



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÁRCIA KIYOE SHIMADA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS COESINA E
CONDENSINA DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*
(CHAGAS, 1909)**

MÁRCIA KIYOE SHIMADA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS COESINA E
CONDENSINA DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*
(CHAGAS, 1909)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
(nível: Doutorado) em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina, como requisito
para a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso

Londrina
2006

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S556c Shimada, Márcia Kiyoe
Caracterização das proteínas coesina e condensina do protozoário
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) / Márcia Kioe Shimada. – Londrina,
2006
118 f. :il.

Orientador: Stênio Perdigão Fragoso.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2006.
Inclui bibliografia

1. Trypanosoma cruzi 2. Proteínas SMC 3. Coesinas 4. Condensinas 5.
Cromatina – Teses I. Fragoso, Stênio Perdigão. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em
Microbiologia. III. Título.

CDU 579.25

MÁRCIA KIYOE SHIMADA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS COESINA E CONDENSINA
DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
(nível: Doutorado) em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina, como requisito
para a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Fiocruz – Curitiba – PR

Profa. Dra. Andréa Rodrigues Ávila
Fiocruz – Curitiba - PR

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata
UFPR – Curitiba - PR

Profa. Dra. Dorly de Freitas Buchi
UFPR – Curitiba - PR

Londrina, 13 de Novembro de 2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pessoas que sempre torceram por mim, me apoiando e deixando, muitas vezes, de realizar seus sonhos para realizar os meus; incentivando a me prosseguir na jornada e ensinando que na vida não há barreiras, se dedicarmos ao que gostamos de fazer. Dedico também aos meus queridos irmãos Marina, Rute, Francisco e Romeu pelos muitos momentos de alegria, apoio e união e, principalmente, a Ivete que esteve sempre me ajudando, mana você é a melhor irmã do MUNDO !!! Agradeço à Deus por todos vocês !!! Amo todos vocês !!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, só tenho a agradecer a DEUS, sem ele não estaria aqui cumprindo mais uma missão, seja no crescimento pessoal e espiritual ou no relacionamento com as pessoas que amamos ou no crescimento profissional. Por estar sempre me guiando nas horas mais difíceis e decisivas!

Para toda a minha família, pelo incentivo, paciência e dedicação em toda a fase da minha vida.

Ao Stênio,

Acho que não tenho palavras para agradecer. Esse “homem” é o maior exemplo da minha vida. Um profissional, sempre dedicado a tudo que faz e para as pessoas que sempre estão sempre pedindo ajuda. O que mais me admira é a paciência e o carinho que tem pelas pessoas. Hoje entendi por que tantas pessoas gostam de você. Obrigada pela orientação e acima de tudo pela amizade, pela compreensão e pelos ensinamentos (veja o versinho que dediquei a você). Também pelas sugestões e críticas nos momentos de dúvida que foram de grande auxílio durante a execução e conclusão deste trabalho.

Samuel, Claudia e Marco

Por vocês serem esse exemplo de Ciência. Quero ser cientista como vocês quando eu “crescer”. Quero ter um pouquinho de cada um de vocês... Tenho o maior orgulho de poder dizer que sou um filhote de todos vocês. Espero poder retribuir esse investimento que vocês fizeram em mim. Muito obrigada de coração por tanta confiança!

A Dra Andréa Rodrigues Ávila

Por ter aceito o convite e já antecipando pelas sugestões e críticas que serão enriquecedores neste trabalho. Obrigada pela amizade e te admiro pela excelente profissional que é.

Ao Dr. Sílvio Marques Zanata e a Dra Dorly Buchi

Pela participação na banca examinadora, pelas sugestões e críticas que serão enriquecedores neste trabalho.

À Dra Suely Ogatta

Obrigada pelo apoio, amizade, paciência e permitir a minha entrada a este grande grupo de pesquisa. Obrigada por acreditar em mim! Você me deixa muito tranqüila e segura.

A coordenadora do curso de pós-graduação Dra Jacinta Pelajo

Jacinta, você é uma pessoal que me deixa em total segurança. Sempre que tive que resolver problemas você me deixava muito mais tranqüila, você é um amor de pessoa. Obrigada pela grande força, pela paciência e amizade!

A todos do laboratório 2 (Dani, Didi, Êdio, Flavinha, Janaína, Lauro, Leo, Milton, Patrícia, Rosana)

Vocês são as pessoas que mais convivo no IBMP. É todo dia chegando no lab. e “BOM DIA!” . É muito bom escutar isso logo de manhã; e nosso lab. sempre com muita alegria e bom humor (às vezes não dá, né?) enfrentamos todas as dificuldades. Muito obrigada pela amizade e pelos muitos momentos de alegria, risadas e muitas risadas

Ao Christian, Alessandro e Eduardo

Por terem sido muito pacientes, prestativos e atenciosos. Obrigada nas informações de bioinformática e pela amizade.

Nilson, Marco, Suzana e Cassiano

Obrigada pela grande ajuda de vocês! Só posso dizer uma coisa: o que seria do IBMP sem vocês? Vocês são fundamentais para o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Edilaine e Luís

Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e sempre com bom humor, tratando as pessoas sempre com muito respeito

Paulo Arauco

Obrigada pelos seqüenciamentos e pelo profissionalismo e amizade.

A todos os colegas do IBMP

Uma grande família reunida em um lugar só. Uma equipe com muita garra e vontade de vencer. Obrigada pelos momentos de diversão e alegria.

A todos os colegas da dança (um das minhas paixões)

Que os conheci e hoje somos uma turma muito unida, sempre esbanjando muita energia positiva, muita alegria e humor. A dança (levada com profissionalismo e respeito) é uma arte muita rica alegria, em sentimentos, uma força que vem do interior. Dançar não é só dançar, tem sentir com alma, senão não é dança. Muito obrigada por todos os momentos de alegria e diversão.

Às agências financiadoras

Que são fundamentais para o desenvolvimento das nossas pesquisas.

“Seja qual for a profissão
escolhida, O principal é ter um
ideal, Gostar da profissão,
trabalhar muito, Ter vontade de
vencer, enfim, Ter uma meta
estabelecida. Este é o melhor
caminho para o sucesso”

(Ingeborg Marenzi)

“ Seja um persistente na vida, Mas
nunca um teimoso, Nunca pense como
um derrotado, Mas como um
vitorioso.”

(Marcinha)

“Ensinar é um exercício de imortalidade
De alguma forma,
você continuará a viver naqueles,
cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia de
suas palavras. Professor assim, não morre jamais.”

(Rubem Alves)

“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos.”

(Lao Tzu)

SHIMADA, Márcia Kiyoe. **Caracterização das proteínas coesina e condensina do protozoário *trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)**. 2006. 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

As proteínas coesina e condensina pertencem à família das proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos (do inglês, Structural Maintenance Chromosome, SMC), altamente conservadas desde leveduras até humanos. Essas proteínas executam importantes funções no processo de divisão celular, uma vez que elas estão envolvidas na condensação cromossômica e na coesão das cromátides irmãs durante o processo de divisão celular. Nós identificamos os ortólogos dessas proteínas no protozoário *Trypanosoma cruzi* Dm28c. Este parasita apresenta algumas características peculiares como limitada condensação cromossômica e a manutenção da integridade do envelope nuclear durante a divisão celular. Isso o torna um modelo interessante para o estudo das funções das SMCs. Os genes que codificam duas, das coesinas (SMC1 and Scc1) e duas, das condensinas (SMC4 and Cap-D2) foram caracterizados tanto por Southern e Northern blots quanto por análise in silico. Os dados mostram que TcSMC1, TcScc1, TcSMC4 e TcCap-D2 são genes de cópia-única no genoma do *T. cruzi* Dm28c e são transcritos em mRNAs. O alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos genes das SMCs de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *X. laevis*, *C. elegans*, *H. sapiens*, *S. pombe* e *S. cerevisiae* mostrou que os motivos conservados dessas proteínas estão presentes em todos os organismos mencionados acima, sugerindo que suas estruturas foram conservadas durante a evolução, as quais são importantes para sua atividade de ATPase e de interações com DNA. Pela imunofluorescência, as SMCs estão localizadas no núcleo. Além disso, a análise do perfil de expressão por Western blot mostrou que as SMCs estão expressas nas formas epimastigotas e tripomastigotas para as condensinas Cap-D2 e SMC4. Enquanto as coesinas SMC1 e Scc1 somente foram detectadas no estágio epimastigota, sugerindo que essas proteínas são importantes para a replicação e não para a diferenciação do parasita. Esses dados também levantam a hipótese de que essas proteínas possam participar da regulação funcional da cromatina modulando sua organização espacial no núcleo e, conseqüentemente, modulando a expressão gênica do parasita.

Palavras-chave: Coesina. Condensina. Cromatina. *Trypanosoma cruzi*.

SHIMADA, Márcia Kiyoe. **Characterization of the cohesin and condensin proteins of the protozoan *trypanosoma cruzi* (chagas, 1909)**. 2006. 118 f. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The cohesin and condensing protein belong to the family of structural maintenance of the chromosomes (SMC) proteins, highly conserved from yeast to humans. They play important roles in cell division since they are involved in the chromosome condensation and sister-chromatid cohesion. We have identified the orthologs of these proteins in the protozoan *Trypanosoma cruzi* Dm28c. This parasite presents peculiarity characteristic such as the chromosome condensation limited and the maintenance of the nuclear envelope integrity during the cell division, which makes it a challenging model to study the function of the SMC. The genes encoding for two cohesins (SMC1 and Scc1) and two condensins (SMC4 and Cap-D2) were characterized both by Southern and Northern blots and in silico analysis. The data show that TcSMC1, TcScc1, TcSMC4 and TcCap-D2 are single copy genes in the genome of the *T. cruzi* Dm28c and all of them are transcribed into mRNAs. The alignment of the deduced amino acid sequences from the SMC genes of *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *X. laevis*, *C. elegans*, *H. sapiens*, *S. pombe* and *S. cerevisiae* showed that the conserved motifs of the SMC proteins are present in all the organisms mentioned above, suggesting that the structure of these proteins was conserved during the evolution, which is important to their ATPase function and DNA interactions. By immunofluorescence, the proteins are localized in the nucleus. Furthermore, the Western blot analysis showed that SMCs are expressed in the epimastigote and trypomastigote form for SMC4 and Cap-D2 condensin. Whereas SMC1 and Scc1 cohesin could be detected only in the epimastigote stage, suggesting that those proteins are important for the replication and not for the differentiation of the parasite. It also raises an interesting hypothesis that SMC proteins might participate of the functional regulation of chromatin by modulating its spatial organization in the nucleus and consequently modulating the gene expression of the parasite.

Keywords: Cohesin. Condensin. Chromatin and *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do complexo SMC de eucariotos	30
Tabela 2 – Enzimas de restrição utilizadas para digestão do DNA genômico de <i>T. cruzi</i> de acordo com o gene.....	51
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores dos genes SMC1, Scc1, SMC4e Cap-D2 utilizados para amplificar os fragmentos (sondas) marcados radioativamente com [α - ³² P]-dCTP.....	52
Tabela 4 – Etapas e temperaturas da reação de amplificação utilizadas para cada gene	52
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes SMC1, Scc1, SMC4e Cap-D2.....	55
Tabela 6 – Os sítios de clonagem utilizados para cada gene e seus respectivos vetores para expressão.....	55
Tabela 7 – Análise da similaridade do gene SMC1 com outros organismos.....	69
Tabela 8 – Análise da similaridade do gene Scc1 com outros organismos	69
Tabela 9 – Análise da similaridade do gene SMC4 com outros organismos.....	69
Tabela 10 – Análise da similaridade do gene Cap-D2 com outros organismos.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no inseto vetor e hospedeiros vertebrados	19
Figura 2 – As diferentes formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> no trato digestivo do inseto vetor.....	20
Figura 3 – Ultra estrutura do material intranuclear de <i>T. cruzi</i>	23
Figura 4 – Estrutura nucleossomal formada pelo cerne do octâmero de histonas e histona H1	25
Figura 5 – Organização nuclear de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.....	26
Figura 6 – Árvore filogenética da proteína SMC e outras distantemente relacionadas.....	29
Figura 7 – Ilustração mostrando o monômero da proteína SMC e os domínios N e C-terminal, <i>coiled coil</i> e da dobradiça	31
Figura 8 – Ilustração mostrando a arquitetura básica do dímero da proteína SMC e os motivos Walker A, Walker B e motivo C.....	32
Figura 9 – As características do domínio da dobradiça.....	33
Figura 10 – A estrutura monomérica e dimérica da proteína SMC.....	34
Figura 11 – O complexo das proteínas SMC e suas respectivas subunidades não SMC em bactérias e eucariotos	35
Figura 12 – A segregação e condensação cromossômica em eucariotos (A) e procariotos (B).....	39
Figura 13 – A ligação e hidrólise de ATP no domínio catalítico da SMC	41
Figura 14 – Formas de interação intramolecular e intermolecular das proteínas SMC	42
Figura 15 – Mecanismos de ação hipotéticos das proteínas coesinas	43
Figura 16 – Mecanismos de ação hipotéticos das proteínas condensinas	44
Figura 17 – Análise da expressão dos genes para condensinas e coesinas pelo ensaio do tipo Northern blot.....	62
Figura 18 – Análise da organização genômica dos genes TcSMC1 e TcScc1 no <i>T.</i> <i>cruzi</i>	63

Figura 19 – Análise da organização genômica dos genes TcSMC4 e TcCap-D2 no <i>T. cruzi</i>	64
Figura 20 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos do gene SMC1	65
Figura 21 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos do gene Scc1.....	66
Figura 22 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos do gene SMC4.....	67
Figura 23 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos deduzidos do gene Cap-D2.....	68
Figura 24 – Análise de domínios conservados da proteína SMC1 em <i>T. cruzi</i> , <i>L. major</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>X. laevis</i> e <i>Mus musculus</i>	70
Figura 25 – Análise de domínios conservados da proteína SMC4 em <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>L. major</i> e <i>P. falciparum</i>	71
Figura 26 – Indução da expressão das proteínas SMC1 e Scc1 em célula <i>E. coli</i> TOP10	72
Figura 27 – Indução da expressão das proteínas SMC4 e Cap-D2 em células <i>E. coli</i> TOP10 + pREP4 e <i>E. coli</i> C43, respectivamente.....	72
Figura 28 – Análise por Western blot.....	73
Figura 29 – Western blot mostrando o perfil de expressão da proteína Scc1 em extrato de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	73
Figura 30 – Imunolocalização da proteína SMC1 em epimastigotas	74
Figura 31 – Imunolocalização da proteína Scc1 em epimastigotas.....	75
Figura 32 – Imunolocalização da proteína SMC4 em epimastigotas	76
Figura 33 – Imunolocalização da proteína Cap-D2 em tripomastigota metacíclico	76
Figura 34 – Imunolocalização da proteína Cap-D2 em tripomastigota metacíclico	77
Figura 35 – Análise da localização celular pela fusão da proteína SMC1 com GFP	77
Figura 36 – Análise da localização celular pela fusão da proteína Scc1 com GFP.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cpm	Cintilações por Minuto
Dm	Didelphis Marsupialis
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos
dATP	Deoxi Adenosina Trifosfato
dgtp	Deoxi Guanidina Trifosfato
dCTP	Deoxi Citosina Trifosfato
dTTP	Deoxi Tiamina Trifosfato
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
IPTG	Isopropil-1-tio-b-D-galactopiranosídeo
g	Aceleração da Gravidade
kb	1000 Nucleotídeos em RNA ou 1000 Pares de Nucleotídeos em DNA
kDa	Quilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LIT	Infuso de Fígado e Triptose
M	Molar
mM	Milimolar
mU	Miliunidade
mRNARNA	Mensageiro
µg	Microgramas
µL	Microlitro
mL	Mililitro
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium
PAGE	Eletroforese em Gel de Acrilamida (em Inglês: Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salina

PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PPO	2,5 Difenioxazole
POPOP	1,4 bis (2-[5-Feniloxazolil] Benzeno)
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA Mensageiro
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TAU	Triatome Artificial Urine
TAU3AAG TAU	Suplementado com Três Aminoácidos e Glicose
U	Unidade
3'UTR	Região 3' não Traduzida (em Inglês: 3' Untranslated Region)
5'UTR	Região 5' não Traduzida (em Inglês: 5' Untranslated Region)
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O PROTOZOÁRIO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	18
1.2	O CICLO EVOLUTIVO DO <i>T. CRUZI</i>	18
1.3	A DOENÇA DE CHAGAS	20
1.4	<i>T. CRUZI</i> – CICLO CELULAR	21
1.5	ORGANIZAÇÃO NUCLEAR EM <i>T. CRUZI</i>	22
1.5.1	O Núcleo	22
1.5.2	A Cromatina	24
1.5.3	Compartimentalização dos Cromossomos	25
1.5.4	O Genoma Nuclear do <i>T. Cruzi</i>	27
1.6	AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO DE MANUTENÇÃO ESTRUTURAL DOS CROMOSSOMOS	28
1.6.1	As Características Estruturais da Proteína SMC	31
1.6.2	As Características Funcionais da Proteína SMC	37
1.6.2.1	Dinâmica das proteínas coesinas e condensinas durante o ciclo celular	37
1.6.2.2	Interação proteína-cromossomo	40
1.6.3	Outras Funções Celulares das Proteínas SMC	45
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	MICROORGANISMOS	48
3.2	METACICLOGÊNESE DO <i>T. CRUZI</i> IN VITRO	49
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>T. CRUZI</i>	49
3.4	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>T. CRUZI</i>	50
3.5	OBTENÇÃO DE EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNA	50
3.6	TÉCNICA DE SOUTHERN BLOT	51
3.6.1	Amplificação dos Fragmentos para Marcação Radioativa	51
3.6.2	Hibridação de DNA com Sondas Radioativas dos Genes Alvos (Current Protocols, 1994 – Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K.)	52

3.7	TÉCNICA DE NORTHERN BLOT	53
3.8	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	54
3.9	CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS COESINAS E CONDENSINAS DE <i>T. CRUZI</i>	54
3.9.1	Reação de PCR e Clonagem.....	54
3.9.2	Expressão dos Genes para Condensinas e Coesinas em <i>E. coli</i>	56
3.9.2.1	Purificação das proteínas recombinantes	56
3.10	OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL CONTRA AS PROTEÍNAS COESINAS E CONDENSINAS RECOMBINANTES.....	57
3.10.1	Anticorpo Policlonal Produzido em Camundongos	57
3.10.2	Anticorpo Policlonal Produzido em Coelhos	57
3.11	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS COESINAS E CONDENSINAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT	57
3.12	ENSAIO DE COMPETIÇÃO.....	58
3.13	ENSAIO DE IMUNOFLORESCÊNCIA	58
3.14	CONSTRUÇÃO DO VETOR PTEXGFP E CLONAGEM DOS GENES TCSCM1 E TCSCC1	59
3.14.1	Procedimento de Transfecção	59
4	RESULTADOS	61
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GENES.....	61
4.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES	71
4.3	ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO CELULAR	73
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES	83
7	PERSPECTIVAS	84
8	REFERÊNCIAS	85
9	ANEXOS	94
9.1	REAGENTES PARA CULTIVO DO PARASITA	95

9.2	REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA	96
9.3	REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE RNA.....	97
9.4	REAGENTES PARA SOUTHERN BLOT.....	99
9.5	REAGENTES PARA MARCAÇÃO RADIOATIVA COM RADIOISÓTOPO P ³² DE MEMBRANA DE SOUTHERN BLOT.....	101
9.6	REAGENTES PARA NORTHERN BLOT	103
9.7	REAGENTES PARA MARCAÇÃO RADIOATIVA COM RADIOISÓTOPO P ³² DE MEMBRANA DE NORTHERN BLOT	105
9.8	REAGENTES PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	107
9.9	REAGENTES PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	109
9.10	REAGENTES PARA WESTERN BLOT	111
9.11	REAGENTES PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	113
9.12	MAPA DO VETOR pET29B (NOVAGEN).....	115
9.13	MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pTRCHIS-TOPO [®] (INVITROGEN [™])	116
9.14	MAPA DO VETOR pQE31 (QIAGEN).....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PROTOZOÁRIO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Levine et al., 1980).

T. cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (Chagas, 1909). A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 18 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo 8 milhões só no Brasil (WHO, 2006) e cerca de 120 milhões estão em risco de infecção na América Latina (TDR, 2002). Essa é uma enfermidade, portanto, de grande importância na saúde pública e de grande impacto econômico e social.

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae, pois inclui espécies de grande importância na saúde pública e na medicina veterinária como *T. cruzi*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. brucei*, *T. equiperdum* e *T. equinum*. Tais protozoários apresentam algumas características peculiares como a presença de um único flagelo com axonema e uma complexa estrutura paraxial; microtúbulos subpeliculares associados à membrana plasmática e mitocôndria única e ramificada contendo uma região alargada com acúmulo de DNA, denominada cinetoplasto (revisado por De Souza, 2002).

1.2 O CICLO EVOLUTIVO DO *T. CRUZI*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (Figura 1) inicia-se quando insetos Hemiptera e família Reduviidae como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistrus* e outros ingerem as formas tripomastigotas do parasita durante o repasto sangüíneo em hospedeiros vertebrados infectados. No estômago do inseto, essas formas transformam-se em epimastigotas que seguem para o intestino, onde se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, migram para a porção retal onde aderem à parede e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados com as fezes e urina do inseto (Figura 2). Os

tripomastigotas metacíclicos são as formas infectivas e não replicativas que podem penetrar pela pele em solução de continuidade ou mucosas e invadir células do hospedeiro vertebrado. Após a invasão, os parasitas iniciam um processo de transformação para as formas amastigotas, as quais se replicam por divisão binária. Em seguida, esses parasitas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que são liberados na corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou serem ingeridos por um inseto vetor iniciando um novo ciclo (revisado por De Souza, 2000; De Souza, 2002). Além da transmissão vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido por outras vias como: transfusão sanguínea e congênita, bem como outras menos comuns tais como a acidental em laboratórios, através de transplante de órgãos e via oral (Dias, 2002). A transmissão por transfusão sanguínea é relevante, pois a migração de portadores permite a disseminação da doença fora das regiões geográficas tradicionais (TDR, 2002).

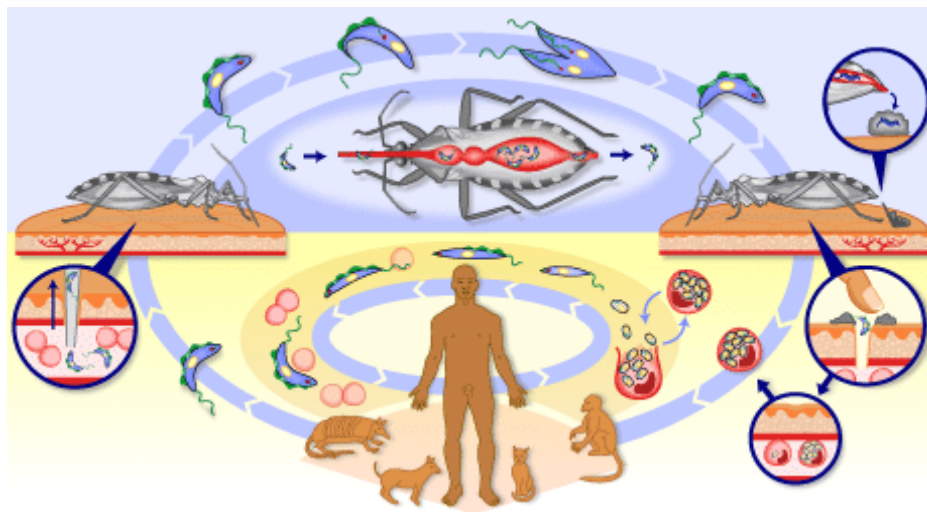


Figura 1 – O ciclo de vida do *T. cruzi* no inseto vetor e hospedeiros vertebrados. O ciclo inicia quando o inseto vetor realiza o repasto sanguíneo adquirindo os tripomastigotas (formas infectivas). No trato digestório do vetor, o parasita passa por mudanças morfológicas e fisiológicas e no reto transforma-se novamente em tripomastigotas que são eliminados através das fezes. O homem se infecta com as formas infectivas por superfícies de descontinuidade ou mucosas. No hospedeiro, transforma-se em amastigotas (formas replicativas) que rompem as células transformando em tripomastigotas sanguíneos que podem invadir novas células ou serem ingeridos novamente por um inseto vetor.

Fonte: WHO

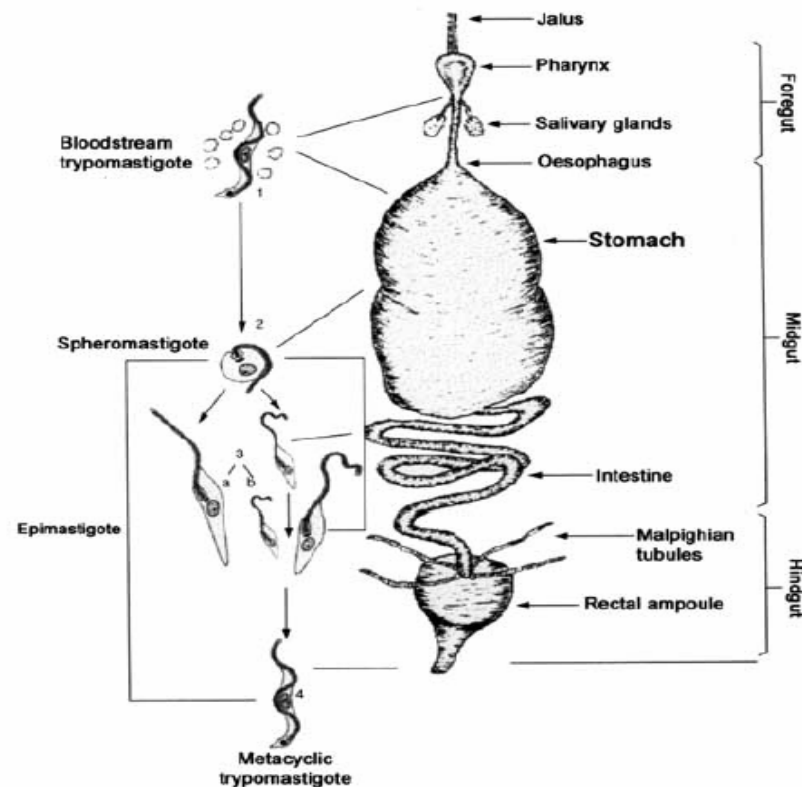


Figura 2 – Diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* no trato digestório do inseto vetor. O inseto ingere as formas tripomastigotas sanguíneas que apresentam cinetoplasto ovalado e, posterior ao núcleo que é alongado. No estômago, transforma-se em esferomastigotas () e depois em epimastigotas na qual o cinetoplasto em forma de bastão apresenta-se anterior ao núcleo arredondado nestas formas. Ao alcançar a ampola retal transformam-se novamente nas formas tripomastigotas que podem contaminar um hospedeiro.

Fonte: de Souza (2002)

1.3 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda, correspondendo ao período em que os tripanosomas são facilmente encontrados no sangue, e uma fase crônica que pode produzir quadros clínicos variáveis. Embora na maioria das vezes assintomática, a fase aguda caracteriza-se clinicamente por febre, sensação de fraqueza, poliadenite, aumento de fígado e baço e lesão na área de inoculação dos protozoários, denominada chagoma de inoculação. A lesão chama particular atenção quando ocorre na região ocular ou em suas imediações e a reação inflamatória é acompanhada de edema bupalpebral, que impede a abertura do olho. Isto constitui o sinal de Romana. Na fase crônica da doença, destacam-se, por sua gravidade, a cardiopatia chagásica, que ocorre em 27% dos casos, as dilatações de órgãos cavitários,

principalmente, do aparelho digestivo (megaesôfago, megacólon, etc), em 6% dos infectados e distúrbios neurológicos em 3% (Rey, 2002).

O tratamento da doença consiste basicamente no uso das drogas Nifurtimox (derivado do nitrofurano) e benzonidazol (a base de nitroimidazol) e no controle dos sintomas como a miocardite aguda e meningoencefalite. A eficácia dessas drogas é de apenas 50% em infecções recentes, e de baixa ou nenhuma atividade sobre chagásicos crônicos; e, além disso, elas causam graves efeitos colaterais aos pacientes (TDR, 2002). Adicionalmente, os processos de imunização para proteger os indivíduos susceptíveis também são ineficazes.

Os programas de controle de transmissão da doença em vários países endêmicos têm apresentado notável sucesso. A profilaxia consiste no controle de triatomíneos baseado na aplicação de inseticidas residuais, triagem sistemática dos doadores de sangue (TDR, 2002) e melhoria das condições de moradia (Silveira, 2000).

1.4 *TRYPANOSOMA CRUZI* -CICLO CELULAR

Os tripanosomatídeos são parasitas que apresentam algumas peculiaridades como limitada compactação da cromatina por não apresentarem a forma convencional de histona H1 (Spadiliero et al., 2002b) e a preservação da carioteca durante o processo de divisão celular (Silveira, 2000).

Em *T. cruzi*, o processo de divisão celular das formas amastigotas e epimastigotas (formas replicativas) é bem semelhante. Ocorre um aumento gradual do tamanho do corpo do parasita com duplicação dos corpúsculos basais, início da divisão do cinetoplasto e modificação na distribuição da cromatina nuclear. Na intérfase, parte da cromatina aglomera-se em massas localizadas na periferia nuclear e, ocasionalmente em regiões mais centrais do núcleo. Com o início do processo de divisão celular, o núcleo torna-se, gradualmente, pouco elétron-denso, surgindo feixes de microtúbulos intranucleares e placas elétron-densas, que podem constituir estruturas tais como os cinetócoros observados em outros organismos. O núcleo de redondo passa, gradualmente, de ovalado a alongado. Nessa fase, inicia-se a associação dos microtúbulos intranucleares e as placas elétron-densas formando um típico fuso mitótico. Em seguida, ocorre a segregação dos cromossomos

seguida da cariocinese originando uma célula com dois núcleos. Após este processo, ocorre a citocinese originando dois organismos independentes (revisado por De Souza, 2000; Spalidiero et al., 2000a; Spalidiero et al., 2002b). Quando a divisão se completa, a cromatina e o nucléolo se reorganizam e assumem as posições vistas durante a intérfase, enquanto os microtúbulos desaparecem (De Souza, 2002).

1.5 ORGANIZAÇÃO NUCLEAR EM *T. CRUZI*

1.5.1 O Núcleo

O núcleo é visto como uma estrutura altamente especializada e organizada (Wieslander, 2004) onde se encontram organelas nucleares que não são definidas por membranas. Nestes locais há um contínuo fluxo de proteínas que associam e desassociam rapidamente entre si e com o próprio compartimento (Phair & Misteli, 2000) como as regiões funcionalmente especializadas denominadas de nucléolo (Fisher et al., 1991) e outros, ainda não caracterizadas em tripanosomatídeos, como Promyelocytic Leukemia Protein (PML) bodies, corpúsculo de Cajal, *Coiled* bodies e Speckles (Cremer & Cremer, 2001).

O nucléolo é o principal sítio para síntese e processamento de RNA ribossomal em eucariotos (López-Velazquez et al., 2005), sendo uma estrutura bem destacada no núcleo interfásico quando visualizado ao microscópio óptico (Alberts et al., 2004). Em eucariotos superiores, o típico nucléolo é constituído por três componentes cujo arranjo e prevalência depende da espécie, tipo celular e estado fisiológico da célula. Estes componentes são denominados de centro fibrilar (CF), associado à localização do rDNA; componente denso fibrilar (DFC), relacionado a transcrição do rDNA e aos primeiros estágios da biossíntese do ribossomo e componente granular (GC), onde ocorre os últimos passos na biogênese de ribossomos (Shaw & Jordan, 1995; López-Velazquez et al., 2005) e, estão organizados, respectivamente, do centro para a periferia (Fisher et al., 1991; Shaw & Jordan, 1995).

Essa organização estrutural é bem conhecida em eucariotos superiores, plantas e leveduras. Uma análise por microscopia eletrônica do núcleo da forma epimastigota de *T. cruzi*, revelou aspectos comuns a outros organismos, como a presença de um único

nucléolo fibronuclear de aspecto arredondado localizado relativamente no centro do nucleoplasma. Essa estrutura apresenta-se discretamente compartimentalizada, com poucas estruturas de DNA em seu interior e a maior parte localizando ao redor do nucléolo. Somente os componentes denso fibrilar e granular foram localizados no núcleo do parasita, enquanto o centro fibrilar não foi observado (Figura 3) (López-Velazquez et al., 2005). Esses centros fibrilares, em vertebrados, funcionam como sítios de ancoragem para centenas de cópias de genes ribossomais, separados por espaçadores não transcritos, em torno, de 2 kb. No caso dos tripanosomatídeos, cerca de 100 cópias de genes ribossomais estão presentes e esses espaçadores são mais longos, o que conseqüentemente pode não resultar em um agrupamento como no caso dos vertebrados (López-Velazquez et al., 2005).

Uma diminuição da transcrição nucleolar foi observada nos estágios epimastigotas a tripomastigotas em *T. cruzi* que está associada a gradual redução no tamanho do nucléolo até o desaparecimento dessa organela. Paralelamente, as proteínas nucleolares não se encontram dispersas no núcleo (mesmo na ausência de um nucléolo evidente) e sim agrupadas em regiões discretas no nucleoplasma (Elias et al., 2001).

Outras partículas extra-nucleolares também foram detectadas, compostas por proteínas nucleolares que sugerem corresponder aos corpúsculos de Cajal (em eucariotos, relacionado ao metabolismo de RNA nuclear) (López-Velazquez et al., 2005).

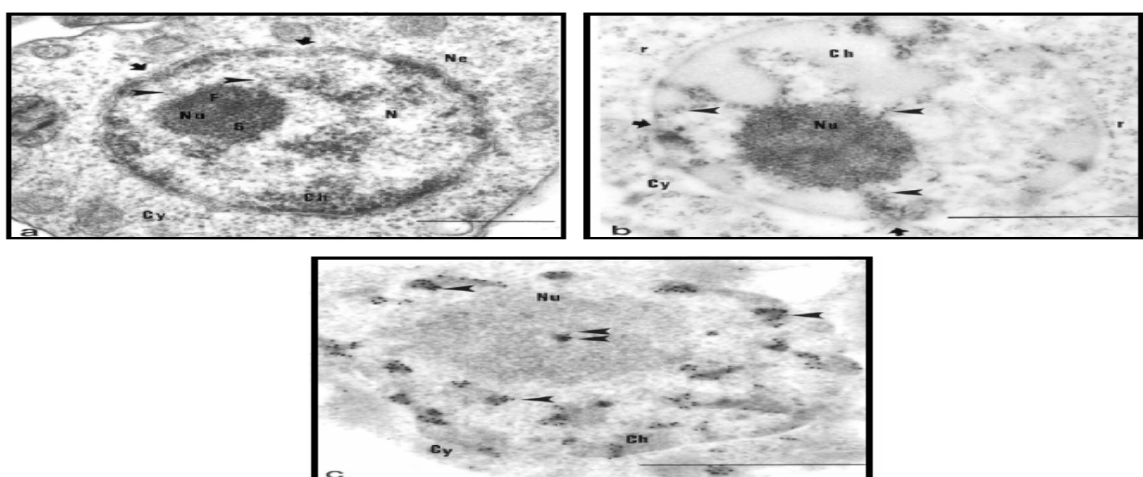


Figura 3 – Microscopia eletrônica de transmissão do material intranuclear de *T. cruzi*. (a) coloração Uranyl-lead; (b) Coloração Bernhard's para ribonucleoproteínas; (c) imunolocalização para DNA. Ch: cromatina; Cy: citoplasma; F: componente fibrilar; G: componente granular; Ne: envelope nuclear; N: núcleo; Nu: nucléolo; r: ribossomos. Barra: 500 nm.

Fonte: López-Velásquez et al. (2005)

1.5.2 A Cromatina

A cromatina de *T. cruzi* é similarmente organizada como de eucariotos superiores, porém, como mencionado anteriormente, ela é menos condensada (Spadiliero et al., 2002b).

As análises pelos métodos convencionais de citogenética não se mostraram adequadas, pois os cromossomos são praticamente impossíveis de serem visualizados durante os processos de divisão dos parasitas (Silveira, 2000).

A compactação da cromatina ocorre de forma altamente ordenada e controlada em resposta à processos celulares como replicação, transcrição, recombinação ou reparo. Entre as principais proteínas envolvidas na compactação da cromatina encontram-se as histonas. O primeiro e mais fundamental nível de compactação dessas proteínas são os nucleossomos que são formados por um octâmero de histonas, contendo duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. O octâmero forma um cerne protéico ao redor do qual uma dupla fita de DNA de 146 nucleotídeos de comprimento se enrola formando uma estrutura solenóide de 30 nm de diâmetro. Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas mantêm o DNA e as proteínas ligadas. Além disso, as histonas são ricas em aminoácidos com cadeias laterais básicas e suas cargas positivas neutralizam a estrutura carregada negativamente do DNA. Uma histona adicional, denominada H1, apresenta um papel diferente ao das histonas centrais: uma única molécula de histona H1 liga-se a cada nucleossomo, mantendo essa estrutura unida (Figura 4) (Hecker et al., 1994; Kornberg & Lorch, 1999; Alberts et al., 2004).

Em tripanosomatídeos, a cromatina é menos compactada. Isso pode ser explicada pelas diferenças na estrutura primária das histonas, a presença de variantes das histonas e/ou modificações pós-traducionais de histona H1 e/ou cerne das histonas. A histona H1 não convencional apresenta características peculiares: ela é menor devido à ausência dos domínios globular e N-terminal característico, importante na ligação ao nucleossomo (Schlimme et al., 1995; Spadiliero et al., 2002a) e o que pode explicar a sua fraca interação com o DNA de tripanosomas, em comparação com outros eucariotos (Spadiliero et al., 2002a). Adicionalmente, é mais hidrofílica (Silveira, 2000) e é, preferencialmente, fosforilada nos estágios infectivos do parasita (Spadiliero et al., 2002a). O nível de condensação da cromatina varia também entre as diferentes formas do *T. cruzi*, podendo estar relacionada ao

nível de transcrição e de replicação em que se encontram (Elias et al., 2001; Spadiliero et al., 2002a). Além disso, o maior nível de compactação em tripomastigotas que em epimastigotas pode estar relacionado a uma expressão mais estável de histona H1 nessas formas (Schlimme et al., 1995). Na fase logarítmica os parasitas apresentam um nível de compactação menor da cromatina quando comparado com a fase estacionária (Spadiliero et al., 2002b).

Sabemos que esses organismos por apresentarem um ciclo de vida heteroxênico requerem uma rápida adaptação a mudanças ambientais podendo explicar, talvez, a presença de cromatina na forma menos compactada para favorecer uma rápida resposta celular baseado em sinais externos (Belli, 2000).

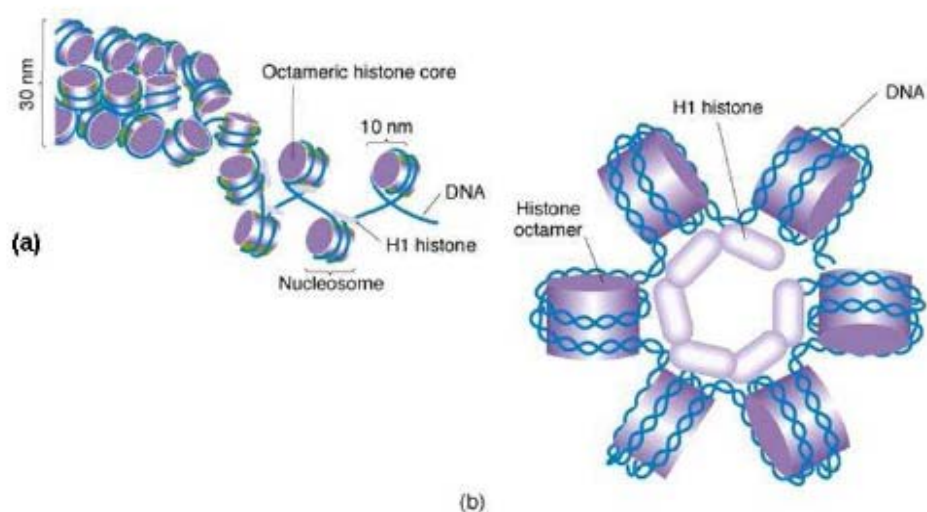


Figura 4 – Estrutura nucleossomal formando a fibra de 30 nm (a) que é composto pelo cerne de octâmero de histonas e histona H1 (b).

Fonte: <<http://www.bio.miami.edu/dana/104/nucleosome.jpg>>

1.5.3 Compartimentalização dos Cromossomos

As estruturas nucleares, apesar de não serem delimitadas por membranas, são compartimentalizadas, identificando-as como território cromossomal e intercromatina em células de mamíferos (Cremer et al., 2000). Os cromossomos são organizados nesses locais de forma que não se tornem emaranhados uns com os outros e esta organização é conseguida, pelo menos em parte, pela ligação de domínios cromossomais a sítios específicos no envelope

nuclear ou lâmina nuclear (Alberts et al., 2004; Spadiliero et al., 2002b; Picchi, 2006). Nesses locais foi constatado também a existência de complexos de macromoléculas específicas que são requeridas para a replicação, transcrição, splicing e reparo. O conteúdo do gene parece também determinar o posicionamento do cromossomo no núcleo (Ferreira et al., 1997).

Em *T. cruzi*, a distribuição da cromatina no núcleo também não é aleatória apresentando definidos domínios localizados no envelope nuclear. Na forma epimastigota da fase estacionária, essas regiões apresentam cromatina altamente condensada e, na fase logarítmica há uma menor concentração de heterocromatina periférica (Elias et al., 2001; Spadiliero et al., 2002b) (Figura 5). Durante a fase S do ciclo celular constatou-se também um agrupamento dos cromossomos na periferia nuclear (Elias et al., 2002). Esse remodelamento da cromatina pode estar envolvido tanto no controle da expressão gênica (silenciamento/transcrição dos genes) (Spadiliero et al., 2002b) como na replicação dos cromossomos (Elias et al., 2002).

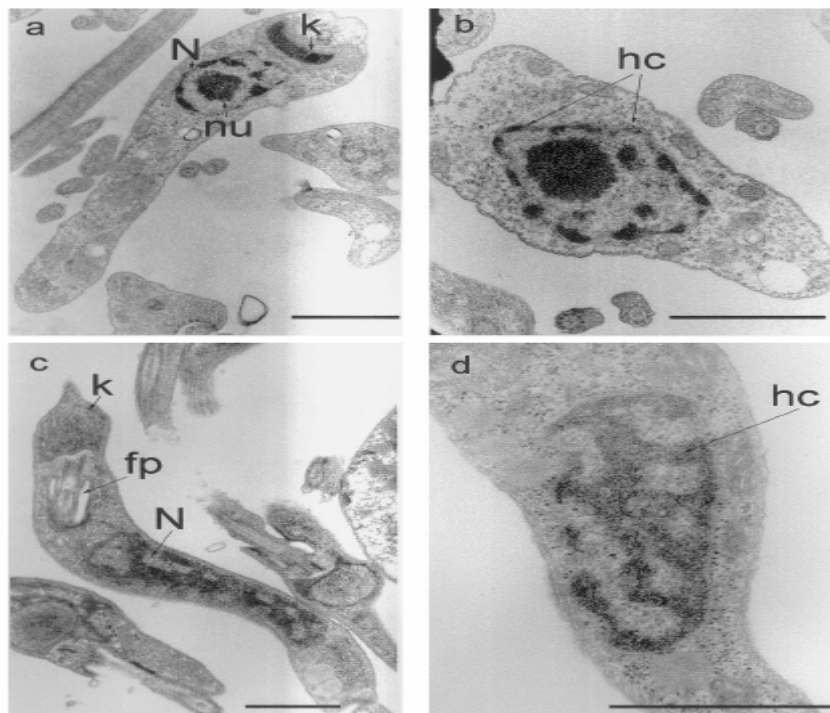


Figura 5 – Organização nuclear de formas epimastigotas e trypomastigotas metacíclicas. (a e b) epimastigotas; (c e d) tripomastigotas metacíclicas. (k) cinetoplasto; (N) núcleo; (nu) nucléolo; (hc) heterocromatina e (fp) bolsa flagelar.

Fonte: Elias et al. (2001)

O núcleo de *T. cruzi* é pequeno, medindo aproximadamente 2,5 μm e, por isso, poucos dados sobre sua organização podem ser obtidos através de microscopia ótica (De Souza, 2002). Hoje, muitas questões estão sendo elucidadas com a utilização de modernas técnicas de biologia molecular e celular, auxiliando em uma melhor compreensão sobre a organização estrutural e funcional de componentes nucleares como a dinâmica dos cromossomos durante o ciclo evolutivo de tripanosomatídeos.

1.5.4 O Genoma Nuclear do *T. Cruzi*

O genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener foi recentemente seqüenciado e o tamanho foi estimado entre 106,4 e 110,7 Mb (El-Sayed et al., 2005) maior do que o descrito previamente pela eletroforese em campo alternado (PFGE, do inglês: Pulse Field Gel Electrophoresis). O tamanho do DNA e o número de cromossomos podem variar entre as cepas de *T. cruzi* (Silveira, 2000). Análises mostraram que o genoma haplóide contém cerca de 12.000 genes que codificam aproximadamente 22.570 proteínas putativas e diversos RNAs (RNA de transferência, RNA ribossomal, sequência do spliced leader, pequenos RNAs nucleares e nucleolares). Entretanto, cerca de 50% consistem de seqüências repetitivas, envolvidas na expressão de uma grande família de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. As proteínas de superfície consistem nos membros da superfamília de trans-sialidases (TS), mucinas e proteínas associadas à mucina e a glicoproteína de superfície gp63. Estas são freqüentemente específicas de *T. cruzi* representando em torno de 18% do total das proteínas expressas no parasita. A abundância no genoma de genes que codificam proteínas de superfície pode ser explicada pela necessidade de adaptação à diferentes condições ambientais e fisiológicas em que o parasita passa durante o ciclo biológico. Em adição, os genes de manutenção do funcionamento celular (em inglês: housekeeping) também estão organizados em repetições, o que pode estar associado a altos níveis de expressão dessas proteínas. Além disso, outras proteínas importantes no ciclo celular também foram identificadas, tais como aquelas envolvidas no reparo de DNA, recombinação homóloga, replicação e meiose. O seqüenciamento completo do genoma de *T. cruzi* juntamente com o de *T. brucei* e *Leishmania major* bem como a análise da organização do

genoma nuclear tem sido importante na determinação de novos alvos para intervenção quimioterápica e na produção de vacinas.

1.6 AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO DE MANUTENÇÃO ESTRUTURAL DOS CROMOSSOMOS (SMC)

No presente trabalho, as proteínas condensinas e coesinas do complexo SMC foram identificadas e caracterizadas em *T. cruzi*. Essas proteínas são responsáveis pela condensação dos cromossomos e segregação das cromátides-irmãs durante o ciclo celular de procariotos e eucariotos. Sendo assim, *T. cruzi* é um modelo bastante interessante para investigar o comportamento das mesmas nos diferentes estágios do ciclo de vida, pois apresenta características bastante peculiares em relação a outros organismos e poucas proteínas são conhecidas por interagirem diretamente com o cromossomo.

A primeira proteína da família SMC foi identificada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* na qual foi observada uma alteração nos cromossomos durante a progressão da metáfase e na segregação, utilizando mutantes para a proteína SMC1 (Strunnikov et al., 1993). Porém, a importante função dessas proteínas na organização estrutural dos cromossomos somente foi estabelecida em estudos genéticos e bioquímicos realizados em *Xenopus* e *Caenorhabditis elegans* (Chuang et al., 1994; Hirano & Mitchison, 1994). As condensinas foram primeiramente identificadas em extrato de ovo de *Xenopus* mostrando-se essencial para a condensação dos cromossomos mitóticos in vitro (Hirano & Mitchison, 1994).

Este complexo está conservado desde leveduras a seres humanos. Foi encontrado também em muitas, se não em todas, as espécies de eubactérias e arqueobactérias, implicando que sua fundamental contribuição à dinâmica dos cromossomos iniciou até mesmo antes da aquisição das histonas durante a evolução (Soppa, 2001; Cobbe & Heck, 2004). Adicionalmente, acredita-se que a proteína bacteriana pode ser considerada como uma ancestral dos complexos SMC eucarióticos (Hirano, 2005). Isto sugere que eventos de duplicação deram origem a cada uma das subfamílias SMC (Cobbe & Heck, 2004) e que condensina e coesina adquiriram suas funções bioquímicas e celulares especializadas durante a evolução (Hirano, 2005). O complexo SMC5-SMC6 também está bem conservado em todos os eucariotos cujo genoma já foi seqüenciado (Cobbe & Heck, 2004).

Uma árvore filogenética derivada independentemente através do alinhamento da seqüência N-terminal (~230 aminoácidos) e C-terminal (~80 aminoácidos) das proteínas SMC, de eucariotos e procariotos, relacionadas distantemente mostrou um agrupamento bem similar entre as análises (Figura 6) (Melby et al., 1998).

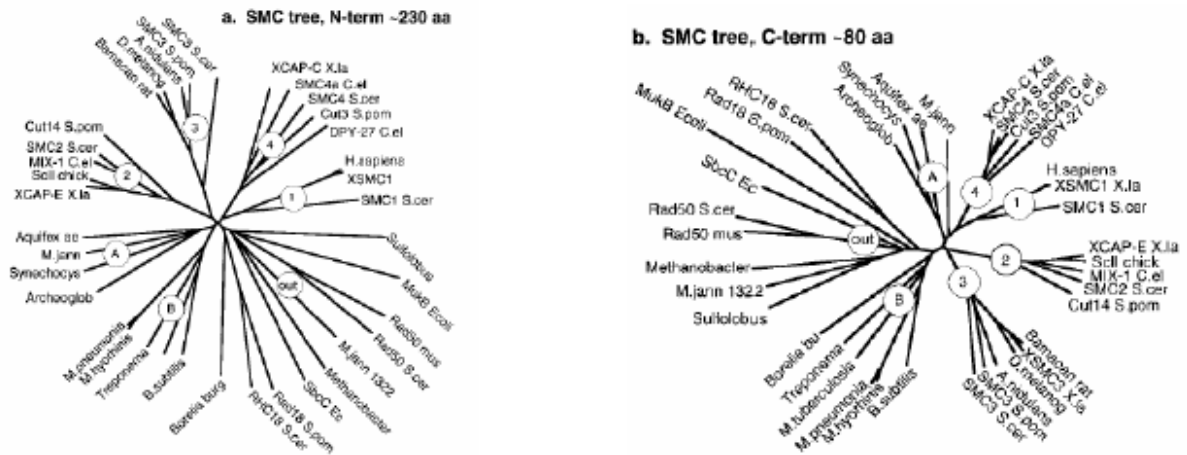


Figura 6 – Árvore filogenética da proteína SMC e outras distantemente relacionadas.
Fonte: Melby et al. (1998)

Essas proteínas foram identificadas em muitos organismos e, portanto, cada componente da proteína SMC possui uma denominação que o identifica com as espécies as quais pertencem. A tabela 1 apresenta a denominação dos componentes das proteínas SMC nos organismos mais estudados (Losada & Hirano, 2005).

Tabela 1 – Componentes do complexo SMC de eucariotos

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. elegans</i>		<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>X. laevis</i>	<i>H. sapiens</i>
Cohesin								
SMC1	Smc1	Psm1	SMC-1		DmSMC1	AtSMC1	XSMC1	hSMC1 α
SMC3	Smc3	Psm3	SMC-3		DmSMC3	AtSMC3	XSMC3	hSMC3
kleisin	Scc1/Mod1	Rad21	SCC-1/COH-2 ^a		DmRAD21	SYN2-4 ^b	XRAD21	hScc1/hRAD21
?	Scc3	Psc3	SCC-3		DmSA/CG13916	CAB45374	XSA1, XSA2	hSA1, hSA2
SMC1 β (meiosis)	-	-	-		-	-	-	hSMC1 β
kleisin (meiosis)	Rec8	Rec8	REC-8		C(2)M7 ^c	SYN1/DIF1	AAH87346	hRec8
? (meiosis)	-	Rec11	-		-	-	?	hSA3/STAG3
Condensin								
SMC2 (I&II)	Smc2	Cut14	MIX-1	MIX-1	DmSMC2	AtCAP-E1, E2	XCAP-E	hCAP-E/hSMC2
SMC4 (I&II)	Smc4	Cut3	SMC-4	DPY-27	DmSMC4/gluon	AtCAP-C	XCAP-C	hCAP-C/hSMC4
HEAT (IA)	Yes4	Cnd1	-	DPY-28	CG1911	CAB72176	XCAP-D2	hCAP-D2/CNAP1
HEAT (IB)	Yes5/Ycg1	Cnd3	-	-	CG17054	BAB08309	XCAP-G	hCAP-G
kleisin (IC)	Brr1	Cnd2	-	DPY-26	Barren	AAC25941	XCAP-H	hCAP-H
HEAT (IIA)	-	-	HCP-6	-	CG31989	At4g15890	XCAP-D3	hCAP-D3
HEAT (IIB)	-	-	F55C5.4	-	-	At1g64960	XCAP-G2	hCAP-G2
kleisin (IIC)	-	-	C29E4.2	-	CG14685	At3g16730	XCAP-H2	hCAP-H2
SMC5-6 complex								
SMC5	Smc5	Spr18/Smc5	C27A2.1		CG32438	CAC01791	BAC56936	hSMC5
SMC6	Rhc18	Rad18/Smc6	C23H4.6, F54D5.14		CG5524	MIM	BAC56937	hSMC6
Ubiquitin ligase?	Nse1	Nse1	T23F6.3?		CG11329	At5g21140	MGC68739	hNse1
SUMO ligase	Mms21	Nse2	2G118		CG13732	At3g15150	MGC53049	hNse2
(MAGE) ^e	YDR288W	Nse3	-?		(CG10059) ^e	(At1g34770) ^e	(many) ^e	(>55 parálogos) ^e
?	Qri2	Nse4/Rad62	H21P03.2		CG13142	At1g51130, At3g20760	CA983359	hQri2, hNse4
?	YML023C ^f	-	?		?	?	?	?
?	Kre29 ^f	-	?		?	?	?	?

^aO genoma de *C. elegans* codifica dois adicionais proteínas semelhantes a SCC1-1/REC-8, COH-1 e COH-3. COH-1 pode ter uma função não mitótica no desenvolvimento enquanto depleção de COH-3 não mostra fenótipo aparente (Mito *et al.*, 2003).

^b Entre os quatro parálogos SCC1/REC8 presente no genoma de *A. thaliana*, somente SYN1 tem sido mostrado uma função na coesão durante a mitose. A função de coesão putativa de SYN2, SYN3 e SYN4 permanece a ser determinada (Cai *et al.*, 2003).

^c Não existe óbvio ortólogo em *D. melanogaster*. Até mesmo, C(2)M codifica u membro da família α kleisina que associa com DmSMC3 e tem função na formação de SC (Heidmann *et al.*, 2004).

^d O complexo de dosagem compensatória (DCC) é único para *C. elegans* (Basker e Salehi, 2002).

^e Nenhum ortólogo óbvio de YML023C ou Kre29 foram encontrados em espécies além daqueles proximamente relacionados a *S. cerevisiae*.

Fonte: Losada; Hirano (2005)

1.6.1 As Características Estruturais da Proteína SMC

As moléculas de SMC são grandes polipeptídeos compostas de 1000 a 1300 resíduos aminoácidos. As proteínas SMC apresentam cinco domínios: os domínios N e C-terminal (cada um com média de 150 resíduos de aminoácidos) estão conectados por duas regiões espiraladas em α -hélice (em inglês: *coiled coil*) através de um domínio globular central denominado de dobradiça (com cerca de 150 resíduos de aminoácidos) (em inglês: *hinge*) (Figura 7) (Melby et al., 1998; Hirano, 2002). O holocomplexo da proteína é formado por dois monômeros que se associam um com o outro (dimerização) pelo domínio da dobradiça (Figura 10B) para formar uma molécula em forma de V (Figura 8) (Haering et al., 2002). Os domínios da dobradiça, N e C-terminal de SMC 1-4 apresentam seqüências altamente conservadas, ao contrário da região *coiled coil* (Melby et al., 1998) e da dobradiça para as proteínas SMC5 e 6 (Sergeant et al., 2005).



Figura 7 – Ilustração mostrando o monômero da proteína SMC e os domínios N e C-terminal, *coiled coil* e da dobradiça.

Fonte: Hirano (2002)

O domínio N-terminal contém o motivo Walker A, enquanto que o domínio C-terminal contém os motivos Walker B e signature (motivo C) (Walker et al., 1982; Hirano & Hirano, 2002) (Figura 8). Esses motivos são altamente conservados e quando interagem, geram um domínio com atividade de ATPase (Hirano et al., 2001).

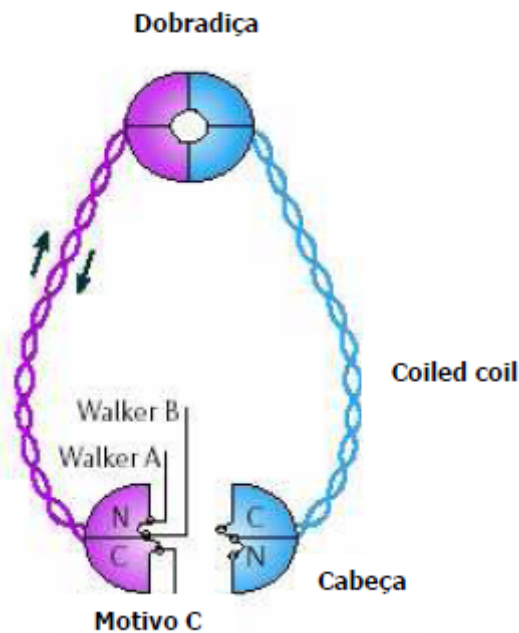


Figura 8 – Ilustração mostrando a arquitetura básica do dímero da proteína SMC e os motivos Walker A, Walker B e motivo C.

Fonte: Hirano (2006)

O domínio N-terminal apresenta as seqüências de aminoácidos bem conservadas FKS (11–13) e GxNGSGKSN (31–39) do motivo Walker A, responsáveis pela ligação ao nucleotídeo, além do dipeptídeo QG (143–144) (Melby et al., 1998). A região da dobradiça apresenta um segmento que contém resíduos de aminoácidos glicina isolados, altamente conservados entre as proteínas SMC. Em *Bacillus subtilis*, cinco resíduos de glicina estão conservados na região da dobradiça e quatro deles aparecem invariavelmente entre as proteínas SMC bacterianas e de eucariotos (Figura 9). Os resíduos de glicina são freqüentemente encontrados em regiões que formam alças na estrutura protéica e contribuem tanto para a flexibilidade estrutural como para a dimerização dos monômeros da proteína (Hirano et al., 2001). Além disso, esse domínio é um determinante essencial nas interações SMC-DNA (Hirano & Hirano, 2002).

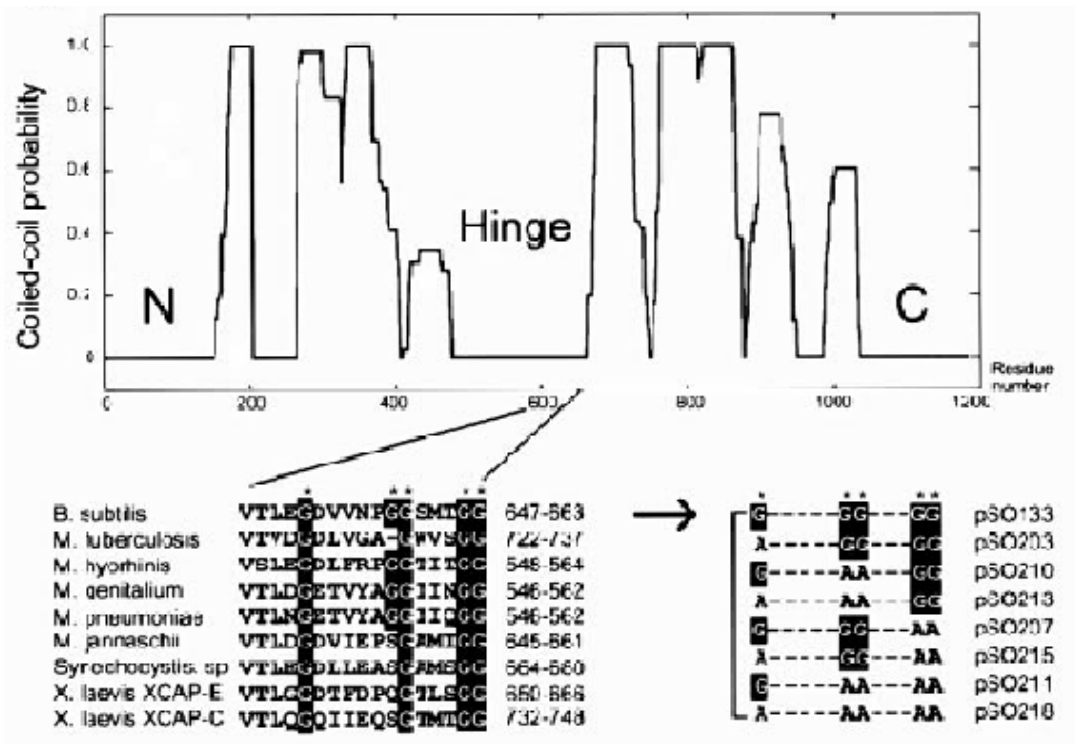


Figura 9 – As características do domínio da dobradiça: (Ilustração superior) apresentação de uma predição do motivo *coiled coil* em *Bacillus subtilis*; (Ilustração inferior) alinhamento da seqüência da dobradiça de diferentes organismos mostrando a conservação dos quatro resíduos de glicina (G) (asterisco vermelho).

Fonte: Hirano et al. (2001)

O domínio C-terminal inclui em média 150 aminoácidos na extremidade *coiled coil*, mas somente 80 apresentam uma seqüência que o identifica. Esse segmento inicia com uma seqüência altamente conservada LSGG (1091–1094), o motivo assinatura (ou motivo C) (Figura 8) que está presente na superfamília das ABC-ATPases incluindo os ABC transportadores e a proteína de reparo Rad50, sendo essencial para a hidrólise de ATP (revisto por Hirano, 2006). A seguir é observado uma seqüência PxPhhhhDEh-DAALD (1112–1126), onde “h” é um aminoácido hidrofóbico. O hhhhD parece corresponder ao motivo Walker B, que pode ser definido como um resíduo de ácido aspártico precedido por 4 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Melby et al., 1998). Finalmente, o domínio *coiled coil* é uma estrutura em α -hélice de, aproximadamente, 300 aminoácidos para cada braço, que conecta as regiões N e C-terminal ao domínio da dobradiça (Melby et al., 1998).

O domínio da dobradiça é uma região bastante flexível (Melby et al., 1998) e isso permite a formação de uma interação *coiled coil* intramolecular resultando em uma molécula em forma de vara com os domínios da dobradiça e da cabeça localizados nas suas extremidades (Figura 10A) (Melby et al., 1998; Haering et al., 2002; Hirano & Hirano, 2002; Cobbe & Heck, 2004). Essa interação é bem forte e ocorre independentemente de ATP. Resíduos de glicina localizados na interface de dimerização são importantes para estabilizar a estrutura dimérica das proteínas (Hirano et al., 2001). Conseqüentemente, essa aproximação do domínio N e C-terminal permite formar um sítio ATPase potencialmente funcional e evolucionariamente relacionada à família ABC (em inglês: ATP binding cassette) transportadores (Saitoh et al., 1994; Melby et al., 1998; Hopfner et al., 2000; Löwe et al., 2001).

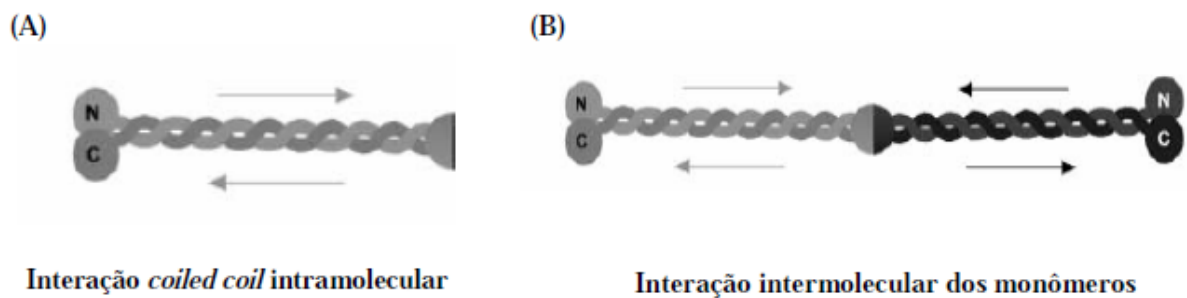


Figura 10 – A estrutura monomérica e dimérica da proteína SMC: (A) Molécula monomérica em forma de vara; (B) Interação intermolecular do monômero da proteína SMC.

Fonte: Haering et al. (2002)

As proteínas SMC presumivelmente descendem de uma proteína bacteriana ancestral, portanto, sugere-se uma arquitetura similar a todas as proteínas desta família (Haering et al., 2002). Em procariotos, há formação de homodímeros, pois foi identificada apenas uma cópia do gene *smc* no genoma bacteriano (Hirano & Hirano, 1998; Melby et al., 1998). Em uma subclasse de bactéria Gram-negativa incluindo *Escherichia coli*, foi identificada uma proteína distantemente relacionada denominada MukB que apresenta uma função equivalente (Hiraga, 2000) mas com uma seqüência divergente (Melby et al., 1998). Diferentemente, em eucariotos, identificou-se uma formação heterodimérica através de

interações específicas de diferentes monômeros das proteínas, determinando as subfamílias de proteínas SMC.

Em eucariotos seis parálogos foram encontrados formando três subfamílias diferentes: SMC1 e SMC3 (complexo das coesinas), SMC2 e SMC4 (complexo das condensinas) e SMC5 e SMC6 (complexo envolvido no reparo de DNA e resposta de checagem) (Soppa, 2001; Hirano & Hirano, 2002). Adicionalmente, cada um dos heterodímeros associa, através do domínio cabeça, com um distinto grupo de subunidades regulatórias não-SMC para formar um complexo funcional. Em bactérias, o complexo é formado pelo homodímero e duas subunidades não-SMC: ScpA (Kleisina) e ScpB. O complexo da condensina possui três subunidades não-SMC: CAP-H (Kleisina), CAP-D2 E CAP-G (que contém as repetições HEAT). O complexo das coesinas contém duas subunidades não-SMC: Scc1 (Kleisina) e Scc3 e o complexo SMC5-SMC6 com quatro subunidades não-SMC: Nse1-4 (Figura 11) (Haering & Nasmyth, 2003; Lehmann, 2005; Hirano, 2005; Hirano, 2006). Em células de vertebrados e de plantas, existem dois diferentes complexos de condensinas que são distinguidos pelas subunidades regulatórias não-SMC: condensina I (CAP-H, CAP-D2 e CAP-G) e condensina II (CAP-H2, CAP-D3 e CAP-G2) (Ono et al., 2003). Outras proteínas acessórias que também participam da dinâmica estrutural dos cromossomos durante o ciclo celular serão mencionadas posteriormente.

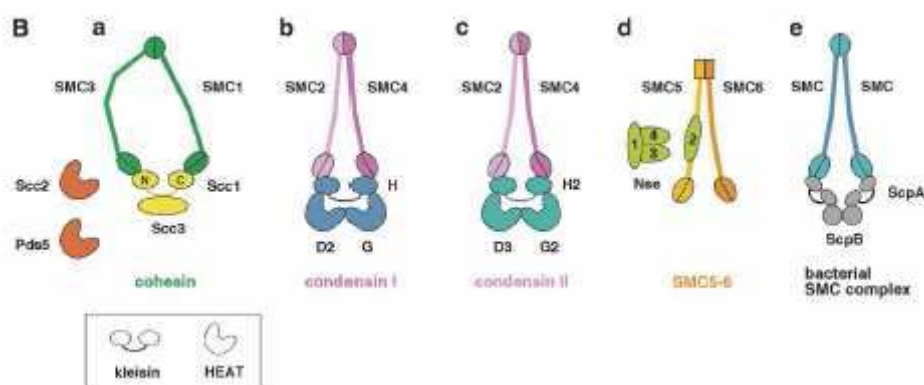


Figura 11 – O complexo das proteínas SMC e suas respectivas subunidades não SMC em bactérias e eucariotos.

Fonte: Losada & Hirano (2005)

Algumas subunidades mencionadas anteriormente, possuem domínios e características importantes nas funções relacionadas ao complexo. As subunidades Scc1, CAP-H, CAP-H2 e ScpA pertencem à uma família denominada Kleisina cujos domínios N e C-terminal contêm um motivo dobrável bem conservado conhecido como hélice alada (em inglês: winged helix) que é composta por três hélices seguida de duas fitas β , por onde interagem aos domínios cabeça dos respectivos dímeros da proteína SMC, formando uma estrutura em forma de anel (Schleiffer et al., 2003; Haering et al., 2004). O domínio em hélice alado do C-terminal destas proteínas parece ligar diretamente ao domínio cabeça da SMC1 (Haering et al., 2004) podendo ser o primeiro passo na formação da estrutura em anel.

Uma outra estrutura denominada de repetições HEAT (iniciais de quatro proteínas em que as repetições foram originalmente detectadas: huntingtin, elongation factor 3, subunidade A da proteína fosfatase 2A e TOR1) mostrou-se presente em várias proteínas associadas aos cromossomos, dentre elas a XCAP-D2, XCAP-G (subunidades não SMC de *Xenopus laevis*) e Scc3 (Neuwald & Hirano, 2000). Essas repetições apresentam um motivo com 30 aminoácidos repetidos e são estruturas em forma de cachos (α -hélice) que parecem servir como uma base flexível para interação com outros componentes como, fatores de transcrição, proteínas associadas ao microtúbulo ou mesmo mediar ligação entre subunidades das proteínas SMC (por exemplo: XCAP-D2 à XCAP-G ou vice-versa) ou às proteínas SMC (Neuwald & Hirano, 2000).

Além dos componentes do complexo SMC, as proteínas acessórias auxiliam conjuntamente na dinâmica das proteínas coesinas e condensinas. A proteína acessória Scc2/Mis4 interage fisicamente com as coesinas e é requerida para a disseminação das mesmas sobre os cromossomos (Ciosk et al., 2000). Essas proteínas também contêm repetições HEAT e sugere-se que promova uma hidrólise de ATP ligado aos domínios catalíticos das coesinas e estimule a abertura do anel permitindo a disseminação sobre os cromossomos (Arumugam et al., 2003). Além disso, pode também participar na mobilização dinâmica ou na mudança conformacional das coesinas durante ou após a replicação de DNA (Lengronne et al., 2004). Em extratos de ovócitos de *Xenopus*, essa disseminação parece depender da reunião do complexo de pré-replicação, mas não da iniciação da replicação (Takahashi et al., 2004). Pds5 (BimD/Spo6) é uma outra proteína que modula a associação dinâmica da coesina ao cromossomo, é conservada desde leveduras a humanos e contêm múltiplas repetições HEAT. De um modo geral, inicia sua participação desde antes da fase S até a transição metáfase-anáfase (Stead et al., 2003). Quando os níveis dessa proteína

diminuem, defeitos na coesão são observados mostrando que é uma proteína essencial para viabilidade e manutenção da coesão (Losada et al., 2005). A Eco1/Ctf7 é uma outra proteína acessória essencial em *S. cerevisiae* envolvido na formação das estruturas coesivas durante a replicação do DNA, mas não para a manutenção (Toth et al., 1999). Para as condensinas, tais fatores de disseminação ou de manutenção ainda não foram identificados, mas parece que uma fosforilação dependente de cdk1 (quinase dependente de ciclina) diretamente estimula a atividade dessas proteínas (Kimura et al., 1998). A proteína MCD1 (em inglês: mitotic chromosome determinant) também é requerida para a manutenção da coesão e condensação dos cromossomos como mostrado em mutantes *mcd1* de *S. cerevisiae* (revisto por Heck, 1997).

As proteínas SMC, tanto coesinas como condensinas, parecem apresentar conformações diméricas similares até em bactérias mesmo na presença de estruturas não-SMC, mostrando diferenças apenas nos ângulos dos braços (Anderson et al., 2002). O domínio da dobradiça é uma região bastante flexível que permite a abertura e o fechamento dos braços das proteínas (Hirano et al., 2001). A condensina apresenta os braços mais estreitos tornando a região *coiled coil* mais próxima. Em contraste, o da coesina é mais aberta, apresentando uma região *coiled coil* mais afastada (Anderson et al., 2002). Estas diferenças conformacionais da estrutura parecem contribuir em suas diferentes funções na célula (Anderson et al., 2002) já que as estruturas das proteínas superpostas e todos os motivos envolvidos na ligação de ATP ou dimerização dos domínios cabeça são bem conservados entre as proteínas SMC (Löwe et al., 2001). Isto é bastante intrigante e questiona-se que como uma proteína que apresenta uma única arquitetura pode participar de tantas funções?

1.6.2 As Características Funcionais das Proteínas SMC

1.6.2.1 Dinâmica das proteínas coesinas e condensinas durante o ciclo celular

As modificações observadas na estrutura do cromossomo ao longo do ciclo celular (mitose ou meiose) são eventos que envolvem um controle e sincronismo temporal fantástico de toda uma rede de proteínas. As condensinas e as coesinas participam de funções essenciais no processo de divisão celular. As condensinas auxiliam na condensação dos

cromossomos para que os mesmos não se tornem emaranhados e sejam resolvidos adequadamente no momento da separação das cromátides-irmãs. As coesinas atuam na coesão das cromátides-irmãs para que haja uma distribuição exata do número de cromossomos para as células filhas.

De um modo geral, as coesinas associam-se aos cromossomos na fase S do ciclo celular com o auxílio de proteínas acessórias como a Pds5 e Scc2 e essa associação é mantida através da fase G2. A conexão do domínio N e C-terminal de Scc1 aos domínios cabeça da SMC3 e SMC1, respectivamente, é essencial para manter a coesão das cromátides-irmãs. (revisto por Haering et al., 2004). Na transição entre a metáfase e a anáfase, a subunidade Scc1 (que contém um sítio de clivagem no domínio central entre os domínios N e C-terminal) é clivada por uma cisteína-protease chamada separase (Uhlmann et al., 1999, 2000) que é fortemente inibida por uma chaperona inibidora da anáfase, a securina. A separase é ativada pela destruição da securina por uma ubiquitina proteína ligase chamada complexo promotor da anáfase ou ciclossomo (APC/C) ligado ao seu ativador Cdc20 (Figura 12A). Esse evento causa a dissociação das coesinas dos cromossomos, porém mantendo os domínios N e C-terminal da Scc1 ligados aos domínios cabeça da SMC3 e SMC1, respectivamente (revisto por Haering et al., 2004).

Em leveduras, muitas coesinas permanecem associadas aos cromossomos até a metáfase e se dissociam no início da anáfase (Uhlmann et al., 1999, 2000; Summary, 2000), por outro lado, a maior parte das coesinas, em células animais, se dissocia do cromossomo durante a prófase e prometáfase de uma maneira independente da separase e é substituído pelas condensinas. Porém, uma quantidade residual de coesinas, suficiente para manter a coesão, permanece associada, em particular, ao redor dos centrômeros até o início da anáfase (Hirano, 2005). A desestabilização das coesinas dos cromossomos parece dependente de duas quinases mitóticas, aurora B e polo-like kinase (Plx1), que atuam através de distintos mecanismos como a fosforilação da histona H3 e da subunidade Scc3, respectivamente (Losada et al., 2002; Hauf et al., 2005). A substituição das coesinas pelas condensinas, vista anteriormente é essencial para a resolução das cromátides-irmãs, mas não para compactação das mesmas (Losada et al., 2002).

As condensinas se disseminam pelos cromossomos durante a prófase, ativada pela fosforilação pela quinase Cdc2 e, juntamente, com as enzimas topoisomerase I (Hagstrom et al., 2002) e topoisomerase II (Hirano, 2000; Nasmyth, 2002), quinases

dependentes de ciclina (cdk, em inglês: cyclin dependent kinase) e fosforilação de XCAP-D2 e XCAP-H direcionam

o complexo aos cromossomos auxiliando na resolução (condensação) das cromátides-irmãs (Kimura et al., 1998) completando a sua função na mitose. A dissociação das condensinas dos cromossomos ocorre no final da telófase (Alberts et al., 1999; Steffensen et al., 2001). A condensação é um pré-requisito para uma eficiente segregação das cromátides-irmãs. Em mutantes para condensinas, severos fenótipos são observados como a falta de resolução dos cromossomos que resultam em pontes cromossomais após a separação das cromátides-irmãs (Hirano, 2000; Steffensen et al., 2001). A integridade da estrutura do complexo das condensinas necessita estar presente para a atividade de condensação cromossomal (Uhlmann et al., 2001).

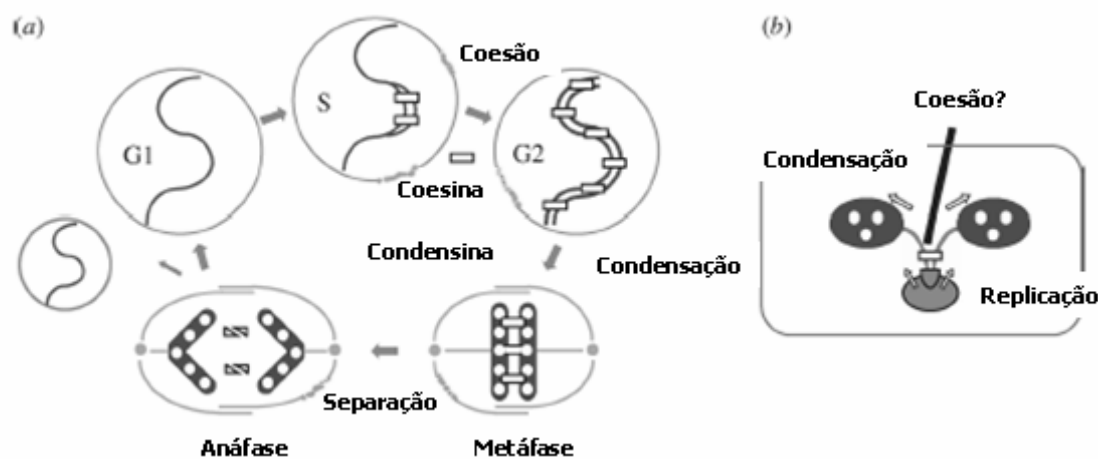


Figura 12 – A segregação e condensação cromossômica em eucariotos (A) e procariotos (B)

Legenda: O = condensinas; \square = coesinas

Fonte: Hirano (2005)

As bactérias, em geral, contêm um único cromossomo e uma origem de replicação. Os cromossomos são compactados em uma estrutura denominada de nucleóide. A condensação dos mesmos ocorre por eventos de superenovelamento e por proteínas histona-like (revisto por Jensen & Shapiro, 1999). Durante a divisão celular, a duplicação e segregação dos cromossomos ocorrem simultaneamente. A segregação dos cromossomos ocorre por decatenação (pela enzima topoisomerase II) e pela proteína SMC separando e condensando (resolução) os cromossomos duplicados em lados opostos da célula originando

no final duas células filhas. Há ainda controvérsia, se realmente ocorre o processo de coesão mediado pelas coesinas (Figura 12B) (Britton et al., 1998; revisto por Jensen & Shapiro, 1999; Hirano, 2005).

1.6.2.2 Interação proteína-cromossomo

Apesar das múltiplas funções na célula, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais as proteínas SMC agem (Case et al., 2004). Sabe-se que o domínio globular catalítico é uma estrutura essencial para permitir a interação das proteínas SMC com o cromossomo, e para executar esta função, é necessário ainda que haja uma seqüência íntegra dos motivos Walker A, Walker B e do motivo C (Hirano et al., 2001). Como mencionado anteriormente, os motivos Walker A e Walker B juntos formam um sítio de ligação ao ATP (Hopfner et al., 2000). Essa ligação induz a interação dos dois domínios catalíticos com as duas moléculas de ATP envolvidas na interface da superfície de ligação do ATP (Haering et al., 2004; Lammens et al., 2004) resultando na hidrólise de ATP promovida pelo motivo C (Figura 13). Mutação em Walker A abole a ligação de ATP enquanto que a mutação no motivo C, permite a ligação, porém bloqueia a interação dos domínios catalíticos e a hidrólise de ATP (Hirano et al., 2001). A substituição de ácido glutâmico no motivo Walker B por glicina estabiliza a interação dos domínios catalíticos, mas diminui a hidrólise de ATP mantendo-os em um estado de transição (Hirano & Hirano, 2004; Haering et al., 2004). Esses trabalhos concluem a importância desses motivos no ciclo mecânico-químico das proteínas SMC.

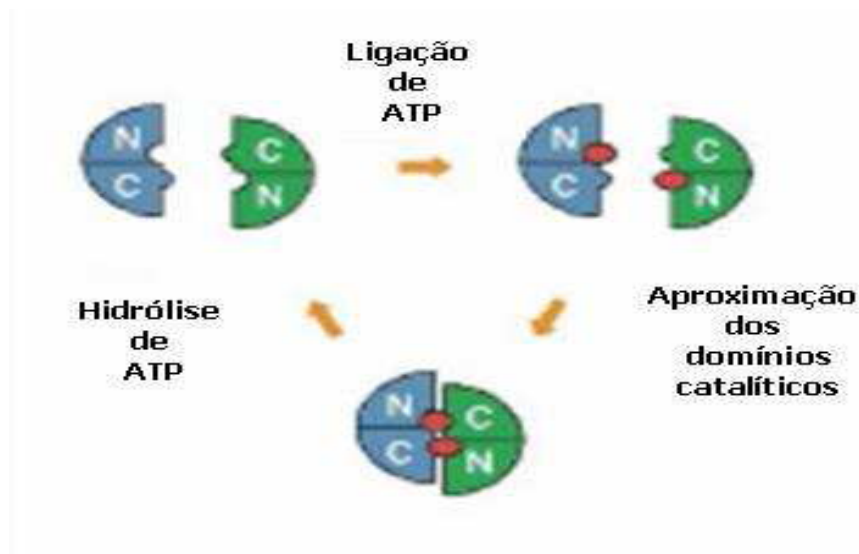


Figura 13 – A ligação e hidrólise de ATP disparam a interação e relaxamento dos dois domínios cabeça SMC, respectivamente.

Fonte: Losada & Hirano et al. (2005)

Há muitas especulações em relação ao mecanismo de ação dessas proteínas que parece ser altamente complexo e dinâmico, possibilitando o envolvimento de diferentes arranjos e interações proteína-proteína intramolecular e intermolecular (Hirano, 2005). A interação intramolecular, ou seja, de dois domínios cabeça de um mesmo dímero resulta na formação de uma estrutura em forma de anel ou em V aproximado. Por outro lado, a interação intermolecular, ou seja, de domínios cabeça de diferentes dímeros resulta na formação de uma variedade de estruturas como duplo anel, filamentos ou estruturas como roseta. É possível também uma interação entre domínios *coiled coil* de diferentes dímeros de maneira independente de ATP (Figura 14) (revisto por Hirano, 2006).

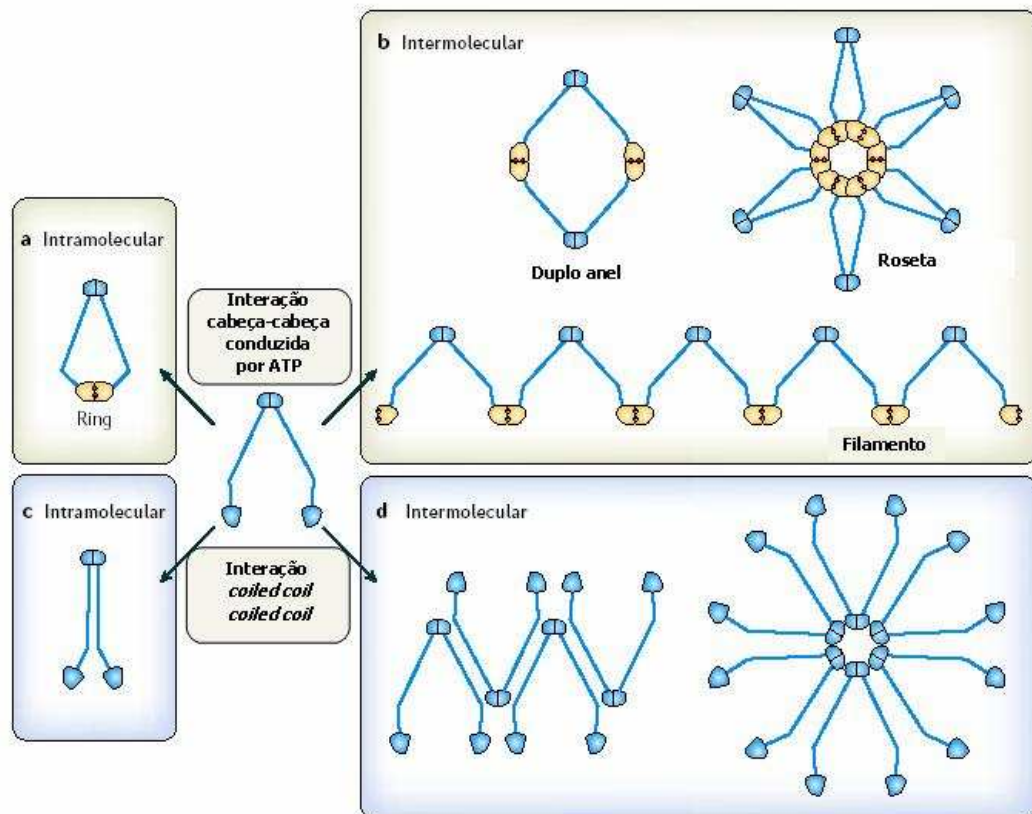


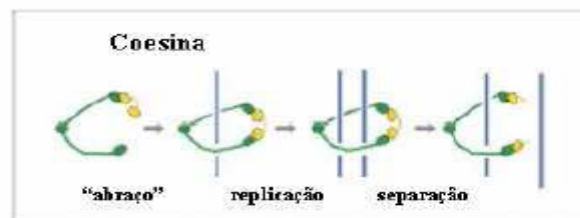
Figura 14 – Formas de interação intramolecular e intermolecular das proteínas SMC.
Fonte: Hirano (2006)

Vimos acima as possíveis interações que essas proteínas podem adotar para atuar na dinâmica estrutural dos cromossomos durante as fases do ciclo celular. O modo como essas moléculas interagem com o DNA também está sob muitas especulações.

A atividade de ATPase pode ser intrínseca (independente de DNA) ou dependente de DNA. Na presença de DNA, a hidrólise de ATP é estimulada e o DNA pode interagir com o complexo SMC promovendo, em seguida, uma associação intermolecular dos domínios cabeça de diferentes dímeros de SMC iniciando a formação de um grande complexo de nucleoproteínas (Löwe et al., 2001; Hirano et al., 2001). As coesinas possuem uma estrutura em forma de anel e isso leva a possibilidade de que elas possam “abraçar” as cromátides-irmãs (Haering et al., 2002) e é um modelo bem atraente, pois explica como a clivagem proteolítica da subunidade Scc1 do complexo abre o anel disparando a separação das cromátides-irmãs no início da anáfase (Uhlmann et al., 1999) (Figura 15A). Após a interação dessas proteínas aos cromossomos duplicados, alternativos exemplos de organização das coesinas são sugeridos: cada complexo pode abraçar as cromátides-irmãs,

mas interagindo através dos “braços” entre os complexos formando uma estrutura que estabiliza a coesão (Figura 16B-a1) ou uma proteína coesina “abraça” uma cromátide e interações pelos “braços” ajudam a estabelecer a coesão entre as duas cromátides (Figura 16B-b2) ou interação de domínios cabeça dirigido por ATP pode ocorrer entre diferentes complexos e produzir uma coesão eficiente (Figura 15B-b3) (revisto por Hirano, 2006).

A



B

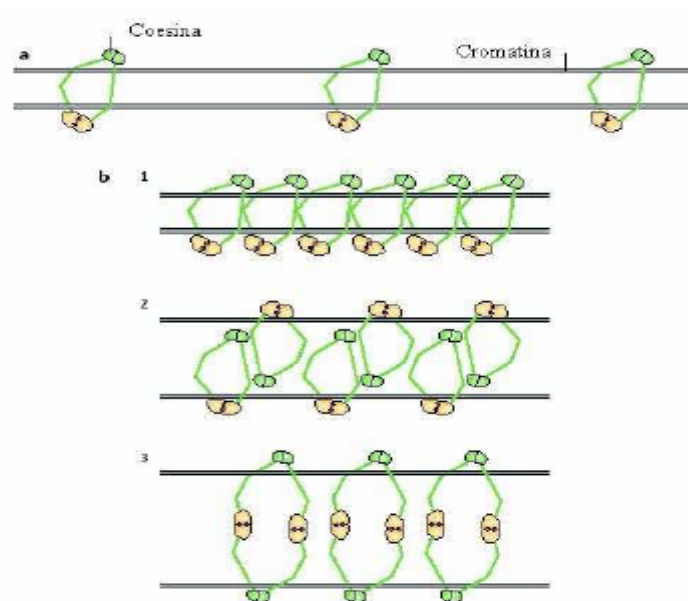


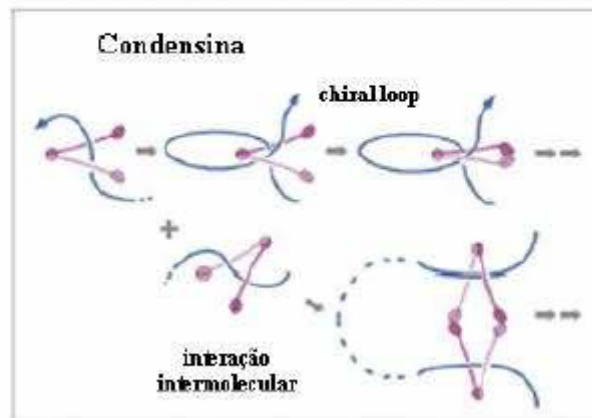
Figura 15 – Mecanismos de ação hipotéticos das proteínas coesinas.

Fonte: Losada & Hirano (2005); Hirano (2006)

De um modo geral, as condensinas parecem induzir uma tensão de superenovelamento no DNA em forma de chiral loop em uma maneira dependente de hidrólise de ATP (Figura 16A) (revisto por Losada e Hirano, 2005). Um modelo baseado no

mecanismo de ação das condensinas em *B. subtilis* mostra que a proteína fechada, entrando em contato com o DNA (Figura 16B1), ativa a hidrólise de ATP facilitando a abertura dos “braços” que estabelece uma interação mais estável com a cromatina pelo modo em “gancho” (Figura 16B2). Em seguida, a interação de ATP aos domínios catalíticos entre diferentes moléculas de condensinas deve reunir ordenadamente estruturas em filamentos criando um grupamento de enovelamento de DNA entre eles (Figura 16B3). Alternativamente, um outro grupamento de DNA em forma de chiral loops pode se formar através da interação dos domínios catalíticos de uma mesma proteína (Figura 16B3’). Em seguida, essas interações proteína-proteína devem formar estruturas em rosetas (Figura 16B4) que se empilham resultando nas fibras de cromatina prometafásicos (Figura 16B5) e metafásicos (Figura 16B6) (revisto por Hirano, 2006). Atualmente, existem muitos modelos hipotéticos disponíveis dos mecanismos de ação e da modulação do ciclo de ligação e hidrólise do ATP das coesinas e condensinas que ainda permanecem a ser esclarecidos.

A



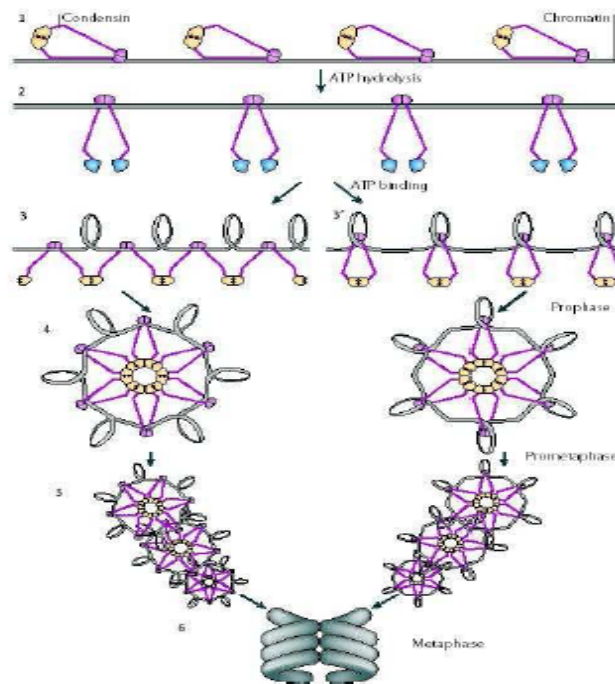
B

Figura 16 – Mecanismos de ação hipotéticas das proteínas coesinas.

Fonte: Losada & Hirano (2005); Hirano (2006)

1.6.3 Outras Funções Celulares das Proteínas SMC

As condensinas e coesinas são as principais proteínas pertencentes à família SMC que participam no processo do ciclo celular. Adicionalmente, outros complexos contendo as SMC apresentam outras funções especializadas. Em células de mamíferos, uma pequena população de coesinas também foi encontrada em complexos de reparo por recombinação juntamente com DNA polimerase ϵ , DNA ligase III e endonucleases (Jessberger et al., 1996). Em *C. elegans*, foi relatada uma família SMC funcionalmente especializada envolvida em dosagem compensatória do cromossomo X denominada de DPY-27 que dimeriza com MIX-1 (Chuang et al., 1994), uma proteína homóloga a CAP-E (SMC2). A MIX-1 também dimeriza com SMC4 participando na condensação mitótica dos cromossomos (Lieb et al., 1998; Hagstrom et al., 2002). Outra função é a repressão da expressão gênica em *Drosophila* nas quais as condensinas e topoisomerase II participam

mantendo o estado de silenciamento da expressão gênica através da manutenção de estruturas como a heterocromatina (Lupo et al., 2001).

T. cruzi é um modelo conhecido por apresentar características bastante peculiares em relação a outros organismos e muitas investigações ainda necessitam ser realizadas para compreendermos melhor toda a estrutura nuclear bem como os componentes que nela existem.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo deste trabalho é a caracterização dos genes que codificam as proteínas do complexo das coesinas e condensinas do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Clonagem dos genes que codificam as proteínas coesinas e condensinas do clone Dm28c de *T. cruzi*;
- Determinação da organização dos genes para condensinas e coesinas no genoma do *T. cruzi* e do tamanho dos RNA mensageiros;
- Obtenção das proteínas recombinantes para produção de antisoro policlonal específico;
- Determinação da localização celular destas proteínas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada no trabalho está descrita no item 3 e o material incluindo reagentes, equipamentos e material encontram-se em anexo.

3.1 MICRORGANISMOS

3.1.1 *Trypanosoma Cruzi* Clone Dm28c (Contreras et al., 1985a)

3.1.2 Cepas de *E. coli*

- *E. coli* Top10F' (Invitrogen[®]): F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻
- *E. coli* XL1-blue (Stratagene): endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44
- F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK⁻ mK⁺)
- *E. coli* Top10F' pREP4 (Qiagen): F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ + pREP4
- *E. coli* C43 [F-ompT hsdSB (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lon λ (DE3)] e duas mutações não caracterizadas (Miroux & Walker, 1996)

3.2 METACICLOGÊNESE DO *T. CRUZI* IN VITRO:

3.2.1 Cultivo do Parasita:

T. cruzi foi cultivado em meio LIT (liver infusion tryptose) a 37°C (Camargo, 1964) com 10% de soro fetal bovino a uma temperatura de 28°C como previamente descrito (Contreras et al. 1985a).

3.2.2 Processo de Metaciclogênese:

A metaciclogênese de *T. cruzi* in vitro foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Contreras et al. (1985b). Formas epimastigotas em fase logarítmica mantidas em LIT foram recuperadas por centrifugação (10.000 x g por 15 min a 10°C) e incubadas por 2 h em meio TAU (triatomine artificial urine). Após esse tempo, nos quais os parasitas passam por um estresse nutricional, estes foram transferidos para frascos de cultura contendo meio TAU, suplementado com glicose e aminoácidos prolina, glutamato e aspartato (TAU3AAG). Epimastigotas em diferenciação se aderem no frasco de cultura e após aproximadamente 96 h os parasitas se desprendem e são liberados no meio como tripomastigotas metacíclicos. Estes foram purificadas em uma coluna de DEAE-51 celulose (Sigma[®]) (Sousa, 1983) para obter uma forma metacíclico puro.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA DE *T. CRUZI* (MEDINA-ACOSTA & CROSS, 1993):

Os parasitas (1×10^7 até 1×10^8 /ml) foram centrifugados a 1.360 x g por 10 minutos, lavadas em PBS e lisados pela adição do tampão TELT. Incubou-se o material por 5 min à temperatura ambiente. O DNA foi extraído com 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico e centrifugado por 5 min a 13.000 x g. O DNA recolhido foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto durante 5 min, centrifugado a 13.000 x g por 10 min e lavado com

1 ml de etanol 70%. O etanol foi evaporado da amostra e, em seguida, o DNA foi ressuspenso em tampão TE contendo 20 µg/ml de RNase A. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *T. CRUZI* (KARLINSEY ET AL., 1989):

Os parasitas (1×10^9 a 1×10^{10}) foram centrifugadas a $9.600 \times g$ por 10 min a 10°C, lavados em PBS e centrifugados na mesma condição anterior. O sedimento foi ressuspenso com um pouco (em torno de 1 ml) de PBS e lisadas em tampão de lise, agitando-o levemente até o material tornar-se viscoso. Em seguida, foram adicionados 7 volumes de LiCl 4 M e o material foi guardado a 4°C por 16 h. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o RNA total (sedimento) ressuspenso em LiCl 3 M. O material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores, por duas vezes. O sedimento foi ressuspenso em solução de ressuspensão e congelado em nitrogênio líquido. Este material foi descongelado e o RNA foi extraído uma vez com fenol saturado, uma vez com fenol/clorofórmio, uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico. A cada extração o material foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente. O RNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol a -20°C e lavado com etanol 70%. Em seguida, o RNA foi ressuspenso em água ultra pura tratada com DEPC 0,1% e armazenado a -70 °C.

3.5 OBTENÇÃO DE EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNA:

Os parasitas foram coletados por centrifugação ($4.000 \times g$, 15 min a 10 °C), lavados duas vezes em PBS pH 7.5 e lisados em tampão de amostra para proteína (Tris-HCl 1M pH 6,8 40 mM, SDS 1%, β-Mercaptoetanol 14,7 M 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%) a uma concentração final de 1×10^6 ou 5×10^6 parasitas/µl.

3.6 TÉCNICA DE SOUTHERN BLOT (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989):

O DNA genômico de *T. cruzi* foi digerido com endonucleases de restrição apropriadas para cada gene do complexo das coesinas e condensinas (Tabela 2) e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gel contendo o DNA digerido foi tratado e transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences) segundo o protocolo de Sambrook et al. (1989). Em seguida, a membrana foi lavada uma vez em SSC 2X, seca e exposta à luz ultra violeta para concluir a ligação covalente do DNA à membrana.

Tabela 2 – Enzimas de restrição utilizadas para digestão do DNA genômico de *T. cruzi* de acordo com o gene

Gene	Endonucleases de restrição
<i>SMC1</i>	<i>AvaI; HindI; SacII; EcoRV; PvuI; BglII</i>
<i>Sccl</i>	<i>AvaI; KpnI; MluI; SacI; PvuI; PstI</i>
<i>SMC4</i>	<i>AvaI; BamHI; BglI; HindI; KpnI; XhoI</i>
<i>CapD2</i>	<i>BglI; DraI; EcoRV; NcoI; SalI e XhoI</i>

3.6.1 Amplificação dos Fragmentos para Marcação Radioativa:

Os genes *SMC1*, *Sccl*, *SMC4* e *CapD2* foram amplificados por PCR, usando as seguintes condições: 100 ng DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos forward e reverso (Tabela 3), 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (InvitrogenTM). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA). Todas as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação, cujas etapas e temperaturas estão descritas na tabela 4:

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores dos genes SMC1, Scc1, SMC4e CapD2 utilizados para amplificar os fragmentos (sondas) marcado radioativamente com [α - 32 P]-dCTP

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores
<i>SMC1</i>	<i>SMC1F</i> 5' CATATTGACCGCGTGGAGTTGTA 3'
	<i>SMC1R2</i> 5'AATCCTCGCCAGCTCCACCT 3'
<i>Scc1</i>	<i>Scc1F1</i> 5'TCTACGTATGTCTTGACGAAGCGAGG 3'
	<i>Scc1R1</i> 5'TGCACCAGGCAGGAGACCCA 3'
<i>SMC4</i>	<i>SMC4F</i> 5'ATGCGTGGGGCAGCTGGTTTG 3'
	<i>SMC4R3</i> 5' TCAACAAGTTCCAAGTCGGCGTCT 3'
<i>CapD2</i>	<i>CCF</i> 5' ATGACGGACGTGCTTGAGTTTTTTTGT 3'
	<i>CCR</i> 5' TCACGGTACTGTTTCAGTCTCTTCTCTCTC 3'

Tabela 4 – Etapas e temperaturas utilizadas para cada gene

	<i>SMC1</i>	<i>Scc1</i>	<i>SMC4</i>	<i>CAP-D2</i>
Desnaturação	94 °C	94 °C	94 °C	94 °C
Hibridação dos oligonucleotídeos	55 °C	60 °C	58 °C	55 °C
Extensão	72 °C	72 °C	68 °C	68 °C

Após os 30 ciclos foi realizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 min. O material amplificado foi purificado segundo o kit GIBCO CONCERT Gel (GIBCO BRL) e armazenado a -20 °C.

3.6.2 Hibridação de DNA com Sondas Radioativas dos Genes Alvos (Current Protocols, 1994 – Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K.):

A membrana foi incubada em solução de pré-hibridação por 1 h a 65 °C e, em seguida, a mesma foi incubada por 16 h em solução de hibridação com 1×10^6 cpm/ml da sonda marcada radioativamente. Esses fragmentos foram marcados radioativamente com [α - 32 P]-dCTP (Amersham Biosciences) utilizando o kit de marcação Nick Translation System

(Invitrogen™) e purificado através de microcoluna ProbeQuant G-50 (Amersham Biosciences). Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X; SDS 0,1%, duas vezes em SSC 1X; SDS 0,1% e duas vezes em SSC 0,1X; SDS 0,1% a 65 °C. Em seguida, a mesma foi exposta a filmes de radiografia (X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences).

3.7 TÉCNICA DE NORTHERN BLOT (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989):

A expressão dos genes SMC1, Scc1, SMC4e CAP-D2 foram analisadas através de ensaios do tipo northern blot. Para tanto, RNA (10 µg) total de *T. cruzi* foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão MOPS. Em seguida, o RNA foi transferido para membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences) utilizando o protocolo descrito por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Após a transferência a membrana foi lavada um vez em SSC 2X, seca e exposta à luz ultra violeta para concluir a ligação covalente do RNA à membrana.

Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de pré-hibridação por 1 h a 42 °C. A hibridação foi realizada em solução de hibridação a 42 °C por 16 h, utilizando as sondas marcadas radioativamente na concentração de 5×10^6 cpm/ml. Esses fragmentos foram marcados radioativamente com [α -³²P]-dCTP (Amersham Biosciences) utilizando o kit de marcação Nick Translation System (Invitrogen®) e purificado através de microcoluna ProbeQuant G-50 (Amersham Biosciences). Depois da hibridação, a membrana foi lavada duas vezes em SSC 2 X; SDS 0,1 %, duas vezes em SSC 1 X; SDS 0,1 % e duas vezes em SSC 0,5 X; SDS 0,1 % a 42 °C. Em seguida, a membrana foi exposta a filmes de radiografia (X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences).

3.8 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA:

As seqüências de DNA e de proteína dos genes foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (disponível na página do NCBI em <http://www.ncbi.nih.gov>) e também os programas EditSeq do pacote de análise Lasergene (Dnastar Inc.).

Para o alinhamento dos resíduos de aminoácidos deduzidos foram utilizados o algoritmo BLAST e os programas Clustal X e Jalview 2.1.1.

A identidade e similaridade de resíduos de aminoácidos das seqüências das proteínas SMC1, Scc1, SMC4 e CAP-D2 de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *Homo sapiens*, *X. laevis*, *C. elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae* foi obtida pelo BLAST no NCBI.

Para verificar o número de cópias desses genes in silico foi utilizado o BLAST e o CruziGeneDB.

O contexto genômico foi analisado utilizando o algoritmo BLAST. A comparação de domínios conservados das seqüências de proteína foi analisada pelo banco de dados de domínios conservados (CDD: Conserved Domain Database, <http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

3.9 CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS COESINAS E CONDENSINAS DE *T. CRUZI*:

3.9.1 Reação de PCR e Clonagem:

Os genes SMC1e Scc1 foram amplificados por PCR, usando as seguintes condições: 100 ng DNA genômico *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores forward e reverso (Tabela 5), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase 1x, 1U da enzima Taq DNA polimerase (InvitrogenTM). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems) e todas as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificação, cujas etapas e temperaturas foram descritas anteriormente na tabela 4. Para

os genes *Smc4e* e *Cap-D2* foram utilizados 100 ng DNA *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol de oligonucleotídeos forward e reverse, 200 µm de cada dNTP, 0,5 U Triple Master® Polymerase mix, 10X High Fidelity Buffer® com Mg⁺². Os fragmentos amplificados foram purificados pelo kit High Pure PCR Purification (Roche) e clonados em vetores de expressão (Tabela 6) apropriados. Este material foi utilizado na transformação de linhagens de *E. coli* CaCl₂ competentes.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes *SMC1*, *Sccl*, *SMC4e* e *CapD2*:

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do fragmento (bp)
<i>SMC1</i>	<i>SMC1F</i> 5'CGGAATTCGGTTCCTTAGGCGCATTTGGTGAGG 3'	1376
	<i>SMC1R</i> 5'CGGGATCCCTTTTCTCGTCCCACTTTTGGT 3'	
<i>Sccl</i>	<i>ScclF1</i> 5'TCTACGTATGTCTTGACGAAGCGAGG 3'	1725
	<i>ScclR1</i> 5'TGCACCAGGCAGGAGACCCA 3'	
<i>SMC4</i>	<i>SMC4F2</i> 5'GCAGACGAACAGACGAAGGCA 3'	1062
	<i>SMC4R2</i> 5'TCACATTTGATTTGCCTGAACCATT 3'	
<i>CapD2</i>	<i>CCR</i> 5'TCACGGTACTGTTTCAGTCTCTTCTCTCTC 3'	1116
	<i>FW3</i> 5'AAAGAAGGCTTTGTGCCACGCTAC 3'	

Tabela 6 – Os sítios de clonagem utilizados para cada gene e seus respectivos vetores para expressão:

Gene	Sítios de clonagem	Vetor*
<i>SMC1</i>	TA	pTRCHis TOPO® TA ** (Invitrogen™)
<i>Sccl</i>	TA	pTRCHis TOPO® TA ** (Invitrogen™)
<i>SMC4</i>	<i>Pst</i> I e <i>Hind</i> III	pQE31 (Qiagen)
<i>CapD2</i>	<i>Eco</i> RV e <i>Hind</i> III	pET29b (Novagen)

* O mapa dos vetores estão anexados; ** Este vetor adiciona 4 kDa na proteína recombinante

3.9.2 Expressão dos Genes para Condensinas e Coesinas em *E. coli*:

Os clones foram selecionados segundo a técnica da palitagem e a expressão dos genes recombinantes foi induzida através da adição de IPTG (Invitrogen™) na concentração final de 1 mM, exceto para as bactérias transformadas com as construções derivadas do pQE30, cuja indução foi feita na presença de IPTG 2 mM. Após a adição do IPTG, as culturas foram incubadas por 3 h a 37 °C em meio LB. Para verificar a indução da proteína, as bactérias foram coletadas por centrifugação, seguida da lise em tampão de amostra para proteína 1x. Os extratos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

3.9.2.1 Purificação das proteínas recombinantes:

As proteínas recombinantes, obtidas por indução das culturas bacterianas com IPTG como descrito no item 3.8, foram purificadas por eletroeluição a partir de gel desnaturante de poliacrilamida de acordo com o seguinte protocolo. As bactérias foram coletadas por centrifugação (8.000 x g por 15min a 4 °C) e ressuspensas em PBS para lavagem do sedimento. Após centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 4 ml de PBS e lisadas por sonicação usando o homogenizador ultrasônico da Cole Parmer (Modelo 4710) nas seguintes condições (4 pulsos de 10 s na potência 8 com a ponteira de 15 mm de diâmetro, a 4 °C). O lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para proteína e submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Após a eletroforese, o gel foi tratado com KCl 100 mM gelado, o que permitiu a visualização e retirada da região do gel correspondente à proteína recombinante, que foi posteriormente eletroeluída em tampão para eletroforese de proteínas, com corrente de 60 mA por 30 a 60 min. O material eletroeluído foi posteriormente dialisado em PBS pH 8,0 por 16 h a temperatura ambiente para a remoção de SDS.

3.10 OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL CONTRA AS PROTEÍNAS COESINAS E CONDENSINAS RECOMBINANTES:

3.10.1 Anticorpo Policlonal Produzido em Camundongos:

Camundongos machos da linhagem Swiss de aproximadamente dois meses de idade foram imunizados pelas vias intraperitoneal e subcutânea próximo aos linfonodos poplíteo e inguinal. Na primeira inoculação, foram utilizadas 50 µg das proteínas recombinantes purificadas (SMC1 e Scc1) que foram emulsificadas com adjuvante completo de Freund (Sigma®). Na segunda inoculação, foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (Sigma®) e nas subseqüentes inoculações, 20µg da proteína foram adicionados em adjuvante de Hidróxido de alumínio (Alu-gel-S, Serva). O intervalo das inoculações foi de 15 dias e o soro foi obtido 5 dias após a última inoculação.

3.10.2 Anticorpo Policlonal Produzido em Coelhos:

Coelhos machos da raça New Zealand de aproximadamente dois meses de idade foram imunizados pela via subcutânea, seguindo o mesmo esquema de inoculação acima, porém utilizando 100 µg das proteínas recombinantes purificadas (SMC4 e CapD2).

3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS COESINAS E CONDENSINAS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOT:

A transferência foi realizada segundo Towbin et al. (1979). Extratos de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T.cruzi* foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida, foi realizada a transferência do material para a membrana de nitrocelulose (Hybond™-C Extra -Amersham Biosciences) e a mesma foi bloqueada em tampão de bloqueio por 1 h. Após o bloqueio, os antisoros produzidos contra as proteínas condensinas e coesinas foram diluídos a 1:100, para

ambos os soros, em tampão de bloqueio e incubados por 1h. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em PBS/Tween 0,05% e incubada no mesmo tampão anterior contendo anticorpos anti-IgG de camundongo ou de coelho conjugado a enzima fosfatase alcalina, dependendo do anticorpo primário (diluição 1:10.000 em tampão de bloqueio). A membrana foi lavada novamente na mesma condição anterior e a revelação foi realizada em 10 ml de tampão da fosfatase alcalina acrescidos de 66 µl de NBT (nitroblue tetrazolium) 50 µg/ml (Promega) e 33 µl de BCIP (5-Bromo-4 Cloro -3 indolil fosfato) 50 µg/ml (Promega).

3.12 ENSAIO DE COMPETIÇÃO:

Para esse ensaio foi utilizado antisoro contra a proteína purificada Scc1. Utilizou-se antisoro em uma diluição 1:100 e 10 µg da proteína purificada em solução PBS Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5%. A reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, foi realizada uma reação de imunoblot contra o extrato total de proteína. O controle não foi submetido a essas condições.

3.13 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA:

Epimastigotas (3 a 4 dias) e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* foram obtidos de cultura in vitro. Os parasitas foram aderidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma[®]) por 20 min e fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma[®]) diluído em PBS por 5 min à temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas 2 vezes (3 min cada) com tampão glicina 0,1 M pH 8,0, seguida de lavagem em PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (Sigma[®]) em PBS por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitas foram lavados 3 vezes, 5 min cada, com PBS e incubados em solução de bloqueio por 1 h à temperatura ambiente ou por incubação a 4 °C por 16 h. Posteriormente, as amostras foram incubadas com os anticorpos policlonais contra condensinas e coesinas, diluídos a 1:50 e 1:20, respectivamente, em solução de bloqueio a temperatura ambiente por 1 h e após lavadas 3 vezes, 5 min cada, com PBS. Os parasitas foram incubados com anticorpos anti-IgG

de camundongo ou coelho, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluição 1:400 em tampão de bloqueio) por 45 min a temperatura ambiente e lavados 3 vezes, 5 min cada, com PBS. Núcleo e cinetoplasto foram corados pela incubação da lâmina em solução de iodeto de propídeo (100 µg/ml) em PBS, por 5 min, à temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS por 8 vezes em intervalos de 5 min cada. A imunofluorescência utilizando soro anti-GFP de coelho na diluição 1:50 foi realizada por um mesmo processo. As lâminas foram observadas em microscópio Nikon E600 e a imagem capturada por câmera digital CoolSNAP. As imagens foram processadas usando o programa ImagePRO (Media Cybernetics®).

3.14 CONSTRUÇÃO DO VETOR pTEXGFP E CLONAGEM DOS GENES TcSMC1 E TcSCC1:

O gene GFP (em inglês: green fluorescent protein) foi inserido no vetor pTEX previamente construído (Kelly et al., 1992). Foi utilizado o sítio de restrição BamH I para clonagem do gene *gfp*. Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar o gene *smc1*: pTEXGFP *smc1* F 5' TCCCCCGGGAATGCTCTCGCATATTGACCGCGT 3' e pTEXGFP *smc1* R 5' TCCCCCGGGTCAAAAGGGGTATCCGCGAAGG 3'. Para o gene *scc1* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: pTEXGFP *scc1*F 5' TCCCCCGGG AATGTTCTTCTCTACGTATGTCTTGACG 3' e pTEXGFP *scc1*R 5' TCCCCCGGGTCAAGATGTGAGCATGAGACCT 3'. Os clones foram selecionados segundo a técnica da palitagem, análise pela PCR e enzimas de restrição.

3.14.1 Procedimento de Transfecção:

Epimastigotas de *T. cruzi* na fase logarítmica foram lavadas uma vez com Dulbecco's phosphate buffered saline (Gibco™, Invitrogen corporation) e ressuspensas a 5×10^8 células/ml em tampão de eletroporação (140 mM sodium chloride anhydrous, 25 mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine - N' - [2 - ethanesulfonic acid]) e 0,74 mM Na₂HPO₄, pH 7,5). Em um volume de 400 µl das células ressuspensas foram adicionados 20

μg de plasmídeo e mantido por 10 min. em gelo. As células foram eletroporadas utilizando o aparelho Gene Pulser[®] II apparatus (Bio-Rad) a uma condição estabelecida de 450 V/500 μF . Dois pulsos foram utilizados para transfecção e após a eletroporação, as células foram mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, essas células foram transferidas para 10ml de meio de crescimento (meio LIT acrescido de penicilina (10.000 U) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Após 24 h, o antibiótico G418 (Sigma[®] , concentração final 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foi adicionado para selecionar a população transfectada. Após 7 dias, as células foram coletadas por centrifugação e um novo meio LIT foi adicionado. Essas células foram subsequentemente cultivadas utilizando uma diluição 1:10 na presença de G418 até a seleção da população resistente baseada numa transfecção controle na qual foi utilizada apenas parasitas sem adição de plasmídeo. Essa população selecionada foi utilizada para posteriores análises.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GENES

O sequenciamento de bibliotecas de cDNA de *T. cruzi* objetivando a confecção de microarranjos de DNA no IBMP, permitiu a identificação de novos genes que ainda não haviam sido descritos em *T. cruzi*. Um desses genes apresentou identidade com genes de diversos organismos, que codificam a condensina SMC4, envolvida na dinâmica da manutenção estrutural dos cromossomos durante o ciclo celular. Na data em que esses resultados foram obtidos, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, realizado pelo consórcio TIGR (The Institute for Genome Research) ainda não havia sido finalizado. Contudo o consórcio disponibilizava as seqüências de grandes regiões aleatórias de distintos cromossomos de *T. cruzi*, que podiam ser analisadas a partir da página WEB do consórcio TIGR (www.tigr.org), usando-se o algoritmo BLAST (ferramenta de bioinformática de busca de identidade e similaridade entre seqüências nucleotídicas e de aminoácidos, disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov). A análise comparativa do fragmento obtido pelo sequenciamento das bibliotecas de cDNA do *T. cruzi* com essas regiões cromossômicas e com genes SMC4 de outros organismos depositados no GenBank, permitiu a identificação da região codificante (ORF) completa do gene SMC4 de *T. cruzi*. O interesse aumentou quando outros genes (ORFs completas ou parciais) de *T. cruzi* que codificam proteínas do complexo condensina (SMC2, CAP-D2, CAP-G, CAP-H) também foram identificados por apresentar uma forte identidade ou similaridade com seqüências ortólogas. A partir dessas descobertas fomos verificar se o complexo condensina também estava codificado no genoma do *T. cruzi*. Mais uma vez foi identificado diversos genes que codificam as proteínas desse complexo (SMC1, SMC3, Scc1, Scc3), indicando que o *T. cruzi* possui toda a maquinaria de condensação e segregação cromossômica presente em outras células eucarióticas, muito embora o parasita tenha como peculiaridades a ausência de condensação cromossômica na mitose. Uma vez que a cepa CL Brener do *T. cruzi* foi escolhida para o sequenciamento do genoma do parasita, tivemos que desenhar alguns oligonucleotídeos iniciadores para amplificar alguns desses genes, utilizando como molde o DNA genômico do *T. cruzi* clone Dm28c, com o intuito de confirmar a seqüência obtida a partir dos bancos de dados e

completar as falhas resultantes da montagem in silico. Resolvemos trabalhar com 4 dos genes para condensinas e coesinas identificados (SMC4, SMC1, Scc1 e CAP-D2), visto que outros genes ou estavam incompletos (seqüência parcial no TIGR) ou não amplificaram, quando o DNA do clone Dm28c foi usado como molde na reação de PCR. Os tamanhos dos genes SMC1, Scc1, SMC4 e CAP-D2 obtidos foram de 3.789 bp, 1.758 bp, 3.648 bp e 3.744 bp, respectivamente. Todas as amplificações foram obtidas com sucesso e os produtos da PCR apresentaram tamanho esperado.

Ensaio do tipo northern blot mostraram que os 4 genes estudados são expressos e que os RNAm possuíam um tamanho de 6,0 kb para SMC1, 4,3 kb para Scc1, 7,4 kb para SMC4 e 5,8 kb para CAP-D2. (Figura 17). Baseado nos tamanhos dos transcritos e de suas respectivas ORFs, esse resultado indica que as regiões 5' UTR (em inglês: untranslated region) e 3' UTR apresentam um tamanho pequeno. O tamanho dessas regiões de cada proteína será determinado futuramente.

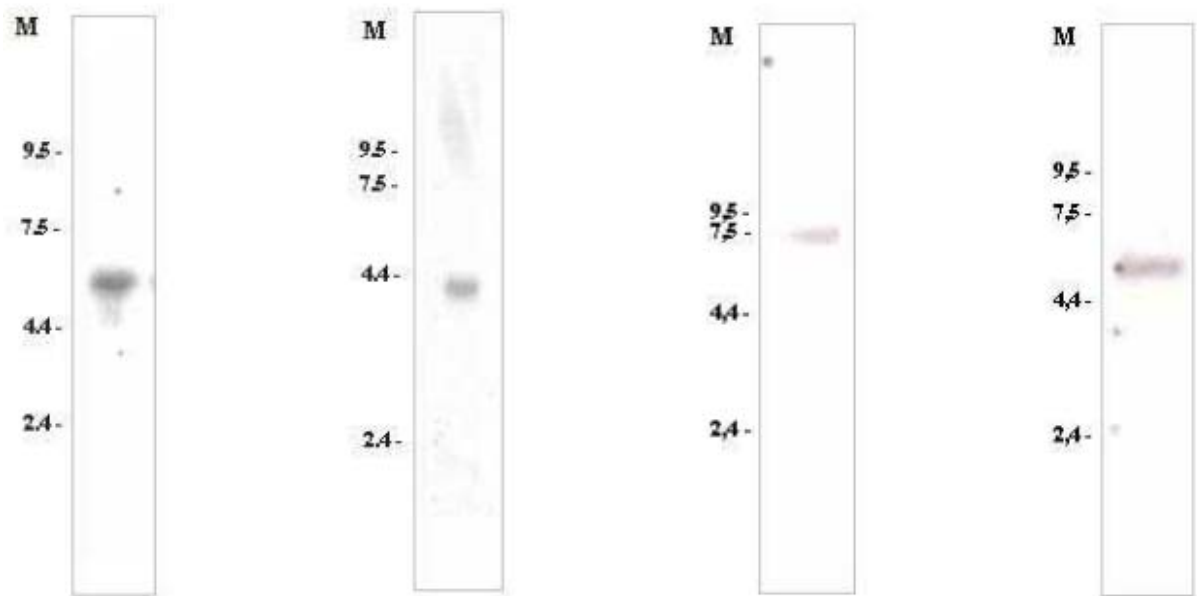


Figura 17 – Análise da expressão dos genes para condensinas e coesinas pelo ensaio do tipo Northern blot. (A) SMC1; (B) Scc1; (C) SMC4; (D) CAP-D2. M: marcador de tamanho molecular (RNA ladder)

Com o intuito de verificar se esses genes apresentam única ou múltiplas cópias no genoma do *T. cruzi* foi realizado uma análise de Southern blot utilizando digestão

do DNA total do parasita com enzimas de restrição (Figuras 18 e 19). O perfil de hibridação mostra que os genes TcSMC1, TcSccl, TcSMC4 e TcCAP-D2 apresentam apenas uma cópia no genoma do parasita. Essa conclusão se baseia no fato que, para cada enzima de restrição utilizada, número e/ou tamanho de fragmentos radioativos observados são compatíveis com o padrão esperado quando da hibridação de uma determinada sonda.

Corroborando os resultados do Southern blot, a pesquisa baseada na similaridade de seqüência (realizada no CruziGeneDB – <http://www.genedb.>) e na organização cromossômica (sintenia) (pelo BLAST) também mostraram que esses genes são de única cópia no genoma do *T. cruzi* Dm28c.

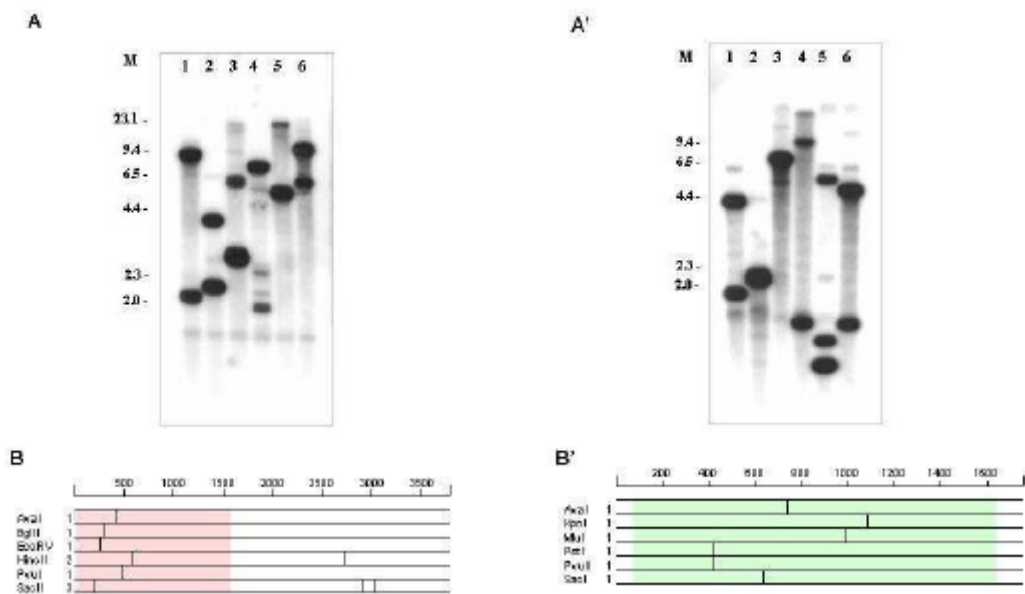


Figura 18 – Análise da organização genômica dos genes TcSMC1 e TcSccl no *T. cruzi*. A sonda utilizada foi amplificada dos pares de oligonucleotídeos iniciadores SMC1F e SMC1R2 (gene TcSMC1) e Sccl1F1 e Sccl1R1 (gene TcSccl) (ver seqüência na tabela 2). (A) Enzimas de restrição utilizadas para a análise do gene TcSMC1: linha 1 (AvaI); 2 (HincI); 3 (SacII); 4 (EcoRV); 5 (PvuI); 6 (BglII); (B) Diagrama mostrando o número de sítios de restrição presentes na região do quadro aberto de leitura. (A') Enzimas de restrição utilizadas para a análise do gene TcSccl: linha 1 (AvaI); 2 (KpnI); 3 (MluI); 4 (SacI); 5 (PvuI); 6 (PstI); (B') Diagrama mostrando o número de sítios de restrição presentes na região do quadro aberto de leitura.

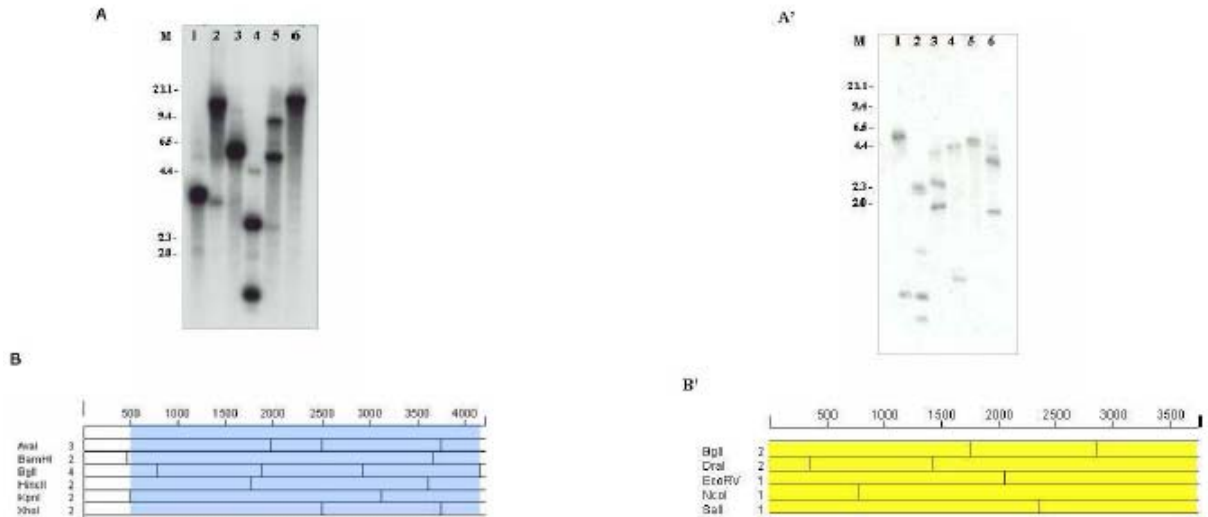


Figura 19 – Análise da organização genômica dos genes TcSMC4 e TcCap-D2 no *T. cruzi*. A sonda utilizada foi amplificada dos pares de oligonucleotídeos iniciadores SMC4F e SMC4R3 (gene TcSMC4) e CCF e CCR (gene Cap-D2) (ver seqüência na tabela 2). (A) Enzimas de restrição utilizadas para a análise do gene TcSMC4: linha 1 (AvaI); 2 (BamHI); 3 (BglI); 4 (HincII); 5 (KpnI); 6 (XhoI); (B) Diagrama mostrando o número de sítios de restrição presentes na região do quadro aberto de leitura. Análise da organização genômica do gene Cap-D2 no *T. cruzi*. (A') Enzimas de restrição utilizadas para a análise: linha 1 (BglI); 2 (DraI); 3 (EcoRV); 4 (NcoI); 5 (SalI) e 6 (XhoI); (B') Diagrama mostrando o número de sítios de restrição presentes na região do quadro aberto de leitura.

A análise do alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos genes SMC1 e SMC4 de *T. cruzi* para os organismos: *T. brucei*, *L. major*, *Homo sapiens*, *X. laevis*,

C. elegans, *S. pombe* e *S. cerevisiae* mostra que essas proteínas apresentam regiões bem conservadas (Figuras 20 e 22). As regiões marcadas em vermelho na região N-terminal mostram as seqüências FKS e GxNGSGKSN do motivo Walker A e o dipeptídeo QG e, no domínio C-terminal, as seqüências conservados LSGG e PxPhhhhDEh-DAALD do motivo Walker B. Na região da dobradiça os quatro resíduos de glicina também estão presentes mostrando realmente uma alta conservação desses resíduos de aminoácidos entre os organismos analisados. As subunidades Scc1 e CAP-D2 também apresentam uma alta conservação das seqüências de aminoácidos deduzidos (Figuras 21 e 23).

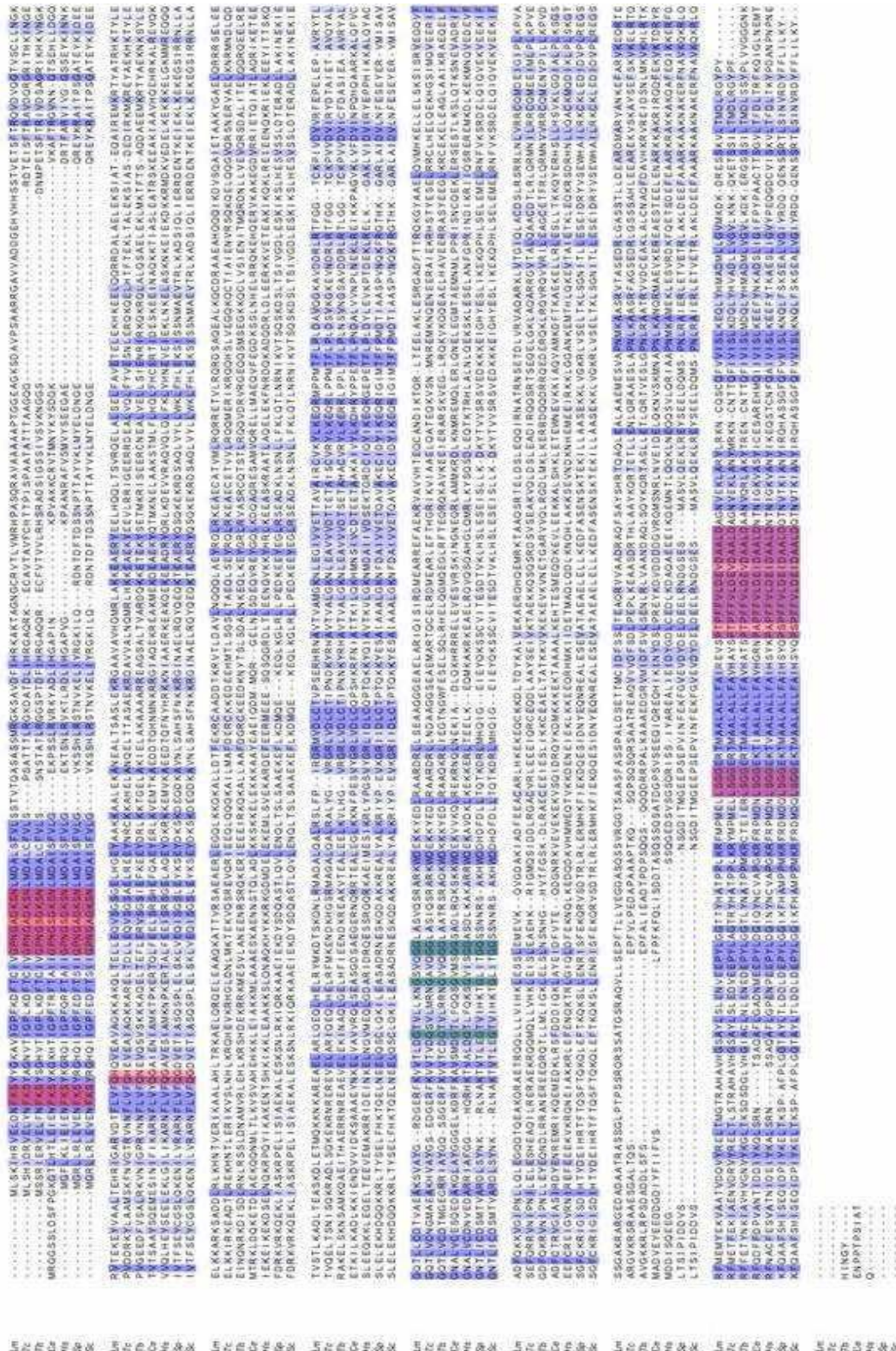


Figura 20 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos do gene Smc1 de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*. As regiões conservadas entre as seqüências de Smc1 estão marcadas em azul. Os motivos Walker A e Walker B estão marcadas em vermelho e os resíduos de glicina em verde.

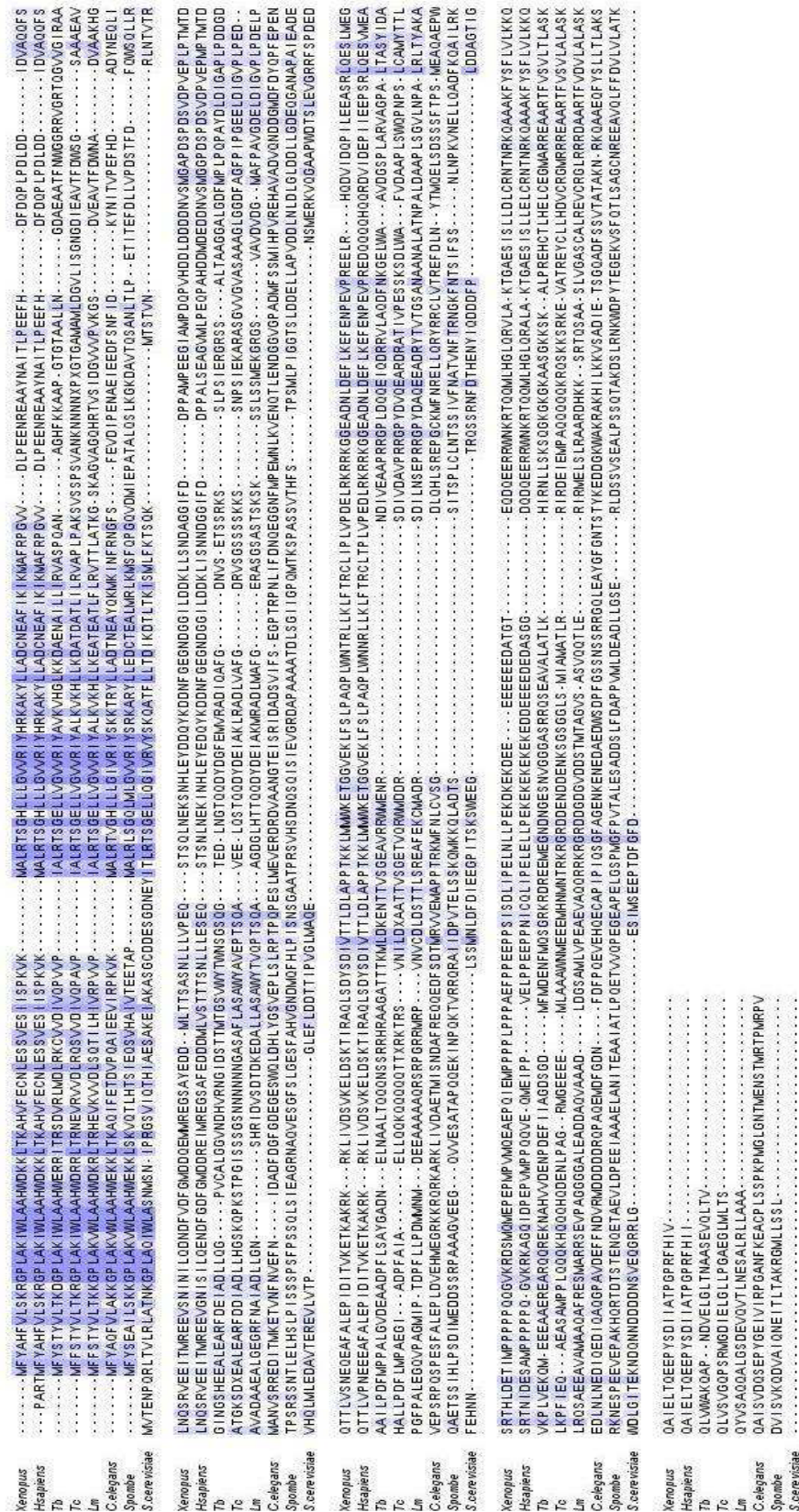


Figura 21 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos do gene Sccl de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. As regiões conservadas entre as seqüências de Sccl estão marcadas em azul.

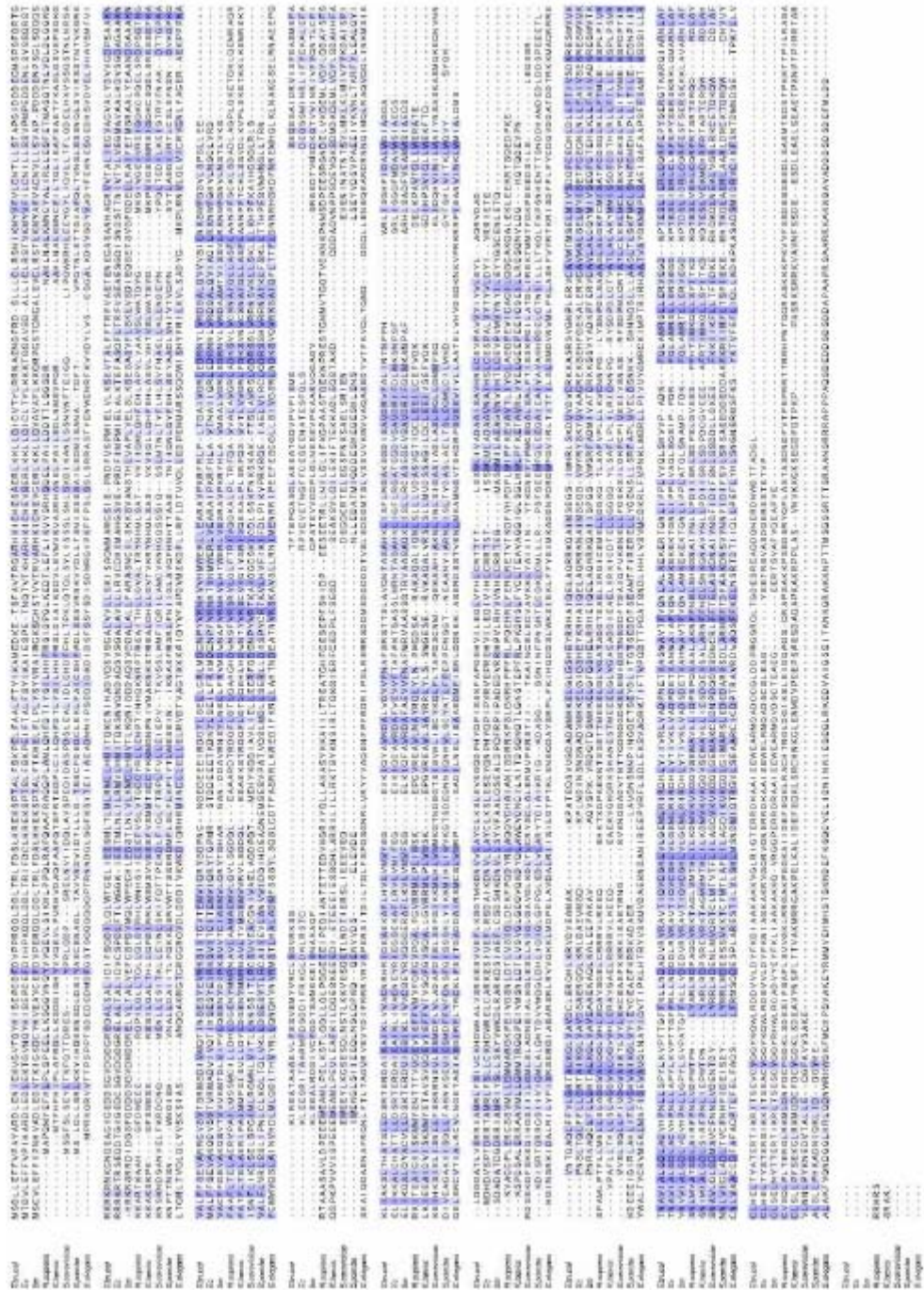


Figura 23 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos do gene Cap-D2 de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. As regiões conservadas entre as seqüências de Cap-D2 estão marcadas em azul.

A identidade e a similaridade entre os tripanosomatídeos variaram entre 42 % a 65 % e 56 % a 81 %, respectivamente.

Tabela 7 – Análise da similaridade do gene Smc1 com outros organismos

Organismos	Identidade	Similaridade
<i>T. brucei</i>	52 %	71 %
<i>L. major</i>	53 %	70 %
<i>H. sapiens</i>	30 %	52 %
<i>X. laevis</i>	30 %	51 %
<i>C. elegans</i>	28 %	50 %
<i>S. pombe</i>	29 %	50 %
<i>S. cerevisiae</i>	27 %	48 %

Tabela 8 – Análise da similaridade do gene Scc1 com outros organismos

Organismos	Identidade	Similaridade
<i>T. brucei</i>	43 %	56 %
<i>L. major</i>	42 %	58 %
<i>H. sapiens</i>	54 %	73 %
<i>X. laevis</i>	54 %	73 %
<i>C. elegans</i>	48 %	79 %
<i>S. pombe</i>	45 %	74 %
<i>S. cerevisiae</i>	33 %	50 %

Tabela 9 – Análise da similaridade do gene Smc4 com outros organismos

Organismos	Identidade	Similaridade
<i>T. brucei</i>	65 %	78 %
<i>L. major</i>	59 %	74 %
<i>H. sapiens</i>	31 %	51 %
<i>X. laevis</i>	30 %	50 %
<i>C. elegans</i>	29 %	50 %
<i>S. pombe</i>	29 %	50 %
<i>S. cerevisiae</i>	30 %	49 %

Tabela 10 – Análise da similaridade do gene CAP-D2 com outros organismos

Organismos	Identidade	Similaridade
<i>T. brucei</i>	65 %	81 %
<i>L. major</i>	57 %	73 %
<i>H. sapiens</i>	22 %	43 %
<i>X. laevis</i>	22 %	44 %
<i>C. elegans</i>	24 %	44 %
<i>S. pombe</i>	20 %	42 %
<i>S. cerevisiae</i>	21 %	44 %

Uma outra forma de visualização por domínios conservados das proteínas SMC1 e SMC4 é mostrada nas figuras 24 e 25, onde podemos notar a presença de uma arquitetura padrão para todos os organismos analisados.



Figura 24 – Análise de domínios conservados da proteína SMC1 em *T. cruzi*, *L. major*, *H. sapiens*, *X. laevis* e *Mus musculus*.

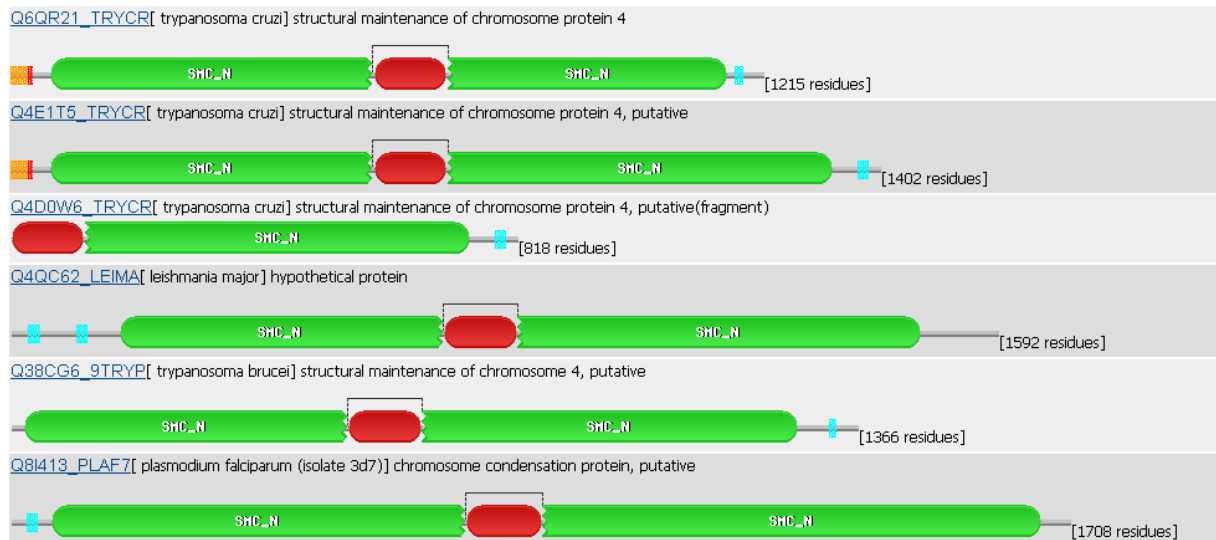


Figura 25 – Análise de domínios conservados da proteína SMC4 em *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *P. falciparum*.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES

Os fragmentos dos produtos amplificados de SMC1, Scc1, SMC4 e Cap-D2 foram clonados em diferentes vetores (ver metodologia) obtendo as proteínas recombinantes com 57 kDa, 68kDa, 40,6 kDa e 40 kDa. (Figuras 19, 20 e 21), respectivamente. As proteínas purificadas foram inoculadas em coelhos e/ou camundongos. O antisoro obtido de cada inoculação foi utilizado para analisar sua especificidade (Figuras 30A' e B', 31A' e B' e 32A' e B') bem como a expressão dessas proteínas em extrato total das formas epimastigotas e/ou tripomastigotas metacíclicos (Figura 33). As massas moleculares das proteínas SMC1, Scc1, SMC4 e Cap-D2 calculada a partir de suas seqüências de aminoácidos são de 143,5 kDa, 64 kDa, 159 kDa e 142 kDa, respectivamente.

Podemos observar que o resultado do western blot mostra que essas proteínas tem massas moleculares compatíveis com aqueles calculados a partir de suas seqüências de aminoácidos, com exceção da proteína Scc1 que deveria apresentar uma massa molecular de 64 kDa, mas apresentou um perfil acima do esperado de, aproximadamente, 90 kDa e outra de aproximadamente 130 kDa. Um ensaio de competição (ver metodologia) foi realizado para verificar se a banda detectada é específica da proteína Scc1. O resultado de western blot revelou que a proteína recombinante Scc1 presente no ensaio competiu, pela

ligação dos anticorpos anti-Scc1, com a proteína presente na membrana, sugerindo que as duas bandas identificadas são da Scc1 (Figura 34).

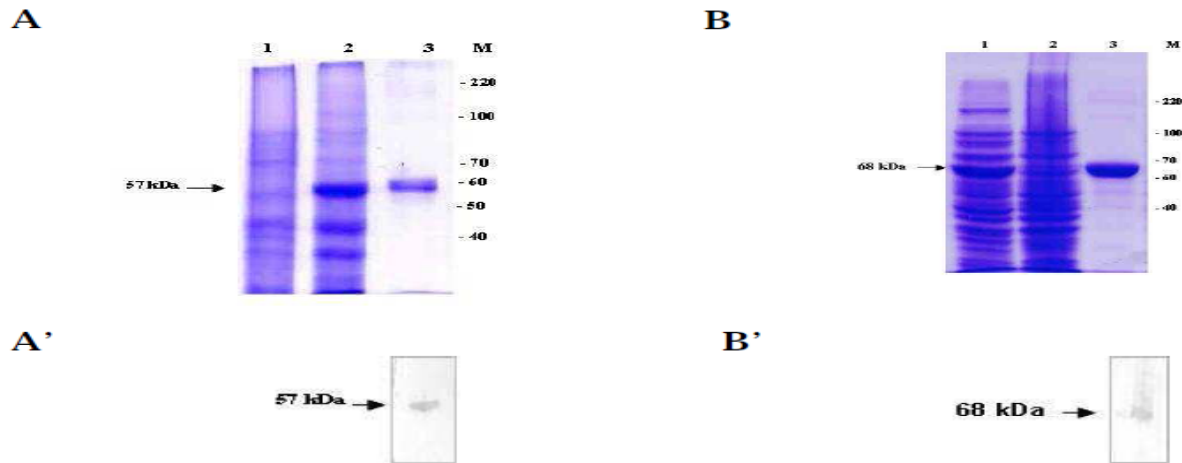


Figura 26 – Indução das proteínas SMC1 e Scc1 em célula E. coli TOP10 (A) SDS-PAGE 10%: 1-pTRC SMC1 induzido; 2-pTRC SMC1 não induzido; 3-pTRC SMC1 purificado; (A') Imunoblot com antisoro de camundongo para a proteína purificada (diluição 1:250) ; (B) SDS-PAGE 10%: 1-pTRC Scc1 induzido; 2-pTRC Scc1 não induzido; 3-pTRC Scc1 purificado; (B') Imunoblot com antisoro de camundongo para a proteína purificada (diluição 1:250); M-marcador de peso molecular (kDa).

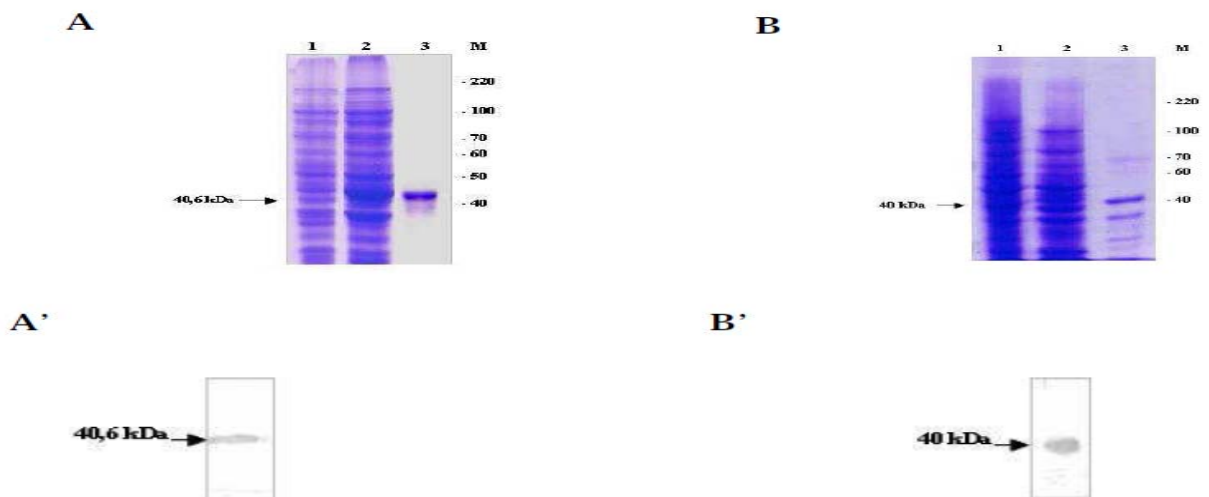


Figura 27 – Indução das proteínas SMC4 e CAP-D2 em célula E. coli TOP10 (A) SDS-PAGE 10%: 1-pQE30 SMC4 induzido; 2-pQE30 SMC4 não induzido; 3-pQE30 SMC4 purificado; (A') Imunoblot com antisoro de camundongo para a proteína purificada (diluição 1:250) ; (B) SDS-PAGE 10%: 1-pET CAP-D2 induzido; 2-pET CAP-D2 não induzido; 3-pET CAP-D2 purificado; (B') Imunoblot com antisoro de camundongo para a proteína purificada (diluição 1:250); M-marcador de peso molecular (kDa).

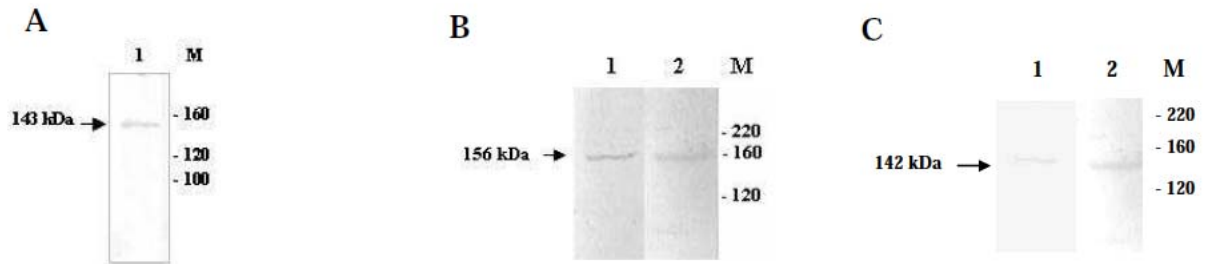


Figura 28 – Análise por Western blot. (A) Extrato de proteína total das formas epimastigotas: 1 – Antisero de camundongo contra a proteína recombinante SMC1 (diluição 1:100); (B) Extrato total: 1 -Antisero de coelho contra a proteína recombinante SMC4 (diluição 1:500) nas formas epimastigotas (1) e tripomastigotas metacíclicos (2); (C) Extrato total: 1 -Antisero de coelho contra a proteína recombinante CAP-D2 (diluição 1:500) nas formas epimastigotas (1) e tripomastigotas metacíclicos (2); M -marcador de peso molecular (kDa)

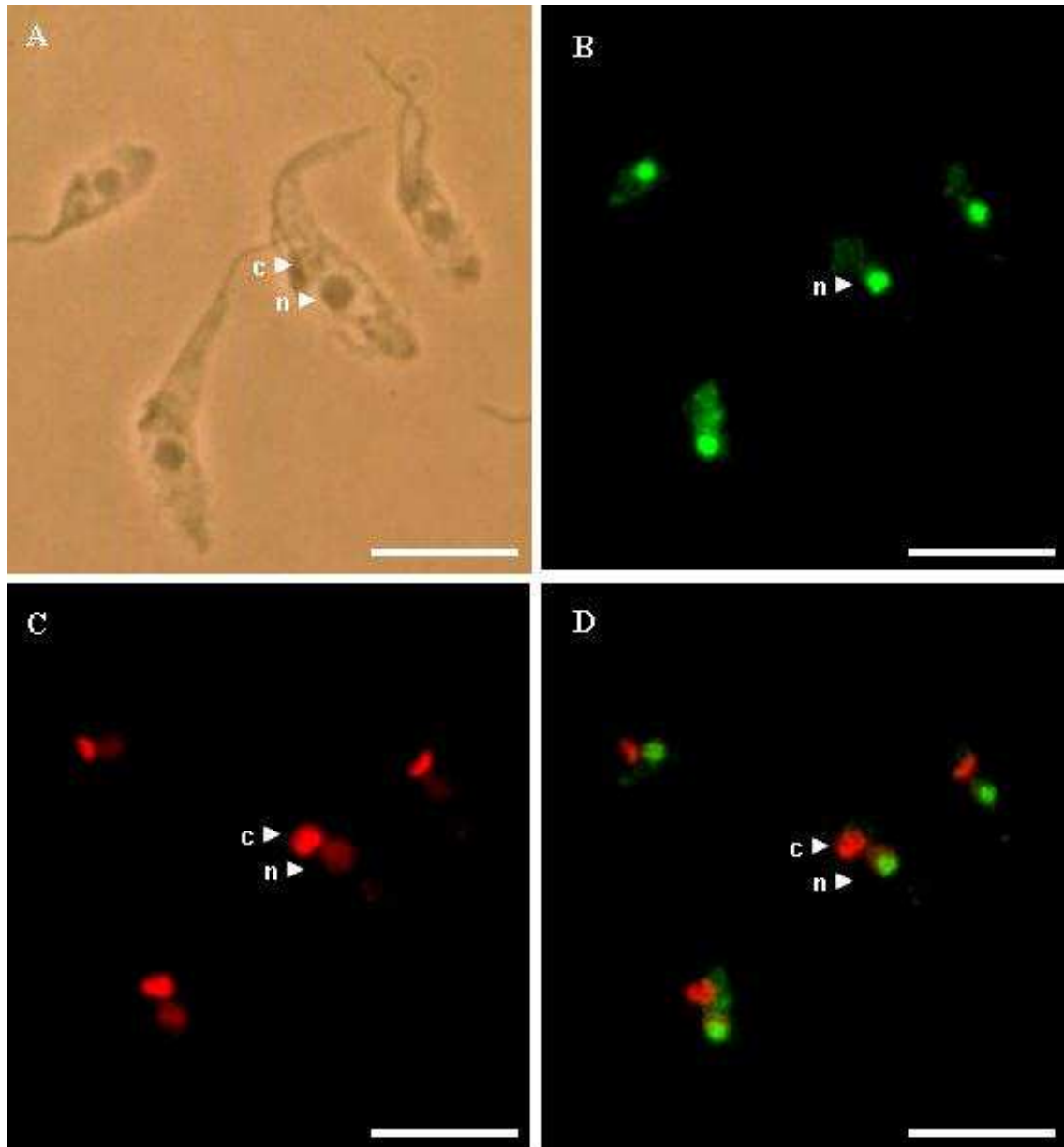


Figura 29 – Western blot mostrando o perfil de expressão da proteína Scc1 em extrato de epimastigotas de *T. cruzi* usando o soro anti-Scc1 (1) e o soro anti-Scc1 incubado previamente com a proteína Scc1 recombinante purificada (2). M-marcador de peso molecular (kDa).

4.3 ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO CELULAR

As análises da localização celular das proteínas coesinas e condensinas realizadas em *T. cruzi* mostraram que essas proteínas são nucleares. As condensinas parecem estar mais localizadas próximo à periferia nuclear (Fig., enquanto as coesinas apresentam uma localização similar, mas menos estrigente no núcleo. Existe ainda uma limitação na região do nucléolo. As proteínas SMC1 e Scc1 fusionadas a GFP também mostram um localização

nuclear similar às obtidas com os antisoros específicos. As imunolocalizações das proteínas SMC1, Scc1, SMC4 e CAP-D2 estão nas figuras 36, 37, 38 ().



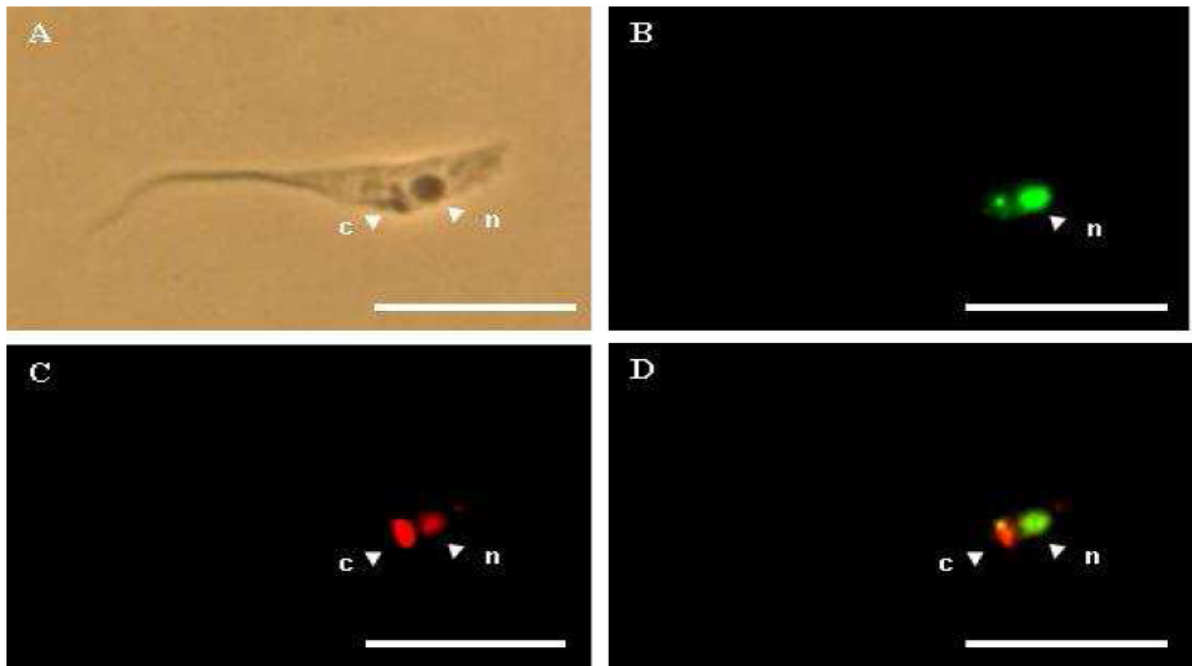


Figura 30 – Imunolocalização da proteína SMC1. A-Imagem de contraste de fase; B-Imagem da fluorescência pela marcação com FITC; C-Imagem da fluorescência pela marcação com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μm .

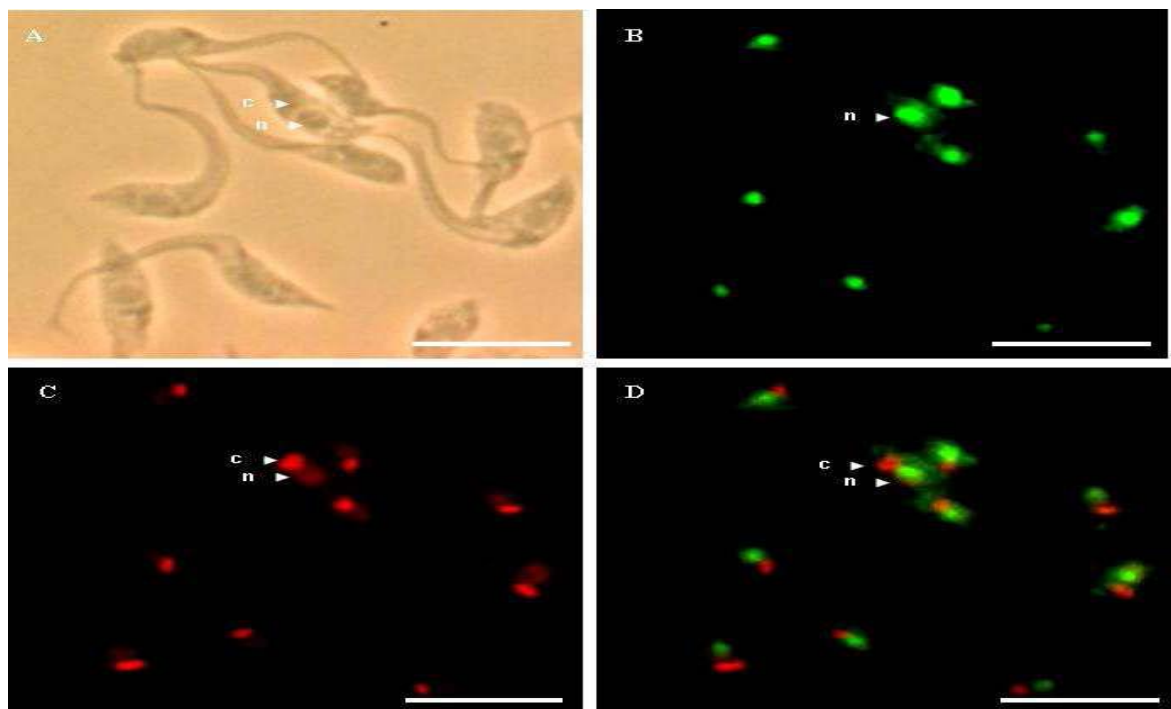


Figura 31 – Imunolocalização da proteína Scc1. A-Imagem de contraste de fase; B-Imagem da fluorescência pela marcação com FITC; C-Imagem da fluorescência pela marcação com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μm .

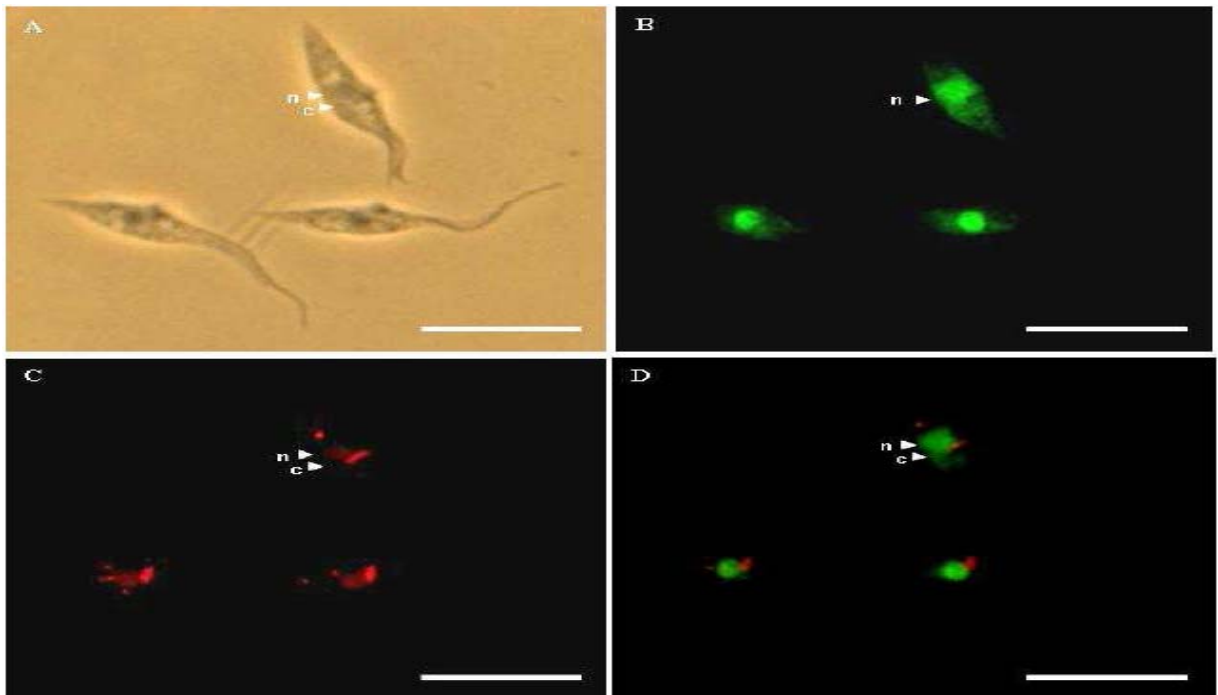


Figura 32 – Imunolocalização da proteína SMC4. A-Imagem de contraste de fase; B-Imagem da fluorescência pela marcação com FITC; C-Imagem da fluorescência pela marcação com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μ m.

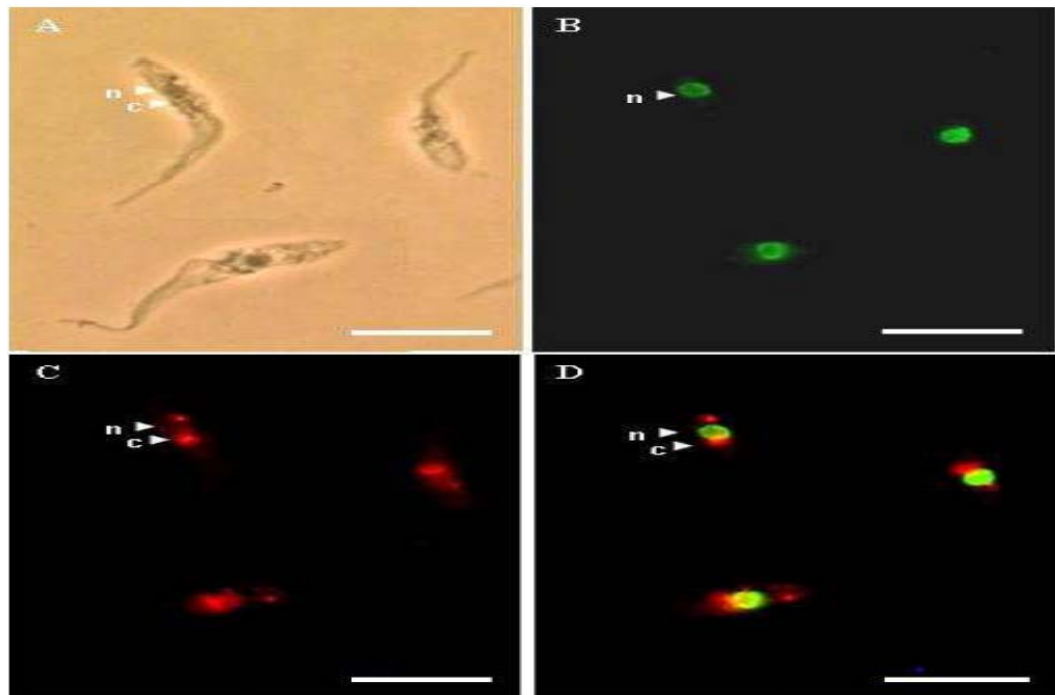


Figura 33 – Imunolocalização da proteína CAP-D2 em tripomastigota metacíclico. A-Imagem de campo claro; B-Imagem da fluorescência; C-Imagem com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μ m.

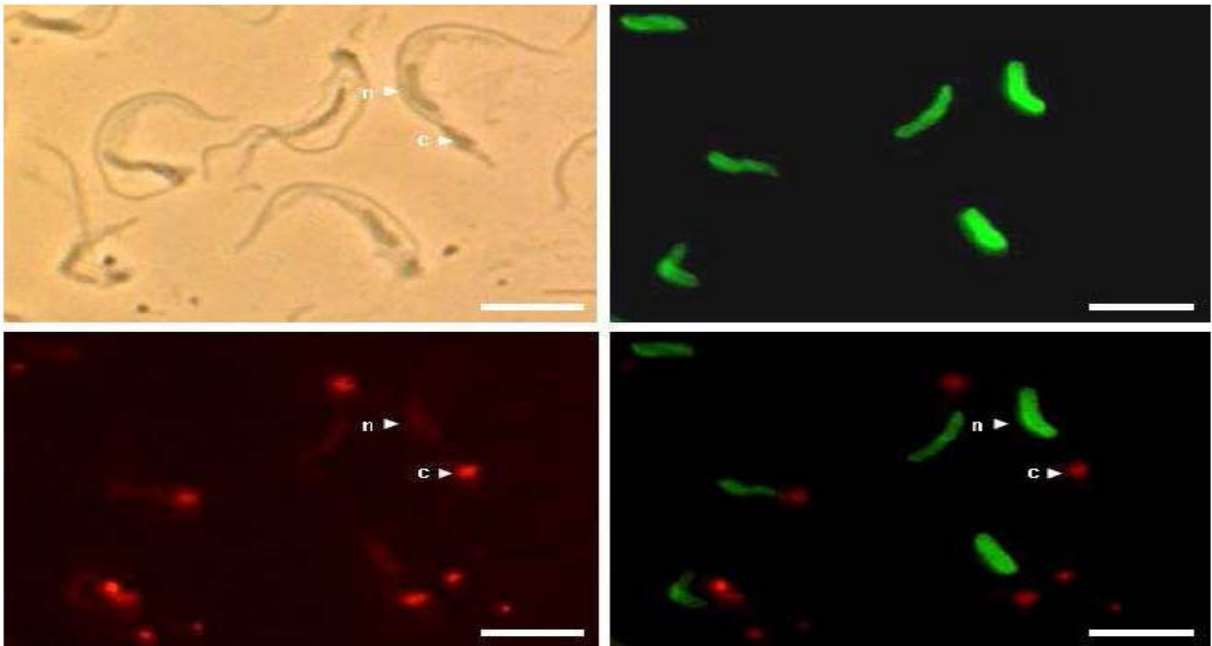


Figura 34 – Imunolocalização da proteína CAP-D2 em tripomastigota metacíclico. A-Imagem de campo claro; B-Imagem da fluorescência; C-Imagem com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μ m.

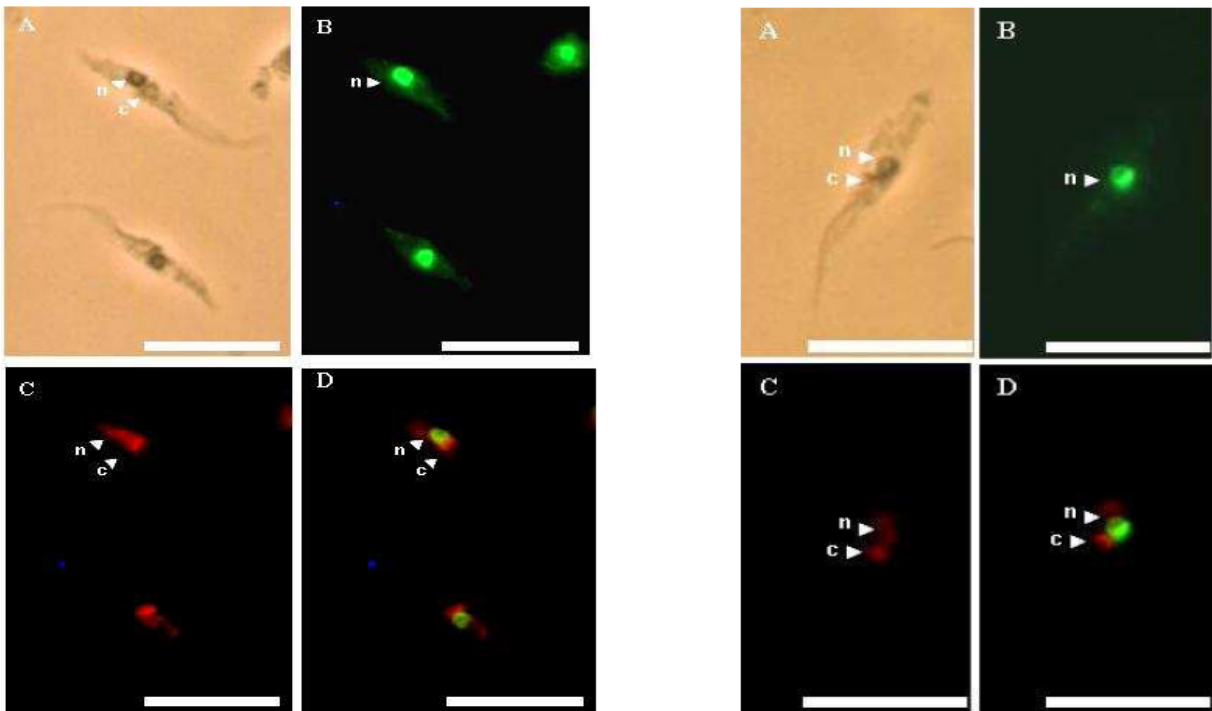


Figura 35 – Análise de localização celular pela fusão da proteína SMC1 com GFP. A-Imagem de campo claro; B-Imagem da fluorescência; C-Imagem com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μ m.

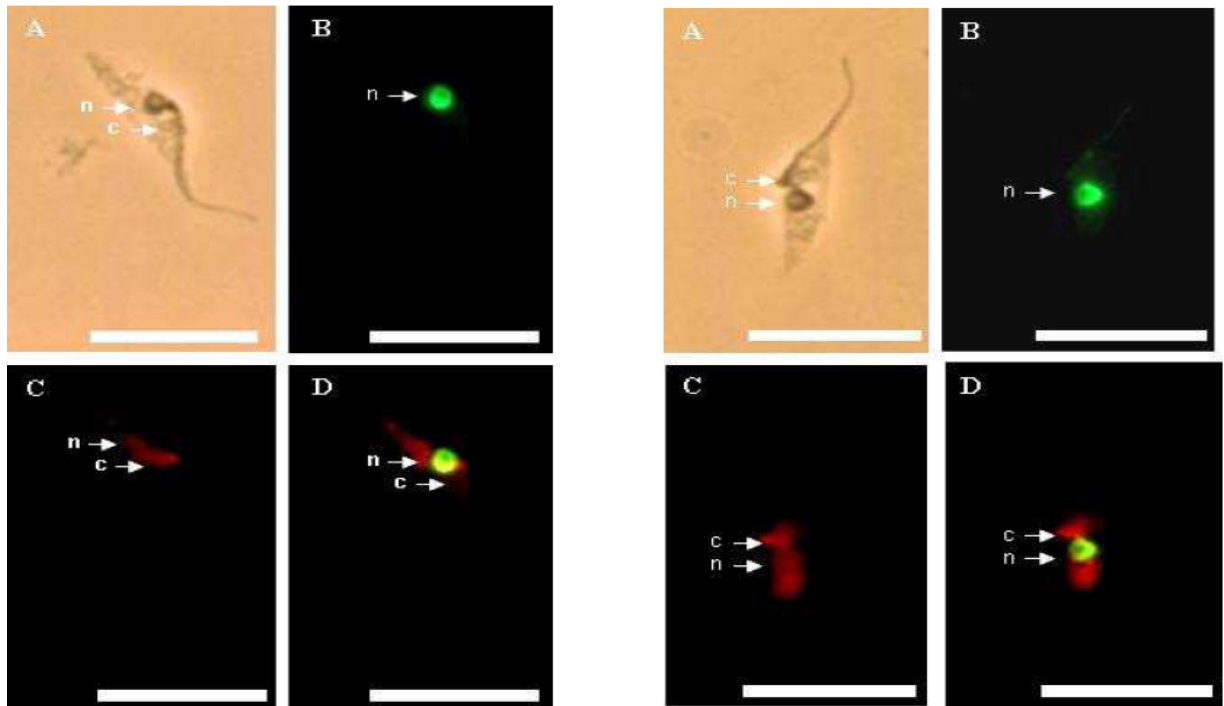


Figura 36 – Análise de localização celular pela fusão da proteína Scc1 com GFP. A-Imagem de campo claro; B-Imagem da fluorescência; C-Imagem com iodeto de propídio e D – Sobreposição das imagens B e C. (n) núcleo; (c) cinetoplasto; barra: 10 μ m.

5 DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário responsável pela doença de Chagas, pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas tanto em relação à biologia celular quanto à molecular. Algumas das características peculiares é a limitada compactação da cromatina por não apresentarem a forma convencional de histona H1 (Hecker et al., 1994; Spadiliero et al., 2002b) e a preservação da carioteca durante o processo de divisão celular (Silveira, 2000). Desta forma, investigar a dinâmica dos componentes nucleares torna-se bastante interessante.

Além disso, existem poucos trabalhos na literatura sobre a organização cromossomal e divisão celular em tripanosomatídeos (Hecker et al., 1985; Hecker et al., 1994; Schlimme et al., 1995; Ersfeld & Gull, 1999; Ogbadoyi et al., 2000; Belli, 2000; Horn, 2000; De Souza, 2002; Spadiliero et al., 2002a, 2002b; Elias et al., 2001, 2002) e poucas proteínas que interagem diretamente com o cromossomo são conhecidas. Esse trabalho identificou proteínas que são essenciais para divisão celular e que ainda não foram investigadas em tripanosomatídeos.

Esse trabalho iniciou com a identificação pelo BLAST de um fragmento que apresentou homologia com a proteína condensina da família SMC obtido de bibliotecas de cDNA. Uma busca realizada no TIGR identificou seqüências nucleotídicas de uma outra proteína do complexo SMC, as coesinas. A partir dessas informações, um conjunto de seqüências parciais foi alinhado resultando na obtenção de um possível quadro aberto de leitura dessas proteínas. O trabalho foi iniciado com todas as subunidades dos dois complexos, porém conseguimos obter antisoros de quatro deles: SMC1, Scc1, SMC4 e CAP-D2. Mesmo trabalhando com as seqüências alinhadas de outros organismos, não tivemos problemas com amplificações e nem com as expressões, obtendo resultados de tamanho e peso molecular esperados. Posteriormente, a busca por seqüências nucleotídicas no *T. cruzi* GeneDB revelou uma similaridade de 99 % com as seqüências de *T. cruzi* CL Brenner e o quadro aberto de leitura apresentou o mesmo tamanho de nucleotídeos mostrando uma alta conservação das seqüências dessas proteínas.

Para determinar a organização genômica dessas proteínas realizamos uma análise por Southern blot e nos bancos de dados do *T. cruzi* GeneDB e de organização

cromossomal. A partir desses resultados sugere-se que TcSMC1, TcScc1, TcSMC4 e TcCAP-D2 são genes de cópia única no genoma de *T. cruzi* Dm28c.

Essas proteínas são altamente conservadas desde leveduras a humanos (Soppa, 2001; Cobbe & Heck, 2004) e apresentam cinco domínios característicos das proteínas SMC (Melby et al., 1998; Hirano, 2002). Com o intuito de verificar se as proteínas do *T. cruzi* também apresentavam o mesmo contexto um alinhamento foi realizado utilizando seqüências de aminoácidos deduzidos de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* mostrando que os domínios N e C-terminal e a região da dobradiça apresentam seqüências bem conservadas, porém o *Coiled coil* não. Os motivos importantes como FKS e GxNGSGKSN do Walker A, o dipeptídeo QG e as seqüências LSGG seguida de PxPhhhhDEh-DAALD do motivo Walker B estão presentes em todos os organismos analisados bem como os resíduos de glicina, importantes para a dimerização. Em outros organismos essas seqüências conservadas também foram encontradas, o que indica ser essencial para a atividade dessas proteínas (Melby et al., 1998).

Os resultados obtidos fornecem informações iniciais mostrando que as proteínas coesinas e condensinas de *T. cruzi* também apresentam seqüências bastante conservadas entre os organismos o que nos indica que elas realizam as mesmas funções como em outros organismos (Melby et al., 1998). Além disso, uma localização nuclear está bem evidente nas formas epimastigotas e tripomastigotas de condensina bem como no extrato total de proteínas. A imunolocalização para SMC4 não foi visualizada nas formas tripomastigotas. Esse resultado ainda necessita ser averiguado, pois o antisoro pode estar com um título baixo talvez podemos concentrar e purificar o soro. As coesinas não foram identificadas em extrato total de proteína e na imunolocalização em tripomastigotas, porém essa informação também necessita ser investigada. A proteína Scc1 apresentou modificações no peso molecular podendo, talvez, estar complexada.

Em *T. cruzi*, a organização e a distribuição da cromatina não é aleatória sendo modulada durante o ciclo de vida do parasita (Spadiliero et al., 2001, 2002). A fase logarítmica exibe uma cromatina menos condensada em relação à fase estacionária na qual a cromatina apresenta domínios localizados próximos ao envelope nuclear, regiões onde existe uma cromatina altamente condensada denominada de heterocromatina. (Elias et al., 2001; Spadiliero et al., 2000a; 2002b). Por outro lado, a cromatina dos parasitas, na fase logarítmica, se desdobra estendendo-se para o centro do núcleo, mas com determinados

domínios nos cromossomos ainda ancorados (ligados) ao envelope nuclear (Spadiliero et al., 2000a; 2002b).

Durante a fase S do ciclo celular constatou-se também um agrupamento dos cromossomos na periferia nuclear (Elias et al., 2002). Esse remodelamento da cromatina pode estar envolvido tanto no controle da expressão gênica (silenciamento/transcrição dos genes) (Spadiliero et al., 2002b) como na replicação dos cromossomos (Elias et al., 2002). Os resultados de localização celular mostram uma concentração maior de condensinas na periferia nuclear sugerindo, talvez, uma participação dessa proteína nessas funções. Em outros organismos essas proteínas foram localizados, principalmente, em regiões heterocromáticas (Uhlmann, 2001). Isso é bastante importante, pois ainda nenhum mecanismo de silenciamento ou ativação de gene induzido pelo remodelamento da cromatina foi descrito em *T. cruzi* e as condensinas, principalmente, podem estar participando nesse processo. O que é intrigante é o fato da condensação da cromatina durante a mitose ser limitada nesses parasitos e como será o mecanismo de ação das condensinas? Em outros organismos a principal função é na condensação e resolução dos cromossomos (Steffensen et al., 2001; Que mecanismos moleculares podem estar atuando para que a condensina não os compacte em característicos cromossomos mitóticos?

As coesinas parecem localizar-se na periferia, mas de forma menos estridente que as condensinas e a região nucleolar parece estar limitada, pois poucas estruturas de DNA em seu interior e a maior parte localizando ao seu redor (López-Velázquez et al., 2005). Os sítios de replicação estão localizados na periferia nuclear nas formas epimastigotas proliferativas (Elias et al., 2002) o que pode corroborar com o que foi visualizado na imunolocalização. A cultura de parasitas utilizada continha diversas formas evolutivas, portanto, visualizamos também marcação mais homogênea no núcleo como visto em epimastigotas na fase estacionária e tripomastigotas (Elias et al., 2002). Uma variação semelhante foi visualizada em condensinas.

A segregação dos cromossomos em *T. cruzi* ocorre intranuclearmente, sem a dissolução da carioteca. Há formação de fusos mitóticos intranuclear e bipolares e a ligação dos microtúbulos polares aos cromossomos ocorre através de placas densas e laminares (possivelmente, equivalentes aos cinetócoros em eucariotos) que migram para os núcleos-filhos, carregando consigo os cromossomos (Silveira, 2000). O cinetócoro é uma região importante para a determinação da coesão das cromátides-irmãs (Weber et al., 2004) e

também facilita o atachamento bipolar dos microtúbulos às cromátides-irmãs. Será que em *T. cruzi* a afinidade para essas regiões é equivalente como em outros organismos?

O trabalho caracterizou os genes das condensinas e coesinas bem como a localização celular dessas proteínas. Além disso, nossas análises forneceram dados iniciais para prosseguirmos as pesquisas em busca de novas informações para compreendermos melhor o comportamento dessas proteínas no parasita.

Como pode ser visto, as condensinas e coesinas apresentam uma única arquitetura molecular e participação em muitas funções celulares. Como será o comportamento das mesmas no protozoário *T. cruzi* já que é um modelo bastante conhecido por apresentar características bastante peculiares em relação a outros organismos? Muitas investigações ainda necessitam ser realizadas para compreendermos melhor toda a complexa e fundamental rede de proteínas que envolvem os fenômenos relacionados à organização estrutural dos cromossomos neste parasita.

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado mostrou que no modelo estudado as proteínas do complexo das condensinas e coesinas também estão presentes, participando na dinâmica estrutural dos cromossomos durante os estágios do ciclo de vida do protozoário *T. cruzi*. Pelas análises realizadas concluímos:

- 1 – O protozoário *T. cruzi* Dm28c também possui os ortólogos das proteínas coesinas (SMC1 e Scc1) e condensinas (SMC4 e CAP-D2);
- 2 – Os genes TcSMC1, TcScc1, TcSMC4 e TcCAP-D2 apresentam cópia única no genoma do protozoário *T. cruzi*;
- 3 – Os principais motivos característicos dessas proteínas estão presentes na proteína do *T. cruzi* mostrando-se essenciais para a atividade da proteína;
- 2 – O transcrito dos genes TcSMC1, TcScc1, TcSMC4 e TcCAP-D2 apresentam tamanho aproximado de 6,9 kb, 4,1 kb, 7,4 e 6,8 kb mostrando regiões 3' UTR e 5' UTR razoavelmente pequenos;
- 3 – As condensinas estão expressas nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* enquanto as coesinas a expressão foram detectadas apenas em epimastigotas;
- 4 – Pela imunolocalização, as condensinas e coesinas apresentam uma localização nuclear bem evidente onde podem estar participando da manutenção estrutural dos cromossomos desse parasita.

7 PERSPECTIVAS

O trabalho realizado mostrou que no modelo estudado as proteínas do complexo das condensinas e coesinas também estão presentes. Estamos no início de uma grande caminhada e muitas questões ainda faltam para serem elucidadas. Outros experimentos serão realizados para compreendermos melhor o comportamento dessas proteínas no *T. cruzi*.

A imunolocalização nos sugere que essas proteínas estão envolvidas na manutenção estrutural dos cromossomos essenciais para o ciclo de vida do parasita. Dessa forma, Uma análise mais detalhada poderá ser realizada através da microscopia eletrônica utilizando os antisoros purificados contra essas proteínas ou contra a GFP já que obtivemos as proteínas SMC1 e Scc1 fusionados à GFP.

Além disso, estudo sistemático das proteínas que interagem com as proteínas coesinas e condensinas necessita ser realizado, utilizando combinações de tecnologias de proteômica e métodos genéticos, como ensaios de duplo híbrido.

Por fim, uma outra informação valiosa que poderemos obter são os sítios de ligação ao DNA através do ensaio de imunoprecipitação de cromatina.

Uma caracterização fenotípica também será determinada após a deleção dos transcritos desses genes pelo ensaio de RNA de interferência utilizando o modelo *T. brucei*.

8 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A. LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4a ed., São Paulo: Artmed, 2004.

ANDERSON, D. E.; LOSADA, A.; ERICKSON, H. P.; HIRANO, T. Condensin and cohesin display different arm conformation with characteristic hinge angles. **J. Cell Biol.**, v.156, n.3, February, p.419-424, 2002.

ARUMUGAM, P.; GRUBER, S.; TANAKA, K.; HAERING, C.; MECHTLER, K.; NASMYTH, K. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. **Curr. Biol.**, v.13, p.1941-1953, 2003.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Wiley, New York, 1987. 3v

BELLI, S.I. Chromatin remodeling during the life cycle of trypanosomatids. **Int. J. Parasitol.** 30: 679-687, 2000.

BRITTON, R.A.; LIN, D.C.; GROSSMAN, A.D. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. **Genes Dev.** 12: 1254-1259, 1998.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosome in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 12: 93-100, 1964.

CASE, R.B.; CHANG, Y.; SMITH, S.B.; GORE, J.; COZZARELLI, N. R.; BUSTAMANTE, C. The Bacterial Condensin MukBEF Compacts DNA into a Repetitive, Stable Structure. **Scienceexpress** 1-11, 2004.

CHUANG, P.T.; ALBERTSON, D.G.; MEYER, B.J. DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with X chromosome. **Cell** 79: 459-474, 1994.

CHAGAS C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1: 11-80, 1909.

CIOSK, R.; SHIRAYAMA, M.; SCHEVCHENKO, A.; TANAKA, T.; TOTH, A.; SCHEVCHENKO, A.; NASMYTH, K. Cohesin's binding to chromosome depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. **Mol. Cell** 5: 243-254, 2000.

COBBE, N.; HECK, M.M.S. The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. **Mol. Biol. Evol.** 21: 332-347, 2004.

CONTRERAS, V.T., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 14: 83-96, 1985a.

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.** 16: 315-327, 1985b.

CREMER et al. Chromosomes territories, interchromatin domain compartment and nuclear matrix. An integrated view of the functional nuclear architecture. **Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression** 12: 179-212, 2000.

CREMER, T.; CREMER, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. **Nature** 2: 292-301, 2001.

CHIU, A.; REVENKOVA, E.; JESSBERGER, R. DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains. **J. Biol. Chem.** 279, 26233-26242, 2004.

De SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.88-126.

De SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Design** 8: 269-285, 2002.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.;

DARBAN, H.; da SILVEIRA, J.F.; de JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; McCULLOCH, R.; McKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; van AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309: 409-415, 2005a.

ELIAS, M.C.Q.B.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.** 112: 79-90, 2001.

ELIAS, M.C.Q.B.; FARIA, M.; MORTARA, R.A.; MOTTA, M.C.M.; de SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome location changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot. Cell** 1: 944-953, 2002.

FERREIRA, J.; PAOLELLA, G.; RAMOS, C.; LAMOND, A. I. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. **J. Cell Biol.** 139: 1597-1610, 1997.

FISHER, D.; WEISENBERGER, D.; SCHEER, U.; Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma** 101: 133-140, 1991.

HAERING, C. H., LOWE, J., HOCHWAGEN, A., NASMYTH, K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesion complex. **Mol. Cell.** 9:773-788, 2002.

HAERING, C.H.; NASMYTH, K. Building and breaking bridges between sister chromatids. **BioEssays**, v.25, p.1178-1191, 2003.

HAERING, C.H.; SCHOFFNEGGER, D.; NISHINO, T.; HELMHART, W.; NASMYTH, K.; LÖWE, J. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. **Mol. Cell**, v.15, p.951-964, 2004.

HAGSTROM, K.A.; HOLMES, V.F.; COZZARELI, N.R.; MEYER, B.J. *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. **Genes Dev.** 16: 729-742, 2002.

HAUF, S.; ROITINGER, E.; KOCH, B.; DITTRICH, C.M.; MECHTLER, K.; PETERS, J.M. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. **PLoS Biol.** 3: e69.

HECK, M.M.S. Condensins, cohesions and chromosome architecture: how to make and break a mitotic chromosome. **Cell** 91: 5-8, 1997.

HECKER, H.; GANDER, E.S. The compactation pattern of chromatin of trypanosomes. **Biol. Cell** 53: 199-208, 1984.

HECKER, H.; BETSCHART, B.; BENDER, K.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. The chromatin of Trypanosomes. **Int. J. Parasitol.** 24(6): 809-819, 1994.

HAERING, C.H.; SCHOFFNEGGER, D.; NISHINO, T.; HELMHART, W.; NASMYTH, K.; LÖWE, J. Structure and stability of cohesin's SMC1-kleisin interaction. **Molecular Cell**, v.15, p.951-964, 2004.

HIRAGA, S. Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. **Annu. Rev. Genet.** 34: 21-59, 2000.

HIRANO, T.; MITCHISON, T.J. A heterodimeric *coiled coil* protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. **Cell** 79: 449-458, 1994.

HIRANO, M.; HIRANO, T. ATP dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. **EMBO J.** 17: 7139-7148, 1998.

HIRANO, T. Chromosome cohesion, condensation and separation. **Annu. Rev. Biochem.** 69: 115-144, 2000.

HIRANO, M.; ANDERSON, D.E.; ERICKSON, H.P.; HIRANO, T. Bimodal activation of SMC ATPase by intra and inter-molecular interactions. **EMBO J.** 20: 3238-3250, 2001.

HIRANO, M.; HIRANO, T. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. **EMBO J.** 21: 5733-5744, 2002.

HIRANO, M.; HIRANO, T. Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins. **EMBO J.** 23: 2664-2673, 2004.

HIRANO, T. SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. **Phil. Trans. R. Soc. B.** 360, 507-514, 2005.

HIRANO, T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. **Nature** 7: 311-322, 2006.

HOPFNER, K.P.; KARCHNER, A.; SHIN, D.S.; CRAIG, L.; ARTHUR, L.M.; CARNEY, J.P.; TAINER, J.A. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. **Cell** 101: 789-800, 2000.

JENSEN, R.B.; SHAPIRO, L. Chromosome segregation during the prokaryotic cell division cycle. **Curr. Opin. Cell Biol.** 11: 726-731, 1999.

JESSBERGER, R.; RIWAR, B.; BAECHTOLD, H.; AKHMEDOV, A.T. SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1. **EMBO Journal**, v.15, n.15, p.4061-4068, 1996.

KARLINSEY, J, STAMATOYANNOPOULOS, G.; ENVER, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. **Anal Biochem.** 180: 303-306, 1989.

KELLY, J. M., WARD, H. M., MILES, M. A., KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and Leishmania. **Nucleic Acids Res.** 20 (15): 3963-3969, 1992.

KIMURA, K.; HIRANO, M.; KOBAYASHI, R.; HIRANO, T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. **Science** 282: 487-490, 1998.

KORNBERG, R.D. & LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell** 98: 285-294, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685, 1970.

LAMMENS, A.; SCHELE, A.; HOPFNER, K.P. Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. **Curr. Biol.** 14: 1778-1782, 2004.

LEHMANN, A.R. The role of SMC in the responses to DNA damage. **DNA repair** 4: 309-314, 2005.

LENGRONNE, A.; KATOU, Y.; MORI, S.; YOKOBAYASHI, S.; KELLY, G.P.; ITOH, T.; WATANABE, Y.; SHIRAHIGE, K.; UHLMANN, F. Cohesion relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. **Nature** 430: 573-578, 2004.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDADE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, F.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.** 27: 37-58, 1980.

LIEB, J.D.; ALBRECHT, M.R.; CHUANG, P.T.; MEYER, B.J. MIX-1: an essential component of the *C. elegans* mitotic machinery executes X chromosome dosage compensation. **Cell**, 92: 265-277, 1998.

LOPEZ-VELAZQUEZ G, HERNANDEZ R, LOPEZ-VILLASENOR I, REYES-VIVAS H, SEGURA-VALDEZ MDE L, JIMENEZ-GARCIA L F. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. **Microsc Microanal.** 11:293-9, 2005.

LOSADA, A.; HIRANO, M.; HIRANO, T. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensing-mediated compaction, at onset of mitosis. **Genes & Dev.** 16: 3004-3016, 2002.

LOSADA, A.; YOKOCHI, T.; HIRANO, T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. **J. Cell Sci.** 118: 2133-41, 2005.

LOSADA, A.; HIRANO, T. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. **Genes Dev.** 19: 1269-1287, 2005.

LÖWE, J.; CORDELL, S.C.; ENT, F. Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel *coiled-coil* inserted. **J. Mol. Biol.**, 306: 25-35, 2001.

LUPO, R.; BREILING, A.; BIANCHI, M.E. ORLANDO, V. Drosophila chromosome condensation proteins topoisomerase II and barren colocalize with polycomb and maintain Fab- & PRE silencing. **Mol. Cell** 7: 127-136, 2001.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G.A.M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.** 59: 327-330, 1993.

MELBY, T.E.; CIAMPAGLIO, C.N.; BRISCOE, G.; ERICKSON, H.P. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel *coiled coils*, folded at a flexible hinge. **J. Cell Biol.** 142: 1595-1604, 1998.

MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J. Mol. Biol.** 260: 289-298, 1996.

NASMYTH, K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. **Science** 297: 559-565, 2002.

NEUWALD, A.F.; HIRANO, T. HEAT repeats associated with condensins, cohesions and other chromosome-related complexes. **Genome Res.** 10: 1445-1452, 2000.

ONO, T.; LOSADA, A.; HIRANO, M.; MYERS, M.P.; NEUWALD, A.F.; HIRANO, T. Differential contribution of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. **Cell** 115: 109-121, 2003.

PHAIR, R.D.; MISTELI, T. High mobility of proteins in the nucleus of mammalian cells. **Nature** 404: 604-609, 2000.

PICCHI, G. F. A. **Identificação e caracterização de TcNUP-1, uma proteína de lâmina nuclear em *Trypanosoma cruzi*.** 2006. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Paraná.

REY, L. (2002) Bases da Parasitologia Médica, 2a edição, Guanabara Koogan.

SAITOH, N.; GOLDBERG, I.G.; WOOD, E.R.; EARNSHAW, W.C. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. **J. Cell Biol.** 127: 303-318, 1994.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHLEIFFER, A.; KAITNA, S.; MAURER-STROH, M.; GLOTZER, M.; NASMYTH, K.; EISENHABER, F. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. **Molecular Cell**, v.11, p.5571-575, 2003.

SHAW, P.; JORDAN, G. E. The nucleolus. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** 11: 93-121, 1995.

SERGEANT, J.; TAYLOR, E.; PALECEK, J.; FOUSTERI, M.; ANDREWS, E.A.; SWEENEY, S.; SHINAGAWA, H.; WATTS, F.Z.; LEHMANN, A.R. Composition and architecture of the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18 (Smc5-6) complex. **Mol. Cell Biol.** 25: 172-184, 2005.

SILVEIRA, J.F. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.127-152.

SCHLIMME, W.; BURRI, M.; BETSCHART, B. et al. Properties of the histones and functional aspects of histone H1 proteins in *Trypanosoma brucei brucei*. **Biol. Cell.**, 83:23-31, 1995.

SOPPA, J. Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic *coiled coil* proteins. **Gene** 278: 253-264, 2001.

SOUSA, M.A. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose column. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 78: 317-333, 1983.

SPADILIERO, B.; SÁNCHEZ, F.; SLEZYNGER, T. C.; HENRÍQUEZ, D.A. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Biochem.** 84: 832-839, 2002a.

SPADILIERO, B.; NICOLINI, C.; MASCETTI, G.; HENRÍQUEZ, D.; VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **J. Cell. Biochem.** 85: 798-808, 2002b.

STEAD, K.; AGUILAR, C.; HARTMAN, T.; DREXEL, M.; MELUH, P.; GUACCI, V. Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. **J. Cell Biol.** 163: 729-741, 2003.

STEFFENSEN, S.; COELHO, P.A.; COBBE, N.; VASS, S.; COSTA, M.; HASSAN, B.; PROKOPENKO, S.N.; BELLEN, H.; HECK, M.M.S.; SUNKEL, C.E. A role for *Drosophila* SMC4 in the sister chromatids in mitosis. **Curr. Biol.** 11: 295-307, 2001.

STRUNNIKOV, A. V.; LARIONOV, V. L.; KOSHLAND, D. SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. **J. Cell Biol.** 123(6): 1635-1648, 1993.

TAKAHASHI, T.S.; YIU, P.; CHOU, M.F.; GYGI, S.; WALTER, J.C. Recruitment of *Xenopus* Scc2 and cohesion to chromatin requires the pre-replication complex. **Nat. Cell Bio.** 6: 991-996, 2004.

TDR/WHO. **TDR strategic direction: Chagas disease.** UNDP/World Bank/WHO special programme for research and training in tropical diseases. Geneva, 2002.

TOTH, A.; CIOSK, R.; UHLMANN, F.; GALOVA, M.; SCHLEIFFER, A.; NASMYTH, K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p (Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. **Genes & Dev.** 13: 320-333, 1999.

TOWBIN, H., STAEBLIN, T.; BORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 76, 4350-4354, 1979.

UHLMANN, F.; LOTTSPREICH, F.; NASMYTH, K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. **Nature** 400: 37-42, 1999.

UHLMANN, F. Chromosome condensation: packaging the genome **Curr. Biol.** 11: R384-387, 2001.

UHLMANN, F.; WERNIC, D.; POUPART, M.; KOONIN, E.V.; NASMYTH, K. Cleavage of cohesion by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. **Cell**, v.103, p.375-386, 2000.

UHLMANN, F.; WERNIC, D.; POUPART, M. A.; KOONIN, E. V.; NASMYTH, K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. **Cell** 103: 375-386, 2004.

WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J.; GAY, N.J. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO J.** 1: 945-951, 1982.

WEBER, S. A.; GERTON, J. L.; POLANIC, J. E.; DeRISI, J. L.; KOSHLAND, D.; MEGE, P. C. The kinetochore is an enhancer of pericentric cohesin binding. **PLoS Biol.** 2(9): e260, 2004.

WIESLANDER, L. The cell nucleus. **Exp. Cell Res.** 296: 1-3, 2004.

9 ANEXOS

9.1 REAGENTES PARA CULTIVO DO PARASITA

9.1.1 Reagentes Químicos

- Ácido L-Aspartico (Sigma[®]), C₄H₇NO₄, PM: 133,1
- Ácido L-Glutâmico sal monossódico (Sigma[®]), C₅H₈NNaO₄, PM: 169,1-
- Bacto-triptose (Difco) - Cloreto de cálcio P.A. (Sigma[®]), CaCl₂, PM: 110,98
- Cloreto de magnésio P.A. (Sigma[®]), MgCl₂, PM: 95,21
- Cloreto de potássio P.A. (Sigma[®]), KCl, PM: 74,56
- Cloreto de sódio P.A (Sigma[®]), NaCl, PM: PM: 58,45
- DEAE-51 cellulose (Sigma[®])
- Extrato de levedura (Becton Dickson Company)
- Fosfato de sódio dibásico P.A.(Merck), Na₂HPO₄, PM: 141,96
- Fosfato dissódico (Vetec), Na₂HPO₄, PM: 141,96
- Glicose P.A. (Sigma[®]), C₆H₁₂O₆, PM: 180,16
- Hemina (Microbiológica), C₃₄H₃₂ClFeN₄O₄, PM: 654,96
- Infuso de fígado (Difco)
- L-prolina (Sigma[®]), C₅H₉NO₂, PM: 115,13
- Soro fetal bovino (Invitrogen[®])

9.1.2 Composição dos Meios

9.1.2.1 Meio LIT (Liver Infusion Tryptose):

Infuso de fígado 0,5 %, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5 % , Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025 %, soro fetal bovino 10 % e extrato de levedura 15 g/L.

9.1.2.2 Meio TAU (Triatomine Artificial Urine):

NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH6,0.

9.1.2.3 Meio TAU3AAG:

Meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.

9.1.3 Material e Equipamentos

- DEAE-51 cellulose (Sigma[®]) – coluna para purificação de metacíclicos
- Estufa BOD
- FANEM -Centrífuga himac CR21G – HITACHI
- Garrafas para cultivo – TPP 25 cm

9.2 REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA (MEDINA-ACOSTA & CROSS, 1993)

9.2.1 Reagentes Químicos

- Álcool etílico absoluto P.A. (Merck[®]), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, PM: 46,07
- Álcool isoamílico P.A. (Sigma[®]), $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, PM: 88,15
- Cloreto de lítio (Sigma[®]), LiCl , PM: 42,40
- Cloreto de potássio P.A. (Merck), KCl , PM: 74,56
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl , PM: 58,45
- Clorofórmio P.A. (Sigma[®]), CHCl_3 , PM: 119,38
- EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate- $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (USB), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PM: 372,24
- Fenol P.A. (Sigma[®]), $\text{O}_6\text{H}_5\text{OH}$, PM: 94,11
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck), KH_2PO_4 , PM: 136,09
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PM: 268,07
- RNase A liofilizado (Sigma[®]), PM: 13700
- TRIS (Hidroxiometil Amino Metano)(Sigma[®]), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, PM: 121,14
- Triton X-100 (Sigma[®])

9.2.2 Composição das Soluções

9.2.2.1 PBS

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄. 7H₂O 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM
pH 8,0

9.2.2.2 TELT:

Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 62,5 mM, pH 9,0; LiCl 2,5 M e 4% Triton
X-100

9.2.2.3 TE:

Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0

9.2.2.4 Fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico

25 partes de fenol:24 partes de clorofórmio:1 parte de álcool-isoamílico

9.2.3 Material e Equipamentos

- Estufa BOD –FANEM
- Centrífuga himac CR21G – HITACHI
- Garrafas para cultivo – TPP 25 cm

9.3 REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE RNA (KARLINSEY ET AL., 1989)

9.3.1 Reagentes Químicos

- Álcool etílico absoluto P.A. (Merck[®]), CH₃CH₂OH, PM: 46,07
- Álcool isoamílico P.A. (Sigma[®]), (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH, PM: 88,15
- β-Mercaptoetanol P. A., C₂H₆O₅, PM: 78,13
- Cloreto de lítio (Sigma[®]), LiCl, PM: 42,40
- Cloreto de potássio P.A. (Merck), KCl, PM: 74,56

- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- Clorofórmio P.A. (Sigma[®]), CHCl₃, PM: 119,38
- Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) (Sigma), C₆H₁₀O₅, PM: 162,1
- EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate-Na₂ EDTA.2H₂O) (USB), C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O, PM: 372,24
- Fenol P.A. (Sigma[®]), O₆H₅OH, PM: 94,11
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck), KH₂PO₄, PM: 136,09
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), Na₂HPO₄.7H₂O, PM: 268,07
- Isopropanol (Sigma[®]), (CH₃)₂CHOH, PM: 60,10
- Isotiocianato de guanidina (Invitrogen), NH₂C(=NH)NH₂.HSCN, PM: 118,16
- Sodium dodecyl sulfate (SDS), CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, PM: 288,38
- TRIS (Hidroximetil Amino Metano)(Sigma[®]), NH₂C(CH₂OH)₃, PM: 121,14

9.3.2 Composição das Soluções

9.3.2.1 PBS

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄. 7H₂O 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM
pH 8,0

9.3.2.2 Tampão de lise

Isotiocianato de guanidina 5M, EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 8%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0

9.3.2.3 Tampão de ressuspensão

Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM e SDS 0,1%

9.3.2.4 TE

Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0

9.3.2.5 Fenol saturado

Derreter o fenol a 65 °C, adicionar 1 vol. de H₂O tratada com DEPC, misturar e guardar a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, descartar a água, adicionar 1 vol. TRIS-HCl 0,5 M pH 8,0 e homogeneizar. Retirar a fase de cima e acrescentar 5 mL de TE.

9.3.2.6 Fenol/clorofórmio

25 partes de fenol:24 partes de clorofórmio

9.3.2.7 Fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico

25 partes de fenol:24 partes de clorofórmio:1 parte de álcool-isoamílico

9.3.2.8 Etanol 70%

70 partes de álcool etílico absoluto e 30 partes de água deionizada

9.3.3 Material e Equipamentos

- Qualquer vidraria ou material que entra em contato com o RNA deverá ser livre de RNase, portanto, tudo é tratado com água DEPC.
- Estufa BOD –FANEM
- Centrífuga himac CR21G – HITACHI
- Garrafas para cultivo – TPP 25 cm

9.4 REAGENTES PARA SOUTHERN BLOT (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989)

9.4.1 Reagentes Químicos

- Ácido bórico P.A.(Vetec), H₃BO₃, PM: 61,83
- Ácido clorídrico P.A.(Merck), HCl, PM: 36,46
- Agarose ultra pura (invitrogen[®])
- Azul de bromofenol (Sigma[®]), C₁₉H₁₀Br₄O₅S, PM: 670
- Brometo de etídeo (Sigma[®]), C₁₂H₂₀N₃Br, PM: 394,3

- Citrato trisódico 2-hidrato (Merck), $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, PM: 294,1
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate- Na_2 EDTA. $2H_2O$) (USB), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, PM: 372,24
- Ficoll (tipo 400) (Sigma[®]), PM: 400000
- Hidróxido de sódio P.A.(Merck), NaOH, PM: 40,0
- Marcadores de tamanho molecular: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
 λ DNA/HindIII (New England Biolabs)
- TRIS (Hidroximetil Amino Metano)(Sigma[®]), $NH_2C(CH_2OH)_3$, PM: 121,14
- Xylene cyanol FF (Serva), PM: 538,6

9.4.2 Composição das Soluções

9.4.2.1 Tampão para eletroforese

Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH 8,0

9.4.2.2 Tampão da Amostra

Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol FF 0,25%

9.4.2.3 Solução de brometo de etídeo

0,5 μ g/mL de brometo de etídeo em água destilada

9.4.2.4 Solução para tratamento do gel para transferência

Solução 1: HCl 0,25M

Solução 2: NaOH 0,5M, NaCl 1,5M

Solução 3: Tris-HCl 0,5M pH 7,5; NaCl 1,5M

9.4.2.5 Solução para lavagem da membrana

SSC20X: NaCl 3M, Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M Para a lavagem da membrana utilizou-se solução SSC2X diluída em água destilada

9.4.3 Material e Equipamentos

- Fonte e cuba horizontal para eletroforese
- Membrana Hybond-N (Amersham Biosciences)
- Papel Whatman 3MM
- Forno Cross-linking, Spectrolinker™ XL-1500 UV crosslinker (Spectronics corporation)

9.5 REAGENTES PARA MARCAÇÃO RADIOATIVA COM RADIOISÓTOPO P³² DE MEMBRANA DE SOUTHERN BLOT (CURRENT PROTOCOLS, 1994)

9.5.1 Reagentes Químicos

- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma[®])
- [α -³²P]-dCTP (Amersham Biosciences)
- Citrato trisódico 2-hidrato (Merck), C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, PM: 294,1
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- DNA de esperma de salmão fita simples (Sigma[®])
- Ficoll (tipo 400) (Sigma[®]), PM: 400000
- Formamida (Sigma[®]), CH₃NO, PM: 45,04
- Kit de marcação Nick Translation System (Invitrogen[®])
- Polyvinylpyrrolidone (Sigma[®]), PM: 360000
- PPO (2,5 diphenyloxazole) (Sigma[®]), C₁₅H₁₁NO, PM: 221,25
- POPOP: (1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene) (Sigma[®]), C₂₄H₁₆N₂O₂, PM: 364,4
- Sodium dodecyl sulfate (SDS), CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, PM: 288,38
- Tolueno (Merck), C₇H₈, PM: 92,14

9.5.2 Composição das Soluções

9.5.2.1 Solução de hibridização Solução de Denhardt:

Ficoll 0,02 % (tipo 400), polivinilpirrolidona 0,02 % e BSA 0,02 % (albumina sérica bovina). Mantida em congelador a – 20 °C.

Solução de hibridização:

SSC 6X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,1 % e DNA de espermatozoides de salmão fita simples 100 µg/mL. Mantida em congelador a – 20 °C.

9.5.2.2 Kit de marcação Nick Translation System

No laboratório foi realizado a incorporação de [α -³²P]-dCTP nas sondas utilizadas. O kit contém os seguintes reagentes:

- dNTP Mix (minus dCTP): 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo dATP, dGTP, dTTP em solução contendo 500 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM MgCl₂, 100 mM 2-mercaptoethanol.
- Pol I/DNase I Mix: 0,5 U/µL DNA Polymerase I, 0,4 mU/µL DNase I em solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM Mg-acetate, 0,1 mM PMSF, e 50% (v/v) glicerol, 100 µg/mL BSA livre de nuclease.
- Tampão Stop: 0,5 M EDTA (pH 8,0)

9.5.2.3 Solução para contagem líquida de cintilação por minuto

0,5% PPO; 0,03% POPOP em tolueno. Foi utilizado 2 mL da solução para cada material marcado radioativamente.

9.5.2.4 Solução para lavagem da membrana

SSC20X: NaCl 3M; Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M Para a lavagem da membrana utilizou-se solução SSC20X diluída em água destilada nas concentrações indicadas abaixo.

- 1ª lavagem: SSC 2X; 0,1% SDS
- 2ª lavagem: SSC 1X; 0,1% SDS
- 3ª lavagem: SSC 0,1X; 0,1% SDS

9.5.3 Material e Equipamentos

- HYBRIDISER HB-1D (Techne) e RED ROLLER II – Hibridization oven (Hofer)
- Cilindros para marcação radioativa
- Filmes de radiografia (X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences)
- Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR (Packard-A, Canberra Company)

9.6 REAGENTES PARA NORTHERN BLOT (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989)

9.6.1 Reagentes Químicos

- Acetato de sódio (Merck), $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, PM: 136,08
- Agarose ultra pura (Invitrogen[®])
- Brometo de etídeo (Sigma[®]), $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$, PM: 394,3
- Citrato trisódico 2-hidrato (Merck), $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PM: 294,1
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl , PM: 58,45
- Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) (Sigma[®]), $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, PM: 162,1
- EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate- Na_2 EDTA.2H₂O) (USB), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PM: 372,24
- Formaldeído (Invitrogen[®]), CH_2O , PM: 30,03
- Marcador de tamanho molecular: RNA Ladder 0.24-9.5 kb (Invitrogen[®])
- MOPS (3-[N-morpholino] propane sulfone acid) (Sigma[®]), $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$, PM: 209,3
- RNA sample loading buffer without ethidium bromide (Sigma[®])

9.6.2 Composição das Soluções

9.6.2.1 Gel desnaturante de agarose 1,2%

Agarose ultra pura, tampão MOPS e formaldeído 18%

9.6.2.2 Tampão MOPS

MOPS 20 mM, acetato de sódio pH 7,5 5 mM e EDTA 1 mM. Mantida a 4 °C.

9.6.2.3 Tampão de corrida comercial

RNA sample loading buffer without ethidium bromide (Sigma[®])

9.6.2.4 Solução de brometo de etídeo

0,5 µg/mL de brometo de etídeo em água destilada

9.6.2.5 Solução para lavagem da membrana

SSC20X: NaCl 3M, Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M Para a lavagem da membrana utilizou-se solução SSC2X diluída em água destilada

9.6.3 Material e Equipamentos

- Fonte e cuba horizontal para eletroforese
- Membrana Hybond-N (Amersham Biosciences)
- Papel Whatman 3MM
- Forno Cross-linking, Spectrolinker[™] XL-1500 UV crosslinker (Spectronics corporation)

9.7 REAGENTES PARA MARCAÇÃO RADIOATIVA COM RADIOISÓTOPO P³² DE MEMBRANA DE NORTHERN BLOT (CURRENT PROTOCOLS, 1994)

9.7.1 Reagentes Químicos

- Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma[®]),
- [α -³²P]-dCTP (Amersham Biosciences)
- Citrato trisódico 2-hidrato, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, PM: 294,1
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- DNA de esperma de salmão fita simples (Sigma[®])
- Ficoll (tipo 400) (Sigma[®]), PM: 400000
- Formamida (Sigma[®]), CH₃NO, PM: 45,04
- Kit de marcação Nick Translation System (Invitrogen[®])
- Polyvinylpyrrolidone (Sigma[®]), PM: 360.000
- PPO (2,5 diphenyloxazole) (Sigma[®]), C₁₅H₁₁NO, PM: 221.25
- POPOP: (1,4-Bis (5-phenyl-2-oxazolyl)benzene) (Sigma[®]), C₂₄H₁₆N₂O₂, PM: 364,4
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB), CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, PM: 288,38
- Tolueno (Merck), C₇H₈, PM: 92,14

9.7.2 Composição das Soluções

9.7.2.1 Soluções para hibridização Solução de Denhardt:

Ficoll 0,02 % (tipo 400), polivinilpirrolidona 0,02 % (Sigma) e BSA 0,02 % (albumina sérica bovina). Mantida em congelador a – 20 °C.

Solução de pré-hibridização:

SSC 5X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,5 %, formamida 50% e DNA de esperma de salmão fita simples 100 µg/mL. Mantida em congelador a – 20 °C.

Solução de hibridização:

SSC 5X, solução de Denhardt 1X, SDS 0,5 %, formamida 50%. Mantida em congelador a – 20 °C.

9.7.2.2 Kit de marcação Nick Translation System

No laboratório foi realizado a incorporação de [α -³²P]-dCTP nas sondas utilizadas. O kit contém os seguintes reagentes:

- dNTP Mix (minus dCTP): 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo dATP, dGTP, dTTP em solução contendo 500 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM MgCl₂, 100 mM 2-mercaptoethanol.
- Pol I/DNase I Mix: 0,5 U/ μ L DNA Polymerase I, 0,4 mU/ μ L DNase I em solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM Mg-acetate, 0,1 mM PMSF, e 50% (v/v) glicerol, 100 μ g/mL BSA livre de nuclease.
- Tampão Stop: 0,5 M EDTA (pH 8,0)

9.7.2.3 Solução para contagem líquida de cintilação por minuto

0,5% PPO; 0,03% POPOP em tolueno. Foi utilizado 2 mL da solução para cada material marcado radioativamente.

9.7.2.4 Solução para lavagem da membrana

SSC20X: NaCl 3M; Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M Para a lavagem da membrana utilizou-se solução SSC20X diluída em água destilada nas concentrações indicadas abaixo.

- 1ª lavagem: SSC 2X; 0,1% SDS
- 2ª lavagem: SSC 1X; 0,1% SDS
- 3ª lavagem: SSC 0,5X; 0,1% SDS

9.7.3 Material e Equipamentos

- HYBRIDISER HB-1D (Techne) e RED ROLLER II – Hibridization oven (Hofer)
- Cilindros para marcação radioativa
- Filmes de radiografia (X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences)
- Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR (Packard-A, Canberra Company)

9.8 REAGENTES PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

9.8.1 Reagentes Químicos

- Acrilamida, C_3H_5NO ultra pura (Invitrogen™), PM: 71,08
- Ácido acético glacial (Merck), CH_3COOH , PM: 60,05
- Álcool metílico (Vetec), CH_3OH , PM: 30,04
- Azul de bromofenol (Sigma®), $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, PM: 670
- Azul de coomassie R-250 (Vetec), $C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$, PM: 826
- β -Mercaptoetanol (Sigma®), $C_2H_6O_5$, PM: 78,13
- Glicerol ultra pura (Invitrogen™), $C_3H_8O_3$, PM: 92,09
- Glicina (Invitrogen™), $C_2H_5O_2N$, PM: 75,07
- IPTG (isopropylthio-1-thio- β -D-galactosideo) (Invitrogen™), PM: 238,3
- Luria Bertani broth (Fisher chemicals)
- Marcador de peso molecular: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™)
- N,N'-Methylene-bis-acrylamide (Promega), $C_7H_{10}N_2O_2$, PM: 154,2
- Persulfato de amônio (United States Biochemical Corporation), $(NH_4)_2S_2O_8$, PM: 288,2
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB), $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, PM: 288,38
- TEMED (N, N, N', N' – tetramethylenediamine) (Sigma®), $C_6H_{16}N_2$, PM: 116,21
- TRIS (Hidroximetil Amino Metano) (Sigma®), $NH_2C(CH_2OH)_3$, PM: 121,14

9.8.2 Composição das Soluções

9.8.2.1 Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 0,5% e água bidestilada

9.8.2.2 Acrilamida

33% Acrilamida e 0,9% N,N'-Methylene-bis-acrylamide Dissolvido em água bidestilada

9.8.2.3 Gel de poliacrilamida

9.8.2.3.1 *Gel de empilhamento*

Acrilamida 33,9% (concentração final 4,7%), Tris-HCl 1 M pH 6,8 120 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.8.2.3.2 *Gel de separação*

Acrilamida 33,9% (concentração final variável), Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 400 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.8.2.4 Tampão de amostra para proteína

Tris-HCl 1M pH 6,8 40 mM, SDS 1%, β -Mercaptoetanol 14,7 M 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%

9.8.2.5 Tampão de corrida para SDS-PAGE

Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%

9.8.2.6 Solução de coloração para gel de poliacrilamida

Azul de coomassie R-250 0,1%, álcool metílico 45%, ácido acético 10% e água destilada 45%

9.8.2.7 Solução de descoloração para gel de poliacrilamida

Álcool metílico 4%, Ácido acético 7,5% e água destilada 88,5%

9.8.3 Material e Equipamentos

- Fonte e cuba vertical para eletroforese
- Agitador horizontal – Incubador Shaker – Innova™ 4080 (New Brunswick Scientific)
- Centrífuga Eppendorf 5415D

9.9 REAGENTES PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE (MÉTODO DA AMERSHAM, PHARMACIA, BIOTECH)

9.9.1 Reagentes Químicos

- Acrilamida, C_3H_5NO ultra pura (Invitrogen™), PM: 71,08
- Azul de bromofenol (Sigma®), $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, PM: 670
- β -Mercaptoetanol (Sigma®), $C_2H_6O_5$, PM: 78,13
- Cloreto de potássio P.A. (Merck), KCl, PM: 74,56
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck), KH_2PO_4 , PM: 136,09
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, PM: 268,07
- Glicerol ultra pura (Invitrogen™), $C_3H_8O_3$, PM: 92,09
- Glicina (Invitrogen™), $C_2H_5O_2N$, PM: 75,07
- Marcador de peso molecular: BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen™)
- N,N'-Methylene-bis-acrylamide (Promega), $C_7H_{10}N_2O_2$, PM: 154,2
- Persulfato de amônio (United States Biochemical Corporation), $(NH_4)_2S_2O_8$, PM: 288,2

- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, PM: 288,38
- TEMED (N, N, N', N' – tetramethylenediamine) (Sigma[®]), $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, PM: 116,21
- TRIS (Hidroximetil Amino Metano) (Sigma[®]), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, PM: 121,14

9.9.2 Composição das Soluções

9.9.2.1 Acrilamida

33% Acrilamida e 0,9% N,N'-Methylene-bis-acrylamide Dissolvido em água bidestilada

9.9.2.2 Gel de poliacrilamida

9.9.2.2.1 *Gel de empilhamento*

Acrilamida 33,9% (concentração final 4,7%), Tris-HCl 1 M pH 6,8 120 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.9.2.2.2 *Gel de separação*

Acrilamida 33,9% (concentração final variável), Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 400 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.9.2.3 Tampão de amostra para SDS-PAGE

Tris-HCl 1M pH 6,8 40 mM, SDS 1%, β -Mercaptoetanol 14,7 M 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%

9.9.2.4 Tampão de corrida para SDS-PAGE

Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%

9.9.2.5 Solução de cloreto de potássio

KCl 100 mM em água bidestilada

9.9.2.6 PBS

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ · 7H₂O 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM
pH 8,0

9.9.3 Material e Equipamentos

- Fonte e cuba horizontal para eletroforese
- Fonte e cuba vertical para eletroforese
- Centrífuga Sorvall[®] RC 5B plus
- Membrana para diálise: Dialysis tubing cellulose (25 mm x 16 mm) (Sigma-Aldrich)

9.10 REAGENTES PARA WESTERN BLOT (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989)

9.10.1 Reagentes Químicos

- Acrilamida, C₃H₅NO ultra pura (Invitrogen[™]), PM: 71,08
- Álcool metílico (Vetec), CH₃OH, PM: 30,04
- Anti-Imunoglobulina G de camundongo e coelho conjugado a enzima fosfatase alcalina 100 mg/ml (Promega)
- Azul de bromofenol (Sigma[®]), C₁₉H₁₀Br₄O₅S, PM: 670
- β-Mercaptoetanol P. A. ((Sigma[®]), C₂H₆O₅, PM: 78,13
- 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphato (BCIP) 50 µg/ml em 100% dimetilformamida (Promega).
- Cloreto de magnésio (Merck), MgCl₂, PM: 95,22
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- Glicerol ultra pura (Invitrogen[™]), C₃H₈O₃, PM: 92,09
- Glicina (Invitrogen[™]), C₂H₅O₂N, PM: 75,07
- Leite desnatado em pó (Molico)

- Marcador de peso molecular: BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen™)
- N,N'-Methylene-bis-acrylamide (Promega), C₇H₁₀N₂O₂, PM: 154,2
- Nitro blue tetrazolium (NBT) 50 µg/mL em 70% dimetilformamida (Promega)
- Persulfato de amônio (United States Biochemical Corporation), (NH₄)₂S₂O₈, PM: 288,2
- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20®) (Sigma®), PM: ~1228
- Poly-L-lysine hydrobromide (Sigma®), p1274, PM: 80000
- Ponceau S (Sigma®), C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄, PM: 760.57
- Sodium dodecyl sulfate (SDS), CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, PM: 288.38
- TEMED (N, N, N', N' – tetramethylenediamine) (Sigma®), C₆H₁₆N₂, PM: 116,21
- TRIS (Hidroximetil Amino Metano) (Sigma®), NH₂C(CH₂OH)₃, PM: 121,14

9.10.2 Composição das soluções

9.10.2.1 Acrilamida

33% Acrilamida e 0,9% N,N'-Methylene-bis-acrylamide Dissolvido em água bidestilada

9.10.2.2 Gel de poliacrilamida

9.10.2.2.1 *Gel de empilhamento*

Acrilamida 33,9% (concentração final 4,7%), Tris-HCl 1 M pH 6,8 120 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.10.2.2.2 *Gel de separação*

Acrilamida 33,9% (concentração final variável), Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 400 mM, SDS 0,1%, Persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07% e água bidestilada

9.10.2.3 Tampão de amostra para SDS-PAGE

Tris-HCl 1M pH 6,8 40 mM, SDS 1%, β -Mercaptoetanol 14,7 M 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%

9.10.2.4 Tampão de corrida para SDS-PAGE

Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%

9.10.2.5 Tampão para transferência

Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, álcool metílico 20% e água bidestilada

9.10.2.6 Corante Ponceau

Ponceau S 0,5% e ácido acético glacial 1%

9.10.2.7 Tampão de bloqueio

PBS, Tween 20 0,05% e Leite desnatado 5%

9.10.2.8 Tampão da enzima fosfatase alcalina

Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM

9.10.3 Material e Equipamentos

-Membrana Hybond™-C Extra (Amersham Biosciences) -Papel Whatman 3MM -Fonte e cuba vertical para transferência -Fonte e cuba vertical para eletroforese - Agitador Orbit Shaker/Lab-line

9.11 REAGENTES PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

9.11.1 Reagentes Químicos

- Anti-Imunoglobulina G de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína 100mg/ml (Promega)

- Anti-Imunoglobulina G de coelho conjugado a isotiocianato de fluoresceína 100mg/ml (Promega)
- Cloreto de potássio P.A. (Merck), KCl, PM: 74,56
- Cloreto de sódio P.A. (Merck), NaCl, PM: 58,45
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (Merck), KH₂PO₄, PM: 136,09
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), Na₂HPO₄.7H₂O, PM: 268,07
- Glicina (Invitrogen™), C₂H₅O₂N, PM: 75,07
- Iodeto de propídeo (Sigma®), C₂₇H₃₄I₂N₄, PM: 668,39
- Paraformaldeído (Sigma®), (CH₂O)_n, PM: 30,03
- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20®) (Sigma®), PM: ~1228
- Poly-L-lysine hidrobromide (Sigma®), PM: 80000 P1274
- Propyl gallate (Sigma®), C₁₀H₁₂O₅, PM: 212,2
- Soro de cabra inativado
- Triton X-100 (Sigma®)

9.11.2 Composição das Soluções

9.11.2.1 PBS

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄. 7H₂O 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM

pH 8,0

9.11.2.2 Solução de glicina

Glicina 0,1 M pH 8,6

9.11.2.3 Solução de bloqueio

Soro de cabra 25%, tween 0,05% em PBS

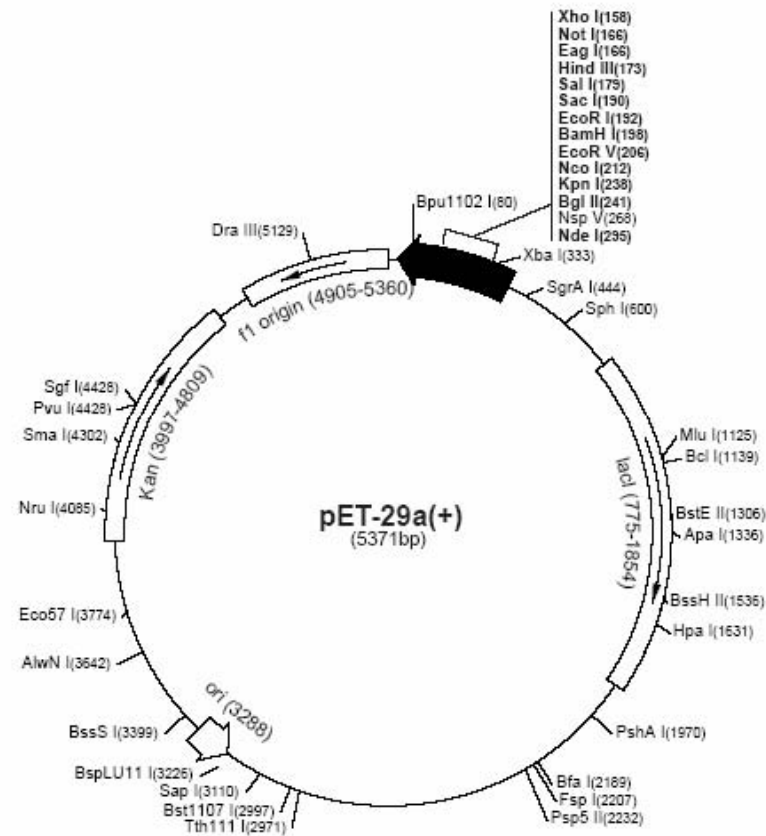
9.11.2.4 Solução de iodeto de propídeo

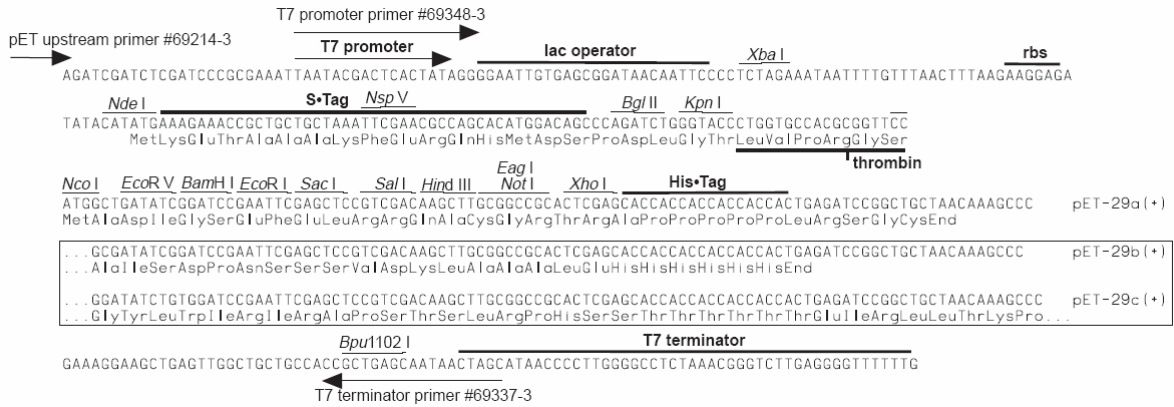
Iodeto de propídeo (100 µg/mL) diluído 10X em PBS

9.11.3 Material e Equipamentos

- Agitador Orbit Shaker/Lab-line
- Lâminas para imunofluorescência e lamínulas
- Microscópio de fluorescência Nikon E600 e a imagem digital capturada pelo programa CoolSNAP PRO cf color – Media Cybernetics®.

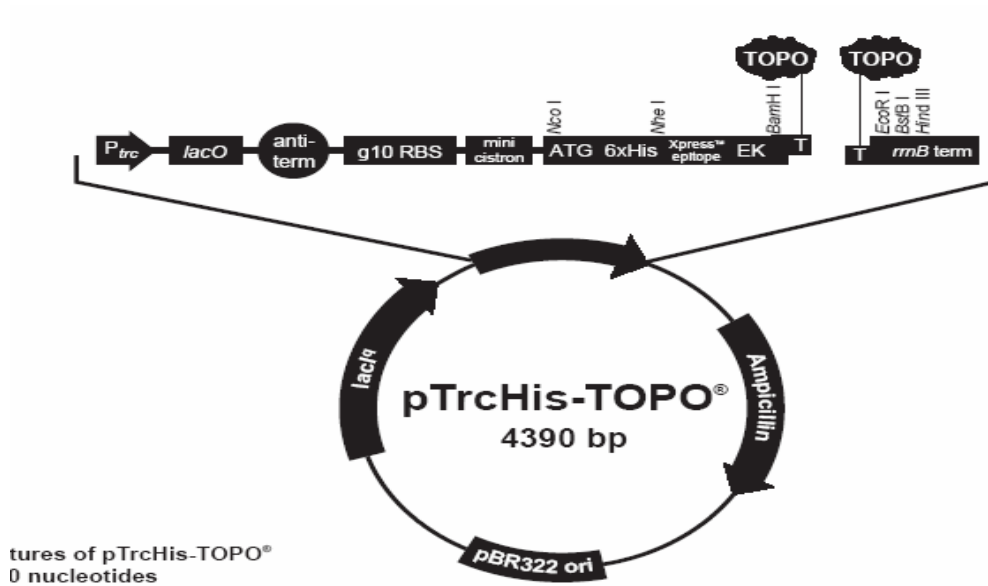
9.12 MAPA DO VETOR pET29B (NOVAGEN)





Fonte: <[http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB076.pdf#search=%22novagen%20pET%2029a-c\(%2B\)%22](http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB076.pdf#search=%22novagen%20pET%2029a-c(%2B)%22)>.

9.13 MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pTRCHIS-TOPO® (INVITROGEN™)



ures of pTrcHis-TOPO®
0 nucleotides

191 ⁻³⁵ TGTTGACAAT TAATCATCCG ⁻¹⁰ GCTCGTATAA TGTGTGGAAAT ^{lac operator (lacO)} TGTGAGCGGA TAACAATTC ACACAGGAAA

261 ^{rrnB antitermination sequence} CAGCGCCGCT GAGAAAAAGC GAAGCGGCAC TGCTCTTTAA CAATTATCA GACAATCTGT GTGGGCACTC

331 ^{gene 10 translational enhancer} GACCGGAATT ATCGATTAAC TTTATTATTA AAAATTAAAG ^{RBS} AGGTATATAT TA ^{Minicistron} ATG TAT CGA TTA
 Met Tyr Arg Leu

395 ^{RBS} AAT AAG GAG GAA TAA ACC ^{Nco I} ATG GGG GGT TCT ^{HisG epitope} CAT CAT CAT CAT CAT CAT ^{6xHis tag} GGT ATG
 Asn Lys Glu Glu *** Met Gly Gly Ser His His His His His His His Gly Met

449 ^{Nhe I} ^{Xpress™ Forward priming site} GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG ^{Xpress™ epitope} GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
 Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp
 EK recognition sequence

503 ^{Bam HI} AAG GAT CCA ACC CTT ^{PCR Product} AAG GCGAATTC ^{Eco RI} ATTCTGAAGCT ^{Bst BI} TGGCTGTTTT ^{HindIII}
 TTC CTA GGT TGG GA A TTC CCGCTTAAGT TAAGCTTCGA ACCGACAAAA
 Lys Asp Pro Thr Leu >>>
 EK cleavage site

551 ^{pTrcHis Reverse priming site} GCGCGATGAG AGAAGATTTT CAGCCTGATA CAGATTAAAT CAGAACGCAG AAGCGGTCTG ATAAAACAGA

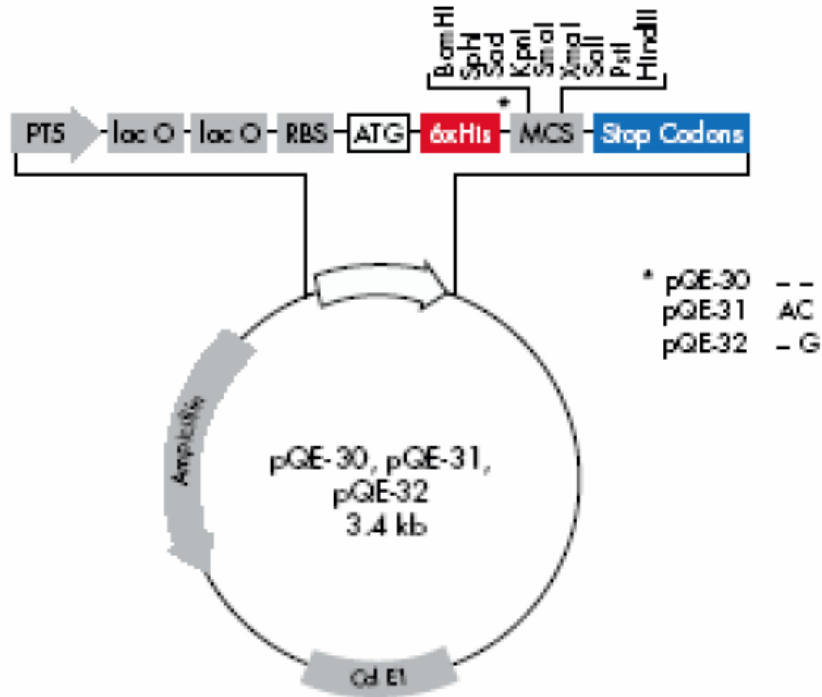
621 ^{rrnB T₁ and T₂ transcription termination sequence} ATTTGCCTGG CGGCAGTAGC GCGGTGGTCC CACCTGACCC CATGCCGAAC TCAGAAGTGA AACGCCGTAG

691 CGCCGATGGT AGTGTGGGGT CTCCCATGC GAGAGTAGGG AACTGCCAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC

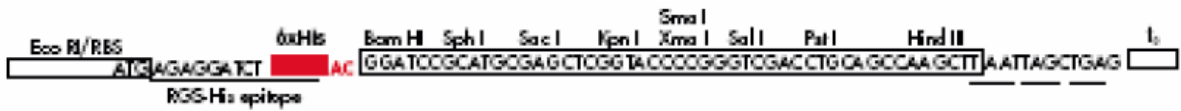
761 TCAGTCGAAA GACTGGGCCT TTCGTTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG TAGGACAAAT

Fonte: <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ptrchistopo_mapvB_web.pdf>
 <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/ptrchistopo_mcs.pdf>

9.14 MAPA DO VETOR pQE31 (QIAGEN)



pQE-31



Fonte: <<http://www.tcd.ie/Genetics/staff/Noel.Murphy/recombinant%20dna%20ge4021/qiagen%20his%20tag.pdf>>