

Marco Túlio Alves da Silva

“Identificação e Caracterização Funcional de Proteínas
Específicas do Complexo U5 snRNP em Tripanosomatídeos”

Tese apresentada ao Instituto
de Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Profa Dra Regina Maria Barretto Cicarelli

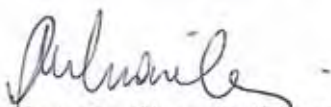
Araraquara
2009

MARCO TÚLIO ALVES DA SILVA

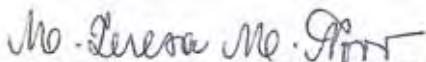
Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de maio de 2009.

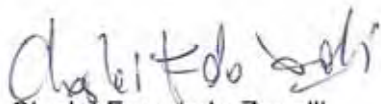
BANCA EXAMINADORA



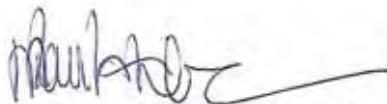
Profª Drª Regina Maria Barretto Cicarelli (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria Teresa Marques Novo
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCAR, São Carlos



Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Márcia Aparecida Silva Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann
Instituto de Física de São Carlos – USP, São Carlos

Dedicatória

A minha mãe (Sônia), por tornar tudo possível (in memoriam)

*A Tati e ao Caio, pela compreensão e dedicação em todos
momentos.*

*Ao meu Irmão Rafael, meu Pai Luís e o Kaizer, pelo incentivo e
apoio incondicionais.*

*A Professora Regina,
Pelo apoio e pela confiança.*

Agradecimentos

Ao Instituto de Química e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, pela oportunidade de desenvolver;

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e a Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro ao projeto;

Aos funcionários da pós-graduação e da biblioteca, pelos prestados e pela atenção;

A todos os meus familiares, por compreender a minha ausência;

A todos da equipe dos Laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular, fundamentais para conclusão deste trabalho;

Aos amigos dos laboratórios de Parasitologia e aos de Microbiologia e Biologia Molecular, pelo auxílio técnico em diversas áreas.

Ao Professor Otávio Thiemann, por ceder as cepas de T.brucei.

*A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu
tamanho original.*

Albert Einstein

Dados Curriculares

Dados Pessoais

Nome Marco Túlio Alves da Silva
Nascimento 11/09/1980 - Tombos/MG - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2004 – 2005: Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil - Título: Expressão diferencial da família gênica BiP (*Binding Protein*) e validação experimental do *Data mining* de *Heat Shock Proteins* em cana-de-açúcar, Ano de obtenção: 2005 - Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli - Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

1999 - 2003 Graduação em Farmácia Bioquímica. - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Bolsas:

- Bolsa de doutorado – CAPES – 2006/2009
- Bolsa de mestrado – CAPES – 2004/2005
- Bolsa de Iniciação Científica – FAPESP – 2000/2003
- Bolsa do Programa Especial de Treinamento (PET) – MEC – 1999/2000

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos e aceitos para publicação

1. MENDONÇA, V. J.; da SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R.; MARTINS JR, J.; BACCI JR, M.; ALMEIDA, C.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma*

brasiliensis complex. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene** – Recentemente aceito para publicação.

2. BOSETTO MC, MORTARA, R. A., AMBRÓSIO, D. L, PASSERENI, G. D., SILVA, M. T. A, OKUDA, E. S., CICARELLI, R. M. B. Detection and Localization of Small Nuclear Ribonucleoproteins (snRNPs) in trypanosomatids by using anti-m3G antibodies. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.61, p.95 - 99, 2008.

3. AMBRÓSIO, D. L.; SILVA, M. T. A, CICARELLI, R. M. B. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5 and U6 snRNAs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v.102, p.97 - 105, 2007.

4. MANZINE, L. R.; SILVA, M. T. A; THIEMANN, O. H.; CICARELLI, R. B. M. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Blastocrithidia* sp L17 RIBOSOMAL PROTEIN. **Acta Protozoologica** , v.45, p.367 - 375, 2006.

5. CERESINI, P C, SILVA, C. L. S. P.; MISSIO, R. F.; SOUZA, E. C.; FISCHER, C. N.; GUILHERME, I. R.; GREGORIO, I.; SILVA, E. H. T. CICARELLI, R. M. B.; SILVA, M. T. A; GARCIA, J. F.; AVELAR, G. A.; PORTO NETO, L. R.; MARCON, A. R.; BACCI Jr, M.; MARINI, D. C.; Satellyptus: analysis and database of microsatellites from ESTs of *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology** , v.28, p.589- 600, 2005.

Artigos submetidos para publicação

SILVA, M. T. A.; AMBRÓSIO, D. L.; TREVELIN, C. C.; WATANABE, T. F.; VALENTINI, S. R.; CICARELLI, R. M. B. Molecular and Functional Characterisation of Spliceosomal Specific U5-15k Protein in Trypanosomatids. Submetida a Parasitology.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SILVA, Marco Túlio Alves da, MANTAON JR, José Roberto, MARTINS, Joyce Aparecida, MANZINE, Livia Regina, AMBRÓSIO, Daniela Luz, MARANA,

Aparecido Nilceu, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Bioinformática: Aplicações na Solução de Problemas Biológicos In: 4º Congresso Temático de Dinâmica, Controle e Aplicações, 2005, Bauru. . , 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, Marco Túlio Alves da, AMBRÓSIO, Daniela Luz, CICARELLI, Regina Maria Barretto. IDENTIFICATION AND MOLECULAR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF U5 snRNP SPECIFIC PROTEINS IN TRYPANOSOMA CRUZI. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2008, Águas de Lindóia. Livro de resumo da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. , 2008.
2. OKUDA, E. S., PASSERINI, M. D., SILVA, Marco Túlio Alves da, AMBRÓSIO, Daniela Luz, CHUNG, M. C., CICARELLI, Regina Maria Barretto. AVALIAÇÃO DE DERIVADOS NITROFURANOS NO TRANS-SPLICING DA TRIPANOTOMIA REDUTASE In: IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 2008, Araraquara. Anais do IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia. , 2008.
3. TREVELIN, C. C., SILVA, Marco Túlio Alves da, AMBRÓSIO, Daniela Luz, CICARELLI, Regina Maria Barretto. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE U5snRNP EM TRYPANOSOMA CRUZI In: IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 2008, Araraquara. Anais do IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia. , 2008.
4. MENDONÇA, Vagner José, CICARELLI, Regina Maria Barretto, GRAMINHA, Márcia Aparecida Silva, SILVA, Marco Túlio Alves da, AMBRÓSIO, Daniela Luz, ROSA, João Aristeu da. Phylogeny and Molecular taxonomy of *Triatoma sherloki* (Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002) and *T. brasiliensis* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae) based on mitochondrial markers In: XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/ XXIII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas, 2006, Caxambu. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/ XXIII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doenças de Chagas. , 2006. p.221 - 221

5. MENDONÇA, Vagner José, CICARELLI, Regina Maria Barretto, GRAMINHA, Márcia Aparecida Silva, SILVA, Marco Túlio Alves da, AMBRÓSIO, Daniela Luz, ROSA, João Aristeu da. Variabilidade Genética De *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae) Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 Baseada no Sequenciamento Parcial do Gene do Citocromo B In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife, 2006.
6. MANZINE, Livia Regina, SILVA, Marco Túlio Alves da, THIEMANN, Otávio Henrique, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Characterization of the gene that codifies the ribosomal L17 (BcL17) protein in *Blastocrithidia* sp In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindoia. Anais da XXXIV SBBq. , 2005.
7. AMBRÓSIO, Daniela Luz, SILVA, Marco Túlio Alves da, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5 and U6 snRNAs In: XXI Meeting of Brazilian Society of Protozoology XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease International Symposium on vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa, 2005, Caxambu. Proceedings. Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2005. p.95 - 95
8. AMBRÓSIO, Daniela Luz, SILVA, Marco Túlio Alves da, CICARELLI, Regina Maria Barretto. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference Protein World In: European Journal of Biochemistry. , 2005. v.272. p.82 - 82
9. MANZINE, Livia Regina, SILVA, Marco Túlio Alves da, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Molecular characterization of the gene that codifies a ribosomal protein in *Blastocrithidia* sp. In: XXXI Annual Meeting on Basic Research Chagas Disease and XX Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology, 2004, Caxambu. Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2004.
10. SILVA, Marco Túlio Alves da, MENDONÇA JÚNIOR, Rubens Rodrigues de, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identificação de Heat Shock Proteins em cana-de-

açúcar In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2002, Presidente Prudente. 2002.

11. SILVA, Marco Túlio Alves da, MENDONÇA JÚNIOR, Rubens Rodrigues de, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identificação de Heat Shock Proteins na cana-de-açúcar In: 49 Jornada Farmacêutica da UNESP, 2002, Araraquara. 2002.

12. SILVA, Marco Túlio Alves da, MARTINS, Elaina Cristina, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identification Heat Shock Proteins in Sugarcane In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambu. 2002.

13. SILVA, Marco Túlio Alves da, MARTINS, Elaina Cristina, CARDOSO, Jussara, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identificação de Heat Shock Proteins no banco de dados da cana-de-açúcar In: 48 Jornada Farmaceutica da UNESP, 2001, Araraquara. 2001.

14. SILVA, Marco Túlio Alves da, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identificação de Heat Shock Proteins no Banco de dados do Sucest In: XIII Congresso de Iniciação Científica, 2001, Bauru. 2001.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SILVA, Marco Túlio Alves da, MANTOAN JUNIOR, Jose Roberto, MENDONÇA JÚNIOR, Rubens Rodrigues de, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Informações Biológicas in silico de Heat Shock Proteins na Cana-de-açúcar In: XV Congresso de Iniciação Científica, 2003, Marília. 2003.

2. SILVA, Marco Túlio Alves da, MANTOAN JUNIOR, Jose Roberto, MENDONÇA JÚNIOR, Rubens Rodrigues de, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Informações Biológicas in silico de Heat Shock Proteins 40 (HSP40) em cana-de-açúcar In: II Congresso Temático de Dinâmica, Controle e Aplicações e Second DLR/CTA Workshop on data analysis and Flight Control, 2003, São José dos Campos. 2003.

3. MANTOAN JUNIOR, Jose Roberto, SILVA, Marco Túlio Alves da, MENDONÇA JÚNIOR, Rubens Rodrigues de, CICARELLI, Regina Maria Barretto Informações Biológicas in silico de Hsf (Heat Shock Factors) em cana-de-açúcar In: II Congresso Temático de Dinâmica, Controle e Aplicações e Second DLR/CTA Workshop on data analysis and Flight Control, 2003, São José dos Campos. 2003.

4. SILVA, Marco Túlio Alves da, MARTINS, Elaina Cristina, CICARELLI, Regina Maria Barretto. Identificação de Heat Shock Proteins no SUCEST data mining In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2001, São Paulo. 2001.

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster Painel no(a) XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2008. (Congresso). IDENTIFICATION AND MOLECULAR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF U5 snRNP SPECIFIC PROTEINS IN TRYPANOSOMA CRUZI..

2. Conferencista no(a) IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia - "Parasitologia no contexto da saúde pública", 2008. (Congresso) Aspectos Moleculares dos Tripanosomatídeos.

3. Apresentação (Outras Formas) no Molecular Immunology of Protozoan Infections, 2007. (Outra)

4. Apresentação (Outras Formas) no(a)VI São Paulo Research Conference, 2006. (Congresso).

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas e Siglas	IV
Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
1) Introdução	1
1.1) Tripanosomiasess Humanas	2
1.2) Doença de Chagas	2
1.2.1) Ciclo Biológico e Transmissão	6
1.2.2) Sintomatologia	7
1.2.3) Diagnóstico Clínico e Laboratorial	7
1.2.4) Terapêutica	8
1.3) Doença do Sono	9
1.3.1) Ciclo Biológico e Transmissão	10
1.3.2) Sintomatologia	11
1.3.3) Diagnóstico Clínico e Laboratorial	12
1.3.4) Terapêutica	12
1.4) Leishmanioses	13
1.4.1) Ciclo Biológico e Transmissão	14
1.4.2) Sintomatologia	15
1.4.3) Diagnóstico Clínico e Laboratorial	16
1.4.4) Terapêutica	16
1.5) Processamento dos RNA mensageiros (mRNAs) em Tripanosomas	17
1.5.1) <i>Cis</i> e <i>Trans-splicing</i>	18
1.5.2) O SL (<i>spliced leader</i>) RNA	20
1.5.3) Ribonucleoproteínas	21
1.5.4) snRNAs	23
1.5.5) Proteínas Sm	23
1.5.6) Proteínas Específicas de snRNPs	25
1.5.6.1) U1 snRNP	25
1.5.6.2) U2 snRNP	26
1.5.6.3) U4/U6 snRNP e U4/U6.U5 tri-snRNP	27
1.5.6.4) U5 snRNP	28
1.5.6.5) SL RNP	29
1.5.7) Fatores de <i>splicing</i>	30
1.5.7.1) Complexo Associado a Prp19 (<i>Prp19-associated complex</i> , <i>Nineteen complex</i> ou NTC)	30
2) Objetivos	32
3) Materiais e Métodos	34
3.1) Análises de Bioinformática – <i>Data mining</i> das sequências	34
3.2) Cultura de parasitos	34
3.2.1) <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.2.2) <i>Trypanosoma brucei</i>	35
3.2.3) <i>Leishmania major</i>	35
3.3) Manipulação de bactérias	35
3.3.1) Preparação de bactérias competentes	35
3.3.2) Reação de transformação	35

3.4) Manipulação de parasitos	36
3.4.1) Transfecção em <i>T. brucei</i> (cepas 427 e 29-13)	36
3.4.2) RNA de interferência (RNAi)	37
3.5) Manipulação de DNA	37
3.5.1) Gel de agarose 1%	37
3.5.2) Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose	38
3.5.3) Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	38
3.5.4) Obtenção rápida do DNA genômico de <i>T. brucei</i>	38
3.5.5) Extração de DNA plasmidial (miniprep)	38
3.5.6) Reação de ligação para clonagem em vetor de expressão pET28a	39
3.5.7) Reação de ligação para clonagem em vetor pGEM-T Easy	40
3.5.8) Reação de PCR para clonagem de U5-15K e U5-102K em vetor PC-PTP-NEO	40
3.5.9) Reação de PCR para clonagem de U5-15K e U5-102K em vetor pLEW100	41
3.6) Obtenção de extratos protéicos	42
3.6.1) Extrato nuclear de <i>T. cruzi</i>	42
3.6.2) Preparação do extrato para a purificação das proteínas contendo PTP-tag	43
3.6.3) Extrato total para a realização do <i>Western blotting</i>	44
3.7) Análise de proteínas	44
3.7.1) Quantificação de proteínas	44
3.7.2) Imunoprecipitação utilizando extrato nuclear de <i>T. cruzi</i>	44
3.7.3) Purificação do PTP-tag: imunoprecipitação com IgG sepharose	45
3.7.4) <i>Western blotting</i>	45
3.8) Produção e purificação de proteínas recombinantes	46
3.8.1) Expressão das proteínas recombinantes em pET28a	46
3.8.2) Purificação de proteínas recombinantes	47
3.9) Produção de anticorpos policlonais em coelhos	48
3.10) Manipulação de RNA	48
3.10.1) Análise da ligação aos snRNAs por <i>primer extension</i>	48
3.10.1.1) Marcação radioativa de oligonucleotídeos	48
3.10.1.2) Imunoprecipitação com IgG sepharose para obtenção do RNA total	49
3.10.1.3) <i>Primer extension</i>	49
3.10.2) Reação de RT-PCR	50
3.11) Imunolocalização de U5-15K e U5-102K fusionada ao PTP-tag	52
4) Resultados	54
4.1) Anotação e <i>data mining</i> do genoma do <i>T. cruzi</i>	54
4.2) Análises de sequências do gene U5 <i>snRNP-specific 40 kDa protein</i>	55
4.3) Análises de sequência do gene de U5 <i>snRNP-specific protein 116kDa</i>	57
4.4) Análises de sequência do gene de <i>Spliceosomal U5 snRNP-specific protein</i>	59
4.5) Clonagem, purificação e sequenciamento de U5-15K	63
4.6) Sub-clonagem de U5-15K em vetor de expressão pET28a	64
4.7) Expressão da proteína recombinante U5-15K em vetor pET28a	65
4.8) Purificação da proteína recombinante U5-15K por cromatografia de afinidade e produção de anticorpos policlonais anti-U5-15K em coelhos	66
4.9) Detecção da proteína U5-15K em tripanosomatídeos	67

4.10) Imunoprecipitação com anticorpo policlonal anti-U5-15K	68
4.11) Clonagem de U5-15K em pC-PTP-NEO para realização da técnica de PTP-tag	69
4.12) RNA de interferência (RNAi) de clones positivos da proteína U5-15K	74
4.13) Avaliação da participação de U5-15K no <i>cis</i> e <i>trans-splicing</i>	75
4.14) Imunolocalização U5-15K em <i>T.brucei</i>	77
4.15 Análises da sequência do gene <i>U5 snRNP-associated 102 kDa protein</i>	78
4.16) Clonagem de U5-102K em pC-PTP-NEO para realização da técnica de PTP-tag	80
4.17) Imunolocalização U5-102K no <i>T.brucei</i>	81
5) Discussão	83
6) Conclusões	87
Referências	88

ABREVIATURAS E SIGLAS

CaOAc₂ - Acetato de Cálcio
DTT - *Dithiothreitol*
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
ETOH - Álcool etílico
IFI - Imunoflorescência indireta
LB - *Luria-Bertani*
LIT - *Liver Infusion Tryptose*
MgOAc₄ - Acetato de Magnésio
NaAc - Acetato de sódio
NaN₃ - Azida de sódio
NTC - *Nineteen Complex*
PAGE - Gel de poliacrilamida
PCR - Reação de Polimerase em Cadeia
PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*
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
TA - Temperature Ambiente
TMG - Trimetilguanosina
ZPFM - *Zimmerman Post-Fusion medium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas de *Trypanosoma cruzi*

Figura 2: Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas.

Figura 3: Detalhes das formas apresentadas pelo *T. brucei* durante o ciclo biológico

Figura 4: Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.

Figura 5: Formas de *Leishmania* spp.

Figura 6: Ciclo biológico da transmissão das Leishmanioses.

Figura 7: Modelo esquemático do *cis-splicing* do pré-mRNA.

Figura 8: Representação esquemática de *cis* e *trans-splicing*.

Figura 9: Estrutura secundária proposta para U5 snRNA de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10: Esquema de U1 snRNP de mamíferos.

Figura 11: Modelo do core Sm e suas variações em U2 e U4 snRNPs.

Figura 12: Estrutura de U1 snRNP.

Figura 13: Modelo esquemático das interações proteína-proteína no UU4/U6.U5 tri-snRNP.

Figura 14: Diferenças entre os vetores TAP-tag e PTP-tag e mapa dos vetores pC-PTP-NEO e pN-PURO-PTP; e Vetor pLEW100.

Figura 15: Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e *trans-splicing*.

Figura 16: Alinhamento múltiplo de U5-40K em tripanosomatídeos.

Figura 17: Alinhamento múltiplo de U5-116K de tripanosomatídeos.

Figura 18: Alinhamento múltiplo de U5-15K de tripanosomatídeos (sequência de nucleotídeos).

Figura 19: Alinhamento múltiplo de U5-15K de tripanosomatídeos, em relação a sequência de aminoácidos

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio com os produtos de PCR amplificados com iniciadores U5-15K específicos

Figura 21: Eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Brilhante R-250 com teste de expressão e solubilidade de U5-15K recombinante .

Figura 22: Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de U5-15K recombinante a partir da fração solúvel e Western Blotting de confirmação de produção de anticorpos policlonas anti-U5-15K em coelhos.

Figura 23: Detecção da proteína nativa em tripanosomatídeos com anticorpo anti-U5-15K

Figura 24: Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 da reação de imunoprecipitação do extrato nuclear de *T. cruzi* com anticorpo policlonal anti-U5-15K

Figura 25: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio do produto de PCR amplificado com iniciadores U5-15K-PTP específicos

Figura 26: Confirmação da transfecção de *Trypanosoma brucei* cepa 427 com U5-15K – PTP.

Figura 27: *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose com anticorpo anti-Proteína A de ; Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *Primer extension*; e *Western Blotting* com extrato nuclear de *T. brucei* transfectado tratado com nucleases, utilizando anticorpo anti-U5-15K (U5-15K) e anti-U2-40K (U2-40K).

Figura 28: Curvas de crescimento de quatro clones (A2, C5, E3 e H6) U5-15K RNAi positivos.

Figure 29: Análises funcionais de U5-15K. Painei A: Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos de U5-15K, 7SL RNA (como controle quantitativo de reação), transcrito de tubulina não processado (Pre tub), transcrito de tubulina processado (tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP) e transcrito de Poli A Polimerase processado durante 0, 24, 48 e 72 horas de indução com doxaciolina. Painei B: Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *primer extension* a partir de cultura de U5-15K RNAi positiva

Figura 30: Imunolocalização da proteína U5-15K

Figura 31: Alinhamento múltiplo de U5-102K de tripanosomatídeos.

Figura 32: Confirmação da transfecção de *T.brucei* cepa 427 com U5-102K-PTP; *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose com anticorpo anti-Proteína A de U5-102K-PTP; Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *Primer extension* de U5-102K-PTP.

Figura 33: Imunolocalização da proteína U5-102K.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para clonagem e subclonagem do gene U5-15K de *Trypanosoma cruzi*

Tabela 2: Primers utilizados na técnica de PTP-tag de U5-15K de *Trypanosoma brucei*

Tabela 3: Iniciadores utilizados para clonagem e subclonagem do gene U5-15K de *T.brucei* no vetor pLEW 100

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na reação de *primer extension*.

Tabela 5: Iniciadores utilizadas nas reações de RT-PCR

Tabela 6: Sequências identificadas na anotação e *data mining* do genoma de *T.cruzi*

Tabela 7: Porcentagem de identidade entre membros de U5-15K de tripanosomatídeos

RESUMO

A família Trypanosomatidae inclui diversos parasitas protozoários responsáveis por diferentes doenças humanas. Várias evidências sugerem importantes diferenças entre a maquinária de tradução e processamento de mRNA (trans-splicing) em Trypanosomatídeos quando comparados com eucariótos superiores. Neste contexto, alguns fatores importantes para o funcionamento da célula eucarióticas são os pequenos complexos constituídos de proteínas e RNA, chamados de ribonucleoproteínas (U snRNPs). Esta partícula possui papel essencial no processamento de RNA mensageiros e durante a reação de splicing apresenta um core comum composto por proteínas (proteínas Sm) and RNAs estruturais (U snRNAs) e um conjunto de proteínas específicas de cada complexo. Embora bem definidas em mamíferos, snRNPs permanecem pouco caracterizadas em Trypanosomatídeos. Ferramentas de bioinformática identificaram quatro possíveis proteínas específicas do complexo U5 snRNP (U5-15K, U5-40K, U5-102K e U5-116K), e importantes parâmetros foram determinados, como peso molecular estimado, domínios e motivos conservados. Este trabalho demonstrou que U5-15K e U5-102K são altamente conservadas entre o Trypanosomatídeos e os domínios Dim1 and Prp1 foram identificados, respectivamente. Técnicas de purificação de complexos (PTP-tag) revelaram que estas proteínas interagem com o U5 snRNA, sugerindo que participem do complexo U5 snRNP. Análises funcionais demonstraram que U5-15K é essencial para viabilidade celular e que de alguma forma esta associada tanto a reação de *cis* quanto de *trans-splicing*. Experimentos de imunolocalização de U5-15K and U5-102K corroboram este dados, uma vez que as proteínas em questão possuem localização nuclear.

Palavras chave: *trans-splicing*, *cis-splicing*, U5 snRNP, U5 snRNA, PTP-tag,

Trypanosoma cruzi, *Trypanosoma brucei*:

ABSTRACT

There are several protozoan parasites in Trypanosomatidae family, including different agents responsible for human diseases. Several evidences suggest important differences in the translational system and mRNA processing (trans-splicing) in Trypanosomatids when compared to higher eukaryotes. In this context, some important factors for the functioning of eukaryotic cells are the small complexes of RNA and proteins; these particles of ribonucleoproteins (UsnRNPs) have an essential role in the pre-mRNA processing, mainly during splicing. UsnRNP presents a common protein core associated between itself and with the snRNA, named Sm proteins and specific proteins of each snRNP. Even though they are well defined in mammals, snRNPs are still not well characterized in certain Trypanosomatids. Bioinformatics analysis identified four possible U5 snRNP specific proteins (U5-15K, U5-40K, U5-102K and U5-116K), and important parameters were determined, as estimated molecular weight, motifs and conserved domains. This work shows that the U5-15K and U5-102K proteins are highly conserved among different Trypanosomatids species and Dim1 and Prp1 domains were identified, respectively. Tandem affinity pull-down assay revealed that these proteins interact with U5snRNA, suggesting its participation in U5snRNP particle, and functional analysis showed that U5-15K is essential for cell viability and it is associated in some way to trans and cis-splicing machinery. Immunolocalization experiments corroborated those data, showed U5-15K and U5-102K in the nucleus of the cell.

Key words: trans-splicing, cis-splicing, U5 snRNP, U5 snRNA, PTP-Tag, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*.

1) INTRODUÇÃO

A prevenção de certas doenças parasitárias depende da associação de diversos fatores, tais como, medidas ecológicas, sanitárias e emprego de fármacos eficazes e seguros (FRAYHA *et al.* 1997). A eficácia depende, por sua vez, do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitos. Com os avanços tecnológicos e do conhecimento científico para o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos parasitos no homem, tornou-se possível a realização do processo de planejamento de fármacos de maneira mais racional, enfatizando o mecanismo de ação, com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais dos parasitos, minimizando os efeitos deletérios das substâncias para o homem.

A caracterização molecular e funcional de fatores de virulência melhorou a compreensão da regulação de funções imunes efectoras, fornecendo não somente uma visão mais detalhada das relações parasita-hospedeiro, mas também indicando caminhos na identificação de novos alvos para intervenção terapêutica (OUAISSI; OUAISSI 2005).

Tanto na doença de Chagas como em outras parasitoses, a biologia celular e imunologia têm procurado compreender os mecanismos envolvidos na capacidade de determinados estágios dos parasitas (tripomastigotas) invadirem células, transformando-se em formas replicativas (amastigotas) que se evadem do sistema imune. Além disso, o desenvolvimento de novos pontos de ataque quimioterápico leva em consideração os mecanismos de resistência a fármacos. Desse modo, o desenvolvimento de trabalhos nessa área de pesquisa poderá auxiliar futuramente na atenuação ou destruição dos parasitos, na busca de alvos de ação imunológica e/ou farmacológica que não estejam presentes nas células humanas e, também, na verificação de eventual expressão diferencial de algumas proteínas nos diferentes estágios e/ou formas dos parasitos em estudo.

1.1) Tripanosomíases Humanas.

A família Trypanosomatidae compreende um grande número de protozoários parasitas, incluindo importantes agentes etiológicos de doenças humanas. Entre os causadores de doenças, destaca-se o *Trypanosoma brucei* (responsável pela Doença do Sono, amplamente presente na África), *Trypanosoma cruzi* (agente causador da Doença de Chagas, doença presente nas Américas) e *Leishmanias spp* (agentes responsáveis por leishmanioses visceral, cutânea e mucocutânea, presente em regiões tropicais e subtropicais). Todos os parasitos citados são transmitidos por insetos vetores sendo capazes de invadir diferentes tipos de tecidos e células, e apresentam diferenças marcantes no curso da infecção causada por eles (McCONVILLE *et al.* 2002).

Protozoários são altamente adaptados em evadir dos mecanismos de resposta imune celular e humoral. Alguns parasitos, como *Leishmanias* e *T. cruzi*, simplesmente possuem uma forma de vida intracelular que lhes possibilita evitar a ação de anticorpos. Outra estratégia empregada é a variação antigênica, com expressão variável de antígenos de superfície, como forma de evitar o reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro. Diversas evidências experimentais demonstram a capacidade destes parasitos de regular a resposta mediada por células T, ocasionando supressão em suas funções efetoras. Um fenômeno observado em *Leishmania major* demonstrou ativa produção de IL-10 (interleucina-10) e ativação de linfócitos T regulatórios CD25⁺ como forma de prevenir a total eliminação deste agente invasor (SACKS & SHER 2002). Entretanto, estes parasitas apresentam processos bioquímicos altamente conservados entre eles, como em particular o processamento dos RNA mensageiros, chamado de *trans-splicing*.

1.2) Doença de Chagas

A tripanosomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909 é uma zoonose causada pelo hemoflagelado denominado *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e transmitido pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família

Reduviidae). Esse protozoário pertence ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (CHAGAS 1909); (BRENER 2000); (NEVES 2000); (REY 2001).

A estimativa do número de indivíduos infectados com o *T. cruzi* em áreas endêmicas da América Latina reduziu desde a década de 1980, atingindo 16-18 milhões de pessoas no início da década de 1990, caiu para 11 milhões no fim dos anos 90; em 2006 este número foi revisado para 7,6 milhões de infectados. Dados demonstram a presença de imigrantes provenientes da América Latina infectados pelo *T. cruzi* em diferentes países, com estimativas de 1.067 casos na Austrália entre 2005-2006; 1218, no Canadá; 5.125 na Espanha; e de 56 a 357 mil casos nos Estados Unidos (SCHMUNIS 2007).

A transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Além da transmissão vetorial, outro mecanismo responsável por aproximadamente 10% dos casos, é a transfusão sanguínea. O risco de adquirir a infecção após receber uma transfusão de sangue de um doador infectado é de aproximadamente 20%. Este é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. O terceiro mais importante mecanismo de transmissão é a congênita, com aproximadamente 5.000 a 18.000 casos por ano e pode ocorrer fora das áreas endêmicas. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (PRATA, 1994).

Recentemente, em março de 2005, a infecção de 25 pessoas pelo *T. cruzi*, em Santa Catarina, levando a óbito três delas, os e 178 casos de pessoas infectadas no Pará após o consumo de polpa de açaí (NÓBREGA et al. 2009), chamaram novamente a atenção de todo o país para a doença de Chagas. O surto representou mais uma comprovação de que a doença, que atinge cerca de 3 milhões de brasileiros, pode ser transmitida por via oral. A prevenção da doença pode ser feita principalmente pelo controle do inseto transmissor, o barbeiro, e pela seleção de doadores de sangue.

A prioridade no combate da doença de Chagas sempre foi renegada devido ao seu caráter crônico e rural, acometendo populações carentes, sem condição de reivindicação de suas necessidades. Senão por compromisso social, estudos de custo-benefício mostraram a importância do combate à doença (BRENER 2000). Sendo a doença uma zoonose, sua erradicação parece utópica. Sempre haverá o risco de domiciliação de vetores silvestres e da contaminação humana acidental. Devido ao grande número de reservatórios selvagens e domésticos e, conseqüente inviabilidade de seu esgotamento, aliado ainda à indisponibilidade de vacinas e fármacos efetivos no tratamento da fase crônica da doença, a única possibilidade de combate à doença atualmente reside na redução ou interrupção da transmissão vetorial focada no controle de populações domiciliadas (BRENER 2000). Decisões políticas levaram à criação de programas governamentais, primeiro no sul do continente (Iniciativa do Cone Sul – 1991/92), e depois em países das Américas Andina e Central (Iniciativas da América Central e do Pacto Andino – 1997/98) (MONCAYO, 1999), focadas na erradicação de insetos vetores da doença de Chagas. Paralelamente, ocorreu o melhoramento na qualidade das transfusões de sangue, também devido ao aumento de indivíduos infectados com HIV. Como resultado, em cerca de 1,8 milhões de militares recrutados na Argentina, porexemplo, a prevalência de sorologia positiva diminuiu de 5,8% em 1981 para 1,9% em 1993 (SEGURA *et al.* 2000). Entretanto, a doença de Chagas ainda é endêmica em muitas áreas do interior do Brasil, exigindo pesquisas sobre novos fármacos contra o *T. cruzi* e novas formas de combater o barbeiro.

O *T. cruzi* apresenta principalmente as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 1). A forma epimastigota caracteriza-se por ser alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior; essa é a forma de replicação no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) que se encontra na porção posterior do intestino e em cultura em meio líquido (CHAGAS 1909); (NEVES 2000); (REY 2001).

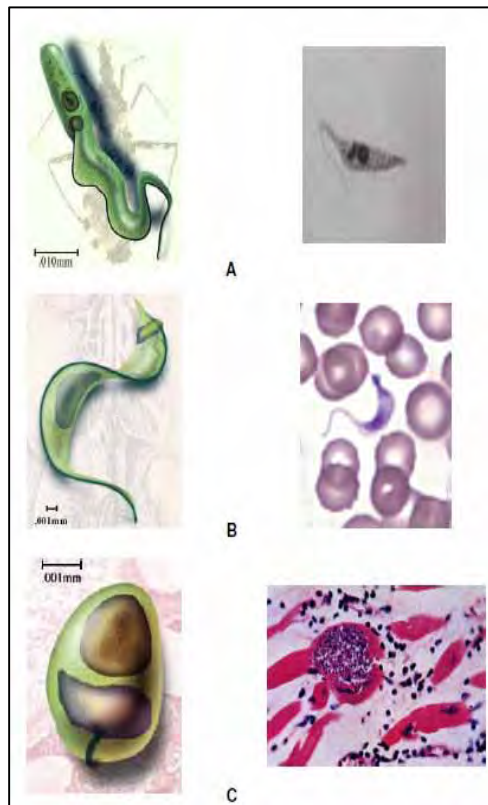


Figura 1: Formas de *T. cruzi*; A, Forma epimastigota; B, tripomastigota; C, amastigota.

A forma tripomastigota (Figura 1) é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo, próximo da extremidade posterior, com flagelo que se estende por toda célula e torna-se livre na porção anterior. Nessa forma, observa-se um nítido polimorfismo, podendo ser descritos dois tipos morfológicos polares, formas finas e formas largas, que resultam em diferenças na evolução parasitológica, na patologia e na resposta do parasitismo a diferentes substâncias. A forma tripomastigota é encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo estar presente também nos espaços intersticiais, no líquido cefalorraquidiano, leite, esperma e em cultura de células. Os tripomastigotas metacíclicos são morfológicamente semelhantes às formas tripomastigotas sanguíneas, sendo as formas infectantes liberadas nas fezes do vetor.

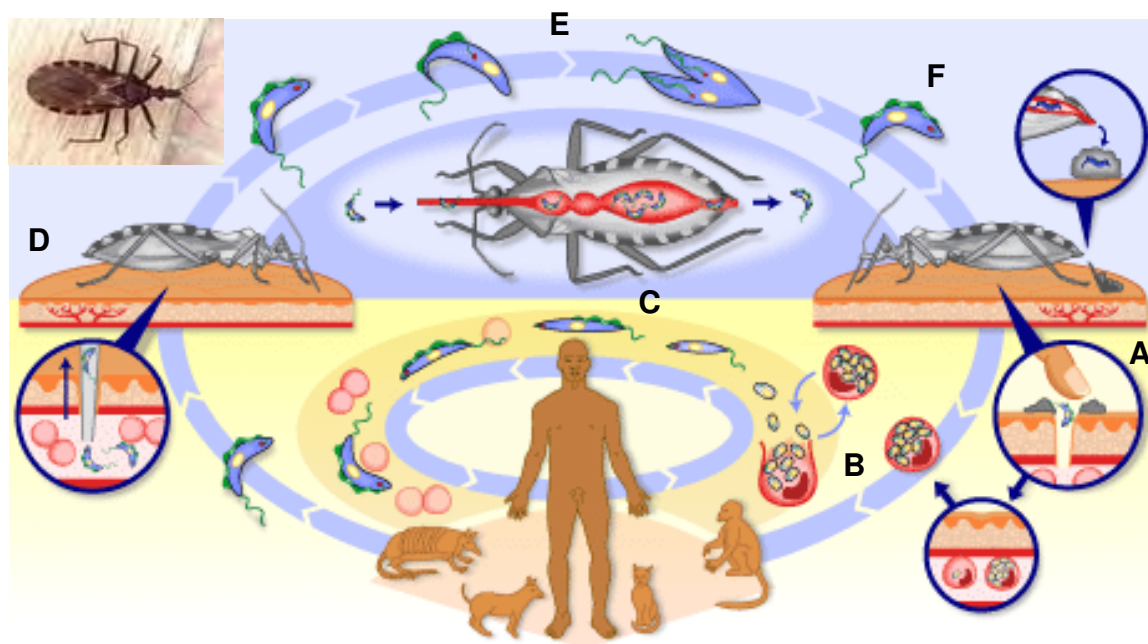
A forma amastigota é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. É a forma de replicação no hospedeiro vertebrado, presente no interior de vários tipos de células, mas

predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear e em cultura de células (CHAGAS 1909); (NEVES 2000); (REY 2001).

1.2.1) Ciclo biológico e transmissão

Os principais mecanismos de transmissão são pelo contato de fezes e urina de triatomíneos contaminados (principais gêneros são *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*), transfusões sanguíneas e transmissão congênita (CHAGAS 1909); (NEVES 2000).

O ciclo biológico descrito por Carlos Chagas encontra-se a seguir (Fig. 2). 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 parasitos 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 parasitos se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes (F).



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

Figura 2: Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas.

1.2.2) Sintomatologia

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica, podendo ser sintomática ou assintomática, sendo a última a mais freqüente (90-98% dos pacientes). A fase aguda inicia-se através de manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romaña) ou na pele (chagoma de inoculação), aparecendo dentro de 4 a 10 dias após a picada do triatomíneo, regredindo em 1 ou 2 meses. Na fase crônica, os pacientes podem apresentar uma forma cardíaca (13%), digestiva (10%) ou formas mistas (8%) (CHAGAS 1909); (NEVES 2000); (BRENER 2000).

1.2.3) Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela clínica e, confirmado, quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial. Elementos importantes para a suspeita da etiologia chagásica são: região de procedência do paciente, estadia em casas onde havia triatomíneos, e

transfusões sanguíneas, mesmo fora das áreas endêmicas. A presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e/ou chagoma de inoculação) acompanhados de febre irregular ou ausente, adenopatia-satélite ou generalizada, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema generalizado ou dos pés, fazem suspeitar da fase aguda da doença. As alterações cardíacas com sinais de insuficiência cardíaca confirmada pelo eletrocardiograma e alterações no esôfago e cólon (reveladas por raios X) fazem suspeitar da fase crônica (NEVES 2000); (BRENER 2000); (REY 2001).

Os métodos de diagnóstico laboratorial (Hemaglutinação, Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA) apresentam diferentes resultados se aplicados na fase aguda ou crônica da infecção. Na fase aguda, observa-se alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos (IgM e IgG) que podem atingir níveis elevados. Nessa fase, recomenda-se a pesquisa direta do parasito (a fresco, micro-hematócrito, gota espessa, etc) e, se necessário, pesquisa indireta (xenodiagnóstico, hemocultura, PCR, etc). Na fase crônica, observa-se baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos da classe IgG (BRENER 2000); (REY 2001).

1.2.4) Terapêutica

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos esforços que vêm sendo desenvolvidos por vários laboratórios e pesquisadores. Diversas substâncias estão sendo testadas em animais e, algumas delas têm sido usadas no homem, mas nenhuma consegue suprimir a infecção pelo *T. cruzi* e promover uma cura definitiva em todos os pacientes tratados (NEVES 2000).

No momento, somente dois medicamentos estão disponíveis para o tratamento da doença, nifurtimox (Lampit®, Bayer) e benzonidazol (Rochagan®, Roche), que atuam sobre as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas. O primeiro, depois de amplamente utilizadas no Brasil e países latino-americanos, foi retirada do mercado farmacêutico brasileiro, permanecendo apenas o benzonidazol (COURA & DE CASTRO, 2002). Os direitos de produção e comercialização do benzonidazol no Brasil foram transferidos pela Roche para o Laboratório Farmacêutico do Estado de

Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), cujos insumos para produção do fármaco serão fornecidos pela Roche até 2009 (JANNIN & VILLA, 2007). Embora várias notícias veiculadas pela página do laboratório na internet apontem a produção do medicamento, o mesmo ainda não compõe a lista de medicamentos produzidos pelo LAFEPE (www.lafepe.pe.gov.br).

O benzonidazol é um N-benzil- 2 nitro- 1 imidazol acetamida que interfere diretamente com a síntese de macromoléculas pelo *T. cruzi* e vários componentes celulares, tais como DNA, lipídios e proteínas. Deve ser administrado durante 30-60 dias, na dosagem de 5 a 7mg/Kg. Apesar da sua atividade tripanossomicida, o benzonidazol pode causar varias reações colaterais caracterizadas por dermatites, depressões da medula óssea e polineuropatia periférica (COURA & DE CASTRO. 2002).

1.3) Doença do Sono

O *Trypanosoma brucei brucei* foi descoberto por David Bruce em 1894, 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. brucei gambiense*). Mais tarde, em 1910, o *T. rhodesiense* (atualmente *T. b. rhodesiense*) foi descrito por Stevens e Fantham (COX, 2004). As formas de *T. brucei* esta descrita na Figura 3.

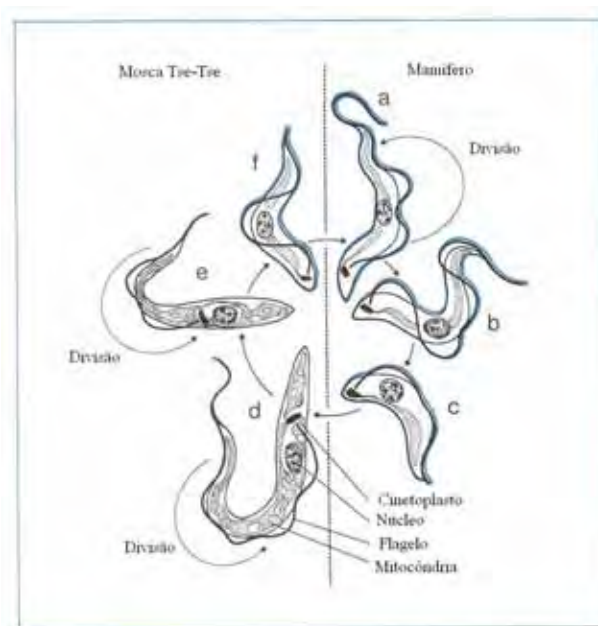


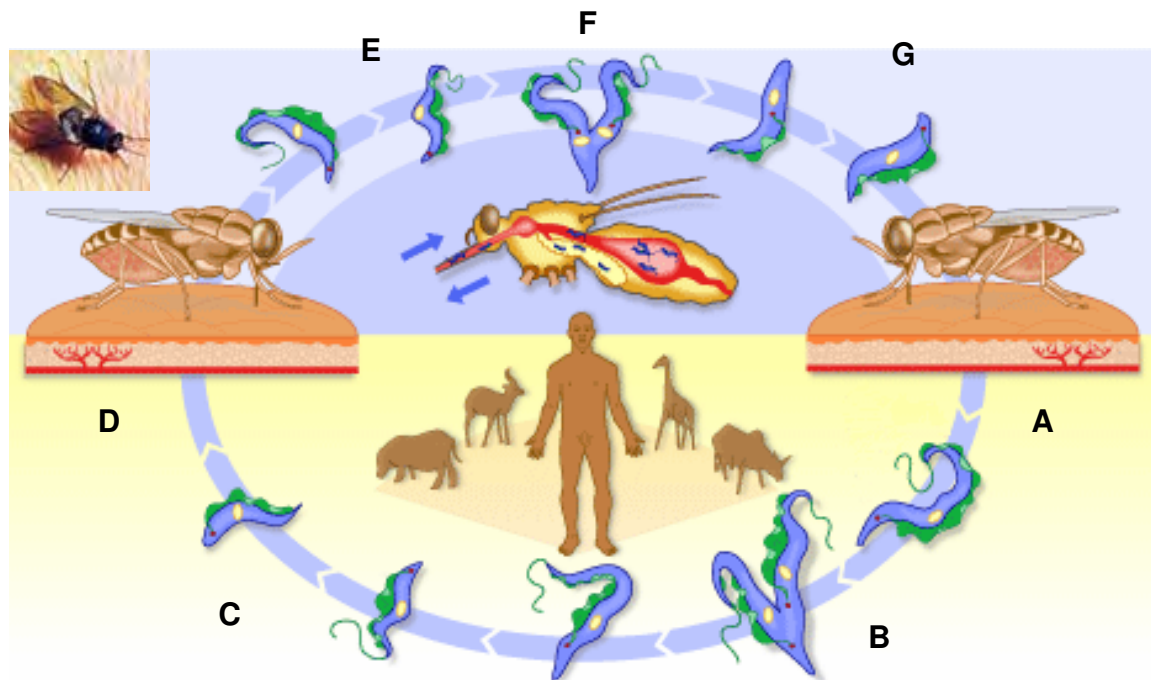
Figura 3: Detalhes das formas apresentadas pelo *T. brucei* durante o ciclo biológico. a, Forma sanguínea delgada; b, forma sanguínea intermediária; c, forma sanguínea larga; d, forma procíclica; e, forma epimastigota; f, forma metacíclica.

A tripanosomíase africana ou doença do sono é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*, sendo esta 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 da espécie *Glossina morsitans* que se alimentam de animais silvestres, representando mais de 90% dos casos (COX, 2004).

1.3.1) Ciclo Biológico e Transmissão

O ciclo completo da doença foi então descrito por David Bruce em 1914 (Fig. 4). Durante o ciclo da tripanosomíase africana, a mosca contaminada (*Glossina sp*) injeta formas tripomastigotas

metacíclicas (A) durante a picada. O parasito se diferencia em forma tripomastigota sanguínea, que se multiplica na corrente sanguínea (B). Os parasitos 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 diferenciam-se em formas procíclicas (E) e em seguida em epimastigotas que se multiplicam na glândula salivar (F). Em seguida, essas formas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (G) e o ciclo inicia-se novamente.



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

Figura 4: Ciclo biológico da transmissão da Doença do Sono.

1.3.2) Sintomatologia

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).

1.3.3) Diagnóstico clínico e laboratorial

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, em especial para *T. b. rhodesiense*; lâmina corada de punção do gânglio, para *T. b. gambiense*; exame do líquido para a fase crônica; teste imunológicos (Hemaglutinação, IFI e ELISA) e moleculares (PCR) (KENNEDY, 2004).

1.3.4) Terapêutica

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*. O mecanismo de ação da pentamidina ainda não está totalmente esclarecido, embora já foram descritos pelo menos 3 transpostadores do fármaco, levando em acúmulo de milimolar do mesmo no interior da célula. Evidências demonstram que a pentamidina se liga a componentes celulares carregados negativamente, como fosfolípidos e ácidos nucleicos, ocasionando perturbação na estrutura do DNA do cinetoplasto (kDNA) e consequente inibição de topoisomerase II (FAIRLAMB 2003).

O mecanismo de ação da suramina permanece um mistério, embora relatos na literatura descrevam este fármaco como inibidor não específico de muitas enzimas e receptores, podendo interferir com a função de vários alvos terapêuticos (FAIRLAMB 2003).

A fase crônica possui um tratamento mais difícil, pois é necessário que o fármaco atravesse a barreira do SNC. Emprega-se o melarprosól (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). O melarprosól é um pró-fármaco, desenvolvido a partir de estudos com antidotos e gases tóxicos baseados em arsênico. Nos pacientes, o melarsoprol é rapidamente convertido na forma ativa, e atua por inibir rapidamente, e de maneira reversiva, diferentes proteínas séricas. A perda extremamente rápida de mobilidade e lise celular observada em formas sanguíneas de *T. brucei* indica que o fármaco atue na enzima piruvato quinase, causando alteração na glicólise e em outros tipos de metabolismo energético (FAIRLAMB 2003). Já o mecanismo de ação da eflornitina se baseia na inibição irreversível da enzima ornitina descarboxilase, envolvida no primeiro passo na biosíntese de poliaminas (FAIRLAMB 2003).

Vários esforços estão sendo feitos na busca de uma vacina para a doença do sono, mas, devido à variação antigênica do parasito, dificilmente será obtida uma vacina eficaz (COX, 2004).

1.4) Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por pelo menos 20 diferentes espécies de *Leishmania*, transmitidas por insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. *Leishmania donovani* foi observada em pacientes sofrendo de Kala-azar e foi descrita em 1903 por Leishman e Donovan, simultaneamente, e assim esses parasitos 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. A figura 5 descreve as formas de Leishmanias observadas durante o ciclo biológico.

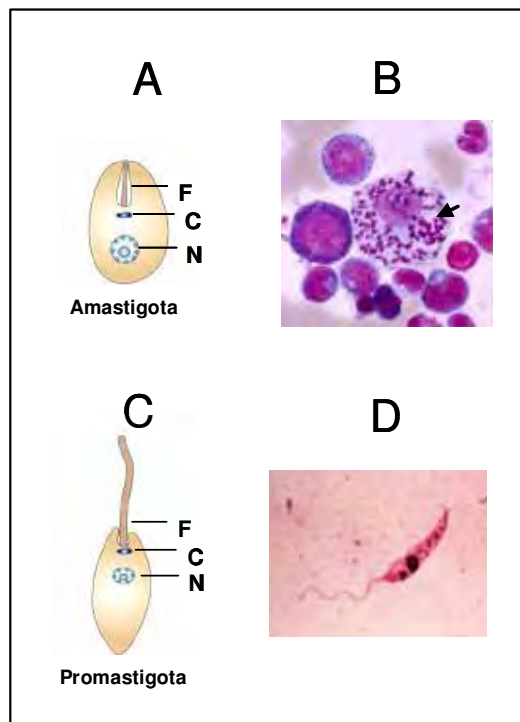


Figura 5: A) Forma esquemática de uma amastigota, B) Amastigotas ao redor do núcleo do macrófago (seta) C) Forma esquemática de uma promastigota de *Leishmania* sp. N: núcleo, C: cinetoplasto, F: flagelo.

1.4.1) Ciclo biológico e transmissão

Durante o ciclo da doença (Fig. 6), 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).

1.4.3) Diagnóstico clínico e laboratorial

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, hanseníase, 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, porém 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).

1.4.4) Terapêutica

O tratamento da leishmaniose visceral é baseado nos antimoniais pentavalentes, mas que possuem efeitos colaterais e observa-se resistência em vários casos. Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da leishmânia, através de glicólise e beta-oxidação que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários (BERMAN *et al.* 1985).

A anfotericina B é utilizada nos casos de resistência, mas é tóxica. 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 da espécie 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) Processamento dos RNA mensageiros (mRNAs) em tripanosomatídeos

Em tripanosomas e leishmanias, os RNAs são processados por um mecanismo não usual denominado *trans-splicing*. As regiões de dois transcritos separados (em lugar de um único pré-mRNA) são unidas de modo que todo o mensageiro maduro inicia com a mesma sequência (aproximadamente 40 nucleotídeos), denominada *spliced leader* (SL) (NILSEN 1995); (TSCHUDI & ULLU 1990); (PERIS *et al* 1997); (STURM & CAMPBELL 1999); (STURM *et al* 1999). O *trans-splicing* envolvendo SL está caracterizado em tripanosomas, nemátodes e outras espécies e requerem, em adição ao SL RNP, as pequenas ribonucleoproteínas, U2, U4/U6 e U5; a sequência SL é transferida por uma partícula RNP (ribonucleoproteína) que contém domínio semelhante a snRNP de mamífero, incluindo sítio de ligação Sm (*Sm-binding site*). O SL RNA não é somente um substrato da reação de *trans-splicing*, contendo um domínio *Sm-like*, mas apresenta proteínas comuns com U2 e U4/U6 snRNPs (PALFI & BINDEREIF 1992).

Em mamíferos, o processamento dos mRNAs é feito por *cis-splicing*, e as proteínas do “spliceosomo” fazem parte de uma grande família de proteínas, onde estão inclusas as proteínas Sm e *Sm-like* (LSm); definidas pela presença da região Sm conservada. Na biogênese dessas partículas, os snRNAs (U1, U2, U4 e U5) são exportados do núcleo para o citoplasma da célula, associando-se a sete proteínas Sm, gerando o snRNP core que é essencial para a estabilidade metabólica do snRNP, importação da partícula para o núcleo e ligação às proteínas específicas (WILL & LÜHRMANN 2001). U6 snRNP em mamíferos diferencia-se das outras snRNPs por ser transcrita pela RNA polimerase III e adquire cap de g-monometil, sendo o U6 snRNP formado no núcleo. Nos passos seguintes U6 snRNP interage com U4 snRNP pelo pareamento dos snRNAs, formando U4/U6 snRNP; proteínas LSm facilitam a interação *in vitro* (ACHSEL *et al.* 1999).

1.5.1) *Cis e trans-splicing*

A maioria dos genes eucarióticos apresenta uma estrutura que alterna éxons e íntrons. Após transcrição, íntrons devem ser removidos a partir do transcrito primário (pré-mRNA) para gerar um mRNA maduro. A precisa excisão dos íntrons e a união dos éxons vizinhos é realizada por um processo complexo chamado de *splicing*, que quando ocorre dentro de uma única molécula de pré-mRNA é chamada de *cis-splicing* (MAYER & FLOETER-WINTER 2005).

Cis-splicing ocorre duas etapas, sendo que em cada passo observa-se uma reação de transesterificação, executadas a partir de um complexo macromolecular conhecido como spliceosomo; uma maquinaria de ribonucleoproteínas, compostas de cinco ribonucleoproteínas (U1, U2, U4/U6 e U5 snRNPs, nomeados de acordo com o snRNA associado) e mais cerca de 300 proteínas associadas (MAYER & FLOETER-WINTER 2005).

O processo inicia-se com a formação do complexo A, resultado da interação entre snRNP U1 e U2 por pareamento dos snRNAs com a região 5' *splice site* do íntron e com a sequência *branch point* (BP), respectivamente. Ao complexo A são adicionados U4/U6 di-snRNP e U5 snRNP como um tri-snRNP, resultando no complexo B. Através de uma série de rearranjos, como a saída dos complexos U1 e U4 e incorporação do complexo NTC (*Prp19-associated complex* ou *Nineteen complex*); forma-se um complexo ativo com capacidade catalítica, nomeado de complexo B*. Durante o primeiro passo catalítico, U1 é dissociado da região 5' *splice site* e U6 liga-se nesta mesma região. O duplex entre U4/U6 snRNAs, gerado pela união de U4/U6 snRNPs, é desfeito e permite o pareamento de bases entre U2-U6. Após este primeiro passo de reação, novos rearranjos ocorrem, levando à formação do complexo C, que catalisa o segundo passo do *splicing* e, em seguida, o complexo é completamente desorganizado (LAGGERBAUER *et al.* 2005). A figura 7 resume o processamento.

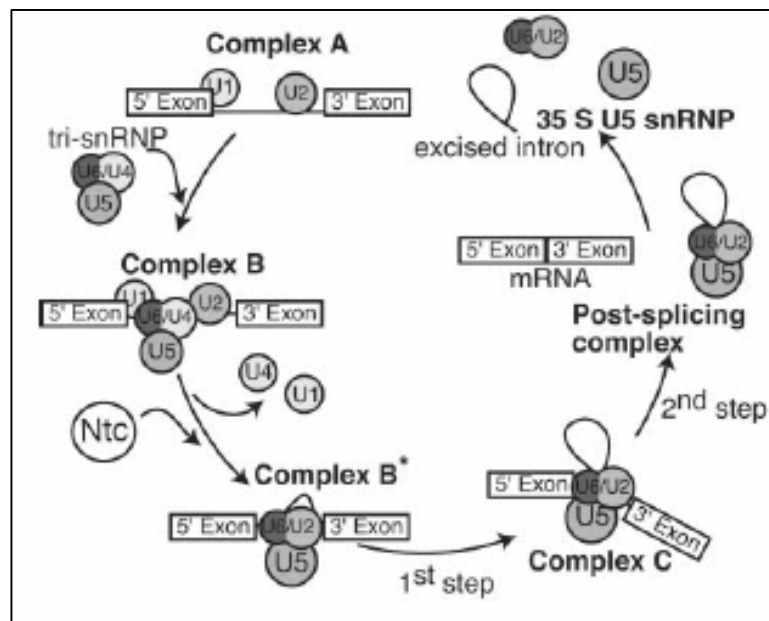


Figura 7: Modelo esquemático do *cis-splicing* do pré-RNA. (Ohi *et al.* 2005).

Trans-splicing é uma reação intermolecular de processamento de RNA, onde duas moléculas distintas de RNA são unidas para formar um RNA mensageiro maduro. No *trans-splicing* os principais componentes da reação são o pré-mRNA, transcritos de forma policistrônica, e um pequeno RNA, chamado de SL (*spliced leader*) RNA, os quais se encontram em moléculas distintas. A sequência que representa a extremidade 5' do SL RNA, associa-se ao 3' *splice site* para formar o RNA maduro. A primeira evidência deste tipo de processamento foi obtida em 1982, quando se observou que uma sequência idêntica de 39 nucleotídeos estava sempre presente na extremidade 5' de muitos transcritos de diferentes glicoproteínas de superfície de *Trypanosoma brucei* (ULLU & TSCHUDI 1995). *Trans-splicing* já foi identificado em nematódeos, trematódeos, euglenóides (ULLU & TSCHUDI 1995) e, mais recentemente, em cestódeos (BREHM *et al.* 2000), em *Hydra* do filo Cnidária (STOVER & STEELE 2001) e em dois membros do subfilo dos Cordatos (VANDENBERGHE *et al.* 2001; GANOT *et al.* 2004).

Exceto pela natureza intermolecular, o *trans-splicing* apresenta as mesmas etapas do *cis-splicing* (dois passos de reação); na primeira etapa, ocorre clivagem no sítio doador do SL gerando 5'

SL éxon; o SL remanescente liga-se à adenosina do íntron no pré-mRNA aceptor para formar o Y-intermediário (correspondente ao *lariat* do *cis-splicing*). Na segunda etapa, a clivagem no sítio 3' e ligação do éxon geram os éxon processados e um Y-íntron excisado (ULLU & TSCHUDI 1995; VIANNA *et al.* 2001).

A figura a seguir ilustra as principais diferenças entre o processamento de RNA por *cis* ou *trans-splicing* (Figura 8).

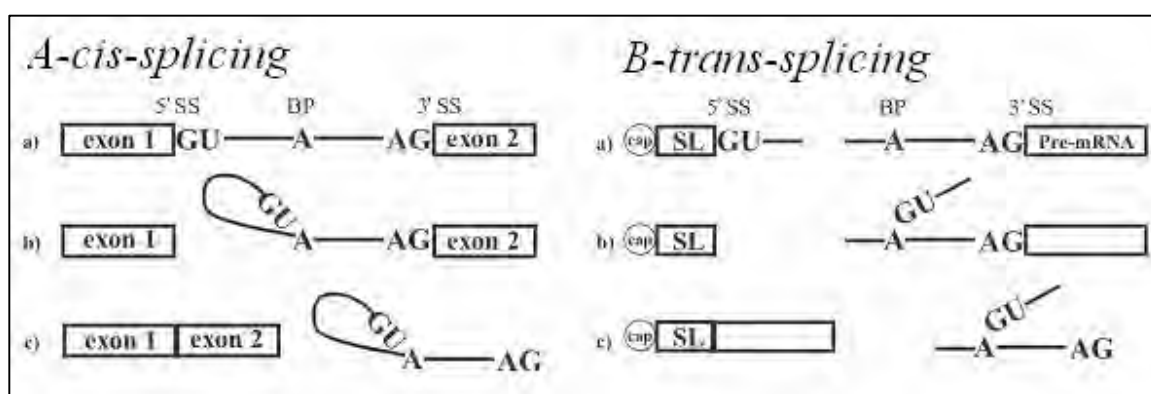


Figura 8: Representação esquemática de *cis* e *trans-splicing*. É possível observar as principais diferenças entre os dois processos; no *cis-splicing* a reação ocorre em uma única molécula e há formação do *lariat*; e no *trans-splicing*, a reação ocorre em moléculas diferentes e formação do Y intermediário (MAYER & FLOETER-WINTER 2005).

1.5.2) O SL (*spliced leader*) RNA

Spliced leader RNA são encontrados em kinetoplastídeos, e apresenta alta conservação entre as diferentes espécies. O tamanho do SL é altamente conservado, apresentando diferença somente no SL RNA de *Leptomonas collosoma*, que possui inserção de dois nucleotídeos na posição nove. A respeito da variação de seqüência e tamanho do SL de tripanosomatídeos e nematódeos, estes podem formar uma estrutura secundária similar, onde estão presentes três *stem-loops*. *Stem-loops* II e III são separados por uma região contendo um motivo *Sm-like*, que em nematódeos é um sítio de ligação de Sm. O *stem-loop* I possui duas conformações (forma 1 e 2), embora a forma 2 pareça ser predominante, proteínas específicas são relevantes para obtenção desta estrutura (ULLU *et al.* 1995).

Sequências relevantes estão presentes no SL íntron e ao redor do sítio de ligação a Sm e são capazes de interagir com U6 snRNA. Esta interação é importante para trazer o SL 5' *splice site* para o centro catalítico do *trans*-spliceosomo. Em tripanosomatídeos, entretanto, não há aparente complementaridade entre regiões do SL e U6 snRNAs e os estudos ainda não demonstraram esta interação *in vivo*. Experimentos com células permeáveis de *T. brucei* revelaram duas regiões relevantes para SL RNA no *trans-splicing*: a primeira, do nucleotídeo 7-19, cujo mascaramento inibe a metilação na extremidade 5' do SL; e a segunda região está compreendida entre as posições 40-43 *downstream* do 5' *splice site* (ULLU *et al.* 1995).

1.5.3) Ribonucleoproteínas

As ribonucleoproteínas (snRNPs – U1, U2, U4/U6 e U5, principalmente), complexos que consistem de pequenos RNAs ricos em uridina (UsnRNAs) unidos fortemente à proteínas, são fatores importantes no funcionamento das células eucarióticas. Os snRNAs apresentam diferentes tamanhos e formas, podendo ser muito abundantes (cerca de 10^7 cópias por célula de mamífero, tanto quanto os ribossomos) e altamente conservadas de leveduras ao homem. Além disso, esses pequenos RNAs possuem um sítio Sm rico em uridina composto por duas regiões conservadas chamadas de Sm1 e Sm2, separadas por uma região não-conservada (HERMANN *et al.* 1995; SÉRAPHIN 1995). Esse sítio Sm codifica para um domínio comum (domínio Sm) responsável por mediar as interações com as proteínas Sm. A figura 9, a seguir, representa a estrutura de U5 snRNA de *T. cruzi* mostrando o sítio Sm (AMBRÓSIO *et al.* 2007).

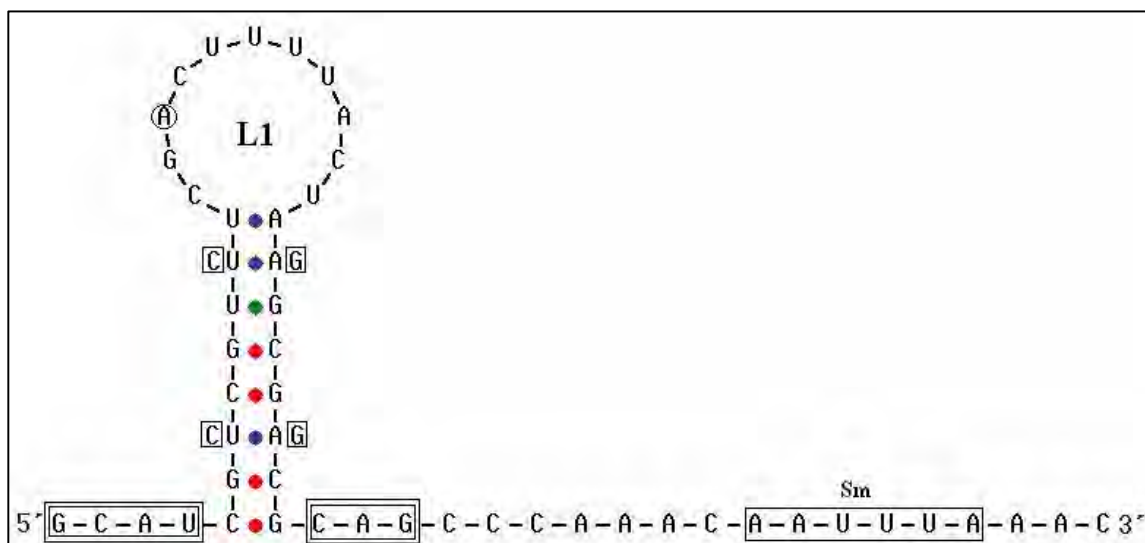


Figura 9: Estrutura secundária proposta para U5 snRNA de *T. cruzi* (dG = -2,8 a 37°C) (AMBRÓSIO *et al* 2007).

Desde a descoberta do *trans-splicing* em tripanosomas, acreditou-se que esses organismos perderam a maquinária para realizar o *cis-splicing*. Isto foi baseado na ausência aparente de sequências intercalantes (íntrons) e de U1 snRNA, que no *cis-splicing* promove interações de pares de bases na região 5' *splice site* durante a formação do spliceosomo inicial. Mais recentemente, a sequência de U1 snRNA foi identificada em *Chritidia fasciculata*, *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma brucei*, apresentando alta similaridade entre si, além de possuir uma estrutura cap de trimetilguanosina (TMG) e estar complexada a proteínas *core* comuns, semelhante às outras U1 já estudadas; além disso, sequências intervenientes foram descritas no gene PAP de *T. brucei* e *T. cruzi* (Schnare & Gray 1999, Mair *et al.* 2000, Djikeng *et al.* 2001, Palfi *et al.* 2002). A sequência de U1 snRNA encontrada em *T. brucei* é extremamente pequena (aproximadamente 70 nucleotídeos) em relação aos outros U1 snRNAs (139 a 568 nucleotídeos) (DJIKENG *et al.* 2001; PALFI *et al.* 2002). Uma questão importante a ser respondida relaciona-se com a participação da U1 snRNA em reações de *cis-splicing* em tripanosomatídeos.

1.5.4) snRNAs

Em tripanosomatídeos, os UsnRNAs são transcritos pela RNA polimerase III e recebem um cap de 7-metilguanosina (m7G) na extremidade 5' adicionado pela enzima guaniltransferase que, associada à RNA polimerase, transfere GMP a partir de GTP para um grupamento difosfato na extremidade 5' promovendo uma ligação 5'-5' (LODISH *et al.* 2000). O cap 5' protege o mRNA da ação das exorribonucleases 5', além de ter papel importante na tradução e processamento dos mRNAs, sendo também extremamente necessário para que ocorram interações eficientes da U6 snRNA ao 5' *splice site* (O'MULLANE *et al.* 1998). Os snRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma, associando-se a sete proteínas Sm, gerando o snRNP core com estrutura semelhante a um anel em torno do sítio Sm, essencial para a estabilidade metabólica do snRNP, importação da partícula para o núcleo e ligação às proteínas específicas (WILL & LÜHRMANN 2001). A U6 snRNP interage com U4 snRNP pelo pareamento dos snRNAs, formando U4/U6 snRNP; proteínas Sm-like (LSm) facilitam a interação *in vitro* (ACHSEL *et al.* 1999). Já os pré-mRNAs recebem o cap 5' durante o *trans-splicing*, quando a sequência SL *capped* de 39 nucleotídeos é transferida, a partir de um SL RNA, para a extremidade 5' de cada RNA mensageiro (MARCHETTI *et al.* 1998).

1.5.5) Proteínas Sm

As proteínas unidas aos snRNAs podem ser classificadas em dois grupos: as específicas que estão associadas somente a determinadas snRNPs e sete proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F e G isoladas do extrato nuclear de células HeLa, apresentando pesos moleculares de 28,0/29,0; 16,0; 16,5; 18,0; 12,0; 11,0; 9,0 kDa e pI de 10,6/10,7; 10,5; 8,0; 8,0; 10,3; 3,3; 8,8; respectivamente) que são comuns para todas as partículas (Figura 10) (LURHMANN *et al.* 1990, BURGE *et al.* 1999, STARK *et al.* 2001).

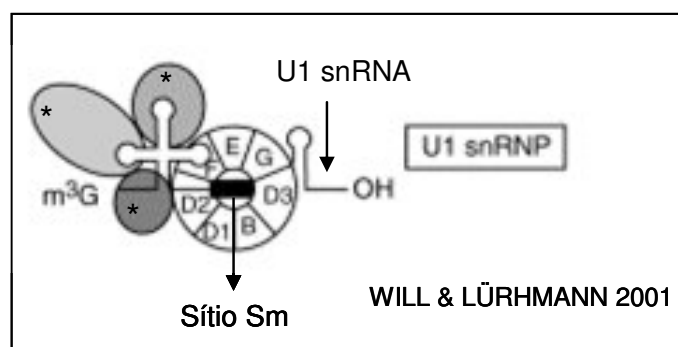


Figura 10: Esquema de U1 snRNP de mamíferos. m³G: cap trimetilguanosina; B, D1, D2, D3, E, F e G: proteínas Sm; asteriscos: proteínas específicas de U1 snRNP (WILL & LURHMANN 2001).

As sete proteínas Sm apresentam-se interligadas, organizando-se em 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, 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) (Fig 11-A). Uma exceção é a partícula de U6 snRNP, onde o U6 snRNA não apresenta a região Sm e as 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. 11-B), 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. 11-C) que apresenta a proteína Ssm-4 substituindo Sm-D3 (TKACZ *et al.* 2007).

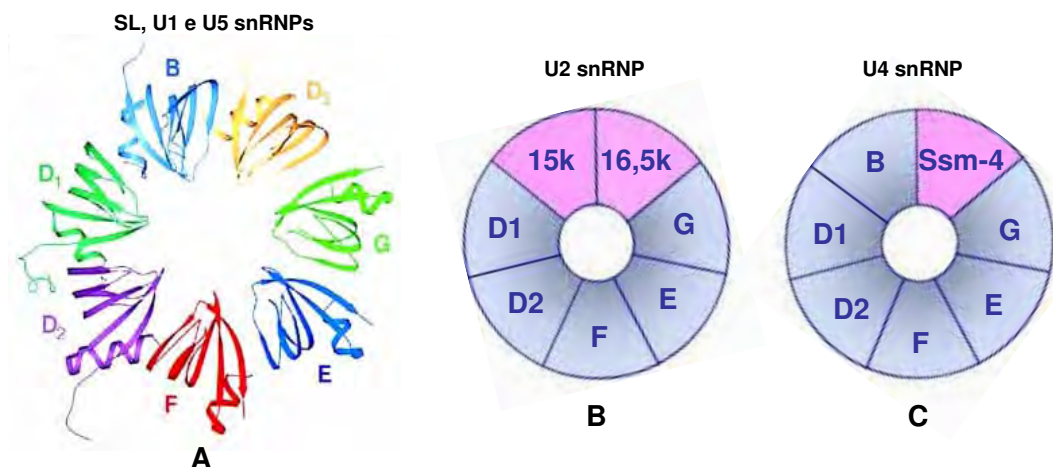


Figura 11: A) Modelo do core Sm. B) Variação do core Sm em U2 snRNP de *T. brucei*. C) Variação do core Sm em U4 snRNP em *T. brucei* (KAMBACH *et al.* 1999, WANG *et al.* 2006 modificado).

1.5.6) Proteínas específicas de snRNPs

Embora bem definidos em mamíferos, as ribonucleoproteínas não estão bem caracterizadas em certos tripanosomatídeos. A seguir, estão descritas cada uma delas.

1.5.6.1) 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 envolvimento de U1-C (HEINRICHS *et al.* 1990; MUTO *et al.* 2004), existindo evidências de que em leveduras U1-C sozinha seja 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 spliceossomal, 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 *cis-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, a partícula U1 snRNA é mais curta do que nos mamíferos (75 nt e 164 nt, respectivamente) e com uma estrutura secundária simples (ausência dos *stem-loops* II e III) (Figura 12). 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 que parecia estar ausente. A 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 daquela proteína. (DIJIKENG *et al.*, 2001; PALFI *et al.*, 2002; PALFI *et al.*, 2005).

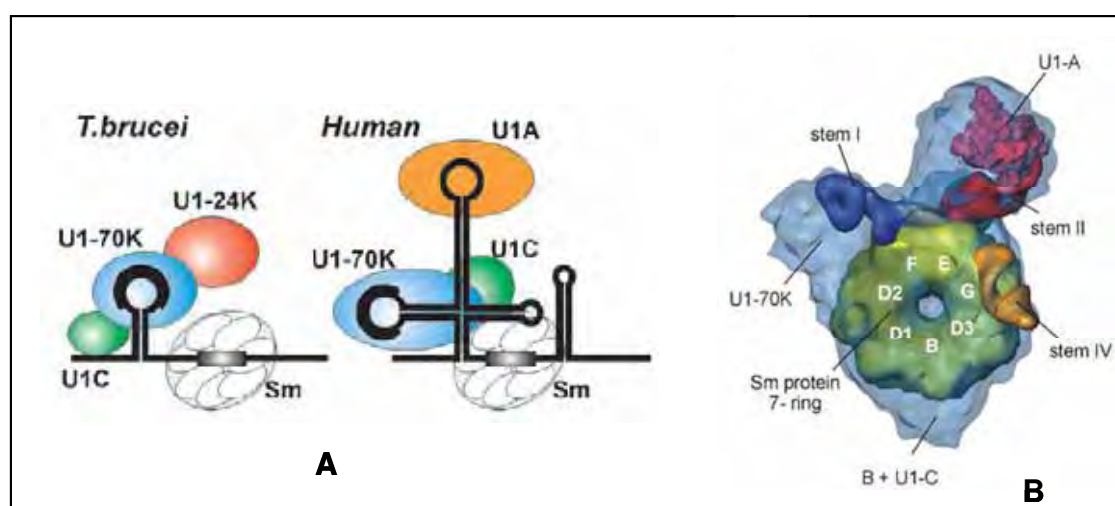


Figura 12: A) Comparação entre as estruturas de U1 snRNP de *T. brucei* e humanos(Palfi *et al.* 2005). B) Estrutura tridimensional de U1 snRNP humana (STARK *et al.* 2001).

1.5.6.2) U2 snRNP

Várias proteínas específicas de U2 snRNP são conhecidas em mamíferos e leveduras (denominação aparece 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 dessas, 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, sendo que U2-40K apresenta 31% de identidade (em termos de aminoácidos) com U2-A de humanos; os pontos de interação específica com U2 snRNA e geral com os outros snRNAs já foram identificados (CROSS *et al.* 1993).

1.5.6.3) 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 dessas 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 (NOTTROTT *et al.* 2002; BELL *et al.* 2002; RADER & GUTHRIE 2002). A forma de tri-snRNP, U4/U6.U5, foi observada em maior quantidade por ser a forma funcional (Figura 13). No tri-snRNP humano, além de U4, U6 e U5, são observadas mais 30 proteínas que compõem esse complexo, entre elas a proteína Prp31 como a responsável pela ligação de U5 a U4/U6 (LIU *et al.* 2006).

Em humanos e em *Saccharomyces cerevisiae* (denominação aparece entre parênteses), são conhecidas as proteínas específicas 90K (PRP3), 60K (PRP4), 61K (PRP31), 20K (USA-Cpy1) 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 isomerases) catalizam mudanças conformacionais em proteínas; a proteína 20K (USA-Cpy1), 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 proteína 90K interage com o *stem-loop* II de U4/U6 snRNAs (NOTTROT *et al.* 2002).

Após estudos utilizando a metodologia do duplo-híbrido, foram mapeadas as interações entre as proteínas do tri-snRNP em humanos foi proposto um modelo (Figura 13) (LIU *et al.* 2006).

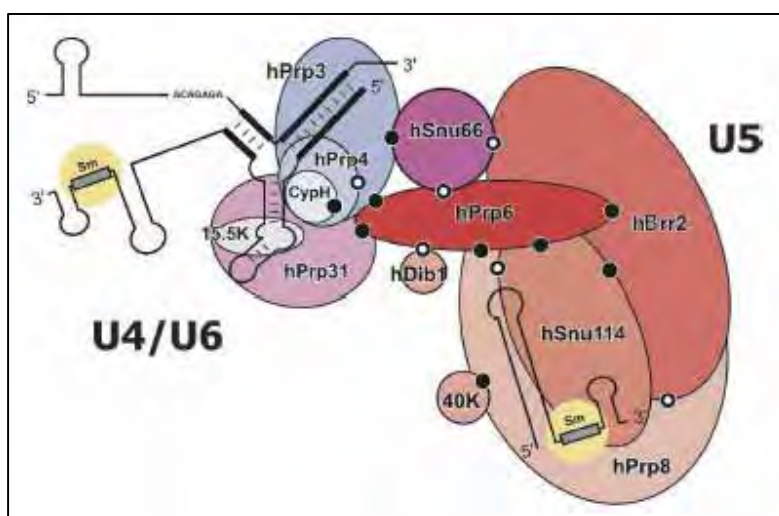


Figura 13: Modelo esquemático das interações proteína-proteína no tri-snRNP (retirado de Liu *et al.* 2006). Os pontos pretos e brancos significam as interações observadas as proteínas presentes nestes complexos.

Em tripanosomatídeos, até o momento não foram confirmadas experimentalmente proteínas específicas de U4 e U6 snRNPs.

1.5.6.4). U5 snRNP

São conhecidas oito proteínas específicas de U5 snRNP em humanos, e suas respectivas 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).

Em um dos maiores e mais conservados fatores de splicing, PRP8, tem sido observado 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, PRP8 também faz contato com BPS e o trato de polipirimidina (MACMILLAN *et al.* 1994; TEIGELKAMP *et al.* 1995a, b), estando também relacionada ao reconhecimento do sítio de *splicing* 5', parecendo 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) e 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 tripanosomas (LÜCKE *et al.* 1997).

U5-116K está relacionada com a separação do duplex U4/U6 durante a ativação do spliceosomo (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 snRNP (ACHSEL *et al.* 1998).

1.5.6.5). 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). 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 em *T. brucei* (XU *et al.* 2000). A interação SL e U6 foi observada em nemátodes, mas pode não ocorrer em tripanosomas (HANNON *et al.* 1992; MANDELBOIM *et al.* 2002).

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

1.5.7) 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 diferentes estágios do processamento de RNA de alguns organismos. Entre elas, estão proteínas denominadas de SAPs (proteínas associadas ao spliceosomo), RNA helicases-like, hnRNPs (RNP heterogênea nuclear), proteínas SR (ricas em serina), ciclofilinas, RBPs (proteínas ligantes de RNA), entre outras (CHEN *et al.* 2007).

1.5.7.1) Complexo Associado a Prp19p (*Prp19-associated complex*, *Nineteen complex* ou NTC)

Os componentes envolvidos na regulação dos rearranjos estruturais do spliceossomo ainda não são totalmente conhecidos. Entretanto, sabe-se que a transição de um complexo inativo para um ativo, está diretamente relacionada com a adição do NTC (OHI *et al.* 2005). Recentes trabalhos mostram que este complexo é responsável pela estabilização das interações entre U5 e U6 snRNAs com o pré-mRNA, bem como participa da desestabilização das proteínas LSm com o U6 snRNA durante a formação complexo C (CHAN *et al.* 2003). Os componentes de NTC também podem facilitar os rearranjos ocorridos em U5 snRNP durante a transição do complexo B para C (MAKAROV *et al.*

2002). Em *Saccharomyces cerevisiae*, NTC pode ser isolado como uma unidade distinta, com pelo menos 11 componentes, incluindo Prp19p, SyF1p (Ntc90), Cef1p (Ntc85), Clf1p (Ntc77), Prp46p (Ntc50), Cwc2p (Ntc40), Syf2p (Ntc31), Isy1p (Ntc30), Snt309p (Ntc25) e Ntc2p, que apresentam alta conservação entre diferentes espécies (OHI *et al.* 2005).

Evidências sugerem que Prp19 é requerida para a integridade estrutural de NTC e subsequente associação com o spliceossomo. Esta interage diretamente com várias proteínas do NTC, incluindo Cef1p, Snt309p e Cwc2p, e possui papel crítico na formação do complexo multiprotéico (Chen *et al.* 2002). Prp19p contém três motivos conservados: o N-terminal U-box, um predito *coil-coiled* e domínios repetitivos WD40 na região C-terminal. Domínios WD40 são responsáveis pela interação com Cwc2p, embora a região N-terminal possua interação com Snt309p e Cef1p. O domínio U-box, possui resíduos com possível associação a íons de zinco, estrutura similar ao *RING Finger domains*, sendo que muitas proteínas com este domínio apresentam atividade ligase *in vitro* (OHI *et al.* 2005).

Diante do exposto, observa-se a carência de informações sobre proteínas específicas de snRNP em tripanosomatídeos e considerando as pesquisas que vem sendo realizadas no laboratório sobre identificação e caracterização de ribonucleoproteínas que participam da reação de *trans-splicing*, este trabalho teve o objetivo principal de identificar e caracterizar proteínas específicas do complexo de U5 snRNP.

2) OBJETIVOS

Diferentes enfoques tem sido empregados no estudo da reação de trans-splicing em *T.cruzi*, e desde 1998 diversos artigos já foram publicados por integrantes do laboratório (VIANNA et al. 2001; AMBRÓSIO et al. 2004; BARBOSA et al. 2007, AMBRÓSIO et al. 2007; BOSETTO et al. 2008; AMBRÓSIO et al. 2009) utilizando esta reação como modelo de estudo.

A maturação dos pré-mRNAs em tripanosomatídeos ocorre por meio de um mecanismo denominado *trans-splicing*, que envolve a excisão dos íntrons e a união dos éxons de dois transcritos independentes. VIANNA e colaboradores (2001) descreveram a padronização desta reação *in vitro* utilizando um sistema totalmente livre de células. Embora não tenha sido possível confirmar a presença do mRNA maduro, o íntron processado observado é um forte indicativo que a reação de *trans-splicing* tenha ocorrido. Outro modelo empregado na avaliação da reação de *trans-splicing* foi a utilização de células de *T.cruzi* permeabilizadas com lisolecitina, com radioativo (AMBRÓSIO et al. 2004) ou sem (BARBOSA et al. 2004) radioatividade, avaliando a interferência de diferentes moléculas no processamento de mRNA em tripanosomatídeos. Utilizando técnicas de imunofluorescência indireta e confocal foi possível confirmar a presença de epítomos especificamente reconhecidos por anticorpos contra o capacete de trimetilguanosina (anti - m₃G), sugerindo a re-importação das partículas de snRNP entre núcleo-citoplasma em *T. cruzi* (BOSETTO et al. 2008).

O laboratório iniciou o estudo dos elementos das snRNP em 2007 com a elucidação das seqüências e principalmente das estruturas secundárias de U2, U4/U6 e U5 snRNA em *T.cruzi* (AMBRÓSIO et al. 2007); e mais recentemente, três novas proteínas específicas participantes de U5 e U4 snRNP foram caracterizadas utilizando técnicas de purificação de complexos e RNA de interferência (AMBRÓSIO et al. 2009).

Face ao exposto, este trabalho tem como objetivo prosseguir na identificação e caracterização de novas proteínas específicas pertencentes ao complexo U5 snRNP, empregando para esta finalidade ferramentas de bioinformática, produção e purificação de proteínas recombinantes, técnicas de

purificação de complexo e análises funcionais através de RNA de interferência. A seguir estão listados os objetivos específicos do projeto:

- 1- Identificação e análise de genes envolvidos no complexo de U5 snRNP, através de ferramentas de bioinformática;
- 2- Clonagem e expressão dos genes para obtenção de proteínas recombinantes e produção de anticorpos policlonais em coelhos;
- 3- Imunoprecipitação do complexo protéico utilizando esses anticorpos;
- 4- Caracterização de proteínas do complexo utilizando a técnica do PTP-tag;
- 5- Caracterização funcional de algumas proteínas do complexo utilizando a técnica de RNA de interferência;
- 6- Imunolocalização das proteínas pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Análises de Bioinformática - *Data mining* das sequências.

No *Data mining* pesquisam-se a semelhança entre os genes de proteínas específicas de *trans-splicing* e aqueles identificados em outros organismos, para designar-se uma provável função a esses genes (SOUZA & SILVA 2002).

As sequências utilizadas para análise neste trabalho foram retiradas do banco de dados do GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), publicadas no artigo de ACHSEL *et al.* 1998. Ferramentas de bioinformática como BLASTn e BLASTp (usando os parâmetros-padrão) foram utilizadas na identificação inicial das sequências de interesse.

A análise de motivos e domínios funcionais foi realizada usando os bancos de dados como o Motif Scan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN/>) e Conserved Domain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml/>).

O alinhamento múltiplo e os cálculos de porcentagem de identidade entre os membros foram feitos utilizando o programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas 2000) e o programa GeneRunner foi empregado para tradução da sequência de nucleotídeos a sequência de aminoácidos, determinação do peso molecular estimado e número de aminoácidos.

3.2) Cultura dos parasitos

3.2.1) *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT pH 7,2 (68,4 mM NaCl (Merck); 5,4 mM KCl (Merck); 56,3 mM Na₂HPO₄ (Merck); 111 mM Dextrose (Mallinckrodt); 0,3% Liver Infusion Broth (Difco); 0,5% Tryptose (Fluka); 25 mg/L Haemin (ICN); 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab) em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 15 dias.

3.2.2) *Trypanosoma brucei*

As formas procíclicas das cepas 427 e 29-13 de *T. brucei* foram cultivadas em meio SDM-79 (BRUN & SCHONENBERGER, 1979) em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 4 dias.

3.2.3) *Leishmania major*

As formas promastigota de *Leishmania major* foram cultivadas em meio LIT, sendo mantidas em estufa a 28°C, realizando-se repiques a cada 7 dias.

3.3-) Manipulação de bactérias

3.3.1-) Preparação de bactérias competentes

Um pré-inóculo de 5 mL contendo bactérias DH5 α , após crescimento overnight, foi transferido para 50 mL de meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄.7H₂O 10mM, esterilizado por filtração) incubando-se a 37°C em estufa sob agitação até que atingisse uma D.O. 600 nm de 0,6. A cultura foi centrifugada por 10 min a 4°C e 2.500g e o sedimento ressuspensão em 16 mL de solução de TB (Pipes pH 7,0 10mM, MnCl₂.4H₂O 55mM, CaCl₂.2H₂O, KCl 250mM, esterilizado por filtração), mantida em gelo por 10 minutos. Novamente, as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 4 °C e 2.500g e o sedimento ressuspensão em 4 mL da solução TB contendo 30 μ L de DMSO, sendo mantidas em gelo durante 10 minutos, em seguida aliquotou-se as bactérias em frações de 200 μ L cada.

O mesmo procedimento foi empregado para preparação de BL21 (DE3) pLysS competentes.

3.3.2-) Reação de transformação

Após misturar no tubo 2 μ L da reação de ligação com 200 μ L bactérias competentes, e incubadas em gelo por 30 min; seguiu-se o choque térmico a 42°C por 2 min, retornando o tubo no gelo por 2 min e à TA por mais 2 min. Adicionou-se 600 μ L de meio SOB (Tryptona 1%, Extrato de

levedura 0,5%, NaCl 8,5mM, KCl₂,5 mM, glicose 10 mM, MgCl₂ 20 mM) incubando-se a 37 °C por 1 hora e 30 min sob agitação (150 rpm), e as bactérias foram então cultivadas em placas de Petri contendo meio LB ágar (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, agar 2%) com 50 µg/ml de kanamicina e incubadas a 37 °C overnight.

3.4-) Manipulação de parasitos

3.4.1) Transfecção em *T. brucei* (cepas 427 e 29-13)

Culturas de 10 ml de formas procíclicas (1×10^6 - 10^7 parasitas/mL) de *T. brucei* cepa 427 (técnica PTP-tag) e 29-13 (técnica RNAi) foram centrifugadas por 7 min/3.000xg/TA. Os sobrenadantes foram descartados e os parasitas lavados com 2 ml de tampão ZPMF 1X (132 mM NaCl; 8 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ (Merck); 1,5 mM KH₂PO₄ (Merck); 1,5 mM MgOAc.4 água (Sigma); 90 µM CaOAc₂ (Sigma), 7 min/ 3.000xg/TA e ressuspensos em 390µl de ZPMF 1X.

Para a tranfecção, os DNAs e parasitas foram colocados em cubeta de eletroporação (Gene Pulser Cuvette - BioRad) e eletroporados em eletroporador com pulso de 1,5 kV, 25 µF, 50 Ohms (Gene Pulser II - BioRad). Após a eletroporação os parasitos foram transferidos para uma garrafa contendo 10 ml de meio SDM-79 e 20µg/ml de geneticina (G418 - Sigma), pois o gene da neomicina fosfotransferaseII é usado como marca de resistência do vetor pC-PTP-neo; ou quando necessário, adicionou-se 1,5µg/mL de fleomicina (Sigma), 15µg/mL de G418 e 50µg/mL de higromicina (Sigma), devido às marcas de resistência do plasmídeo pLEW100 e da cepa 29-13.

Em um tubo plástico, foram misturados 2,5 ml dos parasitos da garrafa anterior, 2,5mL de parasitos 427 ou 29-13 não transfectados, 7,5mL de meio de cultura 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 28°C, para o isolamento de clones transfectados. Após a seleção dos clones, foram

utilizados 40µg/ml de G418 (Sigma) ou 25 µg/mL de fleomicina (Sigma), 15µg/mL de G418 e 50µg/mL de higromicina (Sigma), para garantir a presença somente de parasitas transfectados.

Em relação à técnica de PTP-tag , 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*.

3.4.2) RNA de interferência (RNAi)

Quatro clones positivos obtidos após a transfecção com o plasmídeo pLEW100 recombinado com U5-15K foram induzidos com doxaciclina para realização da técnica de RNAi. Em placas de 24 poços estéreis, culturas de parasitas trasfectados foram diluídas para 2×10^6 células/mL, adicionando-se 10 µg/mL de doxaciclina (Sigma) e incubando-se a 28°C. Nos poços não induzidos acrescentou-se 2 µL de álcool 70%. Após 24 horas, o número de parasitas em cada poço foi avaliado utilizando câmara de Neubauer (Boeco), sendo a cultura novamente diluída para 2×10^6 células/mL com 10 µg/mL de doxaciclina. O experimento teve duração de uma semana, sendo os dados diários plotados em um gráfico para avaliar a curva de crescimento dos parasitos induzidos e não induzidos.

3.5-) Manipulação de DNA

3.5.1) Gel de agarose 1,0%

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1,0% em TAE 1X (tris-acetato 40mM pH 8,5, EDTA 2mM). Á amostra foi adicionado tampão de amostra 5X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,125%; xilenocianol 0,125%, glicerol 30%), e aplicada em gel contendo 0,5 g/mL de brometo de etídeo (Gibco). O gel foi submetido à voltagem de 100 V em tampão TAE 1X. Diferentes concentrações de géis de agarose foram utilizadas, sendo necessário ajuste de massa de agarose.

3.5.2) Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose

Produtos de PCR ou digestão foram separados em gel de agarose 1%, visualizado por coloração de brometo de etídeo e iluminação ultravioleta. Os fragmentos de interesse foi cortado do gel e purificado utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE) de acordo com especificação do fabricante.

3.5.3) Extração de DNA genômico de *T. cruzi* e *T. brucei*

O DNA genômico das formas de cultura de *T. cruzi* e *T. brucei* foi extraído utilizando o reagente DNAzol (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de DNA genômico presente na solução foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1,0%).

3.5.4) Obtenção rápida do DNA genômico de *T. brucei*

Centrifugou-se 1 ml de cultura (fase log) por 1 min/3.000xg/TA. Os parasitas foram lavados com 800µl de tampão *tryps wash* (100mM NaCl; 3mM MgCl₂; 20mM Tris-HCl, pH 7,5), centrifugando por 1 min/3.000xg/TA. O sedimento foi ressuspensão em 250µl tampão TELT (50mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5mM EDTA (Promega), pH 8,0; 2,5M LiCl (Sigma); 4% Triton X-100 - Sigma) e extraído com 250µl de fenol/clorofórmio (Amresco), centrifugando por 2 min/16.000xg/TA. Em seguida foi realizada nova extração com 250µl clorofórmio. O DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol 100% e 0,1 vol NaAc (Amresco) 3M, pH 7,0, centrifugando por 5 min e o sedimento foi lavado com 500µl etanol 70%, centrifugando por 5 min/16.000xg/TA, seco e ressuspensão em 30µl de água deionizada.

3.5.5-) Extração de DNA plasmidial (miniprep)

As bactérias recombinantes foram repicadas em 5 ml de meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) contendo antibióticos adequados e incubadas a 37°C, overnight, sob agitação.

A cultura foi centrifugada removendo-se o sobrenadante; o sedimento foi ressuspense em 100 µL da Solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0, 50 mM de glicose), adicionando-se 200 µL da Solução II (0,2 M de NaOH, 1% de SDS) e misturando por inversão 5X; a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 min. Adicionou-se 150 µL da Solução III (3 M de acetato de potássio, 11,5% de ácido acético glacial), misturando por inversão e incubando-se por 5 min em gelo; os tubos foram centrifugados por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi colocado em novo tubo. As amostras foram precipitadas com 1 mL etanol (Merck) 100% por 10 min a -80 °C, seguido de centrifugação por 10 min a 4°C, 10.000 g; o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugando a 4°C por 5min, seco e ressuspense em 100 µL de tampão de RNase (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 15 mM de cloreto de sódio), contendo 1,5 µL de RNase A 20 mg/mL (Invitrogen), incubando-se a 37°C por 1 hora. Em seguida acrescentou-se 100 µL de fenol/clorofórmio, para extração e posterior precipitação do DNA, que foi ressuspense em 30 µL água destilada, analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com BrEt e visualizado em transiluminador UV.

3.5.6) Reação de ligação para clonagem em vetor de expressão pET28a (Novagen)

Iniciadores específicos foram desenhados, a partir de seqüências obtidas na anotação e no *data mining* do genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org). As seqüências nucleotídicas destes primers contém na extremidade 5' sítios de restrição para enzimas, os quais foram importantes para subclonagem na mesma pauta de leitura (*in frame*) da seqüência que codifica a cauda de poli-Histidina (poli-His) presente no vetor pET28a, de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para clonagem e subclonagem do gene U5-15K de <i>T. cruzi</i>		
Nome do iniciador	Seqüência	Enzima de restrição
U5-15K direto	5' GGAATTCCATATGGCCGAGGTAAAGCTCC 3'	<i>Nde I</i>
U5-15K reverso	5' TTGGATCCTTAATTACCGACGCACCGC 3'	<i>BamH I</i>

Para a ligação do inserto amplificado ao vetor de expressão, os reagentes a seguir foram adicionados no tubo: 1 µL de pET28a(+) digerido com as respectivas enzimas de restrição (~50 ng), 1 µL de inserto digerido com digerido com as respectivas enzimas de restrição (~50 ng), 2 µL Tampão T4 DNA ligase 10X, 5 µL Água deionizada e 1 µL T4 DNA ligase (2 Unidades - USB).

3.5.7) Reação de ligação para clonagem em *pGEM – T Easy Vector System* (Promega)

Os produtos de PCR provenientes das amplificações de diferentes genes de interesse de *T. cruzi* e *T. brucei* foram utilizados para clonagem utilizando no vetor pGEM-T easy conforme especificações do fabricante.

3.5.8) Reação de PCR para clonagem de U5-15K e U5-102K no vetor pC-PTP-NEO

Iniciadores específicos foram desenhados (Tabela 2) para clonagem em fase de leitura do gene U5-15K e U5-102K de *T.brucei* em vetor pC-PTP-NEO, permitindo que esta proteína seja produzida fusionada ao PTP-tag (**P**roteína C – sitio de clivagem para **T**EV protease – **P**roteína A), de acordo com figura 14.

Tabela 2: Primers utilizados na técnica de PTP-tag de U5-15K de <i>T. brucei</i> .		
Nome do primer	Sequência	Enzima de restrição
U5-15K PTP direto	5' <u>CGGCCG</u> ACGGCGTACAGCAGCTGTTG 3'	<i>Eag</i> I
U5-15K PTP inverso	5' <u>GGGCCC</u> ATGACGGAGTTGACACGC 3'	<i>Apa</i> I
U5-15K 5'Out	5-' TATAGGGAAGTTTCCATTGC 3'	-
ProtC- Tap 3	5'TCGCTAGCAGTAGTTGGAATATCATATTTCCCATCAATAAGACGAGG3'	-
U5-102K PTP direto	5' <u>CGGCCG</u> CAATTTGATCATTTCAC3'	<i>Eag</i> I
U5-102K PTP inverso	5' <u>GGGCCC</u> GATGTCATGTTGAATTGC 3'	<i>Apa</i> I
U5-102K 5' out	5' CATATGGTGCTACGCGGC 3'	-

3.5.9) Reação de PCR para clonagem de U5-15K de *T. brucei* em vetor pLEW 100

Iniciadores específicos foram desenhados para posterior clonagem de regiões específicas do gene U5-15K (Tabela 3) de *T. brucei* no vetor pLEW100 (figura 14 - Painei C) para realização da técnica de RNA de interferência (RNAi).

Tabela 3: Iniciadores utilizados para clonagem e subclonagem do gene U5-15K de *T. brucei* no vetor pLEW 100.

Nome do primer	Sequência	Enzima (s) de restrição
U5-15K RNAi direto	5' <u>AAGCTT</u> ACGCGTAGAACTTGTACTTATCCGC 3'	<i>Mlu I</i> e <i>Hind III</i>
U5-15K RNAi inverso	5' <u>TCTAGA</u> ACGGCGTACAGCAGCTGTTGT 3'	<i>Xba I</i>

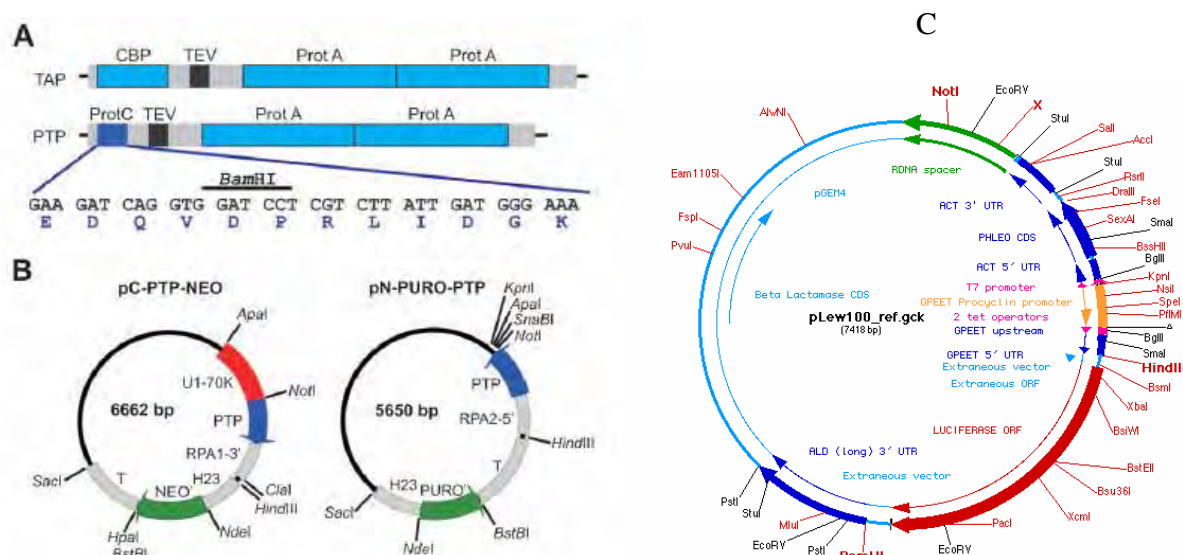


Figura 14: Painei A: Esquema mostrando as diferenças entre os vetores TAP-tag e PTP-tag. Painei B: Mapa dos vetores pC-PTP-NEO e pN-PURO-PTP. U5-15k foi clonado em substituição ao gene U1-70K (pC-PTP-NEO). Figura adaptada de Schimanski *et al.* (2005). Painei C: Vetor pLEW100 (extraído do site http://tryps.rockefeller.edu/crosslab_sequences.html).

3.5.9) Reação de Sequenciamento

Para o sequenciamento dos plasmídeos, os reagentes a seguir foram adicionados no tubo de 0,2 mL: 4 µL DNA (400 ng), 2 µL Tampão 5X, 2 µL iniciadores (*primers*) direto (*forward*) ou reverso (*reverse*) (1,6 pmol/µL) e 2 µL Big Dye Terminator (Applied Biosystems).

Os tubos foram colocados em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguindo-se o ciclo abaixo:

96°C	2 min	40X
96°C	30 seg	
52°C	30 seg	
60°C	4 min	
4°C	Tempo indeterminado	

Após a PCR, adicionou-se aos tubos 80 µl de isopropanol 75% para precipitar o DNA, deixando à temperatura ambiente por 15 min ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas por 15 min. (12.000 g, temperatura ambiente - TA) e o sobrenadante descartado; o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugando por 5 min (12.000 g, TA), seco e ressuspensão em 2 µL de *Loading buffer* (Applied Biosystems). As amostras foram aquecidas a 95°C antes de serem aplicadas em PAGE 5% e a eletroforese foi realizada em sequenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

3.6) Obtenção de extratos protéicos

3.6.1) Extrato Nuclear (EN) de *T. cruzi*

Os extratos nucleares das cepas de *T. cruzi* foram preparados segundo Kovacs et al. (1993). Uma cultura (~15 dias) com $10^7 - 10^8$ formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foi centrifugada por 10 min. (4°C/ 2.500 g), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensão em 10 mL de tampão AGK (10mM de Tris-HCl pH7,9; 1,5mM de MgCl₂ (Sigma); 200mM de KCl (Merck); 10% de glicerol (Mallinckrodt); 1mM de PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride* - Sigma); 1µg/mL de leupeptin (Sigma) e 0,5mM de DTT (USB)) com inibidores e novamente centrifugado por 10 min. (4 °C/ 2.500 g). O sedimento foi novamente lavado com 10 mL de tampão AGK com inibidores e centrifugado por 15 min. (4 °C/ 2.500 g). O sobrenadante foi descartado, adicionando-se 1 ml de tampão AGK com inibidores e transferindo-se os parasitas para novo microtubo contendo pérolas de vidro e mergulhado em nitrogênio líquido por 1 min, descongelando-se, imediatamente, o conteúdo em

banho seco a 37°C, que foi levado ao vórtex durante 4 min. Este passo foi repetido por 3 vezes para rompimento total da membrana dos parasitas, seguindo-se centrifugação por 30 min (4 °C/ 12.000 g). O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 0,5 volume de tampão C (20mM de Tris-HCl pH7,9; 1,5mM de MgCl₂; 25% de glicerol; 0,2mM KCl; 0,2mM de PMSF e 0,5mM de DTT) e 0,5 volume do tampão D (mesma composição do tampão C, alterando a concentração de KCl para 1,2M), deixando-se sob agitação suave a 4°C por 30 min. Após nova centrifugação por 30 min a 4°C/ 12.000 g o sobrenadante (extrato nuclear) foi dializado em tampão E (20mM de Tris-HCl pH7,9; 20% de glicerol; 100mM de KCl; 0,2mM de EDTA; 0,5mM de DTT e 0,2mM de PMSF), sendo uma alíquota analisada em SDS-PAGE.

3.6.2) Preparação do extrato para a purificação das proteínas contendo PTP-tag

Um litro de cultura (fase log - 1×10^7 parasitas/ml) foi centrifugado por 10 min/2.700xg/2°C, o sobrenadante descartado e os parasitas lavados 2 vezes com 40mL de tampão *tryps wash* gelado, ressuspendendo no vórtex e centrifugando por 7 min/2.700xg/2°C; determinou-se o volume do sedimento, que foi lavado com 30mL de tampão de transcrição gelado (150 mM sucrose - Sigma; 20 mM ácido glutâmico - Sigma; 20 mM HEPES-KOH – Sigma, pH 7,7; 3 mM MgCl₂), centrifugando-se por 10 min/3300g/2°C. O sedimento foi ressuspenso no mesmo volume de tampão de transcrição gelado e incubado no gelo por 20-30 min. Pérolas de vidro foram lavadas com etanol 100%, 3 vezes com água deionizada e com tampão de transcrição, mantendo no gelo. Os parasitas foram colocados em contato com as pérolas, adicionando-se 1µl DTT 1M, 1 µl leupeptina (Sigma) 10 mg/ml e 1 µl aprotinina (Sigma) 10 mg/ml para cada ml de solução, e submetendo-se a ciclos de congelamento de nitrogênio líquido por 1 minuto e vórtex por 1 minuto após descongelamento. Esses ciclos foram executados até a quebra de aproximadamente 70% dos parasitas (observado em microscópio ótico comum). O extrato foi aliqotado em frações de 1 ml, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Cada fração foi chamada de Y4.

3.6.3) Extato total para realização de *Western Blotting*

Centifigou-se 1 mL de cultura dos diferentes parasitas na fase logarítmica de crescimento, o sedimento foi ressuspenso em 40 µL de tampão de amostra, ferveu-se por 10 minutos, e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para realização da técnica de *Western Blotting*.

3.7) Análise de Proteínas

3.7.1) Quantificação de Proteínas

Para determinação da concentração protéica de extratos celulares e de proteínas purificadas foi utilizado o reagente de Bradford (Bioagency), de acordo com instruções do fabricante.

3.7.2) Imunoprecipitação utilizando extrato nuclear de *T. cruzi*

A 20µL de soros, pré-imune ou anti-U5-15K, adicionou-se 16,4µL de sulfato de amônio (Reagen) 100%, incubando-se por 1 hora em gelo. Após centrifugação por 10 min (11.000xg a 4°C) o sedimento foi lavado três vezes com 500µL de sulfato de amônio 50% saturado gelado. O pellet foi ressuspenso em 260µL de tampão PA-150 (150mM de KCl; 20mM de Tris-HCl pH 7,7; 3mM MgCl₂; 0,5mM de DTT; 0,1 Tween 20), incubando-se juntamente com 40µL de Proteína A-Agarose (BioRad) por 24 horas a 4°C, sob rotação. O tubo foi centrifugado a 9.000xg por 15 segundos, sendo o sedimento lavado três vezes com 300µL de tampão PA-150, ressuspenso em 400µL do mesmo tampão e adicionado de 100µL de extrato nuclear de *T.cruzi* (protocolo de obtenção descrito no item 3.6.1). Após incubação de 6 horas a 4°C, o sedimento foi lavado cinco vezes com 300µL de PA-150, sendo adicionado ao sedimento 30µL de tampão de amostra e a imunoprecipitação analisada em SDS-PAGE pelo Comassie Brilliant Blue R-250 (Gibco) a 0,010%.

3.7.3) Purificação do PTP-tag: Imunoprecipitação com IgG-sepharose

Alíquota de 1ml de extrato do parasita (Y4), correspondente a $2-4 \times 10^9$ células, foi descongelada e colocada imediatamente em gelo. Adicionou-se 100µl do tampão de extração gelado (1,5 M KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,7; 3 mM $MgCl_2$; 0,5 mM DTT; 1% Tween 20) em tubo previamente colocado em gelo. Cada alíquota do extrato foi adicionada a tubo contendo o tampão de extração, misturando-se rapidamente (invertendo o tubo 3 vezes) e incubando por 20 min em gelo. Enquanto isso, 60µL de IgG-sepharose (Fast Flow, GE) foram equilibradas em 800µL de tampão PA-150, centrifugando-se por 30 segundos a 3.000xg e mantendo-se o tubo em gelo.

O tubo com extrato foi centrifugado por 15 min/21.000xg/2°C e o sobrenadante transferido para outro previamente colocado em gelo, centrifugando-se novamente por 3 min e o sobrenadante adicionado a outro tubo gelado, correspondente ao extrato nuclear de *T. brucei* transfectado. A 20µl desta amostra adicionou-se 25µl tampão de amostra para realização do *Western Blotting* (esta fração foi denominada de *input*). Adicionou-se 100µL de extrato nuclear ao tubo contendo IgG-sepharose previamente equilibrada, juntamente com 300µL de tampão PA-150, mantendo-o sob agitação leve a 4°C por 1 hora. Após centrifugação a 3.000xg por 30 segundos, este sobrenadante foi denominado de fração não ligada, e IgG-sepharose (fração ligada) foi lavada cinco vezes com 800µL de PA-150. Amostra do sobrenadante e das contas foram separadas para realização do *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-proteína A (Sigma).

3.7.4) *Western blotting*

As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bioagency) ou PVDF (GE), utilizando 0,8 mA/cm² por 1 h e 30 min, em tampão de transferência (25 mM Tris base (USB); 192 mM glicina (Amresco); 20% metanol(Synth) gelado, montado como segue: 2 camadas de papel de filtro embebido em tampão, membrana embebida em tampão, gel e novamente 2 camadas de papel. A

membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado por 1 hora TA. A seguir a membrana foi lavada 3X com PBS/Tween-20 (0,1% Tween-20; PBS [1X] q.s.p.) e incubada à 4°C durante 18 h com anticorpo primário (produzido em coelhos) em solução de leite 2%. A membrana foi novamente lavada 3X com PBS/Tween-20 e incubada com proteína A ligada a peroxidase (Pierce) ou anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (KPL), por 1 hora TA. A membrana foi lavada 2X com PBS/ Tween-20 e 1X com Tris 0,05M, pH 7,6. A revelação da reação foi realizada com DAB (diaminobenzidina) 1,0 mg/ml (Sigma) e 1ml/ml de água oxigenada - H₂O₂ (Merck), incubando por 10 min. TA ou utilizando luminol (Sigma) e H₂O₂, incubando por 1 min, sendo possível a observação de bandas após a exposição a filme de auto-radiografia (Thermo).

3.8-) Produção e purificação de proteínas recombinantes

3.8.1) Expressão das proteínas recombinantes em pET28a

Os vetores do sistema pET possuem marcadores seletivos de resistência a antibióticos (kanamicina), uma origem de replicação, um sítio de clonagem múltipla e, diferentes seqüências adjacentes que codificam para uma variedade de peptídeos acessórios que podem ser usados na detecção da proteína alvo.

Os plasmídeos do sistema pET foram desenvolvidos especificamente para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresentam alto grau de eficiência. Genes clonados em plasmídeos do sistema pET estão sob o forte controle dos sinais de transcrição do fago T7. Assim, a expressão da proteína de interesse depende da presença da enzima T7 RNA polimerase (pET System Manual 2001. <http://www.novagen.com>).

Experimentos de expressão do gene em estudo foram feitos na cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Inóculos de cada colônia transformante foram feitos em 5 mL de meio LB com 50 µg/mL de kanamicina. A cultura foi incubada a 37°C, 200 rpm até atingir densidade ótica (D.O.) a 600nm igual a 0,6 e induzida com uma concentração final de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* -

Invitrogen) a 1 mM por 16 a 18 horas. Antes da adição de IPTG foi retirada uma alíquota de 1 mL desse cultivo como controle não induzido. A cultura foi centrifugada a 4.000 g por 20 min, a 4°C e o sedimento ressuspenso em tampão de lise (50mM de Tris-HCl pH8,0; 300mM de NaCl; 10mM de imidazol; 2mM de DTT; 2 mM de PMSF). As amostras foram submetidas a ultrasonicação pulsada (1 min sonicação/30 seg pausa), mantendo-se sempre em gelo para evitar aquecimento, no aparelho 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Após a lise celular, foi realizada nova centrifugação a 4.000 g por 20 minutos separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (sedimento), sendo que o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise descrito anteriormente.

A expressão e solubilidade das proteínas foram observadas através de SDS-PAGE a 15% revelado com 0,010% de Comassie Brilliant Blue R-250 e por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina da proteína recombinante como controle positivo.

3.8.2) Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas foi realizada utilizando o cromatógrafo Äkta FPLC (Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante. A coluna XK16 (Amersham Biosciences) preenchida com 5ml de volume de resina foi lavada com 10 mL de água destilada para retirar o tampão de conservação (etanol 20%). Em seguida, ligou-se o níquel na coluna após passagem de 5 mL (1 volume de coluna) de uma solução de 0,1M de NiSO₄. A coluna foi lavada com de tampão de ligação (20mM de NaH₂PO₄ (Merck), 0,5M de NaCl, 10 mM de imidazol (USB)) até a estabilização da condutância e absorbância, indicando equilíbrio da coluna. Aplicou-se a amostra de proteína e a coluna foi lavada com 25mL (5 volumes de coluna) de tampão de ligação. Para U5-15K recombinante, as proteínas com interação com o níquel foram purificadas em gradiente linear de 20-100 mM de imidazol (20 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl, 100 mM de imidazol). Após a purificação a coluna foi re-equilibrada com tampão de ligação. As frações coletadas de acordo com o cromatograma foram analisadas em gel de SDS-PAGE corado pelo Comassie Brilliant Blue R-250 (Gibco) a 0,010%.

As frações de interesse foram reunidas e submetidas à diálise em membrana com poro de seleção de 12-16.000 Da (Inlab) em 1L de tampão PBS (10mM fosfato pH 7.4, 2,7mM KCl, 140mM NaCl), por uma noite a 4 °C.

3.9) Produção de anticorpos policlonais em coelhos

Para indução da produção de anticorpos foram utilizados coelhos jovens, inoculando-se 200 µg de proteína dializada com adjuvante completo de Freud (Bacto) por via intradérmica. Após 15 e 30 dias da primeira inoculação, novas doses idênticas de proteína foram injetadas com adjuvante incompleto de Freud (Bacto) pela mesma via. Amostra de sangue da orelha do animal foi colhida antes do início das inoculações (soro pré-imune).

3.10) Manipulação de RNA

3.10.1) Análise da ligação aos snRNAs pela reação de extensão de iniciadores (*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, foram obtidas fitas simples de DNA complementar ao RNA que podem ser observadas após eletroforese e autorradiografia.

3.10.1.1) Marcação Radioativa de oligonucleotídeos

A marcação radioativa dos oligonucleotídeos específicos (tabela 4) para cada snRNA foi realizada misturando-se 14,3µl água deionizada; 2µl tampão da T4 PNK 10X (Fermentas); 2µl oligo 100ng/µl; 1,2µl [γ - 32 P] ATP (Perkin Elmer >200 µCi); 0,5µl T4 PNK 10 U/µl (Fermentas). A reação foi incubada por 30 min a 37°C e purificada por gel filtração (ProbeQuant G-50 Micro Columns – Amersham Biosciences). Adicionou-se 150µl de água deionizada para acertar a concentração para 1ng/µl.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na reação de <i>primer extension</i> .	
snRNA de interesse	Seqüência do oligonucleotídeo
U1 snRNA	5'-AGCACGGCGCTTTCGTGATG-3'
U2 snRNA	5'-ACAGGCAACAGTTTGTATCC-3'
U4 snRNA	5'-TACCGGATATAGTATTGCAC-3'
U5 snRNA	5'-CCGCTCGAGGACACCCCAAAGTTT-3'
U6 snRNA	5'-GGGAGAGTGCTAATCTTCTC-3'
SL RNA	5'-CGACCCACCTCCAGATTC-3'

3.10.1.2) Imunoprecipitação com IgG sepharose para obtenção do RNA total

Utilizou-se o mesmo procedimento usado no item 3.7.2: cerca de 60µl de IgG-sepharose (30µL do volume somente de resina) foram equilibrados com 800µl de tampão PA-150 (substituindo KCl por NaCl), centrifugando 3.000xg/30 seg/2vezes. Após a retirada do sobrenadante, a resina foi incubada com 100µl do extrato e 300µl de tampão PA-150 por 1h/4°C/ sob rotação lenta. Após centrifugação a 3.000xg/30 seg, o sobrenadante foi retirado e a resina lavada 5 vezes com 800µl de tampão PA-150, centrifugando a 3.000xg/30 segundos a cada lavagem. O RNA total presente nas preparações foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante.

3.10.1.3) Extensão de iniciadores (*Primer Extension*)

Misturou-se 10µl de RNA (obtido conforme item anterior), 2µl tampão de PCR (Invitrogen), 2µL de MgCl₂ 25mM e 3µl dos oligonucleotídeos (oligos) marcados (volume total). Para cada amostra foi realizada uma reação contendo os oligos de U2, U4, U6 e SL (reação A) e outra contendo os de U1 e U5 (reação B). Os tubos foram incubados por 5 min a 70°C e 5 min em gelo. Foram adicionados 2µl DTT 0,1M; 1µl dNTP (Invitrogen) 10mM e 0,5µl transcriptase reversa (Superscript II – Invitrogen) e a reação foi incubada por 60 min a 42°C. Os produtos da reação foram precipitados com 60µl etanol 100% e 2,5µl NaAc 3M, pH 7,0, centrifugando 16.000xg/10 min/TA, secos e ressuspensos em 10µl de

tampão de amostra contendo formamida (0,025% xylene cyanol, 0,025% azul de bromofenol em formamida deionizada). De cada produto foram aplicados 5µl em PAGE 8% - 7M uréia e analisados no equipamento Typhon Trio-Variable Mode Imager (GE Healthcare).

3.10.2) Reação de RT-PCR utilizando o kit 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends

A reação de RT-PCR foi feita com 5µg de RNA total extraído a partir de parasitas induzidos em diferentes tempos de indução com doxaciclina. O kit 3' RACE (Invitrogen) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante, em duas condições de trabalho, padrão e modificada. Na condição padrão foi empregada a quantificação do mRNA de U5-15K, onde o cDNA foi sintetizado utilizando o iniciador *Adapter Primer* (tabela 5) presente no kit, e a PCR utilizou os oligonucleotídeos U5-15K direto e AUAP (tabela 5), de acordo com o ciclo a seguir:

94°C	2 min e 30seg	21X
94°C	45 seg	
56°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Tempo indeterminado	

Para a condição modificada, utilizou-se 200ng do reagente de *Random Hexamer Primer* (tabela 5 - Fermentas) com intuito de amplificar RNA ainda não processados, em substituição ao *Adapter primer*. O protocolo original também foi alterado em relação aos tempos de incubação, utilizando-se 5 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C, para síntese do cDNA.

Diferentes condições foram empregadas para análise funcional de alterações nas reações de *cis* e *trans-splicing* ao longo dos tempos de indução com doxaciclina. Para avaliação da reação de *cis-splicing* foram utilizados os iniciadores CS1 e CS2 (tabela 5) na reação de PCR, utilizando cDNA obtido com *Random Hexamer Primer*, de acordo com as condições a seguir:

94°C	2 min e 30seg	
94°C	45 seg	35X
53°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Tempo indeterminado	

Para reação de *trans-splicing* foram empregados nas reações de PCR os iniciadores TS1 e TS2 (tabela 5) para formas não processadas, e TS3 e TS4 (tabela 5) para formas processadas de α -tubulina, utilizando cDNA obtido com *Random Hexamer Primer*, de acordo com as condições a seguir:

94°C	2 min e 30seg	
94°C	45 seg	21X
56°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Tempo indeterminado	

Como controle de reação foi amplificado o transcrito de 7 SL RNA, utilizando os iniciadores 7SL1 e 7SL2 (tabela 5), de acordo com AMBRÓSIO *et al.* 2009.

Tabela 5: Iniciadores utilizadas nas reações de RT-PCR	
<i>Adapter Primer</i>	5' – GGC CAC GCG TCG ACT ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT T – 3'
U5-15K direto	5' GGAATTCATATGGCCGAGGTAAAGCTCC 3'
AUAP	5' – GGC CAC GCG ACT AGT AC –3'
<i>Random Hexamer Primer</i>	5' – NNNNNN – 3'
CS1	5' - GTG CAG CGG CAC TCC CAA AAC – 3'
CS2	5' - CGT TAA AAC AGA TGG ACA AAT C – 3'
TS1	5' - GTA AGT GGT GGT GGC GTA AG – 3'
TS2	5' – GGC TAT CTG CAT CCA CAT TG – 3'
TS3	5' – GCC TAC CAC GAG CAA CTC TC – 3'
TS4	5' GTA CTA TAT TGA TGC GTG ACG C – 3'
7SL1	5' – TTG CTC TGT AAC CTT C – 3'
7SL2	5' – TCT ACA GTG GCG ACC TCA AC – 3'

O diagrama a seguir demonstra esquematicamente os locais de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de cis e trans-splcing (figura 15).

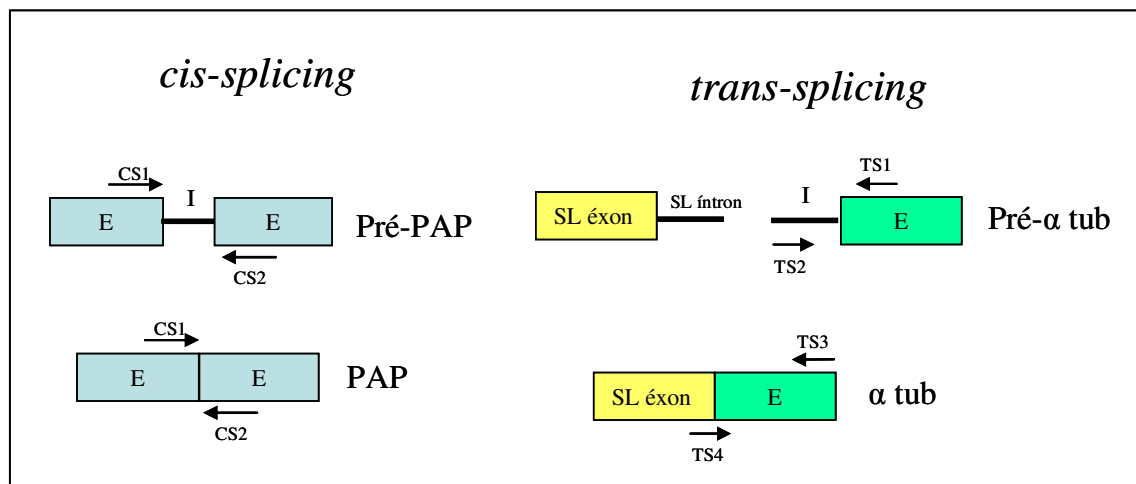


Figura 15: Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e *trans-splicing*. CS1 e CS2 ligam-se ao éxon do transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pré-PAP) e processado (PAP); TS1 e TS2 anelam-se no éxon e íntron, ainda não processados do transcrito de α -tubulina (Pré- α -tub). Para avaliação do processamento do de α -tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). E, éxon; I, íntron.

3.11) Imunolocalização de U5-15K e U5-102K fusionadas ao PTP-tag

Centrifigou-se 2×10^6 parasitas PTP-tag positivos (fase log) a 600g/10 min, sendo o sedimento lavado 2 vezes com 1ml de PBS 1X, pH 7,4 (Sigma – tabletes) gelado e em seguida os parasitas foram ressuspensos em 100 μ l de PBS 1X gelado. Lamínulas de 12 mm de diâmetro foram colocadas em cada poço de uma placa de 24 poços, pipetando-se 25 μ l da suspensão de parasitas sobre cada lamínula, incubando por 15 min/TA para a adesão. Em seguida, adicionou-se 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 1ml de PBS 1X gelado, foi adicionado 1ml de solução Triton X-100 0,1% em PBS 1X gelado, incubando-se por 10 min/TA. Após 4 lavagens com 1ml de PBS 1X gelado (5 min cada lavagem), as lamínulas foram incubadas por 1h/TA com 200 μ l de solução de bloqueio (1% *fish gelatin* (Sigma); 0,02% NaN_3 (Sigma); PBS 1X/ 0,05% Tween 20 q.s.p.), seguido de incubação, pelo mesmo período,

com 200µl do anticorpo primário anti-proteína A de coelho (Sigma, P3775, diluição 1:40.000) diluído em solução de bloqueio. Após 6 lavagens com 1ml de PBS 1X/Tween 20 0,05% gelado (5 min cada), adicionou-se 200µl de solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário Alexa 594 (Invitrogen, A11072, diluído 1:400) e DAPI 1mg/ml (Sigma - diluído 1:200), incubando por 1h/TA. As lamínulas foram então lavadas 6 vezes com 1ml de PBS 1X/Tween 20 0,05% gelado (5 min cada) e montada em lâmina de vidro com glicerina tamponada.

4) RESULTADOS

4.1) Anotação e *data mining* do genoma do *T. cruzi*

A recente anotação do genoma do *T. cruzi* revelou seqüências putativas identificadas como proteínas específicas de snRNPs (El-Sayed *et al.* 2005). Duas proteínas específicas de U5 snRNP foram anotadas com pesos de 18,3 e 17,5 kDa, respectivamente (7579.t00014 - *Spliceosomal U5 snRNP-specific protein, putative* e 4773.t00009 - *Spliceosomal U5 snRNP-specific protein, putative* – Tabela 6), embora análises posteriores revelaram tratar-se da mesma proteína, sendo que aquela com menor peso molecular tem uma sequência parcial.

O *Data mining* é conhecido por mineração ou prospecção de dados, onde os genes expressos revelados por um projeto genoma, podem ser comparados a outros presentes em genomas recém concluídos, podendo ser comparados além das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos, domínios e motivos conservados, compartimentos sub-celular, entre outras características (SOUZA; SILVA, 2002).

Em células HeLa, além das proteínas Sm, foram identificadas 9 proteínas específicas, com massas moleculares de 15, 40, 52, 100, 102, 110, 116, 200 e 220 kDa (ACHSEL *et al.* 1998). Análises de *data mining* realizadas no nosso laboratório, utilizando como molde as seqüências acima mencionadas, identificaram mais três seqüências de proteínas específicas de U5 snRNP de HeLa, além da proteína 220K já descrita anteriormente em *T. brucei* (CROSS *et al.* 1993).

As seguintes proteínas humanas apresentaram identidade com genes encontrados em *T. cruzi*: U5 snRNP-associated 102 kDa protein; U5 snRNP-specific protein 116 kDa WD-repeat protein 57 (Prp8-binding protein - U5 snRNP-specific 40 kDa protein), sendo possível nesta última identificar também a presença do domínio repetitivo conservado WD-40, descrito no respectivo membro de HeLa (ACHSEL *et al.* 1998). Este dados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Sequências identificadas na anotação e <i>data mining</i> do genoma de <i>T.cruzi</i>				
Proteína identificada	Peso molecular em kDa estimado	Número de aminoácidos	Ponto isoelétrico (pI) estimado	Porcentagem de identidade com a sequência molde
Data mining				
U5 snRNP-associated 102 kDa protein	109.892	994	6,82	14
U5 snRNP-specific protein, 116 kDa) (U5-116 kDa) (Elongation factor Tu GTP binding domain protein 2	104.606	960	5,15	29
WD-repeat protein 57 (Prp8-binding protein) (hPRP8BP) (U5 snRNP- specific 40 kDa protein)	34.345	323	6,23	22
Anotação				
Spliceosomal U5 snRNP-specific protein	18.062	162	6.96	58

4.2) Análises de sequência do gene de *U5 snRNP-specific 40 kDa protein*

Dados recentes obtidos por AMBRÓSIO e colaboradores (2009) descreveram a proteína acima citada como sendo específica do complexo U5 snRNP (U5-40K), devido ao seu grau de ligação com o U5 snRNA. A ORF de U5-40K de *T. cruzi* apresenta 973 nucleotídeos, 982 em *T. brucei* e 1.344 em *L. major*, apresentando 62% de identidade entre *T. brucei* e *T. cruzi*, e 36% entre *T. brucei* e *L. major*. Programas de predição de domínios identificaram o domínio conservado *WD REPEATS REGION* Trp-Asp (WD) entre as posições 24-111 e 200-241 em *T. brucei*, 86-108 e 197-230 em *T. cruzi* e 141-177 e 147-229 em *L. major* (Figura 16).

O alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos de U5-40K demonstra que o domínio WD-repeat apresenta vários aminoácidos conservados e que provavelmente a anotação do genoma de *L. major* não tenha identificado corretamente a metionina inicial desta proteína, embora esta hipótese ainda não tenha sido comprovada experimentalmente (Figura 16, quadrado em vermelho).

Os domínios repetitivos WD são em geral curtos, com cerca de 40 aminoácidos, que frequentemente terminam com o dipeptídeo triptofano – ácido aspártico (WD). Geralmente proteínas que contêm este domínio possuem entre 4 a 16 subunidades WD repetitivas, formando uma estrutura

beta circularizada presente em diversas proteínas eucarióticas envolvidas em diferentes processos celulares. Dentre as funções destas proteínas destacam-se a transdução de sinais e regulação da transcrição, ciclo celular e apoptose. Uma função comum das proteínas WD é coordenar a associação de complexos multiprotéicos, uma vez que as unidades repetitivas são capazes de formar uma estrutura rígida que permite a interação de diferentes proteínas. Exemplos desta classe de proteínas são o fator de transcrição TAF II e ubiquitina ligase E3 (LI & ROBERTS 2001).

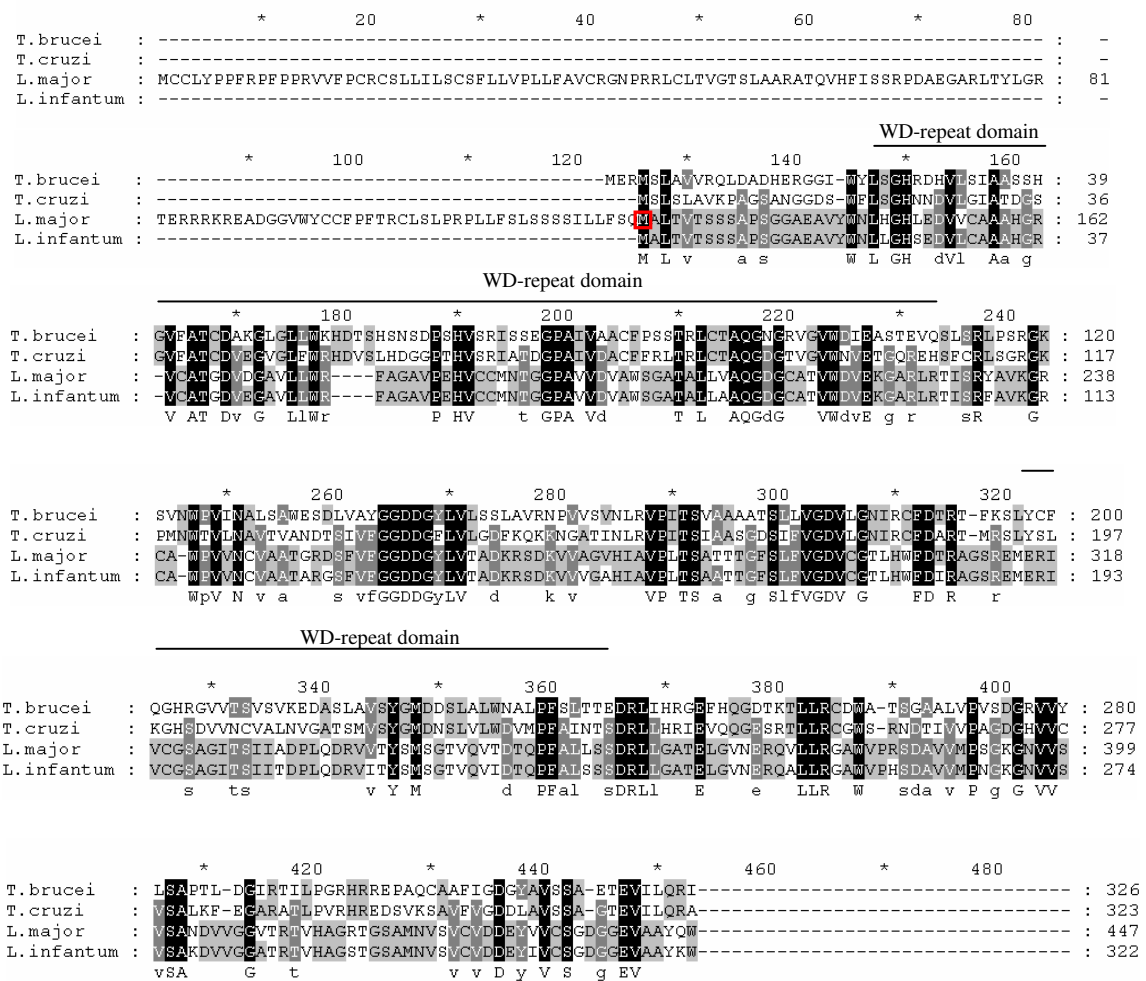


Figura 16: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de U5-40K em tripanosomatídeos. Em preto, estão representados todos os aminoácidos idênticos alinhados; em cinza escuro, somente quando um aminoácido não está alinhado; e em cinza claro quando dois aminoácidos não estão alinhados. *T. brucei* (Tb11.01.2940), *T. cruzi* CL Brener (Tc00.1047053508831.70), *L. major* (LmjF28.2960) e *L. infantum* (XP_001470343); o quadrado em vermelho indica a provável metionina inicial de U5-40K de *L. major*.

4.3) Análises de sequência do gene de *U5 snRNP-specific protein 116 kDa*

A ORF de *U5 snRNP-specific protein 116 kDa* (U5-116K) mostra-se altamente conservada desde tripanosomatídeos até o homem, apresentando em 2.883 nucleotídeos em *T. cruzi*, 2.925 em *T. brucei*; e 3.048 em *L. major* e *L. infantum*. A identidade em relação às sequências de aminoácidos varia de 68% em *T. cruzi* e *T. brucei*, até 47% entre *T. cruzi* e *L. major*. Análises das sequências de U5-116k em tripanosomatídeos demonstram que esta proteína possui domínios relacionados àqueles encontrados no fator de elongação (EF-2), exceto pela presença de um domínio N-terminal ácido de 134 resíduos, rico em aminoácidos ácidos, ácidos aspártico e glutâmico, que representam 25,72% e 5,19%, respectivamente, do tamanho do domínio em questão (Figura 17).

O domínio conservado EF-G foi identificado em U5-116K de tripanosomatídeos (Figura 17), e sua função está relacionada à ligação e clivagem de GTP, e normalmente encontrado em proteína envolvidas de elongação, como por exemplo, EF-2. Este domínio apresenta cinco motivos bem caracterizados (G1 a G5), que se mostram conservados entre U5-116K de diferentes tripanosomatídeos (Figura 17). Também foi possível observar a presença do domínio EF-G C-terminal (EFG_C), que está descrito como sendo pertencente à proteína EF-2 e em alguns casos pode estar envolvido na resistência a tetraciclina (FABRIZIO *et al.* 1997).

Domínio N-term

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
EF2_T.brucei : ----- : -
EF2_L.major : ----- : -
EF2_T.cruzi : ----- : -
U5-116K_T.brucei : HNFQYDEGNRPVSDQSGCGDSTREYDGTHEVRSSTDDNDNDSSGASGSGTESNRGSDGSDSVHEHRRHDDTTSGSSGDFGDDVELVIGEVANQSI : 99
U5-116K_L.major : MDPFGYDEYGNRTSASN---GDGRGGE-EGRSEWRSVQE-----SRGSSKSRSRSAEEDA-----HGRPLDPSDGSHSDFDDELVELVIGEEGTQAL : 82
U5-116K_T.cruzi : MDPFGYDEQGNRLNHD----DSSSNYDSDREVASVSDDDAWKRAGG-GSGDDDDDDDDSSLRQRHGRSNGGGTSGSSSAFSDDELVIIEAGNQITI : 93

```

Domínio N-term

EF-G

```

      0      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200
EF2_T.brucei : ----- : 43
EF2_L.major : ----- : 43
EF2_T.cruzi : ----- : 43
U5-116K_T.brucei : DEPLVAGRDVASSTMKNRNRDAAGGKFLLEDRLVHP-----LLIGEVVSKEP-----STRFDLDRGVSRQRIVAAGSLHHGKTSLLSLLEGG- : 184
U5-116K_L.major : HEPLVDQSELQSHGRRAVGWSNEAQFLLENRYAGREGTASSQLVLLDGDHHRHQRPHSASASQNYLDVSLDPRMRNVVAGSLHHGKTSLLSLLEH- : 180
U5-116K_T.cruzi : AEPLVDEKDVVSFYF---RADGARGKFLFEDRRAP-----LLIQDTHAAPS-----SEREFLLDLCGIESRQRIVAAGSLHHGKTSLLSLLEGG- : 175

```

EF-G

```

      00      *      220      *      240      *      260      *      280      *      300
EF2_T.brucei : GIIKMEDAGDRINDTRADBIARGITIKSTAIKSMHYHVPP---IISDLPDDRDFINLIDSPGHDSSEVTALIRVTDGAVVVDVGVGVQVTEVLR : 142
EF2_L.major : GIIKMEAGDRINDTRADBIARGITIKSTAIKSMHYHVPP---IISDLPDDRDFINLIDSPGHDSSEVTALIRVTDGAVVVDVGVGVQVTEVLR : 142
EF2_T.cruzi : GIIKMEDAGDRINDTRADBIARGITIKSTAIKSMHYHVPP---IISDLPDDRDFINLIDSPGHDSSEVTALIRVTDGAVVVDVGVGVQVTEVLR : 142
U5-116K_T.brucei : -----RAYRCQDEVERGCSVSKSVV---DVVAGAHYEQTSHMTFVDTGPHEDAAETAALRLADAVFCVDAABSLTSGNARLLR : 265
U5-116K_L.major : -----RSYHRQDEVDREMLTSHVLT-----IITGGAELQPTSQITVDTGPHEDLICETASGRHLADAVFCVDAABSLDHSERLLR : 261
U5-116K_T.cruzi : -----RAYRCQDEVERGCSVSKSVV---DVVGAHYQAASHVVSFQDTGPHEDAAETAALRLADAVFCVDAABSLTSGNARLLR : 256

```

GTP_EFT

```

      300      *      320      *      340      *      360      *      380      *      400
EF2_T.brucei : QALTERIRPVVF-INKVDRAILELQDPDEEAYQGFVKTLQNVVVVATYNDPVMGDVQVYPERGCTVAIGSGLOQWAFSVTRFAKMYAAKF-GVDESKMC : 239
EF2_L.major : QALTERIRPVVF-INKVDRAILELQDPDEEAYQGFVKTLQNVVVVATYNDPVMGDVQVYPERGCTVAIGSGLOQWAFSVTRFAKMYAAKF-GVDELKMR : 239
EF2_T.cruzi : QALTERIRPVVF-INKVDRAILELQDPDEEAYQGFVKTLQNVVVVATYNDPVMGDVQVYPERGCTVAIGSGLOQWAFSVTRFAKMYAAKF-GVDEAKMC : 239
U5-116K_T.brucei : QVVLQEGRIQLVITRIDRLMDIKLPPLDAYRKLRMVVDVAVNNEISSFGS-GCSPFLVSPNLCTVCHASSNICGFFITETPAKYSSKYPVDAIALS : 363
U5-116K_L.major : HAVNEQLRIQLVITRIDRLMDIKLPPLDAYRKLRMVVDVAVNNEISSFGS-GCSPFLVSPNLCTVCHASSNICGFFITETPAKYSSKYPVDAIALS : 359
U5-116K_T.cruzi : QTVLQENLQVHLVITRIDRLMDIKLPPLDAYRKLRTVVDVAVNNEISSFGS----PFLSPQNGTVCCHASSRLGFCFTTETPAKYSSREYPSVDVALS : 351

```

```

      400      *      420      *      440      *      460      *      480      *      500
EF2_T.brucei : ERLUGDNFQDAKNRKWKIKSETNAAGEVVRAPFCQCLDPIQVFDVAVNNEKDKDKMLKSNINITTEPERQVKKLLKSIIMMRFL--FAAETLLQMI : 336
EF2_L.major : ERLUGDNFQDAKNRKWKIKSETNAAGEVVRAPFCQCLDPIQVFDVAVNNEKDKDKMLKSNINITTEPERQVKKLLKSIIMMRFL--FAAETLLQMI : 336
EF2_T.cruzi : ERLUGDNFQDAKNRKWKIKSETNAAGEVVRAPFCQCLDPIQVFDVAVNNEKDKDKMLKSNINITTEPERQVKKLLKSIIMMRFL--FAAETLLQMI : 336
U5-116K_T.brucei : QQLUGQVTTE---EGRFVRIITNF---QOKPSFVTLVLEPLKVVVAHSLTGSGSQ-----LSNKNPLPRG--PISAVREAVQLFCGDEALEGI-DAL : 447
U5-116K_L.major : TKLUGQVTTE---EGRFVRIITNF---QOKPSFVTLVLEPLKVVVAHSLTGSGSQ-----LSNKNPLPRG--PISAVREAVQLFCGDEALEGI-DAL : 443
U5-116K_T.cruzi : QQLUGQVATE---EGQVVKIKNF---TQSPATVTLVLEPLKVVVAHSLTGSGHE-----SSRLPHHPD--PAAAREAVQLFCGDEALEGI-DAL : 435

```

```

      500      *      520      *      540      *      560      *      580      *      600
EF2_T.brucei : VAHPSPKKAQSY-RAEMLYSGESNPDEKYYMGKKNCDPNAP-----LMLYSKMNVTADRGR-FAPFGIFSGKVRSGQK----- : 410
EF2_L.major : VAHPSPKKAQSY-RAEMLYSGESNPDEKYYMGKKNCDPAAP-----LMLYSKMNVTADRGR-FAPFGIFSGKVRSGQK----- : 410
EF2_T.cruzi : VAHPSPKKAQSY-RAEMLYSGESNPDEKYYMGKKNCDPEAP-----LMLYSKMNVTADRGR-FAPFGIFSGKVRSGQK----- : 410
U5-116K_T.brucei : LNVLPATDKRSALVKTYRLN--VEEDSAAA-----LAPIIRSQNNPEENAVVVLHGVLK--RG----- : 505
U5-116K_L.major : LSVLPAPPARSRLSEKYGTALCSMRDAAAAAEGEGGAATARADDLVIAVASLQVFEAKDTLAADVVTYGTGLRVNSRSKSGAWSSSCNGGQS : 542
U5-116K_T.cruzi : LNVLPKADVRLNRLRLRYGLT--CETQNSVLA-----LAPLLRSQNNPEENAVVVLHGVLK--RS----- : 493

```

```

      600      *      620      *      640      *      660      *      680      *      700
EF2_T.brucei : -----VRIMGNNYIHGKKQDLIEDKPKVQRVVL--MMERYQEAEDMPCGNVVLGVVDKYIVKSAITITDDGESPHPLR : 481
EF2_L.major : -----VRIMGNNYIHGKKQDLIEDKPKVQRVVL--MMERYQEAEDMPCGNVVLGVVDKYIVKSAITITDDGESPHPLR : 481
EF2_T.cruzi : -----VRIMGNNYIHGKKQDLIEDKPKVQRVVL--MMERYQEAEDMPCGNVVLGVVDKYIVKSAITITDDGESPHPLR : 481
U5-116K_T.brucei : -VKVVVDEHSSDAEPFYTFVKELLKML-DGFI---DVDCAYAGOVVLVGFDTTRASHLVNMGVGAATSLNWEENTIDSARESG--ASWLDDEVRL : 598
U5-116K_L.major : RLRLIADEFSSDADPYVEVEVQGLYLTVEDGFI---PVQRATAGOTVYAGCLPARSGSHVVLVGGAAAAAALAEDEGAPPEACGITSEWVVVIRVR : 639
U5-116K_T.cruzi : -MKLVVDEHSSDAEPFYTFVKELLKML-NGLI---EVDAAHAGOVVLFVGFTRPSHVLVGGAIADPLLHEDD-AVDVGETAS--GDWLDDEVRY : 585

```

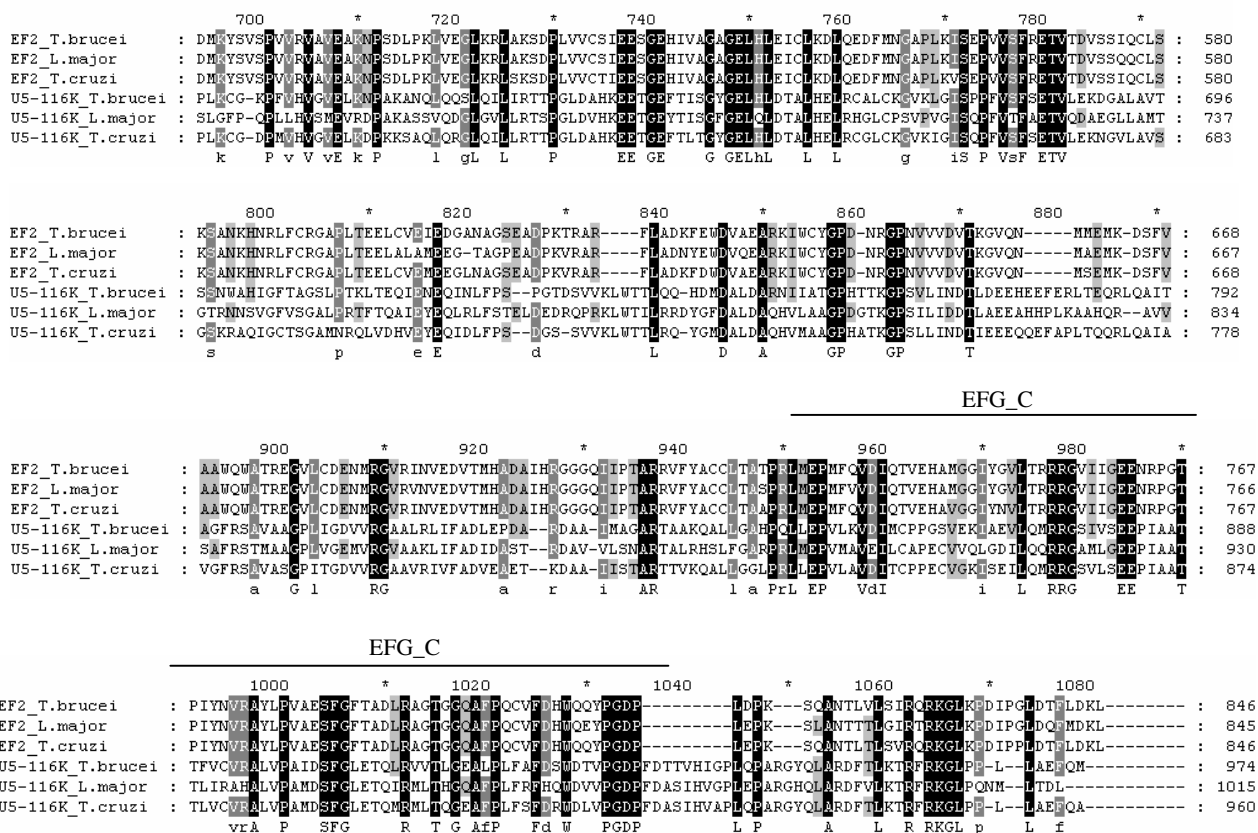


Figura 17: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de U5-116K de tripanosomatídeos. Em preto estão representados todos os aminoácidos idênticos alinhados; em cinza escuro, somente quando um aminoácido não está alinhado; e em cinza claro quando dois aminoácidos não estão alinhados. *T. brucei* (Tb11.01.7080), *T. cruzi* CL Brener (Tc00.1047053509267.50), *L. major* (LmjF32.2200) e *L. infantum* (LinJ32_V3.2350).

4.4) Análises de sequência do gene de *Spliceosomal U5 snRNP-specific protein*

A ORF de *Spliceosomal U5 snRNP-specific protein* (U5-15K) de *T. cruzi* possui 498 nucleotídeos e se apresenta altamente conservada entre os tripanosomatídeos analisados. Por tratar-se do gene com maior grau de similaridades com uma proteína específica de U5 snRNP, U5-15K foi a proteína escolhida para realização dos experimentos de imunoprecipitação, com intuito de obter-se as demais proteínas participantes de U5 snRNP.

Como a cepa de *T. cruzi* utilizada nos experimentos de clonagem do gene de U5-15K foi a cepa Y, as pequenas diferenças encontradas quando das comparações de sequências são devidas ao fato de que no projeto genoma do *T. cruzi* foi usada a cepa CL Brener (Figura 18). A conservação entre outros tripanosomatídeos varia de 42 a 72% de identidade em relação à sequência de nucleotídeos (Figura 18 e Tabela 7) e de 36 a 76% em relação à sequência de aminoácidos, como demonstrado na Figura 19 e Tabela 7. Observou-se que *T. cruzi* possui maior identidade com *T. vivax* (nucleotídeos, 72% e aminoácidos, 76%); em relação ao *T. congolense* apresenta identidade de 69% na sequência de nucleotídeos e 70% na de aminoácidos e, com *T. brucei*, 67% para nucleotídeos e 72% para aminoácidos. Inesperadamente U5-15K de *L. major* apresenta uma ORF maior, com 655 nucleotídeos, ocasionando uma identidade de apenas 42% em relação à sequência de nucleotídeos e de 36% para sequência de aminoácidos.

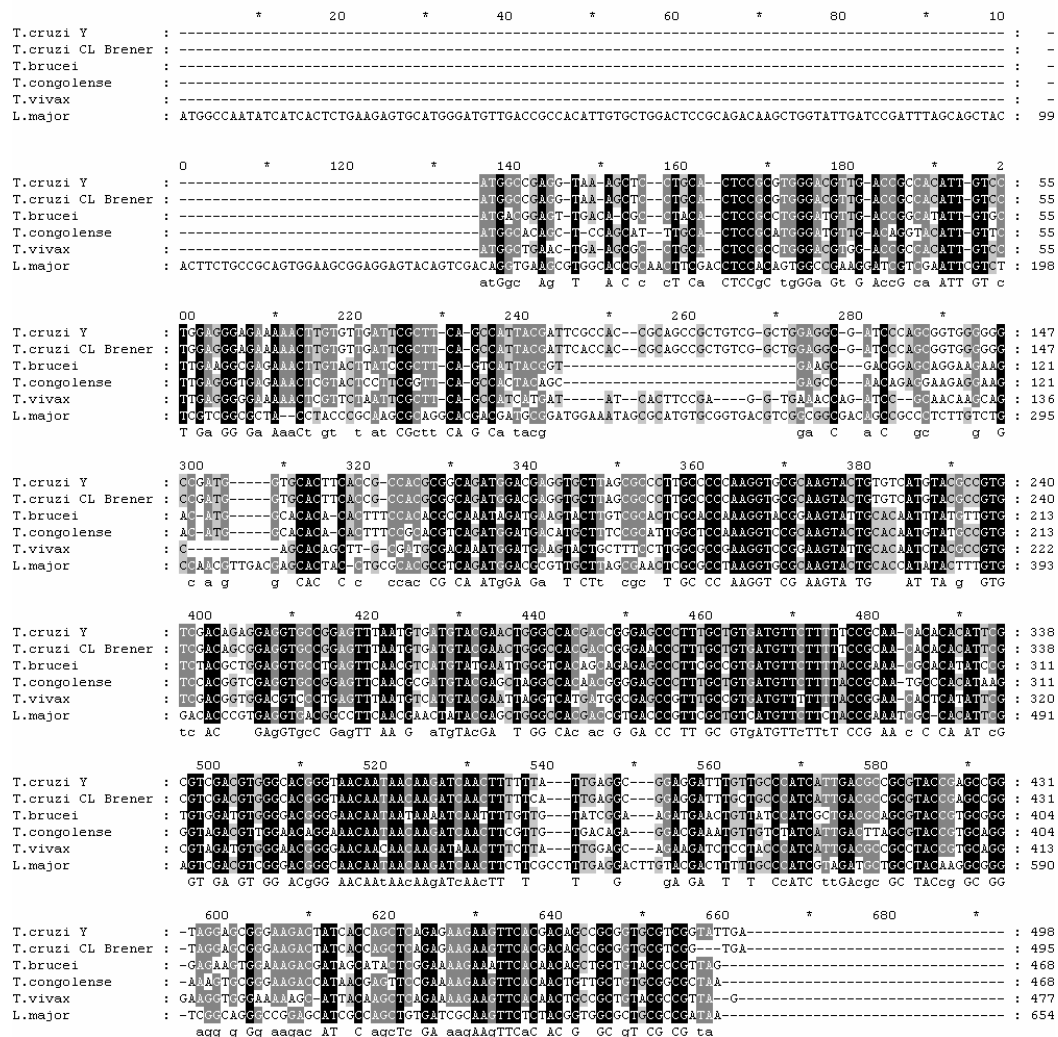


Figura 18: Alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de U5-15K de tripanosomatídeos. Em preto, estão representados todos os nucleotídeos idênticos alinhados; em cinza escuro, somente quando um nucleotídeo não está alinhado; e em cinza claro quando dois nucleotídeos não estão alinhados. *T. cruzi* Y, sequenciado neste trabalho; *T. cruzi* CL Brener (XM_809155), *T. brucei* (XM_841996.1), *T. congolense* (congo1030g10.p1k_10), *T. vivax* (Tviv1269f08.q1k_2) e *L. major* (LmjF23.0650). As sequências do gene de U5-15K dos três últimos organismos foram obtidas em www.genedb.org.

Tabela 7: Porcentagem de identidade entre membros de U5-15K de tripanosomatídeos. Células cinza escuro representam identidade absoluta entre as seqüências de aminoácidos; células cinza claro, identidade entre seqüência de aminoácidos conservativos (resíduos com características físico-químicas semelhantes) e células não sombreadas, identidade entre seqüências de nucleotídeos.

	<i>T. cruzi</i> Y	<i>T. cruzi</i> CL Brener	<i>T. brucei</i>	<i>T. congolense</i>	<i>T. vivax</i>	<i>L. major</i>
<i>T. cruzi</i> Y	-	98	72	70	76	36
		98	78	80	83	45
<i>T. cruzi</i> CL Brener	98	-	73	70	77	36
			78	80	84	45
<i>T. brucei</i>	67	66	-	81	72	36
				89	81	43
<i>T. congolense</i>	69	68	74	-	70	35
					83	43
<i>T. vivax</i>	72	71	69	66	-	35
						43
<i>L. major</i>	49	49	43	43	41	-

A partícula de U5 snRNP contém várias proteínas envolvidas em atividades catalíticas mediando diversos rearranjos conformacionais no *spliceossomo*. O isolamento, caracterização e resolução da estrutura da proteína humana U5-15K revelou alto grau de conservação e a presença de um dobramento semelhante ao observado em tioredoxinas. Entretanto, U5-15K apresenta atividade dissulfeto isomerase estritamente necessária para a ocorrência do *splicing in vivo* (REUTER *et al.* 1999).

4.5) Clonagem, purificação e sequenciamento de U5-15K

Para obtenção do produto de PCR utilizado na clonagem utilizou-se DNA genômico de *T. cruzi* recém extraído. Após a padronização da reação (Figura 20 - A), o produto foi purificado, para retirada de bases não incorporadas e iniciadores e, quantificado (Figura 20 - B). Em seguida, procedeu-se com a reação de ligação no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) e a observação dos clones positivos foi feita através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores M13 universais, como demonstrado na

Figura 20 - C. Após sequenciamento dos clones positivos, os mesmos foram utilizados para sub-clonagem de U5-15K em vetor de expressão.

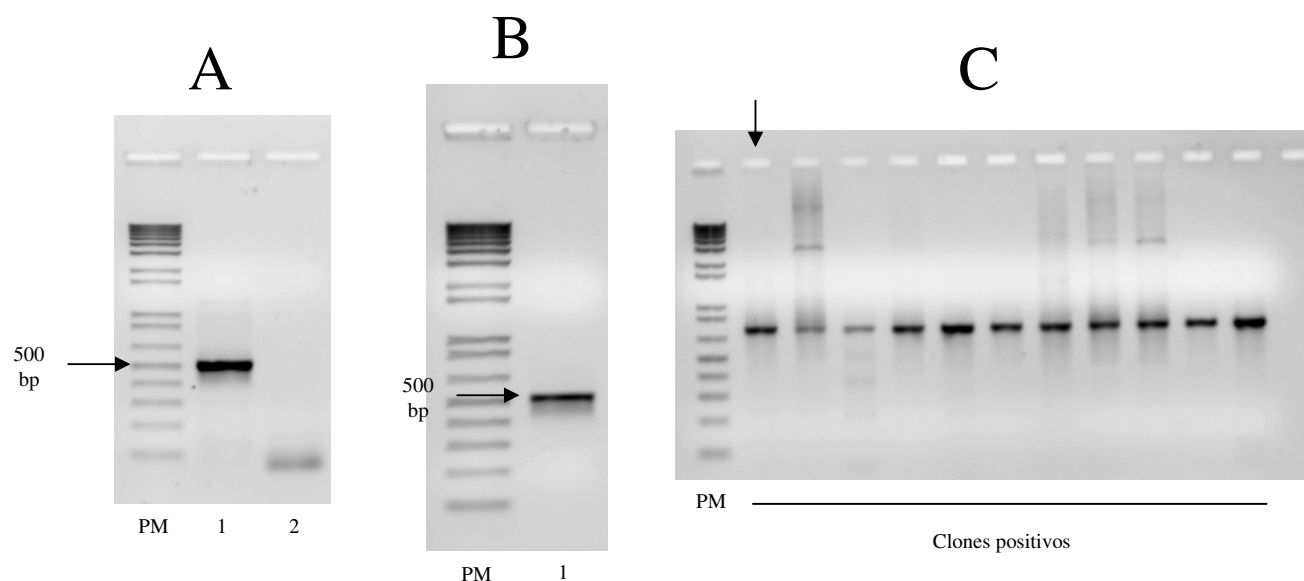


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio. Painei A: Produtos de PCR amplificados com iniciadores U5-15K específicos. PM, Peso Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen); 2, U5-15K; 3, controle negativo. Painei B: Produto de PCR purificado. PM, Peso Molecular 1 kb *plus*; 2, produto de U5-15K purificado. Painei C: PM, Peso molecular 1 kb *plus*; clones positivos, produtos de PCR obtidos após a clonagem em pGEM-T. A seta indica o clone escolhido para experimentos futuros

4.6) Sub-clonagem de U5-15K em vetor de expressão pET28a

O clone 1, apresentado na figura 20, obtido na clonagem em pGEM-T foi digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I, cujos sítios de clivagem foram inseridos nos iniciadores específicos. O produto da digestão foi purificado e ligado ao vetor pET28a previamente digerido com as enzimas citadas e o DNA plasmidial extraído das colônias novamente digerido com as enzimas de restrição confirmando os clones positivos. Os clones que liberaram o fragmento em torno de 500 bp foram considerados positivos, prosseguindo-se com os experimentos de expressão.

4.7) Expressão da proteína recombinante U5-15K em vetor pET28a(+)

Os clones foram transformados em BL21 (DE3) pLys competentes e as colônias selecionadas foram processados para confirmação da expressão da proteína de interesse, e os dados estão apresentados na Figura 21-A. A. Mesmo após a sonicação para verificar a solubilidade da proteína, a banda de interesse não ficou evidente (Figura 21 – B). Na tentativa de isolar a proteína recombinante, a fração solúvel foi purificada em coluna de afinidade com níquel com capacidade de ligar a cauda de histidina (dados não mostrados). Como diversas bandas em torno de 21kDa foram observadas, foi necessário adquirir o anticorpo monoclonal anti-His, que detecta a cauda de histidina na proteína recombinante, para realização de um *Western Blotting* capaz de indicar a presença da proteína de interesse (Figura 21 - C). Neste experimento foi possível observar que U5-15K estava presente na fração solúvel e insolúvel, sendo utilizada a fração solúvel para purificação da proteína.

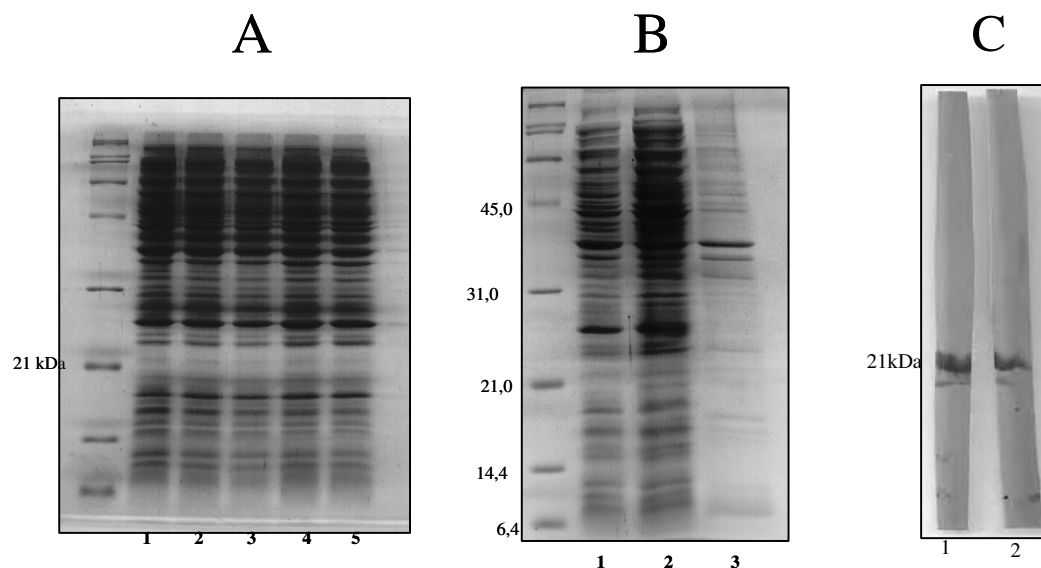


Figura 21: Eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Brilhante R-250. Painel A: Teste de expressão de U5-15K recombinante. 1, amostra não induzida (sem IPTG); 2, indução por 2 horas com 0,1 mM de IPTG; 3, indução por 2 horas com 1 mM IPTG, 4, indução por 16 horas com 0,1 mM IPTG, 5, 1 mM IPTG. Painel B: Teste de solubilidade da proteína U5-15K recombinante. 1, Amostra não induzida. 2, Fração solúvel; 3, Fração insolúvel. Painel C: *Western blotting* da fração insolúvel (1) e solúvel (2) utilizando anticorpo monoclonal anti-His.

4.8) Purificação da proteína recombinante U5-15K por cromatografia de afinidade e produção de anticorpos policlonais anti U5-15K em coelhos.

A proteína U5-15K recombinante foi induzida em grande volume de meio de cultura (3.000 mL), as bactérias tiveram suas membranas lisadas por ultra-som e a fração solúvel obtida foi submetida a ensaios de purificação por cromatografia de afinidade, utilizando coluna com sulfato de níquel (Figura 22 - Painel A). A proteína purificada foi quantificada e inoculada em coelho; após a segunda injeção de proteína, sangue da orelha do animal foi retirado e o soro obtido foi testado para observar a produção de anticorpo policlonal anti-U5-15K. Observou-se que o soro coletado apresentou reatividade até o título de 1:500, como demonstrado na Figura 22 – Painel B.

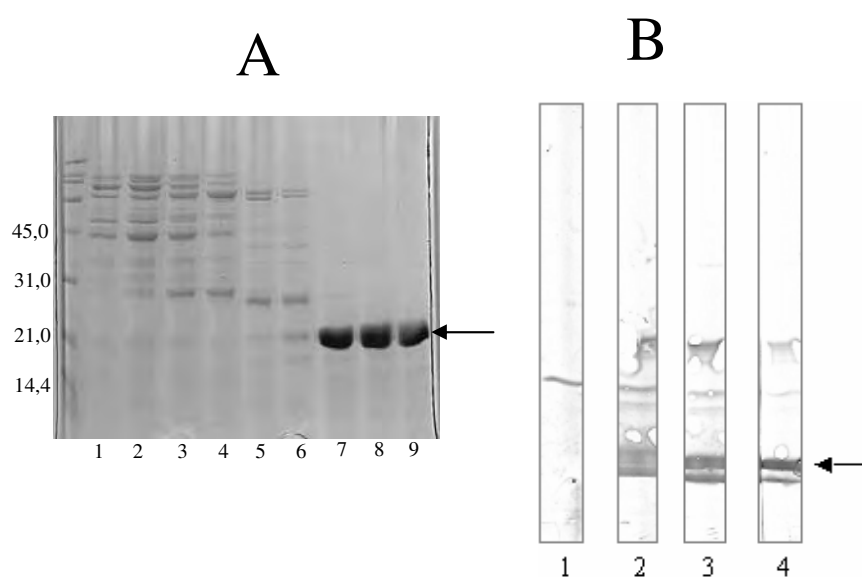


Figura 22: Painel A: Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 demonstrando a purificação de U5-15K recombinante, a partir da fração solúvel. 1, Peso molecular em kDa; 2-9, Frações eluídas em gradiente linear de 20-100mM de imidazol. A seta indica a proteína U5-15K recombinante purificada. Painel B: *Western Blotting* da proteína U5-15K recombinante com anticorpo policlonal obtido em coelho. 1, soro pré-imune diluído 1:20 (antes da inoculação de U5-15K recombinante); 2, soro de coelho contendo anti-U5-15K diluído 1:20; 3, 1:100; 4, 1:500. A seta indica a reação contra a proteína U5-15K.

4.9) Detecção da proteína U5-15K em tripanosomatídeos

Para detectar a presença de U5-15K nativa, proteínas de extrato nuclear de *T. cruzi* e de extrato total dos três tripanosomatídeos (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*) (Figura 23 – Paineis A) foram obtidas para realização da técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-U5-15K previamente produzido (Figura 23 – Paineis B).

Os resultados permitiram observar a presença de banda em torno de 21kDa, indicativa da presença da proteína U5-15K no extrato nuclear de *T. cruzi* até diluição 1/100 do soro. Banda idêntica também apareceu nos extratos totais dos três tripanosomatídeos testados, confirmando os dados obtidos no *data mining*. Além disso, estes dados indicavam que o anticorpo obtido poderia ser utilizado na técnica de imunoprecipitação, na tentativa de capturar o complexo protéico de U5 snRNP.

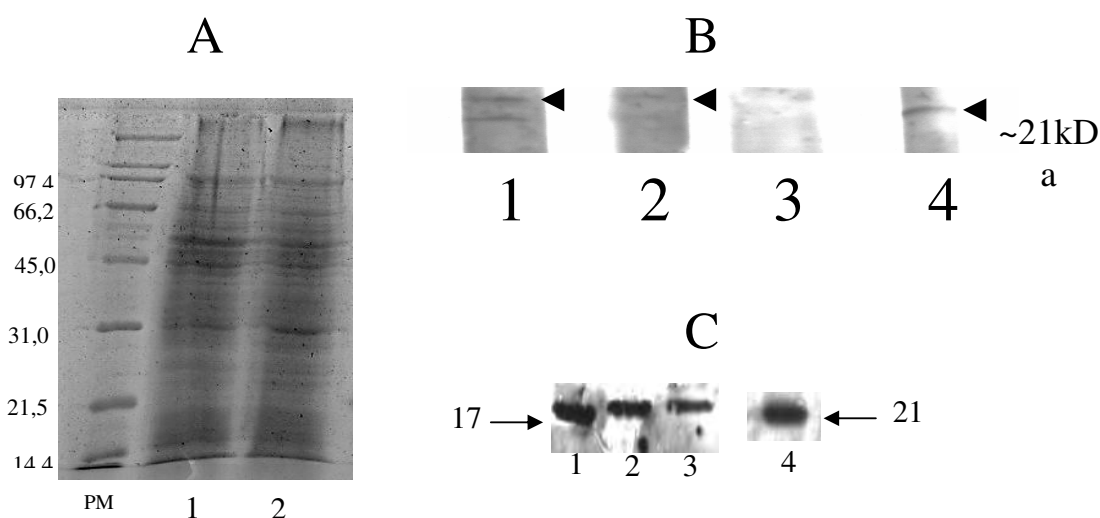


Figura 23. Detecção da proteína nativa em tripanosomatídeos com anticorpo anti-U5-15K. Paineis A: Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 de extrato nuclear de *T. cruzi* (cepa Y), 1 e 2, duas culturas diferentes do parasita). PM, peso molecular em kDa. Paineis B: *Western Blotting* do extrato nuclear com anticorpo policlonal anti-U5-15K. 1 a 3, diluições do soro 1:20, 1:100 e 1:500, respectivamente; 4, controle positivo (proteína recombinante purificada e soro diluído 1:100). A seta indica a reação contra a proteína U5-15K. Paineis C: *Western Blotting* do extrato total de diferentes tripanosomatídeos utilizando o anticorpo anti-U5-15K (diluição 1/100); 1, *T. cruzi*; 2, *L. major*; 3, *T. brucei*; 4, controle positivo (proteína U5-15K recombinante purificada e soro diluído 1:100).

Os resultados da figura anterior revelaram, também, que a proteína U5-15K de *L. major* apresenta o mesmo peso molecular dos homólogos dos outros tripanosomatídeos, sugerindo, portanto, que a sequência extra anotada no N-terminal provavelmente se deve a erros de erros no sequenciamento ou na anotação do referido genoma (Figura 19, sequência no retângulo).

4.10) Imunoprecipitação com anticorpo policlonal anti- U5-15K

Uma vez testada a capacidade do anticorpo anti-U5-15K de reconhecer a proteína nativa, prosseguiu-se com os experimentos de imunoprecipitação. Esta técnica, entretanto, não foi capaz de detectar novas proteínas participantes do complexo de U5 snRNP (Figura 24).

REUTER *et al.* (1999) elucidaram a estrutura de uma proteína chamada U5-15K de humanos, ortóloga de U5-15K de *T. cruzi*, e descreveram a dificuldade na reação de imunoprecipitação desta proteína, provavelmente devido à inacessibilidade dos anticorpos, sugerindo a presença desta proteína em um core central do complexo U5 snRNP, que também deve estar presente em tripanosomatídeos.

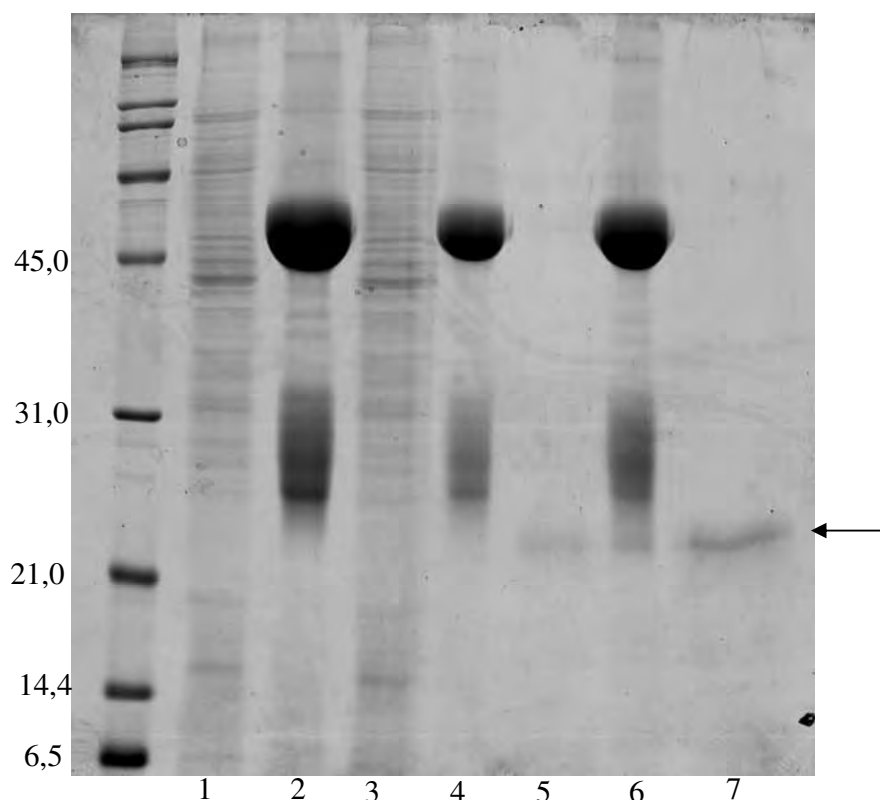


Figura 24: Eletroforese em SDS-PAGE (15%) corado por Comassie Blue R-250 da reação de imunoprecipitação do extrato nuclear de *T. cruzi* com anticorpo policlonal anti-U5-15K. 1, Fração não ligada; 2, Fração precipitada com soro pré-imune; 3, Fração não ligada; 4, Fração precipitada com anticorpo U5-15K; 5, Fração não ligada da proteína U5-15K recombinante; 6, Fração precipitada da proteína recombinante U5-15K com anticorpo U5-15K; 7, Proteína recombinante U5-15K. A seta indica a proteína recombinante U5-15K.

4.11) Clonagem de U5-15K em pC-PTP-NEO para realização da técnica de PTP-tag.

Objetivando a obtenção das outras proteínas presentes no complexo U5 snRNP foram desenhados iniciadores específicos para clonagem de U5-15K no vetor pC-PTP-NEO, uma vez que a imunoprecipitação não foi capaz de purificar estas proteínas de interesse.

Este vetor foi gentilmente cedido pelo Prof Dr Arthur Günzl, University of Connecticut Health Center, EUA. Esta metodologia descrita por SCHIMANSKI *et al.* (2005), utilizando *T. brucei* como modelo, emprega a produção *in vivo* da proteína alvo a ser estudada, fusionada ao PTP-tag, e após a transfecção e integração do vetor recombinado, os parasitas positivos são selecionados com geneticina

(G418) e confirmados através de PCR e *Western Blotting*. Essa metodologia permite a purificação de proteínas que estejam interagindo com a proteína alvo ou que participem de um complexo *in vivo* para posterior identificação das mesmas por espectrometria de massa.

Inicialmente foi necessário a clonagem do gene de U5-15K de *T. brucei* em pGEM-T *easy*, com intuito de confirmar a sequência de interesse e observar possíveis mutações que pudessem interferir do prosseguimento dos experimentos (Figura 25 – Painei A). Após confirmação das sequências dos clones positivos, procedeu-se com a digestão usando enzimas de restrição específicas, cujos sítios de restrição foram inseridos nos iniciadores, conforme descrito em Materiais e Métodos (Tabela 2) (Figura 25 – Painei B).

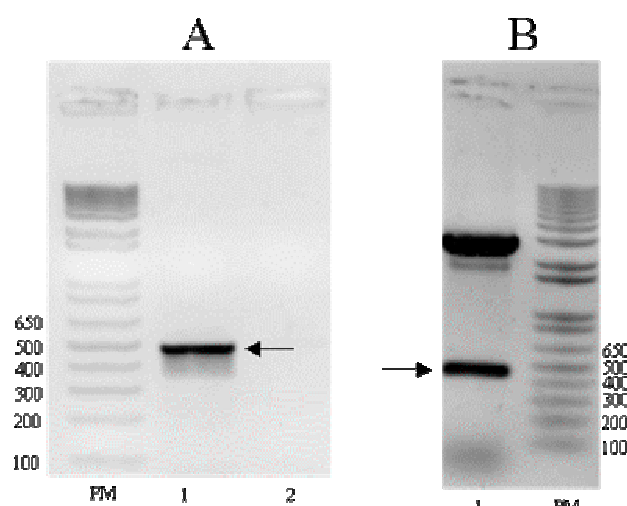


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio. Painei A: Produto de PCR amplificado com iniciadores U5-15K-PTP específicos. PM, Peso Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, amplificação de U5-15K-PTP; 2, controle negativo. Painei B: Digestão de um clone positivo de U5-15K-PTP em pGEM-T *easy*. PM, Peso Molecular 1 kb *plus* (Invitrogen) em nucleotídeos; 1, Produto da digestão. As setas indicam a banda desejada.

O produto da digestão foi purificado e clonado no vetor pC-PTP-NEO e a construção transfectada em *T. brucei* (cepa 427), prosseguindo-se com os experimentos de obtenção das outras proteínas presentes no complexo U5 snRNP. O vetor pC-PTP-NEO contendo a sequência que codifica

para U5-15K (do ATG ao *stop códon*) fusionada ao PTP na porção C-terminal inseriu-se no genoma do parasita para a produção da proteína e, após diluições seriadas, alguns clones foram isolados. Para a verificação da inserção correta da sequência alvo no genoma, realizou-se a reação de PCR com oligonucleotídeos U5-15K-PTP 5'out e protC-TAP3', que resultou na presença de uma banda de 550 pb, como esperado (Figura 26 – Painei A). O mesmo clone também foi analisado para a produção da proteína contendo o tag utilizando *Western Blotting* com anticorpo anti-proteína A (Fig. 26 – Painei B). Neste experimento, foi observada a banda de aproximadamente 34kDa (17 kDa de U5-15K + 19 kDa do tag PTP), demonstrando que o parasita expressou a proteína corretamente.

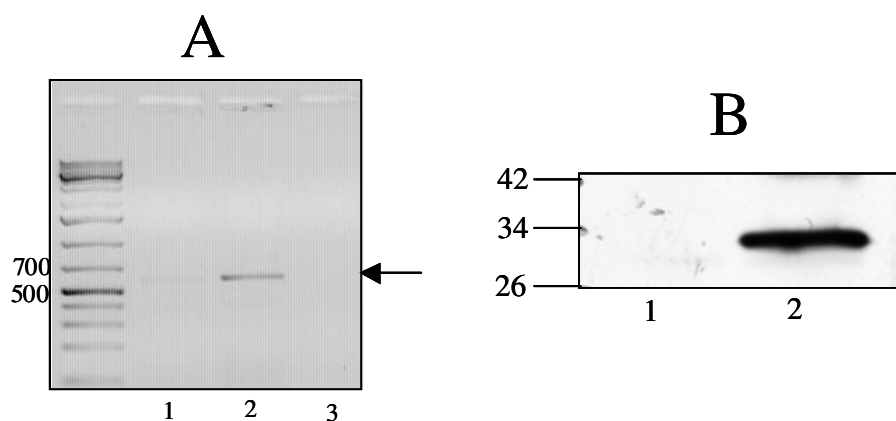


Figura 26: Painei A - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio dos produtos de PCR amplificados com iniciadores U5-15K-5'out e protC-TAP3': 1, *T. brucei* cepa 427; 2, *T. brucei* transfectado com U5-15K; 3, controle negativo. Painei B - *Western Blotting* do extrato nuclear revelado com o anticorpo anti-Proteína A (diluição 1/2.000): 1, *T. brucei* cepa 427 (não transfectada); 2, *T. brucei* transfectado com U5-15K-PTP tag. A seta indica o produto de PCR.

Após confirmação da expressão da proteína de fusão, o extrato nuclear proveniente de uma cultura de *T. brucei* transfectado, foi testado em relação à capacidade da proteína A presente na cauda da proteína de fusão de ligar-se à resina de IgG-Sepharose. Este teste foi importante, pois norteou os experimentos seguintes, tais como a purificação total da técnica de PTP-tag e elucidação das proteínas envolvidas no complexo U5 snRNP.

U5-15K fusionada à cauda do PTP-tag demonstrou alto grau de ligação à resina contendo IgG, como apresentado na figura 27 – Painel A. O controle negativo desta reação indicou a incapacidade do anticorpo secundário anti-IgG de coelhos em reconhecer a IgG imobilizada na resina (Figura 27 – Painel A, linha 4).

Experimentos de extensão de iniciadores (*primer extension*) foram empregados para demonstrar qual RNA estrutural estava associado à imunoprecipitação acima mencionada (Figura 27 – Painel B), como resultado da interação do RNA com a proteína U5-15K, mesmo que de forma indireta. Como controle de reação foi utilizado extrato nuclear de *T. brucei* transfectado, onde se visualiza a presença de todos os RNAs estruturais envolvidos com a reação de *trans-splicing* (Figura 27, Painel B, linhas 3 e 4).

Os resultados mostram a presença de U5 snRNA associado à proteína em estudo, aumentando o conjunto de informações a respeito da mesma (Figura 27, Painel B, linha 2). Entretanto, em menor escala, observou-se também a presença de SL RNA e U2 e U4 snRNAs (Figura 27, Painel B, linha 2), que ocorreu por co-purificação com U5 snRNP, uma vez que estas partículas participam de outros complexos, como o complexo A, onde estão presentes U1, U2, U4, U5 e U6 snRNP no *cis-splicing* e provavelmente SL snRNP, no *trans-splicing*, e os complexos B, B* e C, com U2, U5 e U6 snRNPs.

Tratamento com nucleases (DNase I e RNase H) demonstraram que os RNAs estruturais são essenciais para estabilidade de proteínas de *trans-splicing* na ribonucleoproteína, como esperado (Figura 27, Painel C). O tratamento do extrato nuclear de *T. brucei* transfectado com RNase H, causou insolubilidade de grande quantidade de proteínas, devido provavelmente à perda de interações essenciais para estabilidade do complexo. U5-15K tornou-se insolúvel, demonstrando que U5 snRNA é de suma importância para sua estabilidade (Figura 27, Painel C, linha 5), embora não tenha sido possível determinar se ocorreu interação direta entre esta proteína e o RNA estrutural. Entretanto, o tratamento com DNase I demonstrou que U5-15K não possui interação com DNA ou complexo multi-protético dependente de DNA (Figura 27, Painel C, linha 3). Como controle foi utilizada uma proteína

específica de U2 snRNP (U2-40K), que apresenta comportamento idêntico àquele observado para U5-15K (Figura 27, Painei C).

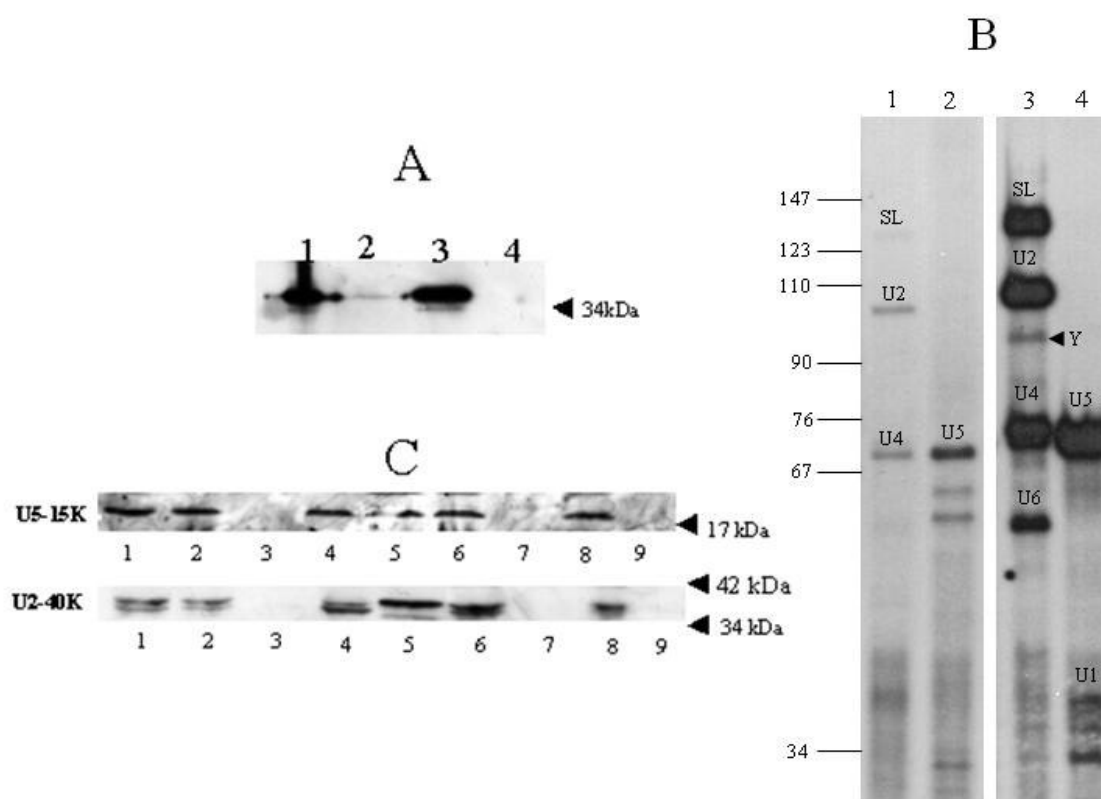


Figura 27: Painei A - *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose com anticorpo anti-Proteína A (diluição 1:2.000); 1, *Input*, extrato nuclear de *T. brucei* transfetado; 2, Sobrenadante (não ligado); 3, Imunoprecipitação; 4, Controle negativo, apenas IgG-Sepharose. Painei B: Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *Primer extension*; 1 e 2, Produtos da reação da proteína U5-15K, 3 e 4, Controles positivos, extrato nuclear de *T. brucei* transfetado. Painei C: *Western Blotting* com extrato nuclear de *T. brucei* transfetado tratado com nucleases, utilizando anticorpo anti-U5-15K (U5-15K) e anti-U2-40K (U2-40K). 1, Extrato nuclear de *T. brucei* transfetado; 2, sobrenadante (DNase I); 3, Precipitado (DNase I); 4, Sobrenadante (RNase H); 5, Precipitado (RNase H); 6, Controle (DNase I), sobrenadante de extrato nuclear mantido a 25°C; 7, Controle (DNase I) precipitado de extrato nuclear mantido a 25°C; 8, Controle (RNase H), sobrenadante de extrato nuclear mantido a 37°C; 9, Controle (RNase H) precipitado de extrato nuclear mantido a 37°C.

4.12) RNA de interferência

A descoberta do RNAi em *T. brucei* ocorreu inesperadamente e simultaneamente com os achados feitos em *Caenorhabditis elegans*, em que os parasitas transfectados com vetores de expressão de proteínas apresentavam fenótipos com várias alterações morfológicas, incluindo múltiplos núcleos e cinetoplasto. Observações mais profundas demonstraram que um grampo de RNA semelhante a 5'-UTR de α -tubulina era o elemento responsável pelo fenótipo constatado. Transfecções com RNA dupla fita construída com T7 RNA polimerase geravam parasitas com as mesmas características anteriormente citadas (HANNON 2003). Atualmente, o mecanismo de RNAi constitui uma poderosa ferramenta no estudo da biologia molecular de parasitos tripanosomatídeos, permitindo a interferência específica de genes endógenos. Devido à natureza deste tipo de silenciamento (pós-transcricional e dominante), este mecanismo de interferência constitui-se em uma técnica particularmente útil para o silenciamento da expressão gênica em organismos diplóides, onde o *knockout* tradicional de genes alvo seria altamente dispendioso e, no caso de genes essenciais, praticamente impossível. Por outro lado, os estudos realizados através deste mecanismo em *T. brucei*, permitiram extrapolar os resultados obtidos para outras espécies de tripanosomatídeos, nas quais a maquinaria de silenciamento por RNA de interferência, não é competente, como por exemplo, em *T. cruzi* (SANCHES 2007).

Para verificar o efeito do silenciamento específico do gene U5-15K foram feitas curvas de crescimento de células induzidas e não induzidas com doxaciclina. Para os quatro clones selecionados foi possível observar que após o terceiro dia de indução, a cultura apresenta uma queda de crescimento que se acentua até o sétimo dia. (Figura 28). Análises da transcrição do gene de U5-15K, após indução (clone E3 com doxaciclina), demonstraram redução no nível de mRNA específico a partir de 24 horas e atingindo o máximo de inibição após 72 horas (Figura 29, painel A). Estes dados sugerem que o gene U5-15K é essencial para parasita, uma vez que sua ausência causa forte redução no crescimento normal do parasito.

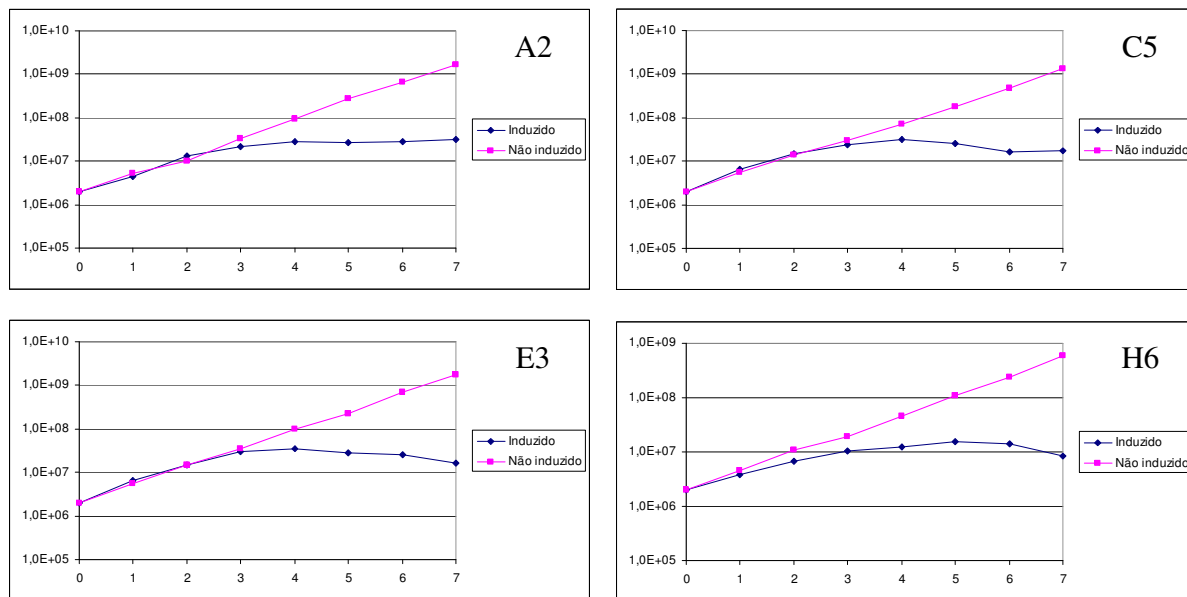


Figura 28: Curvas de crescimento de quatro clones (A2, C5, E3 e H6) U5-15K RNAi positivos durante 7 dias de indução.

4.13) Avaliação da participação de U5-15K no *cis* e *trans-splicing*

Após confirmação da redução do número de transcritos específicos de U5-15K, as mesmas células induzidas com doxaciclina foram empregadas na avaliação da proteína em questão nas reações de *cis* e *trans-splicing*.

Uma reação de RT-PCR semi-quantitativa demonstrou que ao longo da indução com doxaciclina observa-se redução no nível de transcrito processado de α -tubulina (banda de aproximadamente 750 pb - α tub) e acúmulo da forma não-processada (banda de aproximadamente 150 pb - pré- α tub), confirmando a participação de U5-15K na reação de *trans-splicing* (Figura 29 – painel A). Reações de *primer extension* utilizando os oligonucleotídeos direcionados para SL, U1, U2, U4, U5 e U6 snRNAs corroboram este dado, uma vez que foi possível observar discreto acúmulo de SL RNA, demonstrando que com a reação inibida este importante componente não foi consumido (Figura 29 - painel B). O nível de U5 snRNA não se alterou ao longo da indução, indicando que mesmo que a proteína em

questão participe na reação de *trans-splicing*, sua ausência não altera a estrutura do complexo U5 snRNP a ponto de ocorrer instabilidade no RNA estrutural associado a esta partícula (Figura 29 - painel B). Para os demais snRNAs não houve redução no número de moléculas, podendo utilizá-los como controles da reação de *primer extension* (Figura 29 – Painel B).

Em relação ao *cis-splicing*, a participação de U5-15K foi verificada utilizando uma reação de RT-PCR, cujos iniciadores foram direcionados para o gene da Poli A polimerase (PAP), previamente descrito por MAIR *et al* (2000) como sendo um processado por *cis-splicing*. Os iniciadores sintetizados para esta reação foram capazes de se ligar nos exóns, flanqueando o único intron encontrado neste gene. Ao longo do tempo de indução com doxaciclina foi possível observar acúmulo de transcritos não processados de PAP (banda de aproximadamente 780 bp), e pequena redução no nível de transcritos, principalmente com 72 horas de indução (banda de aproximadamente 130 bp), confirmando que U5-15K também participa na reação de *cis-splicing* em tripanosomatídeos (Figura 29 – Painel A). Estes resultados demonstram que a partícula de U5 snRNP, a exemplo do que foi observado em mamíferos e leveduras, é essencial também em tripanosomatídeos para a correta execução das reações de *cis* e *trans-splicing*.

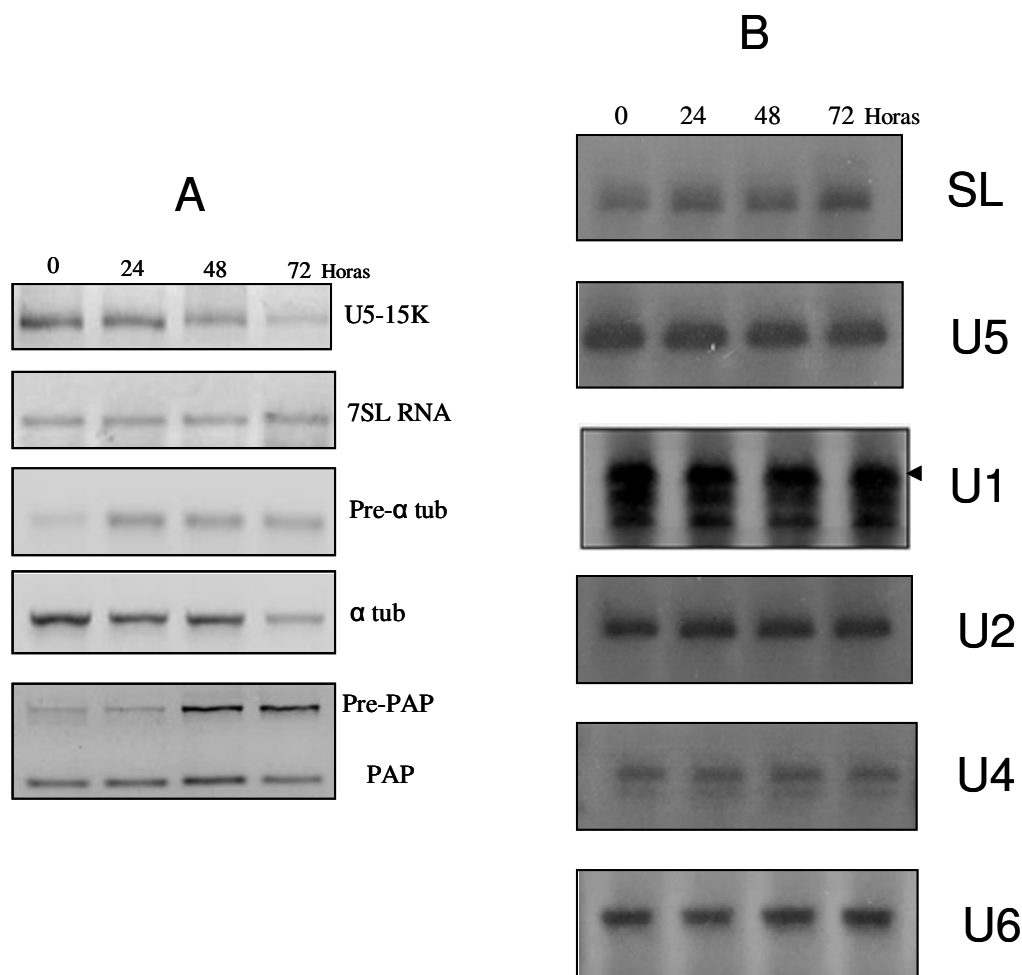


Figure 29: Análises funcionais de U5-15K. PAINEL A: Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos de U5-15K, 7SL RNA (como controle quantitativo de reação), transcrito de tubulina não processado (Pre tub), transcrito de tubulina processado (tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP) e transcrito de Poli A Polimerase processado durante 0, 24, 48 e 72 horas de indução com doxaciçlina. PAINEL B: Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *primer extension* a partir de cultura de U5-15K RNAi positiva

4.14) Imunolocalização U5-15K em *T. brucei*.

A imunolocalização com o anticorpo anti-proteína A, dirigido para o *tag* PTP, demonstrou que U5-15K apresenta-se concentrada no núcleo do parasito, como esperado, por se tratar de uma proteína envolvida com *splicing*, processamento nuclear (Figura 30).

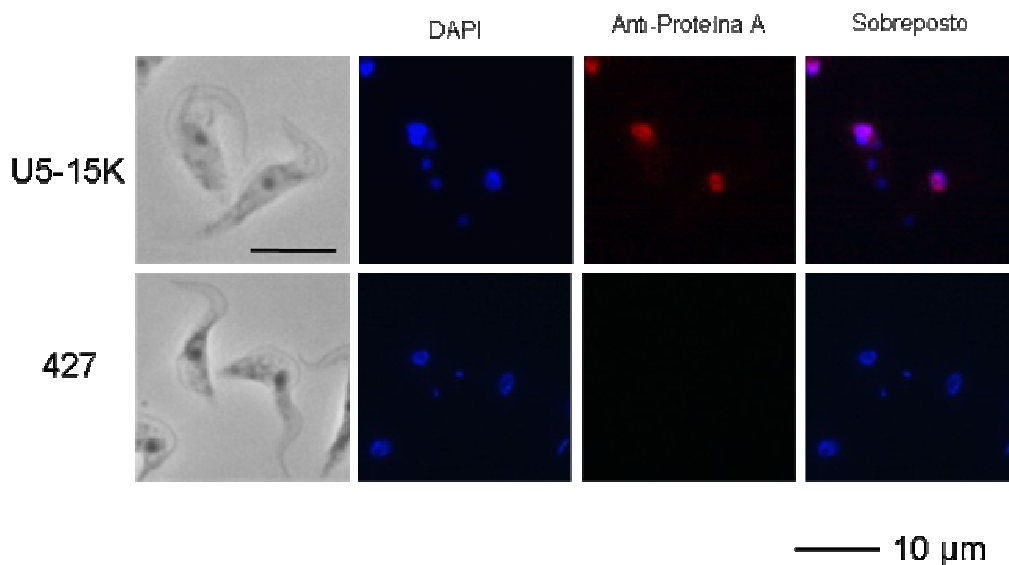


Figura 30: Imunolocalização da proteína U5-15K fusionada ao PTP-tag com anticorpo anti-proteína A (vermelho) e DAPI (azul). Controle negativo: cepa de *T. brucei* 427.

4.15) Análise da sequência do gene de *U5 snRNP-associated 102kDa protein*

A ORF de *U5 snRNP-associated 102kDa protein* (U5-102K) mostrou-se altamente conservada entre os tripanosomatídeos, apresentando 2.985 nucleotídeos em *T. cruzi* e 3.030 *T. brucei*. Em *L. major*, a entrada com identidade com U5-102K trata-se de uma sequência parcial ou eventualmente tratou-se de um erro de anotação para este gene. A identidade em relação à sequência de aminoácidos variou de 59% em *T. cruzi* e *T. brucei*, até 42% entre *T. cruzi* e *T. vivax* (Figura 31). Análises de sequência de U5-102K em tripanosomatídeos sugerem, embora com baixa identidade, a presença do domínio N-terminal chamado de *PRP1 splicing factor*, presente no fator de *splicing* Prp1, proteína provavelmente não envolvida somente no *splicing*, mas também na exportação de RNAs para o citoplasma e progressão do ciclo celular (URUSHIYAMA *et al.* 1997).

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
T.brucei : MSAAAEVLSTVVDKYEQVLAKYDWS SFFPPRGYQYQIGRGAKAF TSAELSATTGVSA-LLALGGEQSAMLDALDRLEERR : 81
T.cruzi : MNAA-ETLLPQDKDYEQLLAKYDWS SFFPPRGYQYQIGRGAKAF TSAELSAVCAAAABFLLSTPETSGLLDALDRLEEKRR : 81
T.vivax : MNSATTALLPKHDKYEQIRAKYDWS SFFPPSGYQYQVGRGAKAF TSAELSA-MSVGTTEQLVLGPECTAMLBALDRLEEGR : 81
      Mnaa p LlpkkDKYEQ LAKYDW SFFPPrGYQyG GRGAKAF TSAELSa vgv a P L lgpEqsamLdALDRLE R

      *           100          *           120          *           140          *           160
T.brucei : HKRRRE-DVKEG---ATSRECKPKLLLSMEDIATVSGASNQSLVKKRKARTEDMDVVDGYAFDDDETAVVTASDLLRGRALA : 159
T.cruzi : QKRRRD-DAKARQAATAHESKPKKTLLSMEDIATVSGSVAGHSVLRKARTEDMDVVDNHVFADETSVVTAQDLLRSQTFT : 162
T.vivax : RKRRREBDSKSSSTTSSSLETAPSKVMLSMEDIATIGSGCTAQSILVKKRKARTDDMEVVDSTAFADETAVVTASDLLRSRALA : 163
      KRRRe D Kg r ats E KkpK lLSMEDIATvGSG qSLVKKRKARteDMdVVD yaFaDETaVVTAsDLLRserala

      *           180          *           200          *           220          *           240
T.brucei : ANQTLENILNMGSSSEQTTWITHSRAFREMGMLTKKAQOTLVEGSRLTGSKGPLIWKEQLQHINDPAAQRQLLEQAVAAKCTC : 241
T.cruzi : TQNTLENILMGSPTEQTTWITHSRAFREMGSLKKAHOTLIEGCRLTGSKGPLIWKERLEHTQDPAAKRQLLEBAVKACSGC : 244
T.vivax : SSQNTLENILDMGSSTEQTTWITHSRAFREMGMLKKAQHTLVEGCRLTGDRGPLIWKERLQYLHDPASQRQLLEBAVKACRSC : 245
      nQTLENIL MGSstEQTTWITHSRAFREMGm KKAqQTLvEGCRLTGskGPLIWKErLqhl DPAAqRQLLEBAVKAC C

      *           260          *           280          *           300          *           320
T.brucei : EELWFLLLQYQPPHEQLHWLQAVMACPASESLWLRILGYVTAPRDQRKTIIRKALEVTFPLPSLWAMLARLEDYERGKAIFN : 323
T.cruzi : EELWLLLLLEHPPHGLHWLQAVVCPSSBKLLWLRVLLHISAPRDQKKIIRKALEVTPRLPSLWAMLARLESYETGKAIFN : 326
T.vivax : EELWLLLLLERSPPHEQLHWLQAVIACPASBVLWLRILGHVVPVRDQKKIIRKALEVTNPLPSLWAMLARLEGYETGKAIFN : 327
      EELWLLLL ePPHeQLHWLQqAVmaCPaSe LWLRILghv aPRDQkKIIRKALEVTP LPSLWAMLARLE YETGKAIFN

      *           340          *           360          *           380          *           400          *
T.brucei : AAAAEHESMKIILEGAKFEFHLRGQVGSER---EGG---NEQLHNAKHSLVQAQAQREFLLMDEEKSRTEWLDAAARVAVSE : 399
T.cruzi : AAAAEHLSLQIIVEAAKFEFHLSSRIKEGRTEEGS---LRELGNERTIQQFVHOAVGSFELIVDEEKSRREWLVARAAAFE : 405
T.vivax : AAVAEEYSLKIIIEASKEFEEFLATPKAKSTSEEGETQLRLQCSDKLRSMVQASIQFLAVDEEKSRREWLBTARSSAVE : 409
      AAaAEhpSlkIiIEaaKFEFHL r k gK eEG lrqL n kI s V QA FL vdEEKSRrEWLe AR aa E

      *           420          *           440          *           460          *           480          *
T.brucei : RYILTSAAYMLLHEVCITGAATITIFVTWLEDLAALVPDMWRRAHDVLCAMATMLIGRDAAVK---GTFNEA--VTEKEVQII : 475
T.cruzi : RYVLTSAAYMYLFEVDSRRRTKSLEVPATWIEDIVALVPDIWTHETVCAAMAAAMLLHQIHGKPCCGGTH---IKEREVEVM : 483
T.vivax : RYLTATSAAYMYLFEVCDKKATOLSPPATWIDDLTALVPDMMQSHVLCAMAAVLLIRGKSSNVLRSGSGDGGGVTEREVOVM : 491
      RYILTSAAYMYL FVcD ka L PatWieDl ALVPDMwR HevlCA WAamLIlr k l Gt vtEkeVqvm

      *           500          *           520          *           540          *           560          *
T.brucei : GEARLSAEFTSLETAVSAVTRYISSSTVSYTSRVEDGMKKEGIREEEEEELGRPMAT-IQAAPPT-CSTTSATAASQCLPLP : 555
T.cruzi : TVALRLASSVAIDAALASALLKHMSPFDAS-----NLGNQSV---EEEEELGRPGTTBLALS PENGTTSATAASNPLPLP : 556
T.vivax : ESALRLAELGIVGVASLSVVLQDVPLSNGVLGGC--ERVDPVKVK-EEEEELPREVETVSVMPPEANTLTSATAASEYLLPLP : 570
      ALRLAp AlSavl s t s vk EEEEEELGrPv T Ppn tTSATAAS LPLP

      *           580          *           600          *           620          *           640          *
T.brucei : LVSVLTYTLFRABENIIDVMSVAKVEYDHHFYDGAHRVIMLATTRYEVNALLETAATAAKTKMANGCRGAGABELLLKSTALD : 637
T.cruzi : LECVFLCTLLHMEWLTAETVIRIAKVLYDRGFYEGASHVLRSLSQHPENCFLFPAAAKTLLATGREKEAVDMLLRSTELV : 638
T.vivax : LLEFVIHETLMGTAFESAVEVLLCIAKVLYDERFYEDAFRLISLGVVRHPICITLETAAAKARMANGHVVEAKKIITLATFTV : 652
      Lt V l TL p f t eV l iAKVLYDr FYegA rVl L i rhPtn LfTAAAKT mAmG keAe Ll gT iv

      *           660          *           680          *           700          *           720          *           7
T.brucei : PSDSDIAWVKLAVHRRSNREDIVPLLEDAVHFPTSERLWLMRLAEAGKAQOLLEDAMARGSTAPTINGLRRVYGKALSS : 719
T.cruzi : SPSDDIVWVKLAVHRSKHKDILPLIDKALCLFPKSEKLWLLRLAEAGAIKRLDDAAMRGVSTLPELIEHQIYTKALSE : 720
T.vivax : PARTDTAWVKLAVHLRSREDIVPLLEKAVAVEPQSERLWLMRLAEAGMRVRRLLDDATVRG----- : 714
      pa sDiaWVKLAVH RS eDivPLldkAl FP SerLWLMrLEAGMr rLLdDA RG st p i lr y kals

      *           740          *           760          *           780          *           800          *           820
T.brucei : EHCRLSPTIWCYAAVKLESNFSDDACAARALLLEGVLVVCCKCCHLHHNGSTKRAEVRTEGLARCHVLRHAGSETALETV : 801
T.cruzi : ANCRFSPTVWCYVGERLESVLSNASAAARALLLEGVVVC--CQQQ-----PNKKAEIQAAEGLARCOVERMHSSRETALEV : 795
T.vivax : ----- : -
      cr spt wcy les l s a aarallleg vvc g q k ae a fglarc ve h g etale v

      *           840          *           860          *           880          *           900
T.brucei : KEVLQQLPKVDCCFTVSVGELVALSIDLENPATRGRAAAQAVQHWVRVDPLVFSVAKLYHAACRHEKALEQAMKAVQMSKG : 883
T.cruzi : KETLQLLPKNNCSFTVPVGEIVSLSIDLEAPAARGRAAAQAVQHWVRVDPLVFGSIARVYHAACKYDKALEQAMKAVKMSKG : 877
T.vivax : ----- : -
      ke lq lpk g ftv vgelv lsidle pa rgraaaqavqhw vrldplvf s ak yhaag kaleqamkav ms g

      *           920          *           940          *           960          *           980
T.brucei : RCGDAVALWLKLASMTYRKIVMEKMGTLVKDE---SNEEETALQNGVLAWLWKQLANGSSGGTSGSBAMEDMKGSSESAT : 962
T.cruzi : SCGDAVALWLKLASLTAYRRLV--KALMCIBDEGELSNTTEE-PIPMSLMSSQLNQCIALDSDDSCNATDA-----GSNKQHT : 951
T.vivax : ----- : -
      cgdavalwlklas yr v k de sn ee l wlw q a s a gs t

      *           1000          *           1020          *           1040          *           1060
T.brucei : HSEPPKPNKSGPLMIYVSKSRDPSNVTLILGFRDSVEVMILTOVEMMKL----- : 1009
T.cruzi : ----PKINGGPLWVLVARIKDPSNVTLILGFRDSVESMLQBYMDLIEL----- : 994
T.vivax : ----- : -
      pk n gplw v dpsnvtllg rdsve ml v i l

```

Figura 31: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de U5-102K de tripanosomatídeos. Em preto estão representados todos os aminoácidos idênticos alinhados; em cinza escuro, somente quando um aminoácido não está alinhado; e em cinza claro quando dois aminoácidos não estão alinhados. *T. cruzi* CL Brener (Tc00.1047053507041.40), *T. brucei* (Tb11.01.7330), *T. vivax* (tviv866f09.q1k_5). As sequências foram obtidas no site www.genedb.org.

4.16) Clonagem de U5-102K em pC-PTP-NEO para realização da técnica de PTP-tag

Após clonagem do gene de U5-102K de *T.brucei* em vetor pGEM-T *easy* e sequenciamento, o mesmo foi sub-clonado no vetor PC-PTP-NEO (dados não mostrados). Após linearização, a construção U5-102K/pC-PTP-NEO foi transfectada na cepa 427 de *T. brucei*, e os clones obtidos foram analisados para verificar a correta inserção do gene de interesse no genoma do parasita (Figura 32 – Painel A e B). Os oligonucleotídeos U5-102K 5'out e U5-102K-s foram empregados para confirmação dos clones positivos, e a observação de uma banda entre 700 e 1.000 bp indicou os clones positivos (Figura 32 – A). Através da técnica de *Western Blotting* utilizando o anticorpo anti-Proteína A foi possível observar uma banda em torno de 140kDa (109kDa de U5-102K + 19kDa da cauda do PTP), indicando a expressão da cauda do PTP fusionada ao gene de interesse (Figura 32 – B).

Após confirmação da expressão da proteína de fusão, o extrato nuclear proveniente de uma cultura de *T. brucei* transfectado, foi testado em relação à capacidade da proteína A presente na cauda da proteína de fusão ligar-se à resina de IgG-Sepharose. A proteína de interesse fusionada à cauda do PTP-tag demonstrou capacidade de ligação a resina contendo IgG, como apresentado na figura 32 – Painel C. Experimentos de *primer extension* utilizando a imunoprecipitação com IgG-Sepharose, indicaram que U5-102K possui interação com U5 snRNA, sugerindo que esta proteína provavelmente participa do complexo U5 snRNP (Figura 32 – Painel D – canaleta 2). A exemplo do observado para U5-15K, também se verificou co-purificação dos complexos U2 e U4 snRNP, uma vez que estas partículas participam de diferentes complexos (*spliceossomo*) durante a reação de *splicing*, como o complexo A (U1, U2, U5, U4/U6 snRNPs) e o complexo B, B* e C (U2, U5 e U6 snRNPs), conforme demonstrado na figura 32, Painel D, canaleta 1.

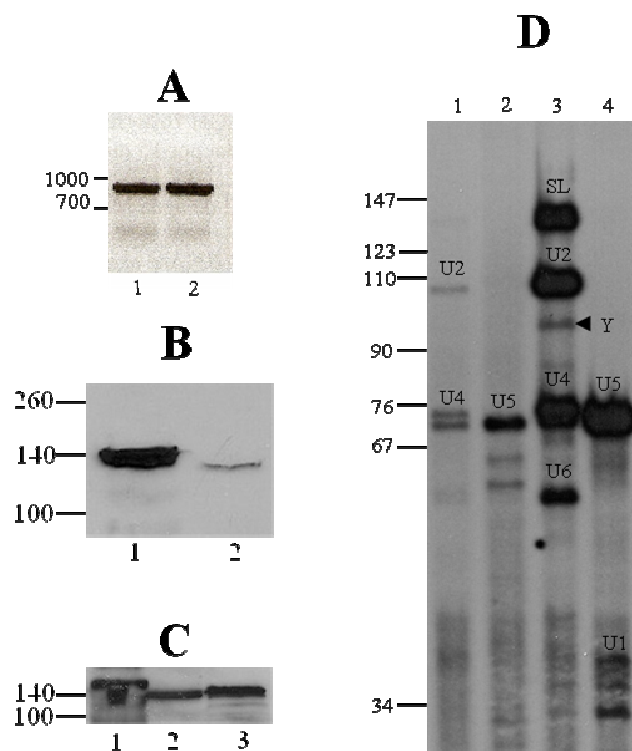


Figura 32 - Paineis A: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado por brometo de etídio dos produtos de PCR (U5-102K); 1, *T. brucei* transfectado com U5-102K (clone B5); 2, *T. brucei* transfectado com U5-102K (clone E2). O controle negativo (cepa 427 não transfectada) está apresentado na figura 22. Paineis B: *Western Blotting* do extrato nuclear com anticorpo anti-Proteína A (diluição 1/2.000); 1, *T. brucei* transfectado com U5-102K-PTP-tag; 2, *T. brucei* cepa 427 (não transfectado). Paineis C: *Western Blotting* da imunoprecipitação com IgG-Sepharose utilizando o anticorpo anti-Proteína A (diluição 1:2000); 1, *Input*, extrato nuclear de *T. brucei* transfectado; 2, Sobrenadante após a imunoprecipitação; 3, Precipitado. Paineis D: Eletroforese em PAGE 8% - 7M uréia contendo os produtos da reação de *primer extension*: 1 e 2, proteína U5-102K, 3 e 4, controle positivo, extrato nuclear de *T. brucei* transfectado

4.17) Imunolocalização U5-102K no *T. brucei*.

Como esperado, a imunolocalização da proteína com o anticorpo anti-proteína A, dirigido para o tag PTP, demonstrou que U5-102K apresenta-se concentrada no núcleo da célula, resultado compatível com proteínas envolvidas na reação de *trans-splicing*, processamento nuclear (Figura 33).

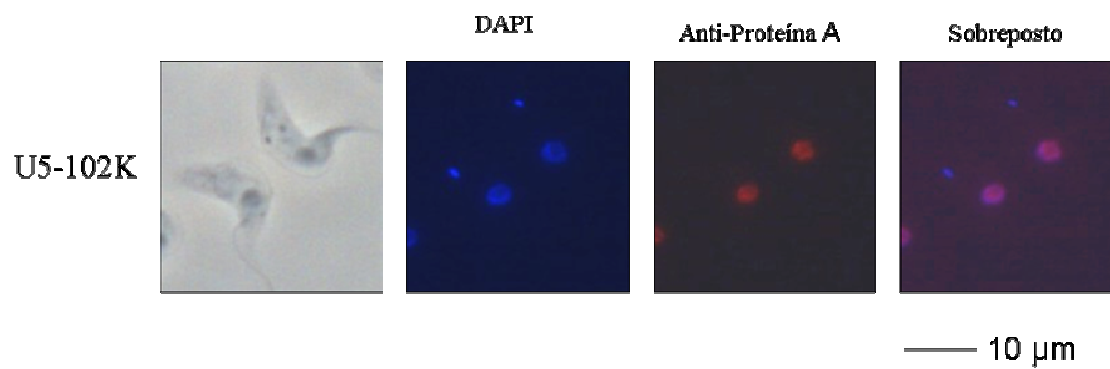


Figura 33: Imunolocalização da proteína U5-102K fusionada ao PTP- tag com anticorpo anti-proteína A (vermelho) e DAPI (azul). Controle negativo desta reação esta demonstrado na figura 27.

5) DISCUSSÃO

O objetivo inicial do projeto era obter as proteínas específicas do complexo U5 snRNP, a partir da reação de imunoprecipitação com o anticorpo policlonal produzido em coelhos para a proteína específica U5-15K de *T. cruzi*. Embora tenha sido possível imunoprecipitar a proteína U5-15K recombinante com o anticorpo correspondente não se observou diferenças entre as bandas da imunoprecipitação. Portanto, foi necessário buscar-se novas estratégias para obtenção das proteínas específicas e foram concentrados os esforços no uso de transfecção de *T. brucei*, tanto para utilização da técnica de RNAi quanto de PTP-tag, uma vez que ambas já estavam sendo padronizadas no laboratório. Portanto, novos experimentos estão sendo desenhados para a obtenção de mais proteínas específicas do complexo U5 snRNP, e embora U5-15K esteja melhor caracterizada para atuar com “isca”, U5-102K também poderá ser empregada neste propósito.

Devido ao alto grau de conservação observado no processo de *trans-splicing*, é provável que as proteínas identificadas como componentes específicos das ribonucleoproteínas de *T. brucei* possuam homólogos nos outros tripanosomatídeos, como *Leishmanias* e *T. cruzi*. Como anteriormente, demonstrado U5-15K apresenta alto grau de similaridade de seqüências, confirmado pela reação do extrato de total de diferentes tripanosomatídeos com o anticorpo anti-U5-15K produzido a partir do homólogo de *T. cruzi*.

Análises de bioinformática similares às aquelas utilizadas para o gene de U5-15K permitiram indicar a presença de genes homólogos das proteínas U5-40K, U5-116K e U5-102K em tripanosomatídeos. Tais inferências detectaram a presença de domínios conservados nestes membros, como o domínio repetitivo WD40 em U5-40K; os domínios de *Elongation Factor (EG-F C e N-terminal)* em U5-116K e o domínio de *PRP1 splicing Factor* em U5-102K.

REUTER *et al* (1999) elucidaram a estrutura de uma proteína chamada U5-15K de humanos, ortóloga de U5-15K de tripanosomatídeos, e descreveram sua incapacidade de ser imunoprecipitada, devido a uma provável inacessibilidade dos anticorpos a esta proteína. Assim, nossos achados sugerem

a presença desta proteína em core central do complexo U5 snRNP também em tripanosomatídeos. Entretanto, quando utilizada a técnica de PTP-tag, os dados demonstraram que devido ao tamanho menor da cauda composta por duas proteínas A e uma proteína C (aproximadamente 19kDa), foi possível imunoprecipitar a proteína U5-15K, mesmo que esta seja integrante do core central do complexo. A imunoprecipitação utilizando IgG-Sepharose foi empregada para avaliar quais RNAs estruturais estavam associados ao complexo que U5-15K participa, observando-se a presença do RNA estrutural U5 snRNA, como esperado, o que indica mais uma vez que esta proteína realmente participa do complexo U5 snRNP.

Em menor grau, U2 e U4 snRNAs e SL RNA foram também observados, confirmando a copurificação dos seus respectivos complexos com o complexo U5 snRNP, uma vez que é bastante provável a interação entre esses complexos durante a reação de *trans-splicing* (STEVENS & JOHN ABELSON 1999). Resultados similares foram observados com a proteína U5-102K, onde se observou além de U5 snRNA a presença de U2 e U4 snRNAs.

Tratamento com duas diferentes nucleases (DNase I e RNaseH) sugeriram que o complexo de U5-15K é RNA dependente, pois se observa perda da estabilidade (insolubilidade) quando o extrato nuclear de *T. brucei* foi tratado com RNase H. Por outro, não se observaram diferenças na estabilidade quando o mesmo extrato foi tratado com DNase I. Entretanto, quando U5-15K foi silenciada no parasita, a ausência da proteína não ocasionou instabilidade do RNA estrutural, sugerindo que a proteína em questão não deve estar diretamente ligada a ele. Instabilidade de proteínas associadas a snRNAs causam degradação do mesmo, como observado para LSm2, onde células de RNAi positivas para transcrito deste gene ocasionou redução no nível de U6 snRNA ao longo da indução com doxaciclina (AMBRÓSIO et al. 2009).

Dados obtidos em experimentos de RNAi demonstraram que U5-15K é uma proteína essencial para *T. brucei*, conforme observado pelas curvas de crescimento. Como *T. cruzi* e *Leishmanias* não possuem os mesmos mecanismos de RNAi ativos e baseado na conservação na reação de *trans-splicing*

ntre esses tripanosomatídeos, os resultados obtidos possivelmente podem ser extrapolados para estes parasitas, demonstrando o papel importante de U5-15K nos tripanosomatídeos. Mutantes de *Schizosaccharomyces pombe*, que apresentam mutações no gene *Dim1*, homólogo a U5-15K de tripanosomatídeos, apresentam inibição de mitose e ausência de divisão nuclear quando as células são submetidas a temperaturas restritivas. A deleção de *Dim1* ocasiona um fenotipo letal para a levedura, com parada do ciclo celular em G2; letalidade que pode ser revertida pela superexpressão do homólogo mDim1 de ratos (BERRY *et al.* 1999).

Os resultados da reação de RT-PCR possibilitaram confirmar a queda no nível de transcritos de U5-15K após indução dos clones RNAi positivos com doxaciclina. Durante os experimentos de indução não foi observado um padrão de alteração morfológica dos parasitos, embora tenha sido nítida a redução no número total dos mesmos (dados não mostrados).

Análises funcionais utilizando clones positivos de U5-15K RNAi confirmam a participação desta proteína na reação de *trans-splicing*, uma vez que experimentos utilizando RT-PCR semi-quantitativa demonstraram redução no nível de processamento do gene de α -tubulina, fato também confirmado pelo acúmulo de SL RNA observado na reação de *Primer extension*. Como esperado, U5-15K também participa da reação de *cis-splicing*, uma vez que ocorre acúmulo da forma não processada do gene de Poli A polimerase ao longo do tempo de indução com doxaciclina. Foi observada uma clara correlação entre o decréscimo dos transcritos U5-15K e redução nas reações de cis e trans-splicing, confirmando a importância desta proteína nos dois processos. O mesmo comportamento foi observado para U5-Cwc21 (AMBRÓSIO *et al.* 2009), sugerindo a presença de elementos comuns na reação de cis e trans-splicing em tripanosomatídeos. Portanto, novos experimentos são necessários para apontar possíveis diferenças entre os tipos de processamento.

Estas informações geram novos questionamentos a serem respondidos futuramente, como por exemplo: quais proteínas interagem com U5-15K durante o processamento; como ocorre esta interação;

qual o papel específico deste membro ao longo da reação de *splicing*, e como se comportam as demais proteínas do complexo na ausência de U5-15K?

Os resultados da imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos obtidos para a cauda do PTP, corroboraram os dados mostrados anteriormente, indicando a localização de U5-15K e U5-102K no núcleo do parasito, como já esperado para proteínas participantes da reação de *trans-splicing*.

Grandes esforços foram empregados para a padronização da transfecção de cepas de *T. brucei* no laboratório, e certamente estas técnicas poderão ser empregadas para caracterização de outras proteínas, adensando o número de informações disponíveis, não somente sobre o processamento de *splicing*, mas também a respeito da interação e funcionalidade dessas proteínas, auxiliando deste modo, na compreensão da relação hospedeiro-parasita nas tripanosomíases.

6) CONCLUSÕES

1) As ferramentas de bioinformática empregadas foram capazes de identificar quatro proteínas específicas do complexo U5 snRNP (U5-15K, U5-40K, U5-102K e U5-116K), indicando parâmetros importantes como peso molecular estimado, ponto isoelétrico teórico, identidade entre diferentes tripanosomatídeos e presença de domínios conservados em cada membro estudado;

2) O anticorpo anti-U5-15K foi capaz de reconhecer a proteína nativa de 17kDa no extrato total de diferentes tripanosomatídeos e no extrato nuclear de *T. cruzi*;

3) O soro policlonal de U5-15K foi empregado na realização da técnica de imunoprecipitação, entretanto, este experimento não foi capaz de detectar novas proteínas participantes do complexo de U5 snRNP; sugerindo que esta proteína encontra-se no core central da partícula;

4) Os genes de U5-15K e U5-102K de *T. brucei* foram convenientemente clonados no vetor pC-PTP-NEO e após transfecção foram obtidos clones, confirmados por PCR e *Western Blotting* e a Imunoprecipitação com IgG *sepharose* identificou o U5 snRNA associado a cada uma das proteínas;

5) O gene U5-15K clonado no vetor pLEW100 gerou clones RNAi positivos. Curvas de crescimento de quatro clones RNAi induzidos demonstraram que U5-15K foi essencial para sobrevivência dos parasitas, sendo a queda do mRNA específico confirmada por RT-PCR;

6) Experimentos funcionais demonstraram que U5-15K participa tanto da reação de *cis* como de *trans-splicing*;

7) Imunolocalização utilizando Imunofluorescência Indireta identificou U5-15K e U5-102K como proteínas nucleares.

REFERÊNCIAS

- ACHSEL, T.; AHRENS, K.; BRAHMS, H.; TEICHELKAMP, 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 novel WD-40 protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 11, p. 6756-6766, 1998.
- AMBRÓSIO, D. L.; SILVA, M. T. A.; CICARELLI, R. M. B. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 97-105, 2007.
- AMBRÓSIO, D. L.; BARBOSA, C. F.; VIANNA, V. F.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: establishment of permeable cells for RNA processing analysis with drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 617-620, 2004.
- AMBRÓSIO, D. L.; LEE, J. H.; PANIGRAHI, A. K.; NGUYEN, T. N.; CICARELLI, R. M. B.; GÜNZL, A. Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. **Eukaryotic Cell**, 2009. doi:10.1128/EC.00075-09.
- BARBOSA, C. F.; OKUDA, E. S.; CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I.; CICARELLI, R. M. B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 33-39, 2007.
- 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 Reports**, v. 3, n. 9, p. 875-880, 2002.
- BELL, M.; SCHREINER, S.; DAMIANOV, A.; REDDY, R.; BINDEREIF, A. p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. **EMBO Journal**, v. 21, p. 2724-2735, 2002.
- BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 916-920, 1985.
- BERRY, L. D.; FEOKTISTOVA, A.; WRIGHT, M. D.; GOULD, K. L. The *Schizosaccharomyces pombe* dim1 gene interacts with the anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) component lid11 and is required for APC/C function. **Molecular And Cellular Biology**, v. 19, n. 4, p. 2535-2546, 1999.
- BLUMENTHAL, T.; STEWARD, K. RNA processing and gene structure. In: RIDDLE, D. L. **C. elegans II**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 117-145.

BOSETTO, M. C.; MORTARA, R. A.; AMBRÓSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; SILVA, M. T. A.; OKUDA, E. S.; CICARELLI, R. M. B. Detection and localization of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) in Trypanosomatids using anti-m3G antibodies. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 95-99, 2008.

BREHM, K.; JENSEN, K.; FROSCH, M. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 3811-3818, 2000.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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

BURGE, C. B.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. In: GESTLAND, R.; CECH, T. R.; ATKINS, J. **RNA World II**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. p. 525-560.

CHAGAS, C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHAN, S. P.; KAO, D. I.; TSAI, W. Y.; CHENG, S. C. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. **Science**, v. 302, p. 279-282, 2003.

CHEN, C. H.; YU, W. C.; TSAO, T. Y.; WANG, L. Y.; CHEN, H. R.; LIN, J. Y., TSAI, W. Y.; CHENG, S. C. Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p.1029-103, 2002.

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 Research**, 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 & Development**, v. 13, n. 15, p. 1970-1982, 1999.

COURA, R. J.; CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 231-245, 2004.

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. **Molecular and Cell Biology**, 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 Journal**, v. 12, n. 3, p. 1239-1248, 1993.

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.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.113, p. 109-113, 2001.

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.

FABRIZIO, P.; LAGGERBAUER, B.; LAUBER, J.; LANE, W. S.; LÜHRMANN, R. An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. **EMBO Journal**, v. 16, n. 13, p. 4092-4106, 1997.

FAIRLAMB, A. H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 488-494, 2003.

FRAYHA, G. J.; SMYTH, J. D.; GOBERT, J. G.; SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **General. Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 273-299, 1997.

GANOT, P.; KALLESOE, T.; REINHARDT, R.; CHOURROUT, D.; THOMPSON, E. M. Spliced-leader RNA trans-splicing in a chordate, *Oikopleura dioica*, with a compact genome. **Molecular and Cell Biology**, v. 24, p. 7795-7805, 2004.

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. **RNAi**: a guide to gene silencing. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press, 2003. 436 p.

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.

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.

HERMANN, H.; FABRIZIO, P.; RAKER, V. A.; FOULAKI, K.; HORNIG, H.; BRAHMS, H.; LÜHRMANN, R. snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein interactions. **EMBO Journal**, v. 14, p. 2076-88, 1995.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems, review. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 24, p.13963-13966, 1989.

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

JANNIN, J.; VILLA, J. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 95-97, 2007

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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 496-504, 2004.

KOVACS, S.; O'NEIL, J.; WATCHARAPIJARN, J.; MOE-KIVAN, C.; VIJAY, S.; SILVA, V. Eubacterial components similar to small nuclear ribonucleoproteins and capped RNAs in a cyanobacterium and gram-positive eubacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 1871-78, 1993.

LAGGERBAUER, B.; LIU, S.; MAKAROV, E.; VORNLOCHER, H. P.; MAKAROVA, O.; INGELFINGER, D.; ACHSEL, T.; LÜHRMAN, R. The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2)

interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon tri-snRNP formation. **RNA**, v.11, n. 5, p. 598-608, 2005.

LI, D.; ROBERTS, R. WD-repeats proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human disease. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 58, p. 2085-2097, 2001.

LIU, Q.; LIANG, X. H.; ULIEL, S.; BELAHCEN, M.; UNGER, R.; MICHAELI, S. Identification and functional characterization of lsm proteins in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, 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.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. E. **Molecular cell biology**. 4 th ed. New York: W. H. Freeman, 2000. 1084 p.

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 Journal**, v. 16, n. 14, p. 4433-40, 1997.

LÜHRMANN, R.; KASTNER, B.; BACH, M. Structure of spliceosoma snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1087, p. 265-292, 1990.

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 & Development**, 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.; LUHRMANN, R. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. **Science**, v. 298, p. 2205-2208, 2002.

- MANDELBOIM, M.; ESTRAÑO, 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35210-35218, 2002.
- MARCHETTI, M. A.; TSCHUDI, C.; SILVA, E.; ULLU, E. Physical and transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* genome reveals a typical eukaryotic arrangement with close interspersion of RNA polymerase II and III – transcribed genes. **Nucleic. Acids. Research**, v. 26, n. 15, p. 3591-3598, 1998.
- 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. **Molecular Cell**, v. 6, n. 2, p. 317-328, 2000.
- MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n. 5, p. 501-501, 2005.
- McCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C.; TEASDALE, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 122-54, 2002.
- MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 401-404, 1999.
- 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. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, n. 1, p. 185-198, 2004.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2000. 494 p.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. **Gene Doc**: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. Disponível em: < <http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/gddl.htm>>. Acesso em: 18 nov. 2006.
- NILSEN, T. W. Trans-splicing: an update. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-6, 1995.
- NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. D. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-655, 2009.

NOTTROTT, S.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R. Hierarchical clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. **EMBO Jorunal**, 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.

O'MULLANE, L.; EPERON, I. C. The pre-mRNA 5' cap determines whether U6 small nuclear RNA succeeds U1 small nuclear ribonucleoprotein particle at 5' splice sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, p. 7510-7520, 1998.

OHL, M. D.; VAN DERKOOI, C. W.; ROSENBERG, J. A.; REN, L.; HIRSCH, J. P.; CHAZIN, W. J.; WALZ, T.; GOULD, K. L. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. **Molecular and Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 451-460, 2005.

OUAISSI, A.; OUAISSI, M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warszawa)**, n. 53, n. 2, p. 102-114, 2005.

PALFI, Z.; BINDEREIF, A. Immunological characterization and intracellular localization of trans-spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, n. 267, n. 28, p. 20159-20163, 1992.

PALFI, Z.; LANE, W. S.; BINDEREIF, A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 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 Research**, v. 33, n. 8, p. 2493-2503, 2005.

PALFI, Z.; LÜCKE, S.; LAHM, H. W.; LANE, W. S.; KRUF, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8967-8972, 2000.

PERIS, M.; SIMPSON, A. M.; GRUNSTEIN, J.; LILIENTAL, J. E.; FRECH, G. S.; SIMPSON, L. Native gel analysis of ribonucleoprotein complexes from a *Leishmania tarentolae* mitochondrial extract. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 9-24, 1997.

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. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 14, p. 6162-6171, 2004.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 649-657, 2006.

PRATA, A. Chaga's disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 8, p. 61-76, 1994.

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.

REUTER, K.; NOTTROT, S.; FABRIZIO, P.; LÜHRMANN, R.; FICNER, R. Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP specific 15 kD Protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, p. 515-525, 1999.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23985-23991, 1996.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. 11, n.3, p. 1041-1047, 2002.

SANCHES, L.T.G. **Efeitos do silenciamento de duas triptofanil-tRNA sintetases de *Trypanosoma brucei* mediante a RNA de interferência**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

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

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007. Supl. 1.

SCHNARE, M. N.; GRAY, M. W. A candidate U1 small nuclear RNA for Trypanosomatid Protozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 23691-23694, 1999.

SEGURA, E. L.; CURA, E. N.; ESTANI, S. A.; ANDRADE, J.; LANSETTI, J. C.; DE RISSIO, A. M.; CAMPANINI, A.; BLANCO, S. B.; GURTNER, R. E.; ALVAREZ, M. Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in young men from Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 353-362, 2000.

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 Journal**, 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 & Development**, v. 13, n. 15, p. 1983-1993, 1999.

SOUZA, G. M.; SILVA, A. M. SUCAST. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 58-63, 2002.

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

STEVENS, S. W.; ABELSON, J. Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins (pre-mRNA splicing & mass spectrometry). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 7226-7231, 1999.

STOVER, N. A.; STEELE, R. E. Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarian. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5693-5698, 2001.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 19361-19367, 1999.

STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Molecular and Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 1595-1604, 1999.

TARN, W. Y.; STEITZ, J. A. Modulation of 5' splice site choice in pre-messenger RNA by two distinct steps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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 Journal**, 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 Research**, v. 23, n. 3, p. 320-326, 1995.

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

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.

TSCHUDI, C.; ULLU, E. Destruction of U2, U4, or U6 small nuclear RNA blocks trans-splicing in trypanosome cells. **Cell**, v. 61, n. 3, p. 459-466, 1990.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the Trypanosome Spliced Leader cap structure in a homologous cell-free system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 20365, 1995.

URUSHIYAMA, S.; TANI, T.; OHSHIMA, Y. Isolation of novel pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 253, p. 118-127, 1996.

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

VIANNA, V. F.; AMBRÓSIO, D. L.; CICARELLI, R. M. B. Mapeamento de bandas de trans-splicing *in vitro* com extratos nucleares de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 2, p. 295-306, 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 Journal**, v. 25, n. 19, p. 4513-4523, 2006.

WILL, C. L.; LÜRHMANN, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 290-301, 2001.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. In GESTELAND, R. F. **The RNA world**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. p. 369-400.

WILL, C. L.; RÜMPLER, S.; GUNNEWIEK, J. K.; 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 Research**, v. 24, n. 23, p. 4614-4623, 1996.

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. **Journal of Biological Chemistry**, 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 Journal**, v. 23, p. 376-385, 2004.