

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

BRUNA VARGINHA RAMOS CAIADO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ORTÓLOGO DA
PROTEÍNA NOM1 EM *Trypanosoma brucei***

VIRTUS IMPAVIDA

RECIFE - PE

2011

BRUNA VARGINHA RAMOS CAIADO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ORTÓLOGO DA
PROTEÍNA **NOM1** EM *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strito sensu* do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis

Recife, PE

2011

Caiado, Bruna Varginha Ramos
Caracterização funcional do ortólogo da proteína NOM1 *Trypanosoma*
***brucei*/ Bruna Varginha Ramos Caiado. – Recife: O Autor, 2011.**

85 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Christian Robson de Souza Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2011.

Inclui bibliografia e apêndice

- 1. Genética dos microorganismos 2. Trypanosomatidae 3. Proteínas I. Título.**

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-200

BRUNA VARGINHA RAMOS CAIADO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ORTÓLOGO DA PROTEÍNA NOM1 EM
*TRYPANOSOMA BRUCEI***

APROVADO EM ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Tercílio Calsa Júnior, Doutor, Universidade Federal de Pernambuco

1º Examinador: Cássia Docena, Doutora, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

**2º Examinador: Janaína Viana de Melo, Doutora, Centro de Tecnologias
Estratégicas do Nordeste**

**Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Doutor, Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães**

**Coordenador: Valdir de Queiroz Balbino, Doutor, Universidade Federal de
Pernambuco**

Recife, PE

2011

Ao meu bem mais precioso: minha família!

AGRADECIMENTOS

Ao fim de mais essa etapa, agradeço aos que em momento algum saíram do meu lado, e me ajudaram assim, a superar todos os obstáculos que apareceram ao longo do percurso, minha família, Arnott, Roberta e Bárbara. Obrigada por todo amor e dedicação ao longo desse período. Também dedico este trabalho ao meu namorado Josué, pelas palavras pacientes e o ombro amigo sempre que precisei.

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio, que com seu brilhantismo me inspirou durante esses quatro anos de trabalho conjunto e tanto me ajudou em minha formação profissional. Sua genialidade, senso crítico e ética são valores que levarei como inspiração para meu futuro profissional. Gostaria de agradecer também ao meu co-orientador Christian Reis, por ser um guia durante minha dissertação e ter sido tão paciente nos momentos mais difíceis enfrentados ao longo desse percurso. Sou muito grata aos outros dois componentes do subgrupo da proteína NOM1, a doutoranda Danielle Moura e o biomédico Valdemir Júnior, pessoas essenciais para este trabalho, que ajudaram tanto na resolução de problemas de bancada, quanto a enfrentar as adversidades do dia-a-dia que são comuns na pesquisa e na vida.

Aos meus companheiros de trabalho, risadas, problemas, rotina: Amaranta, Arthur, Camila, Diego, Franklin, Janaína, João, Larissa, Livia, Ludmila, Mari, Marília, Tamara, Rodrigo, Rômulo. Sinto-me honrada por fazer parte de um grupo tão coeso e de pessoas tão singulares que acrescentaram muito durante a minha jornada. Gostaria de agradecer aos demais integrantes do departamento de microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Agradeço ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, que propiciou a realização dessa dissertação, cedendo não somente o espaço físico, como equipamentos de ponta. Esta instituição maravilhosa é um exemplo de como o Brasil pode realizar pesquisas avançadas com resultados bastante significativos. Gostaria de agradecer ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas financiadas pelo PDTIS. Também sou grata ao Departamento de Genética, pelos conhecimentos adquiridos e a experiência acumulada.

Aos meus irmãos: Adriane, Michelle, Leandro. É muito gratificante terminar mais essa etapa da minha vida com vocês ao meu lado. Os momentos de desabafo, discussões científicas, almoços e saídas para descontração foram essenciais para a continuidade da pesquisa, mesmo quando ela apresentava problemas. Às amigas:

Lívia, Mari, Manu, Paula e Rafaela. E às irmãs que moram distante, mas não foram menos importantes ao longo dessa caminhada: Camila, Paulinha, Isabela, Simone.

Gostaria de agradecer também a toda a torcida da minha família, avô, avó, tias, primas e primos queridos. Pessoas muito especiais que mesmo morando distante e trabalhando em áreas distintas sempre fizeram questão de acompanhar de perto o meu desenvolvimento profissional. Obrigada por todo o suporte e pela torcida!

“Genialidade é esforço”. (Goethe).

“O saber se aprende com os mestres.

A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”. (Cora Coralina).

“Toda decisão acertada é proveniente da experiência.
E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada.” (Albert Einstein).

RESUMO

A regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos é predominantemente pós-transcricional, ocorrendo através de mecanismos como controle da estabilidade e tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs). Em eucariotos a tradução é controlada principalmente no recrutamento dos ribossomos para os mRNAs, sendo mediada pelos fatores eucarióticos de iniciação da tradução (eIFs). Neste contexto, o reconhecimento dos mRNAs é realizado principalmente pelo complexo eIF4F, formado pelas subunidades eIF4E, eIF4A e eIF4G. O eIF4G é a proteína estruturadora do complexo, interagindo com o eIF4E e o eIF4A, além de outras proteínas, pois apresenta em sua estrutura inúmeros domínios de ligação, entre eles, o MIF4G e o MA3, responsáveis pela ligação ao eIF4A. A proteína eIF4G é o protótipo de uma família de polipeptídeos que apresentam estes domínios, onde foi incluída recentemente a proteína NOM1, proteína com localização nucleolar, identificada em pacientes que apresentavam Leucemia Mielóide Aguda, sendo encontrados ortólogos em diferentes espécies, incluindo os tripanossomatídeos. Em trabalhos prévios, os genes da NOM1 de *T.brucei* e *L.major* foram clonados em vetores de expressão e a proteína recombinante *TbNOM1* foi utilizada para imunização de coelhos. No presente trabalho, iniciamos a caracterização funcional da *TbNOM1*, demonstrando que a proteína é capaz tanto de interagir com os homólogos do eIF4A de *T.brucei*, como de formar dímeros ou estruturas mais complexas de ligação *TbNOM1-TbNOM1*. Sua expressão é constante durante todo o ciclo celular na forma procíclica e na forma sanguínea é expressa em maior concentração entre 0 e 6 horas, não sendo regulada por fosforilação em suas formas nativas. A localização subcelular da proteína *TbNOM1* é citoplasmática, tendo sido confirmada em experimentos de imunofluorescência, fracionamento celular e superexpressão de proteína fluorescente. Outro aspecto relevante avaliado foi que a *TbNOM1* é uma proteína não essencial, uma vez que sua depleção mediada por interferência de RNA, não afeta de forma significativa a viabilidade celular. Neste trabalho iniciou-se a caracterização funcional da *TbNOM1*, sendo necessário a realização de outras abordagens metodológicas para dar prosseguimento a este processo de investigação.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos, NOM1, MIF4G, MA3

ABSTRACT

The regulation of gene expression in trypanosomatids is predominantly post-transcriptional, occurring through mechanisms such as stability control and translation of messenger RNAs (mRNAs). Translation in eukaryotes is mainly controlled in the recruitment of ribosomes to mRNAs, mediated by eukaryotic translation initiation factors (eIFs). In this context, the recognition of mRNAs is accomplished primarily by eIF4F complex formed by subunits eIF4A, eIF4E and eIF4G. The eIF4G is a scaffolding protein which binds to the other subunits (eIF4A and eIF4E), of the complex as well as to other translation initiation factors. The MA3 and MIF4G domains are responsible for binding to eIF4A. The eIF4G protein is the prototype of a polypeptides family that have these domains, in which NOM1 protein was recently included, with a nucleolar localization, identified in patients with acute myeloid leukemia, with orthologs found in different species, including trypanosomatids. In previous work, the genes of the NOM1 protein in *T. brucei* and *L. major* were cloned into expression vectors and the his-tagged recombinant was then used for production of polyclonal antiserum in rabbit. In this study, we initiated the functional characterization of *Tb*NOM1, demonstrating that the protein is able to interact with homologues of eIF4A in *T. brucei*, and to each other. The results indicated that NOM1 is expressed in a constitutive way in *T. brucei* procyclic form but as a bloodstream form it's expressed in a higher concentration between 0 and 6 hours and it's not regulated by phosphorylation in their native format. The subcellular localization of the protein *Tb*NOM1 is cytoplasmic and was confirmed in immunofluorescence, cell fractionation and fluorescent protein overexpression experiments. Another important aspect that was evaluated by depletion of *Tb*NOM1 mediated by interference RNA is that this protein is not essential, since it doesn't significantly affect cell viability. This work has initiated the functional characterization of *Tb*NOM1, being necessary the implementation of other methodological approaches in order to continue this process of investigation.

Key words: Trypanosomatids, NOM1, MIF4G, MA3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo Biológico do <i>T. brucei</i>	17
Figura 2. Representação dos genes de <i>L. major</i> , <i>T. brucei</i> e <i>T. Cruzi</i>	19
Figura 3. Transcrição policistrônica nos tripanossomatídeos.....	21
Figura 4. Mecanismo de <i>trans-splicing</i>	22
Figura 5. Mecanismo de iniciação da tradução cap dependente.....	30
Figura 6. Estrutura da proteína eIF4G.....	31
Figura 7. Homólogos da proteína NOM1 em diversos organismos.....	37
Figura 8. Purificação das proteínas <i>TbNOM1/His</i> e <i>TbNOM1/GST</i>	56
Figura 9. Tradução <i>in vitro</i> das proteínas <i>TbNOM1</i> , <i>TbEIF4AI</i> e <i>TbEIF4AIII</i>	57
Figura 10. Análise de interação entre a proteína <i>TbNOM1</i> radioativa (*) e as proteínas <i>TbEIF4AI</i> e <i>TbEIF4AIII</i> fusionadas a GST.....	59
Figura 11. Teste de reconhecimento do anti- <i>TbNOM1</i>	61
Figura 12. Teste de reconhecimento da proteína <i>LmNOM1</i>	61
Figura 13. Curva de expressão da proteína <i>TbNOM1</i> na forma procíclica de <i>T. brucei</i>	62
Figura 14. Curva de expressão da proteína <i>TbNOM1</i> na forma sanguínea de <i>T. brucei</i>	63
Figura 15. Ensaio de purificação de proteínas fosforiladas.....	64
Figura 16. Localização da proteína <i>TbNOM1</i> pela técnica de fracionamento das células de <i>T. brucei</i>	65
Figura 17. Análise da localização subcelular da NOM1 em <i>T. brucei</i>	66
Figura 18. Visualização dos produtos de PCR para o gene <i>TbNOM1</i> flaqueado pelo sítios <i>Hind</i> III / <i>Bam</i> HI.....	67
Figura 19. Confirmação da clonagem do gene <i>TbNOM1</i> no pGEM T-easy.....	68
Figura 20. Localização celular da proteína <i>TbNOM1</i> por EYFP.....	69
Figura 21. RNAi da proteína <i>TbNOM1</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Homólogos de eIF4G identificados em tripanossomatídeos	39
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>TbNOM1</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

Bam HI - Endonuclease de restrição de *Bacillus amyloli*

BSA - Albumina sérica bovina

BSF - Forma Sanguínea de *T. brucei*

CTIF - Fator de Iniciação da Tradução Dependente do CBP80/20

CTP - Citosina trifosfato

DAP5 - Proteína associada a morte celular 5

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

dATP - Desoxiadenosina trifosfatada

DCT - Domínio C-terminal

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNT - Domínio N-terminal

DSE - Elemento de sequência a jusante

eIF - Fator de Iniciação Eucariótico

EJC - Complexo de Junção dos Éxons

eRF - Fatores de liberação eucarióticos

EYFP - Proteína de fluorescência amarela aumentada

GTP - Guanosina trifosfato

GST - Glutathiona S-transferase

HEAT - *Huntingtin, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2A, Target of rapamycin*

Hind III - Endonuclease de restrição de *Haemophilus influenzae*

IMDM - Isgove's Modified Dulbecco's Medium

IPTG - *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

IRES - Sítio de entrada do ribossomo

kDa - kilo Dalton

LB - Meio de cultura Luria-Bertani

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

MA3 - Domínio presente nas proteínas eIF4G/NOM1

Mb - Megabases

Met-tRNAⁱ - RNA transportador contendo o códon de início Metionina

MIF4G - Domínio central do fator de iniciação eucariótico 4G

Miniprep - Minipreparação de plasmídeo bacteriano contendo o gene clonado

mM - Mili Molar

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

mRNP - Partículas ribonucleoprotéicas mensageiras

NLS - Sinal de localização nuclear

NMD - Decaimento de mRNA mediado por sequência sem sentido

NOM1 - Proteína de localização nucleolar contendo o domínio MIF4G 1

Not I - Endonuclease de restrição de *Nocardia otitidis cavium*

OD - Densidade óptica

ORF - Quadro de leitura aberto

P- Sítio Peptidil

PABP - Proteína de ligação a cauda poli(A)

Pb - Pares de bases

P bodies - Corpos de processamento

PBS - Tampão Fosfato Salino

PCF - Forma procíclica de *T. brucei*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PDCD4 - Proteína de programação da morte celular 4

pET21a - Vetor de clonagem

Pfx Polymerase - Enzima da espécie *Pyrococcus sp.*

pGEM T-easy - Vetor de Clonagem

pGEX4T3 - Vetor de Clonagem

PIC - Complexo de pré iniciação

PP1 - Proteína fosfatase I

PTC - Códon de Término Prematuro

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

RF - Fatores de liberação

RNAi - RNA de interferência

RNase - Enzima que degrada RNA

rRNA - RNA ribossômico

SD - Shine-Dalgarno

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS – PAGE - Gel de poli(acrilamida em condições desnaturantes

SL - *Splice leader*

SLIP1 - *Stem Loop Binding Protein- interacting protein 1*

SRP - Partícula de Reconhecimento de Sinal

Taq Polymerase - Enzima da espécie *Thermus aquaticus*

TBP - Proteína de ligação ao sítio TATA-box

TBS - Solução salina tamponada com Tris

TCA - Ácido Tricloracético

tRNA - RNA transportador

URE - Elementos instáveis ricos em U

UTP – Uracila trifosfato

UTR - Regiões não traduzidas

VSG - Glicoproteína de superfície variante

X-GAL - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Tripanossomatídeos.....	14
2.1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	14
2.1.2 Gênero <i>Trypanosoma</i> e doença do sono	15
2.1.3 Ciclo de Vida	16
2.1.4 <i>Trypanosoma brucei</i> – Modelo de estudo	17
2.2 Aspectos relevantes da biologia molecular dos Tripanossomatídeos	18
2.2.1 Organização Genômica.....	18
2.2.2 Transcrição	19
2.2.3 <i>Trans-splicing</i>	21
2.2.4 Regulação da expressão gênica	23
2.3 Tópicos selecionados do metabolismo dos mRNAs nos eucariotos	25
2.3.1 Complexo de junção dos éxons (EJC)	25
2.3.2 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD).....	26
2.3.3 Mecanismos de degradação de mRNAs e grânulos citoplasmáticos	27
2.3.4 Síntese protéica	28
2.4 Família eIF4G de proteínas contendo os domínios MIF4G e MA3	31
2.4.1 eIF4G e o complexo eIF4F de iniciação da tradução	31
2.4.1.1 A RNA helicase eIF4A.....	33
2.4.2 Homólogos do eIF4G de função diferenciada.....	34
2.4.3 NOM1 (Proteína nucleolar com domínio MIF4G 1)	35
2.5 Homólogos do eIF4G em tripanossomatídeos	38
2.5.1 Ortólogos da proteína NOM1 em tripanossomatídeos.....	40
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42

4.1	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	42
4.2	Diálise das proteínas	43
4.3	Transcrição e expressão dos mRNAs sintéticos	43
4.4	<i>Pull-down</i>	45
4.5	Purificação de anticorpos por imunoadsorção.....	45
4.6	Ensaio de <i>Western blot</i>	46
4.7	Cultivo de células.....	47
4.8	Curva de crescimento celular	47
4.9	Purificação de fosfoproteínas	48
4.10	Fracionamento celular	49
4.11	Imunofluorescência.....	49
4.12	PCR e clonagem no vetor pGEM T-easy.....	50
4.13	Subclonagem do gene <i>TbNOM1</i> nos vetores p2216 e p2T7-177	52
4.14	Transfecções	53
4.15	Localização subcelular por proteína fluorescente.....	53
4.16	Interferência de RNA	54
5.	RESULTADOS	55
5.1	Análise da interação entre os ortólogos NOM1/eIF4A de <i>T. brucei</i>	55
5.1.1	Obtenção das proteínas recombinantes de fusão	55
5.1.2	Obtenção das proteínas marcadas radioativamente	57
5.1.3	Ensaio de ligação proteína-proteína	58
5.2	Análise da expressão, fosforilação e localização subcelular da proteína NOM1 nativa de <i>T. brucei</i>	59
5.2.1	Avaliação da sensibilidade de anticorpos policlonais anti- <i>TbNOM1</i>	60
5.2.2	Análise da curva de crescimento celular de <i>T. brucei</i>	61
5.2.3	A proteína <i>TbNOM1</i> não é regulada por fosforilação após a tradução.....	63
5.2.4	Ensaio para determinação da localização subcelular em <i>T. brucei</i>	63
5.3	Análise do efeito da depleção ou superexpressão da proteína <i>TbNOM1</i> em células procíclicas de <i>T. brucei</i>	65

5.3.1 Clonagem e subclonagem do gene <i>TbNOM1</i> em vetores de transfecção de <i>T. brucei</i>	66
5.3.2 Expressão da proteína fluorescente amarela (EYFP).....	67
5.3.3 Análise da viabilidade celular das células de <i>T. brucei</i> por interferência de RNA.....	68
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
9. MEMORIAL	83
9.1 Graduação.....	83
9.2 Pós-Graduação.....	85

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos são protozoários eucariotos e possuem dois gêneros (*Leishmania* e *Trypanosoma*) com importância médica, por serem agentes de doenças como as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono. Essas enfermidades são mais comuns nos países subdesenvolvidos afetando milhares de pessoas e seus tratamentos são tóxicos e inespecíficos. Atualmente, não recebem muita atenção dos governantes, sendo consideradas doenças negligenciadas.

Os tripanossomatídeos apresentam semelhanças e diferenças em relação a outros eucariotos. Entre as particularidades do ponto de vista molecular podem ser citadas a presença dos mecanismos: transcrição policistrônica, processamento de mRNA por *trans-splicing* e a regulação da expressão gênica pós-transcricional. Diferentes estudos mostram que dois mecanismos estão envolvidos nesta regulação: o controle da estabilidade e a tradução dos mRNAs. Na tradução, a informação contida na molécula de mRNA é utilizada para a síntese de proteínas. Este evento pode ser dividido em três etapas, Iniciação, Elongação e Terminação, sendo a iniciação a fase mais complexa e o principal alvo de mecanismos de regulação.

A iniciação da tradução em eucariotos tem como ponto de partida a formação do complexo eIF4F (fator de iniciação da tradução 4F), constituído pelas subunidades eIF4E (proteína que se liga ao cap dos mRNAs na sua extremidade 5'), eIF4A (possui atividade RNA helicase) e eIF4G (proteína mantenedora do complexo). A proteína eIF4G interage com as proteínas eIF4A e eIF4E. O complexo eIF4F promove a interação entre a subunidade menor do ribossomo e o mRNA. A proteína eIF4G possui diversos domínios de ligação, entre eles os domínios MIF4G e MA3 que permitem a interação eIF4G/eIF4A. Nosso grupo de pesquisa vem estudando o processo de iniciação da tradução em tripanossomatídeos, identificando e caracterizando homólogos do complexo eIF4F.

Em um estudo com pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) que apresentavam translocação dos cromossomos 7;12 foi descrita uma proteína denominada de NOM1 (*nucleolar protein with MIF4G domain 1*- proteína nucleolar com domínio MIF4G 1), que se localiza no nucléolo de células humanas e possui uma estrutura conservada em diferentes organismos eucarióticos, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Mus musculus*. Esta proteína está inserida na mesma família do eIF4G por apresentar os

domínios MIF4G e MA3. Embora esses domínios sejam mais divergentes em sequência do que os já observados em outras proteínas da família, a estrutura conservada, principalmente, do domínio MIF4G permite incluir a NOM1 neste grupo. Até o momento a sua função é desconhecida em eucariotos, mas acredita-se que ela possa estar envolvida em mecanismos como: apoptose, transformação, crescimento celular e regulação da tradução, como encontrado em peptídeos da sua família. Entretanto, sua localização nucleolar pode sugerir diferenças em comparação com outros homólogos que possuem localização citoplasmática.

A identificação de ortólogos da NOM1 com domínios (MIF4G/MA3) conservados em tripanossomatídeos indica uma relevante conservação ao longo da evolução e sugere um papel fundamental deste peptídeo na sobrevivência das células eucarióticas, como um todo. O estudo da proteína NOM1 em *Leishmania major* (*LmNOM1*) e *Trypanosoma brucei* (*TbNOM1*) pode então contribuir para a compreensão de sua função em processos biológicos típicos destes protozoários, bem como nos demais eucariotos de uma forma geral.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi realizada a clonagem do gene *TbNOM1* nos vetores plasmidiais de expressão pET21a e pGEX4T3, com a subsequente produção das proteínas em *Escherichia coli* fusionadas a cauda de Histidina e a GST respectivamente. A proteína recombinante *TbNOM1* fusionada a uma cauda de Histidinas foi utilizada para imunização de coelhos e obtenção do soro policlonal.

No presente trabalho, utilizando os anticorpos policlonais anti-*TbNOM1*, foram realizados ensaios de localização subcelular a partir de lisados celulares (fração citoplasmática e nuclear) e imunocitoquímica. Dando continuidade, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína do tipo *Pull-down* entre as proteínas *TbNOM1* e *TbEIF4A1/TbEIF4AIII*. Em outra etapa, foram avaliadas a viabilidade de células submetidas a interferência de RNA (depleção das moléculas de mRNA/proteína da *TbNOM1*) e a purificação de fosfoproteínas do parasita para identificar se a proteína de estudo poderia se apresentar sob a forma fosforilada. Os resultados alcançados constituem uma contribuição inicial para compreensão da função da proteína NOM1 em tripanossomatídeos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRIPANOSSOMATÍDEOS

Kinetoplastídeos são um grupo de protozoários flagelados caracterizados pela presença de uma organela denominada kinetoplasto. Essa estrutura foi inicialmente observada através de microscópio óptico, como sendo um grânulo basófilo localizado nas proximidades do flagelo destes organismos. Somente 60 anos depois, com o recurso da microscopia eletrônica, foi esclarecido que o kinetoplasto é uma estrutura rica em DNA presente na grande e única mitocôndria desses protozoários (Maslov *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2008).

Os kinetoplastídeos incluem espécies de vida-livre, patógenos de invertebrados, vertebrados e plantas. Tradicionalmente a ordem Kinetoplastida é dividida em duas subordens: Bodonina e Trypanosomatina. Nela estão classificados os tripanossomatídeos (pertencentes à família Trypanosomatidae), um grupo de patógenos parasitas (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*) de uma série de animais e plantas. A classificação é baseada na morfologia e nos ciclos de vida desses protozoários. Em geral, os tripanossomatídeos apresentam mais de um estágio de desenvolvimento, variando de células livres, capazes de se modificar, para formas de cistos - as formas que dependem de um ou dois organismos hospedeiros. Para a sobrevivência em um espectro tão grande de hospedeiros e habitats distintos, é necessário que eles possuam aspectos bioquímicos, genéticos e morfológicos diferenciais, possibilitando assim seu desenvolvimento e adaptação adequada em cada fase do seu ciclo de vida (Maslov *et al.*, 2001; Clayton, 2002; Campbell *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2006).

2.1.1 GÊNERO LEISHMANIA

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, baseado na localização do parasita no intestino do inseto vetor. São conhecidas em torno de 30 espécies de *Leishmania* até o momento e dessas, aproximadamente, 20 são patogênicas para humanos. Os protozoários desse gênero são responsáveis pelas leishmanioses, um grupo de doenças com diversos padrões epidemiológicos e clínicos de manifestação. Na maior parte dos casos, as leishmanioses são zoonoses, tendo o homem como um hospedeiro acidental. Os hospedeiros vertebrados naturais são os

mamíferos das ordens: Edentata, Carnívora, Hyracoidea, Rodentia, Primatas, Marsupialia e Perissodactyla (Dantas-Torres *et al.*, 2007; Banuls *et al.*, 2007).

As *Leishmania sp* são transmitidas através da picada de um inseto vetor que tenha se alimentado, previamente, de um mamífero infectado pelo parasita, causando as leishmanioses. Em raras situações, o protozoário pode ser disseminado por compartilhamento de agulhas, transfusão sanguínea e de forma congênita. Diferentes espécies de *Leishmania* podem infectar macrófagos, resultando em doenças com padrões clínicos e prognósticos distintos. Como os sintomas podem ser muito variados, existe uma divisão da leishmaniose em quatro tipos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (Killick-Kendrick, 1999; Boelaert *et al.*, 2000; Chappuis *et al.*, 2007; Reithinger *et al.*, 2007).

2.1.2 GÊNERO *TRYPANOSOMA* E DOENÇA DO SONO

No gênero *Trypanosoma* são encontradas diversas espécies que causam doenças veterinárias importantes, mas apenas duas delas são responsáveis por enfermidades de grande impacto em humanos. Neste gênero destacam-se o *Trypanosoma brucei*, encontrado na África, sendo o agente etiológico da tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono, e o *Trypanosoma cruzi*, que ocorre na América, agente etiológico da tripanossomíase americana mais conhecida como doença de Chagas (Barret *et al.*, 2002).

A doença do sono, assim como as leishmanioses, se enquadra no grupo de doenças negligenciadas e pode ser fatal se não tratada. Sua transmissão ocorre por um inseto vetor, a mosca tsé-tsé, do gênero *Glossina*, que habita exclusivamente a África, desde o sul do Saara até o norte do deserto do Kalahari. Seu diagnóstico, assim como os tratamentos existentes, é muito ineficaz. As drogas utilizadas possuem as características de serem tóxicas, caras e pouco efetivas (Balmer *et al.* 2006; Garcia *et al.*, 2006).

Existe uma divisão do *T. brucei* em três subespécies, mas apenas duas são agentes etiológicos da doença do sono. O *T. brucei gambiense* causa a forma crônica da doença e é encontrado no oeste e parte central da África, já a infecção por *T. brucei rhodesiense* resulta na forma aguda, sendo este localizado ao leste e sul da África. Após a infecção por ambas as subespécies, o parasita multiplica-se localmente por três

dias, desenvolvendo-se um inchaço edematoso, denominado cancro tripanossômico, que desaparece em torno de três semanas. Posteriormente, o tripanossoma se dissemina na corrente sanguínea e ativa a resposta imune, que não é muito efetiva devido a grande capacidade de modificação das proteínas expressas na superfície deste protozoário. Assim, os organismos que sobrevivem ao combate do sistema imune causam uma nova parasitemia e há o recomeço do ciclo. A intensa produção de anticorpos resulta na formação de complexos e ativação do sistema complemento, que por ser exacerbada devido a grande quantidade de parasitas, resulta em edemas e microenfartes no cérebro. Posteriormente, surgem sintomas neurológicos e meningoencefalite com retardação mental. Na infecção por *T. brucei gambiense*, o cérebro é afetado em geral após seis meses do início da doença, enquanto o *T. brucei rhodesiense* pode atingi-lo após algumas semanas. Os sintomas típicos dessa piora no quadro clínico são as convulsões epiléticas, sonolência e apatia, levando, progressivamente, ao coma (Barret *et al.*, 2002; Markell *et al.*, 2003).

2.1.3 CICLO DE VIDA

A espécie *T. brucei* é um parasita digenético, possuindo um ciclo de vida alternado entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado, onde o protozoário passa por modificações que facilitam sua sobrevivência em cada fase desse ciclo de vida (Pfister *et al.*, 2006). No hospedeiro vertebrado, ele apresenta-se na forma tripomastigota sanguínea, capaz de se proliferar através de divisão binária. Ao ser ingerido pelo inseto (hospedeiro invertebrado), no momento do repasto sanguíneo, ele se diferencia na forma tripomastigota procíclico (*procyclic form* - PCF), forma que permite sua sobrevivência no lúmen do sistema digestivo do vetor. Neste inseto infectado, o ciclo de vida do parasita continua passando por uma série de mudanças, quando chega às glândulas salivares o tripomastigota procíclico dá origem então à forma infectiva metacíclica, que é inoculada no hospedeiro vertebrado no momento do repasto sanguíneo. Quando, em contato com a corrente sanguínea, as células metacíclicas se diferenciam na forma sanguínea (*bloodstream form* - BSF), que possui uma multiplicação assexuada e se espalha pelo sangue, linfonodos, fluido espinhal e, em um estágio mais avançado da infecção, pelo sistema nervoso central. No pico de parasitemia, algumas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em uma forma menor, que é sugada pelo inseto, reiniciando o ciclo (Figura 1) (Pfister *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2008).

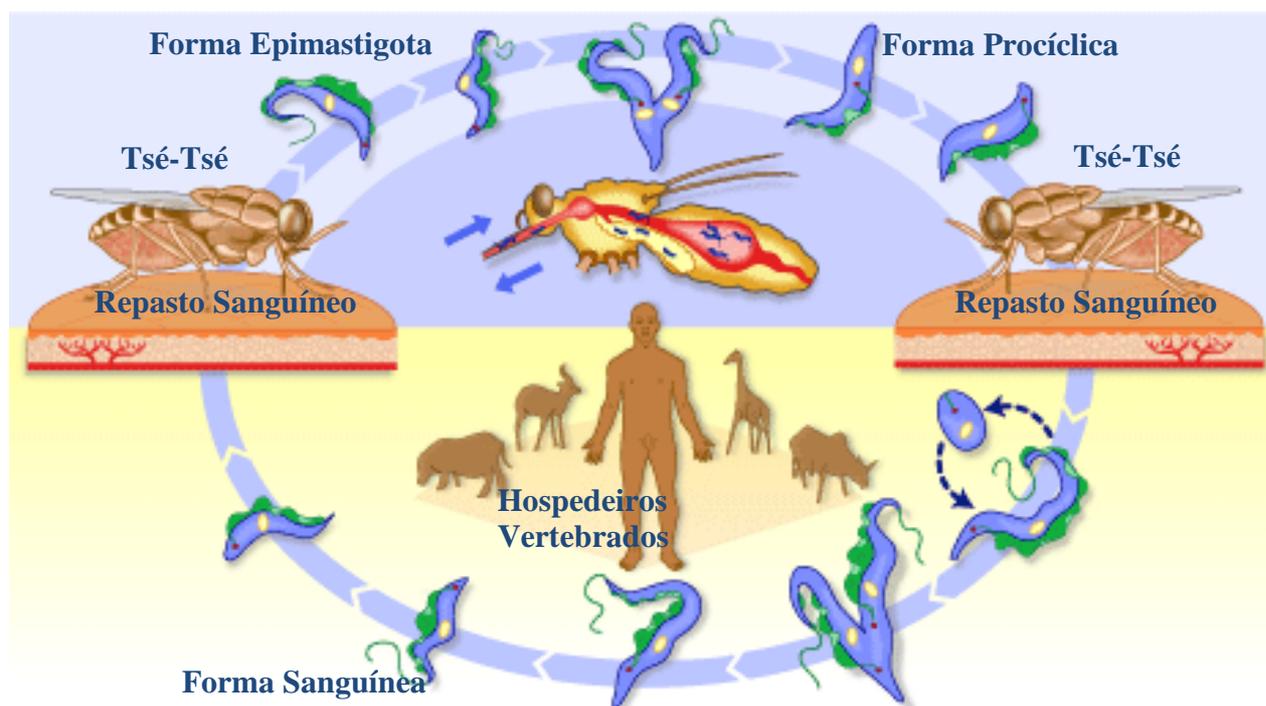


Figura 1. Ciclo Biológico do *T. brucei*. A forma procíclica do parasita *Trypanosoma brucei* é transmitida pelo inseto Tsé-Tsé. No hospedeiro vertebrado ela se diferencia na forma sanguínea, que é posteriormente ingerida com o repasto sanguíneo das moscas. No hospedeiro invertebrado o protozoário se diferencia para forma epimastigota para sobrevivência no lúmen do inseto vetor. Após sucessivas divisões há um retorno à forma procíclica, dando continuidade ao ciclo de infecção. Adaptado do site: <http://www.who.int/tdroid/diseases/tryplifecycle.htm>, Acesso: 04/2011.

2.1.4 *TRYPANOSOMA BRUCEI* - MODELO DE ESTUDO

Além do acometimento de 35 países africanos com a doença do sono, o parasita *T. brucei* chama a atenção por ser um excelente modelo de estudo em muitos aspectos da biologia celular dos tripanossomatídeos, incluindo morfologia e estrutura celulares, posicionamento de organelas, divisão celular e transporte de proteínas. Além disso, os tripanossomas possuem um complexo ciclo de vida que precisa ser adaptado a ambientes divergentes, como: sangue de mamíferos e compartimentos dos insetos tsé-tsé. Esses eventos de diferenciação requerem mudanças estágio específicas de processos celulares básicos, em resposta a estímulos ambientais e devem ocorrer em uma única célula. A maioria dos estudos com esses parasitas é focada em suas formas procíclica (PCF) e sanguínea (BSF) por serem mais facilmente cultivadas. Técnicas como deleção gênica (*knockouts*) através de recombinação, RNA de interferência e expressão regulada de proteínas heterólogas foram estabelecidas em *T. brucei* e são utilizadas de forma rotineira (Matthews, 2005).

2.2 ASPECTOS RELEVANTES DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

2.2.1 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

A publicação das sequências genômicas e estudos proteômicos de três espécies de protozoários kinetoplastídeos foi um avanço científico significativo e gerou novas perspectivas para estudos terapêuticos e de alvos para vacinas contra os agentes da leishmaniose, doença do sono africana e doença de Chagas (Kissinger, 2006).

Os genomas haplóides de *T. brucei*, *L. major* e *T. cruzi* contêm de 25 a 55 megabases (Mb), distribuídas em 11 a 36 cromossomos diplóides. Neles existem, respectivamente, em torno de 8.100, 8.300 e 12.000 genes codificantes de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005). Os genomas dos três parasitas compartilham 6.158 ortólogos de genes codificantes (Figura 2) e inúmeros domínios funcionais de proteínas. A maioria desses genes se localiza em largos blocos sintênicos que contêm 80% dos genes de *T. brucei* e 93% dos de *L. major*. Esses dados são surpreendentes, considerando que esses organismos divergiram entre 200 e 500 milhões de anos atrás e diferem nos vetores utilizados, estratégias para evasão do sistema imune, tecidos alvo e patogênese (Ghedini *et al.*, 2004; El-Sayed *et al.*, 2005; Ginger, 2005; Kissinger, 2006). Além disso, o alinhamento das sequências de aminoácidos dos genes ortólogos revelou uma identidade de 57% entre *T. brucei* e *T. cruzi* e 44% entre *L. major* e as outras duas espécies de tripanossoma, refletindo a já esperada relação de filogenia entre eles (El-Sayed *et al.*, 2005). No gênero *Leishmania*, onde existe uma estimativa de 20-100 milhões de anos de separação entre *L. Viannia* spp. e *L. Leishmania* spp., a sintenia é conservada em mais de 99% dos genes dos três genomas. A identidade de aminoácidos entre *L. major* e *L. infantum* é de 92% e entre *L. infantum* e *L. brasiliensis* 77% (Peacock *et al.*, 2007; Lynn *et al.*, 2008).

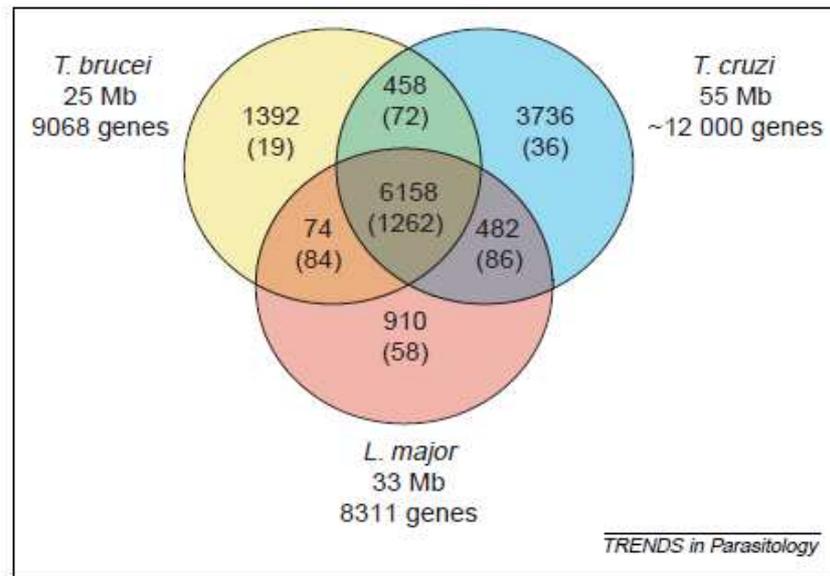


Figura 2. Representação dos genes de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Os genomas dos parasitas *L. major* (vermelho), *T. brucei* (amarelo) e *T. cruzi* (azul), são comparados, mostrando a quantidade de genes total contido em cada um deles, o número de genes compartilhados e os restritos a cada espécie. Fonte: Kissinger, 2006.

Acredita-se que as diferenças entre as patologias causadas pelos tripanossomatídeos se dão pela existência de genes específicos de cada espécie que interrompem a sintonia observada entre os organismos. A biologia espécie-específica se manifestaria, assim, de formas diversas: mudanças na regulação gênica provocadas por mutações; expansão ou divergência de famílias gênicas como consequência de duplicações em *tandem*; perda gênica ou aquisição através de transferência lateral (Ginger, 2005). Os rearranjos podem ainda ser ocasionados por inversões e/ ou translocações, que geram diferenças em proteínas de cada uma das espécies. Em alguns casos de *T. brucei* é possível que os rearranjos sejam causados por fusões em seus cromossomos (El-Sayed *et al.*, 2005).

2.2.2 TRANSCRIÇÃO

Uma característica relevante dos tripanossomatídeos é que os seus genes estão organizados em blocos que são co-transcritos em mRNAs policístrônicos. Os níveis de transcrição no policístron não variam muito, aparentemente, e a diversidade dos mRNAs maduros deve ser determinada pelo número de cópias dos genes e por diferenças na estabilidade dos mRNAs (Kramer e Carrington, 2011; Martínez-Calvillo *et al.*, 2009; Campbel *et al.*, 2003). Embora os genes estejam em policístrons, uma ordem

gênica racional não é encontrada na maioria dos casos em tripanossomatídeos, sendo assim, não há a codificação de proteínas relacionadas (como ocorre em operons de bactérias e nematóides).

Três classes de RNA polimerases eucarióticas (I, II e III) são encontradas no núcleo dos tripanossomatídeos, onde também foi identificada uma RNA polimerase mitocondrial, responsável pela transcrição dos maxicírculos de DNA mitocondrial (Palenchar e Bellofatto *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2000). A RNA polimerase I (RNAPI) transcreve os blocos gênicos de pré-rRNA (18S, 5.8S e 28S) e também transcreve dois mRNAs em *T. brucei*, as glicoproteínas variantes de superfície (VSGs), da forma sanguínea do parasita e as prociclinas (EPs e GPEETs), presentes na forma procíclica. Já a RNA polimerase II (RNAP II) transcreve tanto os mRNAs como um transcrito característico destes protozoários, denominado de *Spliced Leader* (SL), que contém um cap modificado, denominado cap 4 (m7Gpppm6,2AmpAmpCmpm3Um), na sua extremidade 5'. A RNA polimerase III (RNAP III) é responsável pela transcrição dos tRNAs, 5S RNA e snRNAs ricos em U (Das *et al.*, 2008; Palenchar e Bellofatto *et al.*, 2006).

Nos tripanossomatídeos há, de uma forma geral, uma escassez de homólogos aos fatores de transcrição. Um dos poucos fatores caracterizados foi a proteína de ligação ao *TATA-box* (TBP), muito importante para o funcionamento das polimerases (Campbell *et al.*, 2003). Seus genes, em geral, não possuem íntrons, exceto em apenas quatro exemplos (Ivens *et al.*, 2005), sendo separados uns dos outros por regiões intergênicas e reunidos em grupos contíguos que seguem uma mesma orientação na fita do DNA. Estes grupos podem conter dezenas de genes que codificam proteínas não-relacionadas do ponto de vista funcional (Figura 3) (El-Sayed *et al.*, 2005). Resumidamente, a transcrição policistrônica se inicia bidireccionalmente e segue em sentidos opostos. Todos os genes são transcritos a níveis basais pela RNA polimerase II e a regulação dos produtos gênicos se dá em fases pós-transcricionais. (Haile e Papadopoulou, 2007; Palenchar e Bellofatto *et al.*, 2006; Ivens *et al.*, 2005; Martinez-Calvillo *et al.*, 2004).

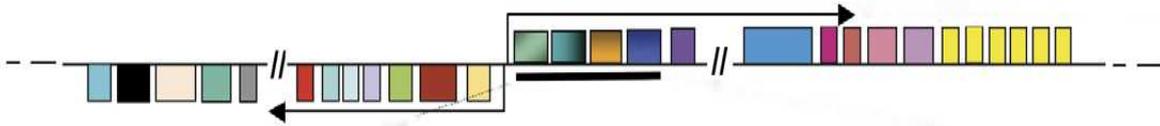


Figura 3. Transcrição policistrônica nos tripanossomatídeos. Blocos gênicos não-relacionados estão agrupados em fitas distintas do DNA e são bidirecionalmente transcritos pela ação da RNAP II, a partir de regiões de troca de fitas. Adaptado de Haile e Papadopoulou, 2007.

2.2.3 TRANS-SPLICING

O mecanismo de *trans-splicing* (processamento em *trans* dos mRNAs) foi descoberto há 20 anos, quando foi constatado que os mRNAs, das diversas glicoproteínas de superfície em *T. brucei*, possuíam uma sequência comum de 39 nucleotídeos, denominada sequência *Spliced Leader* (SL). Com o avanço dos estudos de biologia molecular nesses parasitas, foi estabelecido que todos os mRNAs de tripanossomatídeos são editados pelo *trans-splicing* (Liang *et al.*, 2004). Este processo ocorre através de reações de *trans*-esterificação em dois passos, sendo análoga ao *cis-splicing* (processamento em *cis* convencional dos mRNAs eucarióticos, necessário para a retirada dos íntrons), mas com a formação de uma estrutura intermediária em Y (Figura 4), ao invés de em laço (Liang *et al.*, 2004).

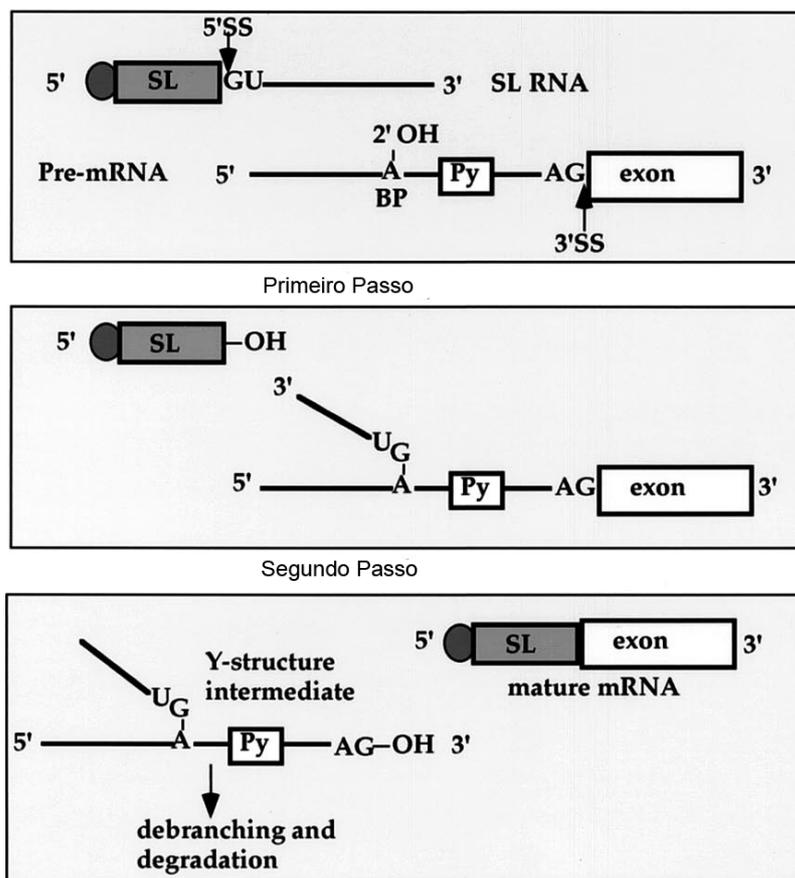


Figura 4. Mecanismo de *trans-splicing*. Representação esquemática do *trans-splicing* onde os sítios 5' (GU) no RNA SL e o 3' (AG) no pré-mRNA são indicados. SL= *Spliced Leader*. Fonte: Liang *et al.*, 2004.

Uma das principais características do RNA SL é a presença da estrutura cap hipermodificada, nomeada de cap 4 devido aos quatro nucleotídeos modificados encontrados após o 7-metilguanosina. Este é adicionado a extremidade 5' da sequência SL durante sua maturação, anteriormente ao processo de *trans-splicing* (Clayton e Shapira, 2007; Liang *et al.*, 2004). Em muitos eucariotos, a região aceptora do *splicing* é caracterizada por motivos bem definidos, incluindo trechos ricos em pirimidinas e o dinucleotídeo AG. (LeBowitz *et al.*, 1993). Essas mesmas sequências polipirimidínicas (ricas em uridinas) servem como sinais para o *trans-splicing* e parecem estar envolvidas na poliadenilação (Clayton, 2002). Em tripanossomatídeos, os sítios de poliadenilação estão localizados de 100 a 300 nucleotídeos anteriores ao local de *trans-splicing* do mRNA.

Através de estudos aprofundados acerca da maturação dos mRNAs, foi possível mostrar que o processamento de mRNAs policistrônico acoplado à transcrição não é universal em tripanossomatídeos. Em alguns casos, sinais presentes em regiões

intergênicas ou não traduzidas facilitam o escape dos mecanismos de *trans-splicing*/poliadenilação. Esse mecanismo gera RNAs intermediários, como dicistrons e mRNAs com sequências 3' UTRs longas, que podem ser posteriormente processados pelos mecanismos convencionais citados acima, mas resultam em mRNAs monocistrônicos. Essas descobertas indicam que a regulação do *trans-splicing* de RNAs parcialmente processados pode ser crucial na geração de monocistrons maduros para a síntese de proteínas (Jäger *et al.*, 2007; LeBowitz *et al.*, 1993).

2.2.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é pós-transcricional e dois processos parecem ter um papel fundamental para que esta ocorra - o controle da estabilidade e a tradução dos mRNAs (Gomez *et al.*, 2010; Palenchar e Bellofatto, 2006; D'Orso *et al.*, 2003). Os estudos do perfil de expressão gênica global durante o desenvolvimento e entre espécies de tripanossomatídeos esclareceram que mais de cem genes são diferencialmente regulados, sendo de 2 a 9% de todos os genes analisados modulados ao nível de RNA (possivelmente via controle de sua estabilidade), enquanto que entre 12 a 18% deles são regulados ao nível protéico (Depledge *et al.*, 2010; Gomez *et al.*, 2010; Rochette *et al.*, 2008; Hailei e Papadopoulou, 2007). A síntese constitutiva do genoma e a seleção das mensagens apenas na fase de maturação, provavelmente, ajudam o parasita a trocar a expressão gênica rapidamente, possibilitando sua sobrevivência e adaptação a novos ambientes. Embora esse sistema englobe a degradação permanente de frações importantes do transcriptoma dos tripanossomatídeos, ele evita o ônus de possuir complexas redes de fatores de transcrição específicos e sequências alvo (Gomez *et al.*, 2010).

Na maioria das vezes, a regulação pós-transcricional estágio-específica é mediada por 3' UTRs dos mRNAs. Em alguns casos, regiões específicas presentes nas 3' UTRs foram delineadas como os elementos *cis* nesses organismos. Elementos instáveis ricos em U (*U-rich instability elements* – UREs) foram encontrados na 3' UTR de alguns transcritos que regulam o desenvolvimento em *T. brucei*, sendo estáveis na forma procíclica mas instáveis na sanguínea. Em *T. cruzi* e *L. infantum* também existem alguns mRNAs regulados via UREs. (Haile e Papadopoulou, 2007; D'Orso *et al.*, 2003).

As principais enzimas das vias principais de degradação de mRNAs, por exonucleases 5' ou por exonucleases 3', foram identificadas em tripanossomatídeos (com exceção das enzimas de *decapping*) e devem estar envolvidas nos eventos regulados de degradação de mRNAs (Gomez *et al.*, 2010). Seu exossomo, complexo proteico associado à degradação de mRNAs via extremidade 3', foi estudado em *T. brucei* onde se observou que o mesmo é menor do que o encontrado em leveduras e humanos (tendo apenas oito subunidades), o que sugere que o mecanismo de maturação de mRNA mediada por exonucleases 3'-5', envolvido no processamento da região 3', pode ser similar ou até mais primitivo do que o encontrado em eucariotos superiores (D'Orso *et al.*, 2003). Alguns estudos sugeriram que a degradação de mRNAs em tripanossomatídeos envolve fatores protéicos altamente instáveis, que são acumulados em resposta a inibidores de síntese protéica. A possibilidade dessa degradação estar acoplada a tradução deve ser considerada e pode ser regulada pelo uso de estruturas secundárias que inibem a tradução de mRNAs específicos. Outra possibilidade é que esses inibidores possam induzir ou suprimir a formação de grânulos de estresse e corpos de processamento (*processing bodies* – *P bodies*) (Haile e Papadopoulou, 2007). De fato, uma RNA helicase putativa (TcDhh1), homóloga a RNA helicase humana presente nos *P-bodies* e envolvida no decaimento de mRNA, foi identificada em *T. cruzi* com resposta a inibidores da tradução e ao estresse, o que indicaria a presença dessas estruturas em tripanossomatídeos (Holetz *et al.*, 2007). Posteriormente, foi verificada sua interação com proteínas que são descritas como componentes de grânulos de estresse, o que sugere que os complexos com TcDHH1 podem ser componentes de grânulos de estresse e não de *P-bodies* (Holetz *et al.*, 2010).

Em *T. brucei*, a transcrição do mRNA-SL pode ser silenciada em resposta ao estresse devido a mudanças no pH e a depleção da partícula de reconhecimento de sinal (*signal recognition particle* – SRP) mediada pelo mecanismo de RNA de interferência (RNAi), resultando em um decréscimo do *splicing* e em níveis reduzidos de diversos mRNAs analisados. O silenciamento do RNA-SL pode ser crucial durante a diferenciação do parasita, pois as condições estágio-específicas são inicialmente bastante estressantes para os parasitas (Haile e Papadopoulou, 2007).

2.3 TÓPICOS SELECIONADOS DO METABOLISMO DOS MRNAs NOS EUcARIOTOS

2.3.1 COMPLEXO DE JUNÇÃO DOS ÉXONS (EJC)

Nos eucariotos, a regulação ao nível pós-transcricional envolve o processamento, exportação, controle da estabilidade, silenciamento e localização do RNA mensageiro (mRNA). Atualmente, acredita-se que todos esses passos sejam mecanisticamente ligados, através de interações entre um conjunto de proteínas que se acoplam aos mRNAs para a formação de complexos multimoleculares, conhecidas como partículas ribonucleoprotéicas mensageiras (mRNPs) (Nott *et al.*, 2004).

Em metazoários um componente central das mRNPs de todos os mRNAs derivados de genes que contêm íntrons é o complexo de junção dos éxons (*exon junction complex* - EJC). O EJC é formado no núcleo e acoplado no mRNA aproximadamente 20 a 24 nucleotídeos a montante do sítio de *splicing*. Este complexo permanece com as mRNPs durante o seu transporte ao citoplasma, onde é, então, desacoplado e reciclado no núcleo (Tange *et al.*, 2004; Le Hir *et al.*, 2001). Sua presença facilita a exportação e tradução dos mRNAs (Bono e Gehring, 2011; Nott *et al.*, 2004; Wiegand *et al.*, 2003).

O EJC é formado pela união de quatro proteínas conservadas: MAGO, Y14, eIF4AIII e Barentsz (BTZ) (Chan *et al.*, 2004; Ferraiuolo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001). A formação do complexo estabelece uma plataforma utilizada por outros fatores para interações dinâmicas. Em humanos, todos os componentes do EJC estão envolvidos na degradação de mRNAs interrompidos precocemente (*nonsense-mediated mRNA decay* - NMD), uma via que detecta e degrada rapidamente mRNAs com códons de parada prematuros (Bono e Gehring, 2011; Bhuvanagiri *et al.*, 2010; Conti e Izaurralde, 2005; Palacios *et al.*, 2004). No citoplasma, acredita-se que os ribossomos, durante o primeiro passo da síntese protéica, retiram as proteínas do EJC dos seus respectivos sítios de ligação no mRNA. O EJC é, então, dividido em dois complexos binários estáveis: o heterodímero MAGO-Y14 e o subcomplexo eIF4AIII-BTZ. A remoção dos componentes do EJC do mRNA, provavelmente, envolve a inibição da atividade ATPase pelo MAGO-Y14, seguida da diminuição da afinidade do eIF4AIII pelo RNA. Isso resultaria na liberação do RNA e na mudança de conformação da eIF4AIII (Bono e Gehring, 2011).

2.3.2 NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY (NMD)

Em eucariotos foi desenvolvido um elaborado conjunto de mecanismos para garantir que as diversas etapas da expressão gênica sejam executadas com acurácia e adaptadas às necessidades celulares. A via de manutenção dos mRNAs trabalha nesse contexto, avaliando a qualidade dos mesmos para garantir que eles sejam passíveis de tradução. Essa via facilita a detecção e remoção de mRNAs que contêm códons de término prematuros (*premature termination códons* – PTCs), pelo processo de decaimento de mRNAs mediado por códons de término sem sentido (NMD) (Wagner e Lykke-Andersen, 2002).

Os PTCs podem resultar de mutações genômicas, transcrições imprecisas ou eventos impróprios ocorridos no pré-mRNA (Wagner e Lykke-Andersen, 2002). Os mRNAs marcados com PTCs precisam ser eliminados, pois eles codificam proteínas truncadas com alterações nas suas extremidades C-terminais que podem resultar em ganho ou perda da função normal. A via de NMD também possui como função a modulação da expressão de diversos mRNAs, envolvidos em importantes processos celulares como: diferenciação celular hematopoiética, resposta ao estresse ou manutenção da função e estrutura cromossômica. Isso demonstra a importância do NMD na regulação da expressão gênica pós-transcricional, juntamente com sua atividade de controle da qualidade dos mRNAs (Bhuvanagiri *et al.*, 2010). A ativação do NMD necessita, inicialmente, do reconhecimento dos PTCs, lembrando que estes precisam ser distinguidos de verdadeiros códons de término. Em eucariotos superiores, esse processo envolve uma marcação nos mRNAs que especifica a posição de junção dos éxons. Quando o códon de término está localizado na parte 3' terminal do éxon, considera-se que ele é verdadeiro (ou próprio), mas quando ele se localiza na região 5' é interpretado como prematuro. A distinção é feita com os EJCs, tendo sua composição básica (MAGO, Y14, eIF4AIII e BTZ) e proteínas periféricas que, provavelmente, ajudam na sua interação com vários processos pós-transcricionais, como o NMD (Bhuvanagiri *et al.*, 2010).

Apesar do núcleo de fatores NMD ser conservado em diferentes espécies, mecanismos diversos foram propostos em estudos com células de mamíferos, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* e *S. cerevisiae* (Bhuvanagiri *et al.*, 2010; Wagner e Lykke-Andersen, 2002). No geral, existem dois principais modelos: o modelo do marcador - localizado a jusante da sequência, caracterizado pela presença de um elemento de ação *cis* (elemento de sequência jusante DSE), que torna o mRNA

instável e estimula o NMD (Wagner e Lykke-Andersen, 2002). Em eucariotos superiores, a posição do códon de término na região 5' de um EJC é conhecida por induzir NMD e amplificar sua eficiência. É importante ressaltar que esse modelo nuclear do NMD é, provavelmente, muito simplificado. Estudos com mamíferos sugerem que existam várias vias alternativas do NMD (Bhuvanagiri *et al.*, 2010). O segundo modelo enfatiza que a NMD é desencadeada por uma 3' UTR aberrante, resultante de um PTC, sendo o espaçamento adequado entre o códon de término e a 3' UTR crucial para o mesmo. De acordo com esse modelo, a 3' UTR longa que se segue ao PTC não é suficiente para trazer a proteína de ligação ao poli (A) (PABP) para a proximidade dos fatores de liberação. Com o término prematuro, a saída dos ribossomos é ineficiente e mais lenta, o que favorece a ativação das proteínas NMD e resulta na degradação do mRNA. Estudos em *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* e *C. elegans* mostraram que nesses organismos o reconhecimento do PTC ocorre, independentemente, do *splicing* e de junções éxon-éxon, de forma que os componentes do EJC não seriam então necessários para que o NMD ocorra (Behm-Ansmant *et al.*, 2007; Gatfield *et al.*, 2003). Mas há evidências de que esse modelo ocorre para o reconhecimento de PTC em *Drosophila* (Bhuvanagiri *et al.*, 2010).

2.3.3 MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO DE MRNAS E GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS

A degradação dos mRNAs eucarióticos é tipicamente iniciada com o encurtamento da cauda 3' poli-A (deadenilação), que geralmente estimula a retirada do cap (*decapping*) e a subsequente degradação do mRNA por exonucleases 5'. Alternativamente, a deadenilação pode levar a degradação por exonucleases 3', normalmente encontradas em um complexo denominado exossomo (Balagopal e Parker, 2009).

Os *P bodies* são complexos cuja associação é proporcional à quantidade de mRNA não-traduzível, embora nem todo mRNA inativo acumule em *P bodies*. Embora sua composição completa ainda não seja conhecida, sabe-se que os *P bodies* incluem enzimas de *decapping*, ativadores do *decapping* e exonucleases. Estes também contêm mRNAs e proteínas envolvidos no NMD e componentes da maquinaria de repressão dos miRNAs (Balagopal e Parker, 2009). A competição entre os mRNPs que participam da tradução e os ligados à maquinaria de *decapping* está relacionada com a localização dos mRNPs. Enquanto os mRNAs traduzíveis estão distribuídos pelo

citossol, os complexados com a maquinaria de *decapping* podem se concentrar nos *P bodies* (Balagopal e Parker, 2009). Os mRNAs não-traduzíveis também podem formar um grânulo RNP citoplasmático secundário, conhecido como grânulo de estresse. Os grânulos de estresse são dinâmicos e parecem ser compostos por mRNAs que estão parados no processo de iniciação da tradução. Eles contêm mRNAs não-traduzidos complexados com fatores de iniciação da tradução (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3 e eIF2), com a subunidade ribossomal 40S e a PABP. A composição completa dos grânulos é desconhecida, mas eles incluem diferentes proteínas de ligação ao RNA (Balagopal e Parker, 2009).

2.3.4 SÍNTESE PROTÉICA

O processo de tradução pode ser didaticamente dividido em iniciação, alongação, terminação e reciclagem do ribossomo. A regulação ocorre, predominantemente, no estágio de iniciação, etapa na qual o códon de início AUG é identificado e decodificado pelo tRNA metionil (met-tRNA_i). O mecanismo de seleção do códon de início difere, fundamentalmente, entre eucariotos e bactérias e, assim, as estratégias de iniciação da tradução também variam. Em bactérias, uma sequência de pares de base denominada Shine-Dalgarno (SD), localizada a montante do códon de início, é complementar a uma sequência anti-SD presente no rRNA 16S. Com a ligação entre as duas, a subunidade menor ribossomal é recrutada para a região de iniciação do mRNA (Sonenberg e Hinnebusch, 2009). Já em eucariotos, o códon de iniciação é, geralmente, identificado através de rastreamento onde a subunidade 40S, acoplada ao met-tRNA (em um complexo de pré-iniciação – PIC), se liga ao mRNA próximo a região 5' e rastreia a região 5' não-traduzida (5' UTR), para encontrar o códon AUG (Nakamoto, 2008). Sendo, então, pareado com o anticódon UAC do RNA transportador- metionina iniciador (Met-tRNA_i) no sítio ribossomal peptidil (P). Estruturas de RNA que impedem os ribossomos de interagir com a 5' UTR ou mesmo que impeçam o rastreamento por essa região, reduzem a eficiência da tradução (Sonenberg e Hinnebusch, 2009).

A iniciação da tradução em eucariotos requer subunidades ribossomais separadas, e envolve ao menos doze fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) e a ligação e hidrólise de ATP e GTP. Os fatores são agrupados de acordo com o estágio no qual eles participam, inicialmente, entretanto, muitos deles são multifuncionais e

podem atuar em estágios subsequentes. Muitos eIFs se ligam uns aos outros de forma estável e são assim recrutados para o complexo de pré-iniciação ribossomal, um exemplo é o fator heterotrimérico eIF4F, que consiste nas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G (Pestova *et al.*, 2007). Para que o reconhecimento do códon AUG seja possível é montado o complexo ternário, composto pela proteína eIF2, GTP e Met-tRNA_i, responsável por levar o Met-tRNA_i à subunidade 40S e possui importância na resposta à identificação do códon de iniciação no mRNA (Pestova *et al.*, 2007). O mRNA é ativado para a ligação com o PIC, através da ligação com fatores eucarióticos de iniciação (eIFs), que reconhecem a estrutura cap dos mRNAs na região 5' (complexo eIF4F), ou a cauda poli (A) na região 3' (PABP). Esse processo de ativação pode ser regulado negativamente com a inativação desses e outros eIFs, para a redução da tradução da maioria dos mRNAs em condições de estresse (Sonenberg e Hinnebusch, 2009; Nakamoto, 2008). O processo de iniciação da tradução em eucariotos está descrito de forma esquemática na Figura 5.

A habilidade da proteína de ligação poli (A), PABP, de interagir com eIF4G, dentro do eIF4F, possibilita a circularização do mRNA durante a tradução, fazendo uma ponte entre o cap e a cauda poli (A). Isso facilitaria a reiniciação por ribossomos pós-terminação. Existem evidências da interação entre a PABP e fatores de liberação eucarióticos eRF1 e eRF3 (*eukariotic release factors* - eRF), proteínas que se ligam aos ribossomos. A PABP também estimula a ligação da subunidade 60S ao mRNA na fase final da iniciação da tradução mas que antecede a formação da primeira ligação peptídica (Sonenberg e Hinnebusch, 2009).

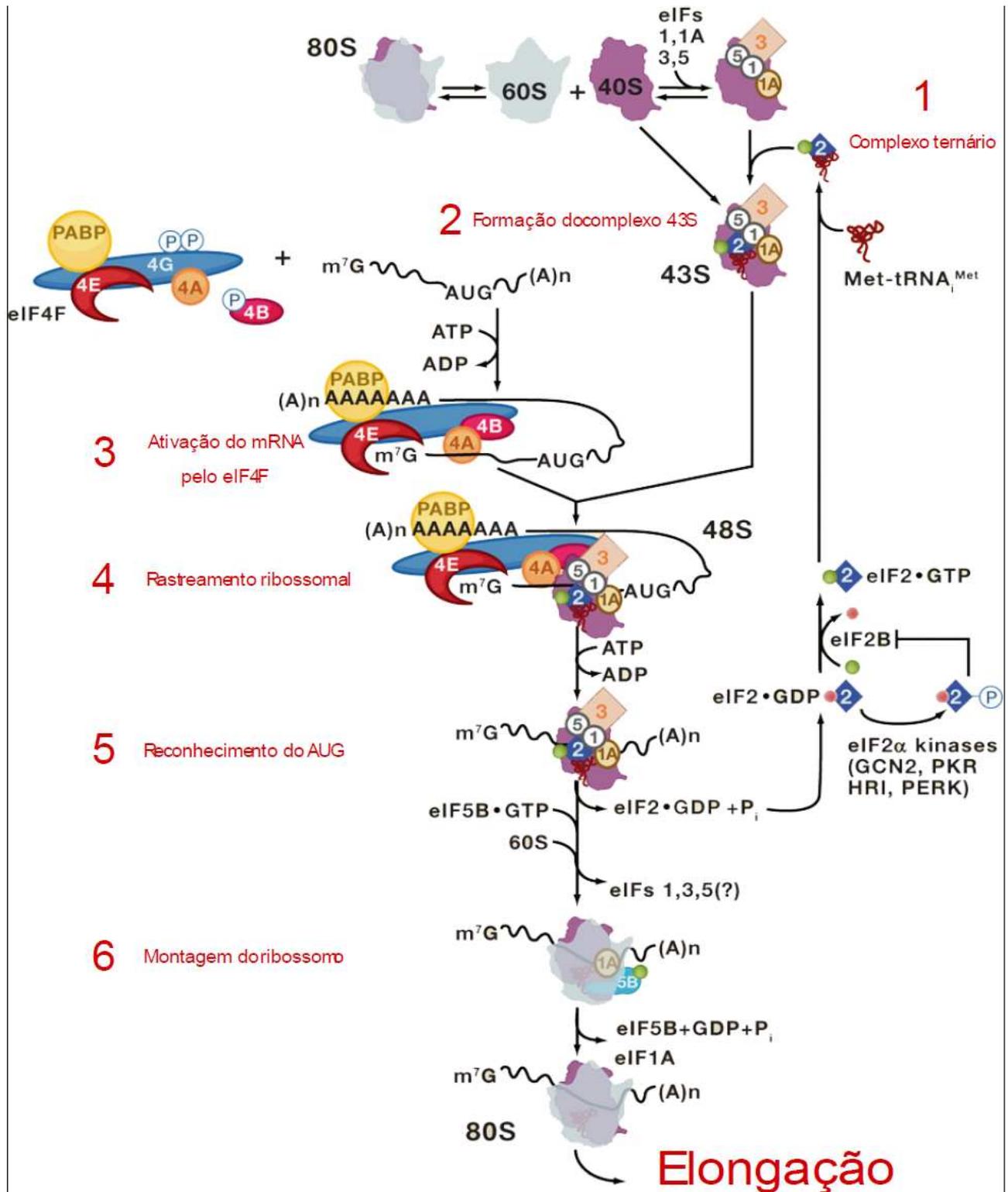


Figura 5. Mecanismo de iniciação da tradução cap dependente. Primeiro ocorre a (1) formação do complexo ternário composto pelo GTP-tRNAⁱ-eIF2, em seguida há a associação do mesmo à subunidade ribossomal 40S e (2) formação do complexo 43S. Ao mesmo tempo há o (3) reconhecimento do mRNA pela ligação do complexo eIF4F e, em seguida o (4) rastreamento ribossomal (scanning) e formação do 48S. Depois ocorre o (5) reconhecimento do códon de iniciação AUG e, por fim, ocorre a (6) montagem do ribossomo pela associação da subunidade 60S, culminando na dissociação dos fatores de iniciação e no início da fase de elongação. Modificado de Sonenberg e Hinnebusch, 2009.

2.4 FAMÍLIA EIF4G DE PROTEÍNAS CONTENDO OS DOMÍNIOS MIF4G E MA3

A família eIF4G engloba um conjunto de proteínas intracelulares, envolvidas em diferentes processos celulares em geral associados ao metabolismo de RNAs, e que apresentam como elementos comuns os domínios MIF4G e/ou MA3, envolvidos em interações proteína/proteína. O protótipo desta família é o fator de iniciação da tradução eIF4G, parte do complexo eIF4F de iniciação da tradução. Em estudos de difração de raios-X com a proteína eIF4G, foi visto que a mesma é estruturada na sua região central (domínio MIF4G) por cinco repetições HEAT (Huntingtin, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2A, Target of rapamycin), motivos geralmente encontrado em proteínas envolvidas em grandes complexos multiprotéicos, sendo formado pelo arranjo de cinco pares de repetições de alfa-hélices antiparalelas (Prévôt *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína eIF4G de humanos é composta na realidade por três domínios HEATs: o primeiro localizado na região central: HEAT-1/MIF4G e dois presentes na região C-terminal: HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2, como observados na Figura 6 (Bellsollell *et al.*, 2006).

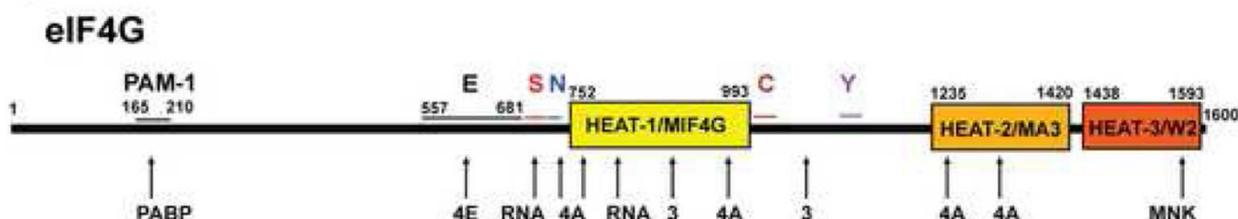


Figura 6. Estrutura da proteína eIF4G. O eIF4G possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e eIF4E. Na região central desta proteína encontra-se o domínio central de ligação ao eIF4A, além de uma região de ligação a RNA (RRM) e do sítio de ligação ao eIF3. Já na sua porção C-terminal se encontram um segundo sítio de ligação ao eIF4A (apenas em mamíferos) e o sítio de ligação da proteína Mnk1 (quinase de eIF4E). O eIF4G humano, proteína protótipo da família, possui três domínios HEAT: HEAT-1/MIF4G, HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2. Marintchev *et al.*, 2009.

2.4.1 EIF4G E O COMPLEXO EIF4F DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO

O fator eIF4G é o elemento estruturador do complexo eIF4F, que por sua vez é composto por três polipeptídeos: (1) o próprio eIF4G, um grande polipeptídeo que contém sítios de ligação para eIF4E, eIF4A, eIF3 e PABP; (2) eIF4A, uma helicase ATPase e RNA dependente; (3) eIF4E, a proteína de ligação ao cap dos mRNAs (Gingras *et al.*, 1999). Este complexo, com o auxílio do fator eIF4B, é responsável pelo recrutamento do mRNA para o ribossomo, interagindo com o cap no início do mRNA

(através do eIF4E) e com a proteína eIF3 associada ao ribossomo (através do eIF4G) (Gingras *et al.*, 1999). Genes codificando o eIF4G foram isolados e clonados de diversas espécies, incluindo as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, *Drosophila*, trigo, humanos (Prévôt *et al.*, 2003) e até em protozoários (Dhalia *et al.*, 2005). Existem duas isoformas do eIF4G em mamíferos, eIF4GI e eIF4GII, que possuem 46% de identidade e massa molecular predita de 171 kDa e 176 kDa, respectivamente. Em *S. cerevisiae* também são encontradas duas isoformas (Tif4631 e Tif4632), com 53% de identidade. Dois tipos de eIF4G estão presentes em plantas. As isoformas de mamíferos e plantas possuem atividades bioquímicas similares, enquanto as proteínas de levedura possuem algumas diferenças (Gingras *et al.*, 1999).

O segmento N-terminal do eIF4G de humanos possui sítios de ligação para a PABP e o eIF4E (Imataka *et al.*, 1998; Gringas *et al.*, 1999; Prévôt *et al.*, 2003), enquanto a região central é importante para a ligação dos fatores eIF3 e eIF4A (Marcotrigiano *et al.*, 2001; Prévôt *et al.*, 2003). Já a região C-terminal, serve de ancoradouro para as proteínas eIF4A e Mnk1 (essa última responsável pela fosforilação do eIF4E) (Prévôt *et al.*, 2003). Existem assim dois sítios de ligação para o eIF4A nos eIFGI/II de mamíferos, um localizado na sua região central (resíduos 642-1046 no eIF4GI – no domínio HEAT-1/MIF4G) e outro na região carboxi-terminal (no domínio HEAT-2/MA3). A região central também possui ainda um sítio de ligação para a proteína eIF3 e em humanos as ligações envolvendo as proteínas eIF3 e eIF4A são independentes. A ligação entre eIF4A e eIF4G é mais fraca do que a que ocorre com o eIF4E de forma que, ao menos em experimentos com proteínas de mamíferos, o eIF4A pode ser facilmente dissociado do complexo (Gingras *et al.*, 1999; Prévôt *et al.*, 2003).

Em plantas, foi descoberto que o eIFiso4G possui dois domínios para a ligação ao eIF4A, sendo eles o N-terminal e o C-terminal, similares em número e organização aos de animais. O homólogo difere, entretanto, no domínio N-terminal de ligação, pois ele está sobreposto com os domínios para o eIF4B e PABP. Sendo assim, quando o C-terminal de ligação ao eIF4A está ausente, há uma competição entre as proteínas PABP, eIF4B e eIF4A na ligação ao eIFiso4G, mas quando os dois sítios de ligação ao 4A estão presentes, as interações com todas as proteínas são possíveis e estáveis (Cheng e Gallie, 2010).

2.4.1.1 A RNA HELICASE EIF4A

O fator eIF4A é o protótipo de uma família proteica (com mais de 28 membros), denominada família DEAD-box. Essas proteínas são encontradas em diferentes organismos e atuam em diversos processos celulares como tradução, *splicing*, biogênese ribossômica e formação dos gametas. Todos os membros da família possuem atividade ATPásica, mas apenas alguns deles, incluindo o eIF4A, conseguem desenrolar RNAs dupla-fita (Gingras *et al.*, 1999). Como outras helicases, essa molécula altera sua estrutura entre dois estados: “aberto” e “fechado”. No estado “fechado” (sua conformação ativa), os dois domínios formam uma superfície que permite a ligação ao RNA e ATP (Andersen *et al.*, 2006) Na iniciação da tradução, a atividade de helicase do eIF4A facilita tanto a ligação do complexo 43S ao mRNA, como o deslocamento do mesmo ao longo da 5' UTR para identificação do códon de início (Gingras *et al.*, 1999).

Em mamíferos, existem três isoformas: eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII, sendo as duas primeiras altamente homólogas (com 89% de identidade) e funcionalmente equivalentes (mas a eIF4AII possui expressão tecido específica). Em contraste, a eIF4AIII (66% idêntica a eIF4AI em humanos), não pode substituir a eIF4AI na técnica de ligação ao ribossomo (Gingras *et al.*, 1999). O eIF4A é provavelmente o fator de iniciação da tradução mais abundante. A sequência de nucleotídeos do cDNA da eIF4A em mamíferos e leveduras apresentam 65% de identidade e 81% de similaridade sugerindo uma conservação funcional na iniciação da tradução (Linder, 2003).

A maior diferença entre as proteínas eIF4AI e eIF4AIII reside em uma região N-terminal de 30 aminoácidos única na eIF4AIII e em nove pequenos segmentos de sequência que são característicos de homólogos dessa mesma proteína em diferentes espécies. O fato do eIF4AIII não conseguir se ligar ao ribossomo, pode ser explicado pela descoberta da sua ligação com o eIF4G1 ocorrer apenas pelo domínio da região central (MIF4G) (Li *et al.*, 1999). Além disso, a localização do eIF4AIII é nuclear (Holzmann *et al.*, 2000) e ele atua como um ancoradouro para a formação do EJC (Le Hir *et al.*, 2000), se ligando diretamente as proteínas Magoh, Y14 e MLN51 (Ballut *et al.*, 2005). Mutações nos seus motivos Ia, VI e H, afetam a formação do EJC e impedem que o decaimento de mRNA mediado por códons sem sentido ocorra (Shibuya *et al.*, 2006).

2.4.2 HOMÓLOGOS DE EIF4G DE FUNÇÃO DIFERENCIADA

Além dos homólogos funcionais já citados, a família eIF4G também engloba proteínas que possuem conservação em relação a domínios selecionados mas são funcionalmente distintas ou ainda não tiveram suas funções claramente definidas. Uma delas é a proteína humana de interação a PABP, denominada PAIP-1, que possui uma sequência similar a porção central (MIF4G), responsável pela interação com o fator eIF4A. A superexpressão dessa proteína em células COS-7 estimula a tradução (Craig *et al.*, 1998). Outra proteína caracterizada foi chamada p97 e exibe 28% de identidade com dois terços da porção C-terminal do eIF4G, seu mRNA não possui o códon de iniciação AUG, sendo seu início da tradução dependente do reconhecimento do códon GUG. Pela região de homologia, a p97 se liga aos fatores eIF4A e eIF3, não possuindo, entretanto, sítio de ligação para a proteína eIF4E. Experimentos indicam que esse peptídeo suprime as vias de tradução dependente e independente de cap, atuando como um repressor da tradução (Prévôt *et al.*, 2003; Imataka *et al.*, 1997).

Em 2009, uma nova proteína que contém o domínio MIF4G foi identificada e denominada de CTIF (fator de iniciação da tradução dependente do CBP80/20), esse nome foi dado devido à interação entre ela com a CBP80 e sua parte do complexo de iniciação da tradução dependente de CBP80/20. A depleção de CTIF bloqueia a tradução dos mRNAs ligados a CBP80 *in vitro*, enquanto a adição do fator purificado restaura a mesma, entretanto, sua depleção não afeta mRNAs ligados ao eIF4E. Essa proteína também interage com as proteínas ligadas a CBP80, eIF3 e eIF4AIII. Sua associação se dá preferencialmente no complexo de iniciação dependente do CBP80/20 ligado ao complexo de junção dos éxons (EJC). Consistente com suas funções, a localização da CTIF é perinuclear (Kim *et al.*, 2009).

O domínio MA3 também está presente em outros polipeptídeos. Um exemplo é a proteína PDCD4 (Proteína de morte celular programada 4 - *Programmed Cell Death 4*), que foi isolada através de clones de cDNA em um estudo para elucidar o processo de apoptose celular. Em todas as células com apoptose induzida, foi verificada a expressão do mRNA dessa proteína. Sua sequência é muito conservada e foi encontrada não só em vertebrados, como em *Drosophila* (Shibahara *et al.*, 1995). A PDCD4 possui dois domínios MA3, que quando analisados, mostraram ser estruturalmente e funcionalmente similares e ambos se ligam especificamente ao

domínio N-terminal do eIF4A (NTD). Os domínios MA3 desse fator competem com o do eIF4G e RNA pela ligação com o eIF4A. Evidências demonstram que a PDCD4 inibe a iniciação da tradução, competindo com o eIF4G pela ligação ao RNA e eIF4A, formando com ele um complexo mais estável (Suzuki *et al.*, 2008).

Na tentativa de encontrar uma proteína que se ligasse a FKBP6 (FK506 binding protein 6), peptídeo estudado em ratos e camundongos, capaz de parar a espermatogênese no paquíteno, foi identificada a proteína SLIP1 (***Stem Loop Binding Protein- interacting protein 1***), também conhecida como MIF4GD. No perfil de expressão em ratos, foram encontradas duas formas da MIF4GD, com tamanhos de 25 e 16 kDa. No testículo, uma forma adicional estava expressa, com 20 kDa. Esses dados mostram que a proteína é diferencialmente expressa nos tecidos. As isoformas com os tamanhos de 25 e 20 kDa, se localizam abundantemente no citosol, estando raramente presentes no núcleo e em frações ribossomais. Já a de 16 kDa, foi encontrada no citoplasma e em frações ribossomais, evidenciando uma associação com ribossomos. A SLIP1 parece participar da tradução de mRNAs com replicação dependente de histonas, levando a estrutura *stem loop* da extremidade 3' para o complexo do cap. (Okada *et al.*, 2011).

A hUpf2 foi caracterizada em um estudo de proteínas que participariam do NMD. Ela contém alguns sinais bipartidos putativos de localização nuclear (NLS), perto do seu N-terminal e uma região similar ao eIF4G, também encontrada no ortólogo de leveduras. Surpreendentemente, sua localização é perinuclear, o que pode ser uma resposta para a controvérsia existente entre as proteínas envolvidas no NMD, que estão distribuídas entre o núcleo e o citoplasma. Assim, o complexo poderia se formar na região perinuclear (Lykke-Andersen *et al.*, 2000).

2.4.3 NOM1 (PROTEÍNA NUCLEOLAR COM DOMÍNIO MIF4G 1)

A proteína NOM1 foi originalmente identificada quando, em um estudo com pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) pediátrica que possuíam uma translocação nos cromossomos 7;12. Seu gene foi localizado justamente na região de quebra do cromossomo 7 (7q36). O transcrito completo da NOM1 possui 6.1kb e contém uma longa 3' UTR, que inclui algumas sequências de repetições Alu e, em testes de expressão, este transcrito foi encontrado em níveis diferenciais nos diversos tecidos. A proteína resultante é de localização nuclear, com concentração

predominante no nucléolo, sendo semelhante à reportada no homólogo de leveduras (SGD1), o que sugere uma função conservada. Em sua estrutura a proteína NOM1 possui os domínios MIF4G e MA3 e, como outras proteínas quem contêm estes domínios, é capaz de interagir com as proteínas eIF4AI e eIF4AIII. Assim, a proteína NOM1 poderia ir do núcleo ao citoplasma para interação com os fatores eIF4AI/II ou ter uma ligação principal com o eIF4AIII no núcleo (Simmons *et al.*, 2005).

Pesquisas em bancos de dados revelaram que vários organismos possuem homólogos da proteína NOM1, incluindo: *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus músculos* e até os tripanossomatídeos (*T. brucei* e *L. major*) (Simmons *et al.*, 2005, Caiado monografia, 2008). As sequências dessas proteínas são muito similares (variando entre 819 a 899 aminoácidos) e também possuem uma composição e organização semelhantes (Figura 7), incluindo uma região amino terminal básica, outra região rica em aminoácidos ácidos e sua região carboxi terminal altamente similar que inclui os domínios MIF4G/MA3. Os homólogos dessa proteína em *S. cerevisiae* (SGD1) e *C. elegans* (1L643) são considerados genes essenciais, pois mutantes que não a expressavam tiveram sua viabilidade celular reduzida (Akhtar *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2005). O gene SGD1 possui um sinal bipartido de localização nuclear e provavelmente está envolvido na resposta osmorregulatória ao glicerol (Akhtar *et al.*, 2000).

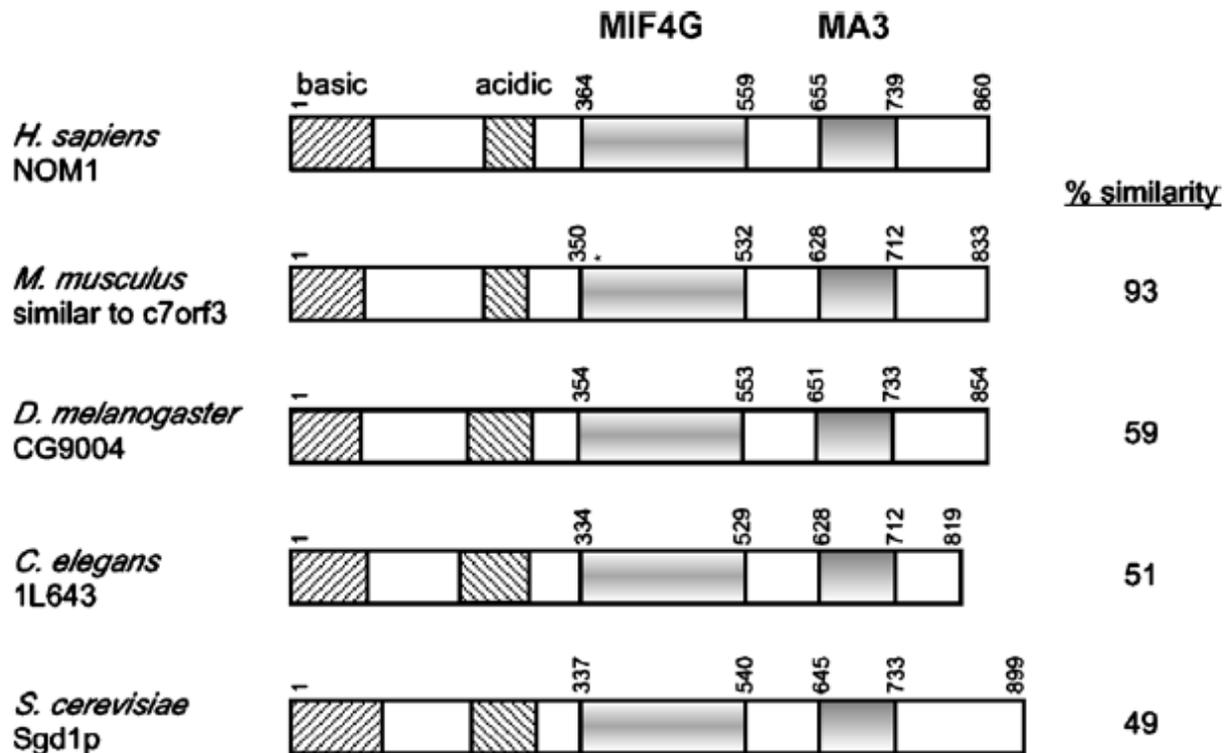


Figura 7. Homólogos da proteína NOM1 em diversos organismos. Figura mostrando o alinhamento entre os homólogos da proteína NOM1 em *H. sapiens*, *Mus musculus*, *D. melanogaster*, *C. elegans* e *S. cerevisiae*. As estruturas das proteínas são representadas por suas regiões mais conservadas (básica, ácida, MIF4G e MA3). A partir da análise das sequências também é dada a similaridade entre elas. Fonte: Simmons *et al.*, 2005.

Embora as leveduras *S. cerevisiae* não possuam um complexo de junção dos éxons, elas contêm uma proteína helicase DEAD-box que possui alta homologia ao eIF4AIII, denominada Fal1p. A Fal1p interage com a proteína homóloga da NOM1 em leveduras, SGD1. Ensaio *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma interação entre os homólogos humanos eIF4AIII/NOM1. Com um posterior *knockdown* dessas proteínas de humanos em leveduras, foi visto que provavelmente esse complexo age no processamento do pré-rRNA, além de funções na iniciação da tradução e no complexo de junção dos éxons (Alexandrov *et al.*, 2011).

Em 2008 foi identificada a interação da NOM1 com a proteína fosfatase 1 (PP1). Essa proteína é uma fosfatase serina/treonina eucariótica essencial, importante em vários processos celulares, como: divisão, sinalização e metabolismo celulares. Populações distintas de PP1 são encontradas em diferentes localizações e substratos nas células. Acredita-se que a associação das subunidades dessa proteína com outros polipeptídeos, determine sua localização e especificidade pelo substrato, principalmente através da interação com a sequência RVXF presente na proteína de

ligação (Gunawardena *et al.*, 2008). Neste estudo, o motivo RVXF foi encontrado se iniciando no aminoácido 307 da NOM1. A PP1 α foi a única isoforma identificada como proteína de interação com a NOM1, o que pode indicar uma interação preferencial da NOM1 com ela. Entretanto, essa isoforma é também a PP1 mais abundante em nível protéico, o que seria também consistente com os resultados obtidos. Nesses experimentos, as prováveis sequências que determinam a localização nucleolar da NOM1 foram identificadas na região amino terminal da proteína, presentes entre o aminoácido 1 ao 269. Elas são reconhecidas por serem geralmente compostas de um alto número de aminoácidos básicos, consistente com o encontrado na região N-terminal da NOM1 (Gunawardena *et al.*, 2008).

2.5 HOMÓLOGOS DE EIF4G EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Uma vez que a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos é predominantemente pós-transcricional, o estudo de proteínas associadas ao metabolismo de mRNAs e que possam estar funcionamente ligadas a mecanismos de controle da sua tradução e/ou estabilidade é fundamental. Neste contexto, a caracterização de homólogos de eIF4G nestes organismos pode esclarecer pontos importantes a respeito da existência de conservação ou não em etapas associadas a estes mecanismos de controle. De uma forma geral, esta proteína é muito diversificada em termos de, sequência, e, de fato, apenas sua região central é a mais conservada entre os eIF4Gs de diferentes organismos (Gingras *et al.*, 1999). Com base, então, na sequência desta região da proteína humana eIF4GI, foram procurados ortólogos no genoma de *L. major* através da ferramenta BLAST e cinco proteínas foram encontradas (*LmEIF4G1-5*). Exceto pelo domínio HEAT-1/MIF4G, as sequências parecem não relacionadas, com exceção dos *LmEIF4G3* e 4. Estas duas proteínas mostram uma região N-terminal similar e uma região conservada de aproximadamente 120 aminoácidos. Os níveis intracelulares do *LmEIF4G3* foram determinados e seu domínio HEAT foi capaz de se ligar especificamente à proteína *LmEIF4A1* (Dhalia *et al.*, 2005).

Recentemente, foi mostrado que a incubação de extratos celulares de *L. major* a resina m⁷GTP Sefarose permitiu a purificação das proteínas *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4*, assim como a co-eluição das proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4A1*. Estas interações foram confirmadas a partir da imunoprecipitação da proteína *LmEIF4G3* em fusão com FLAG expressa em células transgênicas de *L. major*. As proteínas *LmEIF4G3*,

LmEIF4E1 e *LmEIF4E4* foram encontradas, ainda, em frações polissomais indicando a formação, de, pelo menos, um complexo eIF4F nos tripanossomatídeos (Yoffe *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem a interação entre os homólogos *LmEIF4G3* e *LmEIF4E4*, já encontrados nesses parasitas, no complexo de iniciação de tradução. Os mesmos resultados levam a crer que os demais homólogos não estão envolvidos, ao menos de forma direta, no processo de iniciação da tradução dos tripanossomatídeos. Na Tabela 2 estão representados os cinco homólogos do EIF4G encontrados em *L. major*, juntamente com a proteína *LmNOM1*, reunindo suas principais características.

Tabela 1. Homólogos de eIF4G identificados em tripanossomatídeos. Tabela contendo os homólogos de fatores de iniciação da tradução identificados com o sequenciamento de *L. major*, com suas respectivas características previstas. Modificada do artigo Dhaliya *et al.*, 2005.

Sequência em <i>L. major</i>	GeneDB ID	Peso Molecular Predito (kDa)	Localização Cromossômica
<i>LmEIF4G1</i>	LmjF15.0060	114	15
<i>LmEIF4G2</i>	LmjF15.1320	145.9	15
<i>LmEIF4G3</i>	LmjF16.1600	71.2	16
<i>LmEIF4G4</i>	LmjF36.6060	84.6	36
<i>LmEIF4G5</i>	LmjF10.1080	88.8	10
<i>LmNOM1</i>	LmjF30.1150	93.6	30

A fim de estudar mais a fundo fatores de iniciação da tradução que em eucariotos interagem com o eIF4G pelos domínios MIF4G e MA3, os dois homólogos do eIF4A em *L. major*, *LmEIF4AI* e *LmEIF4AIII*, foram caracterizados, apresentando uma identidade de 59 e 52% respectivamente em relação ao eIF4AI humano e possuindo ortólogos em *T. brucei* (*TbEIF4AI/AIII*), mas apenas o primeiro deles parece estar envolvido na iniciação da tradução. A proteína *TbEIF4AI* é abundante, com expressão constitutiva durante o ciclo de vida do parasita, possui localização citoplasmática, todas características compatíveis com o esperado. Já a *TbEIF4AIII* possui localização nuclear, é pouco abundante, possui uma resposta lenta ao fenótipo induzido pelo RNAi, resultados que indicam uma participação no metabolismo do RNA no núcleo. Esses dados são correlatos com os encontrados nos ortólogos de *L. major*, onde *LmEIF4AI* se liga especificamente a pelo menos dois homólogos do eIF4G (*LmEIF4G3* e 4), enquanto o *LmEIF4AIII* possui uma atividade de ligação reduzida (Dhaliya *et al.*, 2006; Reis, 2009). Recentemente foram isolados dois componentes

funcionais do EJC, nos tripanossomatídeos (Mago e Y14), mas surpreendentemente, o homólogo de eIF4AIII não foi detectado junto a este complexo (Bercovich *et al.*, 2009).

2.5.1 ORTÓLOGOS DA PROTEÍNA NOM1 EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Após o sequenciamento dos genomas de *L. major* e *T. brucei*, foi verificado que ambos possuem ortólogos da proteína NOM1, com os domínios MIF4G/MA3. Sendo assim, foram iniciados estudos sobre as proteínas *LmNOM1* e *TbNOM1* desses parasitas, para que os resultados obtidos sobre a função dessa proteína possam contribuir na compreensão de processos biológicos básicos destes parasitas e também para reforçar a literatura incipiente existente sobre a NOM1 em eucariotos (Caiado, monografia, 2008). A NOM1 em tripanossomatídeos está descrita no GeneDB pelos números de referência LmjF30.1150 (*L. major*) e Tb927.6.2650 (*T. brucei*). O gene que codifica *LmNOM1* é definido como pertencente ao cromossomo 30 de *L. major* e tem como produto uma proteína com as seguintes propriedades preditas: pI 9.5; 858 aminoácidos e 93.6 kDa. Sobre a proteína *TbNOM1*, as informações incluídas como predições são: localização do gene que a codifica no cromossomo 6 de *T. brucei*, com o pI 8.7, 757 aminoácidos, 84.5 kDa. Em estudos de análise da expressão de mRNAs durante os dois estágios principais de desenvolvimento de *Leishmania* (amastigotas e promastigotas), o gene *LmNOM1* está incluído nos 94% (dos 8160 genes estudados), que são constitutivamente expressos (Leifso *et al.* 2006). A proteína NOM1 de *T. brucei* não é essencial à viabilidade celular em um estudo recente de fenotipagem em larga escala (Alsford *et al.*, 2011).

Em trabalhos anteriores, nosso grupo realizou a clonagem das sequências gênicas da *LmNOM1* e *TbNOM1* em vetores plasmidiais de expressão. Em seguida foi realizada a expressão das respectivas proteínas em *Escherichia coli*. O foco do estudo foi a construção das ferramentas com as quais estão sendo realizadas diversas abordagens no intuito de conhecer melhor os ortólogos dessa proteína em tripanossomatídeos (Caiado, monografia, 2008). Como descrito a seguir, o presente trabalho de mestrado buscou dar continuidade a essas abordagens utilizando as ferramentas moleculares previamente desenvolvidas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar de forma funcional o ortólogo da proteína NOM1 em *Trypanosoma brucei* (*TbNOM1*), avaliando propriedades como expressão, localização subcelular e requerimentos para a viabilidade do organismo.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar interações *in vitro* entre a proteína *TbNOM1* e possíveis parceiros funcionais.
- Avaliar a expressão do ortólogo *TbNOM1* nas formas procíclica e sanguínea de *T. brucei*, verificando sua sensibilidade a modificações pós-traducionais e sua presença em diferentes frações subcelulares.
- Determinar a localização subcelular *in vivo* da proteína *TbNOM1* por meio de imunofluorescência em formas procíclicas de *T. brucei*, assim como através da sua expressão fusionada à proteína fluorescente.
- Avaliar a viabilidade de células procíclicas de *T. brucei* após depleção da *TbNOM1* por meio de interferência de RNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para expressão das proteínas previamente obtidas (Caiado, 2008), fusionadas a cauda de poli-histidinas (*TbNOM1*-pET21a), utilizou-se células de *E. coli* da linhagem BL21 star (Invitrogen). A transformação se deu por choque térmico e as células foram posteriormente semeadas em meio LB (Luria-Bertani) Agar contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C por 18 horas. Posteriormente, as colônias foram inoculadas em 15 ml de LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) e colocadas a 37°C sob agitação de 180 rpm por 18 horas. No dia seguinte, esse pré-inóculo foi expandido para 500 ml de LB com ampicilina sob agitação de 180 rpm a 37°C. O crescimento bacteriano foi monitorado através da densidade ótica (OD) obtida em espectrofotômetro. Para essa construção, esperou-se a OD chegar a 0,5 para a adição do IPTG (concentração final 0,1 mM). Após esse procedimento, a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas, mas a temperatura foi reduzida para 30°C. Para a expressão da proteína recombinante fusionada a GST (*GST-TbNOM1*), as células foram crescidas até a OD de 0,8, acrescidas de IPTG na concentração de 0,1 mM e depois incubadas sob agitação por 1 hora a 25°C.

As purificações da *TbNOM1* fusionada a sequência de poli-histidinas a partir da BL21 star foram feitas de acordo com protocolos para proteínas insolúveis. As proteínas obtidas anteriormente tiveram seus sedimentos reconstituídos em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M uréia, pH = 8), sendo então submetidas a ultrasonicação (4 pulsos de amplitude 50 e duração de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto), com posterior adição de Triton X -100 (1%) e centrifugação a 11.000 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi incubado por 1 hora a 4° C com 200 µl da resina Ni-NTA Agarose (Quiagen®), sendo essa previamente equilibrada por 3 vezes com 10 ml do tampão de lise suplementado com 20 mM de imidazol. A incubação foi seguida de lavagens, sendo duas delas com o mesmo tampão de lise com 20 mM de imidazol e duas com 30 mM imidazol, para a retirada de proteínas ligadas inespecificamente. Para desligar as proteínas recombinantes da resina foram feitas duas eluições com tampão de lise (1 M imidazol e pH 4,5), com duração de meia hora cada.

A proteína recombinante *GST-TbNOM1* foi incubada com 200 µl da resina Glutathiona Sefarose 4B (GE Healthcare®), por 1 hora a 4° C. As lavagens posteriores

foram feitas com PBS. Foram realizadas duas eluições com duração de meia hora a 4° C. Na primeira delas utilizou-se 1 ml de Glutathione Reduzida 20 mM pH 9. Já na segunda, foi usado 1 ml de solução Glutathione Reduzida 50 mM pH 9.

Após as eluições, ambas as resinas foram ressuspensas em 200 µL de PBS e as amostras obtidas (sedimento do sonicado, sobrenadante da fração não ligada a resina, resina, lavagens e eluatos) congeladas a -80°C. Alíquotas das amostras foram diluídas em tampão de proteínas, fracionadas em gel SDS-PAGE 15%, sendo o gel corado com Azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich™). A eficiência da purificação foi estimada a partir da comparação das diluições das amostras obtidas com diluições seriadas de BSA em concentrações definidas e análise da imagem do gel contendo as proteínas no programa Kodak 1D Image Analysis Software®.

4.2 DIÁLISE DAS PROTEÍNAS

As proteínas GST-*TbNOM1*, GST-*TbEIF4AI* e AIII purificadas foram submetidas à diálise para utilização em experimentos de interação de proteínas do tipo *Pull-down*. Para esse procedimento, foi preparado o tampão de diálise, com um volume final de 2 litros (44 mM Na₂HPO₄, 5,2 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5% Glicerol e H₂O). Paralelamente, sacos de diálise de 6 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich™), foram hidratados e posteriormente cortados em um tamanho consideravelmente maior do que o volume que seria ocupado pelas amostras. As proteínas *TbNOM1*, *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* purificadas foram então retiradas do freezer -80° C e colocadas (em todo seu volume) nos sacos para diálise hidratados.

As amostras foram então colocadas em um béquer, sob leve agitação por 6 horas a 4° C, e o tampão de diálise foi adicionado até cobrir as membranas. O tampão foi trocado por três vezes a cada duas horas e após o final do procedimento, as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 ml com alíquotas de 20 µl retiradas para determinação da concentração e o restante armazenado a -80°C para os testes de interação.

4.3 TRANSCRIÇÃO E EXPRESSÃO DOS MRNAS SINTÉTICOS

Para realização do experimento de *Pull-down*, foi necessário inicialmente que houvesse a transcrição *in vitro* das construções *TbEIF4AI*, *TbEIF4AIII* e *TbNOM1* a partir do pET21a. Assim, 10 µg das amostras foram inicialmente linearizados através

da digestão com a enzima de restrição *Not* I (5 Unidades). Após a digestão, as amostras foram precipitadas com NaCl e etanol 100% livres de RNase.

Para as reações de transcrição foram utilizados: 5 µl do tampão de transcrição 10 vezes concentrado (400 mM Tris-HCl pH= 8 e 150 mM MgCl₂), 2 µl da solução de rNTPs (100 mM ATP, CTP, UTP e 10 mM GTP), 5 µl do m⁷-CAP 10 mM (New England Biolabs®), 0,5 µl de DTT 1 M, 1,5 µl de inibidor de RNase, 2 µl de T7 RNA polimerase (GE Healthcare®) 5 U/µl, 5 µg do DNA da construção, previamente digerido com a enzima de restrição para sua linearização e água deionizada tratada com DEPC, para um volume final de 50 µl.

A reação ocorreu através da incubação das amostras por 2 horas a 37° C, sendo suplementada após 30 minutos pela adição de 0,5 µl de GTP 100 mM e após uma hora por 0,5 µl da enzima T7 RNA polimerase.

Com o término da transcrição, a eficiência do experimento foi verificada pelo fracionamento de 1 µl do transcrito em gel de agarose a 1% por apenas 10 minutos (com mais tempo o RNA degrada se não estiver em um gel com preparação específica).

Os mRNAs sintéticos obtidos foram purificados por duas formas, afim de retirar os reagentes restantes da transcrição: através da precipitação direta ou da extração por fenol-clorofórmio 1:1 com posterior incubação com clorofórmio hidratado seguida de precipitação. A precipitação foi feita com 0,3 M NaCl e etanol absoluto (livres de RNase), sendo as amostras ressuspensas em 20 µl de água deionizada tratada com DEPC.

Os mRNAs obtidos foram traduzidos em pequena escala, utilizando 1 µl do RNA diluído 10 vezes, 3,6 µl de lisado de reticulócito de coelho (Promega®), 0,2 µl da solução de aminoácidos sem metionina (Promega®) e 0,2 µl de metionina marcada com enxofre radioativo. As reações ocorreram por 1 hora e meia a 30° C.

Após a tradução, o volume total das amostras, em pequena escala, foi acrescido de tampão para proteínas e fracionados em gel de poliacrilamida 15%. Sendo o gel, posteriormente, corado com azul de Comassie 250 R (Sigma-Aldrich™), seco em papel de filtro por 1 hora a 70° C e exposto em um filme de autoradiografia (GE Healthcare), para identificar se as proteínas marcadas radioativamente foram traduzidas. Com a confirmação da eficiência de tradução, o protocolo foi utilizado em larga escala para obtenção de quantidades de proteínas suficientes para o experimento de *Pull-down*.

4.4 PULL-DOWN

Nos ensaios de interação foram utilizadas tanto as proteínas fusionadas a GST, previamente purificadas e dialisadas, quanto às traduzidas com metionina marcada com enxofre radioativo. Inicialmente, a resina Glutathiona Sefarose 4B foi equilibrada com tampão BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH= 7,2, 0,2% NP40 e 5% Glicerol), sendo então, incubada com BSA (10 µg/ml em BB3), por meia hora, com a finalidade de bloquear a resina, evitando ligações inespecíficas.

Em cada ensaio foi utilizado 2 µg das proteínas fusionadas a GST para cada 10 µl de resina bloqueada, tendo a incubação um volume final de 200 µl (completado com BB3), com duração de 1 hora, sob agitação a 4° C. As resinas foram então lavadas duas vezes com 500 µl de BB3 e posteriormente incubadas com 10 µl das proteínas marcadas radioativamente (volume final 200 µl), com 2 horas de incubação, sob agitação a 4° C.

Com o término da incubação, o excesso de radioatividade foi retirado em quatro lavagens com 500 µl de BB3 e ao término as resinas resultantes foram acrescidas de 40 µl de tampão de proteína. Desse volume, 10 µl foram corridos em gel SDS-PAGE, corados e submetidos à autorradiografia para visualização das possíveis ligações. Foram utilizados como controles da reação a resina Glutathiona Sefarose 4B e a proteína GST.

4.5 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR IMUNOADSORÇÃO

A produção de soro policlonal específico anti-*Tb*NOM1 foi realizada em trabalhos anteriores (Hollanda, 2009 e da Silva, 2011). Para a purificação do anticorpo, cerca de 100 a 200 µg da proteína recombinante fusionada a GST foi fracionada por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5%, com posterior transferência para membrana de nitrocelulose PVDF (Immobilon-P Millipore). Em seguida, a membrana foi corada com Rouge Ponceau 0,2% em 1% de ácido tricloroacético (TCA), para a visualização da banda referente à proteína de interesse. A região dessa banda foi excisada da membrana e fragmentada. Após três lavagens de 10 minutos com PBS/Tween-20 0,05%, os fragmentos foram incubados durante 30 minutos a 4° C numa solução de leite 5% em PBS 1X/ Tween-20 0,05% para saturação da membrana. Em seguida, adicionou-se, sob agitação, o soro policlonal contra a respectiva proteína recombinante, por um período de 18h a 4° C.

Após esta etapa, foram realizadas, novamente, três lavagens de 10 minutos com PBS/Tween-20 0,05%, com posterior tratamento com solução ácida de glicina 0,1 M (pH 2,5), para a eluição do anticorpo específico. A solução foi então separada dos fragmentos da membrana e neutralizada com 20 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,0 e acrescida de 200 µl PBS duas vezes concentrado. O anticorpo purificado foi armazenado a -80° C. Posteriormente, a eficiência da purificação foi testada através de ensaios de reconhecimento das proteínas fusionadas a cauda de poli-histidina, GST e extratos de *T. brucei* na fase procíclica e sanguínea.

4.6 ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Amostras das proteínas recombinantes e dos extratos dos parasitas diluídas em tampão de proteína (Laemmli) foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana hidratada foi incubada inicialmente em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 1%, pH7,5), por meia hora, responsável pelo bloqueio da mesma, evitando assim ligações inespecíficas e em seguida foi incubada em solução de leite 2,5%/ TBS Tween-20 1%, com os respectivos anticorpos purificados (anti-*TbNOM1* e anti-*TbH2B*), em diluição 1:500, sendo colocada sob leve agitação por 18 horas.

No dia seguinte, a membrana foi lavada duas vezes em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 1% e uma terceira vez com TBS Tween-20 1%, sendo posteriormente incubada em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 1% com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase na diluição de 1:8.000.

Após três lavagens, como descrito anteriormente, foi adicionada à membrana uma mistura de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM (em DMSO) e peróxido de hidrogênio 0,03% para a reação de quimioluminescência (ECL). Essa incubação se deu por dois minutos e a membrana foi seca e exposta a um filme (Hyperfilm™ – Amersham Biosciences) por 7 e 2 minutos, sendo, então, revelado por uma solução de dektol (1:2) e fixado em solução de ácido acético.

O reconhecimento da proteína *TbNOM1* por seu respectivo anticorpo policlonal foi verificado por ensaios de *Western blot* seguindo os parâmetros citados acima, sendo empregadas diferentes diluições para as proteínas purificadas e extratos protéicos totais de fase procíclica e sanguínea de *T. brucei*.

4.7 CULTIVO DE CÉLULAS

As culturas de células de *T. brucei* na fase procíclica utilizadas neste trabalho foram as linhagens 29-13 (linhagem transgênica que possui em seu genoma genes da T7 RNA polimerase e do repressor do operon de tetraciclina expressos constitutivamente) e 427 (linhagem selvagem). Ambas são cultivadas em meio SDM-79 (Sigma®), a 27° C, suplementado com hemina, soro fetal bovino (10% v/v) e os antibióticos ampicilina/estreptomicina (0,1%). Na linhagem 29-13 foram adicionados, também, os antibióticos neomicina (15 µg/ml) e higromicina (25 µg/ml) para manutenção.

As culturas das células sanguíneas foram cultivadas a 37° C em câmaras com 5% de CO₂, o meio utilizado foi o HMI-9 (composto por: IMDM, Bicarbonato de Sódio, Hipoxantina, Timidina, Ácido Batocrupoínico, Cisteína e β-mercaptoetanol), suplementado por soro fetal bovino (10% v/v) e ampicilina/estreptomicina (0,1%). A linhagem avaliada foi: selvagem (BSF 427).

As diferentes culturas de parasitas utilizadas neste trabalho foram monitoradas por contagem em câmara *Newbauer*.

4.8 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

Para a realização das curvas de crescimento da forma procíclica de *T. brucei*, foi feito, inicialmente, um pré-inóculo de 20 a 30 ml de cultura de células da linhagem 427 de manutenção com concentração inicial de $2,5 \times 10^6$ células/ml. O inóculo foi acompanhado, no dia seguinte, para contagem das células e verificação da fase de crescimento alcançada pela cultura. Quando ela atingiu a fase estacionária de crescimento (estimado em 8×10^6 células/ml), foi retirada a alíquota do ponto 0h. A cultura foi, então, expandida para 400 ml com concentração de 5×10^5 células/ml.

O experimento foi monitorado a cada 24 horas até a morte das células, e alíquotas contendo um número equivalente de células/µl foram retiradas em cada uma dessas etapas. As amostras obtidas foram utilizadas para produção de extratos protéicos totais, através de centrifugação (2.700 g / 5 minutos), lavagem com PBS e posterior ressuspensão em tampão de amostra para SDS-PAGE (Laemmli).

Os extratos obtidos foram fervidos por 5 minutos e posteriormente fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membranas de nitrocelulose, possibilitando uma posterior análise por *Western blot*.

Para realização das curvas de crescimento da linhagem de *T. brucei* na fase sanguínea (427), foi realizado um pré-inóculo de 50 a 70 ml de cultura com uma concentração inicial de 2 a 4×10^5 células/ml, utilizando para isso alíquotas da cultura de manutenção. Estas culturas foram acompanhadas diariamente até que fosse atingida a fase estacionária de crescimento (em torno de 10^6 células/ml), quando a alíquota do ponto de 0 h da curva de crescimento foi retirada, contendo $2,5 \times 10^5$ células/ml. Outra alíquota do pré-inóculo foi utilizada para realizar a expansão da cultura para um volume de 400 ml do respectivo meio de cultura, de forma a ajustar a concentração inicial da cultura também para $2,5 \times 10^5$ células/ml. Após esse momento, alíquotas contendo um número equivalente de células foram retiradas no tempo de 6 horas e depois a cada 24 horas até a ocorrência da morte celular. Estas amostras foram utilizadas para a produção de extratos protéicos totais, e o procedimento adotado para tal fim foi o mesmo já descrito para as formas procíclicas.

4.9 PURIFICAÇÃO DE FOSFOPROTEÍNAS

Para analisar se a proteína *TbNOM1* é regulada por fosforilação após a tradução, foram cedidas amostras provenientes de um experimento de purificação de fosfoproteínas (Malvezzi, 2010). Este experimento foi realizado com a utilização do Kit de purificação de Fosfoproteínas (Qiagen), que possibilitou separar a fração de proteínas fosforiladas das proteínas não fosforiladas de lisados da forma procíclica de *T. brucei*.

Inicialmente, uma alíquota da cultura contendo 2×10^8 células foi centrifugada a 6000 g a 4°C e lavada com HEPES 50 mM pH 7,0. O sedimento foi ressuspenso em 5 ml do tampão de lise do kit (25 mM MES, 1 M NaCl, 0.25% CHAPS) contendo inibidores de proteases e a nuclease benzonase (utilizada na degradação de ácidos nucléicos) e então incubado por 30 minutos a 4°C, sendo brevemente agitado a cada 10 minutos. Após o período de incubação, o lisado celular foi centrifugado a 10.000 g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada através do método de Bradford. Após o equilíbrio da coluna de purificação de fosfoproteínas, um volume de lisado contendo 0,1 mg/ml foi passado pela mesma permitindo que todas as proteínas fosforiladas ficassem retidas na coluna de afinidade. Em sequência, a coluna foi lavada com tampão de lise e a fração não-ligada foi coletada e armazenada para avaliar a eficiência da purificação e para análise das proteínas não fosforiladas. Para obtenção da fração protéica fosforilada foram

realizadas quatro eluições utilizando o tampão de eluição de fosfoproteínas (fosfato de potássio 50 mM e NaCl 50 mM).

A concentração protéica de todas as eluições foi determinada através do método de Bradford e amostras das eluições e da fração não-ligada foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF para detecção da proteína de interesse através de ensaios de *Western-blot*.

4.10 FRACIONAMENTO CELULAR

Cerca de 2×10^8 células de culturas da forma procíclica 427 de *T. brucei* (em fase exponencial de crescimento) foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos a 4° C, sendo os sedimentos posteriormente lavados com PBS. Após outra centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml de dois diferentes tampões de lise. O primeiro deles composto de: 20 mM de HEPES-KOH pH 7,4, 75 mM de acetato de potássio, 4 mM de acetato de magnésio e 2 mM de DTT, acrescido de 100 µl de inibidor de protease e 1 mM de fluoreto de sódio. Após sua adição, as amostras foram submetidas a cinco ciclos de congelamento e descongelamento (utilizando nitrogênio líquido e banho-maria a 37° C).

O segundo tampão de lise era composto por: 50 mM de KCL, 0,125 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de HEPES, acrescidos de 200 µl de inibidor de protease, 2,5% de IGEPAL (NP40) e 4 ml de água. Depois de colocar 1 ml dessa solução, as amostras ficaram no gelo por 15 minutos e ainda passaram por dois ciclos de congelamento/descongelamento.

Ao final dos dois testes, os tubos contendo os lisados foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g, com o sobrenadante final correspondendo à fração citoplasmática e o sedimento à nuclear. As alíquotas dos fracionamentos foram armazenadas em freezer -80° C para posterior análise.

4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A imunofluorescência foi realizada com a linhagem selvagem (427) da forma procíclica de *T. brucei*. Para cada experimento, 2×10^6 células em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 2.700 g por 10 minutos a temperatura ambiente (25° C) e o sedimento obtido foi ressuspensado com meio SDM 79 sem soro e sem hemina, acrescido de paraformaldeído em uma concentração de 3%. Esse procedimento de fixação se deu por 18 horas a 4° C. No dia seguinte, as células foram centrifugadas

(nas mesmas condições anteriores) e lavadas três vezes com 1 ml de PBS, sendo posteriormente incubadas por 15 minutos com lamínulas, previamente, tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®). As lamínulas foram posteriormente submetidas a três lavagens de 10 minutos cada, com PBS-glicina 20 mM, para retirada do excesso de células que não aderiram às mesmas. As células aderidas foram permeabilizadas com solução PBS/ Triton-X 100 (Sigma-Aldrich®) 0,1%, por 10 minutos. Após o procedimento, foram feitas mais três lavagens de 10 minutos com solução PBS-glicina 20 mM, seguidas do bloqueio por 20 minutos com solução PBS-glicina 20 mM / BSA 1% (*Bovine Serum Albumin* - Sigma-Aldrich).

O primeiro anticorpo foi adicionado, nas diluições 1:25 e 1:50 e incubado durante 1 hora a 37° C, na mesma solução de bloqueio. As lamínulas foram lavadas (como descrito acima) e incubadas por 1 hora 37° C com 1:500 de anticorpo secundário conjugado ao Alexa Flúor 488. Após a adição do segundo anticorpo, todos os procedimentos foram realizados no escuro. Posteriormente, à incubação foram realizadas lavagens e acréscimo por 10 minutos do DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), um corante fluorescente que se liga a regiões ricas em DNA, servindo como controle dos experimentos. As células foram, novamente, lavadas e as lamínulas contendo as mesmas foram secadas e montadas em lâminas com utilização de *Prolong Gold* (Invitrogen). As lâminas já montadas foram acondicionadas a 4° C estando protegidas da luz, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

4.12 PCR E CLONAGEM NO VETOR PGEM T- EASY

As subclonagens obtidas em trabalho anterior (Caiado, 2008) eram do gene *TbNOM1*, flanqueado pelos sítios *Bam* HI e *Not* I (New England BioLabs®), impossibilitando sua utilização no presente trabalho, já que os vetores p2216 (superexpressão em fusão com YFP) e p2T7-177 (RNAi) possuem os sítios de clonagem *Hind* III/ *Bam* HI (New England BioLabs®).

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada numa reação contendo: 5 µL de tampão de reação 10 vezes concentrado, 1 µL de DNA total de *T.brucei*, 0,45 µL do oligonucleotídeo *TbNOMF* (10 µM), 0,45 µL do oligonucleotídeo *TbNOMR* (10 µM) (tabela 1), 0,75 µL de dNTPs (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM CTP, 10 mM dTTP), 5 µL do Enhancer (10 vezes concentrado), 0,5 µl MgSO₄ (50 mM), 1 µL de DNA polimerase *Platinum*® *Pfx* (1 unidade) e água deionizada para um volume final de 25 µl. As condições utilizadas na reação de PCR foram: 1- 94°C por 5 minutos

(desnaturação inicial), 2- 94°C por 15 segundos (desnaturação) , 3- 59°C por 1 minuto (alinhamento dos iniciadores) e 4- 68°C por 2 minutos (extensão). Foram realizados 35 ciclos – dos passos 2 ao 4. As sequências dos *primers* utilizados são citadas na Tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação do gene *TbNOM1*. Na tabela estão presentes as sequências dos *primers* *Forward* e *Reverse*, utilizados para obtenção de fragmentos *TbNOM1* com sítios para as enzimas *Hind* III e *Bam* HI. No *primer Forward* o sítio de *Hind* III está sublinhado e no *Reverse* o destaque está no sítio para *Bam* HI.

Primer	Orientação	Sequência
<i>TbNOM1F</i>	Forward	<u>AAG CTT</u> ATG GAC GTG TTT TCA AGA CAT G
<i>TbNOM1R</i>	Reverse	<u>GGA TCC</u> CGA AAT GCC ACC CTT CAA AGC

Após o término da reação de PCR, foram fracionados 2 µl da amostra em gel de agarose à 1% contendo o corante de DNA SYBR[®] Safe (Invitrogen), a 120V por 50 minutos. As bandas foram visualizadas com ajuda do transluminador de raios ultravioleta.

Os fragmentos foram, então, clonados no vetor pGEM T-easy (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Para que as amostras fossem ligadas ao vetor foi necessário um tratamento prévio com *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare), para adicionar os nucleotídeos “Adeninas” às extremidades do produto de PCR. O tratamento ocorreu com o uso de 5 µl da amostra obtida após a PCR numa reação contendo: 1 µl do tampão para enzima *Taq* 10 vezes concentrado com MgCl₂ (1,5 mM), 0,2 µl de dATP (0,2 mM), 1 µl de *Taq* e água para completar o volume final da reação para 10 µl. As amostras foram incubadas na temperatura de 70° C por 30 minutos.

A ligação foi feita em diferentes proporções inserto: vetor (1:1, 3:1, 5:1), sendo composta por 5 µl de tampão 2x, 1 µl de pGEM T-easy, produto de PCR tratado com *Taq*, 1 µl da enzima T4 DNA ligase e água deionizada para um volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas 16 horas na temperatura de 4° C. Para a triagem dos clones, após a ligação entre inserto/plasmídeo, 50 µl de bactérias DH10b (Invitrogen), foram transformadas com 5 µl da ligação, sendo incubadas por 30 minutos no gelo, seguidos de 5 minutos a 37° C. Após choque térmico, as transformações foram

semeadas em meio LB Agar contendo ampicilina (100 µg/ml) e X-GAL (1 mg) /IPTG (100 mM), sendo incubadas a 37°C por 16 horas. Os clones obtidos foram inoculados em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) e colocados sob agitação de 180 rpm a 37°C durante 16 horas. Em seguida, foram realizadas minipreparações para extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001).

Para a confirmação da clonagem foram realizadas, inicialmente, provas de digestão com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI, e posteriormente o sequenciamento das amostras obtidas.

4.13 SUBCLONAGEM DO GENE *TbNOM1* NOS VETORES P2216 E P2T7-177

Para etapas posteriores do trabalho, foi necessário subclonar o gene *TbNOM1* nos vetores plasmidiais p2216 e p2T7-177. O plasmídeo p2216 (Kelly *et al.*, 2007) permite a expressão do gene inserido em proteína fusionada no C-terminal a proteína de fluorescência amarela (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein* - EYFP). Essa construção contém o promotor para T7 polimerase sendo o mesmo induzido por tetraciclina. A segunda subclonagem foi realizada no vetor p2T7-177, que integra os genes em um minicromossomo de *T. brucei* e permite realizar a técnica de interferência de RNA, visto que ele apresenta dois promotores para T7 RNA polimerase em orientação inversa, cuja transcrição é induzida por tetraciclina. Tanto o p2216, quanto o p2T7-177, possuem resistência a fleomicina, sendo esse antibiótico utilizado na seleção das células transfectadas.

Para as subclonagens, foi necessário estabelecer uma estratégia diferenciada, uma vez que, no final da sequência gênica da *NOM1* de *T. brucei* já existia um sítio para *Hind* III. Na tentativa de contornar esse problema, foram digeridos 20 µg da construção pGEM/*TbNOM1* com *Bam* HI inicialmente. Após confirmação da linearização da amostra, os fragmentos foram digeridos parcialmente com *Hind* III, utilizando o tampão 3 (New England Biolabs - propicia uma atividade de apenas 50% da enzima) e a banda que parecia corresponder ao maior material isolado do plasmídeo pGEM T-easy foi excisada do gel de agarose sendo posteriormente purificada.

Paralelamente, 20 µg dos plasmídeos p2216 e p2T7-177 também foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI (10 Unidades de cada). Os fragmentos obtidos foram purificados com o *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) e ligados com a enzima T4 DNA ligase (New England

BioLabs®), seu respectivo tampão e água para 10µl de reação, sendo incubados a 16° C durante 18h. Foram realizadas ligações em duas proporções inserto: vetor, sendo 1:1 e 3:1. As construções foram então transformadas em cepas DH10b de *Escherichia coli* e as minipreparações obtidas foram confirmadas por digestões com enzimas de restrição, em seguida foram realizadas preparações de DNAs plasmidiais em larga escala.

4.14 TRANSFECCÕES

Para a realização das transfecções em células de *T. brucei*, os diferentes plasmídeos contendo o gene *TbNOM1* foram extraídos em larga escala com a utilização do kit de maxipreparação de DNA plasmidial (Qiagen). Em seguida, foram linearizados 10 µg dos DNA plasmidiais *TbNOM1*-p2216 e *TbNOM1*-p2T7-177 com a enzima *Not I* (5 Unidades por linearização). Células da linhagem 29-13 em fase exponencial (2×10^7 células/ml) foram centrifugadas (600 g /10 minutos) e lavadas em meio de eletroporação ZPMF (132 mM de NaCl, 8 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 1,5 mM de KH₂PO₄, 1,5 mM de MgOAC.4H₂O, 90 µM de CaCl₂), sendo posteriormente ressuspensas em 450 µl mesmo. As alíquotas foram incubadas com o DNA plasmidial e transfectadas em um eletroporador para células eucarióticas BTX ECM 830 (Genotronics), com três pulsos elétricos de 1.5 kV, 200 microssegundos de amplitude e 10 segundos de duração.

As células transfectadas foram transferidas, em seguida, para 10 ml de meio SDM-79 e incubadas por 18 horas antes do acréscimo dos antibióticos de manutenção (neomicina e higromicina) e da fleomicina (2,5 µg/ml) utilizada na seleção de parasitas contendo as construções transfectadas. Após esse tempo, parte da cultura foi dividida em poços de 2 ml com concentração de 10^6 células/ml e suplementadas com mais 5% de soro fetal bovino (totalizando 15%). A seleção com fleomicina foi feita por 12 dias, sendo seguida por uma fase de recuperação das células em meio rico em aminoácidos e fleomicina (1 µg/ml).

4.15 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR POR PROTEÍNA FLUORESCENTE

Células procíclicas previamente transfectadas e selecionadas com a construção *TbNOM1*-p2216 foram expandidas e crescidas até 6 a 8×10^6 /ml, com posterior indução da expressão das proteínas fusionadas a EYFP feita por adição de tetraciclina, tendo como controle, células transfectadas retiradas do mesmo tubo de manutenção e

diluídas da mesma forma, mas com ausência de tetraciclina. Após 48h de indução alíquotas de 1×10^7 células foram lavadas com tampão PBS e incubadas a 4° C por 30 minutos. A análise da expressão da *TbNOM1* fusionada à proteína EYFP foi realizada em microscópio confocal TCPS SP2 AOBS – Leica Microsystems ®.

Além da análise no microscópio, as culturas do controle negativo e das células com supreeexpressão ativada por tetraciclina, foram centrifugadas a 2700 g/10 minutos, lavadas com PBS e ressuspensos de amostra para SDS-PAGE (Laemmli), para posterior *Western blot* e confirmação da transfecção.

4.16 INTERFERÊNCIA DE RNA

Após a transfecção, seleção dos clones pela adição de fleomicina e recuperação das células transfectadas, a viabilidade celular, juntamente com o efeito da indução do RNAi, foi avaliada através de curvas de crescimento dos parasitas.

Para isso, as culturas foram expandidas para o volume de 60 ml com uma concentração celular de 5×10^5 células/ml, sendo esse dividido em duas amostras com 30 ml cada, uma delas com a indução da interferência de RNA feita pela adição de tetraciclina (1 μ g/ml) e a outra funcionando como controle negativo do experimento (sem a adição de tetraciclina para ativação do RNAi). O crescimento das culturas foi monitorado a cada 24 horas por observação das células em microscópio óptico e contagem em câmara de *Newbauer*. Em torno de quatro dias após o início da curva, as culturas foram novamente diluídas para evitar morte celular e a monitoração continuou por mais dois dias.

5. RESULTADOS

Para iniciar a caracterização funcional da proteína NOM1 em *T. brucei* foram utilizadas diferentes abordagens experimentais, com o uso de ferramentas bioquímicas como produção de proteínas recombinantes para ensaios de interação proteína-proteína *in vitro*, obtenção de anticorpos e manipulação *in vivo* do parasita. A dissertação teve como foco três diferentes temas para avaliação, sendo eles: 1- análise da interação entre os ortólogos NOM1 e eIF4A de *T. brucei*; 2- análise de expressão, fosforilação e localização subcelular da proteína NOM1; 3- análise do efeito da depleção ou superexpressão da proteína NOM1 em células procíclicas de *T. brucei*. Nos tópicos abaixo são apresentados os principais resultados obtidos em relação aos temas de investigação desta dissertação.

5.1 ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE OS ORTÓLOGOS NOM1/EIF4A DE *T. BRUCEI*

Com o objetivo de investigar a possibilidade de interação entre a proteína *TbNOM1* com ortólogos *TbEIF4A1* e *AIII*, como encontrada em diferentes organismos, utilizamos a técnica de *Pull-down*. Essa técnica já foi usada para demonstrar a interação entre homólogos do eIF4G com o eIF4E e ou eIF4A de *L. major* e *T. brucei* (Dhalia *et al.*, 2005; Reis., 2009; Freire *et al.*, 2011). Nos ensaios de *Pull-down*, as proteínas fusionadas a GST são pré-incubadas com a resina Glutathione Sefarose 4B e em seguida incubadas com as proteínas marcadas com ^{35}S . A resina é então coletada, lavada para remoção de interações inespecíficas e as proteínas retidas são analisadas por eletroforese desnaturante, em gel de poliácridamida. Apenas no caso de interações específicas, entre as proteínas com GST e àquelas marcadas com ^{35}S é que as proteínas radioativas vão ser detectadas junto à resina.

5.1.1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE FUSÃO

As construções de DNA plasmidial *TbNOM1/pET21a* e *TbNOM1/pGEX4T3*, obtidas em trabalho anterior, (Caiado, 2008), permitiram a expressão e purificação das proteínas *TbNOM1-HIS* e *GST-TbNOM1* respectivamente. As proteínas recombinantes foram expressas e purificadas em *E. coli* (Figura 8). As amostras protéicas obtidas foram quantificadas em SDS-PAGE 15%, juntamente com amostras de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações conhecidas. Algumas alíquotas das proteínas *GST-TbNOM1* purificadas foram então dialisadas e novamente quantificadas para uso nos

ensaios de *Pull down*. Ao mesmo tempo, as proteínas *TbEIF4AI*, *TbEIF4AIII*, *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* foram expressas, purificadas, dialisadas e quantificadas para utilização nos ensaios de interação proteína/proteína.

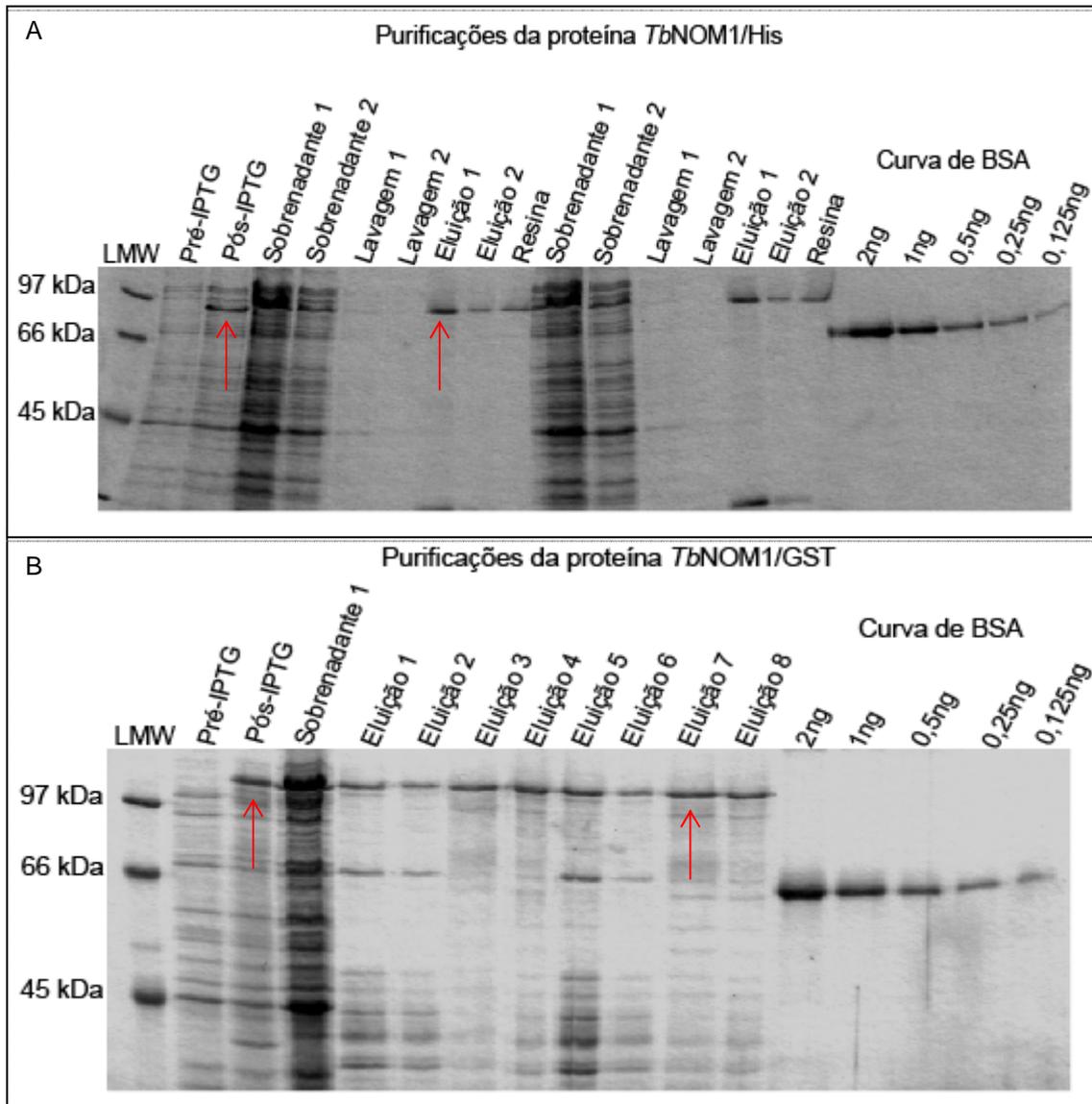


Figura 8. Purificação das proteínas *TbNOM1/His* e *TbNOM1/GST*. Expressão das proteínas recombinantes *TbNOM1/Histidinas* e *GST*. As proteínas foram previamente expressas em bactérias e após diferentes etapas de purificações (pós-IPTG e eluições em destaque com setas vermelhas), fracionadas em SDS-PAGE 15%, sendo comparadas com o marcador LMW e com amostras de albumina bovina sérica (BSA) para quantificação. **A.** As proteínas foram expressas em seu tamanho molecular de 84.5 kDa. O rendimento das purificações foi satisfatório, com uma quantidade de proteína muito superior nas eluições (principalmente a primeira), do que na resina. **B.** As proteínas foram expressas em seu tamanho molecular de 112.5 kDa. O rendimento das purificações foi satisfatório, com uma quantidade de proteína suficiente para a utilização nos ensaios de interação posteriores. O maior problema enfrentado com as proteínas fusionadas a *GST* foi a degradação sempre presente.

5.1.2 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS MARCADAS RADIOATIVAMENTE

Para realização dos ensaios de *Pull-down*, foi necessária a transcrição dos genes *TbNOM1*, *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* com consequente produção do mRNA, seguido de sua tradução *in vitro* para a produção das proteínas marcadas com ^{35}S . As construções *TbNOM1/pET21a*, *TbEIF4AI/p2171* e *TbEIF4AIII/pET21D* linearizadas com *Not I* foram então purificadas e utilizadas para transcrição *in vitro* pela enzima T7 RNA polimerase, seguida da tradução dos mRNAs resultantes em lisado de reticulócito de coelho. Mesmo com a garantia de um mRNA de qualidade (analisados em gel de agarose) e com quantidades aumentadas, a tradução da proteína *TbNOM1* não foi muito eficiente. Essa característica pode ter ocorrido devido ao tamanho da mesma ou até da quantidade de metioninas presentes em sua sequência, já que a banda vista no filme é uma impressão da radiação contida no gel. Já as proteínas *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* possuíram níveis de tradução maiores (Figura 9), entretanto, isso não impossibilitou a realização do experimento de interação entre a proteína *TbNOM1* e os homólogos do eIF4A de *T.brucei*.

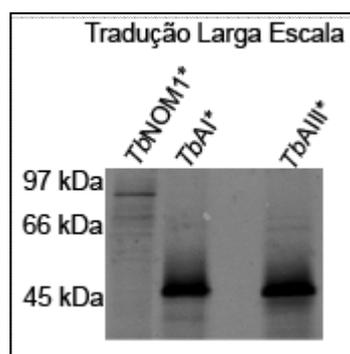


Figura 9. Tradução *in vitro* das proteínas *TbNOM1*, *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII*. Autorradiografia mostrando as traduções em larga escala obtidas para as proteínas *TbNOM1*, *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII*. O símbolo * indica que as proteínas contêm metionina marcada com radiação.

5.1.3 ENSAIOS DE LIGAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

De posse das diferentes proteínas recombinantes e marcadas radioativamente, passou-se a realização dos ensaios de *Pull-down*, propriamente. No ensaio onde as proteínas *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII*, fusionadas a GST, foram incubadas com a proteína *TbNOM1* radioativa, foi possível observar uma fraca ligação. Entretanto, e de forma surpreendente, a proteína GST-*TbNOM1* também foi capaz de se ligar a proteína radioativa em uma ligação mais eficiente, indicando que essa proteína além de se ligar com homólogos do eIF4A, parece ser capaz de se ligar a si mesma (Figura 10). Em ensaios reversos, onde as proteínas *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* radioativas foram incubadas tanto com a *TbNOM1* como com as proteínas *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* fusionadas com a GST, não foi possível observar interações específicas, mesmo no caso do controle positivo (*TbEIF4G3/ TbEIF4AI*) (dados não mostrados). É necessário, entretanto, repetir este segundo conjunto de experimentos, fazendo uso de proteínas radioativas geradas a partir de mRNAs obtidos de construções plasmidiais com o vetor pET21a, uma vez que mRNAs gerados a partir de p2171 ou que expressam HIS na N-terminal podem alterar a estrutura terciária da proteína atrapalhando os ensaios de interação *in vitro*.

No entanto, só o dado obtido sobre a ligação entre proteínas *TbNOM1* já é relevante, visto que essa característica não foi descrita nos ortólogos da proteína NOM1 de outros organismos já estudados e nem é destacada em nenhum artigo das proteínas que contêm o domínio MIF4G.

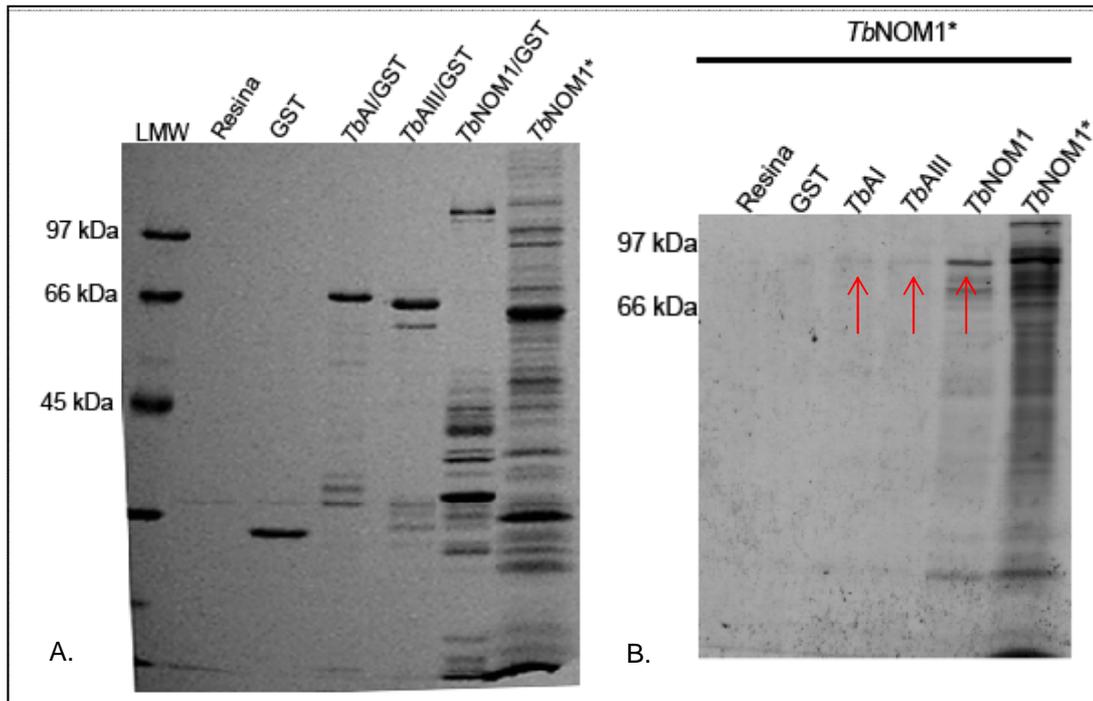


Figura 10. Análise de interação entre a proteína *TbNOM1* radioativa (*) e as proteínas *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* fusionadas a GST. As proteínas recombinantes GST, GST-*TbEIF4AI*, GST-*TbEIF4AIII* e GST-*TbNOM1* foram imobilizadas em resina Glutaciona Sefarose 4B e incubadas com a proteína *TbNOM1* marcada com ^{35}S . A figura A representa as proteínas recombinantes fracionadas em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. A Figura B representa a autorradiografia mostrando as proteínas ligadas marcadas com ^{35}S . As setas vermelhas estão indicando as ligações ocorridas entre a proteína *TbNOM1* radioativa e as proteínas recombinantes GST-*TbEIF4AI/AIII* e GST-*TbNOM1*. Os pesos moleculares estão indicados no lado esquerdo das figuras.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO, FOSFORILAÇÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA NOM1 NATIVA DE *T. BRUCEI*

Essa etapa do trabalho iniciou-se com a avaliação da expressão da proteína NOM1 em *T. brucei*, utilizando para isso tanto as proteínas recombinantes fusionadas a cauda de Histidina e a GST, como extratos celulares das formas procíclicas e sanguíneas dos parasitas. Além disso, também foi avaliado o reconhecimento do ortólogo da NOM1 em células de *L. major*. Em etapa posterior, os experimentos foram conduzidos para elucidar se a proteína em questão passava por um tipo de regulação pós-traducional denominado fosforilação. Com consecutivos êxitos de reconhecimento do anticorpo obtido, foi possível realizar experimentos de fracionamento celular e imunofluorescência para determinar a localização subcelular da proteína *TbNOM1*.

5.2.1 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*TbNOM1*

Para realização deste trabalho, uma etapa fundamental foi a utilização de anticorpos dirigidos contra a proteína NOM1 de *T.brucei*. Estes anticorpos foram obtidos a partir da imunização de coelhos com as proteínas recombinantes *TbNOM1*-His (Da Silva Júnior, 2011). Os anticorpos policlonais obtidos foram purificados e utilizados em ensaios de *Western blot*. Após as purificações os anti-*TbNOM1* foram testados em amostras contendo as proteínas recombinantes fusionadas a cauda de poli-histidinas e a GST, juntamente com extratos de células *T. brucei* procíclicas (PCF) e sanguíneas (BSF). Os anticorpos foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes no tamanho esperado, porém em fusão com GST foram reconhecidas bandas de massa molecular inferior, provavelmente provenientes de degradação protéica (não mostrado). Em extrato de *T. brucei* a banda correspondente a *TbNOM1* também apareceu, juntamente com outras duas bandas localizadas acima desta (Figura 11). É importante ressaltar que mesmo utilizando soros de três coelhos obtidos em diferentes trabalhos, os anticorpos anti-*TbNOM1* reconheceram três bandas, as de interesse e duas acima dela em extratos de *T. brucei*.

Através dos anticorpos purificados, avaliamos a capacidade de reconhecimento de anti-*TbNOM1* em extratos celulares de *L. major*. Os anticorpos reconheceram especificamente uma proteína no tamanho predito (93.6 kDa) para *LmNOM1* (Figura 12), todavia não reconheceram as duas bandas de massa molecular superior encontradas em *T. brucei*. Além disso, o reconhecimento foi muito intenso, o que não ocorre em *T. brucei*, pois as bandas mais altas são mais fortes.

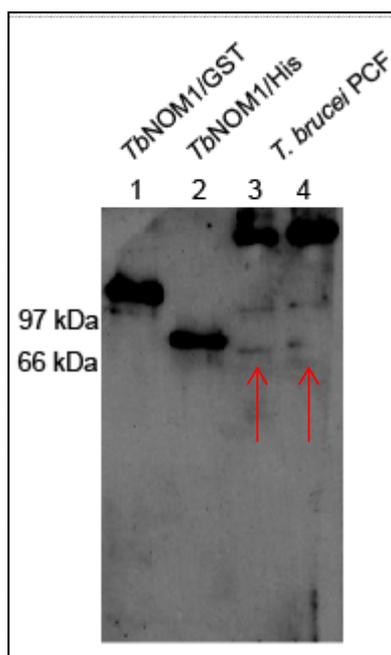


Figura 11. Teste de reconhecimento do anti-*TbNOM1*. Experimento de *Western blot* realizado para testar o reconhecimento do anticorpo anti-*TbNOM1* contra 5ng das proteínas recombinantes fusionadas a GST (1) e cauda de Histidinas (2), assim como o reconhecimento da proteína no extrato celular da forma procíclica (PCF) de *T. brucei*, com 2×10^6 (3- seta vermelha) e 10^6 (4- seta vermelha) células. Para realização do ensaio as proteínas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% com marcador LMW e transferidas para membrana PVDF. O teste reconheceu as proteínas recombinantes fusionadas a Histidinas com 84.5 kDa e a GST com 112.5 kDa, assim como a proteína endógena de *T. brucei* com a presença de duas bandas adicionais acima do tamanho predito para a mesma.

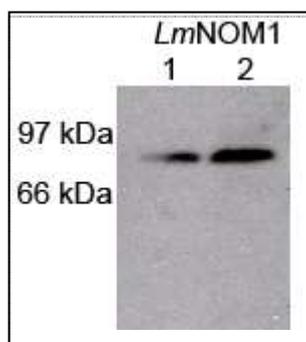


Figura 12. Teste de reconhecimento da proteína *LmNOM1*. Experimento de *Western blot* realizado para testar o reconhecimento do anticorpo anti-*TbNOM1* um extrato de células de *L. major* em fase exponencial. O poço 1 contém 5×10^6 células, enquanto o 2 apresenta 10^7 células. Para realização do ensaio as proteínas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% com marcador LMW e transferidas para membrana PVDF. O reconhecimento ocorreu no tamanho predito para a proteína *LmNOM1* (93.6 kDa) e sem a presença de bandas adicionais acima da prevista para o peptídeo.

5.2.2 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *T. BRUCEI*

Para comparar o perfil de expressão da NOM1 em diferentes fases de crescimento do *T. brucei*, foram analisadas alíquotas de curvas de crescimento, que

permitiram avaliar se há expressão diferencial da proteína *TbNOM1* em culturas axênicas de *T. brucei* nas formas procíclica e sanguínea de seu ciclo de vida.

Assim, extratos celulares correspondentes a células da linhagem de *T. brucei* 427 de diferentes fases do crescimento foram imobilizados em membrana e incubados com anti-*TbNOM1*. A expressão da *TbNOM1* é constitutiva durante as diferentes fases de crescimento nas formas procíclicas (Figura 13A). Como controle foi utilizado a proteína *TbEIF4AI*, que previamente foi identificada como constitutivamente expressa (Figura 13B).

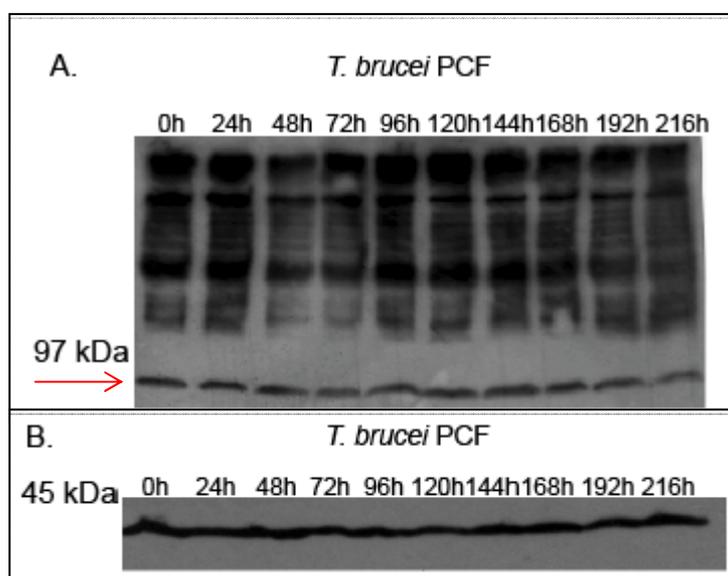


Figura 13. Curva de expressão da proteína *TbNOM1* na forma procíclica de *T. brucei*. Curva de 10 dias que abrange todo o crescimento da forma procíclica de *T. brucei* contendo 10^7 células em cada ponto da curva. **A.** Expressão constitutiva da proteína *TbNOM1*. **B.** Controle do experimento, proteína *TbAI* que possui expressão constante no ciclo dessas células.

Em seguida, avaliamos a expressão da *TbNOM1* em diferentes fases de crescimento da forma sanguínea. Para essas curvas foram utilizados extratos celulares com 5×10^6 células. Estes experimentos demonstraram a presença de duas bandas acima do tamanho predito, já visualizado na figura 11, em todos os pontos analisados (0h, 6h, 12h, 24h e 48h), todavia as bandas no tamanho predito só foram visualizadas nos pontos 0 e 6 horas (Figura 14). Esse comportamento divergiu do apresentado em células procíclicas, onde esse ortólogo aparece constante durante os nove dias do ciclo de vida dos parasitas.

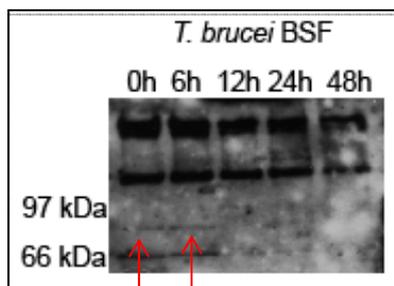


Figura 14. Curva de expressão da proteína *TbNOM1* na forma sanguínea de *T. brucei*. Cada poço contém 5×10^6 células retiradas em tempos diferentes da curva de crescimento da forma BSF: 0h, 6h, 12h, 24h e 48h. As bandas no tamanho predito da proteína *TbNOM1* foram reconhecidas em 0 e 6 horas. Já as bandas de massa molecular maior estavam presentes durante todo o ciclo do parasita.

5.2.3 A PROTEÍNA *TbNOM1* NÃO É REGULADA POR FOSFORILAÇÃO APÓS A TRADUÇÃO

Amostras de lisados da forma procíclica de *T. brucei* foram incubadas com resina específica para purificação de todo o conjunto de fosfoproteínas do parasita. As proteínas fosforiladas ficaram imobilizadas na resina e após lavagens, saíram nas eluições com tampão específico. As amostras obtidas foram incubadas com o anti-*TbNOM1* para identificar se a proteína avaliada podia apresentar-se fosforilada. Como controle negativo foi utilizado o anti-*TbEIF4A1*, que não é capaz de reconhecer a respectiva proteína nas eluições obtidas, indicando que a mesma é não fosforilada. Já o anti-*TbEIF4E3* foi utilizado como um controle positivo, já previamente foi identificado o reconhecimento da respectiva proteína nas eluições, demonstrando que a mesma é fosforilada. Quando testada com o anti-*TbNOM1*, a *TbNOM1* foi identificada no lisado e sobrenadante, entretanto a proteína não foi encontrada nas eluições, o que a caracteriza como uma proteína provavelmente não-fosforilada (Figura 15).

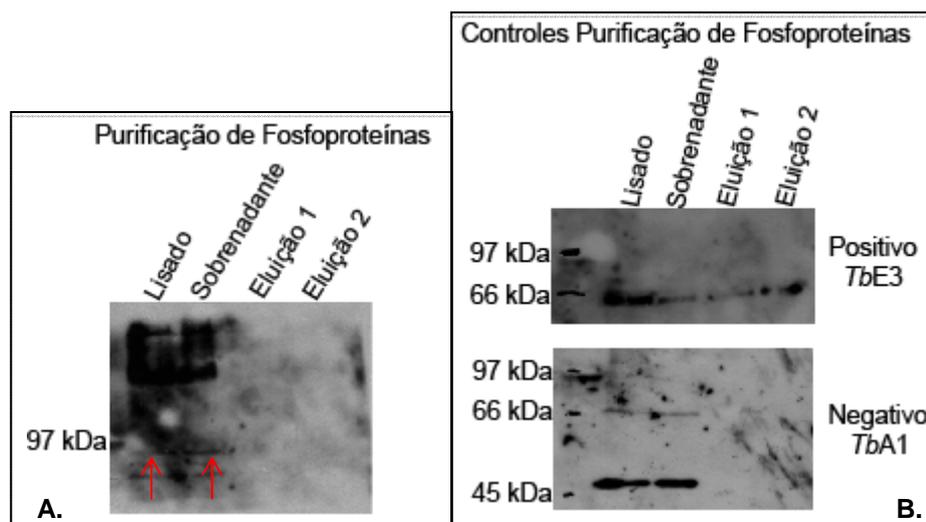


Figura 15. Ensaio de purificação de proteínas fosforiladas. As amostras resultantes da purificação de fosfoproteínas foram corridas em gel SDS-PAGE 15%, sendo então transferidas para membrana PVDF e incubadas com os anticorpos **A.** anti-*TbNOM1* (reconhece proteína de interesse). **B.** anti-*TbEIF4A1* (controle negativo) e anti-*TbEIF4E3* (controle positivo). O lisado é utilizado para verificar se a proteína estava inicialmente no ensaio, o sobrenadante é a fração que passou pela resina onde as proteínas fosforiladas se ligam e as eluições correspondem a proteínas fosforiladas.

5.2.4 ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR EM *T. BRUCEI*

A partir dos resultados satisfatórios na purificação e reconhecimento dos anticorpos anti-*TbNOM1* contra as proteínas recombinantes e os extratos de *T. brucei*, foram realizados experimentos para indicação da localização subcelular da proteína *TbNOM1*. O fracionamento celular foi um deles e consiste na separação das frações citoplasmáticas e nuclear da célula, sendo conduzido com a utilização de dois diferentes tampões e protocolos diversos. Apesar disso, ambos os testes convergiram na apresentação de um padrão de proteínas diferenciado no sobrenadante e no sedimento celular. A proteína *TbNOM1* foi encontrada inteiramente na fração solúvel, que corresponde ao citoplasma celular. Enquanto isso, o anticorpo para o controle nuclear anti-*TbH2B* só reconheceu a proteína na fração insolúvel, que corresponde ao núcleo.

Visto que o fracionamento pelas duas técnicas utilizadas apresentou um padrão semelhante em gel, apenas as amostras do fracionamento celular a partir do lisado de congelamento/descongelamento foram usadas para realizar um ensaio de *western-blot* que viesse indicar a localização subcelular da *TbNOM1* e *TbH2B* (Figura 16). A presença da *TbNOM1* na amostra relativa ao sobrenadante é indicativo de sua

localização citoplasmática, enquanto que a histona *TbH2B*, foi observada apenas na amostra relativa ao sedimento, indicando sua localização nuclear.

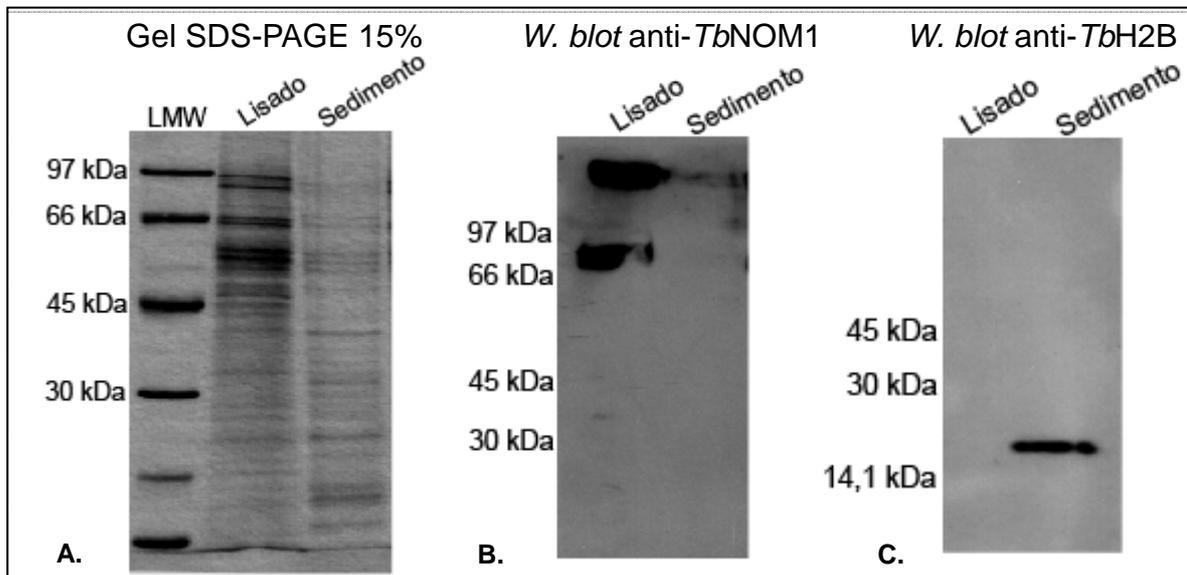


Figura 16. Localização da proteína *TbNOM1* pela técnica de fracionamento das células de *T. brucei*. No experimento realizado, as células foram lisadas, com posterior separação entre o sobrenadante e o sedimento resultantes. **A.** As amostras obtidas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e coradas com Coomassie para visualização dos diferentes perfis protéicos encontrados no lisado (sobrenadante) e sedimento (núcleo), após o fracionamento. **B.** Após a transferência das amostras para membranas PVDF e realização de experimentos de *Western blot* com o anti-*TbNOM1* foi observado o reconhecimento da proteína *TbNOM1* no lisado. **C.** Após a transferência das amostras para membranas PVDF e realização de experimentos de *Western blot* com o anti-*TbH2B* foi observado o reconhecimento do controle nuclear *TbH2B* no sedimento.

Para confirmar, através de outra metodologia, a localização da proteína *TbNOM1* (Figura 17), foram realizados experimentos de imunofluorescência. O anti-*TbNOM1* foi capaz de reconhecer a região citoplasmática, sendo mais concentrada na região próxima ao kinetoplasto. O ensaio foi validado pelo uso de DAPI, um marcador nuclear. Esse resultado corrobora o resultado obtido no fracionamento celular, confirmando a *TbNOM1* como uma proteína citoplasmática

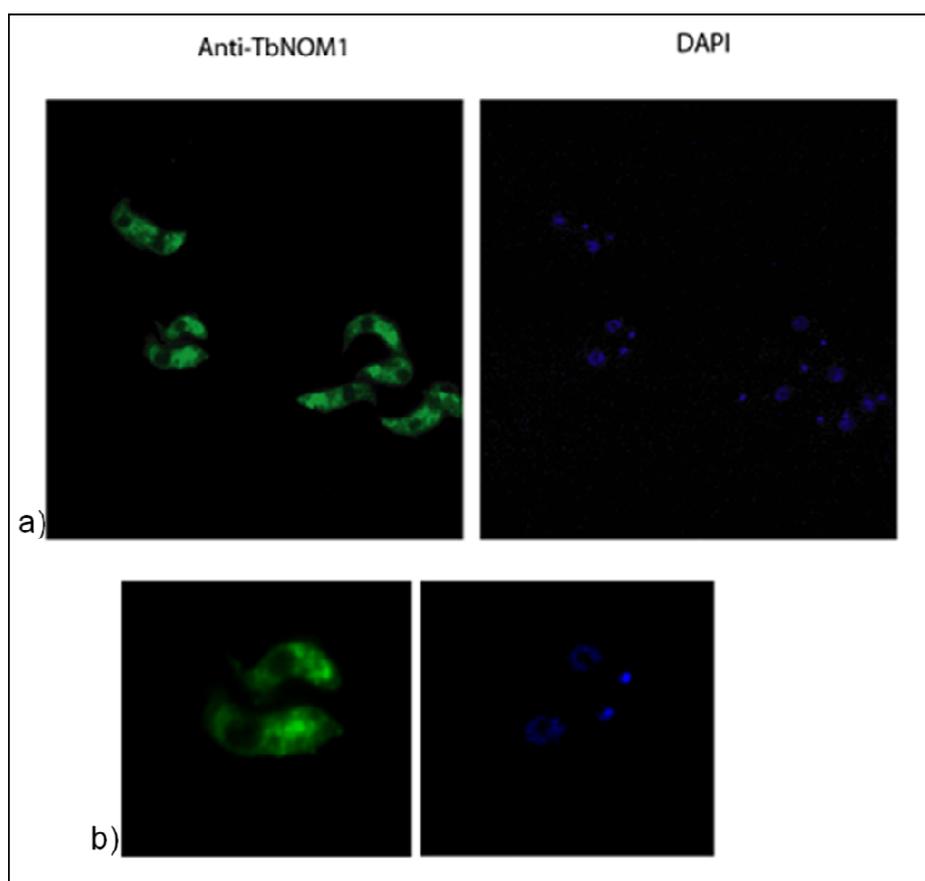


Figura 17: Análise da localização subcelular da NOM1 em *T.brucei*. Células de *T.brucei* da linhagem 427 submetidas à técnica de imunofluorescência indireta com o anticorpo anti-*TbNOM1* (à esquerda) e contra coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (à direita). As células foram observadas em microscopia de fluorescência, em (a) notamos várias células marcadas pelo anticorpo anti-*TbNOM1* e num maior aumento apenas duas células (b).

5.3 ANÁLISE DO EFEITO DA DEPLEÇÃO OU SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA *TbNOM1* EM CÉLULAS PROCÍCLICAS DE *T.BRUCI*

Para validar a localização subcelular obtida por fracionamento celular e imunofluorescência indireta foi realizada a superexpressão da proteína *TbNOM1* fusionadas à proteína fluorescente (EYFP). Outro aspecto analisado foi o efeito da depleção da proteína *TbNOM1* para a viabilidade do parasita foi realizada a técnica de interferência de RNA. Para que estas ensaios fossem realizados foi necessário, porém obter inicialmente construções plasmidiais para realização das transfeções em células procíclicas de *T.brucei*.

5.3.1 CLONAGEM E SUBCLONAGEM DO GENE *TbNOM1* EM VETORES DE TRANSFEÇÃO DE *T. BRUCEI*

A partir do DNA total de *T. brucei* foi realizada a amplificação do gene *TbNOM1* flanqueado pelos sítios das enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose, permitindo a visualização de um fragmento aproximado de 2.300 pb (Figura 18), como predito com base na sequência genômica (número de acesso: Tb927.6.2650).

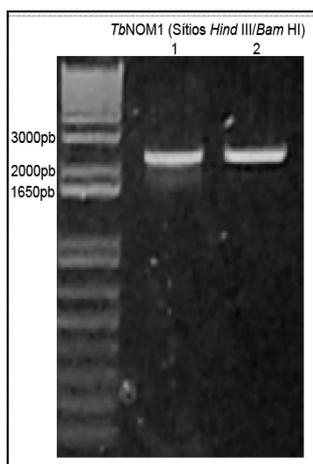


Figura 18. Visualização dos produtos de PCR para o gene *TbNOM1* flaqueado pelo sítios *Hind* III /*Bam* HI. Após amplificações, os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1%, corado com SYBER SAFE. O marcador utilizado foi o 1Kb Ladder (Invitrogen). Em 1 – produto de PCR obtido com temperatura de anelamento 56° C; 2- produto de PCR obtido com temperatura de anelamento de 59° C.

O gene *TbNOM1* foi clonado inicialmente no vetor pGEM T-easy. A partir dos clones obtidos pela ligação *TbNOM1*/pGEM T-easy foram realizadas minipreparações de DNA plasmidial. Em seguida, as clonagens foram verificadas através de provas de digestão simultânea com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI (Figura 19), demonstrando a liberação de um fragmento maior correspondente ao vetor e o segundo fragmento referente ao gene *TbNOM1* inserido na construção. Algumas minipreparações foram submetidas a sequenciamento de DNA para confirmação final da sequência do gene *TbNOM1* de acordo com o encontrado nos bancos de dados.

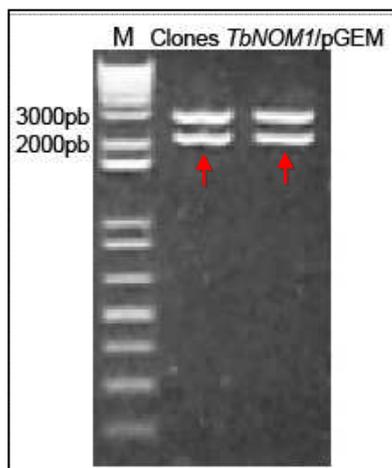


Figura 19. Confirmação da clonagem do gene *TbNOM1* no pGEM T-easy. As amostras de DNA plasmidial *TbNOM1/pGEM T-easy* digeridas com *Hind* III/*Bam* HI foram submetidas a eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições como descrito anteriormente. A clonagem foi confirmada através da liberação do fragmento correspondente ao gene *TbNOM1* (indicado pelas setas), com tamanho aproximado de 2300pb.

Para as subclonagens nos vetores p2216 e p2T7-177, a construção *TbNOM1/pGEM T-easy* foi digerida com *Bam* HI, e em seguida foi realizada uma digestão parcial com *Hind* III. O procedimento de digestão parcial foi necessário, visto que o *TbNOM1* apresentava um sítio interno de *Hind* III. A banda correspondente ao gene *TbNOM1* íntegro foi isolada e subclonada nos sítios *Hind* III e *Bam* HI dos plasmídeos p2216 e p2T7-177. A clonagem foi confirmada pela digestão dos plasmídeos resultantes com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI, liberando o fragmento desejado (resultados não mostrados). Para as transfecções os DNA plasmidiais foram linearizados utilizando a enzima *Not* I e quantificados em gel de agarose.

5.3.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE AMARELA (EYFP)

Os experimentos *in vivo* são importantes para validar os dados obtidos pelas técnicas de fracionamento celular, que consiste em um lisado que separa a fração solúvel (citoplasma) da insolúvel (núcleo) e imunofluorescência, onde as células estão imobilizadas. Sendo assim, se tornou essencial a expressão da proteína *TbNOM1* fusionada a uma proteína fluorescente amarela em células procíclicas de *T. brucei* transfectadas com a construção *TbNOM1/p2216*.

A superexpressão de proteína fluorescente amarela *in vivo* (EYFP), pode ser visualizada no citoplasma celular (Figura 20), corroborando os resultados obtidos previamente.

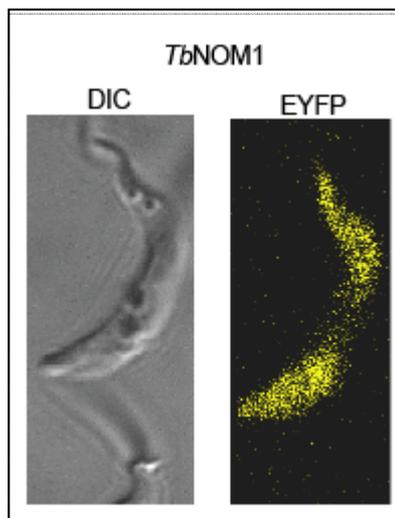


Figura 20. Localização celular da proteína *TbNOM1* por EYFP. Célula de *T. brucei* transfectada superexpressando a proteína *TbNOM1*-EYFP, indicando localização citoplasmática. A região que não está expressando a proteína corresponde ao núcleo. EYFP: expressão das proteínas em fusão com a proteína YFP; DIC: contraste de interferência diferencial.

5.3.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DE *T. BRUCEI* POR INTERFERÊNCIA DE RNA

No experimento de RNAi utilizando a construção *TbNOM1/p2T7-177*, as células transfectadas foram viáveis durante os seis dias nos quais foram observadas, demonstrando apenas uma pequena redução em relação ao crescimento do controle (que não possuía tetraciclina), após o repique ocorrido no quarto dia (Figura 21).

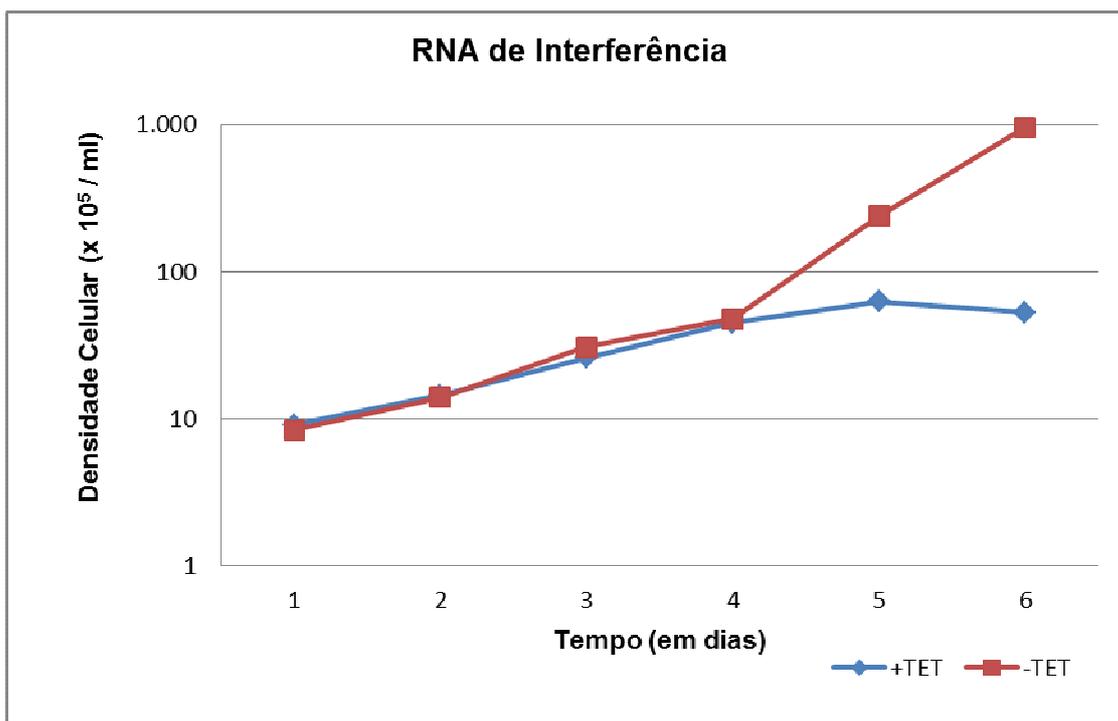


Figura 21. RNAi da proteína *TbNOM1*. Curva de crescimento de *T. brucei* mostrando o crescimento celular semelhante entre as células com a indução da interferência do RNA (+TET) e do controle (-TET). A diferença do crescimento entre as células ocorre após o repique para 5×10^5 células/ml realizado no quarto dia, com ele as células +TET têm uma rápida diminuição da densidade celular na cultura quando comparadas ao controle.

6. DISCUSSÃO

A proteína NOM1 foi inicialmente caracterizada em *Homo sapiens*, sendo então encontrada nos mais diversos organismos como *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Mus musculus*, *S. cerevisiae* e até em tripanossomatídeos como *L. major* e *T. brucei*. Além disso, sua estrutura, principalmente os domínios MIF4G e MA3 são conservados nessas espécies, o que evidencia uma semelhança na sua atuação (Simmons et al., 2005; Caiado, 2008).

Como a NOM1 tem uma estrutura conservada na maioria dos organismos em que foi encontrada e em pelo menos dois deles (*H. sapiens* e *S. cerevisiae*), nos quais foi inicialmente caracterizada, ela se apresentava no núcleo (Simmons et al., 2005), acreditava-se que o ortólogo presente em tripanossomatídeos também teria uma localização nuclear. Os resultados refutaram essa hipótese, pois demonstraram que a localização da *TbNOM1* é citoplasmática (em maior concentração próxima ao kinetoplasto), indicando que nestes protozoários a *TbNOM1* pode ter adquirido uma função diferente de outros organismos.

É importante ressaltar que Alexandrov et al., 2011 viu que a proteína NOM1 de humanos está provavelmente envolvida no complexo de junção dos éxons (EJC). Nos tripanossomatídeos esse complexo ainda foi pouco estudado, já que existem evidências de apenas quatro genes com íntrons nesses parasitas. Contudo foram identificados ortólogos das proteínas Y14 e Mago componentes do complexo, sem, no entanto identificar o Btz nesses organismos. Na condução dos estudos acerca do EJC não foi verificada a interação dos ortólogos identificados com a proteína eIF4AIII. A função desse complexo nos tripanossomatídeos ainda não é conhecida, mas pode divergir da desempenhada em outros eucariotos (Berchovich et al., 2009). Nos tripanossomatídeos a regulação da expressão gênica é preferencialmente pós-transcricional, sendo estimado que 2-9% dela ocorra em nível de estabilidade dos mRNAs (Depledge et al., 2009; Gomez et al., 2010; Hailei e Papadopoulou, 2007; Rochette et al., 2008). Sendo assim, poderia haver um EJC primitivo ou uma espécie de decaimento do mRNA sem sentido (NMD) nesses parasitas e ambos os processos em geral ocorrem no citoplasma, algumas vezes com início no núcleo. Em humanos encontramos sempre proteínas com o domínio MIF4G interagindo nesses mecanismos.

Então a hipótese da atuação da *TbNOM1* em processos similares ainda não caracterizados é significativa.

Em humanos, translocações na região do gene da *NOM1* são encontradas em muitas crianças com leucemia mieloide aguda, mostrando que super ou subexpressão tem efeitos drásticos para a célula. Os homólogos de *C. elegans* e *S. cerevisiae* foram inviáveis quando foram obtidos mutantes sem a expressão dessa proteína, sendo considerados genes essenciais (Simmons *et al.*, 2005). Já nos experimentos de RNA de interferência conduzidos nessa pesquisa, a diminuição da expressão dessa proteína manteve as células de *T. brucei* da forma procíclica viáveis, tendo ocorrido apenas uma pequena diferença de crescimento e uma redução maior do número celular após seis dias do início do RNAi. O resultado obtido confirma dados publicados recentemente por Alford *et al.*, 2011, onde ensaios de RNAi em larga escala também demonstraram que a *TbNOM1* é uma proteína não-essencial nestes protozoários. A diferença está no tipo de estudo realizado, já em Alford *et al.*, 2011, a abordagem foi de todo o genoma de *T. brucei*, o que torna os resultados mais generalistas e algumas vezes menos confiáveis. As curvas realizadas nessa dissertação serão testadas para avaliação da depleção da proteína, o que permite avaliar a eficiência do experimento e, além disso, essa abordagem individual realizada também nos possibilita investigar os efeitos da *TbNOM1* na tradução desses tripanossomatídeos.

Uma característica específica do ortólogo estudado (não sendo apresentada em *L. major* nem nos artigos publicados sobre a *NOM1*) é a presença de duas bandas acima da proteína. Inicialmente formularam-se três hipóteses sobre elas: poderiam ser o produto de reação cruzada com anticorpos dirigidos contra bandas de proteínas de *E. coli* imunizadas acidentalmente juntamente com a *TbNOM1*; seriam resultados da interação entre as próprias proteínas *TbNOM1* (dimerização ou multimerização); seriam resultante da formação de complexos com outras proteínas. A primeira hipótese foi descartada quando outros dois coelhos foram imunizados com a proteína purificada, sem a presença de qualquer outra banda e mesmo assim os resultados de *Western blot* foram semelhantes. Para tentar separar os possíveis complexos, foram realizados diferentes testes, aumentando-se o tempo de fervura, as condições de desnaturação do gel, uréia, tampão de proteínas mais concentrado. E apesar de em alguns deles ser observado uma ligeira desnaturação, não foi possível em nenhum momento obter apenas a banda da *TbNOM1*. Nos testes de fracionamento celular, com utilização de tampões com detergente, ciclos de congelamento/descongelamento e fervura próxima

aos 10 minutos, ainda conseguimos reduzir uma das bandas e surpreendentemente a banda da proteína *TbNOM1* no tamanho predito aumentou em concentração.

Outro resultado relevante foi o obtido nos testes de *Pull-down*, onde a proteína *TbNOM1/GST* foi capaz de interagir eficientemente com a *TbNOM1* radioativa. Esse dado em união com os padrões de bandas observados no *Western blot*, poderiam indicar uma dimerização ou multimerização da proteína como responsável pelas múltiplas bandas de maior peso molecular. Como demonstrado anteriormente o ensaio de reconhecimento do anti-*TbNOM1* em extratos de *L. major* obteve êxito, com o reconhecimento da banda específica da proteína *LmNOM1* (93.6 kDa). Esse reconhecimento não foi acompanhado pelas bandas superiores, o que sugere que mesmo que exista uma similaridade entre os ortólogos de tripanossomatídeos (já que o anticorpo reconhece ambas as proteínas), sua atuação pode ter diferenças significativas entre os gêneros. Para investigar a importância do *LmNOM1* em células de *L. major* foram desenhados *primers* para futuros ensaios de deleção gênica (*knock-out*), com o objetivo de investigar o papel da proteína em *L. major*, estabelecendo as diferenças e semelhanças com *T. brucei*

Os resultados dos testes de interação das proteínas radioativas *TbEIFAI* e *TbEIFAIII* com a proteína GST-*TbNOM1* precisam ser repetidas para sua confirmação. Para as repetições elas devem ser obtidas a partir de mRNAs transcritos de construções plasmidiais no plasmídeo pET21a, uma vez que mRNAs gerados a partir de p2171 ou que expressam HIS na N-terminal podem alterar a estrutura terciária da proteína atrapalhando os ensaios de interação *in vitro*, como já observado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa. Para essa finalidade, os genes *TbEIF4AI* e *AIII* estão sendo subclonados nos vetor pET21a. Se a ligação com a família eIF4A verificada em ensaios *in vitro* for confirmada, ela irá corroborar com dados obtidos por Simmons *et al.*, 2005 em humanos e Alexandrov *et al.*, 2011 em humanos e leveduras. Após a confirmação de todas essas interações, serão identificados os domínios e aminoácidos que estão envolvidos nelas. Esses resultados serão validados por Imunoprecipitação da proteína *TbNOM1* selvagem ou da proteína superexpressa em fusão com HA, que permitirão identificar os parceiros a partir do painel de soros disponível para os fatores de iniciação da tradução presentes para proteínas de *T. brucei* e ou identificação por espectrometria de massa.

Como a localização do ortólogo estudado foi diferente da hipótese levantada inicialmente, a sua atuação na iniciação da tradução poderia ser possível. Entretanto no teste de identificação de proteínas fosforiladas, verificou-se que a *TbNOM1* não é fosforilada e a fosforilação foi uma característica encontrada como regulação pós-traducional de muitas proteínas em tripanossomatídeos (Malvezzi, 2010), que participam do processo de biossíntese proteica e em fatores de iniciação da tradução eucarióticos (eIFs) (Rush *et al.*, 2005). Obviamente esse resultado não descarta sua participação no processo de tradução, só indica uma possível função diferenciada dos eIFs estudados até o momento e talvez até indireta nesse mecanismo. Em compensação, em resultados preliminares de experimentos com polissomos iniciados recentemente, a proteína parece estar na fração polissomal, localização de proteínas atuantes na tradução.

O presente trabalho iniciou um estudo que possui inúmeras perspectivas já que a proteína *TbNOM1* foi inicialmente caracterizada e demonstrou um perfil diferenciado do encontrados nos outros eucariotos. As principais características a serem trabalhadas são sua localização diferenciada e sua ligação com ela mesma em possíveis dímeros ou até estruturas mais complexas, dados que parecem ser peculiares desse ortólogo.

7. CONCLUSÕES

1. A proteína *TbNOM1* possui localização citoplasmática com concentração ao redor do kinetoplasto.
2. Ela se apresentou majoritariamente representada por duas bandas com tamanhos superiores ao predito e em ensaio de *pull down* apresentou propriedades compatíveis com uma interação *TbNOM1-TbNOM1*.
3. A proteína *TbNOM1* não é essencial para a sobrevivência da forma procíclica da célula de *T. brucei*.
4. A proteína *TbNOM1* não é regulada a nível pós-traducional por fosforilação.
5. A expressão da proteína *TbNOM1* se dá de forma constitutiva nas curvas de crescimento de ambas as formas procíclica e sanguínea do seu ciclo de vida.
6. O anticorpo anti-*TbNOM1* também é capaz de reconhecer a proteína *LmNOM1* em extratos de *L. major* e esse reconhecimento ocorre de forma divergente ao observado em *T. brucei*.

8. REFERÊNCIAS

ALEXANDROV, A.; COLOGNORI, D.; STEITZ, J. A. Human eIF4AIII interacts with an eIF4G-like partner, NOM1, revealing an evolutionarily conserved function outside the exon junction complex. **Genes Dev.**, 25 (10): 1078-1090, 2011.

ALSFORD, S.; TURNER, D. J.; OBADO, S. O. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.*, 21: 915-924, 2011.

ANDERSEN *et al.* Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase bound to RNA. **Science**, 313 (5795): 1968-1972, 2006.

AKHTAR *et al.* SGD1 encodes an essential nuclear protein of *Saccharomyces cerevisiae* that affects expression of the GPD1 gene for glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **FEBS Lett.**, 483 (2-3): 87-92, 2000.

BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* e Leishmanioses: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, 64: 1-113.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Cell Biology**, 21: 1-6, 2009.

BALLUT *et al.* The Exon Junction Core Complex is locked onto RNA by inhibition of the eIF4AIII ATPase activity. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 12 (10): 861-869, 2005.

BARRETT *et al.* The trypanosomiases. **Lancet**. 362: 1469-1480, 2003.

BEHM-ANSMANT *et al.* mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. **FEBS Lett.**, 581: 2845-2853, 2007.

BELLSOLELL *et al.* Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. **Structure**, 14 (5): 913-923, 2006.

BERCOVICH *et al.* P. Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 166 (2): 190-193, 2009.

BOELAERT *et al.* Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 94: 465-471, 2000.

BONO, F.; GEHRING, N. H. Assembly, disassembly and recycling: the dynamics of exon junction complexes. **RNA biology**, 8: 24-29, 2011.

BRUN, R.; BALMER, O. New developments in human African trypanosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 19: 415-420, 2006.

BHUVANAGIRI *et al.* NMD: RNA biology meets human genetic medicine. **Biochem. J.**, 430: 365-377, 2010.

CAIADO, B. V. R. Clonagem e Expressão em *Escherichia coli* dos genes de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* da proteína NOM1 (Monografia de conclusão de curso Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade de Pernambuco, Recife, 2008.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, 5: 1231-1240, 2003.

CHAN *et al.* eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. **RNA**, 10: 200-209, 2004.

CHAPPUIS *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Evaluating Diagnostics**, 5: S7-S16, 2007.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. Competitive and noncompetitive binding of eIF4B, eIF4A, and the poly (A) binding protein to wheat translation initiation factor eIF4G. **Biochemistry**, 49 (38): 8251-8265, 2010.

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

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, 21: 1881-1888, 2002.

CONTI, E.; IZAURRALDE, E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 17(3): 316-325, 2005.

CRAIG *et al.* Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. **Nature**, 392 (6675): 520-523, 1998.

DA SILVA JÚNIOR, V. V. Análise da Localização e Expressão Subcelular das Proteínas NOM1 e H2B em *Trypanosoma brucei* (Monografia de conclusão de curso Biomedicina). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 149: 139-146, 2007.

DAS, A.; BANDAY, M.; BELLOFATTO, V. RNA polymerase transcription machinery in Trypanosomes. **Eukaryotic cell**, 7: 429-434, 2008.

DEPLEDGE *et al.* Leishmani specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 4: 1-12, 2010.

DHALIA *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterization of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol. Biochem. Parasitol.** 140:23-41, 2005.

DHALIA *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res.** 34:2495-2507, 2006.

D'ORSO, I.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends Parasitol.**, 19 (4): 151-155, 2003.

EI-SAYED *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science.** 309:404-409, 2005.

FERRAIUOLO *et al.* A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. **PNAS**, 101(12): 4118-4123, 2004.

GARCIA *et al.* Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. **Trends in parasitology**, 22: 405-409, 2006.

GATFIELD *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. **The EMBO Journal**, 22 (15): 3960-3970, 2003.

GHEDIN *et al.* Gene Synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.** 134(2): 183-191, 2004.

GINGER, M.L. Trypanosomatid biology and euglenozoan evolution: new insights and shifting paradigms revealed through genome sequencing. **Protist.** 156:377-392, 2005.

GINGRAS, A.C., RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.** 68:913- 63, 1999.

GOMEZ, C.; RAMIREZ, M. E.; CALIXTO-GALVEZ, M. Regulation of Gene Expression in Protozoan Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010: 1-24, 2010.

GUNAWARDENA *et al.* NOM1 targets protein phosphatase 1 to the nucleolus. **J. Biol. Chem.**, 283 (1): 398-404, 2008.

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

HOLLANDA, D. Análise da Expressão e Localização Subcelular de um Ortólogo de *Trypanosoma brucei* da proteína NOM1 (Monografia de conclusão de curso Biomedicina). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

HOLETZ *et al.* Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **BBRC**, 356: 1062-1067, 2007.

HOLETZ *et al.* Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **The FEBS Journal**, 277: 3415-3426, 2010.

HOLTZMANN *et al.* A human common nuclear matrix protein homologous to eukaryotic translation initiation factor 4A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 267 (1): 339-344, 2000.

IMATAKA, H.; OLSEN, H. S.; SONENBERG, N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. **EMBO J.**, 16 (4): 817-825, 1997.

IVENS *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**: 309, 436-442, 2005

JÄGER *et al.* mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 104(7):2035-2042, 2007.

KATAOKA *et al.* Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. **EMBO J.**, 20 (22): 6424-6433, 2001.

KELLY *et al.* Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. **Mol. Biochem. Parasitol.** 154(1):103-109, 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Elsevier Science**, 17: 279-289, 1999.

KIM *et al.* A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap binding protein CPB80/20-dependent translation. **Genes Dev.**, 23 (17): 2033-2045, 2009.

KISSINGER, J.C. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. **Trends Parasitol.** 22:240-243, 2006.

LEBOWITZ *et al.* Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev.** 7:996-1007, 1993.

LE HIR *et al.* The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **The EMBO Journal**, 19: 6860-6869, 2000.

LEIFSO *et al.* Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genomes is constitutively expressed. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 152(1): 35-46, 2006.

LI *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AIII (eIF4AIII) Is Functionally Distinct from eIF4AI and eIF4AII. **Molecular and Cellular Biology**, 19: 7336-7346, 1999.

LIANG *et al.* Trans and Cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanisms, Factors, and Regulation. **Euk .Cell.** 2(5):830-840, 2004.

LINDER, P. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. **Biology of the Cell**, 95: 157-167, 2003.

LYKKE-ANDERSEN, J.; SHU, M. D.; STEITZ, J. A. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. **Cell**, 103 (7): 1121-1131, 2000.

LYNN, M. A.; MCMASTER, W. R. *Leishmania*: conserved evolution ---- diverse diseases. **Trends Parasitol**, 24 (3): 103-105, 2008.

MALVEZZI, A. M. Identificação de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*. (Dissertação de Mestrado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

MARCOTRIGIANO *et al.* A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. **Mol. Cell.**, 7(1): 193-203, 2001.

MARINTCHEV *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell**, 136(3): 447-460, 2009.

MARKELL, E. K; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. **Parasitologia Médica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, 96: 397-402, 2001.

MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.**, 118: 283-290, 2005.

NAKAMOTO, T. Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis. **Gene**, 432: 1-6, 2008.

NOTT, A.; LE HIR, H.; MOORE, M. Splicing enhances translation in mammalian cells an additional function of the exon junction complex. **Genes and Development**, 18: 210-222, 2004.

OKADA *et al.* Expression analysis of MIF4GD in the rat testis. **J. Reprod. Dev.**, 57 (2): 256-261, 2011.

PADILLA-MEJÍA *et al.* **BMC Genomics**, 10:232 1-18, 2009.

PALACIOS *et al.* An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. **Nature**, 427: 753-757, 2004.

PALENCHAR, J.B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 146:135-141, 2006.

PEACOCK *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease, 39 (7): 839-847, 2007.

PESTOVA, T. V. The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Monographs**, 48: 87-128, 2007.

PFISTER *et al.* A Mitogen-Activated Protein Kinase Controls Differentiation of Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, 5: 1126-1135, 2006.

PRÉVÔT, D.; DARLIX, J.-L.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biol. Cell**. 95:141-156, 2003.

REIS, C.R.S. Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G de *Leishmania major*. (Tese de Doutorado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, 45: 21-25, 2007.

ROCHETTE *et al.* Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. **BMC Genomics**, 9: 255-281, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHIBUYA *et al.* eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11(4): 346-351, 2004.

SCHIBUYA, T.; TANGE, T. O.; STROUPE, M. E. Mutational analysis of human eIF4AIII identifies regions necessary for exon junction complex formation and nonsense-mediated decay. **RNA**, 12: 360-374, 2006;

SCHWEDE, A.; KRAMER, S.; CARRINGTON, M. How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? **Protoplasma**. 2011.

SHIBAHARA *et al.* Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. **Gene**, 166 (2): 297-301, 1995.

SIMMONS *et al.* Identification of NOM1, a nucleolar, eIF4A binding protein encoded within the cromosome 7q36 breakpoint region targeted in cases of pediatric acute myeloid leukemia. **Gene**, 347 (1): 137-145, 2005.

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

SONENBERG, N; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**. 136(4):731-745, 2009.

STUART *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** 118 (4):1301-1310, 2008.

SUZUKI *et al.* PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 105 (9): 3274-3279, 2008.

WAGNER, E.; LYKKE-ANDERSEN, J. mRNA surveillance: the perfect persist. **Journal of Cell Science**, 115: 3333-3338, 2002.

WIEGAND H. L.; LU, S.; CULLEN, B. R. Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. PNAS, 100: 11327-11332, 2003.

YOFFE *et al.* Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E/eIF4G interactions. **Nucleic Acids Res.** 37:3243-3253, 2009.

Site da internet consultado:

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<http://www.who.int/tdroid/diseases/trypanosomiasis/lifecycle.htm>. Acesso: 05/2011.

9. MEMORIAL

Desde cedo a Biologia esteve presente no meu cotidiano, pois cresci em meio às belezas naturais do cerrado no estado de Goiás, em uma família que sempre valorizou aventuras ao ar livre e o despertar da curiosidade nas crianças. Minha paixão pela área fez com que meus pais me dessem um microscópio para crianças, “brinquedo” esse que só fez aguçar a curiosidade existente em mim sobre tudo o que ainda desconhecia. Decidi-me pelo curso pensando em seguir a área ambiental, na tentativa de lutar pela conscientização da população em relação ao uso sustentável dos recursos naturais. Assim, ao final do 3º ano do ensino médio, prestei vestibular para Ciências Biológicas Bacharelado e fui aprovada, começando o curso no ano de 2005 na Universidade de Pernambuco.

Uma das coisas que mais me admiro nesse curso é sua amplitude, a tentativa de entender a vida, em todas as suas formas e peculiaridades, buscando assim, as características mais intrínsecas de cada organismo.

9.1 GRADUAÇÃO

Mesmo com o amplo conhecimento obtido e com minha intenção inicial de seguir a área ambiental, foi impossível, logo no 3º período do curso, não amar a Genética. Eu já tinha afinidade com a matéria, mas a necessidade de estudá-la constantemente, já que tínhamos uma carga horária de 90h, me tornou definitivamente apaixonada por esse tema e todos os seus subtópicos. Durante 6 meses o SNUSTAD foi meu livro de cabeceira por puro prazer e nesse momento eu decidi, queria ser uma geneticista!

Assim comecei a busca por estágios na área, já que havia me apaixonado pela genética como um todo. Fui aprovada em uma seleção do HEMOPE para o laboratório de Biologia Molecular, chefiado pelo Dr. Raul Antônio de Moraes Melo em abril de 2006 e em agosto tive a minha primeira bolsa de iniciação científica aceita na Facepe com o projeto: “Validação de Marcadores Minissatélites para Análise do Quimerismo Misto por PCR”. Essa experiência foi muito proveitosa, tive oportunidade de estar ao lado de pessoas muito prestativas, que me ensinaram as técnicas básicas de biologia molecular e ajudaram no início da minha formação como profissional. No final do período de iniciação científica, foi realizada uma jornada para apresentação de todos os bolsistas da Facepe e o trabalho executado no HEMOPE ficou em 6º lugar.

Após essa maravilhosa experiência, estava em busca de uma pesquisa básica, onde eu explorasse mais áreas da biologia molecular e exatamente nesse momento o Dr. Osvaldo

Pompílio iniciou uma seleção para alunos bolsistas. Consegui passar pelas dinâmicas e ao final da seleção fiquei no Departamento de Microbiologia sob orientação do então pesquisador visitante Dr. José Ronnie Vasconcelos e Co-orientação do Dr. Osvaldo. Na época a procura de estudantes era para substituir urgentemente a bolsa de alunos que tinham passado para o mestrado, mas eu só poderia começar outro trabalho em agosto, por isso demos entrada em um pedido de bolsa nova que não foi aprovado. Pude continuar no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pois na UPE tínhamos seguro saúde.

O meu trabalho com a NOM1 de tripanossomatídeos foi iniciado no segundo semestre de 2007 e a cada nova descoberta me imaginava fazendo tudo aquilo minha vida inteira. Me apaixonei pela pesquisa básica, por tudo ser novo, algumas vezes difícil, mas tão empolgante. Em abril de 2008, surgiu uma oportunidade de troca de bolsa com uma aluna que estava desistindo do curso, assim, consegui outra iniciação científica com o projeto: “Clonagem e expressão em *Escherichia coli* de ortólogos da proteína NOM1 de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*”. Um mês após conseguir a bolsa o projeto, com alguns resultados preliminares, foi apresentado na jornada científica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e com ele me foi concedido o prêmio de primeiro lugar Frederico Guilherme Coutinho Abath. Nesse mesmo período, me inscrevi, para o curso de Bioquímica e Biologia Molecular da USP de Ribeirão Preto e fui aprovada. A experiência do curso foi indescritível. É muito importante poder ter contato com outros laboratórios, ver as condições de trabalho, fazer estágio para tentar entender os nossos próprios “vícios” que acabam prejudicando experimentos. Além disso, tivemos uma semana de palestras sobre as mais variadas pesquisas realizadas dentro desses temas na USP e ao final delas, apresentamos nossos trabalhos para a comissão julgadora do curso, onde meu trabalho de iniciação científica recebeu uma menção honrosa.

No final de 2008 eu estava certa de que queria fazer mestrado em genética, inclusive, em paralelo às atividades de pesquisa fui monitora da matéria no ano de 2008 e monitora de Microbiologia no ano de 2006. Me preparei e finalizei a primeira parte da pesquisa com a proteína NOM1 para a apresentação da monografia. Como o trabalho com esse polipeptídeo já vinha sendo realizado desde o meio de 2007, pude escrever o projeto de mestrado, com dicas do Dr. Osvaldo.

9.2 PÓS-GRADUAÇÃO

Em 2009 ingressei no curso de Mestrado em Genética e Biologia Molecular em 4º lugar e fui congratulada com uma bolsa da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE. As aulas iniciaram no mês de março e desde esse período também dei

início aos experimentos da presente pesquisa. Por se tratar de um projeto grande, que abrange muitas metodologias e ser realizado com uma proteína nunca estudada pelo grupo, muitos protocolos tiveram de ser adaptados e repetidos exaustivamente, o que reduziu o tempo disponível para cursar disciplinas extras, mas em compensação, me ajudou a ter um olhar crítico em diversas metodologias utilizadas na biologia molecular. Também foi essencial para a compreensão da importância do planejamento teórico dos experimentos e do foco do trabalho, que em pesquisas de base é mais difícil de ser definido, mas se torna cada vez mais importante, principalmente para futuras publicações.

Durante o ano de 2009, co-orientei o aluno de iniciação científica Diego de Hollanda que trabalhou em um projeto de iniciação científica focado na produção de anticorpos anti-*TbNOM1*, em 2010, com a formatura do aluno, sua bolsa foi transferida para Valdemir Júnior que deu continuidade ao trabalho iniciado. As experiências de co-orientações foram muito válidas, pois elas nos ensinam a ser mais tolerante, paciente, saber que cada pessoa tem seu tempo de aprendizagem, nos faz estudar mais. Sinto que aprendi muito com os alunos acima citados e espero ter acrescentado algo para suas vidas profissionais.

Por o projeto da dissertação abranger muitas técnicas, houveram problemas durante a execução, principalmente com relação ao cultivo de células, o que acabou atrasando a obtenção de alguns resultados. Devido a esses problemas e à viagem do Dr. Osvaldo para o Canadá, a defesa foi adiada por 6 meses do prazo regular. Ao final desse período, foi possível não só concluir os objetivos propostos no projeto inicial, como realizar outros experimentos que pudessem responder mais questões sobre a proteína *NOM1*. O nosso foco agora é a melhora de alguns desses resultados para a publicação de uma *short communication* contando a história desse polipeptídeo. Como fruto do trabalho, um resumo foi enviado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Protozoologia.

Sinto-me realizada por olhar para trás e perceber o quanto já conquistei. O título de mestre será mais um sonho realizado que vem com uma bagagem de experiência profissional sem igual.