGGTACGGAAGGTTTTAC-3'
p16,2-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCCTGGAGGCGTTGCGGTGCGC-3'
p16,2-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGCTCTCCCTTGATACGCTTCA-3'
p17-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCAGCACAAATTGTGTTACACAG-3'
p17-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGCTCTCCACGAGCACGCTTTC-3'
p18-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCCTTTGGGGAAGTCCGGTTCG-3'
p18-PTP <i>Not</i> I AS	5'-TAGGGCCCCTTTGGGGAAGTCCGGTTCG-3'
p31-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCCTTTGGGGAAGTCCGGTTCG-3'
p31-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGCTGACGTAACCTCTTTCC-3'
p35-PTP <i>Apa</i> I S	5'-GGGCCCTCTTTCGCGTAAGGAATCC-3'
p35-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-CGGCCGAATTCGCTGTAATATTAC-3'
p42-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCACGACACAAAATGATAGCGG-3'
p42-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGCTCACCCTTCTTTCGCTCGC-3'
p65,5-PTP <i>Apa</i> I S	5'-GGGCCCGCCGAGCCCCATGCATAC-3'
p65,5-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-CGGCCGCTTTCTCTTCAGTAGTTGC-3'
p87,7-PTP <i>Apa</i> I S	5'-TAGGGCCCACAATTTACCGCTCTGACG-3'
p87,7-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-TACGGCCGCTGCTTTTTCTTCACAAACAAC-3'
p92,2-PTP <i>Apa</i> I S	5'-GGGCCCGGGAGTTCTCCAAATTG-3'

p92,2-PTP <i>Eag</i> I AS	5'-CGGCCGCGTAAGTGCTGGCACCCGG-3'
p92,2-PTP mut S	5'-GTAATGCGGATAGAGCGCACACCGTGATGGAGGCC-3'
p92,2-PTP mut AS	5'-GGCCTCCATCACGGTGTGCGCTCTATCCGCATTAC-3'

Os produtos de PCR foram tratados com 4 µl 5X B/K buffer (25 µl tampão T4 PNK 10X; 25 µl tampão *Klenow* 10X; 25 µl dNTP 10 mM; 2,5 µl dATP 100 mM; H₂O q.s.p. 100 µl), 1 µl T4 polinucleotídeo kinase (T4 PNK) 10 U/µl e 1 µl *Klenow* 5 U/µl, incubando a 37°C/ 30 min, para ajuste das extremidades e fosforilação dos produtos. Em seguida, os produtos foram purificados do gel de agarose 1% contendo BrEt, utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), após eletroforese. Esse tratamento foi necessário para a clonagem em vetor digerido com uma enzima que produz uma extremidade abrupta.

2.3. Reação de ligação e transformação

O vetor utilizado para a clonagem e sequenciamento foi o pTZ18U (Bio-Rad) (Fig. 26) digerido com *Sma* I (extremidade abrupta) e defosforilado. A reação de ligação foi realizada utilizando-se 20 ng do vetor digerido, 1 µl tampão T4 DNA ligase 10X, produto de PCR 3x mais que a quantidade molar do vetor, 1 µl de T4 DNA ligase 400 U/µl e H₂O q.s.p. 10 µl, incubando por 2h/ TA ou 16°C/ *overnight*.

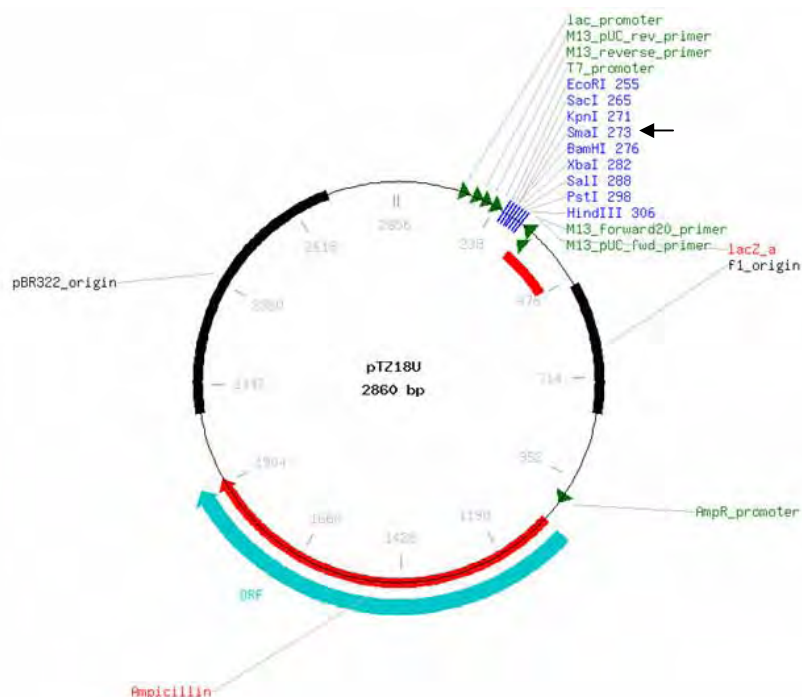


Figura 26: Mapa do vetor pTZ18U. A seta preta indica o sítio de *Sma* I.

A transformação foi realizada com 50 µl de bactérias DH5α competentes (*Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells*, Invitrogen) e 5 µl da reação de ligação, incubando por 20 min. em gelo. Em seguida foi dado o choque térmico por 20 seg/ 37 °C e gelo por 2-5 min. Adicionou-se 150 µl de meio LB (1% Triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; pH 7,0) e logo em seguida as bactérias foram esparramadas em placa de petri contendo LB ágar (LB com 2% de ágar) e 100 µg/ml de ampicilina. A placa foi incubada em estufa a 37 °C/ *overnight*.

2.4. Confirmação da clonagem, obtenção do plasmídeo recombinado e sequenciamento

Algumas colônias foram repicadas da placa de LB ágar para meio LB com 100 µg/ml de ampicilina. Após o crescimento, uma alíquota de cada cultura foi utilizada na reação de PCR para a confirmação da clonagem. A PCR foi feita com 2 µl de cultura (5h de crescimento); 5 µl tampão da Taq *platinum* 10X; 1,5 µl MgCl₂ 50 mM; 1 µl *primer M13 forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') 100 ng/µl; 1 µl *primer M13 reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 100 ng/µl; 1 µl dNTP 10 mM; 0,2 µl Taq *platinum* 5 U/µl (Invitrogen); H₂O q.s.p. 50 µl.

Ciclo de amplificação: 94 °C – 1 min 30 seg

94 °C – 30 seg	}	30X
56 °C – 30 seg		
72 °C – 1 min 45 seg		
4 °C - ∞		

Após a eletroforese em gel de agarose 1% corado com BrEt e identificação dos clones positivos, o DNA plasmidial de uma cultura de 5 ml dos mesmos foram extraídos utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e enviados para sequenciamento.

2.5. Subclonagem em vetor pC-PTP-neo

Depois de confirmada a seqüência, o inserto foi liberado pela digestão com *Apa* I e *Eag* I (com exceção da p18 que foi digerida com *Apa* I e *Not* I) para a

clonagem em vetor pC-PTP-neo digerido com *Apa* I e *Not* I (SCHIMANSKI et al., 2005 – Fig. 27). A banda referente ao inserto foi purificada do gel de agarose 1% corado com BrEt após eletroforese. A ligação, transformação, confirmação dos clones e obtenção do DNA foram realizadas da mesma forma que nos itens 2.3 e 2.4, mas utilizando os oligos S específico de cada proteína e oligo Prot C-TAP3' (5'-TCGCTAGCAGTAGTTGGAATATCATATTTCCCATCAATAAGACGAGG-3'), complementar à sequência de proteína C presente no *tag* PTP do vetor.

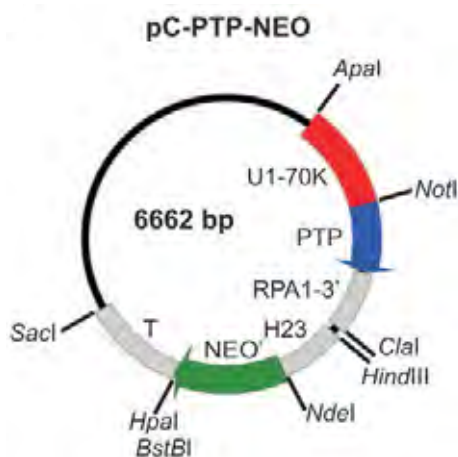
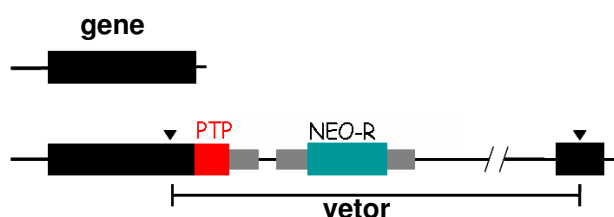


Figura 27: Mapa do vetor pC-PTP-neo (Schimanski et al. 2005). PTP-*tag* em azul. Marcador de resistência a neomicina em verde. Gene de U1-70K que é substituído pela sequência da proteína de interesse, em vermelho.

3. Transfecção dos plasmídios pC-PTP-neo recombinados em *T. brucei* e confirmação dos clones

O plasmídeo linearizado por uma enzima de restrição foi inserido em um alelo do genoma do parasita após eletroporação, como observado no esquema a seguir:



3.1. Preparo do DNA

10 µg de plasmídeo foram digeridos *overnight* com uma enzima de restrição específica para cada seqüência (item 2.1), utilizando tampão e temperatura ótimos para cada enzima. O DNA foi fenolizado (V/V), precipitado e ressuspensão em 10 µl de H₂O MilliQ.

3.2. Preparo dos parasitas

Uma cultura de 10 ml de formas procíclicas de *T. brucei* cepa 427 ($\sim 8 \times 10^6$ - 1×10^7 parasitas/ml) foi centrifugada por 7 min/ 3.000g/ TA. O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados com 2 ml de ZPMF 1X (132 mM NaCl; 8 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 1,5 mM MgOAc.4H₂O; 90 µM CaOAc₂), 7 min/ 3.000g/ TA. O sedimento foi ressuspensão em 390 µl de ZPMF 1X.

3.3. Transfecção

O DNA e os parasitas foram colocados em cubeta de eletroporação (BTX 2 mm) e eletroporados em eletroporador BTX, pulso de 1,5 kV, 25 µF, 24 Ohms.

Após a eletroporação os parasitas foram transferidos para uma garrafa contendo 10 ml SDM-79 e 20 µg/ml de G418 (gene da neomicina fosfotransferase

II como marca de resistência do vetor pC-PTP-neo). Em um tubo plástico, foram misturados 2,5 ml dos parasitas da garrafa, 2,5 ml de parasitas 427 não transfectados, 7,5 ml meio SDM-79 e 20 µg/ml G418 e em seguida 250 µl dessa mistura foram distribuídos em 48 poços de uma placa de poliestireno de 96 poços estéril, incubada em câmara úmida a 26 °C, para o isolamento de clones transfectados. Após a seleção dos clones, foram utilizados 40 µg/ml de G418 para garantir a presença somente de parasitas transfectados.

3.4. Confirmação dos clones positivos

O DNA de cada clone isolado foi extraído para a confirmação da transfecção por PCR e a expressão da proteína foi analisada por *western blot*.

3.4.1. Obtenção rápida do DNA genômico de *T. brucei*

1 ml de cultura (fase *log*) foi centrifugada por 1 min/ 3.000g/ TA. Os parasitas foram lavados com 800 µl de tampão *tryps wash* (100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5), centrifugando por 1 min/ 3.000g/ TA. O sedimento foi ressuspenso em 250 µl tampão TELT (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM EDTA pH 8,0; 2,5M LiCl; 4% Triton X-100) e extraído com 250 µl de fenol/clorofórmio, centrifugando por 2 min/ 16.000g/ TA. Em seguida foi realizada a extração com 250 µl clorofórmio, centrifugando por 2 min/ 16.000g/ TA. O DNA foi precipitado com 3 vol ETOH 100% e 0,1 vol NaAc 3M pH 7,0, centrifugando por 5 min/ 16.000g/ TA. O sedimento foi lavado com 500 µl ETOH 70%, centrifugando por 5 min/ 16.000g/ TA. O sedimento foi seco e ressuspenso em 30 µl H₂O MilliQ.

3.4.2. Reação de PCR

Foi utilizado um oligonucleotídeo para a sequência da proteína C (protC-TAP3') e outro *sense 5'out* para cada sequência alvo, mostrados a seguir e descritos no item 2.1.

SmD1-PTP <i>5'out</i>	5'-ACTCTTTACTTGAATCAGTG-3'
p13,2-PTP <i>5'out</i>	5'-GTTTCGGTGGGGAGCAGATTC-3'
p16,2-PTP <i>5'out</i>	5'-ATGTATAATGGCATCGCTCC-3'
p17-PTP <i>5'out</i>	5'-ATGGTCCGGCGGAATAATAAG-3'
p18-PTP <i>5'out</i>	5'-ATGGAGGCGCTTCGCGTTCAG-3'
p31-PTP <i>5'out</i>	5'-CCATTGCAGAAGGGGAAAGC-3'
p35-PTP <i>5'out</i>	5'-ATGATGGCTATTTGGTTC-3'
p42-PTP <i>5'out</i>	5'-GTAAGCCACAGCCAAGAAGG-3'
p65,5-PTP <i>5'out</i>	5'-AAGCTTACGCGTGTCTGGGATGCGCGTTAC-3'
p87,7-PTP <i>5'out</i>	5'-GCTACGCGAAGTTGGAGGAG-3'
p92,2-PTP <i>5'out</i>	5'-ACACGGTTGCCTCTCCAC-3'

A reação de PCR foi realizada da mesma forma que no item 2.4, utilizando 2 µl do DNA extraído do parasita (~50 ng).

3.4.3. Western blot

Os clones PCR positivos foram analisados para a expressão da proteína alvo contendo o PTP-*tag* por *Western blot*.

1 ml de cultura (fase *log*) de cada clone obtido foi centrifugada 1 min/ 3.000g/ TA e o sobrenadante removido. Os parasitas foram ressuspensos em 30 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS; 25% glicerol; 2,5 mg/ml azul de bromofenol; 200 mM DTT) e fervidos por 10 min. 12 µl de cada amostra foram aplicados em gel SDS-PAGE 10% para a eletroforese a

80V para o empilhamento e 130V para a separação. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF em tampão de transferência (25 mM Tris; 150 mM glicina; 10% metanol) a 100V/ 1 h/ 4°C e esta foi bloqueada com 10 ml solução de bloqueio (5% leite desnatado; 5% soro fetal bovino; 0,1% Tween 20) por 2 h/ TA. O anticorpo anti-proteína A conjugado com peroxidase (diluição 1:2000) foi adicionado à solução de bloqueio e incubado por 30 min/ TA. Em seguida foram realizadas 5 lavagens de 5 min cada com TBST 1X (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). A membrana foi então revelada utilizando o kit *BM Chemiluminescence blotting substrate* (POD) - Roche e o resultado foi observado após exposição em filme de raios-X.

4. Preparação do extrato para a purificação das proteínas contendo PTP-tag

3,5 a 4 L de cultura (fase *log* - 1×10^7 parasitas/ml) foram centrifugados por 10 min/ 2.700g/ 2 °C. O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados 2x com 40 ml tampão *tryps wash* gelado, ressuspendendo o sedimento no vórtex e centrifugando por 7 min/ 2.700g/ 2 °C. Determinar o volume do sedimento. O sedimento foi lavado com 30 ml de tampão de transcrição gelado (150 mM sucrose; 20 mM ác glutâmico; 20 mM HEPES-KOH pH 7,7; 3 mM MgCl₂), centrifugando por 10 min/ 3300g/ 2 °C. O sedimento foi ressuspensão no mesmo volume de tampão de transcrição gelado e incubado no gelo por 20-30 min.

O *dounce* de vidro de 7 ml foi lavado com ETOH 100%, 3x com H₂O e com tampão de transcrição, mantendo no gelo. Os parasitas foram colocados no *dounce* de vidro e foram adicionados 1 µl DTT 1M, 1 µl leupeptina 10 mg/ml e 1 µl aprotinina 10 mg/ml para cada ml. Após a quebra de >70% dos parasitas (~5

min), o extrato foi alíquotado em frações de 1 ml, congelado em N₂ líquido e armazenado a -80 °C. Cada fração é chamada de Y4.

5. Purificação do PTP-tag

Dez alíquotas de 1 ml do extrato do parasita (Y4), correspondente a 2-4x10⁹ células, foram descongeladas e colocadas imediatamente em gelo. 100 µl do tampão de extração gelado (1,5 M KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 1% Tween 20) foram distribuídos em eppendorfs previamente colocados em gelo, para cada 1 ml do extrato. Cada alíquota do extrato foi adicionada em um eppendorf contendo o tampão de extração, misturando rapidamente e incubando por 20 min no gelo e invertendo o tubo 3x.

A coluna de IgG (*poly-prep chromatography columns* 0.8x4cm, BioRad) foi preparada com 200 µl de *beads* de IgG (*IgG sepharose fast flow*, GE), passando 50 ml de tampão PA-150 (150 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 0,1% Tween 20) pela coluna.

Os tubos foram centrifugados por 15 min/ 21.000g/ 2 °C e o sobrenadante transferido para outro eppendorf previamente colocado em gelo. Os tubos foram centrifugados novamente por 3 min e os sobrenadantes adicionados a um mesmo tubo de 15 ml previamente em gelo (~ 6 ml). Foram separados 20 µl amostra + 25 µl tampão de amostra + 5 µl 2-Me para WB (*input*). Foram adicionados 500 µl do inibidor de protease (*complete mini, EDTA free*, Roche) previamente dissolvido em 1 ml de PA-150 (A, Fig. 28). A coluna de IgG foi fechada embaixo e o extrato adicionado. O topo foi fechado e a coluna deixada sob rotação a baixa velocidade a 4 °C/ 2h (B, Fig. 28).

O *flow-through* (FT) foi coletado e separado a amostra para WB – 20 µl amostra + 25 µl tampão de amostra + 5 µl 2-Me. Adicionou-se aproximadamente 10 ml de PA-150 à coluna, deixando sob baixa rotação por 10 min/ 4°C e em seguida a solução foi descartada. Mais 15 ml de PA-150 foram passados pela coluna para completar a lavagem. A coluna foi fechada novamente e adicionados 2 ml tampão da TEV (150 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT; 0,1% Tween 20) e 300 U TEV protease (*AcTev*, Invitrogen), deixando sob baixa rotação *overnight*/ 4 °C (C, Fig. 28).

A coluna de anti-proteína C foi preparada com 200 µl de resina (*anti-protein C affinity matrix*, Roche), passando 50 ml do tampão PC-150 (150 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 0,5 mM DTT; 0,1% Tween 20).

O eluato da TEV (~2 ml) foi coletado e 20 µl da amostra + 25 µl tampão de amostra + 5 µl 2-Me foram separados para o WB. Passou-se mais 4 ml de PC-150 na coluna, que foi coletado juntamente com o TEV eluato. Foram adicionados 7,5 µl of CaCl₂ 1M e 500 µl do inibidor de protease e os 6 ml colocados na coluna de anti-proteína C, deixando sob baixa rotação por 2h/ 4°C (D, Fig. 28). O *flow-through* foi coletado e 20 µl amostra + 25 µl tampão de amostra + 5 µl 2-Me foram separados para WB.

A coluna foi então lavada com 10 ml de PC-150, sob rotação por 10 min, passar pela coluna mais 10 ml e depois mais 10 ml. As lavagens foram repetidas mais uma vez.

600 µl do tampão de eluição EGTA/EDTA (5 mM Tris-HCl pH 7,7; 10 mM EGTA; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,01 µg/µl leupeptina) foram adicionados e a coluna foi colocada sob baixa rotação por 5 min/ TA. O eluato foi coletado e esse passo

repetido mais 2x (E, Fig. 28). Foram separados 20 µl amostra + 25 µl tampão de amostra + 5 µl 2-Me para WB e SDS-PAGE.

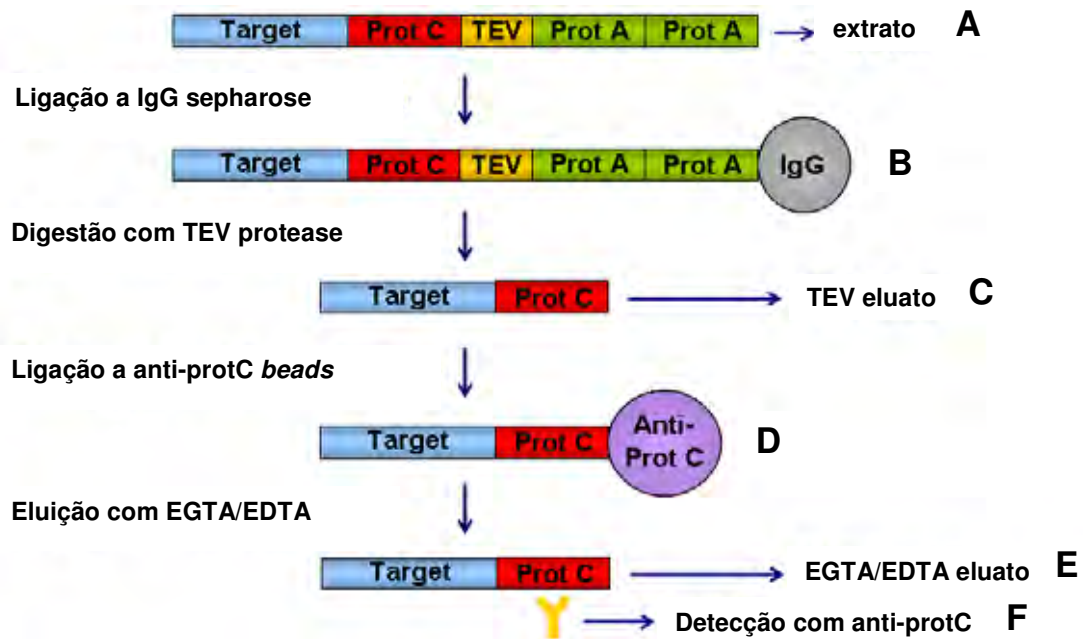


Figura 28: Esquema da purificação do PTP-tag.

5.1. Análise da eficiência da purificação

As amostras coletadas foram analisadas por WB para checar a eficiência da purificação (F, Fig. 28). No gel SDS-PAGE 12,5% foram aplicados 2,5 µl do extrato e IgG FT; 4,2 µl TEV eluato; 12,5 µl protC FT; 15 µl EGTA/EDTA eluato

O WB foi realizado como descrito no item 3.4.3, mas com a adição de 1 mM CaCl₂ na solução de bloqueio e no TBST para as lavagens, pois para esta análise foi utilizado anticorpo anti-proteína C (diluição 1:2.000), que é dependente de Ca²⁺ para a ligação. Como o anticorpo anti-proteína C não é conjugado, foi

realizada uma incubação com o anti-IgG conjugado com peroxidase (diluição 1:5.000) por 1h/ TA, seguido das lavagens com TBST.

As mesmas amostras foram aplicadas em gel Tris-HCl gradiente 10-20% linear (*Tris-HCl gel 10-20% linear gradient*, Biorad), corado com *Sypro-Ruby* (Invitrogen).

6. Espectrometria de massas

O eluato obtido na purificação do PTP-*tag* foi concentrado a vácuo até o volume de aproximadamente 200 µl. A amostra foi dialisada em tampão de diálise (10mM Tris-HCl pH 7,6-7,8; 1 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,1mM DTT), *overnight*/ 4°C. A amostra foi concentrada novamente à vácuo até aproximadamente 100µl e armazenada a -80°C até o envio para o *Seattle Biomedical Research Institute*, Seattle, WA, USA, em colaboração com Aswini K. Panigrahi, PhD.

7. Análise da ligação aos snRNAs pela reação de *primer extension*

Essa reação consiste na utilização de um oligonucleotídeo marcado radioativamente, específico para cada snRNA a ser analisado, em uma reação com transcriptase reversa. Com isso, são obtidas fitas únicas de DNA complementar ao RNA, observadas após eletroforese.

7.1. Marcação radioativa dos oligonucleotídeos

A marcação radioativa dos oligonucleotídeos para U1 (5'-AGCACGGCGCTTTTCGTGATG-3'), U2 (5'-ACAGGCAACAGTTTTGATCC-3'), U4 (5'-TACCGGATATAGTATTGCAC-3'), U5 (5'-CCGCTCGAGGACACCCCAAAGTTT-3'), U6 (5'-GGGAGAGTGCTAATCTTCTC-3') e SL (5'-CGACCCACCTTCCAGATTC-3') snRNAs foi realizada misturando-se 14,3 µl H₂O; 2 µl tampão da T4 PNK 10X; 2 µl oligo 100 ng/µl; 1,2 µl [γ -³²P] ATP (ICN >200 µCi); 0,5 µl T4 PNK 10 U/µl. A reação foi incubada por 30 min/ 37 °C e purificada por gel filtração (*Micro Bio-Spin 30*, BioRad). Foram adicionados 150 µl de H₂O para acertar a concentração para 1 ng/µl.

7.2. Obtenção do RNA

Uma alíquota de 1 ml do extrato (Y4) foi extraída como no item 5, alíquotada em frações de 100 µl cada e guardadas a -80 °C. ~ 30 µl de *beads* de IgG foram equilibrados com 800 µl de tampão PA-150 (item 5, substituindo KCl por NaCl), centrifugando 3.000g/ 30 seg, por 2x. Uma amostra de 10 µl + 10 µl tampão de amostra foi separada da alíquota de extrato extraído para o WB. Após a retirada do sobrenadante, a resina foi incubada com 100 µl do extrato extraído e 400 µl de tampão PA-150 por 1h/ 4° C/ rotação lenta. Após centrifugação 3.000g/ 30 seg, o sobrenadante foi coletado, uma amostra de 10 µl + 10 µl tampão de amostra foi separada para WB e a resina lavada 5x com 800 µl de tampão PA-150, centrifugando a 3.000g/ 30 seg a cada lavagem. A resina foi ressuspensa em 30 µl de PA-150 e 12 µl (equivalente a 6 µl de resina sem tampão) foram

transferidos para outro tubo para o WB. O sobrenadante foi retirado e a resina ressuspensa em 40 µl de tampão de amostra. O restante da resina (o outro tubo) foi centrifugado novamente, retirado o sobrenadante e seguiu-se com a extração do RNA. No gel para o *western blot* foram aplicados 2 µl do input, 5 µl do sobrenadante e 5 µl da resina, seguindo o mesmo protocolo do item 3.4.3.

O RNA presente na amostra foi obtido com a adição de 300 µl de solução D (25g tiocianato de guanidina; 29,3 ml H₂O; 1,76 ml citrato de sódio 0,75M pH 7,0; 2,64 ml sarcosyl 10%; 7,2 µl 2-Me/ ml no momento do uso) diretamente nas *beads* e vórtex. Adicionou-se 30 µl NaAc 2M pH 4,0 e inverteu-se o tubo para homogeneização. Em seguida o RNA foi extraído pela adição de 300 µl de fenol ácido saturado e 60 µl clorofórmio, vórtex e incubou-se no gelo por 10 min, seguido de centrifugação 16.000g/ 5 min/ TA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 1 µl de glicogênio 20 mg/ml, misturando por inversão. O RNA foi precipitado com 3 volumes de ETOH 100%, centrifugando por 10 min/ 16.000g/ TA. O sedimento foi lavado 2x com 500 µl de ETOH 70%, centrifugando 5 min/ 16.000g/ TA, seco e ressuspensão em 40 µl H₂O DEPC.

7.3. Primer Extension

Misturou-se 10 µl RNA (item 8.2); 4 µl tampão 1st *strand* 5X e 3 µl dos oligonucleotídeos marcados (volume total). Para cada RNA foram realizadas uma reação contendo os oligos de U2, U4, U6 e SL (reação a) e outra contendo os oligos de U1 e U5 (reação b). Os tubos foram incubados por 5 min/ 70 °C e 5 min/ gelo. Foram adicionados 2 µl DTT 0,1M; 1 µl dNTP 10 mM e 0,5 µl transcriptase

reversa (*Superscript II* – Invitrogen) e a reação foi incubada por 45 min/ 42 °C. Os produtos da reação foram precipitados com 60 µl ETOH 100% e 2,5 µl NaAc 3M pH 7,0, centrifugando 16.000g/ 10 min/ TA. O sedimento foi seco e ressuspensão em 10 µl de tampão de amostra contendo uréia.

Cinco µl de cada produto foram aplicados em PAGE 8% - 7M uréia para eletroforese e analisados após exposição em filme de raios-X.

8. Imunolocalização das proteínas fusionadas ao *PTP-tag*

2-4x10⁶ parasitas *PTP-tag* positivos (fase *log*) foram centrifugados a 600g/ 10 min, o sedimento foi lavado 2x com 1 ml de PBS 1X, pH 7,4 (Sigma – tabletes) gelado e em seguida os parasitas foram ressuspensos em 100 µl de PBS 1X gelado.

Lamínulas de 12 mm de diâmetro foram colocadas em cada poço de uma placa de 24 poços. Foram pipetados 25 µl da suspensão de parasitas em cada lamínula, incubando por 15 min/ TA para a adesão na lamínula. Foi adicionado gentilmente 1 ml de solução de paraformaldeído 4% em PBS 1X para fixação, incubando a placa por 15 min/ 4°C.

Após 2 lavagens com 1 ml de PBS 1X gelado, foi adicionado 1 ml de solução Triton X-100 0,1% em PBS 1X gelada, incubando por 10 min/ TA. Após 4 lavagens com 1 ml de PBS 1X gelado (5 min cada), a lamínula foi bloqueada por 1h/ TA com 200 µl de solução de bloqueio (1% fish gelatin (Sigma); 0,02% NaN₃; PBS 1X/ 0,05% Tween 20 q.s.p.).

A lamínula foi então incubada com 200 µl do anticorpo primário anti-proteína A de coelho (Sigma, P3775, diluição 1:40.000) diluído em solução de

bloqueio por 1h/ TA. Após 6 lavagens com 1 ml de PBS 1X/ Tween 20 0,05% gelado (5 min cada), 200 µl de solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário Alexa 594 (Invitrogen, A11072, diluído 1:400) e DAPI 1 mg/ml (diluído 1:200) foi adicionada, incubando por 1h/ TA.

A lamínula foi então lavada 6x com 1 ml de PBS 1X/ Tween 20 0,05% gelado (5 min cada) e montada em uma lâmina de vidro com *Vectashield*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de conhecer novas proteínas que compõem o spliceosomo em tripanosomatídeos, estabeleceu-se a metodologia de PTP-*tag* segundo Schimanski et al. (2005), em colaboração com o Prof. Dr. Arthur Günzl da *University of Connecticut Health Center*, durante o programa de doutorado sanduíche (PDEE) por um período de 12 meses, com o apoio financeiro da Capes.

Nessa metodologia uma proteína alvo fusionada ao *tag* PTP (**Proteína C**, sítio de clivagem TEV protease, **Proteína A**) pode ser produzida *in vivo* em *Trypanosoma brucei* (Fig. 27). A presença do *tag* permite a purificação da proteína alvo, ligada a outras proteínas que tenham interação *in vivo*, a partir do extrato total do parasita (Fig. 28).

Neste trabalho, a proteína SmD1 de *T. brucei* foi escolhida como alvo para a purificação do complexo spliceosomal utilizando a metodologia de PTP-*tag* com o intuito de se identificar proteínas que se ligam à SmD1 e/ou a outros componentes do spliceosomo, havendo um interesse especial em proteínas ligadas ao SL RNP até hoje não identificadas. A escolha dessa proteína se deve à sua presença em todas as snRNPs envolvidas no processamento dos pré-mRNAs por *splicing* (U1, U2, U4, U5 e SL), com exceção de U6 snRNP que é composta por proteínas *L*Sm (*Sm-like*). A SmD1 de *T. brucei* (código de acesso - Tb927.7.3120) é uma proteína de 11,7 kDa, 106 aas e que possui um domínio Sm. Experimentos envolvendo RNAi mostraram que o *knock-down* de SmD1 é letal para o parasita e causa anormalidades no mecanismo de *trans-splicing* (Mandelboim et al. 2003; Zeiner et al. 2004).

Sendo assim, o vetor pC-PTP-neo contendo a seqüência que codifica para SmD1 (do ATG ao stop códon) fusionada ao PTP na porção C-terminal foi inserido no genoma do parasita (transfecção) para a produção da proteína recombinada e, após diluições seriadas, alguns clones foram isolados. Para a verificação da inserção correta da seqüência alvo no genoma, foi realizada a reação de PCR com oligonucleotídeos SmD1-PTP 5'out e protC-TAP3', que resultou na presença de uma banda de 410 pb, como esperado (dados não mostrados). O mesmo clone também foi analisado para a produção da proteína contendo o *tag* utilizando WB com anticorpo anti-proteína A (Fig. 29). Neste experimento, foi observada uma banda única de 30,7 kDa (11,7 kDa de SmD1 + 19 kDa do *tag* PTP), demonstrando que o parasita expressou a proteína recombinada adequadamente.

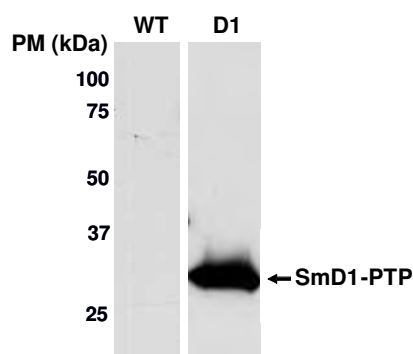


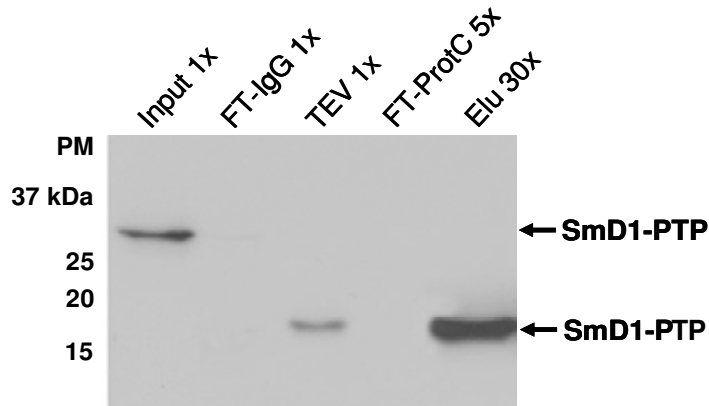
Figura 29: WB do clone PCR-positivo para a transfecção de SmD1-PTP, utilizando anticorpo anti-proteína A. WT: cepa 427 não transfectada.

Em seguida, foi realizada uma cultura de 3,5 L da fase *log* do clone SmD1-PTP positivo para o preparo do extrato total. A purificação de SmD1-PTP (ver item 5) consiste na utilização de uma coluna de IgG, seguida de uma coluna de anti-

proteína C, na presença de Ca^{2+} . SmD1 foi eluída pela desestabilização da reação antígeno-anticorpo, com a adição de solução EGTA/EDTA para a retirada do Ca^{2+} . Cada etapa da purificação foi acompanhada por WB utilizando anticorpo anti-proteína C (Fig. 30A). No *input* (amostra inicial do extrato) observou-se a presença da proteína recombinada. O FT-IgG com ausência de banda mostrou que toda a proteína presente no extrato foi ligada à coluna de IgG e não perdida durante as lavagens. Ao clivarmos a proteína com TEV protease, a proteína recombinada foi eluída eficientemente e com um tamanho reduzido, já que a porção da proteína A foi retirada. O FT-ProtC mostra que toda a proteína se ligou à coluna e em seguida foi eficientemente eluída, como observado na amostra do eluato final.

As amostras da purificação de SmD1-PTP também foram analisadas após eletroforese em gel Tris-HCl 10-20% gradiente corado com *Sypro-Ruby* (Invitrogen) (Fig. 30B). Observamos que houve a eluição de uma série de proteínas no TEV eluato, sendo que as não contaminantes apresentaram-se mais concentradas no eluato final, confirmando uma purificação eficiente.

A)



B)

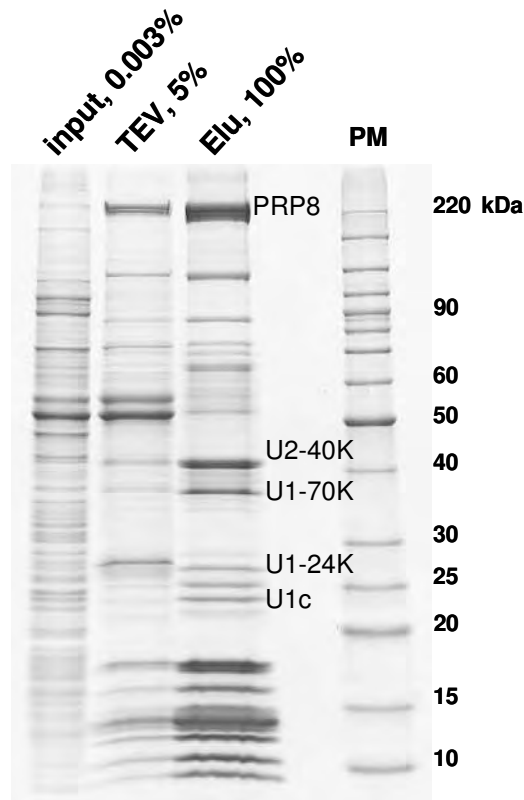


Figura 30: A) WB das etapas de purificação de SmD1-PTP, utilizando anticorpo anti-proteína C. B) Eletroforese em gel Tris-HCl 10-20% gradiente contendo as amostras da purificação de SmD1-PTP, corado com *Sypro-Ruby*. Algumas proteínas específicas de U1, U2 e U5 conhecidas estão indicadas no gel. *Input*: extrato total inicial; FT-IgG: *flow-through* da coluna de IgG; TEV: eluato após clivagem com TEV; FT-protC: *flow-through* da coluna anti-proteína C; Elu: eluato final. As concentrações das amostras aplicadas nos géis estão indicadas nas figuras.

Após dialisado e concentrado, o eluato da purificação de SmD1-PTP foi enviado para a análise por espectrometria de massas (LC/MS/MS) e as proteínas, identificadas por pelo menos 2 peptídeos diferentes, encontram-se descritas na tabela a seguir:

Tabela 1: proteínas identificadas após purificação de SmD1-PTP

Proteínas	PM (kDa)	n. peptídeos diferentes	Referências ou domínios
Proteínas Sm			
SmB*	12,3	8	Palfi et al. 2000
SmD1*	11,7	7	Palfi et al. 2000
SmD2*	12,5	8	Palfi et al. 2000
SmD3*	12,4	4	Palfi et al. 2000
SmE*	9,6	7	Palfi et al. 2000
SmF*	8,4	4	Palfi et al. 2000
SmG*	8,9	5	Palfi et al. 2000
Sm U2-15K / Ssm2-1*	12,8	4	Wang et al. 2006; Tkacz et al. 2007
Sm U2-16.5K / Ssm2-2	14,7	2	Wang et al. 2006; Tkacz et al. 2007
Ssm-4*	23,2	8	Tkacz et al. 2007
Proteínas snRNPs específicas			
U1-70K*	31,7	5	Palfi et al. 2002; Palfi et al. 2005
U1-C*	21,7	4	Palfi et al. 2005
U1-24K	24,2	3	Palfi et al. 2005
U2-40K*	36,5	16	Cross et al. 1993
U2-B*	13,6	4	Ivens et al. 2005
U5-PRP8*	277,0	47	Lücke et al. 1997
U5-116K*	105,5	22	Ivens et al. 2005
U5-15K (Dib-1)	17,7	2	Ivens et al. 2005
Proteínas Lsm			
Lsm4	14,2	3	Liu et al. 2004
Lsm7*	10,2	3	Liu et al. 2004
Lsm8	14,0	3	Liu et al. 2004

Outras proteínas**

Hipotética conservada (p12)	12,0	2	
Hipotética conservada (p13,2)	13,2	6	domínio Lsm ¹
Hipotética conservada (p16,2)*	16,2	4	
Hipotética conservada (p17)*	17,0	3	
Hipotética conservada (p18)*	18,0	3	domínio RRM ²
Hipotética conservada (p27,1)	27,1	3	ciclofilina ³
Hipotética conservada (p31)	31,0	2	
Hipotética conservada (p31,7)	31,7	4	
Hipotética conservada (p35)*	35,0	6	domínio WD40 ⁴
Hipotética conservada (p42)	42,0	4	
Hipotética conservada (p55,4)	55,4	4	
Hipotética conservada (p63,2)*	63,2	9	domínio PRP3 ⁵
Hipotética conservada (p65,5)	65,5	12	domínio WD40 e PRP4 ⁶
Hipotética conservada (p87,7)	87,7	8	domínio HAT ⁷
Hipotética conservada (p92,2)*	92,2	10	
Hipotética conservada (p111)	111,0	7	repetições TPR ⁸
Triparedoxina peroxidase	22,4	2	
<i>Poly A binding protein</i>	62,1	7	
HSP70	75,4	5	
RNA helicase putativa	249,3	45	

* presentes em duas purificações diferentes.

** para facilitar a nomenclatura, as proteínas conservadas hipotéticas serão chamadas de p seguido do PM.

¹ LSm (*Sm-like*): domínio encontrado no *core* da estrutura de proteínas LSm. Essas proteínas possuem diversas funções, e acredita-se serem importantes moduladores da biogênese e função do RNA.

² RRM (*RNA recognition motif*): domínio abundante em proteínas envolvidas nos processos de regulação pós-transcricionais (processamento de mRNA e rRNA, exportação e estabilidade de RNA), que interage com RNAs de fita simples, mas que também pode interagir com DNAs de fita simples. É encontrado em uma variedade de hnRNPs (ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas), proteínas relacionadas ao *splicing* alternativo e componentes de snRNPs.

³ ciclofilina: ligação de proteínas com alta afinidade em vertebrados. Exibe uma atividade peptidil-prolil cis-trans isomerase, que acelera o *folding* de proteínas, ou seja, participa em processos nas mudanças conformacionais protéicas.

⁴ WD40: Este domínio é encontrado em proteínas eucarióticas, com uma variedade de funções, incluindo adaptador/regulador na transdução de sinal, processamento de pré-mRNA, montagem do citoesqueleto e coordenação de interações com outras proteínas e/ou pequenos ligantes.

⁵ PRP3 (*pre-mRNA processing factor 3*): fator de *splicing* associado a U4/U6 snRNPs.

⁶ PRP4 (*pre-mRNA processing factor 4*): encontrado em U4/U6 snRNPs, envolvida no processamento do pré-mRNA.

⁷ HAT (*half-A-TPR*): caracterizado pela presença em várias proteínas que ligam RNA e estruturalmente similar aos TPRs (domínio repetido tetratricopeptídeo). Parece ser componente de complexos macromoleculares requeridos para processamento de RNA. As repetições podem estar envolvidas em interações proteína-proteína.

⁸ repetições TPR (*tetratrico peptide repeat*): presente em uma variedade de proteínas, que promove a interação proteína-proteína e a montagem de complexos multiprotéicos. Proteínas contendo TPRs estão envolvidas em diversos processos como regulação do ciclo celular, controle transcricional, transporte de proteínas mitocondriais e peroxisomais, neurogênese e *folding* protéico.

Foram realizadas duas purificações independentes, com extratos preparados em dias diferentes e enviados para a espectrometria de massas. As proteínas identificadas em ambas as purificações estão indicadas na Tabela 1 por asteriscos.

Como esperado, todas as proteínas Sm e proteínas específicas de snRNPs já conhecidas estavam presentes na amostra. Das 7 proteínas LSm conhecidas, somente 3 foram detectadas na amostra naquele momento. Uma possível explicação seria que a presença de U6 snRNP é dependente da presença da forma U4/U6 snRNP, pois U4 snRNP possui SmD1, permitindo a sua co-purificação. Sendo assim, a ausência de U6 snRNP livre promove uma menor concentração de suas proteínas LSm e específicas na amostra, dificultando a detecção pelo espectrômetro de massas.

As proteínas triparedoxina peroxidase, *poly-A binding protein* e HSP70 não eram esperadas nesta amostra, mas sua presença pode estar relacionada com a contaminação da amostra durante a purificação ou por interações eventuais com o spliceossomo.

Além das proteínas já mencionadas, mais 16 proteínas conservadas hipotéticas foram identificadas na amostra que, pelo nosso interesse em proteínas

desconhecidas, 10 delas foram os alvos de estudo nessa tese. A maioria das proteínas conservadas hipotéticas presentes em *T. brucei* apresentaram identidade com proteínas em *T. cruzi* e *L. major* (tabela 2). Para p12, p31 e p31,7 não foram encontradas seqüências homólogas em *L. major*.

Tabela 2: Porcentagem de identidade entre seqüências de *T. brucei* quando comparadas com *T. cruzi* e *L. major*

<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>		<i>L. major</i>	
	aminoácidos idênticos	aminoácidos conservados	aminoácidos idênticos	aminoácidos conservados
p12	61	69	-	-
p13,2	62	77	36	48
p16,2	64	79	42	57
p17	36	53	28	46
p18	56	70	33	56
p27,1	61	75	-	-
p31	27	43	-	-
p31,7	27	43	-	-
p35	22	34	50	69
p42	35	48	-	-
p55,4	45	59	23	36
p63,2	54	67	35	49
p65,5	52	65	28	41
p87,7	66	79	41	59
p92,2	55	74	37	57
p111	59	75	32	47

Todas as seqüências foram analisadas utilizando-se ferramentas de bioinformática como *BLAST* no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), *omniBLAST* no GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/seqSearch.jsp>) e

alinhamentos com *GeneDoc* e *ClustalW*, na busca de informações que pudessem direcionar para uma possível identificação dessas proteínas, possível ligação com snRNAs ou outras proteínas conhecidas, bem como prováveis funções.

Algumas proteínas apresentaram domínios conservados que estão apresentados na tabela 2, enquanto as outras não mostraram nenhum tipo de informação, além da presença de proteínas homólogas à de *T. brucei* em *T. cruzi* e *L. major*.

Com o projeto genoma dos *Trityps* (denominação que engloba *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*), foi evidenciado aproximadamente 57% de identidade entre as seqüências de genes ortólogos de *T. brucei* e *T. cruzi*, e 44% de identidade entre *L. major* e esses tripanosomas, refletindo uma relação filogenética entre esses organismos. O restante do proteoma é composto por proteínas espécie-específicas (*T. cruzi* – 32%, *T. brucei* – 26% e *L. major* – 12%), que estão relacionadas com famílias de antígenos de superfície, genes relacionados a estratégias de sobrevivência e evasão do sistema imune (EL-SAYED et al., 2005). Esse tipo de análises torna possível o estudo do mecanismo de *splicing* e das proteínas nele envolvidas em *T. brucei*, extrapolando-se os resultados obtidos para proteínas homólogas de *T. cruzi* e *L. major*. Sendo assim, foram escolhidas 10 proteínas conservadas hipotéticas (p13,2; p16,2; p17; p18; p31; p35; p42, p65,5; p87,7 e p92,2) para o prosseguimento dos estudos, utilizando *T. brucei* como modelo de estudo.

As seqüências das 10 proteínas foram analisadas para a construção dos oligonucleotídeos para clonagem em vetor pC-PTP-neo e transfecção (ver itens 2 e 3, em materiais e métodos), com o objetivo de purificar cada proteína do extrato e observar a sua eventual relação com algum dos snRNAs envolvidos no *splicing*

(U1, U2, U4, U5, U6 e SL), o que auxiliaria na identificação de proteínas específicas de snRNPs, bem como dedução de possíveis subcomplexos.

Após a verificação dos clones para cada uma das proteínas por PCR e *western blot*, como já descrito anteriormente para SmD1-PTP, o experimento de *primer extension* foi utilizado para a identificação dos snRNAs presentes em cada amostra das proteínas hipotéticas fusionadas ao PTP, sendo utilizado SmD1-PTP como controle positivo para todos os snRNAs e CITFA-2-PTP, um fator de transcrição de classe I (BRANDENBURG et al., 2007), como controle negativo. Os snRNAs foram obtidos após a incubação do extrato extraído com as *beads* de IgG, já que a purificação total do PTP seria financeiramente inviável somente para este experimento.

A Fig. 31 mostra os produtos da reação de *primer extension* das proteínas p18; p16,2; p35; p65,5 e p13,2; que apresentaram interação forte com um dos snRNAs quando comparada à reação com a amostra de SmD1-PTP, indicando serem prováveis proteínas específicas de U1, U5, U5, U4/U6 e U6 snRNPs, respectivamente.

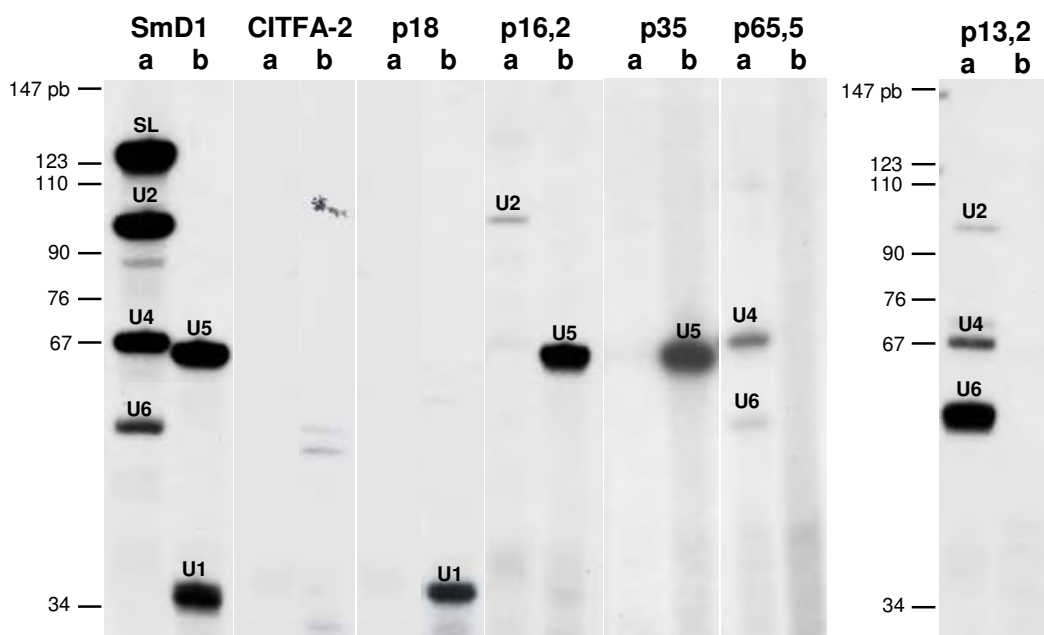


Figura 31: Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *Primer extension* das proteínas p18; p16,2; p35; p65,5 e p13,2 com os oligonucleotídeos marcados radioativamente para (a) SL, U2, U4 e U6, e (b) U1 e U5, com as respectivas bandas marcadas na figura. SmD1, como controle positivo e CITFA-2, como controle negativo.

Diante dos resultados obtidos na reação de *primer extension* (Fig. 31), foi possível a análise mais direcionada das sequências para eventuais proteínas homólogas conhecidas. A p18 foi a primeira a ser analisada pela presença de um domínio conservado de ligação ao RNA, denominado de RRM (*RNA recognition motif*), do Glu² à Pro⁷⁹. RRM, também conhecido como RBD (*RNA binding domain*) ou RNP (*ribonucleoprotein domain*), é um domínio abundante em proteínas envolvidas nos processos de regulação pós-transcricionais (processamento de mRNA e rRNA, exportação e estabilidade de RNA), que interage com RNAs de fita simples, mas que também pode interagir com DNAs de

fita simples. O domínio RRM é encontrado em uma variedade de hnRNPs (ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas), proteínas relacionadas ao *splicing* alternativo e componentes de snRNPs.

Com os resultados da ligação de U1 snRNA à p18 observados na reação de *primer extension*, analisamos essa sequência como sendo um possível homólogo da proteína U1-A, que até o momento não havia sido identificado em tripanosomas e acreditava-se que a sua ausência seja devida à presença da proteína U1-24K, conservada entre os tripanosomatídeos (PALFI et al., 2005).

A Fig. 32 mostra o alinhamento da sequência de p18 dos tripanosomatídeos e de U1-A de outros organismos. Diante desse alinhamento, podemos observar várias regiões altamente conservadas que nos permitem concluir que deva se tratar da sequência de U1-A.

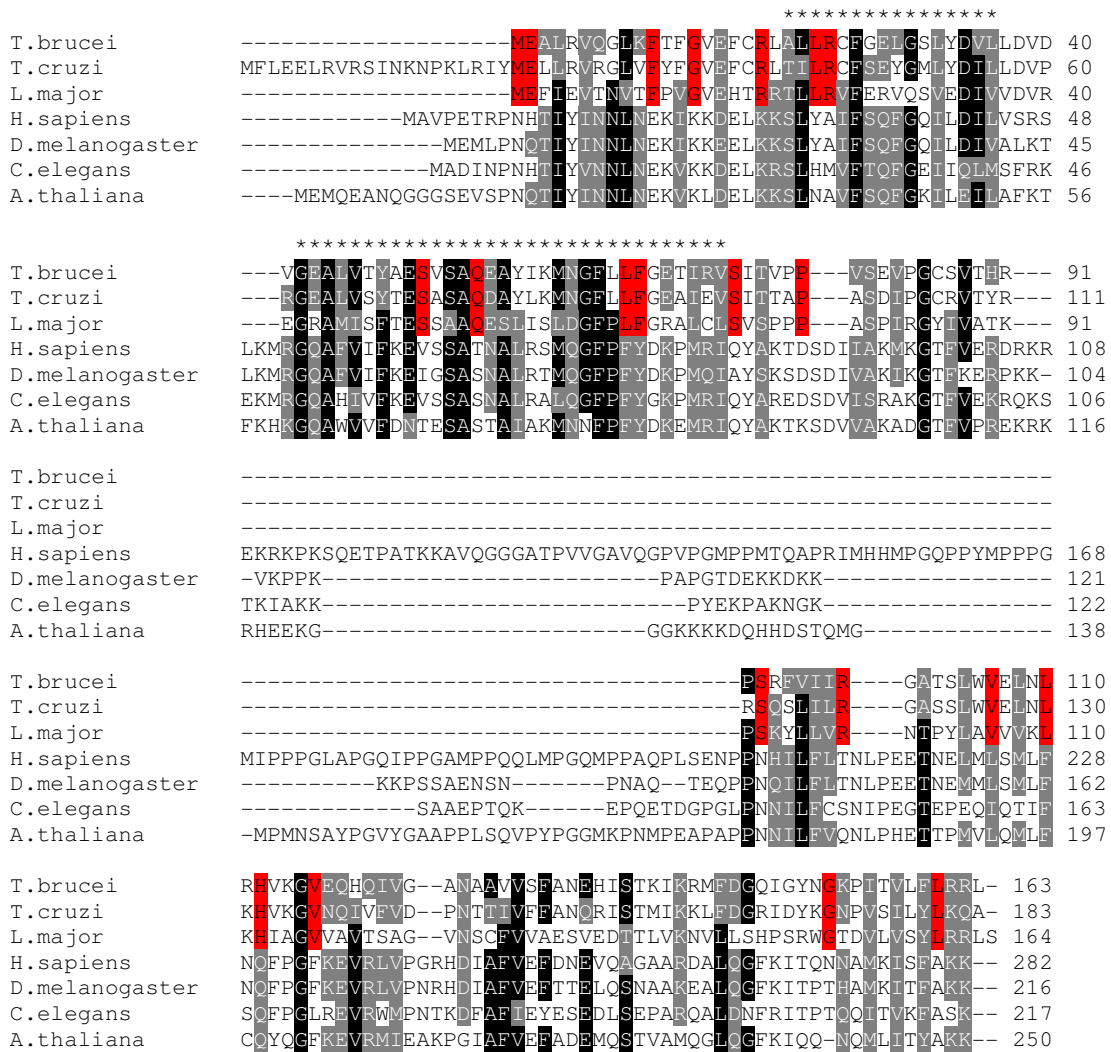


Figura 32: Alinhamento múltiplo da seqüência de p18 dos tripanosomatídeos com outras seqüências de U1-A conhecidas. Em vermelho estão os aminoácidos idênticos entre os tripanosomatídeos, em preto os aminoácidos idênticos em pelo menos cinco organismos e em cinza os aminoácidos conservados em pelo menos cinco organismos. O domínio RRM está indicado por asteriscos. *H. sapiens* (NP_004587), *D. melanogaster* (P43332), *C. elegans* (NP_500505) e *A. thaliana* (NP_182280).

A p16,2 mostrou a presença de U5 snRNA na reação de *primer extension* (Fig. 31) sugerindo uma provável proteína específica de U5 snRNP. Em humanos são conhecidas 7 proteínas de U5 (PRP8, 200K, 116K, 102K, 100K, 40K, 15K) e em tripanosomas somente 3 (PRP8, 15K, 116K) e, após extensas e detalhadas

comparações entre cada uma das proteínas de U5 conhecidas e a p16,2, não foi possível uma conclusão de que essa seja uma proteína homóloga à alguma dessas proteínas U5 conhecidas. Sendo assim, a p16,2 pode tratar-se de uma nova proteína de U5 snRNP, que deverá ser melhor estudada quanto a sua importância para o parasita e função no mecanismo de *splicing* em tripanosomas.

Uma das informações relevantes obtidas foi que ao compararmos essa sequência com o genoma humano, apresentou uma identidade baixa (42%) com a sequência da proteína SRRM2 de humanos, mas com regiões extremamente conservadas, principalmente os 5 aas iniciais de p16,2, correspondentes exatamente aos 5 aas iniciais de SRRM2 (Fig. 33).

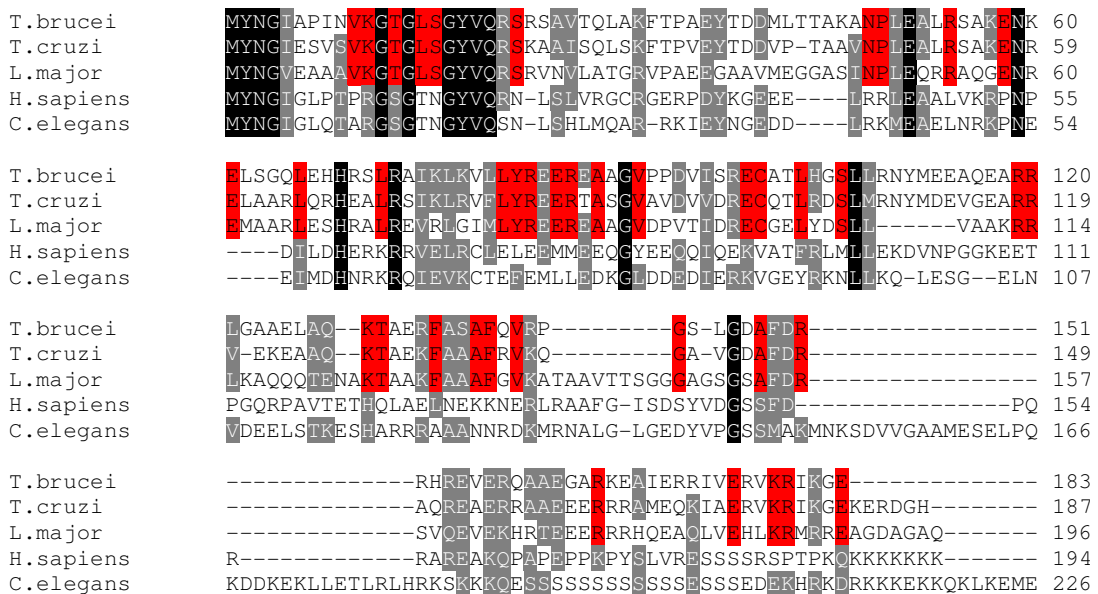


Figura 33: Alinhamento múltiplo da sequência de p16,2 dos tripanosomatídeos com sequências de SRRM2 de outros organismos. Em vermelho estão os aminoácidos idênticos entre os tripanosomatídeos, em preto os aminoácidos idênticos em pelo menos quatro organismos e em cinza os aminoácidos conservados em pelo menos quatro organismos. *H. sapiens* (AAH46104) e *C. elegans* (NP_496595).

Ao investigarmos a proteína SRRM2, também chamada de CWF21, 300-kD, SRL300 e SRm300 nos diferentes organismos, observamos que se trata de uma proteína denominada de SR relacionada, pois apresenta o domínio RS, mas o RRM está ausente, que é comum nas proteínas SR. A proteína SRm300 aparece ligada à proteína SRm160, formando um complexo *splicing* co-ativador. SRm160/300 promove o *splicing* de seus substratos pela formação de múltiplas interações com fatores que se ligam diretamente ao pré-mRNA, mas a ausência somente de SRm300 não influenciou no processamento como na depleção do complexo inteiro ou de somente SRm160. Essa associação com o pré-mRNA requer U1 snRNP, proteínas SR que se ligam a um ESE (*exonic splicing enhancer*) que é estabilizado pela U2 snRNP (BLENCOWE et al., 1998; BLENCOWE et al., 2000; SAWADA et al., 2000). Nenhuma informação relacionada à interação com U5 snRNP foi encontrada na literatura; sendo assim, estudos de funcionalidade serão importantes para a caracterização desta proteína e para desvendarmos se ela pode estar funcionalmente relacionada com a proteína SRm300.

A p13,2 apresentou-se ligada fortemente a U6 snRNA e (Fig. 31), como esperado, podemos observar a presença de U4 snRNA por estar pareado com U6 (U4/U6 snRNP). Esta proteína apresenta um domínio LSm, característico de proteínas que se ligam ao sítio LSm de snRNAs. Somadas às informações da presença de um domínio LSm e da presença marcante de U6 snRNA, concluímos que se tratava de uma proteína LSm, uma vez que 2 proteínas LSm (LSm-2 e LSm-5) ainda eram desconhecidas em tripanosomas. Entretanto, Tkacz e colaboradores (2007) determinaram essa proteína como sendo a LSm-2. Também podemos observar nessa reação a presença de pequena quantidade de U2, que

pode indicar a formação de um complexo intermediário U2/U4/U6, não observado no *cis-splicing*.

A p35 mostrou-se associada fortemente a U5 snRNA (Fig. 31), como já esperado pelos dados obtidos por análises de bioinformática, que indicavam uma proteína com uma fraca identidade com a U5-40K, apresentando somente 27% de identidade de aa quando comparada com a proteína de humanos, identidade que se deve principalmente ao domínio WD40. Este domínio é encontrado em proteínas eucarióticas, com uma variedade de funções, incluindo adaptador/regulador na transdução de sinal, processamento de pré-mRNA, montagem do citoesqueleto e coordenação de interações com outras proteínas e/ou pequenos ligantes. Diante dessas informações e de que a proteína possui peso molecular próximo aos 40 kDa, é possível que essa proteína seja um homólogo de U5-40K, mas são necessários estudos de interação com as outras proteínas de U5 e de funcionalidade para esta comprovação.

A p65,5 apresentou ligação com U4 e U6 snRNAs (Fig. 31) e possui os domínios WD40 e PRP4, característicos da proteína PRP4 presente em U4/U6 snRNPs de humanos e leveduras. Além disso, a proteína PRP4 apresenta, em humanos, peso molecular de 60 kDa, muito próximo ao da p65,5. Entretanto, os alinhamentos com as sequências das proteínas de humanos e leveduras apresentaram identidade somente na região dos domínios conservados. Sendo assim, são várias as evidências de que essa proteína seja o homólogo de PRP4, apesar de não ter apresentado muita identidade com as outras PRP4 conhecidas.

Na Fig. 34A podemos observar os produtos da reação de *primer extension* das proteínas p87,7; p42; p31; p17 e p92,2 que, diferentemente das reações

observadas na Fig. 31, apresentaram um padrão de reação com 2 ou mais snRNAs. Para um melhor controle da eficiência na purificação dos RNAs, tendo em vista que não foi observada uma reação tão intensa no *primer extension*, realizou-se a reação de *western blot* da purificação com anticorpo anti-proteína A. Apesar de algumas amostras ainda conterem proteína não ligada no sobrenadante, a quantidade de proteína ligada à resina manteve-se semelhante, demonstrando que todas as proteínas foram purificadas adequadamente e é possível a comparação dos resultados (Fig. 34B).

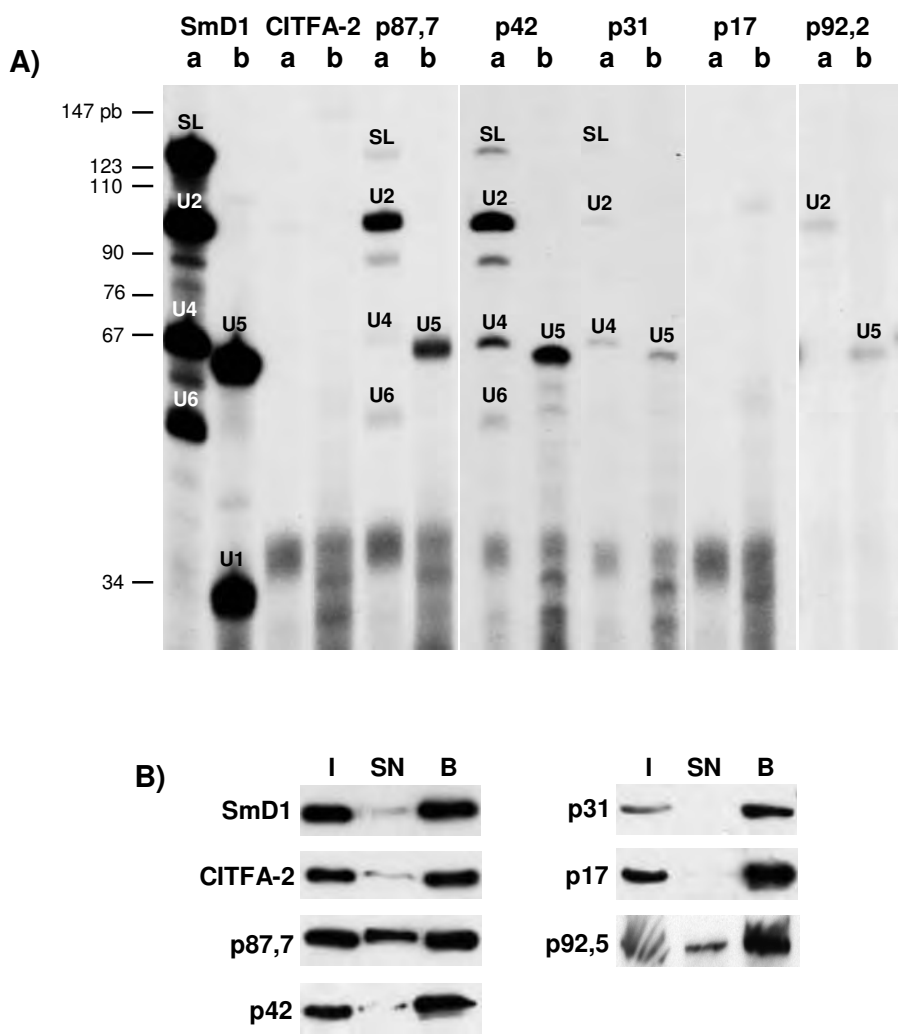


Figura 34: A) Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *primer extension* das proteínas p87,7; p42; p31; p17 e p92,2 com os oligonucleotídeos marcados radioativamente para (a) SL, U2, U4 e U6, e (b) U1 e U5, com as respectivas bandas assinaladas na figura. SmD1, como controle positivo e CITFA-2, como controle negativo. B) *Western blot* controle da obtenção dos RNAs para o *primer extension* utilizando anticorpo anti-proteína A. *Input* (I), sobrenadante (SN) e *beads* (B).

As proteínas p87,7 e p42 (Figura 34A) apresentaram um padrão de reatividade com U5 e U2 semelhantes, mas além disso, observou-se a presença de reação com SL, U4 e U6 em menor intensidade. Esse resultado pode sugerir a

interação de U2, U5, SL e U4/U6 em algum momento do processamento por *trans-splicing*. A p87,7 apresenta um domínio HAT (*Half-A-TPR*) que é caracterizado pela presença em várias proteínas que ligam RNA e é estruturalmente similar aos TPRs (domínio repetido tetratricopeptídeo). Parece ser um componente de complexos macromoleculares requeridos para processamento de RNA. As repetições podem estar envolvidas em interações proteína-proteína.

A p31 apresentou SL, U2, U4 e U5 em concentrações extremamente baixas se compararmos com o controle positivo com SmD1 (Fig. 34A). A p92,2 apresentou-se positiva para U5 e U2, podendo sugerir a formação desse complexo em algum momento do processamento.

Em relação às proteínas p87,7, p42, p31 e p92,2 (Fig. 34A), podemos concluir que se tratam de prováveis fatores de *trans-splicing* que fazem interações com complexos pré-formados ou possuem alguma função de ligação entre algumas ribonucleoproteínas, mas esta função específica necessita ser melhor analisada.

A p17 não apresentou reação com nenhum dos snRNAs analisados (Fig. 34A). Algumas justificativas podem ser levantadas: a proteína pode ter aparecido na lista de proteínas vindas da espectrometria de massas por contaminação durante a purificação e não ter nenhuma relação com o spliceosomo; ou estaria fazendo uma interação instável e momentânea que foi desfeita durante a sua purificação; ou a adição do *tag* à proteína estaria modificando a sua estrutura tridimensional, desfazendo as interações com as snRNPs, sendo esta a explicação mais provável.

Para todas as proteínas estudadas (p13,2; p16,2; p17; p18; p31; p42 e p87,7) foi realizada a imunolocalização utilizando-se o anticorpo anti-proteína A, dirigido para o *tag* PTP (Fig. 35). Todas as proteínas apresentaram-se concentradas no núcleo, como esperado por se tratarem de proteínas envolvidas no *splicing*, um processamento que ocorre no núcleo. As proteínas p35; p65,5 e p92,2 foram imunolocalizadas e também se apresentaram concentradas no núcleo, mas por problemas técnicos, não foram apresentadas na Fig. 35. Somente a proteína p16,2 apresentou-se também dispersa pelo citoplasma, mais um motivo intrigante para o estudo funcional desta proteína.

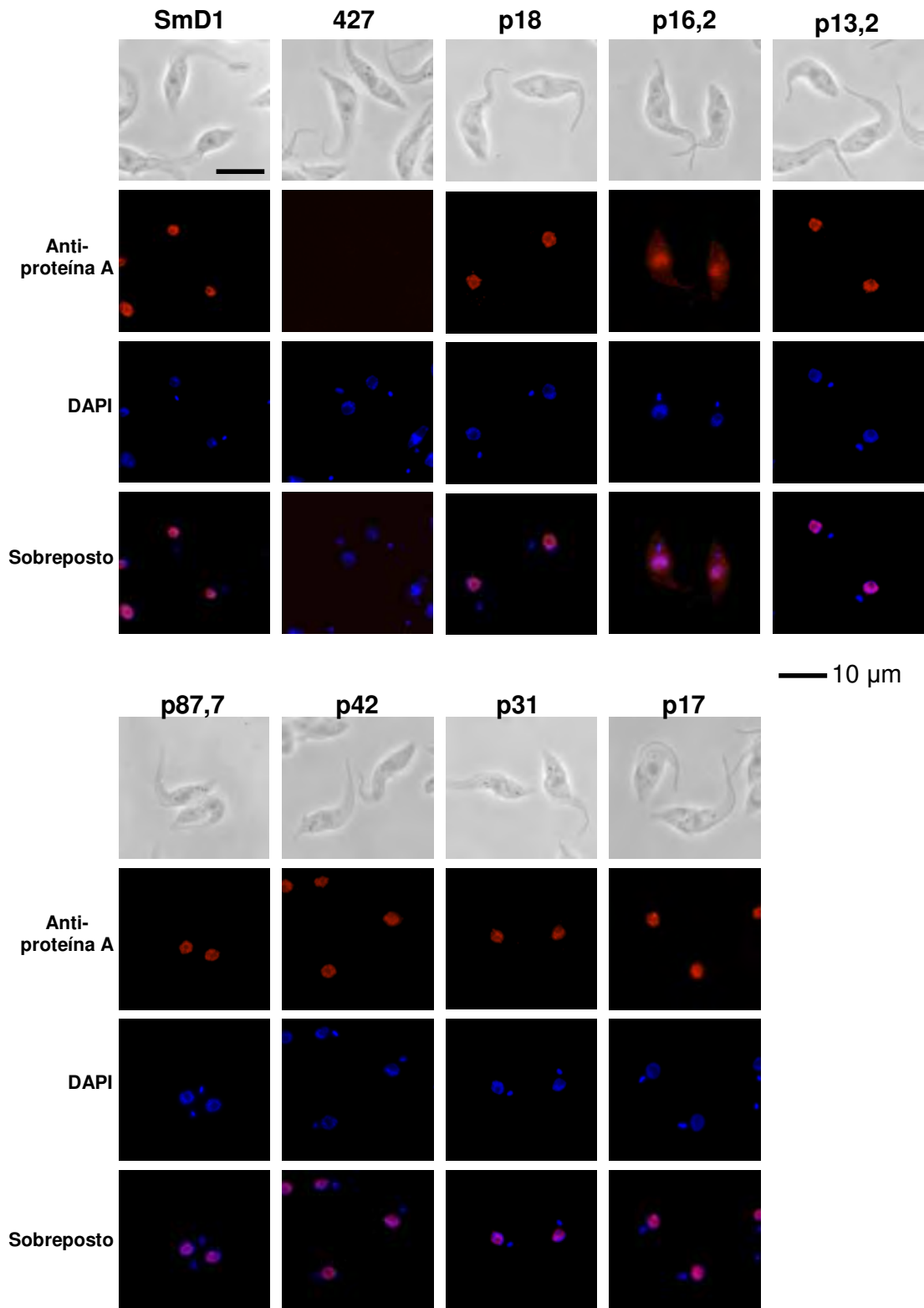


Figura 35: Imunolocalização das proteínas PTP-tagged com anticorpo anti-proteína A (vermelho), DAPI em azul. SmD1, como controle positivo e 427, como controle negativo.

Tabela 3: Resumo dos dados obtidos com as proteínas estudadas

	Domínios	PE (snRNA)	Identificação
p18	RRM	U1	U1-A
p13,2	Sm/Lsm	U6 e U4	LSm-2
p16,2	-	U5	?
p35	WD40	U5	U5-40K
p65,5	WD40 e PRP4	U4 e U6	U4/U6-60K
p87,7	HAT	SL, U2, U4, U5 e U6	fator de <i>splicing</i>
p42	-	SL, U2, U4, U5 e U6	fator de <i>splicing</i>
p31	-	SL, U2, U4 e U5	fator de <i>splicing</i>
p92,2	-	U2 e U5	fator de <i>splicing</i>
p17	-	-	?

CONCLUSÕES

1. A metodologia de PTP-*tag*, tendo como proteína alvo SmD1, foi eficiente para a purificação do complexo spliceosomal em *Trypanosoma brucei*;
2. Um conjunto de 41 proteínas foi identificado por espectrometria de massas da purificação de SmD1-PTP, entre elas estão as proteínas Sm, LSm, proteínas específicas de snRNPs já conhecidas e 16 proteínas conservadas hipotéticas;
3. Algumas das proteínas hipotéticas apresentaram domínios conservados e as restantes não apresentaram nenhuma informação relevante para a caracterização por análises de bioinformática para a sua caracterização, além da sua presença em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*;
4. Obtiveram-se linhagens celulares de 10 proteínas conservadas hipotéticas (p13,2; p16,2; p17; p18; p31; p35; p42; p65,5; p87,7 e p92,2) fusionadas ao PTP-*tag* e a ligação aos snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6 e SL) foi analisada por *primer extension*;
5. Foi possível a determinação da proteína específica U1A (p18) da partícula de U1 snRNP em *T. brucei* que, até o momento, acreditava-se estar ausente nesses parasitas;
6. Uma proteína LSm foi detectada (p13,2) ligando-se a U6 snRNP, como esperado, e que foi caracterizada como uma LSm2;
7. A proteína p16,2 apresentou-se ligada a U5 snRNA, mas não apresentou nenhuma identidade com as proteínas específicas de U5 já conhecidas; entretanto, apresentou identidade de 42% com uma região de SRRM2 de humanos. Além disso, demonstrou-se estar concentrada no núcleo, mas

também dispersa pelo citoplasma, diferentemente das outras proteínas estudadas;

8. Estudos de funcionalidade e interação protéica de p16,2 serão de fundamental importância para a determinação do papel dessa proteína durante o *splicing*;
9. p35 apresentou-se ligada fortemente a U5 snRNA e, considerando-se a presença do domínio WD40 e um tamanho próximo ao de U5-40K de humanos, acredita-se que essa proteína seja um homólogo de U5-40K em tripanosomatídeos;
10. p65,5 apresenta os domínios WD40 e PRP4, que sugerem que essa proteína seja específica de U4/U6 snRNP. Adicionada à informação de ligação com U4 e U6 snRNAs, torna essa proteína uma candidata a PRP4 (U4/U6-60K) nos tripanosomatídeos;
11. p87,7; p42; p31 e p92,2 apresentaram-se ligadas a mais de dois tipos de snRNAs, em uma reação pouco intensa, o que indica que essas proteínas devam ser prováveis fatores de *splicing*, e não proteínas específicas de um dos snRNAs analisados;
12. As análises de primer extension com p87,7; p42; p31 e p92,2 também puderam sugerir a composição de intermediários da reação de *splicing*, como um complexo formado por U2/U5/SL/U4/U6, e o complexo U2/U5;
13. A p17 não mostrou ligação com nenhum dos snRNAs analisados, sendo uma provável explicação que a presença do PTP-*tag* tenha desestabilizado a interação com as snRNPs;
14. Na imunolocalização, todas as proteínas apresentaram-se concentradas no núcleo, como já esperado por se tratarem de proteínas relacionadas ao

processamento do RNA que ocorre no núcleo, com exceção de p16,2 que se apresentou também dispersa pelo citoplasma;

15. Estudos de funcionalidade para as proteínas analisadas devem ser realizados para mostrar a influência de cada uma delas, especificamente, nos mecanismos de *cis* e *trans-splicing*, principalmente da p16,2 que parece ser uma nova proteína de U5 snRNP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHSEL T.; AHRENS K.; BRAHMS H.; TEIGELKAMP S.; LÜHRMANN R. The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein. *Mol. Cell Biol.*, v. 18, n. 11, p. 6756-6766, 1998.

AGABIAN N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, v. 61, p. 1157-1160, 1990.

BARTELS C.; KLATT C.; LÜHRMANN R.; FABRIZIO P. The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. *EMBO Rep.*, v. 3, n. 9, p. 875-880, 2002.

BARTELS C.; URLAUB H.; LUHRMANN R.; FABRIZIO P. Mutagenesis suggests several roles of Snu114p in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 30, p. 28324-28334, 2003.

BELL M.; SCHREINER S.; DAMIANOV A.; REDDY R.; BINDEREIF A. p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO J.*, v. 21, p. 2724-2735, 2002.

BLENCOWE B. J.; ISSNER R.; NICKERSON J. A.; SHARP P. A. A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.*, v. 12, p. 996-1009, 1998.

BLENCOWE B. J.; BAURÉN G.; ELDRIDGE A. G.; ISSNER R.; NICKERSON J. A.; ROSONINA E.; SHARP P. A. The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA*, v. 6, p. 111-120, 2000.

BLUMENTHAL T.; STEWARD K. RNA processing and gene structure. Em *C. elegans* II, D. L. Riddle, ed. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), p. 117-145, 1997.

BOOTHROYD J. C.; CROSS G. A. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene*, v. 20, n. 2, p. 281-289, 1982.

BRANDENBURG J.; SCHIMANSKI B.; NOGOCEKE E.; NGUYEN T. N.; PADOVAN J. C.; CHAIT B. T.; CROSS G. A.; GÜNZL A. Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *EMBO J.*, v. 26, n. 23, p. 4856-66, 2007.

BRUCE D. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. Durban: Bennett and Davis, 1895.

BRUCE D. Classification of the African trypanosomes pathogenic to man and domestic animals. *Trans. Soc. Trop. Med. Hgy.*, v. 8, p. 1-22, 1914.

BRUN R.; SCHONENBERGER M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop.*, v. 36, n. 3, p. 289-92, 1979.

CHAGAS C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS C. A new human disease. Summary of etiological and clinical studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 3, p. 219-275, 1911.

CHEN Y. I.; MOORE R. E.; GE H. Y.; YOUNG M. K.; LEE T. D.; STEVENS S. W. Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, n. 12, p. 3928-3944, 2007.

COLLINS C. A.; GUTHRIE C. Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. *Genes Dev.*, v. 13, n. 15, p. 1970-1982, 1999.

COURA J. R.; JUNQUEIRA A. C. V.; FERNANDES O.; VALENTE S. A. S.; MILES M. A. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 171-176, 2002.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, v. 18, p. 231-245, 2004.

CROSS, G. A. M.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* ssp. in semi-defined and defined media. *Parasitology*, v. 67, p. 315-331, 1973.

CROSS M.; GÜNZL A.; PALFI Z.; BINDEREIF A. Analysis of small nuclear ribonucleoproteins (RNPs) in *Trypanosoma brucei*: structural organization and protein components of the spliced leader RNP. *Mol. Cell Biol.*, v. 11, n. 11, p. 5516-5526, 1991.

CROSS M.; WIELAND B.; PALFI Z.; GÜNZL A.; RÖTHLISBERGER U.; LAHM H. W.; BINDEREIF A. The trans-spliceosomal U2 snRNP protein 40K of *Trypanosoma brucei*: cloning and analysis of functional domains reveals homology to a mammalian snRNP protein. *EMBO J.*, v. 12, n. 3, p. 1239-48, 1993.

CUROTTO DE LAFAILLE M. A.; LABAN A.; WIRTH D. F. Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *PNAS*, v. 89, n. 7, p. 2703-2707, 1992.

DE LANGE T.; BERKVEN T. M.; VEERMAN H. J.; FRASCH A. C.; BARRY J. D.; BORST P. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res.*, v. 12, n. 11, p. 4431-4443, 1984.

DENKER J. A.; ZUCKERMAN D. M.; MARONEY P. A.; NILSEN T. W. New components of the spliced leader RNP required for nematode trans-splicing. *Nature*, v. 417, p. 667-670, 2002.

DIX I.; RUSSEL C. S.; O'KEEFE R. T.; NEWMAN A. J.; BEGGS J. D. Protein-RNA interactions in the U5 snRNP of *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, v. 4, p. 1675-1686, 1998.

DJIKENG A.; FERREIRA L.; D'ANGELO M.; DOLEZAL P.; LAMB T.; MURTA S.; TRIGGS V.; ULBERT S.; VILLARINO A.; RENZI S.; ULLU E.; TSCHUDI C. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 113, p. 109-115, 2001.

DUTTON J. E. Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man. Thompson Yates Lab. Rep., v. 4, p. 455-468, 1902.

DU H.; ROSBASH M. The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. Nature, v. 419, n. 6902, p. 86-90, 2002.

EL-SAYED N. M.; MYLER P. J.; BLANDIN G.; BERRIMAN M.; CRABTREE J.; AGGARWAL G.; CALER E.; RENAULD H.; WORTHEY E. A.; HERTZ-FOWLER C.; GHEDIN E.; PEACOCK C.; BARTHOLOMEU D. C.; HAAS B. J.; TRAN A. N.; WORTMAN J. R.; ALSMARK U. C.; ANGIUOLI S.; ANUPAMA A.; BADGER J.; BRINGAUD F.; CADAG E.; CARLTON J. M.; CERQUEIRA G. C.; CREASY T.; DELCHER A. L.; DJIKENG A.; EMBLEY T. M.; HAUSER C.; IVENS A. C.; KUMMERFELD S. K.; PEREIRA-LEAL J. B.; NILSSON D.; PETERSON J.; SALZBERG S. L.; SHALLOM J.; SILVA J. C.; SUNDARAM J.; WESTENBERGER S.; WHITE O.; MELVILLE S. E.; DONELSON J. E.; ANDERSSON B.; STUART K. D.; HALL N. Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. Science, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005.

FORDE R. M. Some clinical notes on an European patient in whose blood a trypanosome was observed. J. Trop. Med, v. 5, p. 261-263, 1902.

GUNDERSON S. I.; BEYER K.; MARTIN G.; KELLER W.; BOELEN W. C.; MATTAJ L. W. The human U1A snRNP protein regulates polyadenylation via a direct interaction with poly(A) polymerase. Cell, v. 76, n. 3, p. 531-541, 1994.

HANNON G. J.; MARONEY P. A.; NILSEN T. W. U small nuclear ribonucleoprotein requirements for nematode cis- and trans-splicing *in vitro*. J. Biol. Chem., v. 266, p. 22792-22795, 1991.

HANNON G. J.; MARONEY P. A.; YU Y. T.; HANNON G. E.; NILSEN T. W. Interaction of U6 snRNA with a sequence required for function of the nematode SL RNA in trans-splicing. Science, v. 258, n. 5089, p. 1775-1780, 1992.

HARTMUTH K.; URLAUB H.; VORNLOCHER H. P.; WILL C. L.; GENTZEL M.; WILM M.; LÜHRMANN R. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. PNAS, v. 99, n. 26, p. 16719-16724, 2002.

HASTINGS K. E. M. SL trans-splicing: easy come or easy go? Trends Genet., v. 21, p. 240-247, 2005.

HEINRICHS V.; BACH M.; WINKELMANN G.; LÜHRMANN R. U1-specific protein C needed for efficient complex formation of U1 snRNP with a 5' splice site. Science, v. 247, n. 4938, p. 69-72, 1990.

HOROWITZ D. S.; LEE E. J.; MABON S. A.; MISTELI T. A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. EMBO J., v. 21, n. 3, p. 470-480, 2002.

ITO T.; CHIBA T.; OZAWA R.; YOSHIDA M.; HATTORI M.; SAKAKI Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. PNAS, v. 98, p. 4569-4574, 2001.

IVENS A. C.; PEACOCK C. S.; WORTHEY E. A.; MURPHY L.; AGGARWAL G.; BERRIMAN M.; SISK E.; RAJANDREAM M. A.; ADLEM E.; AERT R.; ANUPAMA A.; APOSTOLOU Z.; ATTIPOE P.; BASON N.; BAUSER C.; BECK A.; BEVERLEY S. M.; BIANCHETTIN G.; BORZYM K.; BOTHE G.; BRUSCHI C. V.; COLLINS M.; CADAG E.; CIARLONI L.; CLAYTON C.; COULSON R. M.; CRONIN A.; CRUZ A. K.; DAVIES R. M.; DE GAUDENZI J.; DOBSON D. E.; DUESTERHOEFT A.; FAZELINA G.; FOSKER N.; FRASCH A. C.; FRASER A.; FUCHS M.; GABEL C.; GOBLE A.; GOFFEAU A.; HARRIS D.; HERTZ-FOWLER C.; HILBERT H.; HORN D.; HUANG Y.; KLAGES S.; KNIGHTS A.; KUBE M.; LARKE N.; LITVIN L.; LORD A.; LOUIE T.; MARRA M.; MASUY D.; MATTHEWS K.; MICHAELI S.; MOTTRAM J. C.; MÜLLER-AUER S.; MUNDEN H.; NELSON S.; NORBERTCZAK H.; OLIVER K.; O'NEIL S.; PENTONY M.; POHL T. M.; PRICE C.; PURNELLE B.; QUAIL M. A.; RABBINOWITSCH E.; REINHARDT R.; RIEGER M.; RINTA J.; ROBBEN J.; ROBERTSON L.; RUIZ J. C.; RUTTER S.; SAUNDERS D.; SCHÄFER M.; SCHEIN J.; SCHWARTZ D. C.; SEEGER K.; SEYLER A.; SHARP S.; SHIN H.; SIVAM D.; SQUARES R.; SQUARES S.; TOSATO V.; VOGT C.; VOLCKAERT G.; WAMBUTT R.; WARREN T.; WEDLER H.; WOODWARD J.; ZHOU S.; ZIMMERMANN W.; SMITH D. F.; BLACKWELL J. M.; STUART K. D.; BARRELL B.; MYLER P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science, v. 309, n. 5733, p. 436-42, 2005.

JOHNSON P. J.; KOOTER J. M.; BORST P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*, v. 51, p. 273-281, 1987.

JURICA M. S.; LICKLIDER L. J.; GYGI S. R.; GRIGORIEFF N.; MOORE M. J. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, v. 8, n. 4, p. 426-439, 2002.

KAMBACH C.; WALKE S.; YOUNG R.; AVIS J. M.; LA FORTELLE E.; RAKER V. A.; LÜHRMANN R.; LI J.; NAGAI K. Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell*, v. 96, n. 3, p. 375-387, 1999.

KENNEDY P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J. Clin. Invest.*, v. 113, p. 496-504, 2004.

KRAUSE M.; HIRSH D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, v. 49, p. 753-761, 1987.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX M. M. Princípios de bioquímica, 4^a ed, p. 985-1023, Ed Savier, 2006.

LIANG X. H.; HARITAN A.; ULIEL S.; MICHAELI S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell.*, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LIU Q.; LIANG X. H.; ULIEL S.; BELAHCEN M.; UNGER R.; MICHAELI S. Identification and functional characterization of lsm proteins in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, v. 279, n. 18, p. 18210-18219, 2004.

LIU S.; RAUHUT R.; VORNLOCHER H. P.; LÜHRMANN R. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA*, v. 12, n. 7, p. 1418-1430, 2006.

LÜCKE S.; KLÖCKNER T.; PALFI Z.; BOSCHART M.; BINDEREIF A. Trans mRNA splicing in trypanosomes: cloning and analysis of a PRP8-homologous gene from *Trypanosoma*

brucei provides evidence for a U5-analogous RNP. EMBO J., v. 16, n. 14, p. 4433-40, 1997.

LUND M.; KJEMS J. Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. RNA, v. 8, n. 2, p. 166-179, 2002.

MACMILLAN A. M.; QUERY C. C.; ALLERSON C. R.; CHEN S.; VERDINE G. L.; SHARP P. A. Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region. Genes Dev., v. 8, n. 24, p. 3008-3020, 1994.

MAIR G.; SHI H.; LI H.; DJIKENG A.; AVILES H. O.; BISHOP J. R.; FALCONE F. H.; GAVRILESCU C.; MONTGOMERY J. L.; SANTORI M. I.; STERN L. S.; WANG Z.; ULLU E.; TSCHUDI C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. RNA, v. 6, p. 163-169, 2000.

MAKAROV E. M.; MAKAROVA O. V.; URLAUB H.; GENTZEL M.; WILL C. L.; WILM M.; LÜHRMANN R. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. Science, v. 298, n. 5601, p. 2205-2208, 2002.

MAKAROVA O. V.; MAKAROV E. M.; URLAUB H.; WILL C. L.; GENTZEL M.; WILM M.; LÜHRMANN R. A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. EMBO J., v. 23, n. 12, p. 2381-2391, 2004.

MARONEY P. A.; ROMFO C. M.; NILSEN T. W. Functional recognition of 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly. Mol. Cell, v. 6, n. 2, p. 317-328, 2000.

MANDELBOIM M.; ESTRASÑO C. L.; TSCHUDI C.; ULLU E.; MICHAELI S. On the role of exon and intron sequences in trans-splicing utilization and cap 4 modification of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* SL RNA. J. Biol. Chem., v. 277, n. 38, p. 35210-35218, 2002.

MANDELBOIM M.; BARTH S.; BITON M.; LIANG X. H.; MICHAELI S. Silencing of Sm proteins in *Trypanosoma brucei* by RNA interference captured a novel cytoplasmic intermediate in spliced leader RNA biogenesis. J. Biol. Chem., v. 278, n. 51, p. 51469-51478, 2003.

MAYER M. G.; FLOETER-WINTER L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 100, n. 5, p. 501-513, 2005.

MCNALLY, K. P.; AGABIAN, N. *Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are required for trans-splicing in vivo. Mol. Cell Biol., v. 12, n. 11, p. 4844-4851, 1992.

MCPHEETERS D. S.; MUHLENKAMP P. Spatial organization of protein-RNA interactions in the branch site-3' splice site region during pre-mRNA splicing in yeast. Mol. Cell Biol., v. 23, n. 12, p. 4174-4186, 2003.

MERENDINO L.; GUTH S.; BILBAO D.; MARTÍNEZ C.; VALCÁRCEL J. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. Nature, v. 402, n. 6763, p. 838-841, 1999.

MURPHY W. J.; WATKINS K. P.; AGABIAN N. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans-splicing. Cell, v. 47, p. 517-525, 1986.

MUTO Y.; POMERANZ KRUMMEL D.; OUBRIDGE C.; HERNANDEZ H.; ROBINSON C. V.; NEUHAUS D.; NAGAI K. The structure and biochemical properties of the human spliceosomal protein U1C. J. Mol. Biol., v. 341, n. 1, p. 185-198, 2004.

NOTTROT S.; URLAUB H.; LÜHRMANN R. Hierarchical clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. EMBO J., v. 21, p. 5527-5538, 2002.

O'CONNOR J. P.; ALWINE J. C.; LUTZ C. S. Identification of a novel, non-snRNP protein complex containing U1A protein. RNA, v. 3, n. 12, p. 1444-1455, 1997.

PALFI Z.; LÜCKE S.; LAHM H. W.; LANE W. S.; KRUF T. V.; BRAGADO-NILSSON E.; SÉRAPHIN B.; BINDEREIF A. The spliceosomal snRNP core complex of *Trypanosoma brucei*: cloning and functional analysis reveals seven Sm protein constituents. PNAS, v. 97, n. 16, p. 8967-72, 2000.

PALFI Z.; LANE W. S.; BINDEREIF A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol., v. 121, n. 2, p. 233-243, 2002.

PALFI Z.; SCHIMANSKI B.; GÜNZL A.; LÜCKE S.; BINDEREIF A. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. Nucleic Acids Res., v. 33, n. 8, p. 2493-503, 2005.

PATEL S. B.; BELLINI M. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. Nucleic Acids Res., v. 36, n. 20, p. 6482-6493, 2008.

PHILLIPS C.; PACHIKARA N.; GUNDERSON S. I. U1A inhibits cleavage at the immunoglobulin M heavy-chain secretory poly(A) site by binding between the two downstream GU-rich regions. Mol. Cell Biol., v. 24, n. 14, p. 6162-6171, 2004.

PISCOPO T. V.; AZZOPARDI C. M. Leishmaniasis. Postgrad. Med. J., v. 82, p. 649-657, 2006.

RADER S. D.; GUTHRIE C. A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. RNA, v. 8, p. 1378-1392, 2002.

RAJKOVIC A.; DAVIS R. E.; SIMONSEN J. N.; ROTTMAN F. M. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. PNAS, v. 87, n. 22, p. 8879-8883, 1990.

RAPPSILBER J.; RYDER U.; LAMOND A. I.; MANN M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. Genome Res., v. 12, n. 8, p. 1231-1245, 2002.

REED R. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. Curr. Opin. Genet. Dev., v. 6, p. 215-220, 1996.

REY L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ª ed., p. 137-150, Ed. Guanabara Koogan, 2001

REYES J. L.; KOIS P.; KONFORTI B. B.; KONARSKA M. M. The canonical GU dinucleotide at the 5' splice site is recognized by p220 of the U5 snRNP within the spliceosome. *RNA*, v. 2, n. 3, p. 213-225, 1996.

ROSSI F.; FORNÉ T.; ANTOINE E.; TAZI J.; BRUNEL C.; CATHALA G. Involvement of U1 small nuclear ribonucleoproteins (snRNP) in 5' splice site-U1 snRNP interaction. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 39, p. 23985-23991, 1996.

SAWADA Y.; MIURA Y.; UMEKI K.; TAMAOKI T.; FUJINAGA K.; OHTAKI S. Cloning and characterization of a novel RNA-binding protein SRL300 with RS domains. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1492, p. 191-195, 2000.

SCHIMANSKI B.; NGUYEN T. N.; GÜNZL A. Highly efficient tandem affinity purification of Trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eucaryotic Cell*, v. 4, n. 11, p. 1942-1950, 2005.

SÉRAPHIN, B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.*; v. 14, p. 2089-98, 1995.

SIATECKA M.; REYES J. L.; KONARSKA M. M. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev.*, v. 13, n. 15, p. 1983-1993, 1999.

STARK H.; DUBE P.; LÜHRMANN R.; KASTNER B. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature*, v. 409, n. 6819, p. 539-542, 2001.

STEVENS J. W. W.; FANTHAM H. B. On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Proc. R. Soc.*, v. 83, p. 28-33, 1910.

TARN W. Y.; STEITZ J. A. Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. *PNAS*, v. 92, n. 7, p. 2504-2508, 1995.

TEIGELKAMP S.; NEWMAN A. J.; BEGGS J. D. Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J.*, v. 14, n. 11, p. 2602-2612, 1995.

TEIGELKAMP S.; WHITTAKER E.; BEGGS J. D. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res.*, v. 23, n. 3, p. 320-326, 1995.

TEIXEIRA A. R. L.; NITZ N.; GUIMARO M. C.; GOMES C.; SANTOS-BUCH C. A. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.*, v. 82, p. 788-798, 2006.

TESSIER L. H.; KELLER M.; CHAN R. L.; FOURNIER R.; WEIL J. H.; IMBAULT P. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J.*, v. 10, p. 2621-2625, 1991.

TKACZ I. D.; LUSTIG Y.; STERN M. Z.; BITON M.; SALMON-DIVON M.; DAS A.; BELLOFATTO V.; MICHAELI S. Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, v. 13, n. 1, p. 30-43, 2007.

TKACZ I. D.; COHEN S.; SALMON-DIVON M.; MICHAELI, S. Identification of the heptameric Lsm complex that binds U6 snRNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 160, n. 1, p. 22-31, 2008.

TYCOWSKI K. T.; KOLEV N. G.; CONRAD N. K.; FOK V.; STEITZ J. A. The ever-growing world of small nuclear ribonucleoproteins. Em *The RNA World*, 3^a ed. (eds. R. F. Gesteland et al.), p. 327-368. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2006.

UETZ P., GIOT L., CAGNEY G., MANSFIELD T. A., JUDSON R. S., KNIGHT J. R., LOCKSHON D., NARAYAN V., SRINIVASAN M., POCHART P.; QURESHI-EMILI A.; LI Y.; GODWIN B.; CONOVER D.; KALBFLEISCH T.; VIJAYADAMODAR G.; YANG M.; JOHNSTON M.; FIELDS S.; ROTHBERG J. M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, v. 403, p. 623-627, 2000.

ULLU E.; MATTHEWS K. R.; TSCHUDI C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cel. Biol.*, v. 13, n. 1, p. 720-725, 1993.

ULLU E.; TSCHUDI C. Trans-splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *PNAS*, v. 88, p. 10074-10078, 1991.

ULLU E.; TSCHUDI C. Accurate mModification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 35, p. 20365-20369, 1995.

VAN NUES R. W.; BEGGS J. D. Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 157, p. 1451-1467, 2001.

VANDENBERGHE A. E.; MEEDEL T. H.; HASTINGS K. E. mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. *Genes Dev.*, v. 15, p. 294-303, 2001.

WANG P.; PALFI Z.; PREUSSER C.; LÜCKE S.; LANE W. S.; KAMBACH C.; BINDEREIF A. Sm core variation in spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins from *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, v. 25, n. 19, p. 4513-4523, 2006.

WHO - World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Seventeenth Programme Report, 2005.

WILL C. L.; LÜRHMANN R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 13, p. 290-301, 2001.

WILL C. L.; LÜRHMANN R. Spliceosome structure and function. Em *The RNA World*, 3^a ed. (eds. R. F. Gesteland et al.), p. 369-400. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2006.

WILL C. L.; RÜMPLER S.; KLEIN GUNNEWIEK J.; VAN VENROOIJ W. J.; LÜHRMANN R. *In vitro* reconstitution of mammalian U1 snRNPs active in splicing: the U1-C protein enhances the formation of early (E) spliceosomal complexes. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, n. 23, p. 4614-4623, 1996.

WU S.; ROMFO C. M.; NILSEN T. W.; GREEN M. R. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature*, v. 402, n. 6763, p. 832-835, 1999.

XU Y.; LIU L.; MICHAELI S. Functional analyses of positions across the 5' splice site of the trypanosomatid spliced leader RNA. Implications for base-pair interaction with U5 and U6 snRNAs. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 36, p. 27883-27892, 2000.

XU Y. Z.; NEWNHAM C. M.; KAMEOKA S.; HUANG T.; KONARSKA M. M.; QUERY C. C. Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *EMBO J.*, v. 23, p. 376-385, 2004.

ZEINER G. M.; FOLDYNOVÁ S.; STURM N. R.; LUKES J.; CAMPBELL D.A. SmD1 is required for spliced leader RNA biogenesis. *Eukaryot. Cell*, v. 3, n. 1, p. 241-244, 2004.

ZHOU Z.; LICKLIDER L. J.; GYGI S. P.; REED R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, v. 419, n. 6903, p. 182-185, 2002.