



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

### **Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**JIMENA FERREIRA DA COSTA**

**A EXONUCLEASE XRNA E O METABOLISMO DE mRNA EM *Trypanosoma cruzi***

**Curitiba/PR  
2015**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

### **Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**JIMENA FERREIRA DA COSTA**

**A EXONUCLEASE XRNA E O METABOLISMO DE mRNA EM *Trypanosoma cruzi***

**Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia**

**Orientadoras: Dra. Fabíola Barbieri Holetz  
Dra. Andréa Rodrigues Ávila**

**Curitiba/PR  
2015**

À minha família pelo amor e incentivo sempre presentes em minhas trajetórias e ao meu marido pelo amor, paciência e compreensão em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Fabíola Barbieri Holetz pela orientação, pela paciência em ensinar com seus esquemas e desenhos mesmo quando eu não entendia nada e por todos os dias de bancada quando realizamos experimentos juntas ou até mesmo pelas passadinhas diárias no laboratório para saber sobre o andamento do projeto.

À Dra. Andrea Rodrigues Ávila pela orientação. Agradeço a oportunidade e a confiança que depositou em mim mesmo sabendo da minha pouca experiência em biologia molecular.

À Dra. Kárita Freitas Lidani por ter me apresentado a biologia molecular de tripanossomatídeos ainda na graduação e me incentivado a trabalhar com pesquisa científica.

Aos avaliadores Dr. Alejandro Correia e Dra. Ana Paula Abud pelas dicas e ideias em todas as jornadinhas.

À todos os amigos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Ize, Pri, Amanda, Helena, Haruo, Camila, Bruno, Hálisson, Elisa, Malu, Ju, Mari Sepeloni, Mari Sayuri, Alice e Carol., Dr. Augusto Savio Peixoto Ramos, Dr. Bruno Dallagiovana Muniz, Dra. Lysangela Ronalte Alves, Dra. Sheila Nardeli., Dra. Fabíola Barbieri Holetz e Dra. Andrea Rodrigues Ávila, Dra. Eloise Slompo, Dra. Patrícia Morking, Dra. Saloe Bispo, Dr. Samuel Goldenberg. Por toda a amizade e ajuda em experimentos, ensinamentos e companheirismo dedicados a mim durante o mestrado.

Um agradecimento especial a minha amiga e companheira de bancada Ize Bittencourt pela primeira amizade no mestrado e que se estenderá por toda a minha vida.

Ao pessoal do Lab2 (Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos), pelas explicações sobre vetores de clonagem. Em especial ao Dr. Stênio Perdigão Fragoço pelos ensinamentos sobre vetores, nocaute e *Southern blot*.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular em especial ao Cassiano e a Lia pelas dicas de montagem e preparação de lâminas para imunofluorescência.

Ao pessoal do Laboratório de Células Tronco por toda a ajuda, em especial à Bruna pela grande ajuda com a microscopia de fluorescência.

Ao Nilson, Vanessa, Hellen, Tânia e Silvio pela organização dos materiais necessários aos experimentos, facilitando assim a realização deste trabalho.

Aos meus pais Antonio e Guatacira e irmãos Antonio e Giseane pelo amor e incentivo aos estudos.

Ao meu marido Reginaldo pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo dedicados à mim durante todos esses anos.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”

*Leonardo da Vinci*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Carlos Chagas e suas pesquisas com <i>T. cruzi</i> .....	2
<b>Figura 1.2</b>	Desenho esquemático, baseado em informações obtidas com microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as várias estruturas encontradas em epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	3
<b>Figura 1.3</b>	Células coradas demonstrando os estágios de desenvolvimento encontrados nos tripanossomatídeos. ....	4
<b>Figura 1.4</b>	Ultraestrutura e micrografia eletrônica do <i>T. cruzi</i> .....	5
<b>Figura 1.5</b>	Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	6
<b>Figura 1.6</b>	Visualização do cinetoplasto e a região que emerge o flagelo de uma forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	8
<b>Figura 1.7</b>	Transcrição e processamento de mRNAs em tripanossomatídeos.....	9
<b>Figura 1.8</b>	Representação esquemática do mecanismo de trans- <i>splicing</i> .....	10
<b>Figura 1.9</b>	Estrutura química do <i>cap4</i> .....	11
<b>Figura 1.10</b>	Mapa ribossomal do <i>T. cruzi</i> .....	13
<b>Figura 1.11</b>	Modelo da maturação do mRNA intermediário em <i>T. cruzi</i> . ....	16
<b>Figura 1.12</b>	Esquema do processo e controle do início da tradução em eucariotos. ....	19
<b>Figura 1.13</b>	Mecanismos de degradação de mRNAs em eucariotos.....	22
<b>Figura 1.14</b>	Interação entre grânulos de estresse e <i>P-bodies</i> .....	24
<b>Figura 1.15</b>	Modelo de formação de grânulos de estresse em eucariotos.....	26
<b>Figura 1.16</b>	Modelo de formação de <i>P-bodies</i> em leveduras.. ....	28
<b>Figura 1.17</b>	Modelo de grânulos de RNA em tripanossomas.....	31
<b>Figura 3.1</b>	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para amplificação do gene TcXRNA. ....	44
<b>Figura 3.2</b>	Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen).....	45
<b>Figura 3.3</b>	Esquema dos vetores pTcFLAG e pTcGFP produzidos no Instituto Carlos Chagas.. ....	47
<b>Figura 3.4</b>	Esquema dos cortes realizados pelas enzimas utilizadas no <i>Southern blot</i> .....	51
<b>Figura 3.5</b>	Mapa dos vetores para nocaute em <i>T. cruzi</i> .....	52
<b>Figura 3.6</b>	Esquema da construção dos vetores usados para nocaute de TcXRNA.....	52
<b>Figura 3.7</b>	Mapa do vetor pGEM®-T Easy utilizado nas clonagens. ....	54
<b>Figura 4.1</b>	Análise para determinação do tamanho da sequencia codificadora do gene de TcXRNA e detecção da proteína TcXRNA.....	58
<b>Figura 4.2</b>	Análise por <i>Western blot</i> para verificar a expressão da proteína TcXRNA ao longo da metaciclogênese de <i>T. cruzi</i> .....	59

<b>Figura 4.3</b>	Histograma mostrando a média do número de grânulos que contém a proteína TcXRNA nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato.....	60
<b>Figura 4.4</b>	Localização da proteína TcXRNA durante a metaciclologênese <i>in vitro</i> do <i>T. cruzi</i> .....	61
<b>Figura 4.5</b>	Localização perinuclear da proteína TcXRNA em epimastigota em fase logarítmica de crescimento.....	62
<b>Figura 4.6</b>	Histograma mostrando a média do número de grânulos que contém a proteína TcXRNA nas formas epimastigota, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato com e sem tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina.....	64
<b>Figura 4.7</b>	Histograma do controle da ação das drogas cicloheximida e puromicina, mostrando a média do número de grânulos que contém a proteína TcDHH1 nas formas epimastigota, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato com e sem tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina.....	65
<b>Figura 4.8</b>	Imunolocalização dos grânulos de TcXRNA em epimastigota em fase logarítmica de crescimento.....	66
<b>Figura 4.9</b>	Imunolocalização da proteína TcXRNA nas formas epimastigota em fase logarítmica de crescimento sob estresse nutricional.....	67
<b>Figura 4.10</b>	Imunolocalização da proteína TcXRNA nas formas epimastigota em diferenciação aderidas ao substrato.....	68
<b>Figura 4.11</b>	<i>Western blot</i> da imunoprecipitação de TcXRNA e teste do soro pré-imune....	70
<b>Figura 4.12</b>	Eletroferograma após corrida em eletroforese de capilar dos RNAs obtidos nas réplicas das imunoprecipitações de TcXRNA através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.....	71
<b>Figura 4.13</b>	Controle dos anticorpos secundários Alexa 594 e Alexa 488.....	72
<b>Figura 4.14</b>	Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota em fase logarítmica de crescimento.....	74
<b>Figura 4.15</b>	Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota sob estresse nutricional.....	75
<b>Figura 4.16</b>	Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato.....	76
<b>Figura 4.17</b>	Co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em Tripomastigotas metacíclicos	77
<b>Figura 4.18</b>	Análise da clonagem do gene de TcXRNA no vetor pDONR™221.....	78
<b>Figura 4.19</b>	Análise da clonagem gene da proteína TcXRNA em vetores pTcGFP e pTcFLAG.....	79
<b>Figura 4.20</b>	Análise da expressão da proteína TcXRNA fusionada com as etiquetas GFP e FLAG em linhagens de <i>T. cruzi</i> .....	80
<b>Figura 4.21</b>	Localização celular da proteína TcXRNAGFP e TcXRNAFLAG em <i>T. cruzi</i> .....	81
<b>Figura 4.22</b>	Ensaio de <i>Southern blot</i> .....	82
<b>Figura 4.23</b>	Ensaio de <i>Southern blot</i> .....	83

<b>Figura 4.24</b>	Análise de clonagem das regiões intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> nos vetores pNEO2 e pHygro2.....	84
<b>Figura 4.25</b>	Análise da transfecção para obtenção de parasitas mutantes selecionados com neomicina.....	85
<b>Figura 4.26</b>	Ensaio de <i>Western blot</i> para verificar a expressão da proteína TcXRNA em parasitas mutantes selecionados com neomicina..	86
<b>Figura 4.27</b>	Alinhamento do fragmento de DNA/KO.....	87
<b>Figura 4.28</b>	Alinhamento da intergênica <i>upstream</i> com o genoma de <i>T. cruzi</i> .....	88
<b>Figura 4.29</b>	Alinhamento da intergênica <i>downstream</i> com o genoma de <i>T. cruzi</i> . .....	88



## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 3. 1</b> Concentrações utilizadas para a reação de PCR.....	44
<b>Tabela 3.2</b> Enzimas de restrição utilizadas para digestão do DNA e análise por <i>Southern blot</i> .....	50
<b>Tabela 4.3</b> Sequências gênicas do gene TcXRNA em diferentes cepas disponíveis em banco de dados.....	57
<b>Quadro 3.1</b> Sequências de primers para a produção da sonda para <i>Southern blot</i> e para a confirmação do nocaute. ....	49
<b>Quadro 3.2</b> Sequência de primers para clonagens nos vetores para nocaute.....	53
<b>Quadro 3.3</b> Condições de tratamento dos parasitas para verificar a dinâmica de formação dos grânulos de TcXRNA.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina 5'-trifosfato  
BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato  
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*  
BSA - Albumina sérica bovina  
DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol  
DIC - Contraste por interferência diferencial  
Dm - *Didelphis marsupialis*  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
dNTP - Desoxirribonucleotídeo  
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético  
G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina  
GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)  
GSs - Grânulos de estresse  
GTP - guanosina 5'-trifosfato  
HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico  
IgG - Imunoglobulina G  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
kb - Quilobase; em RNA 1000 nucleotídeos; em DNA 1000 pares de bases de nucleotídeos  
kDa - kilo-Dalton  
kDNA - Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto  
LB - Meio Luria-Bertani  
LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)  
m7G cap - cap 7-metilguanosina  
Mb - mega base  
miRNA - micro RNAs  
mRNA - RNA mensageiro  
mRNP - Complexo ribonucleoprotéico  
NBT - Nitroblue tetrazolium  
NMD - *Nonsense-mediated mRNA decay*  
nt - nucleotídeos  
ORF - Fase aberta de leitura, "open read frame"  
PABP - Proteína ligante à cauda poli(A) (*Poli-A binding protein*)  
PBs - *P-bodies*  
*P-bodies* - corpos de processamento (*Processing bodies*)  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
PGC - polycistronic gene clusters  
PGK - Fofoglicerato Kinase (*phosphoglycerate kinase*)  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PSG - Tampão salina fosfato com glicose (*Phosphate Saline Glucose*)  
RBP - Proteínas de ligação a RNA (*RNA binding proteins*)  
RNA - Ácido ribonucléico  
RNAi - interferência de RNA  
rRNA - RNA Ribossomal  
RT-PCR - transcrição reversa seguida por reação em cadeia pela polimerase  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
SL - splice leader  
SL-RNA - RNA *Spliced-Leader*

snRNA - pequenos RNAs nucleares  
snoRNA - pequenos RNAs nucleolares  
TAU - Meio Urina artificial de Triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)  
TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA  
TRES - transcrição/exportação  
TRIS - Tris-hidroximetil aminometano  
tRNA - RNA transportador  
Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana  
UTR - Região não traduzida (*Untranslated region*)  
WT - Linhagem selvagem (*wild type*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius  
% - Porcentagem  
cm - centímetro  
µg - Micrograma  
µl - Microlitro  
µM - Micromolar  
g - Aceleração de gravidade  
kDa - QuiloDalton  
L - Litro  
M - Molar  
mA – Miliamperagem  
mg – Miligrama  
mL - Mililitro  
mM - Milimolar  
ng - Nanograma  
nm - Nanômetro  
bp - Pares de bases  
pH - Potencial hidrogeniônico  
U - Unidade  
V-Volt

INTITUTO CARLOS CHAGAS

**A exonuclease XRNA e o metabolismo de mRNA em *Trypanosoma cruzi***

RESUMO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Jimena Ferreira da Costa**

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre majoritariamente pelo controle de eventos pós-transcricionais. Dentre estes, mudanças na estabilidade e acesso dos mRNAs à maquinaria de tradução estão diretamente relacionados à adaptação destes parasitas durante o ciclo de vida. Grânulos de mRNA, como os *P-bodies*, e grânulos de estresse, são compostos por mRNPs e responsáveis por regular a expressão de genes. Os grânulos de estresse estão envolvidos na triagem e estocagem de mRNAs, enquanto os *P-bodies* são sítios de estocagem e/ou degradação de diversos transcritos. Em tripanossomatídeos, algumas proteínas marcadoras de grânulos de estresse e *P-bodies* já foram identificadas, entre elas as proteínas DHH1, LSM1-7, SCD6, POP2 e XRNA. Entretanto, a função destes grânulos ainda não foi completamente elucidada. Por exemplo, DHH1 de *T. cruzi* está presente em grânulos de mRNA citoplasmáticos independentes de polissomos e com características semelhantes aos grânulos de estresses e *P-bodies* de leveduras e mamíferos. Por isso, ainda não foi possível definir se estes grânulos participam especificamente da estocagem ou degradação dos mRNAs. Por isso, neste trabalho decidimos investigar a participação da exonuclease TcXRNA e sua relação com grânulos de mRNA em *T. cruzi* para ajudar a definir o papel destes grânulos. Nós verificamos que a proteína TcXRNA, uma exonuclease 5'→3' conservada e considerada uma marcadora de *P-bodies* em leveduras e mamíferos, é constitutivamente expressa ao longo da metaciclogênese do *T. cruzi*. Ela localiza-se principalmente em *foci* citoplasmáticos que variam em número quando as células são submetidas a condições de estresse ou ao tratamento com as drogas que bloqueiam a tradução. Além disso, aparentemente TcXRNA e TcDHH1, tem co-localização parcial em epimastigotas, que é reduzida nas formas em diferenciação do parasita. Verificamos também que a proteína TcXRNA está presente em grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo. Esta localização se assemelha a de grânulos perinucleares de oócitos de *Drosophila*, mas ainda é necessário investigar a relação funcional entre eles. Atualmente, estamos investindo em ensaios de imunoprecipitação seguidos por espectrometria de massas e sequenciamento massivo dos RNAs, utilizando parasitas que expressam a proteína com etiquetas. Assim, pretendemos identificar outras proteínas destes grânulos e os RNAs alvos, para entender melhor o papel destas mRNPs, afinal, os dados obtidos até o momento indicam que os grânulos de TcXRNA são dinâmicos e podem estar envolvidos no metabolismo de mRNA com papel importante no controle da expressão gênica em *T. cruzi*.

INTITUTO CARLOS CHAGAS

**A exonuclease XRNA e o metabolismo de mRNA em *Trypanosoma cruzi***

ABSTRACT

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Jimena Ferreira da Costa**

Regulation of gene expression in trypanosomatids occurs mostly by post-transcriptional events. Some events involve changes in stability or access of mRNAs to translation that are directly related to adaptation of parasites during the life cycle. RNA granules, as p-bodies and stress granules, comprise mRNPs that are responsible for regulating gene expression at post-transcriptional level. Stress granules are involved in sorting and storage of mRNAs, whereas the P-bodies are sites for degradation of several transcripts. In the case of trypanosomatids, some proteins specific of stress granules and P-bodies have been identified, as DHH1, LSM1-7, SCD6, POP2 and XRNA proteins. However, the role of these parasite granules are still not clear. For example, *T. cruzi* DHH1 is in cytoplasmic mRNA granules independent of polysomes that are similar to both stress granules and P-bodies of yeast and mammalian. For this reason, it was not possible to define if DHH1 granules are involved specifically in mRNAs storage or degradation. Therefore, we have decided to investigate the role of the exonuclease TcXRNA and your association with mRNA granules in *T. cruzi* to help in sorting the the role of these granules. We have found that TcXRNA, an exonuclease 5' → 3' conserved and considered a P-body marker in yeast and mammals, is constitutively expressed throughout *T. cruzi* metacyclogenesis. It is localized mainly as cytoplasmic foci that the number is altered when the cells are under stress conditions or drug treatment that blocks the translation. Besides, TcXRNA and TcDHH1 seems to co-localize partially in epimastigotes that is reduced during parasite differentiation. We have observed that TcXRNA is present in cytoplasmic granules around the nucleus. The localization is similar to the perinuclear granules of *Drosophila* oocytes, but it is still necessary to investigate the functional relation between them. At this point, we are putting efforts in immunoprecipitation assays followed by mass spectrometry and highthroughput sequencing of RNAs, using parasites that express the Tagged-protein. Then, we intend to identify other components of these granules and the target RNAs, searching for better understand the functions of those mRNPs. So far, the data indicate the TcXRNA granules are dynamic and might be involved in mRNA metabolism having an important role in controlling the gene expression in *T. cruzi*.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	3
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	4
<b>EPÍGRAFE</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVISTURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> ( <i>T. cruzi</i> ) .....	1
1.2. Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
1.3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.4. Biologia molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
1.4.1. Disposição do genoma.....	7
1.4.2. Transcrição policistrônica e processamento de mRNA.....	8
1.4.3. Tradução em Tripanossomatídeos .....	12
1.5. Controle da Expressão Gênica em Tripanossomatídeos .....	14
1.5.1. Regulação no processamento e exportação de mRNA .....	15
1.5.2. Regulação traducional.....	17
1.5.3. Regulação da expressão gênica através da degradação de mRNA .....	20
1.6. Grânulos de RNA em tripanossomatídeos.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1. Objetivo geral .....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
2.2.1. Avaliar a expressão e a localização celular da proteína TcXRNA durante a metaciclogênese <i>in vitro</i> .....	33
2.2.2. Analisar a composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA .....	33
2.2.3. Produzir linhagens de <i>T. cruzi</i> expressando TcXRNA fusionada às etiquetas GFP e FLAG .....	33
2.2.4. Analisar a estabilidade dos mRNAs em parasitas nocaute para a proteína TcXRNA .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1. Soluções e tampões .....	35

3.2. Meios de cultura .....	36
3.3. Microrganismos.....	36
3.4. Análise da expressão e localização celular da proteína TcXRNA durante a metaciclogênese <i>in vitro</i> .....	36
3.4.1. Ensaio de metaciclogênese <i>in vitro</i> .....	36
3.4.2. Preparação de extrato protéico de <i>T. cruzi</i> Dm28c e análise por <i>Western blot</i> .....	37
3.4.3. Ensaio de imunolocalização .....	38
3.4.4. Ensaio de localização da proteína TcXRNA em parasitas tratados com as drogas puromicina e cicloheximida .....	39
3.5. Analisar a composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA.....	39
3.5.1. Imunoprecipitação do complexo que contém a proteína TcXRNA .....	39
3.5.2. Análise de interação entre as proteínas TcXRNA e TcDHH1 .....	41
3.5.3. Identificação das proteínas no complexo imunoprecipitado contendo TcXRNA por espectrometria de massas .....	41
3.6. Produzir linhagens de <i>T. cruzi</i> expressando TcXRNA fusionada às etiquetas GFP e FLAG.....	43
3.6.1. Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	43
3.6.2. Amplificação do gene de TcXRNA por PCR a partir de DNA genômico .....	44
3.6.3. Purificação do produto de PCR.....	45
3.6.4. Recombinação do gene de TcXRNA no vetor pDONR™221.....	45
3.6.5. Transformação de bactérias cálcio-competentes.....	46
3.6.6. Verificação de clonagem pelo método de palitagem ( <i>Toothpick</i> ).....	46
3.6.7. Propagação e purificação dos vetores contendo o gene de TcXRNA .....	46
3.6.8. Recombinação do gene de TcXRNA nos vetores pTcGFP e pTcFLAG.....	47
3.6.9. Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção de parasitas transfectantes ...	48
3.7. Analise da estabilidade de mRNAs após nocaute da proteína TcXRNA.....	48
3.7.1. Ensaio tipo <i>Southern blot</i> para identificar número de cópias do gene de TcXRNA .....	48
3.7.2. Obtenção de vetores para nocaute da proteína TcXRNA .....	52
3.7.3. Clonagem das regiões intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> em vetor pGEM®-T Easy.....	54
3.7.4. Clonagem das regiões intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> em vetor pNEO2 BlueSK e pHygro2.....	54
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1. Análise da expressão e da localização celular da proteína TcXRNA .....</b>	<b>57</b>
4.1.1. A proteína TcXRNA é composta por 4.326 pares de bases e possui peso molecular de 162,05 kDa.....	57



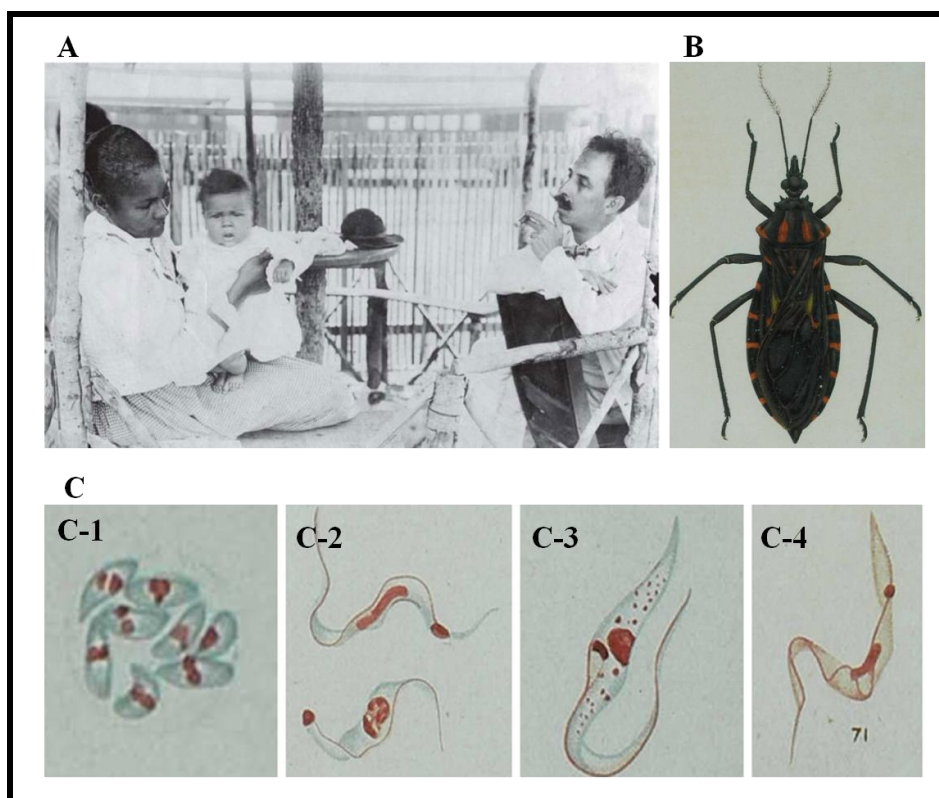
4.1.2. A proteína TcXRNA é constitutivamente expressa e está localizada em <i>foci</i> citoplasmáticos durante a metaciclogênese <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i> .....	58
<b>4.2. Condições que afetam o processo de tradução interferem na dinâmica de formação dos grânulos que contem TcXRNA</b> .....	62
<b>4.3. Análise da composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA</b> .....	69
4.3.1. Imunoprecipitação do complexo contendo TcXRNA e identificação de proteínas por espectrometria de massas .....	69
4.3.2. Sequenciamento em larga escala dos mRNAs associados à TcXRNA .....	71
4.3.3. A proteína TcXRNA co-localiza parcialmente com a proteína TcDHH1 .....	72
<b>4.4. Obtenção de linhagens de <i>T. cruzi</i> mutantes contendo TcXRNA fusionada às etiquetas FLAG e GFP</b> .....	78
<b>4.5. Análise da estabilidade de mRNAs mediante nocaute da proteína TcXRNA</b> .....	81
4.5.1. <i>Southern blot</i> para identificar número de cópias do gene de TcXRNA .....	82
4.5.2. Obtenção de vetores para nocaute da proteína TcXRNA .....	83
4.5.3. Produção de linhagens de <i>T. cruzi</i> para nocaute do gene TcXRNA .....	85
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	89
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	99
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	100
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	101
<b>9. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS</b> .....	112

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) foi descoberto no ano de 1907, quando o então Diretor Geral de Saúde Pública e médico sanitaria Oswaldo Gonçalves Cruz incumbiu ao também médico sanitaria Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, no âmbito da campanha anti-palúdica, a tarefa de investigar uma moléstia que estava acometendo pessoas que viviam na região da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil. Com as pesquisas então desenvolvidas por Carlos Chagas, o mesmo identificou a presença de um inseto hematófago, o qual habitava a residência dos moradores locais. Foi então através de análises de sangue dos moradores, do conteúdo do inseto hematófago e por meio de testes em cobaias animais que Chagas descobriu um novo parasita, o qual morfologicamente se assemelhava aos parasitas do gênero *Trypanosoma*, e Chagas nomeou o parasita como *Trypanosoma cruzi*. Porém, nos ensaios em suas cobaias, Chagas também identificou a presença de formas semelhantes a esquizontes e então, o *T. cruzi* foi renomeado por Carlos Chagas como sendo um novo gênero chamado de *Schizotrypanum cruzi* agente etiológico da Nova Tripanossomíase Americana (Figura 1.1) (Chagas, 1909).

Em 1911, através de uma nota publicada juntamente com o artigo “Nova entidade mórbida do homem”, Carlos Chagas declara o “desaparecimento” do nome *Schizotrypanum* devido às novas pesquisas realizadas na época com outros tripanossomos (citados por Dias, 1939), retornando assim o nome válido para o agente etiológico da Doença de Chagas como sendo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1911).



**Figura 1.1: Carlos Chagas e suas pesquisas com *T. cruzi*.** A: Carlos Chagas observa a menina Rita um dos primeiros casos descritos da Doença de Chagas (Lacerda, 2009), B: *Conorhinus megistus* agente transmissor do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909), C: Esquemas dos parasitas visualizados por Carlos Chagas; C-1: Parasitas no pulmão do vertebrado, C-2: Parasita do sangue humano, C-3 C-4: Parasita presente no intestino do *Conorhinus megistus* (Chagas, 1909).

Atualmente, a Doença de Chagas acomete cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas, sendo que dentre estas, 2 milhões são brasileiras. Além disso, mais de 10 mil pessoas morrem todos os anos pela doença (Jurberg, 2009).

A evolução da infecção por *T. cruzi* pode ocorrer de formas distintas. Cerca de 90% das pessoas infectadas, na fase aguda, podem ter suas manifestações sanadas espontaneamente. Porém se a doença se instalar, no início (fase aguda, cerca de 1-2 semanas após o contágio com o parasita), a maioria dos indivíduos acometidos apresenta-se assintomático, mas caso sintomas existam pode advir de severas miocardites e/ou meningoencefalites. Após a fase aguda, se não houver a cura da doença, esta pode evoluir para a fase crônica apresentando doença cardíaca e/ou digestiva geralmente após 10-30 anos após infecção (Rassi & Marin-Neto, 2010).

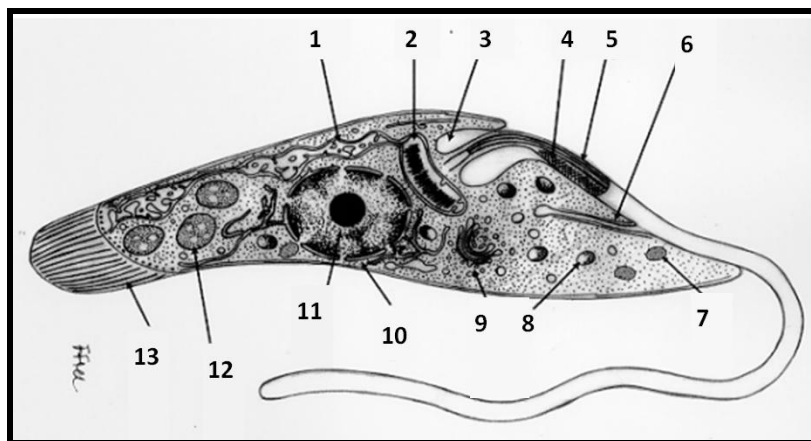
O tratamento da doença de chagas é realizado com as drogas nifurtimox e benzonidazol, as quais apresentam efeito rápido ao tratamento na fase aguda. Porém, na fase crônica elas são ignoradas devido aos indesejáveis efeitos colaterais e baixos índices de cura. Neste cenário, as medidas de contenção da proliferação do inseto vetor e triagem de doadores

de sangue tornaram-se nacional e internacionalmente os principais focos de controle da doença (Jannin & Villa, 2007). Portanto, a Doença de Chagas causa uma grande ameaça para a saúde e desvantagens econômicas para as populações nativas que vivem em países endêmicos, além de ser um grande problema para os viajantes que visitam estas regiões (Zinoviev & Shapira, 2012).

### **1.2. Biologia celular do *Trypanosoma cruzi***

A espécie *Trypanosoma cruzi* compreende um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae advinda da ordem Kinetoplastida (Stevens *et al.*, 2001). A ordem Kinetoplastida é originária do filo Euglenozoa (Simpson *et al.*, 2002), o qual surgiu da primeira linhagem divergente dos eucariotos ancestrais (Cavalier-Smith, 2009).

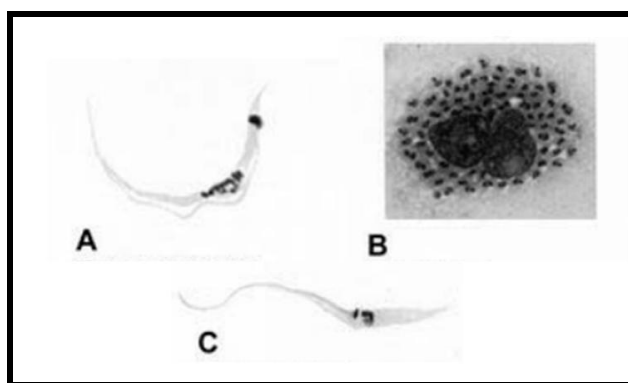
O *T. cruzi* possui organelas que normalmente são encontradas em células eucarióticas, mas algumas outras estruturas especiais os diferem dos demais eucariotos (Brener, 1997), como por exemplo, a presença do cinetoplasto (uma rede de DNA condensada presente na mitocôndria) que está localizado na base do flagelo (Stevens *et al.*, 2001) (Figura 1.2). A mitocôndria é única e tubular, apresentando cristas e DNA que são características típicas dessa organela. Contudo, ao contrário do que acontece nas demais células eucarióticas, o DNA do *T. cruzi* não está distribuído ao longo da mitocôndria, mas, sim se concentra no cinetoplasto (Brener, 1997). Próximo ao cinetoplasto emerge um único flagelo constituído de nove pares de microtúbulos arranjados em um alongado círculo com dois microtúbulos centrais envolvidos por uma membrana celular em toda a sua extensão (Martins *et al.*, 2012). O flagelo é implantado no corpo da célula em uma região chamada bolsa flagelar (Martins *et al.*, 2012), uma invaginação peculiar por onde o parasita ingere nutrientes do meio externo (Brener, 1997).



**Figura 1.2: Desenho esquemático, baseado em informações obtidas com microscopia eletrônica de transmissão, mostrando as várias estruturas encontradas em epimastigota**

**de *T. cruzi*.** (1) mitocôndria, (2) cinetoplasto, (3) bolsa flagelar, (4) haste paraflagelar, (5) axonema, (6) citostoma, (7) glicossoma, (8) acidocalcisome, (9) complexo de golgi, (10) núcleo, (11) nucléolo, (12) reservossomo, (13) microtubulos subpelicular. Imagem adaptada de: (De Souza, 1999).

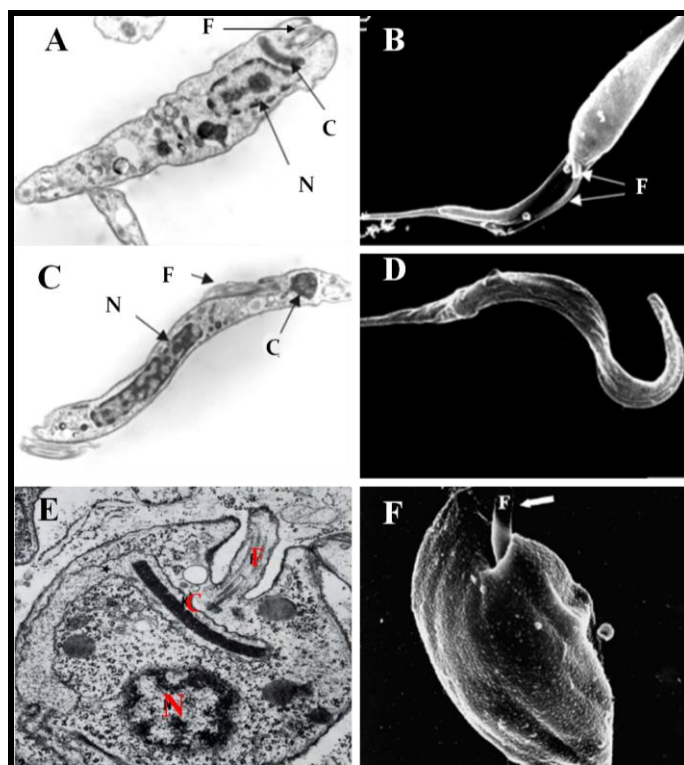
Para se adaptar aos diferentes microambientes de seus hospedeiros, o *T. cruzi* sofre transformações biológicas, que causam mudanças na sua estrutura e metabolismo para viabilizar a infecção (Martins *et al.*, 2012). Assim o *T. cruzi*, como qualquer tripanossomatídeo, assume várias formas durante seu ciclo de vida, diferenciando-se pelo tamanho do flagelo e pela posição do mesmo em relação ao núcleo (De Souza, 2002) (Figura 1.3). O *T. cruzi* pode assumir três formas distintas e bem definidas durante suas mudanças biológicas diferenciando-se em epimastigota, tripomastigota ou amastigota, dependendo do ambiente em que se encontra (Martins *et al.*, 2012).



**Figura 1.3: Células coradas demonstrando os estágios de desenvolvimento encontrados nos tripanossomatídeos.** A – Tripomastigota, B – amastigota e C – epimastigota. Imagem adaptada de: (De Souza, 2002).

Além da disposição do flagelo ao longo do corpo celular, a posição e a forma do cinetoplasto e do núcleo são as principais maneiras de diferenciar as formas do *T. cruzi*. Na forma epimastigota, o núcleo é esférico posiciona-se no meio do corpo celular dividindo a célula em duas porções, região anterior a qual dá continuidade ao flagelo e região posterior a qual é mais alargada e cônica. O cinetoplasto do epimastigota possui a forma discoide e localiza-se na região anterior do corpo celular e está mais próximo ao núcleo (Figura 1.4A-B). O tripomastigota possui a forma mais afilada e o flagelo se conecta a todo o comprimento do corpo celular. O núcleo é alongado e ocupa grande parte de célula e o cinetoplasto apresenta forma circular e encontra-se distante do núcleo e próximo ao polo posterior da célula (Figura 1.4C-D) (Ferreira *et al.*, 2008). A forma amastigota pode variar de esférica à oval, o flagelo pode ser visto extremamente curto ou muitas vezes não é visualizado. Núcleo apresenta-se em forma circular e o cinetoplasto varia entre forma discoide à oval posicionando-se

anteriormente ao núcleo no corpo celular (Figura 4E-F) (Hernández-Osorio *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2011).



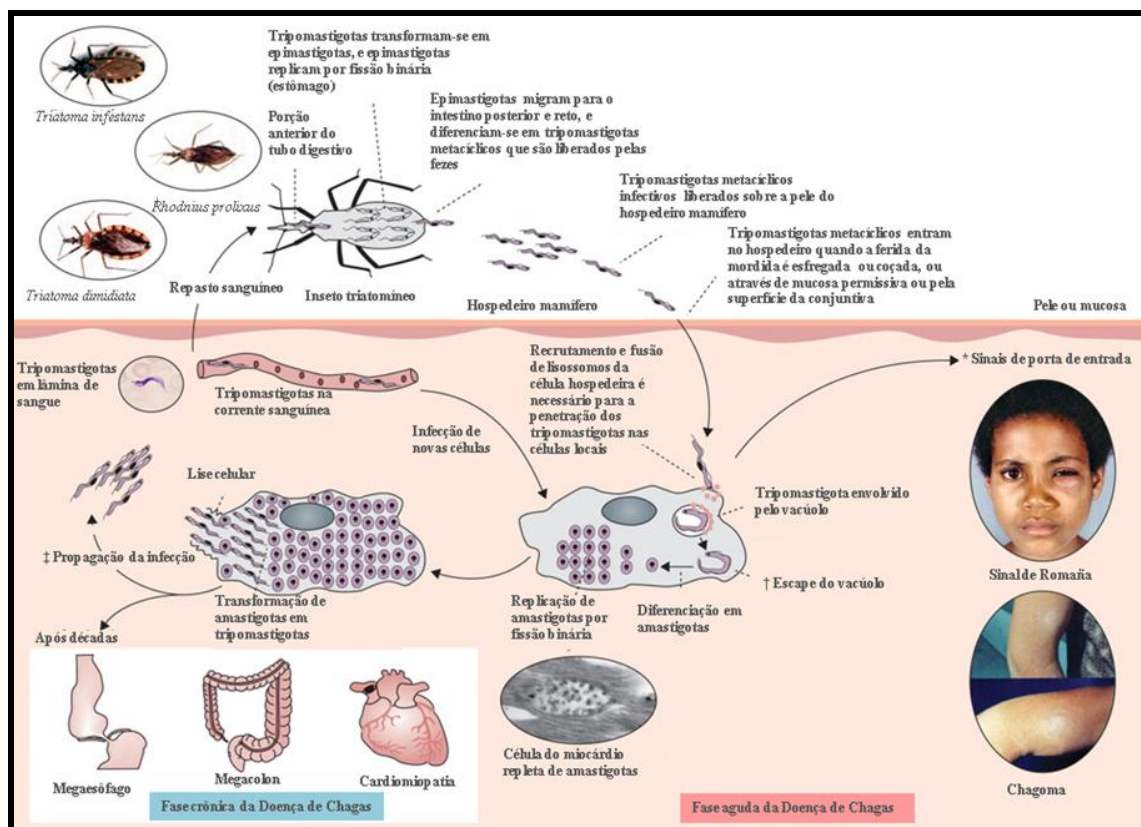
**Figura 1.4:** Ultraestrutura e micrografia eletrônica do *T. cruzi*. A-B: Epimastigota. C-D: Tripomastigota. E-F: Amastigota. F: flagelo; C: cinetoplasto; N: núcleo. Imagens adaptadas de: (E - De Souza, 2002; A-D - Ferreira *et al.*, 2008; F - Nakamura *et al.*, 2005).

### 1.3. Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi

O *T. cruzi* é um protozoário heteroxênico, pois alterna seu ciclo evolutivo entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os vetores do *T. cruzi* são insetos hematófagos da ordem hemíptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Compreendendo essa família estão as espécies *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* os quais são os três mais importantes vetores da transmissão do *T. cruzi* para o homem (Rassi & Marin-Neto, 2010). Como reservatórios naturais deste parasita inclui-se uma série de mamíferos de pequeno e médio porte, tais como marsupiais e roedores, além de alguns carnívoros (Herrera, 2010).

Durante o ciclo, o parasita apresenta quatro estágios distintos (Figura 1.5). No tubo digestivo do inseto, apresenta-se na forma de epimastigota. No intestino do inseto, os epimastigotas se dividem exponencialmente por um processo de fissão binária e podem migrar e aderir às porções posteriores, cujo ambiente é pobre em nutrientes (Kollien & Schaub, 2000). O ambiente com pouco nutriente causa estresse nutricional ao parasita, o qual

é um dos sinais que desencadeia o processo de diferenciação celular de epimastigota em tripomastigota metacíclico (processo denominado metaciclogênese), que é liberado junto com as fezes do inseto vetor. Com a picada, o parasita liberado entra em contato com o sangue do mamífero e infecta células. No interior das células, os tripomastigotas metacíclicos permanecem por algumas horas no interior de um compartimento chamado vacúolo parasitóforo, onde se diferencia em amastigota, com posterior ruptura da membrana do vacúolo. No citoplasma da célula, o parasita inicia o processo de replicação e as novas formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, as quais se movimentam rapidamente e rompem a membrana da célula. O rompimento destas células libera os parasitas na forma de tripomastigotas sanguíneos, que infectam outras células ou podem ser ingeridos por outro inseto, completando o ciclo (De Souza, 1984; Kollien & Schaub, 2000; Rassi & Marin-Neto, 2010).



**Figura 1.5: Transmissão e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.**

\*Penetração na mucosa intacta de olhos por tripomastigotas infectivos leva a uma reação indolor na conjuntiva, com edema de ambas as pálpebras e linfadenite dos gânglios pré-auriculares (Sinal de Romaña). Uma picada em qualquer outra parte da pele pode levar a uma reação no tecido subcutâneo com edema local e endurecimento, congestão vascular, e infiltração celular (Chagoma). †Tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira e são liberados no citoplasma por um mecanismo incomum: tripomastigotas transformam-se em amastigotas que começam a replicação, e quando a célula local está repleta de amastigotas, eles transformam-se novamente em tripomastigotas com crescimento

do flagelo. ‡ Tripomastigotas lisam as células infectadas, invadem tecidos adjacentes, e se espalham através dos vasos linfáticos e na corrente sanguínea para locais distantes, principalmente células musculares (cardíacas, liso e esquelético) e células ganglionares, onde se submetem a novos ciclos de multiplicação intracelular. Imagem adaptada de: (Rassi & Marin-Neto, 2010).

#### **1.4. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi***

##### **1.4.1. Disposição do genoma**

O genoma de *T. cruzi* apresenta-se como nos demais eucariotos, sendo um nuclear e outro mitocondrial.

**O genoma nuclear** é organizado em um grande cluster de genes policistrônicos (PGCs), ou seja, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas dispostos consecutivamente na mesma fita de DNA (Figura 1.7, parte 1) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2009). O conteúdo de DNA e a quantidade de cromossomos pode variar entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (Henriksson *et al.*, 1996). A variabilidade genética encontrada entre as populações de *T. cruzi* permitiu a sua classificação em seis grandes grupos de cepas TcI-TcVI. A cepa CL Brener, a qual está inserida no grupo TcVI (Zingales *et al.*, 2009), é a predominante causa de Doença de Chagas no Cone Sul da América Latina (Zingales *et al.*, 2012). Esta cepa foi sequenciada em 2005 por El-Sayed e colaboradores. Neste trabalho, foi estimado que o genoma diploide desta cepa continha entre 106,4 a 110,7 Mb e o genoma haploide em torno de 55 Mb apresentando 12.000 genes codificantes de proteínas (El-sayed *et al.*, 2005). As cepas Sylvio X10/1 e Dm28c, as quais fazem parte do grupo TcI (Zingales *et al.*, 2009) também estão envolvidas com a Doença de Chagas principalmente na Amazônia Brasileira, Venezuela, Colômbia e América Central tanto em ciclos domésticos como silvestres (Zingales *et al.*, 2012). Recentemente essas cepas foram sequenciadas e, foi estimado que contivessem cerca de 44 Mb e 27 Mb respectivamente (Franzén *et al.*, 2011; Grisard *et al.*, 2014).

**O DNA mitocondrial** constitui-se em uma complexa rede de moléculas circulares que ao todo formam o cinetoplasto (kDNA) (Figura 1.6) (Brener, 1997). Ao contrário dos outros eucariotos, os quais apresentam cerca de 1% do DNA celular dentro da mitocôndria, o *T. cruzi* pode concentrar entre 16 a 30 % do seu DNA total no genoma mitocondrial. O cinetoplasto apresenta-se como uma rede de círculos monoméricos (Lukeš *et al.*, 2002), essa rede é composta por aproximadamente 5.000 a 20.000 minicírculos e 50 cópias de maxicírculos por rede. A principal função dos maxicírculos é codificar enzimas da cadeia respiratória como ATPase e citocromo oxidase, enquanto que os minicírculos parecem codificar RNAs guias (gRNA) requeridos para a edição de RNA mitocondrial (Martins *et al.*,



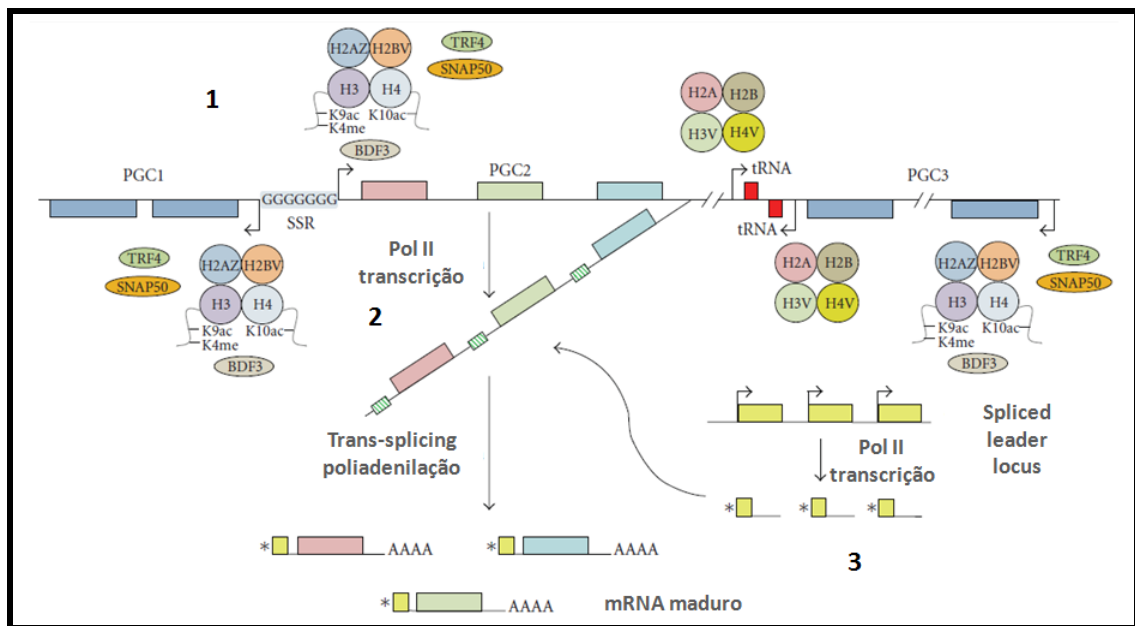
2012). A edição de RNA é um processo que consiste na modificação pós-transcricional de RNA mensageiros (mRNAs) transcritos pelos genes contidos nos maxicírculos. Essas modificações incidem na inserção ou deleção de uridinas para a formação de um mRNA funcional (Lukeš *et al.*, 2002).



**Figura 1.6: Visualização do cinetoplasto e a região que emerge o flagelo de uma forma epimastigota de *T. cruzi*.** Fonte: (De Souza, 2002).

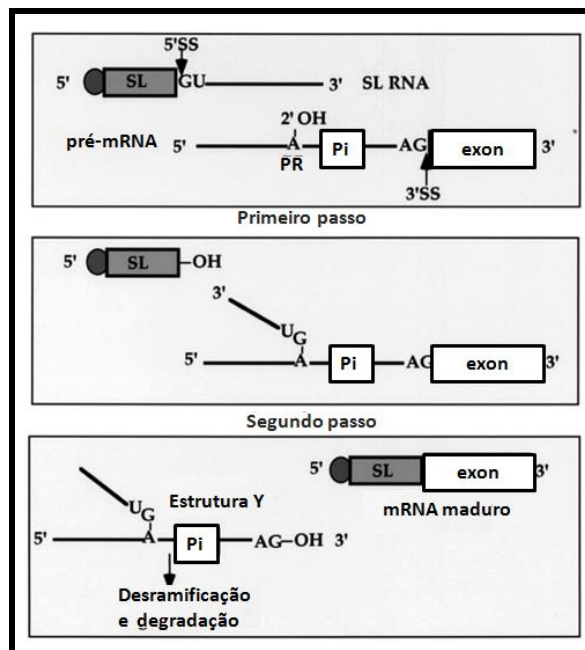
#### **1.4.2. Transcrição policistrônica e processamento de mRNA**

Conforme foi mencionado no item anterior, a disposição do genoma do *T. cruzi* é organizada em sequências policistrônicas e, na ausência de íntrons, o transcrito é produzido em uma única molécula de RNA igualmente com característica policistrônica (Figura 1.7, parte 2). Essas moléculas de RNA policistrônicas podem albergar informações gênicas para diferentes vias metabólicas, ao contrário do que ocorre nos procariotos. As moléculas de pré-mRNAs são processadas no núcleo para que se tornem traduzíveis através de eventos conhecidos como *trans-splicing* e poliadenilação (Figura 1.7, parte 3) (Vanhamme & Pays, 1995).



**Figura 1.7: Transcrição e processamento de mRNAs em tripanossomatídeos.** 1: Parte superior da figura representa um cromossomo hipotético com três agrupamentos de genes policistrônicos (PGC1-3). Pol II inicia a transcrição a montante do primeiro gene do PGCs (setas). A região de troca de fitas (*strand switch regions* - SSR) está representada entre PGC1 e PGC2. Os nucleossomos estão localizados próximos às regiões de iniciação da transcrição. Pol II transcrição de alguns PGCs termina perto de genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) (entre PGC2 e PGC3). 2: A transcrição de um PGC produz um transcrito primário (mostrada apenas para PGC2) que é processado por *trans-splicing* e poliadenilação para gerar o maduro mRNAs. 3: Parte inferior da figura apresenta o *trans-splicing*, uma sequência líder de RNA (SL RNA - *Spliced leader*) (caixa amarela) é adicionada à extremidade 5' de cada mRNA. No locus do *spliced leader* (localizado num cromossomo diferente) cada gene possui uma região promotora para Pol II (setas). O *cap* no SL RNA é indicado por um asterisco no final 5' do RNA. O transcrito policistrônico contém regiões ricas em pirimidinas (indicado por uma caixa listrada nas regiões intergênicas) que são necessárias para ambos *trans-splicing* e poliadenilação. Os quatro As localizados na extremidade 3' dos mRNAs maduros representam a cauda poli-A. Imagem adaptada de: (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997).

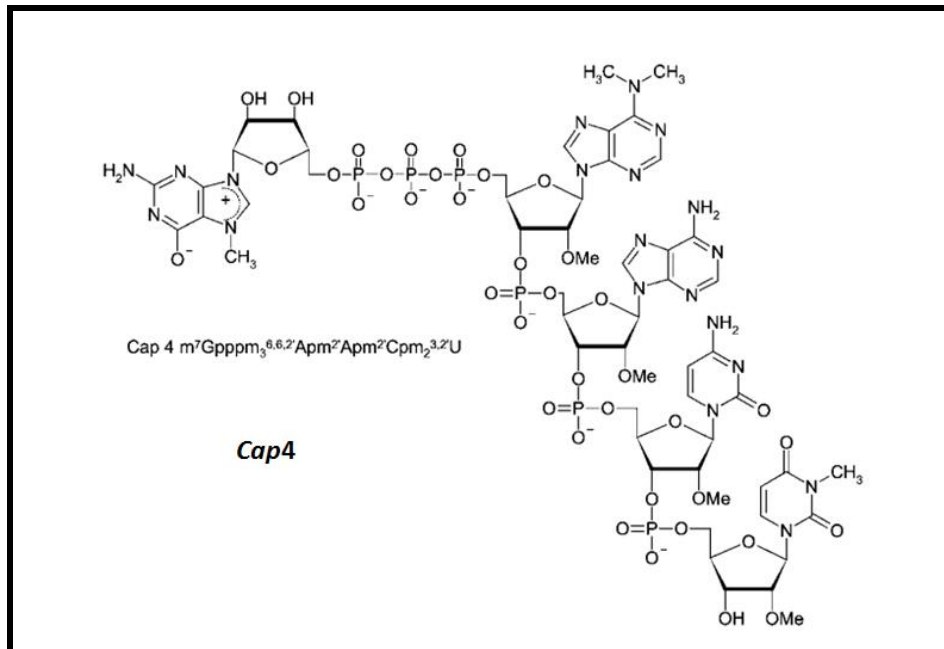
**Trans-splicing** é um processo que adiciona uma sequência conservada de 39 nucleotídeos, chamada *miniéxon* ou *splicing leader* (SL), no final 5' do mRNA. Igualmente ao *cis-splicing*, o *trans-splicing* ocorre via duas reações de transesterificação. Participam desse processo duas moléculas de RNA codificadas por genes situados em locais diferentes no genoma (razão do nome *trans-splicing*), e envolve a formação de uma estrutura Y ao invés de um laço intermediário (Figura 1.8) (Liang *et al.*, 2003). Um dinucleotídeo AG na extremidade 3' do SL e uma região rica em pirimidina presente na molécula de mRNA são as mais conservadas sequências necessárias para este processo (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997).



**Figura 1.8: Representação esquemática do mecanismo de trans-splicing.** O sítio de *splice* GU presente na porção 5' do SL RNA e o sítio de *splice* AG na porção 3' do pré-mRNA estão indicados por setas. PR, é o ponto de ramificação; Pi, é a região rica em pirimidina. Imagem adaptada de: (Liang *et al.*, 2003).

As **RNA polimerases** nucleares envolvidas na transcrição de RNAs em tripanossomatídeos são as mesmas descritas para eucariotos superiores, ou seja, RNA pol I, RNA pol II e RNA pol III (Das *et al.*, 2008; Palenchar & Bellofatto, 2006). Existe também uma RNA polimerase mitocondrial (mtRNAP), responsável pela transcrição do cinetoplasto (Grams *et al.*, 2002). A RNA pol I transcreve os genes para RNAs ribossômicos (rRNA); a RNA Pol II transcreve genes que serão traduzidos em proteínas e a RNA pol III transcreve pequenos RNAs como, por exemplo, RNA transportador (tRNA). Para as RNAs pol I e pol III já existem promotores conhecidos (Laufer & Günzl, 2001; Laufer *et al.*, 1999). Porém, para RNA pol II só existe o conhecimento do promotor para transcrição da SL RNA, ou seja, ainda não foram caracterizados promotores para RNA pol II para outros genes (Palenchar & Bellofatto, 2006). Essa ausência de promotores clássicos para RNA pol II sugere que o início da transcrição não parece ser uma condição limitante na taxa de produção de mRNAs. Um dos meios descritos para a transcrição pela RNA pol II seria através da região de troca de fitas ou *strand switch region* – SSR (Figura 8), a qual seria responsável por direcionar este evento. Nas extremidades dessa região encontram-se dois conjuntos de genes, os quais seriam codificados e transcritos em sentidos opostos e, a transcrição finalizaria ao final do grupo policistrônico, quando o mesmo encontrasse genes para tRNA, rRNA ou pequenos RNAs nucleares (snRNA) (revisado por Palenchar & Bellofatto, 2006).

A **estrutura cap** é importante para a tradução da maioria dos mRNA e também está envolvida na estabilização das moléculas de mRNA contra a ação de exonucleases (Cowling, 2010). Diferentes tipos *cap* são encontrados nos mRNAs e, são classificados de acordo com as modificações por metilação na guanosina e nos nucleotídeos adjacentes dos mRNAs. Estruturas *cap* com metilação na guanosina podem ser: (a) com uma metilação - m<sup>7</sup>GpppN; (b) com duas metilações – m<sup>2,7</sup>GpppN; (c) com três metilações – m<sup>2,2,7</sup>GpppN e (d) com metilação no grupo fosfato – mpppN. As estruturas *cap* com metilações nos nucleotídeos adjacentes podem ser classificadas em: *cap0*, *cap1*, *cap2* e *cap4*. Nos mRNAs de eucariotos como leveduras e mamíferos o *cap2* está presente e, em tripanossomatídeos é característico a presença do *cap4* (Figura 1.9) (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1992). Em *Trypanosoma brucei* e *Crithidia fasciculata* foi visto que na porção 5' do SL o resíduo m<sup>7</sup>GTP adicionado é seguido por quatro nucleotídeos metilados, duas metilações na primeira adenosina e quarta uridina formando a estrutura 7-metilguanosina(5')-ppp(5')-n<sup>6</sup>,n<sup>6</sup>,2'-O-trimetiladenosina-p-2'-O-metil-adenosina-p-2'-O-metilcitosina-p-n<sup>3</sup>-2'-O-dimetiluridina. Estas metilações nas bases são únicas para tripanossomatídeos, e não são conhecidos em qualquer outro grupo de eucariotos. (Bangs *et al.*, 1992; Mair *et al.*, 2000 e revisado por Zinoviev & Shapira, 2012).



**Figura 1.9: Estrutura química do cap4.** A imagem demonstra as metilações nos quatro nucleotídeos adjacentes a guanosina. Imagem adaptada de: (Lewdorowicz & Yoffe, 2004).

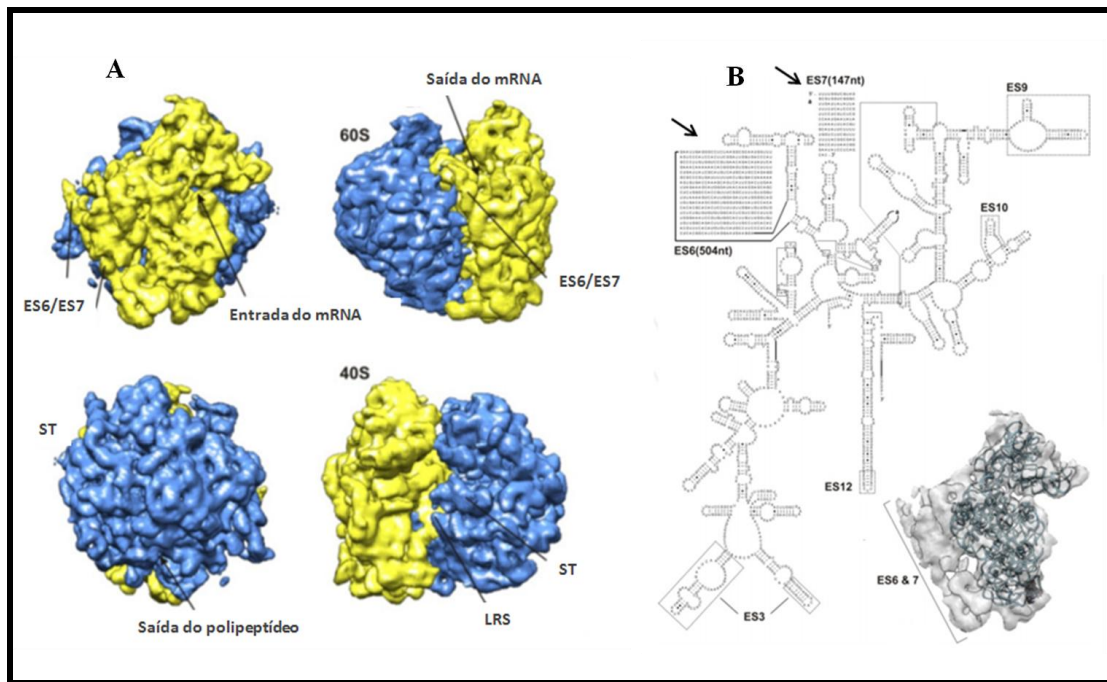
A **poliadenilação** em tripanossomatídeos, é um evento que parece estar acoplado ao processamento em trans e à clivagem da região 3' (LeBowitz & Smith, 1993). Os sítios de poliadenilação estão localizados de 100 a 300 nucleotídeos antes do sítio de trans-*splicing* do

mRNA subsequente presente no precursor policistrônico. Ao que parece, estas são as mesmas sequências polipirimidínicas que servem como sinais para o *trans-splicing* e que também parecem funcionar na sinalização da poliadenilação, uma vez que não se tem o conhecimento de sinais típicos para esse evento (Clayton, 2002).

### 1.4.3. Tradução em Tripanossomatídeos

O processo de tradução em tripanossomatídeos ainda não está bem elucidado. Porém, várias evidências justificam a importância de futuros estudos sobre a maquinaria de síntese proteica em tripanossomatídeos. Características até o momento descritas para a maquinaria de tradução em tripanossomas sugerem fortemente que a iniciação da síntese de proteínas pode ser diferente e específica nesses protozoários (Ayub *et al.*, 2012).

Em um estudo de crio-microscopia eletrônica, Ayub e colaboradores (2012), construíram o mapa do ribossomo 80S do *T. cruzi*. Neste trabalho foi observada claramente a presença de ambas as subunidades ribossomais: a pequena unidade 40S e a grande unidade 60S (Figura 1.10A). Além disso, foram identificadas diferentes características do ribossomo 80S de *T. cruzi* quando comparadas com levedura, tanto as pequenas como as grandes subunidades ribossomais de *T. cruzi* são maiores, principalmente em função do tamanho das moléculas de RNA ribossomal. *T. cruzi* rRNA (18S rRNA: 2.315 nt e 28S rRNA: 4.151 nt) sendo um quinto maior que o rRNA de levedura (18S rRNA: 1.798 nt; 25S rRNA: 3.392 nt) em número total de nucleotídeos. Outra característica foi a aparência expandida da subunidade 40S, a qual foi atribuída a dois segmentos de expansão ES6 e ES7 do rRNA 18S (Figura 1.10B). Quanto às proteínas ribossomais, foi visto também que as proteínas de *T. cruzi* são maiores quando comparadas com as de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e que essas extensões são geralmente nas extremidades da região amino-terminal ou carboxi-terminal (Ayub *et al.*, 2012).



**Figura 1.10: Mapa ribossomal do *T. cruzi*.** A: Crio-microscopia eletrônica do ribossomo 80S. Azul: subunidade maior. Amarelo: subunidade menor. ST: stalk. LRS: laço ricina sarcina. ES6/ES7: segmentos de expansão (conferem aparência expandida). B: Estrutura secundária do rRNA 18S com os característicos segmentos de expansão (ES). As setas indicam os segmentos de expansão ES6 e ES7 que conferem aparência expandida à subunidade 40S. Abaixo na figura está representada a subunidade 40S de *T. cruzi* sobreposta com a cristalização do rRNA 18S de *S. cerevisiae*. O volume ocupado por ES6/ES7 está indicado. Imagem adaptada de: (Ayub *et al.*, 2012).

Outra estrutura importante para a tradução de proteínas em eucariotos é o *cap*, pois após o mRNA ser transportado do núcleo para o citoplasma, ele deve ser reconhecido pela maquinaria de tradução para que este processo se inicie e, este reconhecimento é feito através de proteínas de início da tradução (complexo eIF4F) quando encontram a estrutura *cap* (Pestova *et al.*, 2001). Conforme foi dito anteriormente, a estrutura *cap* dos mRNAs de tripanossomatídeos é diferente da estrutura *cap* de mRNAs de outros eucariotos, portanto não se pode presumir que o processo de tradução seja o mesmo em tripanossomatídeos. Dados que reforçam a ideia de que o processo de início da tradução em tripanossomas tenha características únicas mostram que muitas proteínas homólogas em tripanossomatídeos para os fatores de início da tradução de outros eucariotos não apresentam a mesma especialidade funcional (revisado por Ayub *et al.*, 2012). No entanto, não se pode descartar a atuação do *cap4* juntamente com a SL na tradução. Como vimos no item anterior, a SL dos tripanossomatídeos recebe quatro metilações nos nucleotídeos da região 5', a qual é a característica do *cap4*. Em um estudo, Zamudio e colaboradores (2009) ao produzirem cepas de *T. brucei* nocaute para proteínas 2'-O-ribose metil transferases, responsáveis pela biogênese do *cap4*, verificaram que a síntese de proteínas diminuía, mostrando assim o papel dessas

modificações no processo de tradução (Zamudio *et al.*, 2009). Outro estudo realizado em tripanossomatídeos mostrou que mutações na SL abrangendo os nucleotídeos 10-29 levou a diminuição da associação dos mRNAs ao polissomos, indicando que a SL contém determinantes para que essa associação ocorra (Zeiner *et al.*, 2003).

Algumas isoformas dos fatores de tradução já foram identificadas em tripanossomatídeos, por exemplo: eIF4A em *T. brucei* e *Leishmania* (revisados por Zinoviev & Shapira, 2012); eIF4E1-4 em *Leishmania major* (*L. major*) (Yoffe *et al.*, 2006); eIF4E1-6 em *T. brucei* (Freire *et al.*, 2011, 2014); eIF4G e eIF4F em *Leishmania* (revisado por (Yoffe *et al.*, 2009) e proteínas de ligação a cauda poli(A) – PABPs em *L. major* (Costa Lima *et al.*, 2010), *T. brucei* (revisado por Clayton & Shapira, 2007) e *T. cruzi* (Clayton, 2002). Uma característica peculiar de fatores de início da tradução foi identificada em *T. brucei*. Neste parasita foram identificadas características distintas entre fatores homólogos de início da tradução. Dentre as proteínas estudadas eIF4E3 e eIF4E4 parecem atuar na tradução, ambas são proteínas citoplasmáticas, abundantes e possuem uma característica semelhante entre si, apresentam uma longa região amino-terminal com mais de 150 aminoácidos. No entanto, algumas propriedades diferentes foram vistas entre ambas as proteínas. A proteína eIF4E3 não se liga fortemente ao *cap* quando comparada com eIF4E4, o que sugere que eIF4E3 necessite de algum co-fator para se ligar ao mRNA. Além disso, a proteína eIF4E4 interage somente com o fator de início da tradução eIF4G3 e a proteína eIF4E3 interage com os fatores eIF4G3-4. Todas essas características levam a crer que existem dois complexos eIF4F que atuam de formas independentes no início da tradução, as quais podem ser direcionadas para a tradução de diferentes grupos de mRNAs (Freire *et al.*, 2011).

### **1.5. Controle da Expressão Gênica em Tripanossomatídeos**

Muitos tripanossomatídeos, os quais podem ser patogênicos para animais, também se replicam em um hospedeiro invertebrado. Para se adaptarem aos diferentes microambientes, alterações na expressão de genes são requeridas (Clayton & Shapira, 2007).

Os tripanossomatídeos possuem características especiais, as quais não estão presentes em outros eucariotos, como por exemplo, as fases de leitura aberta (ORFs) arranjadas em longas sequências policistrônicas; a transcrição de pré-mRNAs em unidades policistrônicas, as quais, os cístrons não estão associados a uma mesma via metabólica; o processamento de mRNAs em unidades individuais por *trans-splicing* e poliadenilação (Liang *et al.*, 2003) e o não conhecimento até o momento de sequências promotoras típicas para transcrição de genes codificadores de proteínas (Clayton & Shapira, 2007). Todas essas peculiaridades dos tripanossomatídeos faz com que se acredite que a regulação da expressão gênica seja exercida

predominantemente em nível pós-transcricional (Clayton & Shapira, 2007). Assim, o processamento de mRNAs, a estabilidade e a tradução servem como mecanismos fundamentais que direcionam o programa de expressão diferencial dos genes ao longo do ciclo de vida do parasita (Zinoviev & Shapira, 2012).

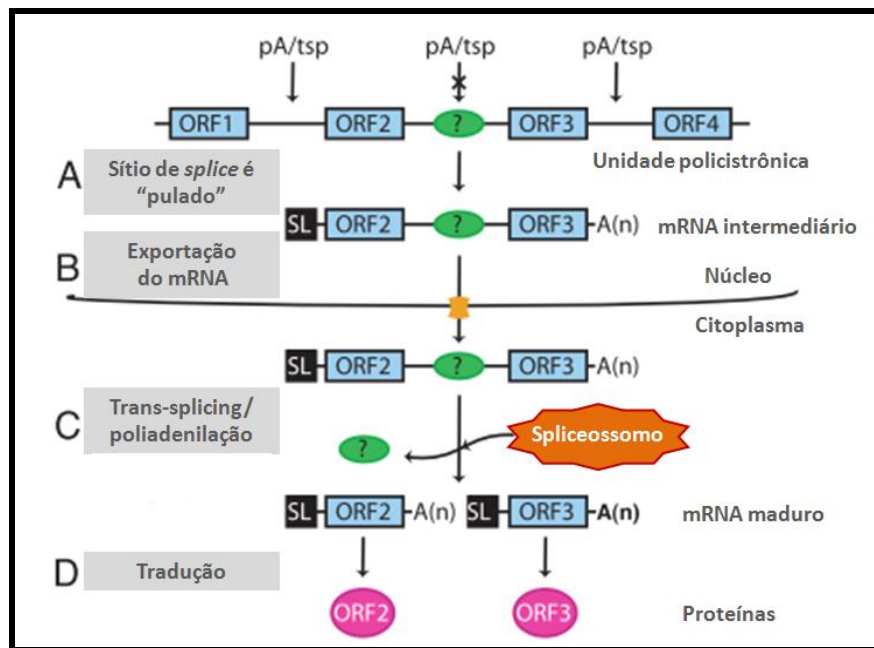
### **1.5.1. Regulação no processamento e exportação de mRNA**

Até o momento, pouco se sabe acerca do processo de regulação da expressão gênica **em nível de processamento de mRNA**, o qual inclui os eventos de *trans-splicing* e poliadenilação (Clayton & Shapira, 2007). Alguns estudos, os quais serão descritos na sequência, apontam eventos que podem estar relacionados com a regulação no processamento de mRNA em tripanossomatídeos.

Um dos estudos foi realizado por Kapotas e Bellofatto em 1993. Neste estudo os autores propuseram que diferenças no *splicing* podem estar relacionadas com a especificidade da interação entre o miniéxon e o sítio acceptor de *splicing* 3' (SAS) contido no pré-mRNA. Assim, os autores analisaram a influência do *trans-splicing* no padrão de expressão dos mRNA das proteínas fosfoglicerato quinase (PGK - PGK A, PGK B e PGK C) em *T. brucei*, uma vez que, esses mRNAs são transcritos na mesma unidade policistônica. Ao final, foi verificado que houve diminuição nos níveis de expressão do mRNA de PGK A e, essa redução da expressão poderia estar relacionada à baixa eficiência de adição do miniéxon ao sítio SAS devido a uma diferença no padrão da sequência polipirimidinica que antecede PGK A no pré-mRNA (Kapotas & Bellofatto, 1993).

Em 2007 Jäger e colaboradores, mostraram em *T. cruzi* que alguns sítios de *trans-splicing*/poliadenilação podem ser ignorados, ou “pulados”, durante o processamento normal do pré-mRNA (Figura 1.11). Como consequência, as unidades dicistônicas e/ou monocistônicas ficariam com longas regiões 3' não traduzíveis (3'UTRs) e que estes transcritos não excisados poderiam ser transformado posteriormente em mRNAs maduros pelos eventos convencionais de *trans-splicing*/poliadenilação que levam a tradução. Além disso, eles também identificaram uma proteína do tipo motivo de reconhecimento de RNA, homóloga à proteína de mamíferos de ligação a polipirimidina, a qual interagiu com um dos RNAs parcialmente transformados. Com isso, os autores propuseram que esse “salto” no sítio de *Splice* pode ser parte de um mecanismo pós-transcricional para regular a expressão de genes em tripanossomas, através da geração de moléculas de RNA prematuras não traduzíveis (Jäger *et al.*, 2007).





**Figura 1.11: Modelo da maturação do mRNA intermediário em *T. cruzi*.** Dois passos de *trans-splicing* e poliadenilação geram mRNA monocistrônicos funcionais. pA: sítio de poliadenilação. tsp: sítio de *trans-splicing*. Imagem adaptada de: (Jäger *et al.*, 2007).

Recentemente, Gupta e colaboradores (2014) ao realizarem a depleção por RNAi de duas proteínas de fatores de splicing, TSR1 e TSR1IP, em *T. brucei*, verificaram mudanças nos níveis de mRNA, sugerindo que essas proteínas poderiam ter um papel na regulação de mRNA. Além disso, ao analisarem o complexo proteico ao qual estão inseridas essas proteínas, eles sugeriram que esses fatores teriam alguma função na estabilidade de mRNAs (Gupta *et al.*, 2014).

**A regulação da exportação de mRNA** a partir do núcleo para o citoplasma pode ser um evento pós-transcricional adicional envolvido na regulação de genes. No entanto, o conhecimento sobre a exportação de mRNA em tripanossomas é muito limitado. Embora fatores de exportação em eucariotos sejam conservados, apenas alguns ortólogos foram identificados no genoma dos tripanossomatídeos (Dostalova *et al.*, 2013).

Em 2005 Cuevas e colaboradores descreveram um fator de exportação nuclear em *T. cruzi* nomeado TcCRM1, o qual é semelhante a proteína CRM1 de eucariotos superiores. Neste trabalho foi visto que a proteína TcCRM1 contém a região conservada central (CCR) que interage com sequências de sinais de exportação nuclear (NES), presentes nas moléculas a serem transportadas, e com o resíduo de cisteína envolvido na ligação covalente ao metabolito leptomicina B, o qual inibe a CRM1 e bloqueia a exportação nuclear. Ao tratarem as células com este inibidor, observaram um acúmulo parcial de RNA poli(A) no núcleo, além da redução nos níveis de alguns mRNA, sugerindo assim a presença de uma rota de exportação de mRNAs neste parasita (Cuevas *et al.*, 2005).

Serpeloni e colaboradores (2011) caracterizaram funcionalmente a proteína TcSub2, a qual faz parte do complexo TREX de exportação de mRNAs em *T. cruzi*. Através de experimentos de RNAi, os autores demonstraram que a depleção da proteína TcSub2 promove o acúmulo de mRNA no núcleo e a diminuição dos níveis de tradução, indicando seu papel como componente da via de exportação/transcrição de mRNAs em tripanossomatídeos (Serpeloni *et al.*, 2011).

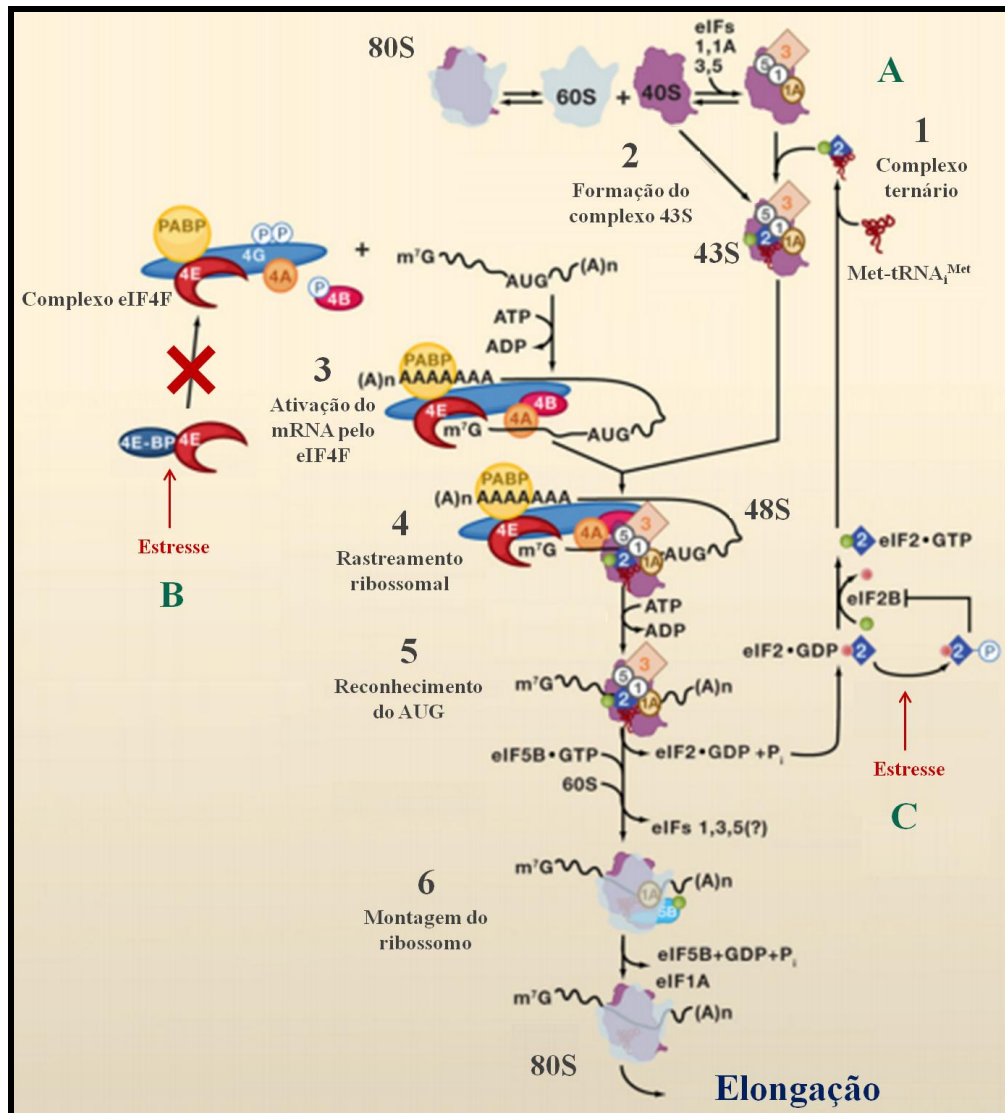
Recentemente dois trabalhos reportaram a caracterização de duas proteínas envolvidas na exportação de mRNA, Mex67 em *T. brucei* e Hel45 em *T. cruzi*. A TbMex67 é uma proteína que contém um motivo de ligação Dedo de Zinco e interage com um fator de exportação chamado TbMTr2 e ambas formam o receptor de exportação heterodimérico Mex67-MTr2, o qual é conservado no reino eucariota. Além disso, neste trabalho foi visto por RNAi que o decaimento da Mex67 levou ao acúmulo de mRNA no núcleo (Dostalova *et al.*, 2013). A Hel45 é uma proteína DEAD-box RNA helicase. As proteínas RNA helicases da família DEAD/H-box estão envolvidas em muitas etapas no metabolismo de RNA, desde a transcrição até a tradução. A Hel45 possui o sinal de exportação nuclear (NES) e se apresenta tanto no citoplasma como no núcleo, mais precisamente em regiões da intercromatina (local de atividade transcricional e *splicing*) e, quando a transcrição é bloqueada pela actinomicina D a Hel45 acumula-se no núcleo. Com isso os autores inferem que a Hel45 parece interagir com o mRNA durante a transcrição e é transportada através do complexo de poro nuclear por um receptor específico. Como o tratamento com leptomicina B não bloqueou a mudança de localização da Hel45, foi proposto que esta proteína poderia ser exportada por um mecanismo RanGTP-independente e, sabendo que Mex67 atua como receptor para exportação de mRNA RanGTP-independente em muitos eucariotos, o grupo verificou que o decaimento da Mex67 por RNAi em *T. brucei* leva ao acúmulo da ortóloga de Hel45 no núcleo, sugerindo que a movimentação desta proteína entre citoplasma e núcleo depende da via onde está inserida a proteína Mex67 (Inoue *et al.*, 2014).

### **1.5.2. Regulação traducional**

O processo de tradução compreende as etapas de Início da tradução, Elongação, Terminação e Reciclagem do ribossomo. O início da tradução é a etapa mais complexa do evento e, portanto, onde a maior parte da regulação é exercida (Sonenberg & Hinnebusch, 2013). Neste item vamos falar dos principais eventos de regulação traducional em eucariotos e, quando possível, exemplificar esses eventos com os dados já obtidos para tripanossomatídeos.

A tradução é iniciada por um mecanismo dependente do *cap* 5' (Figura 1.12A), onde a partir da ligação do complexo eIF4F (eIF4E, eIF4A, e eIF4G), via eIF4E, ao *cap* presente na extremidade 5' do mRNA e a ligação das proteínas PABP (*poli(A) binding protein*) na cauda poli(A), ocorre a circularização do mRNA. Paralelamente, ocorre a formação do complexo de pré-iniciação 43S, onde a subunidade 40S se associa ao complexo ternário (eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup>) e aos fatores eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3. Além disso, o complexo 48S também é formado, pelas interações entre eIF4G e eIF3. Na sequência, o posicionamento do metionil-tRNA<sup>Met</sup> no sítio P (peptidil) do complexo 48S leva ao recrutamento da subunidade ribossomal 60S, e a formação do complexo 80S, dando início ao processo de elongação da tradução (Jackson *et al.*, 2010). Como citado anteriormente no item 1.4.3 vários homólogos dos fatores de tradução foram identificados em tripanossomatídeos, entre eles os fatores eIF4E, eIF4G, eIF4A, PABP (Clayton & Shapira, 2007; Dhaliya *et al.*, 2005, 2006; Freire *et al.*, 2011; Yoffe *et al.*, 2006).

O bloqueio do início da tradução é uma das formas de controle traducional, e esse controle pode ocorrer através de fosforilações de proteínas envolvidas com a regulação. As proteínas 4E-BPs fazem parte de uma classe de reguladores traducionais (Figura 1.12B). Essas proteínas, quando hipofosforiladas, competem com o fator eIF4G pela ligação ao fator eIF4E, bloqueando assim a montagem do complexo eIF4F reprimindo o início da tradução. Na forma hiperfosforilada as 4E-BPs não conseguem se ligar ao eIF4E e o início da síntese protéica é permitido (revisado por Kong & Lasko, 2012). Outra forma de regular a tradução por fosforilação é através da proteína eIF2 (Figura 1.12C). A disponibilidade de eIF2-GTP é determinada pela atividade de eIF2B, quando a serina 51 do fator eIF2 está fosforilada ocorre um aumento da afinidade entre eIF2-GDP e eIF2B. Com isso, não ocorre a troca de GDP por GTP e conseqüentemente resulta na redução do complexo ternário levando à queda da iniciação da tradução (Sonenberg & Dever, 2003). Em tripanossomas, foram caracterizadas três quinases potenciais para eIF2 (eIF2K1, K2 e K3) que são capazes de fosforilar a serina 51 do eIF2 de levedura e mamífero (Moraes *et al.*, 2007). Chow e colaboradores (2011) verificaram que a fosforilação do fator eIF2 alfa em *Leishmania infantum*, desempenha um papel importante na diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. (Chow *et al.*, 2011). E em *T. cruzi* esta fosforilação é necessária para a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (Tonelli *et al.*, 2011).



**Figura 1.12: Esquema do processo e controle do início da tradução em eucariotos.** A) Início da tradução. 1. Ocorre a formação do complexo ternário (GTP-tRNA<sub>i</sub>-eIF2), que se associa com a subunidade ribossomal 40S. 2. Formação do complexo 43S após a junção do 40S com o complexo ternário. Ao mesmo tempo há a formação do complexo eIF4F. 3. O complexo eIF4F reconhece o mRNA e juntamente com as proteínas de ligação à cauda poli(A) promove a circularização do mRNA. 4. Rastreamento ribossomal e formação do 48S. 5. Reconhecimento do códon de iniciação AUG. 6. Montagem do ribossomo pela associação da subunidade ribossomal 60S, leva à dissociação dos fatores de iniciação e início da fase de elongação. B) Bloqueio do início da tradução pela proteína 4E-BP. C) Bloqueio do início da tradução pelo fator eIF2. Imagem adaptada de: (Sonenberg & Hinnebusch, 2009).

A etapa de elongação também é controlada. O fator de elongação eucariótico eEF1A, na sua forma eEF1A-GTP, liga-se a um tRNA aminoacilado correspondente ao segundo códon do mRNA e o posiciona no sítio A (aminoacil). Esse evento leva à hidrólise do GTP e desligamento do eEF1A do ribossomo, permitindo o acesso do tRNA aminoacilado no sítio A. Rapidamente, o sítio catalítico ribossomal PTC (*Peptidyl Transferase Center*) leva à formação da ligação peptídica (Alberts *et al.*, 2010). A inibição da tradução já foi verificada

em *T. brucei* através da interação entre as proteínas TbeIF1A e TbRACK1, homóloga a RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase 1*) (Regmi *et al.*, 2008).

Para que ocorra a translocação do tRNA do sítio A para o sítio P e do tRNA do sítio P para o sítio E, um segundo fator de alongação é requerido, o eEF2. Este se liga ao ribossomo quando associado à GTP. Ao interagirem, eEF2 e GTP interagem como centro de ligação de fator da subunidade maior o que estimula a hidrólise de GTP. Esta hidrólise altera a conformação do eEF2, permitindo-lhe alcançar a subunidade menor e desencadear a translocação do tRNA do sítio A. Após a translocação completa do ribossomo, a afinidade da estrutura ribossômica resultante pelo eEF2 é reduzida levando à liberação do fator de alongação e resultando na translocação do tRNA, bem como no deslocamento do mRNA (Frank *et al.*, 2007).

A fosforilação de eEF2 pela quinase eEF2K é um importante inibidor da tradução na fase da alongação (Kong & Lasko, 2012), e em tripanosomatídeos, já foi identificado um grande número de possíveis proteínas quinases que poderiam atuar no controle da atividade proteica por fosforilação ou desfosforilação do fator eEF2 (Parsons *et al.*, 2005).

### **1.5.3. Regulação da expressão gênica através da degradação de mRNA**

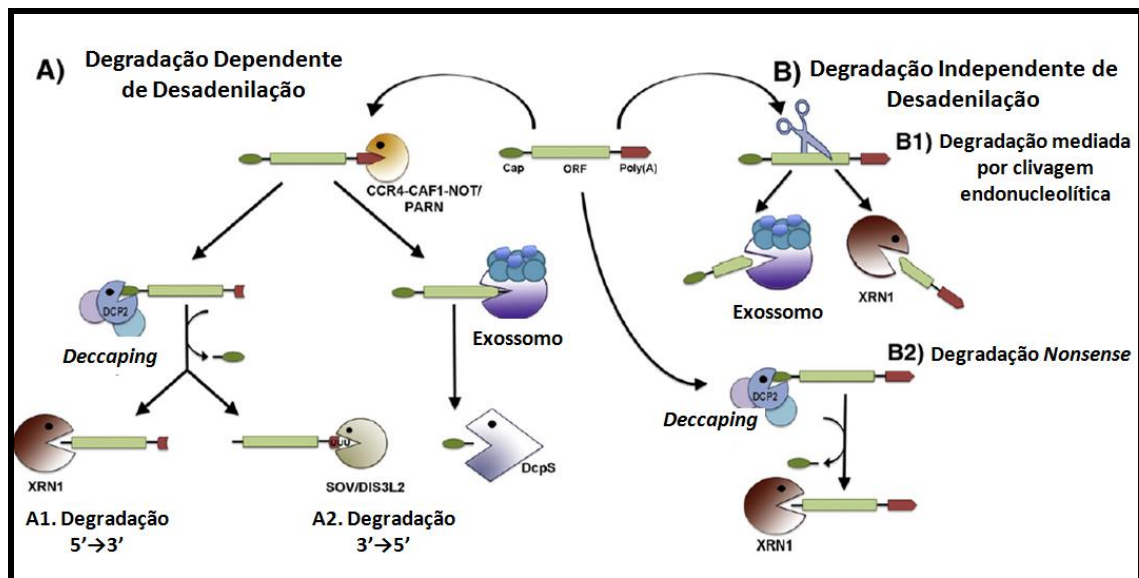
Eventos que afetam a taxa de degradação ou também conhecida como tempo de meia vida (*turnover*) de RNAs mensageiros são importantes na modulação da expressão de genes. Esse mecanismo de *turnover* é essencialmente destinado a regular a estabilidade dos transcritos. A implementação desse mecanismo também resulta na eliminação de mRNAs defeituosos, os quais poderiam causar consequências significativas às células (Nagarajan *et al.*, 2013).

No núcleo, a desestabilização via degradação da cauda poli(A) é realizada pelo complexo TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4), a qual leva à degradação 3'→5' mediada pelo exossomo nuclear (Jia & Wang, 2012). Em leveduras, os mRNAs são degradados pela proteína XRN2 (Rat1) após o mRNA ter seu *cap* retirado pelo complexo proteico Lsm2-8. Além disso, as proteínas XRNs também participam de diversos processos no metabolismo de RNAs como silenciamento de RNA, maturação de rRNA e terminação da transcrição (Nagarajan *et al.*, 2013).

No citoplasma, RNAs que não estão sendo traduzidos são compartimentalizados no citosol em microdomínios, para serem degradados nos *corpos de processamento (P-bodies)*, ou para serem estocados nos *grânulos de estresse* (Parker & Sheth, 2007). A degradação citoplasmática de mRNA em eucariotos superiores pode ocorrer por duas maneiras distintas:

(1) degradação dependente da desadenilação; (2) degradação independente da desadenilação (Figura 1.13) (Nagarajan *et al.*, 2013).

**A degradação dependente da desadenilação** (Figura 1.13A) inicia com um processo de encurtamento da cauda poli(A) chamado desadenilação. Esse processo consiste na retirada de adeninas da extremidade 3' do mRNA por enzimas deadenilases do complexo Ccr4/Caf1/Not, ou Pan2/Pan3, ou PARN. Na sequência, o mRNA pode ser degradado por dois eventos distintos: degradação no sentido 5'→3' pela ação de diversas proteínas envolvidas na retirada do *cap* (*deccapping*) e degradação propriamente dita e/ou pela direção 3'→5' pelo exossomo, um complexo de 11 proteínas com diversas funções na degradação do mRNA. Na degradação 5'→3 (Figura 1.13A1), após a desadenilação, as proteínas do complexo Lsm1-7 ligam-se no final 3' do mRNA e recrutam o complexo *deccapping* (Dcp1, Dcp2) e a helicase Dhh1, o qual hidroliza o *cap* expondo o mRNA para ser degradado pela exonuclease Xrn1 (Clayton & Shapira, 2007; Nagarajan *et al.*, 2013). Na degradação 3'→5' (Figura 1.13A2) atua o exossomo, um complexo macromolecular que tem um núcleo central arranjado em forma de anel, o qual contém seis exorribonucleases 3'→5' cataliticamente inativas. Dependendo da localização subcelular, o núcleo do exossomo associa-se com subunidades cataliticamente ativas como, exorribonuclease RNase D, RRP6 (núcleo e nucléolo) e/ou exorribonuclease RNase II, RRP44/DIS3 (citoplasma e núcleo). Após a associação, o exossomo medeia a degradação 3'→5' e ao final o *cap* é hidrolizado pelas enzimas de *deccapping* Dcps (Nagarajan *et al.*, 2013). Outro mecanismo de degradação 3'→5' é através da proteína de *deccapping* SOV (suppressor of VARICOSE/HEDLS) (Figura 1.13A2), identificada primeiramente em *Arabidopsis*. SOV é um membro da família RRP44/DIS3 que contém um domínio conservado RNase II, mas não apresenta o domínio PIN, requerido para interação com o exossomo (Zhang *et al.*, 2010). O homólogo de SOV em humanos na levedura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) foi nomeado DIS3L2, a qual preferencialmente degrada substratos uridilados em *S. pombe in vitro*, sugerindo que SOV/DIS3L2 representam um caminho de degradação de RNA alternativo ao mediado por Xrn1 e exossomo (Malecki *et al.*, 2013 e revisado por Nagarajan *et al.*, 2013).



**Figura 1.13: Mecanismos de degradação de mRNAs em eucariotos.** A: A maioria dos mRNA são degradados pelo sistema dependente de desadenilação. A atividade de desadenilação por CCR4-CAF1-NOT1 ou PARN remove quase toda a cauda poli(A). Na sequência, os mRNAs podem ser degradados ou no sentido  $5' \rightarrow 3'$  e/ou no sentido  $3' \rightarrow 5'$ . A1: Na degradação  $5' \rightarrow 3'$ , um complexo *deccapping* contendo DcpS hidrolisa o *cap* 5' expondo o mRNA à ação da exorribonuclease Xrn1. A2: Alternativamente, o mRNA desadenilado pode ser degradado pelo exossomo no sentido  $3' \rightarrow 5'$  e a estrutura *cap* 5' é hidrolisada pelas DCPs. SOV/DIS3L2 preferencialmente degrada transcritos uridilados na direção  $3' \rightarrow 5'$ . B: A degradação pode ocorrer independente da desadenilação através de clivagens endonucleolítica ou *nonsense*. B1: A clivagem interna por endonucleases resulta em fragmentos 5' e 3', os quais são degradados por Xrn1 e exossomo, respectivamente. B2: RNAs alvos do sistema NMD tem a desadenilação ignorada e são degradados pela Xrn1 após a remoção do *cap* 5'.

A **degradação independente de desadenilação** (Figura 1.13B) envolve dois mecanismos: (1) degradação mediada por clivagem endonucleolítica e (2) degradação *nonsense*. A degradação do mRNA mediada por clivagem endonucleolítica (Figura 1.13 – B1) ocorre por ação de endonucleases como por exemplo, AGO, SMG6 e RRP44/DIS3, levando a formação de fragmentos 5' e 3' que são expostos a degradação por exorribonucleases. Um exemplo dessa degradação, o qual ocorre tanto em animais como em plantas, é através de pequenos RNAs (20-30 nucleotídeos de comprimento) que atuam como guias no silenciamento de mRNAs alvos por direcionar as proteínas AGO. Em *Drosophila*, os transcritos contendo códon prematuro de terminação (PTCs) são clivados através de uma endonuclease SMG6, seguido por degradação exorribonucleolítica dos fragmentos 5' e 3' pelo exossomo e Xrn1, respectivamente. Na degradação *nonsense* (Figura 1.13 – B2), ou também chamada *Nonsense-Mediated Decay* (NMD), alguns mRNAs sofrem degradação  $5' \rightarrow 3'$  sem a remoção da cauda poli(A), pois como parte do sistema de vigilância de mRNA citoplasmáticos os mRNAs aberrantes, os quais levariam à tradução de proteínas truncadas e

consequente efeitos deletérios para a célula, sofrem degradação 5' → 3' sem a necessidade de desadenilação. Esses mRNAs aberrantes tem seu *cap* removido pelas Dcps e consequente degradação pela exorribonuclease Xrn1 (revisado por Nagarajan *et al.*, 2013).

Com exceção das enzimas de *deccaping* Dcp1 e Dcp2, as principais enzimas envolvidas na degradação de mRNA estão presentes em tripanossomatídeos (Clayton & Shapira, 2007). A atividade de desadenilação foi demonstrada em extratos de *Leptomonas seymouri* (Milone *et al.*, 2002). O exossomo de *T. brucei* tem a estrutura e composição semelhante àquelas encontradas em leveduras e mamíferos (Estévez *et al.*, 2001). Além disso, já foram identificadas em tripanossomas seis potenciais exorribonucleases 5' → 3' similares à Xrn1 e Xrn2 de leveduras e mamíferos: XRNA, XRNB, XRNC, XRND (Li *et al.*, 2006), XRNE e XRNF (Sakyiama *et al.*, 2013). A XRNA em *T. brucei* é predominantemente citoplasmática e é essencial para o crescimento do parasita, e seu silenciamento causa o aumento do número de mRNAs instáveis (Li *et al.*, 2006). Em 2007 Cassola e colaboradores verificaram que a proteína TcXRNA é principalmente citoplasmática, com pouca fluorescência no núcleo e, se localiza com mRNAs. A dinâmica dos grânulos que contém TbXRNA foi demonstrado por Kramer e colaboradores (2008) quando os grânulos que continham a proteína aumentavam ou diminuía de tamanho e quantidade quando a célula era submetida à situações que interferem na tradução. As TbXRNB e TbXRNC também citoplasmáticas, não afetam o crescimento do parasita quando silenciadas. A proteína TbXRND é nuclear e inibe de forma letal o crescimento na fase procíclica (Li *et al.*, 2006). Recentemente, outras duas enzimas da família XRN\_N foram encontradas sendo denominadas XRNE e XRNF. Até o momento apenas a XRNE começou a ser estudada, onde foi visto que esta enzima é nucleolar e pode estar envolvida com a biogênese de ribossomos, processamento de rRNA e crescimento celular em *T. brucei* (Sakyiama *et al.*, 2013).

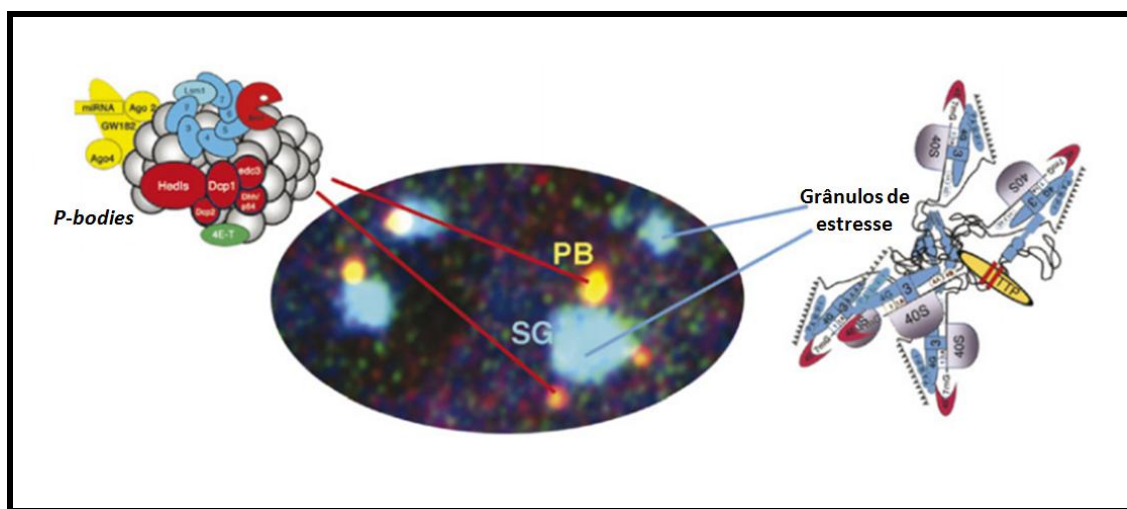
### **1.6. Grânulos de RNA em tripanossomatídeos**

A função exata dos grânulos de RNA ainda não é totalmente compreendida, mas estas estruturas apresentam papel importante na regulação da expressão gênica em eucariotos com funções na degradação, estocagem, distribuição e transporte de mRNAs nas células (Buchan, 2014).

Em outros eucariotos, como por exemplo em leveduras, os grânulos de estresse e *P-bodies* são os grânulos de mRNA mais estudados. Esses grânulos são complexos ribonucleoproteicos que se formam na presença de mRNAs não traduzíveis (Kramer, 2014). Podem compartilhar substratos de mRNA, propriedades dinâmicas e muitas proteínas, mas também abrigam componentes específicos e desempenham funções autônomas. Cada um



pode existir de forma independente, mas quando são coordenadamente induzidos podem manter-se unidos em uma “dança citosólica” (Figura 1.14). Vários estudos revelam novas proteínas e RNAs que são componentes dessas estruturas e que também executam outras funções celulares. As proteínas que medeiam splicing, transcrição, adesão, sinalização e desenvolvimento estão integradas com a formação de GSs e *P-bodies*. Assim, estes grânulos representam muito mais do que controladores do destino de mRNA entre tradução e degradação (Anderson & Kedersha, 2007). Apesar da diversidade protéica e funcional que existe entre GS e PB, ambos têm características em comum, e a principal delas é que todos contêm mRNAs reprimidos que podem retornar à tradução em resposta à sinais apropriados (Buchan, 2014).

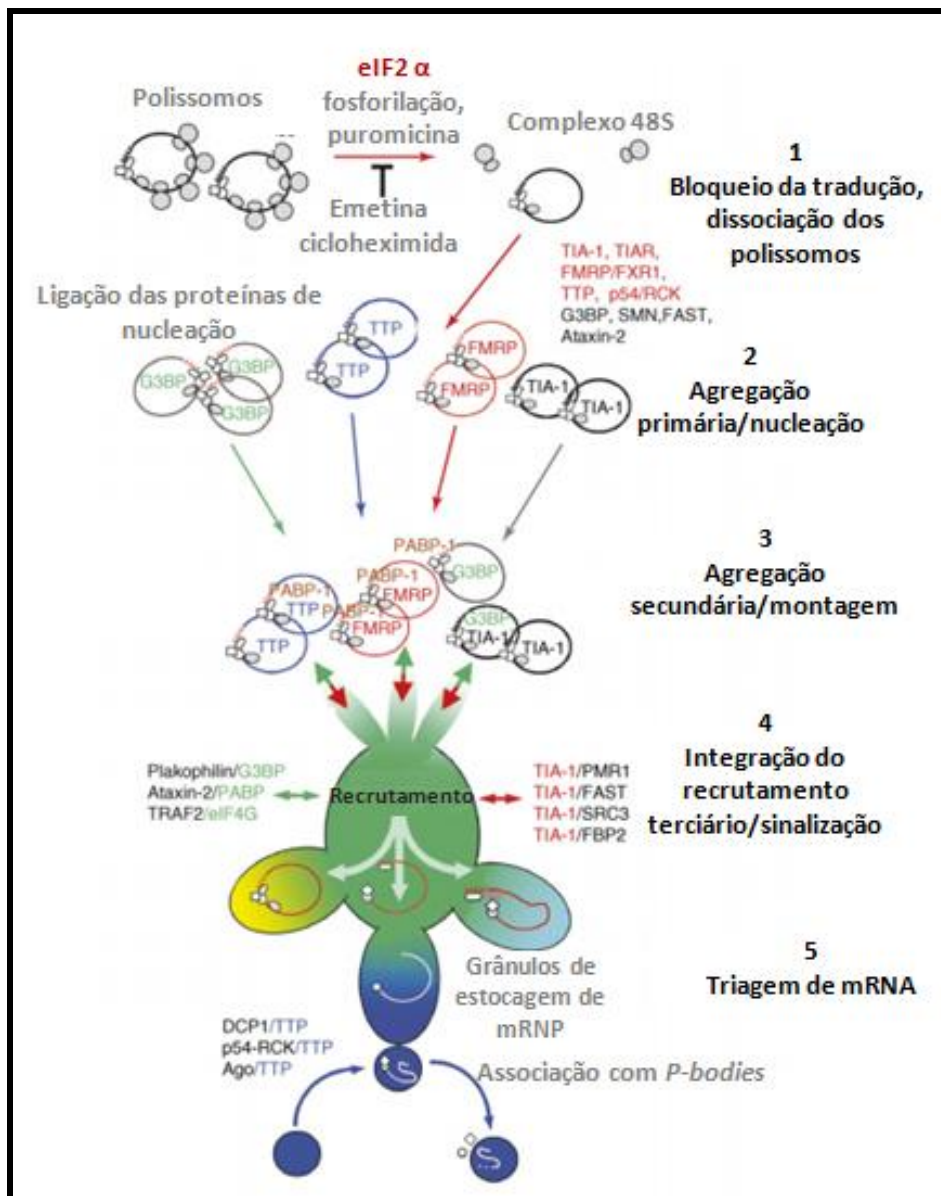


**Figura 1.14: Interação entre grânulos de estresse e *P-bodies*.** Imagem adaptada de (Anderson & Kedersha, 2007).

**Os grânulos de estresse** incluem um grupo diverso de mRNAs e proteínas, alguns até mesmo sem ligações conhecidas para o metabolismo do RNA (Anderson & Kedersha, 2007). A primeira classe a ser definida consiste em complexos de iniciação da tradução ainda ligados ao mRNA após a desmontagem de polissomos. Esta categoria inclui mRNA, eIF3, eIF4F (compreendendo eIF4E, eIF4A e eIF4G), eIF4B, subunidade ribossomal 40S e PABP-1 (Kedersha *et al.*, 2002; Moore, 2005). A segunda classe de componentes de GSs consiste em proteínas de ligação ao mRNA envolvidas no silenciamento traducional ou estabilidade de mRNA, as quais são marcadoras confiáveis de GSs, mas pode não ser universal a todos os GSs. Membros de silenciamento traducional incluem TIA-1 (*T cell internal antigen-1*) e TIAR (*TIA-1-related*), FMRP (*fragile X mental retardation protein*), FXR1 (*fragile X mental retardation-related protein 1*), argonauta, CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein*), pumillio, *smaug*, *ataxin-2* e Rap55 (*RNA-associated protein 55*, também

chamada *Lsm14*). Os componentes de GSs associados à estabilização de mRNA incluem proteínas argonautas, tristetraprolina (TTP) e BRF1, a RNA helicase RCK (também denominada p54), a endonuclease PMR1 (*polysome-associated RNase I*) e ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) (Anderson & Kedersha, 2007).

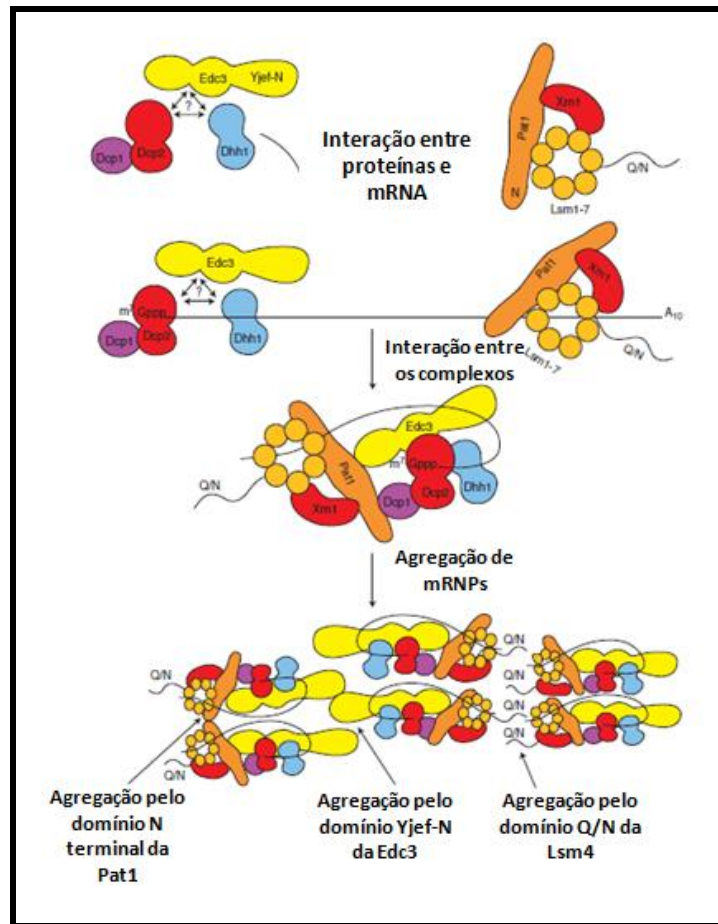
Grânulos de estresse só aparecem sob condições de estresse e sua presença correlaciona-se com a parada ou redução do processo de tradução. Em células de mamíferos, a fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) por quinases ativadas por estresse impede novos eventos de iniciação da tradução, o que resulta na formação de complexos de pré-iniciação improdutivos no mRNA, levando à formação de grânulos de estresse (Figura 1.15) (Anderson & Kedersha, 2007; Cassola, 2011). Vários mecanismos que envolvem interações proteína-proteína entre proteínas de ligação a RNA têm sido implicados na montagem de ribonucleoproteínas (mRNPs) em grânulos de estresse. Um mecanismo, que contribui para a montagem do GS é a dimerização da proteína G3BP. Outro mecanismo de formação de grânulos estresse é através da auto-agregação de domínios *prion-like* ricos em glutamina/asparagina (*QN-rich prion domains*) nas proteínas de ligação a RNA, TIA-1, TIA-R e os seus ortólogos. Além disso, vale ressaltar que a formação dos grânulos depende do tipo de estímulo que causa o estresse celular. Por exemplo, TIA-1, e o seu homólogo de levedura Pub1, têm a formação de grânulos em resposta a estresse por arsenito e privação de glicose, respectivamente, mas não em resposta a outros fatores, como o choque térmico. Portanto, a natureza do stress, a qual molda o complexo mRNP, provavelmente define as regras de montagem para a formação de grânulos de estresse (Decker & Parker, 2012).



**Figura 1.15: Modelo de formação de grânulos de estresse em eucariotos.** O processo de formação dos GSs pode ser dividido em estágios que são marcados por composições e localizações específicas de mRNPs. Estágio 1: A montagem começa com a parada do início da tradução, a qual permite a dissociação dos polissomos, convertendo-os em mRNPs a partir do qual os GSs são montados. Estágio 2: Agregação primária e nucleação ocorre quando transcritos ligados às unidades 48S se unem através das proteínas de ligação ao RNA, como G3BP, TIA-1, TTP, e FMRP. Estágio 3: Agregação secundária e montagem ocorrem quando PABP-1 liga-se à todos os RNA poli(A) formando agregados. Estágio 4: Alguns transcritos estão ligados a múltiplas proteínas de nucleação, o que aumenta o tamanho do grânulo, que podem recrutar proteínas que não se ligam à RNAs (por exemplo TRAF2, *Placophilin*, SRC3, FAST). Estágio 5: Dentro dos GSs, os transcritos são submetidos a triagem. Os mRNAs podem ser enviados novamente para tradução, enviados para a montagem de outros grânulos RNP, ou destinados à *P-bodies*. Uma característica importante do modelo é que o processo é reversível, isto é, os mRNAs que entram nos GSs após a dissociação dos polissomos podem ser reintegrados e voltar à fração polissomal. Imagem adaptada de: (Anderson & Kedersha, 2007).

Os *P-bodies*, que são geralmente vistos em todos os tipos de celulares (Buchan, 2014) são agregados de mRNPs relacionados à degradação de mRNAs e a fatores que inibem o processo de tradução. PBs estão presentes nas células não estressadas, mas sua formação é ainda mais induzida em resposta ao estresse ou outras condições que levem à inibição da tradução. A composição total dos PBs ainda não está determinada. No entanto, pode-se citar alguns componentes já identificados nesses grânulos: proteínas da maquinaria de degradação, as quais incluem as enzimas de *deccaping* Dcp1p/Dcp2p, os ativadores de *deccaping* Dhh1p/RCK/p54, Pat1p, Scd6p/RAP55, Edc3p, o complexo Lsm1-7, e a exonuclease 5'→3' Xrn1 (Parker & Sheth, 2007; Teixeira & Sheth, 2005); Recentemente uma nova proteína de PBs foi identificada, HAX-1, uma proteína presente em células de mamíferos, a qual é multifuncional e se liga à 3'UTR de transcritos específicos. Está envolvida na regulação da apoptose, migração celular e homeostase de cálcio. Este trabalho mostrou que HAX-1 colocaliza com proteínas de PBs como Dcp1 e Rck/p54 (Zayat *et al.*, 2015).

Assim como nos grânulos de estresse, os *P-bodies* se formam sob a dependência de mRNAs não traduzíveis, ou seja, primeiro ocorre a formação dos complexos mRNPs e na sequência tem-se a formação de agregados maiores pelas interações proteína-proteína. Em leveduras (Figura 1.16), a agregação das mRNPs nos PBs parece ser primeiramente dependente de um domínio de auto-interação (Yjef-N *domain*) presente na proteína Edc3 e de um de domínios *prion-like* rico em glutamina/asparagina (Q/N) presente na porção carboxiterminal da Lsm4. Devido ao domínio Yjef-N da Edc3 ser conservado é provável que a proteína Edc3 também contribua para a formação de PBs em metazoários. Contudo, a depleção de Edc3 não bloqueou a montagem de PBs em *Drosophila*, neste caso, provavelmente o domínio Q/N e outros mecanismos contribuam para a formação de PBs neste organismo. Finalmente, a proteína Pat1 também contribui para a formação dos grânulos, passivelmente por interagir com componentes de PBs incluindo o complexo Lms1-7, o qual é dependente de Pat1 para sua localização em PBs (Buchan *et al.*, 2008; Decker *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2008; Mazzoni *et al.*, 2007; Reijns *et al.*, 2008; Spiller & Beggs, 2008. Revisados por Decker & Parker, 2012).



**Figura 1.16: Modelo de formação de *P-bodies* em leveduras.** Primeiro, os fatores de PBs são recrutados para formar complexos com o mRNA. Segundo, a interação entre as proteínas do complexo levam a formação de um “círculo fechado”. Finalmente, o grânulo se forma através da interação entre os domínios Q/N da Lsm4, YjeF-N da Edc3 e amino-terminal Pat1. Imagem adaptada de: (Decker & Parker, 2012).

Embora vários trabalhos venham tentando definir a função dos grânulos de RNA em tripanossomatídeos (Cassola *et al.*, 2007; Dallagiovanna *et al.*, 2008; Fernández-Moya *et al.*, 2012; Garcia-Silva *et al.*, 2010; Holetz *et al.*, 2007, 2010; Li *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2008, 2012, 2013; Krüger *et al.*, 2013; Mani *et al.*, 2011; Subota *et al.*, 2011), ainda não foi estabelecida a relação direta entre a função dos mesmos e a regulação da expressão gênica durante o ciclo de vida dos parasitas. Além disso, como revisado por Kramer (2014), existem pelo menos seis diferentes tipos de grânulos de RNA nestes parasitas e o estudo aprofundado da composição proteica dos mesmos pode ajudar a desvendar mecanismos importantes de regulação gênica nestes organismos.

**Grânulos de pequenos RNAs transportadores (tRNA halves)** foram identificados em *T. cruzi* e representam em torno de 25 % do total de pequenos RNA (sRNA). Os grânulos de tRNA halves foram identificados no citoplasma de *T. cruzi* sob condições de estresse nutricional e, acredita-se que esses grânulos participam no processo da repressão da tradução

durante o controle da expressão de genes sob a ação de pequenos tRNAs *halves* guias em um processo comparável à maquinaria de RNA de interferência (RNAi) (Garcia-Silva *et al.*, 2010).

**Grânulos perinucleares** (GPNs) possuem propriedades semelhantes aos grânulos germinativos encontrados em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), como por exemplo, localização na periferia do núcleo e formação a partir do acúmulo de pré-mRNA quando o *trans-splicing* é inibido. Em tripanossomatídeos já foi apontado que estes grânulos podem conter proteínas envolvidas na ligação à RNAs, iniciação da tradução e degradação de mRNA (DHH1, SCD6, CAF1, XRNA, eIF4E1, eIF4E3, PABP2, UPF1, e VASA). Além disso, esses grânulos são dependentes da integridade do complexo de poro nuclear e na transcrição ativa, contudo, não são afetados pela interferência na tradução. Acredita-se que os GPNs atuam como uma triagem e controle de qualidade de mRNAs (Kramer, 2012, 2014; Sheth *et al.*, 2010).

Os **grânulos de estresse por choque térmico** foram originalmente definidos como grânulos que se formam em resposta a severo choque térmico em culturas procíclicas de *T. brucei*, pois o choque térmico promove a dissociação dos polissomos bem como a disponibilização de mRNAs para degradação. Contudo, até o momento, não se tem o conhecimento de como o estresse por choque térmico reprime a tradução para levar à formação dos grânulos, mas sabe-se que estes grânulos possuem uma estrutura não uniforme que é formada por proteínas que podem estar presentes em *P-bodies* como a XRNA, bem como proteínas não pertencentes à *P-bodies* como a PABP1. Além disso, a função desses grânulos ainda não é conhecida, mas especula-se a ideia da relação entre esses grânulos com os grânulos de pólo posterior (Kramer *et al.*, 2008).

No **grânulo de pólo posterior** uma pequena fração da proteína XRNA de *P-bodies* localiza-se no pólo posterior da célula e, esse grânulo aumenta seu tamanho significativamente com o choque térmico em *T. brucei*. Esses grânulos são semelhantes à *P-bodies*, embora nem todas as proteínas de PBs estão presentes em grânulos de polo posterior. A função desse grânulo no tripanossoma permanece inteiramente desconhecido, no entanto, especula-se a ideia de um mecanismo de transporte unidirecional de mRNA dependente de microtúbulos, os quais estão contidos em grande quantidade no pólo posterior da célula (Kramer *et al.*, 2008).

Os **grânulos de estresse nutricional** foram primeiramente identificados em *T. cruzi* e *T. brucei* através da privação extrema de nutrientes em cultura *in vitro* e, no intestino do inseto vetor (apenas para *T. cruzi*). Os GSs são maiores que os *P-bodies* e são capazes de armazenar e estabilizar os mRNAs durante o momento de estresse nutricional. Esses grânulos

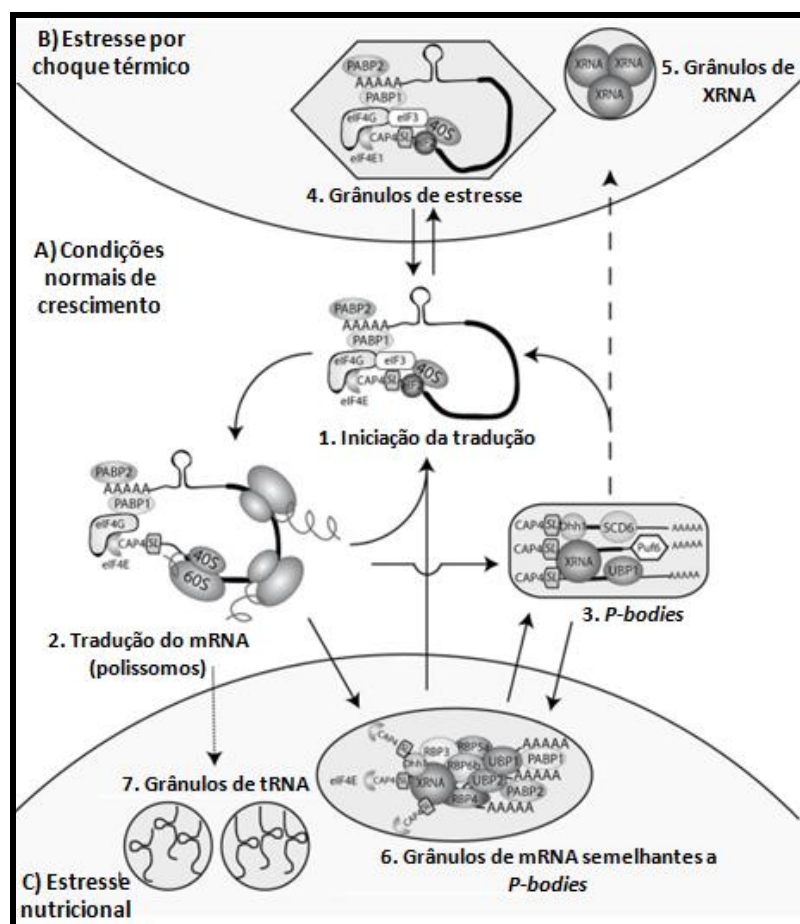
podem conter as proteínas DHH1, XRNA, SCD6, eIF4E1-3, PABP1 e PABP2, proteínas que se ligam a uridina UBP1-2, proteínas que se ligam a RNA RBP3,4,5a,6b, DRBD3 e ALBA1-4 (Cassola *et al.*, 2007; Holetz *et al.*, 2007; Kramer, 2014).

Em tripanossomas alguns eventos envolvidos com grânulos de estresse têm sido relatados. Em *T. brucei*, GSs semelhantes aos de mamíferos aparecem em resposta ao choque térmico, o qual é simultâneo com a dissociação dos polissomos e aumento na taxa de degradação de mRNAs. Foi visto também que ao tratar os parasitas com a droga cicloheximida, houve redução na formação dos grânulos. Nesses grânulos foram encontradas proteínas de ligação à cauda poli(A) como PABP1 e PABP2, quatro homólogos do fator de início de tradução eIF4E (1 a 4), eIF2 $\alpha$  e eIF3B. Além disso, é provável que os grânulos de estresse em *T. brucei* contenham ainda proteínas ribossomais e ortólogos do eIF4G (Kramer *et al.*, 2008).

**Grânulos semelhantes a *P-bodies*** de animais e leveduras são constitutivamente presentes, aumentam seu tamanho durante a repressão traducional e diminui ou desaparece quando a dissociação dos polissomos é reprimida, indicando que estes grânulos estão em equilíbrio com a tradução (Kramer, 2014).

Em tripanossomatídeos, algumas proteínas já foram identificadas como componentes de *P-bodies*. Em 2007, Holetz e colaboradores identificaram em *T. cruzi* uma proteína homóloga à proteína marcadora de grânulos de RNA de levedura, Dhh1. TcDHH1, está presente em grânulos citoplasmáticos e em complexos independentes de polissomos em epimastigotas e em parasitas submetidos a estresse nutricional, demonstrando pela primeira vez a existência de grânulos de mRNA em tripanosomatídeos com características semelhantes aos GSs e PBs de leveduras e mamíferos. O número de grânulos que contém TcDHH1 varia de acordo com o estado de tradução da célula, ou seja, a formação dos grânulos depende da disponibilidade dos mRNAs em consequência à dissociação dos polissomos. Em análises do complexo proteico que contém a proteína TcDHH1, foi visto que estão presentes também proteínas componentes de grânulos de estresse, como proteínas de choque térmico e subunidade ribossomal 40S, entretanto algumas proteínas essenciais para a constituição de PBs em leveduras e mamíferos, como Lsm1-7, DCPs e Xrn1, não foram identificados neste complexo. Além disso, TcDHH1 co-localiza parcialmente com algumas proteínas envolvidas na maquinaria de tradução, TcL26 e TcS7; proteína de ligação ao RNA, (TcPUF6, TcALBA3 e TcZFP2) e proteínas de grânulos de estresse, TcHSP70, TcPABP1 e TcPABP2) (Holetz *et al.*, 2007, 2010). Foi visto que em *T. brucei* TbXRNA e TbDHH1 também respondem ao estresse e aos tratamentos com as drogas cicloheximida e puromicina, semelhante ao que foi visto em TcDHH1 por Holetz e colaboradores (2007) .

Com base em todas as evidências já descritas para grânulos de RNA em tripanossomas, Cassola (2011) estabelece um modelo para grânulos de RNA nestes protozoários (Figura 1.17). Neste modelo, Cassola exemplifica o ciclo dinâmico dos mRNAs, o qual compreende os eventos de tradução, estocagem e degradação. A repressão da tradução disponibiliza os mRNAs para serem estocados ou degradados. mRNAs complexados com a maquinaria de degradação podem ser degradados ou serem brevemente estocados para retornar ao processo de tradução. Situações de estresse levam à queda na taxa de tradução e podem direcionar os mRNAs para grânulos de estresse, onde serão estocados podendo ser enviados para os grânulos de degradação ou para que retornem para a tradução. Com base em todas as evidências suportadas para explicar a regulação da expressão de genes em tripanossomatídeos pode-se presumir que todos esses mecanismos já descritos com suas peculiaridades e até mesmo suas semelhanças com outros eucariotos sejam essenciais para as rápidas mudanças morfológicas e metabólicas durante seu complexo ciclo de vida.



**Figura 1.17: Modelo de grânulos de RNA em tripanossomas.** Modelo realizado com base nas informações obtidas para *T. brucei* e *T. cruzi*. A) *Sob condições normais de crescimento:* 1. Novo evento de início de tradução. 2. Tradução do mRNA em polissomos. 3. *P-bodies* são componentes constitutivos no citoplasma. B) *Sob condições de estresse por choque térmico:* 4. A paralisação do início da tradução parece ser o principal fator para formação de grânulos



de estresse por choque térmico. 5. O choque térmico pode induzir a formação de grânulos de XRNA. C) *Sob condições de estresse nutricional*: 6. Durante o estresse nutricional, os mRNAs deixam a tradução e se fusionam com PBs para formar grânulos de mRNAs semelhantes a *P-bodies*, os quais são compostos por uma mistura de componentes tanto de PBs como GSs. Os transcritos contidos em grânulos de mRNA são protegidos da degradação, mas em condições nutricionais normais, podem voltar ao início da tradução. 7. O estresse nutricional também pode levar à formação de grânulos de tRNA, os quais são estruturas independentes. Imagem adaptada de: (Cassola, 2011).

Mediante o exposto, fica evidente que vários avanços foram feitos na pesquisa sobre a existência e composição dos grânulos de mRNA em tripanossomatídeos. Entretanto, ainda não foi possível definir se estes grânulos participam da estocagem ou degradação dos mRNAs. Por isso, neste trabalho decidimos investigar a participação da exonuclease TcXRNA no metabolismo de mRNAs e na formação dos grânulos de RNP em *T. cruzi*. e assim, tentar definir se grânulos de estocagem e degradação de fato co-existam neste organismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar a função da proteína XRNA de *T. cruzi* (TcXRNA), inferindo o papel desta proteína no metabolismo de RNA, principalmente no que diz respeito ao envolvimento em grânulos de mRNA.

### **2.2. Objetivos específicos**

#### **2.2.1. Avaliar a expressão e a localização celular da proteína TcXRNA durante a metaciclologênese *in vitro***

**Meta 1** – Realizar ensaio de metaciclologênese *in vitro*;

**Meta 2** – Realizar ensaios de *Western blot* e imunofluorescência indireta com as formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas aderidos ao substrato por 24 horas e tripomastigotas metacíclicos;

**Meta 3** – Verificar a dinâmica de formação de grânulos que contém a proteína TcXRNA nas diferentes formas de diferenciação celular após o tratamento dos parasitas com as drogas puromicina e cicloheximida através de ensaio de imunofluorescência indireta.

#### **2.2.2. Analisar a composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA**

**Meta 1** – Imunoprecipitar o complexo que contém a proteína TcXRNA e identificar os parceiros funcionais por espectrometria de massas;

**Meta 2** – Imunoprecipitar o complexo que contém a proteína TcXRNA e identificar os RNAs associados por sequenciamento em larga escala;

**Meta 3** – Verificar a interação entre as proteínas TcXRNA e TcDHH1 por ensaio de *Western blot* do complexo imunoprecipitado e por ensaio de imunofluorescência indireta.

#### **2.2.3. Produzir linhagens de *T. cruzi* expressando TcXRNA fusionada às etiquetas GFP e FLAG**

**Meta 1** – Amplificar e recombinar o gene de TcXRNA em vetores contendo a etiqueta GFP e FLAG;

**Meta 2** – Transfectar os vetores em parasitas selvagens para obter expressão de TcXRNA fusionada à etiquetas.

#### **2.2.4. Analisar a estabilidade dos mRNAs em parasitas nocaute para a proteína TcXRNA**

**Meta 1** – Obter vetores para nocaute da proteína TcXRNA em *T. cruzi*;

**Meta 2** – Produzir parasitas mutantes nulos para a proteína TcXRNA;

**Meta 3** – Sequenciar a população de mRNAs dos parasitas mutantes e selvagens por métodos de sequenciamento em larga escala.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Soluções e tampões

**AP Buffer (tampão de reação para fosfatase alcalina):** Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

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

**Solução de bloqueio para *Western blot*:** Tampão PBS, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5%.

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

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

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

**Solução de lise para método de palitagem:** NaOH 50 mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, azul de bromofenol 0,025% em água deionizada.

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

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

**Solução PSA 2%:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM; Agarose *Low Melting* 2%.

**Solução PSG:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.

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

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

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

**Tampão de amostra para proteínas 4x:** Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, β-Mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

**Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,74 mM.

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

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

**Tampão IMP0:** KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4.

**Tampão IMP1:** KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, NP-40 0,5 %.

**Tampão IMP2:** KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, NP-40 1 %.

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

**Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*):** KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

**Tampão SSC 20X:** NaCl 3M e Citrato trisódico 2-hidrato 0,3M.

**Tampão TELT:** Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M, Triton X-100 4%.

### **3.2. Meios de cultura**

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

**Meio LIT (CAMARGO, 1964):** Infusão de fígado 5,0 g/l, NaCl 4,4 g/l, KCl 0,4 g/l, Glicose 2,2 g/l, Triptose 5,0 g/l, Fosfato básico de sódio 11,56 g/l, Extrato de levedura 15,0 g/l, Hemina 0,02 g/l, Soro fetal bovino 10%, Penicilina 10.000 U pH 7,2.

**Meio TAU (Triatomine Artificial Urine):** NaCl 190,0 mM, KCl 17,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, Tampão fosfato pH 6,0 8,0 mM.

**Meio TAU 3AAG pH 6,0 mM:** Meio TAU suplementado com: Glicose 10,0 mM, Ácido L-aspartico 2,0 mM, Ácido L-glutâmico 50,0 mM, L-Prolina 10,0 mM.

### **3.3. Microrganismos**

***Escherichia coli*:** As bactérias de genótipo DH5α<sup>TM</sup>: {F<sup>-</sup> *recA1 endA1 hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) *supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*} foram utilizadas nas etapas de clonagem e propagação de vetores de clonagem.

***T. cruzi* clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*):** Para a realização deste trabalho foram utilizados parasitas sob a forma epimastigota mantidos em meio de cultura LIT (Camargo, 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias. Para obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas foi realizado o ensaio de metaciclogênese *in vitro*, descrito por Contreras e colaboradores (Contreras *et al.*, 1985) com modificações, conforme descrito no item 3.4.1.

### **3.4. Análise da expressão e localização celular da proteína TcXRNA durante a metaciclogênese in vitro**

#### **3.4.1. Ensaio de metaciclogênese in vitro**

As formas epimastigotas de *T. cruzi* se diferenciam naturalmente em tripomastigotas metacíclicas no intestino do inseto vetor e esse processo pode ser realizado *in vitro* sob

condições químicas permitindo o isolamento das células em diferentes estágios durante a diferenciação do parasita (Contreras *et al.*, 1985).

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, as formas epimastigotas em densidade celular de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml foram centrifugadas a  $7.000 \times g$  por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . As células foram suspensas em meio TAU em densidade de  $5,0 \times 10^8$  células/ml e incubadas a  $28^\circ\text{C}$  durante 2 horas (Contreras *et al.*, 1985). Neste período os parasitas encontraram-se sob estresse nutricional e ao final do período de 2 horas, os parasitas foram incubados na concentração final de  $5,0 \times 10^6$  células/mL em meio TAU3AAG a  $28^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Neste processo os parasitas aderiram às paredes das garrafas de cultivo e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, sendo liberadas no sobrenadante do meio de cultura.

Para obtenção das células epimastigotas aderidas após 24 horas de cultivo no meio de diferenciação, o sobrenadante da cultura foi desprezado, adicionado tampão NKM e as formas aderidas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura com este tampão (Bonaldo *et al.*, 1988).

Para a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas purificadas, foi coletado o sobrenadante da cultura após 72 horas de cultivo e em seguida realizada cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) de acordo com (Contreras *et al.*, 1985).

### **3.4.2. Preparação de extrato proteico de *T. cruzi* Dm28c e análise por *Western blot***

Os extratos protéicos dos parasitas nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas aderidos por 24 horas e tripomastigotas metacíclicos produzidos neste trabalho foram obtidos a partir de  $1 \times 10^8$  células, que foram centrifugadas a  $7.000 \times g$  por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e, lavadas três vezes com tampão PBS. A cada lavagem os parasitas foram centrifugados nas mesmas condições já descritas neste item e, os parasitas foram suspensos em  $55 \mu\text{l}$  de tampão PBS, seguida da adição de  $20 \mu\text{l}$  de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail Tablets - Roche) e  $25 \mu\text{l}$  de tampão de amostra para proteínas 4x. A adição do tampão de amostra para proteínas 4x causa a lise das células e liberação do conteúdo celular, portanto após este passo o extrato foi lentamente homogeneizado em gelo por 5 minutos, seguido de aquecimento a  $95^\circ\text{C}$  por 5 minutos e centrifugação por 1 minuto a  $16.000 \times g$ . Após o preparo dos extratos, os mesmos foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme (Walker, 2002). Foram utilizadas as concentrações de 8 % para o gel de corrida e 6 % para o gel de empilhamento. A

eletroforese foi realizada no tampão de corrida para SDS-PAGE por uma hora a 30 mA em cuba de eletroforese vertical.

A técnica de *Western blot* foi realizada de acordo com (Towbin, Staehelint, & Gordon, 1979). Para tanto, após separação das proteínas por SDS-PAGE seguiu-se com a transferência para membrana de nitrocelulose por três horas a 70 V no tampão de transferência para *Western blot*. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau para verificar a eficiência da transferência e incubada em solução de bloqueio por 16 horas a 4 °C. Posteriormente à incubação, a membrana foi colocada em solução de PBS/Tween 0,1% contendo o anticorpo primário por uma hora em temperatura ambiente e, em seguida, lavada três vezes em PBS/Tween 0,1% por 5 minutos cada lavagem. A membrana foi incubada com PBS/Tween 0,1% contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado à fosfatase alcalina para detecção colorimétrica ou conjugado ao fluoróforo IRDye 680LT (LI-COR) para detecção por fluorescência. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário por uma hora em temperatura ambiente seguida de lavagens conforme descrito acima. No *imunoblot* por detecção colorimétrica, foram utilizados 33 µl do cromógeno NBT e 16,5 µl do substrato BCIP diluídos em tampão para fosfatase alcalina. Para detecção por fluorescência foi utilizado o Scanner Odyssey Li-Cor Biosciences.

### **3.4.3. Ensaios de imunolocalização**

Para todos os ensaios de imunolocalização realizados neste trabalho foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos policlonais procedentes de outros trabalhos, disponíveis no Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR.

Os parasitas, nas diferentes formas de diferenciação celular foram centrifugados a 2.000 x g por 5 minutos, lavados quatro vezes com tampão PBS e suspensos em paraformaldeído 4% para fixação, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células/µl. As células foram aderidas em lâminas, com campos delimitados por teflon previamente tratadas com Poli-L-lisina. Em cada campo foram aderidos  $10^6$  parasitas e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 em PBS durante 2 minutos. Após a permeabilização as células foram lavadas três vezes com PBS e bloqueadas com BSA 4% diluído em PBS por uma hora. Os anticorpos primários foram diluídos em BSA 1% e incubados com os parasitas durante uma hora em temperatura ambiente. Após incubação os parasitas foram lavados cinco vezes com PBS por imersão. O anticorpo secundário, conjugado ao fluoróforo Alexa 488 ou Alexa 594 (Invitrogen), foi adicionado e as etapas de incubação e lavagens repetidas. Para detectar o núcleo e cinetoplasto, as células foram incubadas com DAPI diluído em 1:2000 em PBS para

a marcação do DNA. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS e sobre cada campo foram adicionados 8 µl de n-propil-galato na concentração de 200 µg/ml. As lâminas foram seladas com lamínula e observadas no microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B, sendo que algumas imagens foram processadas por deconvolução utilizando o *software* LAS AF - Leica (Leica-microsystems)..

#### **3.4.4. Ensaios de localização da proteína TcXRNA em parasitas tratados com as drogas puromicina e cicloheximida**

Para verificar a dinâmica de formação dos grânulos que contém TcXRNA em parasitas tratados com drogas que interferem no processo de tradução, os parasitas obtidos durante a metaciclogênese foram previamente tratados com as drogas puromicina e cicloheximida. Para o ensaio de estabilização de polissomos,  $5 \times 10^8$  parasitas/ml foram incubados com 100 µg/ml de cicloheximida por 15 minutos a 28 °C. Para o ensaio de dissociação de polissomos  $2 \times 10^7$  parasitas/ml foram incubados com 2 mM de puromicina por uma hora a 28 °C. Após as incubações, o procedimento de preparação da lâmina para imunofluorescência seguiu os passos do item 3.4.3. O resultado foi analisado em microscopia óptica utilizando o microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B e as imagens foram deconvoluídas utilizando o *software* LAS AF - Leica (Leica-microsystems).

Para avaliar a dinâmica de formação dos grânulos após os tratamentos, foram selecionadas aleatoriamente 100 células de cada etapa da metaciclogênese para contagem do número de grânulos presentes nas células. Através do programa GraphPad Prism 5 foram aplicados o testes estatísticos Média, Desvio Padrão e Teste T Student para verificar se a diferença entre a quantidade de grânulos entre os tratamentos, bem como, entre as distintas formas de diferenciação celular era significativa. Como controle da eficiência das drogas, realizamos os mesmos experimento para análise dos grânulos de TcDHH1, pois segundo Holetz e colaboradores, 2007, existe uma diferença significativa entre o número de grânulos que contém TcDHH1 quando os parasitas são tratados com cicloheximida e puromicina (Holetz *et al.*, 2007).

### **3.5. Analisar a composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA**

#### **3.5.1. Imunoprecipitação do complexo que contém a proteína TcXRNA**

O ensaio de imunoprecipitação da proteína TcXRNA foi realizado para obtenção das proteínas parceiras e dos RNAs alvo do complexo. Os ensaios foram feitos em triplicata.



Para preparação da resina, 75 µl de *beads* magnéticas (Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Sheep anti-Mouse IgG – Life Technologies), previamente lavadas com tampão IMP 0, foram incubadas com 10 µl de anticorpo policlonal anti-TcXRNA por duas horas sob agitação em temperatura ambiente.

Para a obtenção dos extratos citoplasmáticos de *T. cruzi*,  $2 \times 10^9$  parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 x g e lavados três vezes com tampão IMP 0 nas mesmas condições descritas acima. As células foram lisadas com 1 ml de tampão de lise IMP 1 seguidas por sonicação em potência 20% por 3 segundos no sonicador Ultrasonic Processor (Cole-Parmer). A lise dos parasitas foi verificada em microscópio óptico. O extrato citoplasmático foi obtido após centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C e 1 ml desse extrato foi incubado com 20 µl de *beads* magnéticas por uma hora em gelo realizando assim o *Preclearing* com o objetivo de remover moléculas que poderiam se ligar inespecificamente à resina (eBioscience, 2014). Na sequência, as *beads* foram capturadas e o extrato livre de contaminantes foi incubado por 16 horas a 4 °C em agitador orbital, com os 75 µl de *beads* magnéticas previamente incubadas com o anticorpo. Após a incubação, as *beads* magnéticas contendo o complexo ribonucleoproteico de interesse foram capturadas em estante magnética, e lavadas três vezes com tampão IMP 2. O extrato livre de *beads* foi reservado e denominado *Flow Trought* (FT).

Para a obtenção das proteínas imunoprecipitadas, o conteúdo proteico ligado as *beads* foi eluído com 100 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 e após a eluição o pH do eluído foi ajustado para 7,5 – 8,0 com tampão Tris-HCl pH 9,5. As proteínas eluídas foram quantificadas no equipamento Qubit e encaminhadas para espectrometria de massas.

Para a obtenção dos RNAs presentes no complexo contendo TcXRNA, foi realizada imunoprecipitação de TcXRNA nas mesmas condições descritas acima. Porém, a extração dos RNAs foi obtida com uso do reagente TRIzol<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen). Para tanto, as resinas contendo os imunoprecipitados foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente com 500 µl de TRIzol com posterior adição de 100 µl de clorofórmio *RNase free* e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada e os RNAs foram precipitados por 24 horas com 2 volumes de etanol absoluto e 10 % de acetato de sódio, ambos *RNase free*. O precipitado foi centrifugado por uma hora a 22.000 x g a 4 °C. O precipitado foi então lavado duas vezes com etanol 70 % *RNase free* e, após a secagem em temperatura ambiente, o precipitado foi suspenso em 20 µl de água *RNase free* e armazenado em freezer a –80 °C para serem enviadas para sequenciamento no equipamento Illumina.

### **3.5.2. Análise de interação entre as proteínas TcXRNA e TcDHH1**

A interação entre as proteínas TcXRNA e TcDHH1 foi analisada por duas abordagens: a primeira foi através da análise por *Western blot* de amostras imunoprecipitadas, a segunda foi através de análises de co-localização por ensaios de imunofluorescência indireta conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.4.3 respectivamente. O ensaio de imunofluorescência foi realizado com parasitas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento em condições normais e sob estresse nutricional por duas 2 horas com TAU pH 6.0, bem como em epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato por 24 horas e tripomastigota metacíclicos. Foi realizado também o tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina em todas as formas citadas. Os controles pré-imune já haviam sido testados em trabalhos anteriores do grupo (Ferrarini, 2012; Holetz, 2008), assim, realizamos para este experimento o controle para o anticorpo secundário, onde as células foram incubadas apenas com os anticorpos secundários, Alexa 594 e Alexa 488 (ausência do anticorpo primário). Para o ensaio de co-localização os anticorpos primários foram diluídos na concentração de 1:100 seguida da incubação com anticorpo secundário na diluição de 1:200. O resultado foi analisado em microscopia óptica utilizando o microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B. As imagens foram deconvoluídas pelo *software* LAS AF - Leica (Leica-microsystems).

Para análise de co-imunoprecipitação das proteínas, foram realizados ensaios de *Western blot* com alíquotas das amostras obtidas durante o experimento de imunoprecipitação: 20 µl do FT, 50 µl do complexo proteico eluído das *beads* previamente incubadas com anticorpo contra a proteína alvo e 50 µl do complexo proteico eluído das *beads* previamente incubadas com um soro pré-imune, obtido de camundongo, que serviu de controle do experimento. O anticorpo da proteína TcS7, o qual foi gentilmente cedido pelo grupo do Dr. Stênio P. Fragoso, foi utilizado no ensaio de *Western blot* da imunoprecipitação como controle negativo, pois a proteína ribossomal S7 não é constituinte de *P-bodies*. Os anticorpos foram diluídos nas seguintes proporções: TcXRNA (1:250); TcDHH1 (1:100) e TcS7 (1:500). Os anticorpos secundários utilizados foram IRDe 680LT anti-camundongo e anti-coelho (LI-COR) (1:4000) e a membrana foi analisada no equipamento Scanner Odyssey Li-Cor Biosciences.

### **3.5.3. Identificação das proteínas no complexo imunoprecipitado contendo TcXRNA por espectrometria de massas**

As análises por espectrometria de massas foram feitas usando o equipamento LTQ Orbitrap XL - ETD, e as amostras foram processadas pela equipe da Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ. Previamente, as amostras

de proteínas obtidas em triplicata passaram por um processo de remoção do detergente, através de uma coluna Pierce<sup>®</sup> Detergent Removal Spin Columns (Thermo Scientific). As colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 1.500 x g para remover o tampão de condicionamento da coluna, na sequência a coluna foi lavada duas vezes com tampão PBS e 50 µl das amostras foram adicionadas nas colunas e incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente, na sequência a mostra foi centrifugada e coletada livre de detergente. A quantidade de proteína obtida em cada ensaio (~5 µg/ml) foi reduzida com ditioneitol 1 mM por 30 minutos, alquiladas com iodoacetamida (IAA) 5.5 mM durante 20 minutos ao abrigo da luz e, em seguida, adicionou-se 4 volumes de 20 mM de bicarbonato de amônio. A digestão com tripsina foi realizada durante 16 horas, com adição da enzima (Promega) em uma razão de enzima/proteína de 1/50. Peptídeos tripticos foram purificados usando colunas de RP-C18 Stage Tip antes da análise por espectrometria de massas (MS) (Rappsilber *et al.*, 2003). A amostra foi analisada em triplicata técnica.

Digestões tripticas foram submetidas à cromatografia líquida fase reversa (RP), acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. Os experimentos foram realizados com um Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific, EUA), conectado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (espectrometria de massas RPT02H PDTIS / Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná), equipado com uma fonte iônica nanoeletrospray (S/T Phoenix). A separação cromatográfica dos peptídeos ocorreu em um capilar de sílica fundido de 15 centímetros (75 µm de diâmetro interno) empacotada com resina de fase reversa ReproSilPur-C18-AQ 3µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch – Entringen, Alemanha).

Os peptídeos foram injetados na coluna com um fluxo de 250 nl/minuto e, subsequentemente, eluídos em gradiente de acetonitrilo (5 a 40%) em 0,1 % de ácido fórmico por 120 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo dependente de dados para alternar automaticamente entre aquisição MS e MS/MS (MS<sup>2</sup>). Um perfil completo dos espectros MS (de 350-1.650 em m/z) foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução R = 60.000 em m/z 400 (após a acumulação de um valor alvo de 1.000.000 no íon *trap linear*). Os dez íons mais intensos foram sequenciados isoladamente e fragmentados no íon *trap linear* usando a dissociação induzida por colisão em um valor-alvo de 10.000. Ex-íons alvos selecionados para o MS/MS foram excluídos dinamicamente durante 90 segundos. O tempo total do ciclo foi de aproximadamente 3 segundos. As condições gerais de espectrometria de massa foram: spray de tensão, de 2,4 kV; temperatura no tubo de transferência de íon de 100 °C; pressão de gás de colisão de 1,3 mTorr; energia de colisão normalizada usando banda larga no modo de ativação de 35 % para MS<sup>2</sup>. O limiar de seleção de íons foi 250 contagens para MS<sup>2</sup>. Uma ativação q = 0,25 e tempo de ativação de 30 ms foi

aplicado em aquisições MS2. A opção de “lock mass” foi ativada em todas as análises completas para melhorar a precisão das massas de íons precursores (Olsen *et al.*, 2005).

Os espectros obtidos por MS/MS foram tratados para quantificação e validação utilizando a plataforma MaxQuant (versão 1.4.1.2) (Cox & Mann, 2008). Para a identificação de proteínas, os dados obtidos foram usados para busca em base de dados de espectros de fragmentos de massa foi realizada utilizando o algoritmo Andrômeda (Cox *et al.*, 2011), que está integrado no ambiente MaxQuant. A identificação de proteínas foi baseada nas sequências de proteínas na base de dados de *T. cruzi* (cepa CI Brener disponível em TriTrypDB).

### **3.6. Produzir linhagens de *T. cruzi* expressando TcXRNA fusionada às etiquetas GFP e FLAG**

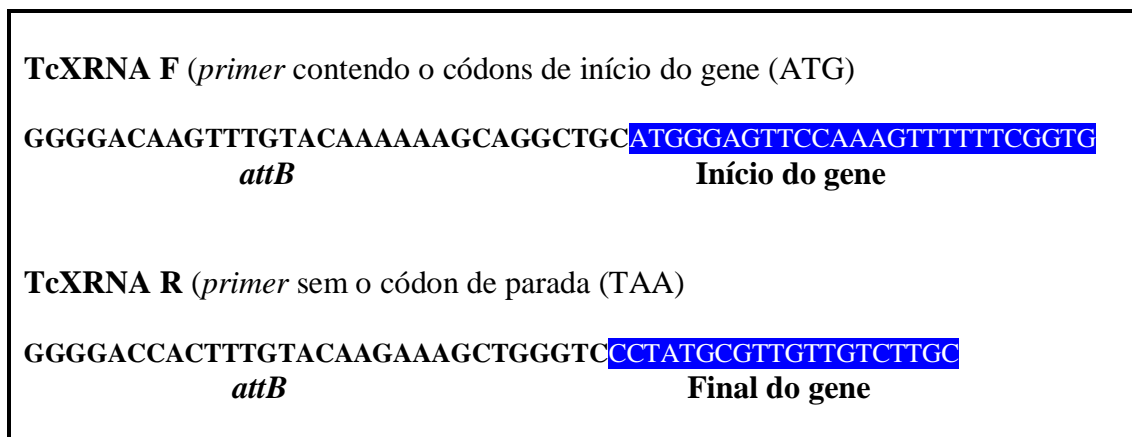
Para produzir linhagens mutantes de *T. cruzi* expressando a proteína TcXRNA fusionada às etiquetas FLAG e GFP, foi preciso construir vetores com o sistema Gateway® (Invitrogen). A sequência do gene correspondente a proteína TcXRNA foi amplificada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). O produto purificado foi inserido por recombinação homóloga no vetor de entrada pDONR™221 de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, o vetor de entrada foi utilizado com entrada para as recombinações nos vetores de destino pTcGFP e pTcFLAG (ambos vetores para fusão carboxi-terminal). Os vetores foram transfectados por eletroporação em parasitas de linhagem selvagem. Abaixo cada etapa será descrita em detalhes.

#### **3.6.1. Extração de DNA genômico de *T. cruzi***

Um total de  $5 \times 10^7$  parasitas foram centrifugados por 2 minutos a 3.000 x g. As células foram lavadas três vezes com PBS e suspensas em 350 µl de tampão TELT por inversão do tubo. A suspensão foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência foram adicionados 150 µl de fenol-clorofórmio e prosseguiu-se com centrifugação por 5 minutos a 13.000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado para adição de 2 volumes de etanol absoluto. A solução foi misturada e centrifugada por 10 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol 70% seguido por centrifugação a 13.000 x g por 5 minutos. Após as lavagens o precipitado seco foi suspenso em 100 µl de água ultrapura com resistividade 18.2 e mantido a 4°C.

### 3.6.2. Amplificação do gene de TcXRNA por PCR a partir de DNA genômico

Para permitir a recombinação do produto de PCR com a sequência *attP* do vetor de entrada, da plataforma Gateway, foram adicionadas sequências *attB* às extremidades 5' dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *Forward* (F) e *Reverse* (R), ilustrados na figura 3.1.



**Figura 3.1: Sequências dos primers sintetizados para amplificação do gene TcXRNA.** *Forward* (F) e *Reverse* (R). Em negrito, a sequência *attB* adicionada à região 5' de ambos primers. Com realce em azul, início e final do gene com códon ATG e sem códon TAA respectivamente. (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen).

A amplificação do gene de TcXRNA foi realizado sob condições padronizadas (Tabela 3.1) utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), a qual apresenta atividade de correção exonuclease 3'-5' permitindo assim menor taxa de erro na amplificação.

Para a reação foram utilizados 150 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 50 µl. A ciclagem consistiu de um passo inicial de 3 minutos a 96 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 96 °C, 30 segundos a 55 °C e 5 minutos a 68 °C. A reação de PCR foi realizada na presença de um controle negativo, o qual não continha DNA genômico.

Tabela 3. 1 Concentrações utilizadas para a reação de PCR

Reagentes	Concentração estoque	Concentração final
Tampão	10X	1X
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	2 mM
dNTP	10 mM	0,2 mM
Primers	10 pmol/µl	0,4 pmol/µl
Taq	1 U/0.2 µl	0,02 U/µl
DNA	100 ng/µl	4 ng/µl

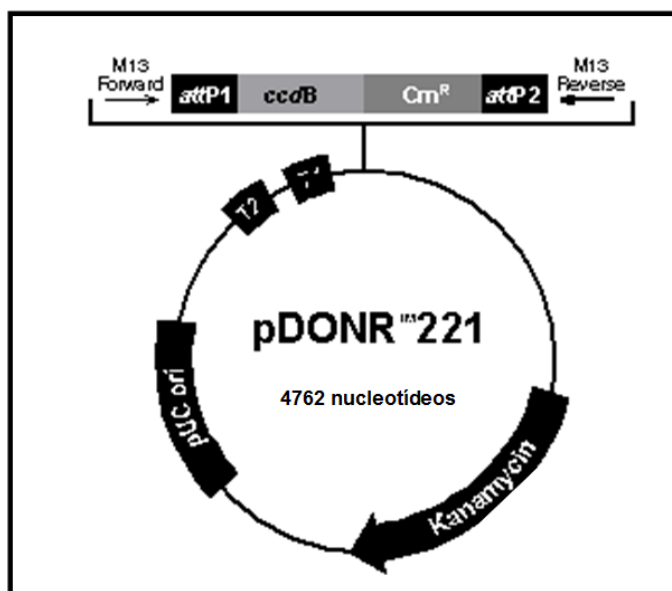
### 3.6.3. Purificação do produto de PCR

As amostras de PCR foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x para concentração final de 1x e aplicadas em gel de agarose 1%. A corrida foi feita imersa em tampão TBE, a 100 V por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio na concentração de 100 µg/ml, visualizado em transluminador LPIX e fotografado em câmera *Kodak Digital Science*, com *software* LPIX (Loccus biotechnology).

A banda contendo o *amplicon* correspondente ao gene de TcXRNA foi excisado com o auxílio de um bisturi e o material foi purificado com auxílio do kit GFX™ PCR DNA and Gel band Purification (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante e o rendimento da purificação foi quantificado por espectrofotometria com uso do equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

### 3.6.4. Recombinação do gene de TcXRNA no vetor pDONR™221

Após a purificação do produto de PCR correspondente ao gene de TcXRNA, o mesmo foi recombinado no vetor pDONR™221 (Figura 3.2) pela tecnologia Gateway conforme orientações do fabricante. Para tanto, foi feita uma reação que continha 500 ng do produto de PCR, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, 2 µl da enzima BP clonase™ II, num volume final de 8 µl completados com TE, que foi incubada a 25 °C por 16 horas. Após esta etapa, foram adicionados 2 µg de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37 °C.



**Figura 3.2:** Mapa do vetor de entrada pDONR™221 (Invitrogen). pUC ori: origem de replicação de alta cópia. *attP1/attP2*: sequência de 200 pb presente no vetor pDNOR para recombinação com sítio *attB* presente no produto de PCR. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDNOR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio *attB* do produto de PCR. *Kanamycin*: gene de resistência à

canamicina. CmR: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 *Forward* e *Reverse*: Oligonucleotídeos iniciadores do vetor utilizados para sequenciamento (FONTE: Catálogo *Gateway® Technology* Invitrogen).

### **3.6.5. Transformação de bactérias cálcio-competentes**

A reação de recombinação entre o gene de TcXRNA e o plasmídeo pDONR<sup>TM</sup>221 foi incubada com 50 µL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB e incubação sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por uma hora.

Alíquota de 100 µL foi espalhadas em meio LB-ágar adicionado de antibiótico (meio seletivo) de acordo com a resistência conferida pelo vetor e incubadas a 37 °C por 18 horas. As colônias crescidas nessas condições foram analisadas pelo método de palitagem, conforme descrito no item a seguir.

### **3.6.6. Verificação de clonagem pelo método de palitagem (*Toothpick*)**

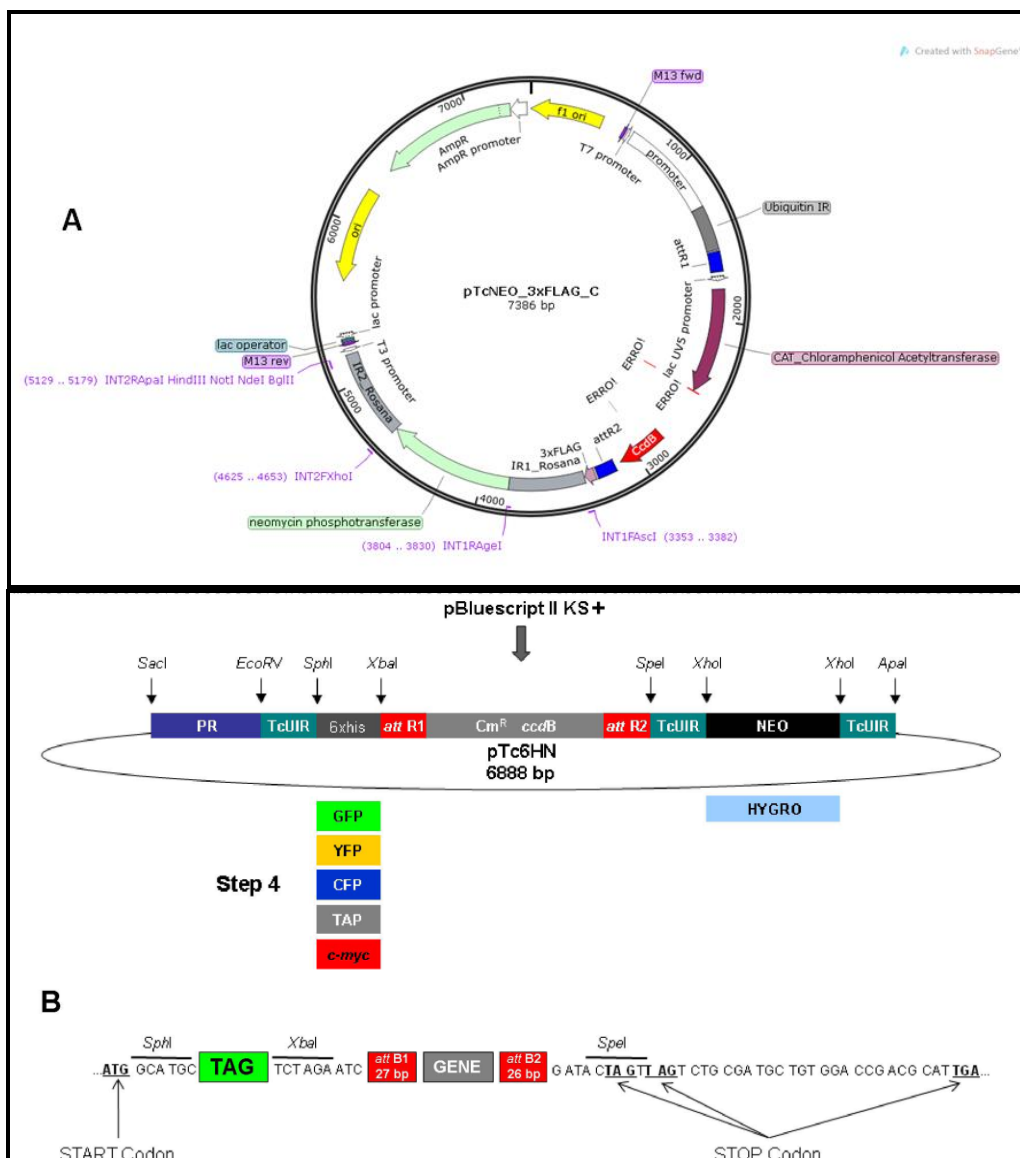
Após a seleção por antibiótico apropriado, cada colônia foi removida com um palito esterilizado e transferida para um tubo de 1,5 mL. Em cada tubo foi adicionado 15 µL de solução de lise e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 13.000 x g por 1 minuto e aplicado em gel de agarose 0,8 % não submerso em tampão TBE e submetido à diferença de potencial de 80 V. Uma vez que as amostras entraram na malha do gel de agarose, o volume de tampão TBE foi completado e a voltagem alterada para 100 V. O gel foi corado através da imersão em solução de brometo de etídeo e analisado em luz ultravioleta (UV).

### **3.6.7. Propagação e purificação dos vetores contendo o gene de TcXRNA**

Após identificar as colônias que continham o vetor com o tamanho esperado, cinco destas colônias foram selecionadas aleatoriamente e com o auxílio de um palito esterilizado, uma porção de cada colônia foi inoculada em 5 ml de meio líquido de LB e cultivada por 16 horas sob agitação de 200 rpm a 37 °C para propagação. Estas culturas foram utilizadas para extração e purificação dos plasmídeos pelo método da lise alcalina. Neste caso, foi utilizado o kit Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. Os vetores purificados foram sequenciados para verificar a exatidão nas sequências de nucleotídeos pertencentes ao gene de TcXRNA clonado.

### 3.6.8. Recombinação do gene de TcXRNA nos vetores pTcGFP e pTcFLAG

O vetor pDONR contendo o gene de interesse foi usado como vetor de entrada para recombinação nos vetores pTcFLAG e pTcGFP (Batista *et al.*, 2010) ambos construídos no Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR (Figura 3.3) estes vetores seguem os mesmos princípios adotados pela plataforma Gateway. Chamada de reação LR, a recombinação se baseia na troca do inserto entre os vetores de entrada e de destino. Portanto, 150 ng do vetor de entrada pDONR<sup>TM</sup>221 contendo o gene de TcXRNA, 150 ng do vetor de destino pTcGFP ou pTcFLAG e 2 µl da enzima LR clonase<sup>TM</sup> II, num volume final de 8 µl ajustado com TE, foram incubados a 25 °C por 16 horas. Após esta etapa, foram adicionados 2 µg de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37 °C. Após a reação de recombinação, até a obtenção final dos plasmídios foram seguidos os experimentos descritos nos itens 3.6.5, 3.6.6 e 3.6.7.



**Figura 3.3: Esquema dos vetores pTcFLAG e pTcGFP produzidos no Instituto Carlos Chagas. A: Mapa do vetor pTcFLAG. B: Esquema do vetor pTcGFP (aqui o esquema mostra**



a etiqueta disponível na porção amino-terminal, porém neste trabalho nós utilizamos o vetor com a etiqueta na porção carboxi-terminal – disponível no Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR).

### **3.6.9. Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção de parasitas transfectantes**

Para cada transfecção, um total de  $1 \times 10^8$  parasitas na forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento foram centrifugados por 5 minutos a  $7.000 \times g$ , lavados com PBS estéril e suspensos em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida foram coletados 0,4 mL desta suspensão (referente a  $4 \times 10^7$  células) e transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mm pré-resfriada. Os vetores pTcGFPXRNA e pTcFLAGXRNA foram adicionados às células em uma concentração 50  $\mu\text{g}$  e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. Como controle da seleção, formas epimastigotas foram eletroporadas sem a presença dos vetores. A mistura foi submetida à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500  $\mu\text{F}$  em eletroporador Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad) e mantida por 10 minutos no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25  $\text{cm}^3$  contendo 10 mL de meio LIT adicionado de penicilina e incubadas a 28 °C durante 24 horas. Após este período de recuperação, o processo de seleção dos parasitas foi feito pela adição de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 no meio LIT. Aproximadamente 72 horas após a adição da droga foi feita uma diluição 1:4 dos parasitas em meio contendo 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418.

As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que fosse observada a inibição total do crescimento celular na cultura controle, que foi eletroporada sem plasmídios. As células resistentes à droga foram selecionadas em intervalo de 10 a 30 dias.

## **3.7. Análise da estabilidade de mRNAs após nocaute da proteína TcXRNA**

### **3.7.1. Ensaio tipo *Southern blot* para identificar número de cópias do gene de TcXRNA**

O nocaute gênico é uma ferramenta de genética reversa muito utilizada para estudar a função dos genes em *T. cruzi* (De Souza *et al.*, 2010; MacRae *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

A estratégia de nocaute utilizada neste trabalho foi por recombinação homóloga com as marcas de seleção neomicina e higromicina (De Souza *et al.*, 2010). Para que o nocaute por este sistema seja viável é necessário determinar se o gene, o qual se quer nocautear, seja cópia única, pois cada alelo do gene será substituído por uma das marcas de seleção.

Para comprovar a cópia única do gene da TcXRNA, realizamos o teste de *Southern blot*, o qual permite a detecção da sequência de DNA de interesse através da marcação com sonda específica (Southern, 1975). A técnica de *Southern blot* consistiu na digestão do DNA genômico de *T. cruzi* com enzimas de restrição (Tabela 3.2 e Figura 3.4) selecionadas de

forma que nenhum e/ou apenas um corte fosse feito na região codificadora da TcXRNA (4,3 Kb). Na sequência, o DNA genômico digerido com as respectivas enzimas foi aplicado em gel de agarose e o mesmo foi transferido para uma membrana de nylon. Para a produção da sonda foram utilizados *primers* específicos para uma região de 2,4 kb dentro da ORF de TcXRNA (Quadro 3.1) que não corresponde ao domínio conservado e o produto de PCR foi purificado do gel de agarose com o auxílio do kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel band Purification Kit (GE Healthcare). A marcação da sonda radioativa seguiu a técnica *Nick Translation* (Invitrogen) com nucleotídeos marcados com fósforo radioativo (P<sup>32</sup>). Após a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana, a mesma foi hibridizada com a sonda marcada e exposta a filme autoradiográfico (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP – GE Healthcare) durante 3 dias a -80°C.

Quadro 3.1: Sequências de *primers* para a produção da sonda para *Southern blot* e para a confirmação do nocaute.

<i>Primer</i>		Sequência	Amplicon (pb)
Sonda	F R	5'GTGCGCCCGCAGGTATTT3' 5'AATTTCCCGCGGGACAGTA3'	2409
NEO	F R	5'GGGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG3' 5'GGGGAATTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAGAA3'	800
Higro	F R	5'GGGGAAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC3` 5'GGGTGAATTCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG3`	1100
Inter DW	F	5'GCGCGGATCCCATGAAGTGAACAAGGCAATACA3'	-
Ext DW	R	5'CCATGTGTATGTGTGCGTACAAATTAG3'	-

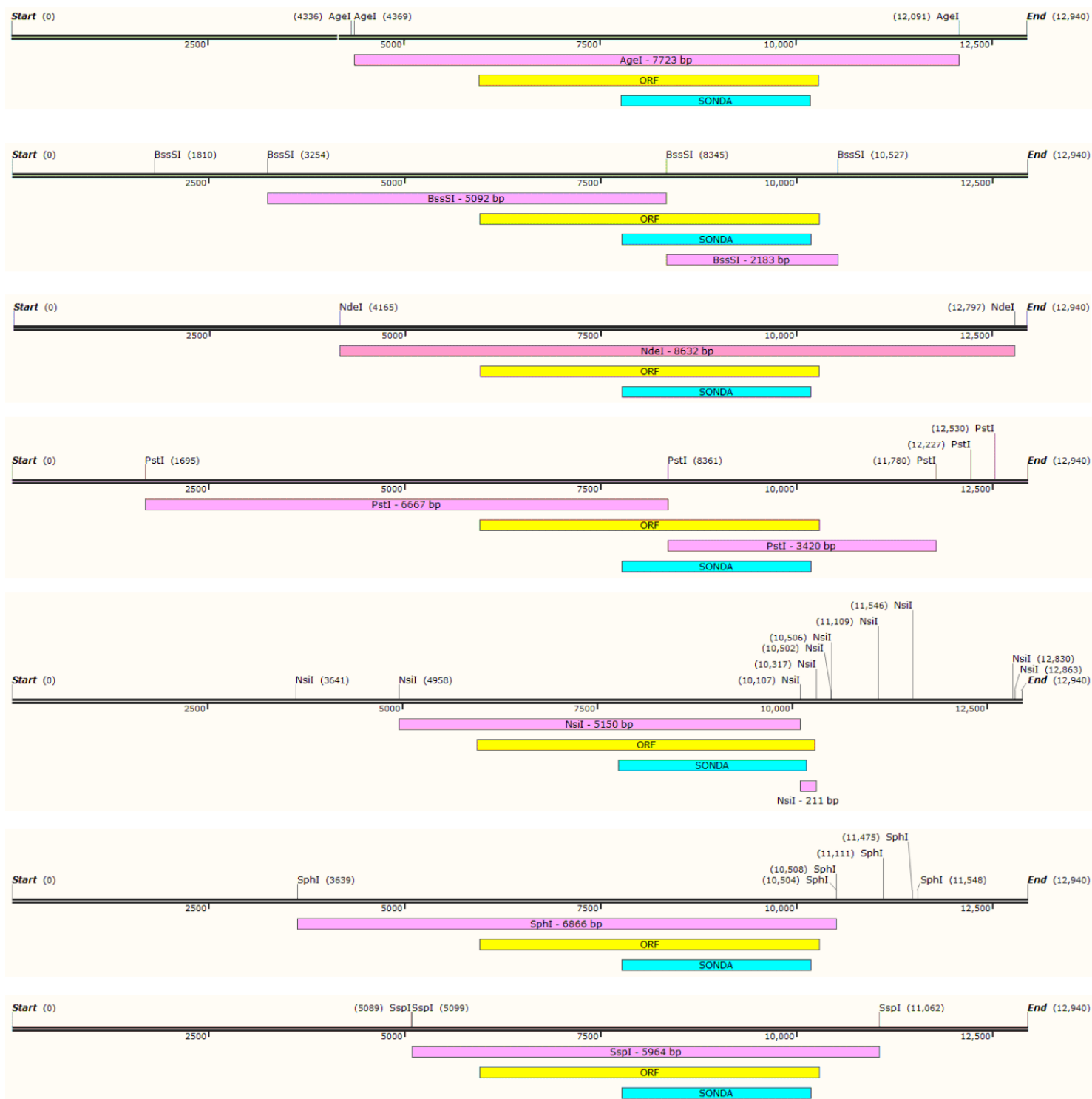
F: sequência *forward*. R: sequência *reverse*. pb: pares de bases. Sonda: *Primers* para produção da sonda para *Southern blot*; NEO: *primers* que amplificam gene da neomicina; Higro: *primers* que amplificam gene da higromicina; Inter DW: *primers* que amplificam parte da sequência intergênica *downstream* (utilizado para a produção do produto transfectado) e Ext DW: *primers* que amplificam parte da sequência intergênica *downstream* a qual não compreende o produto transfectado.

Tabela 3.2: Enzimas de restrição utilizadas para digestão do DNA e análise por *Southern blot*

Enzimas de restrição	Fragmento gerado (pares de bases)	Sítio de clivagem	Cortes
AgeI	7723	ACCGGT	zero
BssSI	5092 / 2183	GCGCGC	um
NdeI	8632	CATATG	zero
PstI	6667 / 3420	CTGCAG	um
NsiI	5149 / 210	ATGCAT	um
SphI	6866	GCATGC	zero
SspI	5964	AATATT	zero

A coluna de cortes representa a quantidade de clivagens realizada por determinada enzima no gene de TcXRNA.

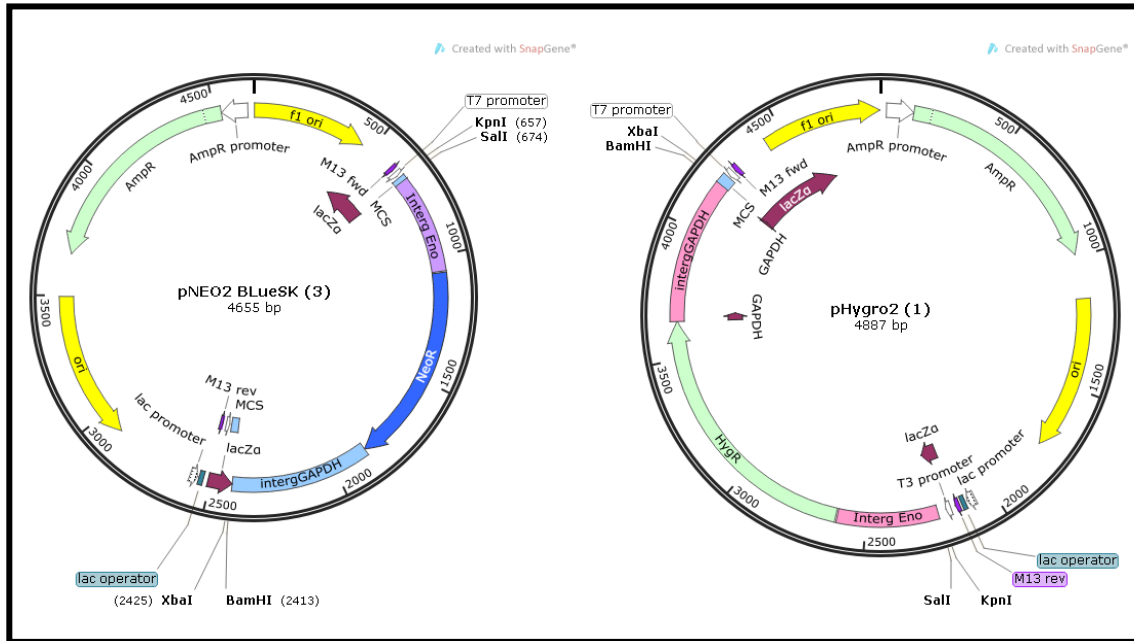
## Sequência XRNA para Southern 12,940 bp



**Figura 3.4: Esquema dos cortes realizados pelas enzimas utilizadas no *Southern blot*.** Barra na cor preta representa toda ORF e regiões intergênicas de TcXRNA e as regiões onde ocorrem as digestões. Barra na cor rosa representa o tamanho dos produtos das digestões enzimáticas. Barra amarela representa ORF de TcXRNA. Barra na cor azul representa a sonda e o local onde ocorreu a hibridização.

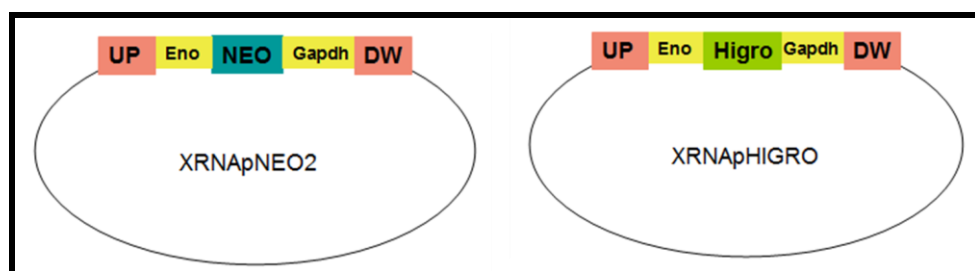
### 3.7.2. Obtenção de vetores para nocaute da proteína TcXRNA

Os vetores utilizados para o nocaute em *T. cruzi* foram construídos no Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ por De Souza e colaboradores, 2010 a partir do vetor pBlueScript. Esses vetores chamados pNEO2 BlueSK e pHygro2 contem respectivamente o gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina - G418 (NEO), e o gene *hph*, que codifica a enzima higromicina fosfotransferase e confere resistência ao antibiótico higromicina B (HIGRO) (Figura 3.5).



**Figura 3.5:** Mapa dos vetores para nocaute em *T. cruzi*. À esquerda o vetor pNEO2 BlueSK contendo gene *npt* (NEOR). À direita o vetor pHygro2 contendo o gene *hph* (HygroR). Ambos apresentam os devidos sítios de restrição para a clonagem das regiões intergênicas.

Para obter os vetores para nocaute de TcXRNA, foi necessário flanquear os genes de resistência com as regiões intergênicas do gene de TcXRNA a jusante (*downstream* - DW) e a montante (*upstream* - UP) (Figura 3.6).



**Figura 3.6:** Esquema da construção dos vetores usados para nocaute de TcXRNA. Os vetores mostram as intergênicas *upstream* (UP) e *downstream* (DW) do gene de TcXRNA flanqueando os genes de resistência Neomicina (NEO) ou Higromicina (HIGRO).

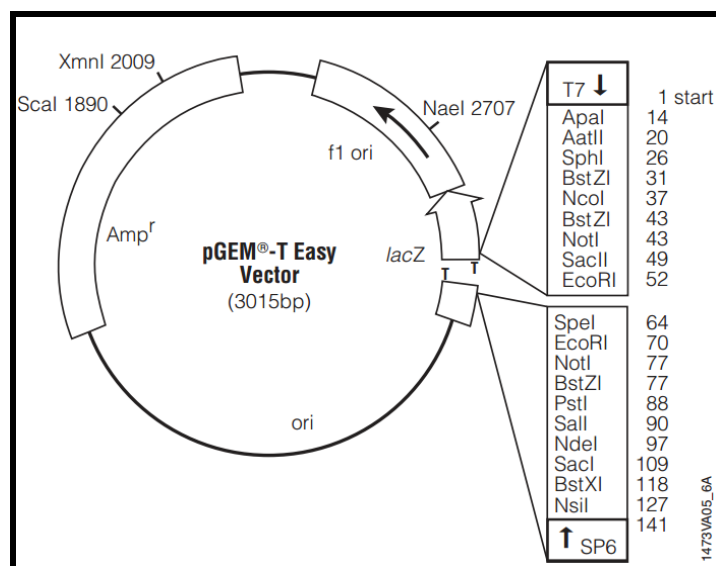
As regiões intergênicas do gene de TcXRNA foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* disponíveis no Quadro 3.2. A estes iniciadores foram adicionados sítios de enzimas de restrição apropriados na extremidade 5' para permitir que os produtos de PCR fossem coesivos com os vetores pNEO2 e pHygro2 após a digestão de ambos com as mesmas enzimas.

Quadro 3.2: Sequência de primers para clonagens nos vetores para nocaut

<i>Primer</i>		Sequência do <i>primer</i> com os sítios de clivagem	Amplicon (pb)
Inter UP	F	5'TCCGGGGGTACC TCCGGTCACACACTTCGC3'	356
	R	ATGCGTCGACGCACCTCCGTGACACAAAGAC3'	
Inter DW	F	5'GCGCGGATCCCATGAAGTGAACAAGGCAATACA3'	326
	R	5'GGGCTCTAGACAGAAGCATTGCACAAAAAGAG5'	

F: sequência *forward*. R: sequência *reverse*. pb: pares de bases. Inter UP; *primers* que amplificam parte da região intergênica *upstream*. Inter DW: *primers* que amplificam parte da região intergênica *downstream*. Os sítios de clivagem das enzimas de restrição KpnI, SalI, BamHI e XbaI estão representados em cores.

Para amplificação das regiões intergênicas foram utilizados como molde 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo tampão de reação com MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase produzida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP. A ciclagem da reação de PCR consistiu de um passo inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e um passo final de 72 °C por 10 minutos, o qual permite a inserção de uma adenosina a cada extremidade 3' livre dos produtos de PCR. Essa abordagem permite a clonagem de tal produto em um vetor de clonagem linearizado que possui extremidades complementares 3'-timidina não pareadas, como é o caso do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (Figura 3.7). As clonagens estão detalhadas nos itens a seguir.



**Figura 3.7:** Mapa do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy utilizado nas clonagens.

### 3.7.3. Clonagem das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* em vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy

A clonagem das sequências intergênicas *upstream* e *downstream* (chamadas aqui de inserto) seguiu as instruções o fabricante: 50 ng de vetor foram misturados a 500 ng de inserto em presença de 3 unidades da enzima T4 ligase (Promega) em um volume total de 10 µl. A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C. Um volume de 2 µl das reações destas ligações foram transformadas em bactérias *E. coli* DH5α, conforme descrito no item 3.6.5. As células foram cultivadas em LB-ampicilina sólido contendo IPTG Xgal e, após a incubação de 16 horas a 37<sup>0</sup>C foi possível observar a formação de colônias brancas isoladas. A confirmação da clonagem foi realizada pelo método de PCR de colônias, onde uma porção da colônia é colocada em um tubo para PCR adicionado do mix para reação de PCR descrito no item 3.7.2. Os clones de bactérias foram propagados em meio LB líquido para purificação dos vetores pelo método da lise alcalina com auxílio do kit Qiaprep<sup>®</sup> *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Após a purificação, os vetores foram enviados para sequenciamento e um clone de cada intergênica foi utilizado para a clonagem nos vetores pNEO2 e pHygro2.

### 3.7.4. Clonagem das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* em vetor pNEO2 BlueSK e pHygro2

Para clonar as intergênicas nos vetores de nocaute, foi necessário retirá-las do vetor pGEM e ao mesmo tempo linearizar os vetores de nocaute. Iniciou-se esse primeiro passo com a clonagem da intergênica *upstream*. Portanto 5 µg do vetor pGEM contendo a intergênica *upstream* e 5 µg dos vetores de nocaute foram digeridos separadamente com 10 U de cada enzima KpnI e *SalI* (New England Biolabs) em solução contendo tampão 2 em

volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 2 horas e a purificação do DNA digerido foi realizada com o auxílio do kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel band Purification (GE Healthcare) após separação dos fragmentos em gel de agarose 1%. Após purificados, vetores e insertos foram ligados na proporção de 1:20 respectivamente, adicionando 2 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), 4 µL de tampão 10X da T4 DNA ligase em volume final de 15 µL. A incubação foi realizada por 16 horas a 16 °C e esta reação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5α cálcio-competentes, conforme item 3.6.5. A verificação da clonagem foi realizada através do método de PCR de colônias descrito no item 3.7.3 e os possíveis plasmídeos recombinantes foram posteriormente propagados em meio LB líquido e purificados utilizando o sistema Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. A confirmação da orientação de clonagem da região *upstream* nestes plasmídeos foi feita por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Intergênica *upstream* F e Intergênica *upstream* R (Quadro 3.2). A ciclagem utilizada foi a mesma para a produção das intergênicas descrita no item 3.7.2. Estas construções foram denominada de TcXRNA-UP-pNEO2 e TcXRNA-UP-pHygro2.

Para clonar as intergênicas downstream nos vetores de nocaute os mesmos princípios de digestão e clonagem foram adotados, porém as enzimas utilizadas para essa região foram BamHI e XbaI e, além disso os vetores de nocaute digeridos eram aqueles que já continham a intergênica *upstream* clonada. A confirmação da orientação de clonagem da região *downstream* nestes plasmídeos foi também feita por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Intergênica *downstream* F e Intergênica *downstream* R (Quadro 3.2). A ciclagem utilizada foi a mesma para a produção das intergênicas descrita no item 3.7.2. Esta construções foram denominada de TcXRNApNEO2 e TcXRNApHygro2.

Após a confirmação da presença das duas intergênicas nos vetores para nocaute de TcXRNA, foi realizada uma PCR para a amplificação de todo o conjunto a ser transfectado (chamado agora de Fragmento de DNA/KO). Para essa reação, foram utilizados os iniciadores Intergênica *upstream* F e Intergênica *downstream* R. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo tampão de reação com MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase produzida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP. Para DNA molde foram utilizados 12 ng de cada vetor. A ciclagem para esta PCR consistiu de: um passo inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 3 minutos e um passo final de 72 °C por 5 minutos.

A produção do Fragmento de DNA/KO para transfecção foi feita nas mesmas condições descritas acima, porém em maior volume. A purificação dos Fragmentos de



DNA/KO foi feita por eletroeluição onde, após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1%, o *amplicon* do fragmento esperado foi excisado do gel e submetido a corrente elétrica de 80 V em tampão TBE. Após a eletroeluição o material foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 por 16 horas. Na sequência o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e o precipitado suspenso em água ultrapura com resistividade 18.2. A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria com uso do equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). Um total de 10 µg e do fragmento foi usado para transfectar *T. cruzi* conforme descrito no item 3.6.9.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise da expressão e da localização celular da proteína TcXRNA

#### 4.1.1. A proteína TcXRNA é composta por 4.326 pares de bases e possui peso molecular de 162,05 kDa

A organização do gene TcXRNA foi o primeiro item a ser avaliado. Genomas de diferentes cepas de *T. cruzi* estão anotados em bancos de dados como *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Database for genomics of Trypanosomatids* (TriTrypDB), e ao contrário da anotação obtida para o gene TbXRNA no genoma de *T. brucei*, onde o gene está anotado como uma única sequência foi verificado que em *T. cruzi* este gene está anotado como mais de uma sequência apresentando diferentes pesos moleculares para duas cepas distintas (CL Brener e Sylvio) (Tabela 4.1). Todavia, em um trabalho prévio, nosso grupo realizou a amplificação do gene na cepa *T. cruzi* Dm28c, utilizando vários pares de iniciadores, e conseguiu obter a sequência completa do gene, com 69% de similaridade com a sequência nucleotídica do mesmo gene em *T. brucei*, verificando assim, que a anotação do gene TcXRNA em *T. cruzi* está errada (dados não publicados).

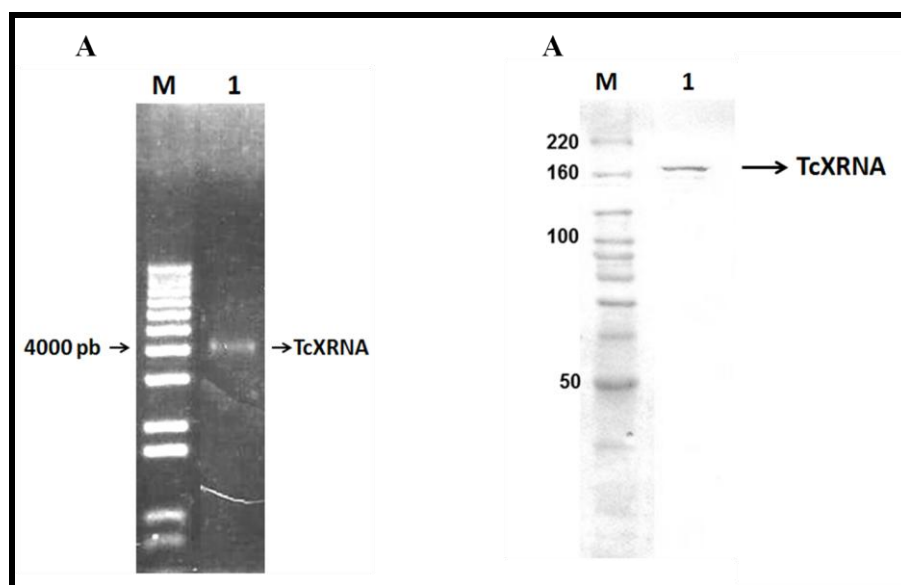
Tabela 4.3: Sequências gênicas do gene TcXRNA em diferentes cepas disponíveis em banco de dados

Cepa	Sequência gênica	Banco de dados	Peso molecular kDa
CL Brener	Tc00.1047053507817.80	NCBI	93,1
	Tc00.1047053506351.9	NCBI	26,5
	Tc00.1047053505939.89	NCBI	30,6
	Tc00.1047053427303.10	NCBI	51,9
Sylvio	TCSYLVIO_002495	TriTrypdb	185,5
	TCSYLVIO_004952	TriTrypdb	44,4
Dm28c	ESS62976.1	NCBI	151,4

Recentemente, o genoma da cepa Dm28c do *T. cruzi* foi sequenciado e depositado no banco de dados do NCBI incluindo assim o gene de TcXRNA (NCBI, 2014). Porém, a proteína anotada apresenta 1350 resíduos de aminoácidos, o que representa peso molecular de 151,44 kDa (Tabela 4.1), ao contrário da sequência identificada pelo nosso grupo, a qual codifica para uma proteína de 162.05 kDa. Além disso, comparando a sequência do gene de TcXRNA da cepa Dm28c depositada com a sequência obtida pelo nosso grupo verifica-se que o códon ATG de início do gene da sequência anotada está a uma distância de 279 nucleotídeos após o códon ATG de início do gene sequenciado pelo nosso grupo.

Devido as dificuldades em determinar a sequência completa do gene com base na anotação do banco de dados e assim determinar a massa molecular da proteína TcXRNA,

foram utilizados métodos experimentais de biologia molecular para identificar com maior precisão o tamanho da sequência da proteína. Por PCR foi possível amplificar um produto de aproximadamente 4.000 pb que corresponde a sequência do gene de TcXRNA, como demonstrado na Figura 4.1A. Com o soro policlonal obtido previamente pelo grupo (Ferrarini, 2012), através da técnica de *Western blot*, foi possível detectar uma proteína cuja a massa era de aproximadamente 160kDa, logo, isso confere com o valor teórico de 162,05 kDa que seria determinado com base em uma sequência do gene sendo em torno de 4.000 pb como estimado pelo nosso grupo (Figura 4.1B).

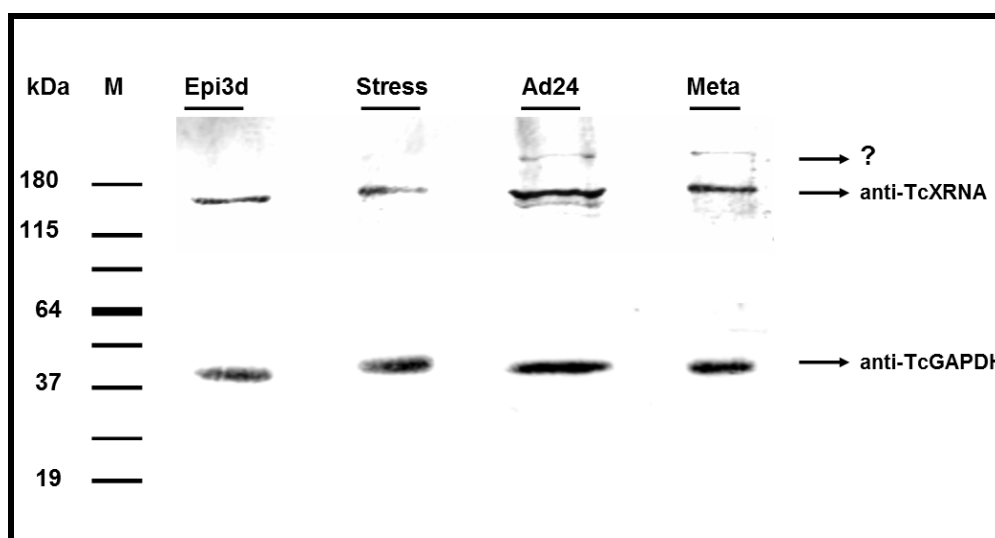


**Figura 4.1: Análise para determinação do tamanho da sequência codificadora do gene de TcXRNA e detecção da proteína TcXRNA.** A) Análise em gel de agarose 1% do produto de PCR correspondente a sequência codificadora do gene TcXRNA. M: marcador de peso molecular em pares de bases (pb) (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). 1: *amplicon* do gene de TcXRNA obtido por PCR. B) Análise tipo *Western blot* para detecção da proteína TcXRNA. 1: Soro Imune. M: marcador de peso molecular em kDa (BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder- Invitrogen).

#### 4.1.2. A proteína TcXRNA é constitutivamente expressa e está localizada em *foci* citoplasmáticos durante a metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi*

A diferenciação de formas epimastigotas do *T. cruzi* em uma forma não replicativa e infectiva tripomastigota metacíclica é um processo chamado metaciclogênese, o qual pode ser realizado *in vitro* sob condições quimicamente definidas (Bonaldo *et al.*, 1988). Com o soro policlonal também foi possível verificar a expressão da proteína ao longo da metaciclogênese de *T. cruzi* através de ensaios de *Western blot*, usando extratos protéicos das formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas submetidos a estresse nutricional, epimastigotas aderidos ao substrato por 24 horas (Ad24h) e nas formas

tripomastigotas metacíclicas. Como mostra a Figura 4.2, a proteína TcXRNA é expressa em todas as formas, contudo é possível notar que nas formas epimastigotas aderidas ao substrato e tripomastigota metacíclicas o anticorpo detecta também uma banda de massa molecular superior a 180 kDa. Apesar de não sabermos ainda a explicação disso, acreditamos que isso poderia representar alguma interação forte proteína-proteína, ou até mesmo um processamento diferencial do pré-mRNA produzindo duas isoformas da proteína TcXRNA nestas etapas da metaciclo gênese *in vitro*. O anticorpo policlonal anti-TcGAPDH foi utilizado como normalizador para verificar a quantidade de proteína presente em cada extrato.

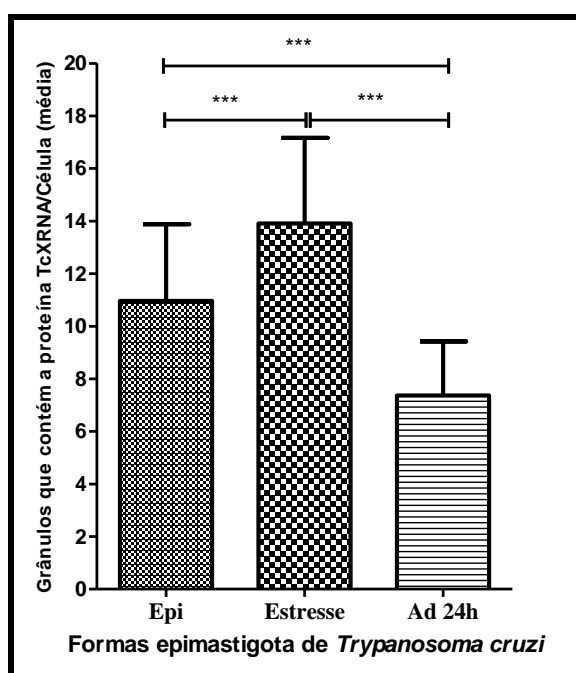


**Figura 4.2: Análise por Western blot para verificar a expressão da proteína TcXRNA ao longo da metaciclo gênese de *T. cruzi*.** A diluição do anticorpo de camundongo anti-TcXRNA utilizada foi de 1:250. M: Marcador de peso molecular em kDa - (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen). Epi3d: Extrato proteico de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Stress: Extrato proteico de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento após 2 horas de estresse nutricional. Ad24: Extrato proteico de formas epimastigota em diferenciação aderidas ao substrato após 24 horas. Meta: Extrato proteico de formas tripomastigotas metacíclicas.

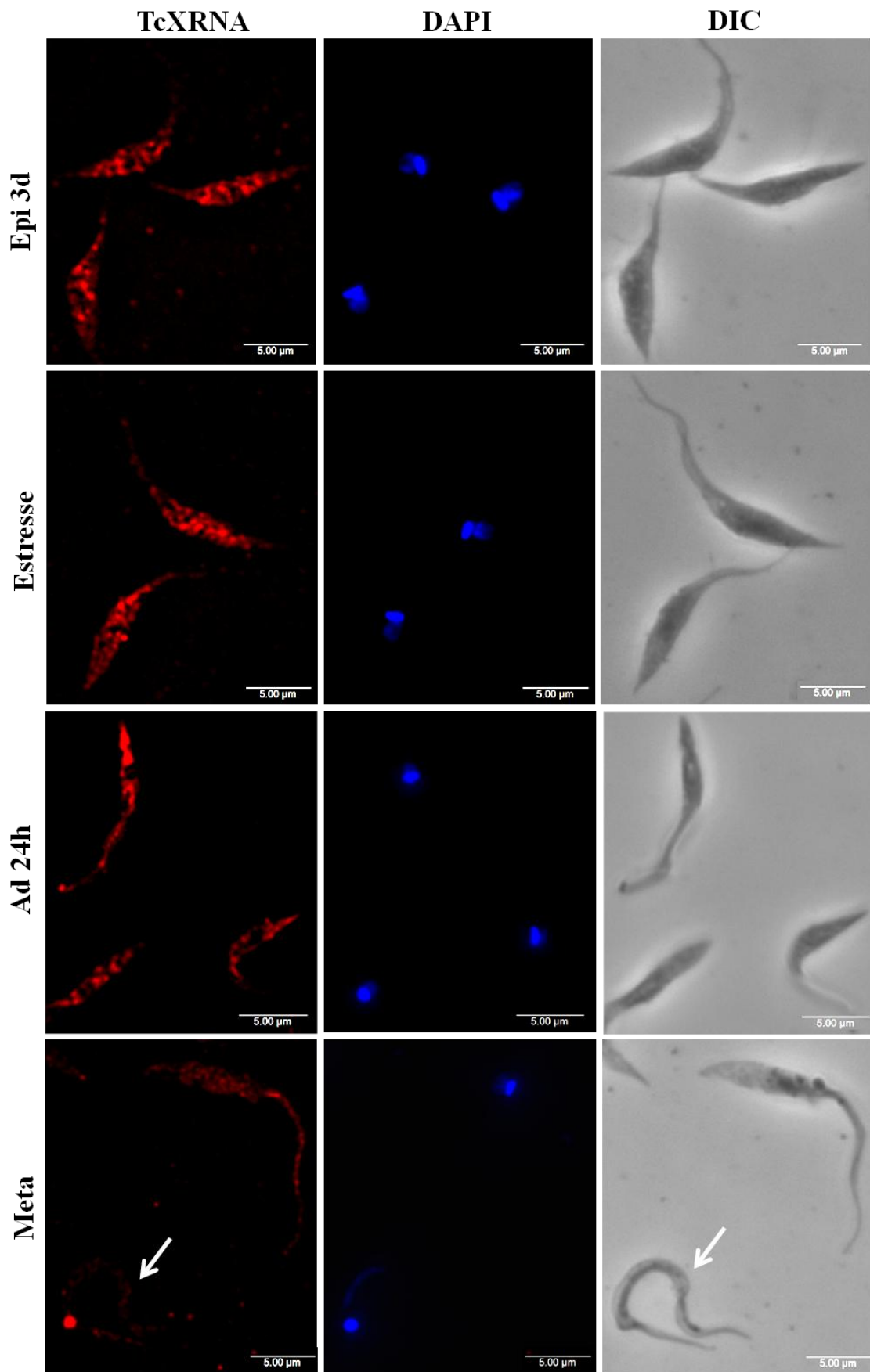
Para determinar a localização celular da proteína TcXRNA, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo policlonal obtido em camundongo (Ferrarini, 2012). Nas formas replicativas (epimastigotas), a proteína TcXRNA apresentou um padrão de fluorescência granular distribuído por todo o citoplasma com média de  $10,96 \pm 2,9$  grânulos/célula. Os parasitas sob estresse nutricional apresentaram um aumento na quantidade de grânulos quando comparado com as demais formas  $13,91 \pm 3,2$  grânulos/célula. Enquanto em parasitas aderidos ao substrato a quantidade de grânulos diminuiu para  $7,37 \pm 2,0$  grânulos/célula (Figuras 4.3 e 4.4). A forma não replicativa (tripomastigota metacíclica) apresentou uma diminuição acentuada do número e da intensidade da fluorescência dos

grânulos quando comparada com a forma epimastigota (Figura 4.4) e por isso, não pudemos estabelecer um padrão para contagem de grânulos nessa forma.

Ao analisar as lamínas de imunofluorescência indireta percebemos que algumas células apresentavam um padrão de grânulos que se concentravam ao redor do núcleo (Figura 4.5). Acreditamos que isso possa ser um indício de que a proteína TcXRNA possa estar presente em grânulos de RNA ditos como Grânulos Perinucleares, os quais aparecem em momentos de inibição do *trans-splicing* e podem estar envolvidos com o processo de controle de qualidade de mRNA. Contudo, para confirmar estes dados serão realizados testes com drogas que promovem a inibição do *trans-splicing* e acúmulo de pré-mRNA como por exemplo, a droga sinefungina.

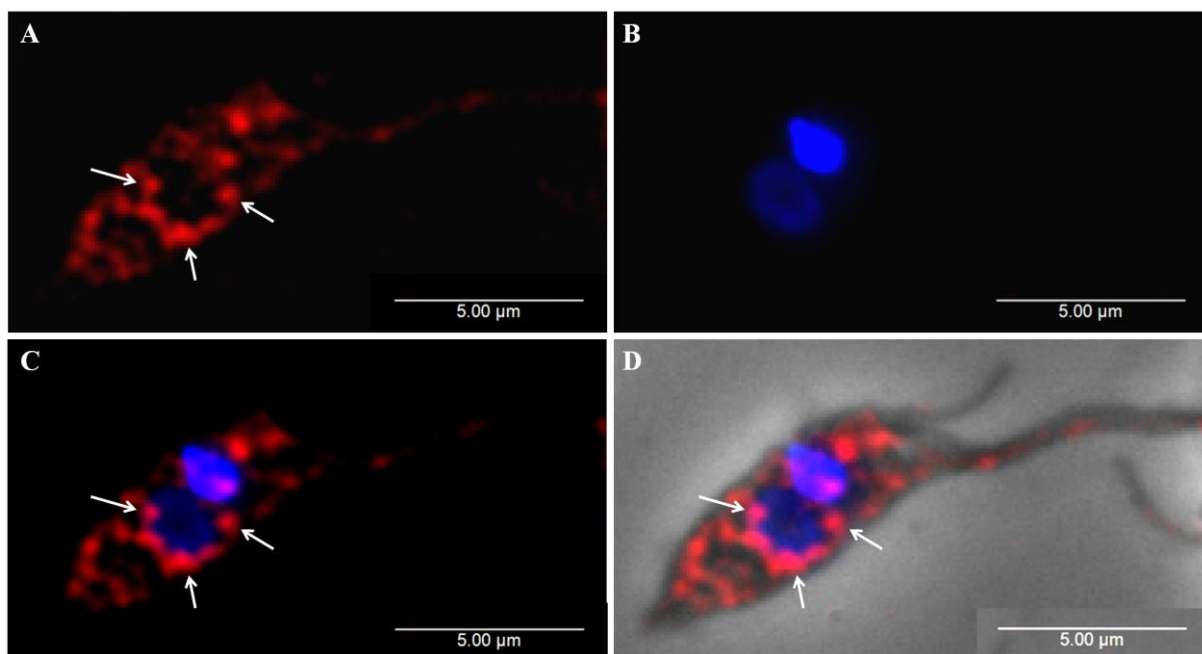


**Figura 4.3:** Histograma mostrando a média do número de grânulos que contém a proteína TcXRNA nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato. Eixo y representa número de grânulos  $\pm$  o desvio padrão ( $n = 100$ ). (\*\*\*) indicam uma diferença significativa entre o número de grânulos (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Eixo x representa as formas de *T. cruzi*.



**Figura 4.4:** Localização da proteína TcXRNA durante a metaciclogênese *in vitro* do *T. cruzi*. Ensaio de imunofluorescência indireta. A proteína TcXRNA foi detectada por anticorpo policlonal anti-TcXRNA e anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado a Alexa 594. O DNA

do núcleo e cinetoplasto foram corados com DAPI. Epi 3d: epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Estresse: epimastigota em fase logarítmica de crescimento sob estresse nutricional por 2 horas. Ad 24h: epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato. Meta: tripomastigota metacíclico (seta) acompanhado de um epimastigota. Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 4.5: Localização perinuclear da proteína TcXRNA em epimastigota em fase 2qmlogarítmica de crescimento.** Ensaio de imunofluorescência indireta. As setas indicam os grânulos perinucleares. A) A proteína TcXRNA foi detectada por anticorpo policlonal anti-TcXRNA e anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado a Alexa 594. B) O DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com DAPI. C) Sobreposição das imagens A e B. D) Sobreposição das imagens A e B e adicionado DIC. Imagem processada por deconvolução. Barra = 5  $\mu$ m.

#### **4.2. Condições que afetam o processo de tradução interferem na dinâmica de formação dos grânulos que contem TcXRNA**

Evidências na literatura indicam que a dinâmica de formação dos grânulos de mRNA presentes em *T. cruzi* é dependente da disponibilidade de mRNA (Cassola *et al.*, 2007; Holetz *et al.*, 2007). Assim, para verificar o envolvimento da proteína TcXRNA no metabolismo de mRNA, decidimos investigar se condições que comprometem a tradução, e consequentemente a disponibilidade de mRNAs em *T. cruzi* poderiam afetar a dinâmica de formação dos grânulos que contém a proteína TcXRNA. Para tanto, tratamos os parasitas com as drogas cicloheximida e puomicina, que interferem no processo de tradução, seja estabilizando ou desestabilizando os polissomos. A cicloheximida é uma droga que inibe a função do fator de tradução eEF2, que medeia a translocação do peptidil-tRNA do sítio A do ribossomo para o sítio P, bloqueando dessa maneira a elongação da tradução e mantendo os ribossomos associados ao mRNA (Landau, 2012). Por outro lado, a puomicina é um antibiótico que possui uma estrutura muito semelhante a um amionoacil-tRNA e, pode atuar ocupando o sítio

A do ribossomo durante a síntese protéica, chegando a se ligar ao peptidil-tRNA que está no sítio P, formando peptidil-puromicina, que então é liberado do ribossomo sem que este sofra translocação ao longo do mRNA levando à liberação prematura da cadeia polipeptídica em construção no ribossomo e, liberando o mRNA da maquinaria de tradução (Starck & Roberts, 2002).

Realizamos assim, ensaios de imunofluorescência dos parasitas nas seguintes condições listadas no Quadro 3.3 e o números de grânulos foram determinados em cada condição.

Quadro 3.3: Condições de tratamento dos parasitas para verificar a dinâmica de formação dos grânulos de TcXRNA.

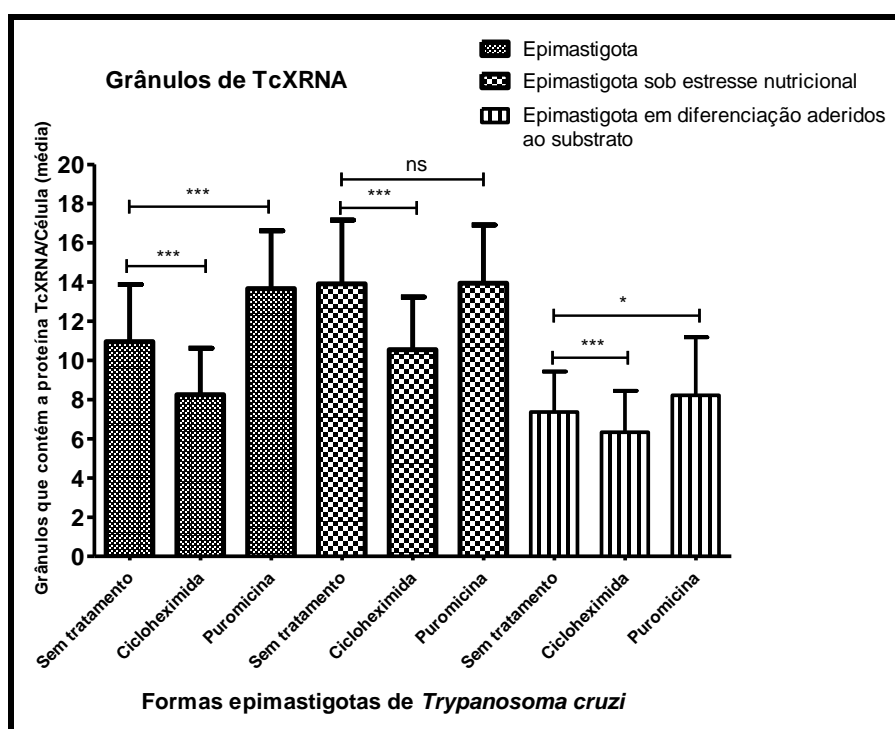
Epimastigotas	Sem tratamento com droga Tratados com cicloheximida Tratados com puromicina
Epimastigotas sob estresse nutricional	Sem tratamento com droga Tratados com cicloheximida Tratados com puromicina
Epimastigotas aderidos ao substrato	Sem tratamento com droga Tratados com cicloheximida Tratados com puromicina

As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento sem tratamento apresentaram  $10,96 \pm 2,9$  grânulos de TcXRNA. Entretanto, nas células tratadas com cicloheximida o número diminuiu para  $8,25 \pm 2,3$  grânulos e os epimastigotas tratados com puromicina apresentaram  $13,66 \pm 2,9$  grânulos (Figuras 4.6 e 4.8). Em epimastigotas submetidos a estresse nutricional observamos  $13,91 \pm 3,5$  *foci* contendo a proteína TcXRNA e quando estas células foram tratadas com cicloheximida houve diminuição do número de grânulos para  $10,55 \pm 2,6$ . Porém, quando os parasitas sob estresse nutricional foram tratadas com puromicina não houve diferença significativa no número de grânulos (Figuras 4.6 e 4.9). Nos parasitas tripomastigotas metacíclicos não foi possível verificar a quantidade de grânulos devido à redução da intensidade de fluorescência nesta forma o que não nos permitiu estabelecer um padrão para a contagem, como foi feito para os epimastigotas (Figura 4.4). No entanto, nos epimastigotas em diferenciação (aderidos ao substrato), verificamos que além dessas formas apresentarem naturalmente número reduzido de grânulos  $7,37 \pm 2,0$ , quando comparados com epimastigotas em crescimento, tais células também sofrem a ação das drogas cicloheximida e puromicina, apresentando  $6,33 \pm 2,1$  e  $8,22 \pm 2,9$  grânulos respectivamente (Figuras 4.6 e 4.10). Pode-se observar com esses resultados que as alterações no número de

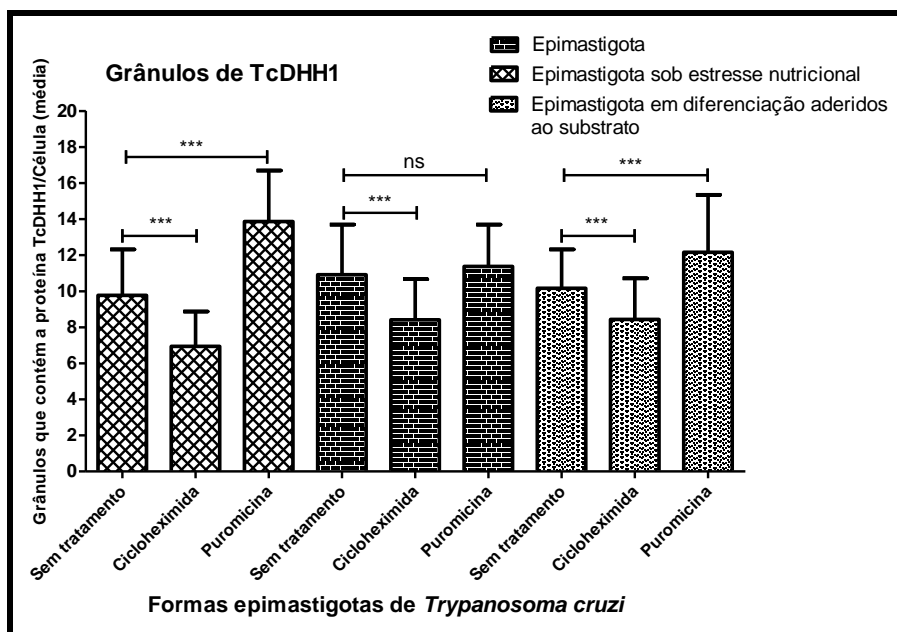


grânulos de TcXRNA perante os tratamentos foram pequenas, porém com base no teste estatístico Teste T de Student essas diferenças foram significativas.

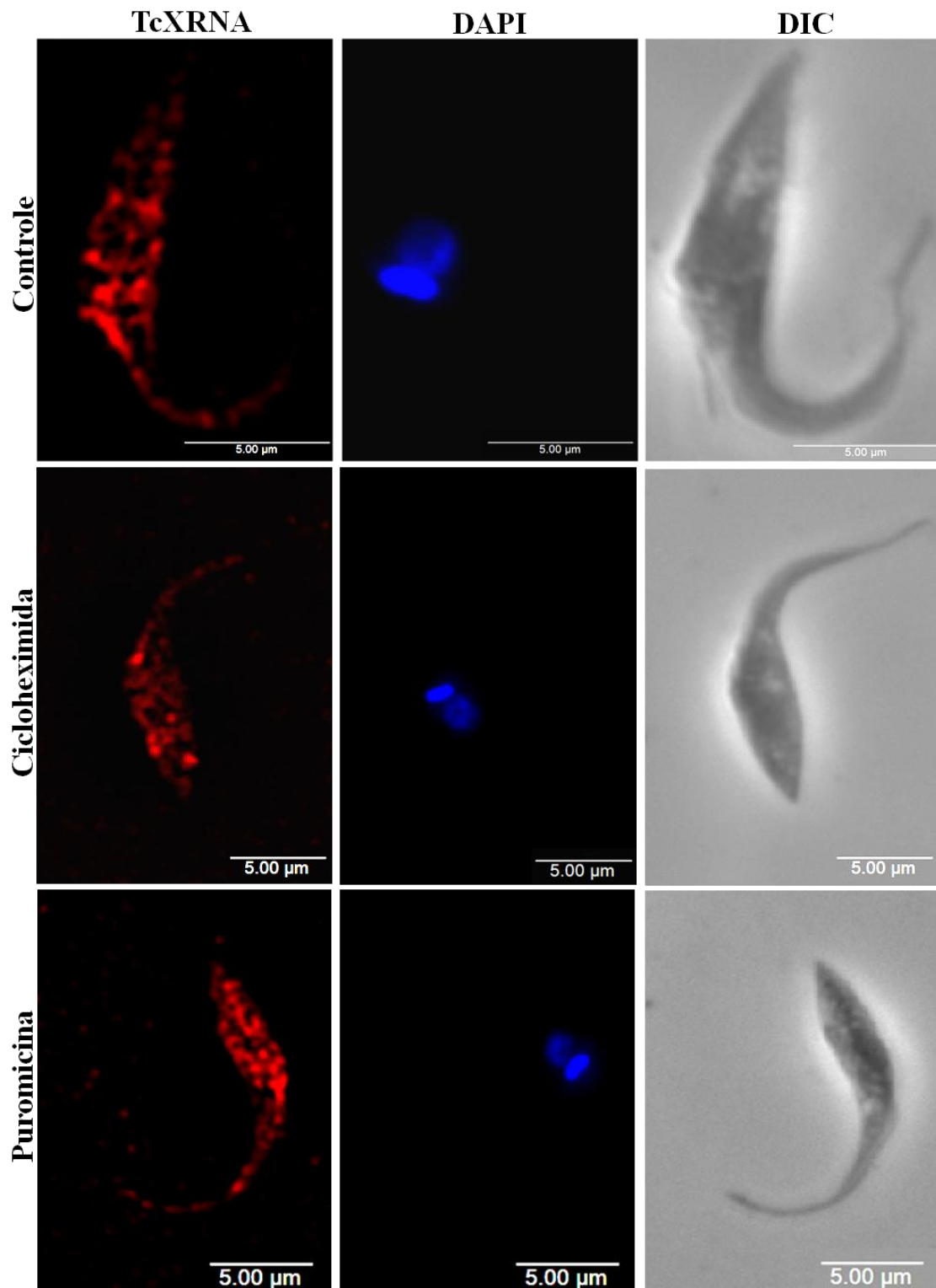
Visto que em trabalhos anteriores já foi demonstrado que o tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina altera a formação dos grânulos de DHH1 durante a metaciclogênese, nós realizamos como controle comparativo do experimento, e também para verificar a atividade das drogas, ensaios nas mesmas condições para análise da dinâmica de grânulos de DHH1 (Figura 4.7), e é possível observar com os histogramas contidos nas Figuras 4.6 e 4.7 que o perfil da quantidade de grânulos de TcDHH1 é menor nas formas epimastigota em fase logarítmica de crescimento e epimastigota em fase logarítmica de crescimento sob estresse quando comparado com o perfil dos grânulos de TcXRNA nestas mesmas formas, porém nas formas epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato o perfil da quantidade de grânulos se inverte, ou seja, parecem existir menos grânulos de TcXRNA do que de TcDHH1.



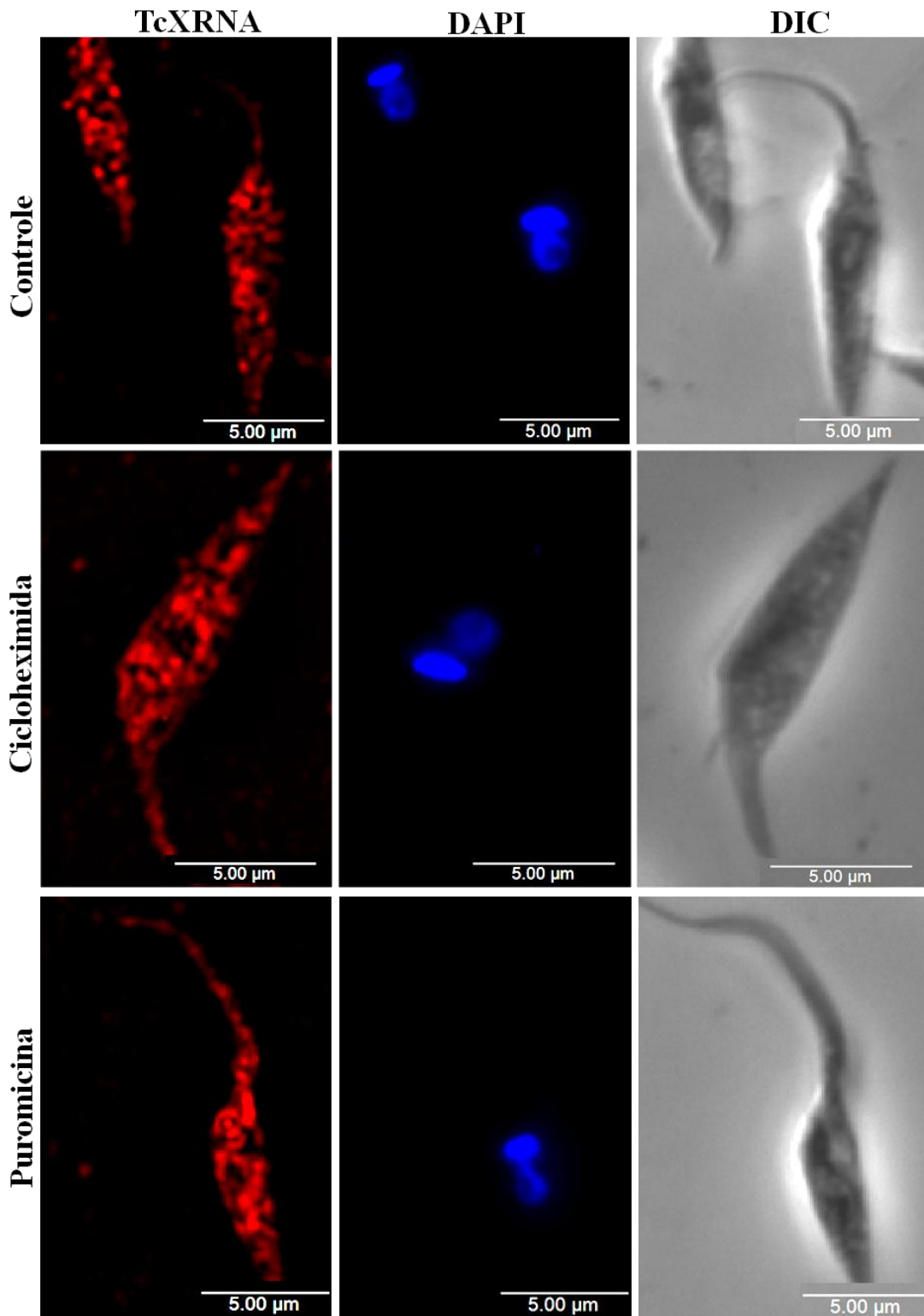
**Figura 4.6:** Histograma mostrando a média do número de grânulos que contêm a proteína TcXRNA nas formas epimastigota, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato com e sem tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina. Eixo y representa número de grânulos  $\pm$  o desvio padrão ( $n = 100$ ). (\*\*\*/\*) indicam uma diferença significativa entre o número de grânulos (\*\*\*/ $p < 0,01$ ; \*/ $p < 0,05$ ). (ns) indica que não há diferença significativa entre o número de grânulos. Eixo x representa as formas em diferenciação celular e os tratamentos.



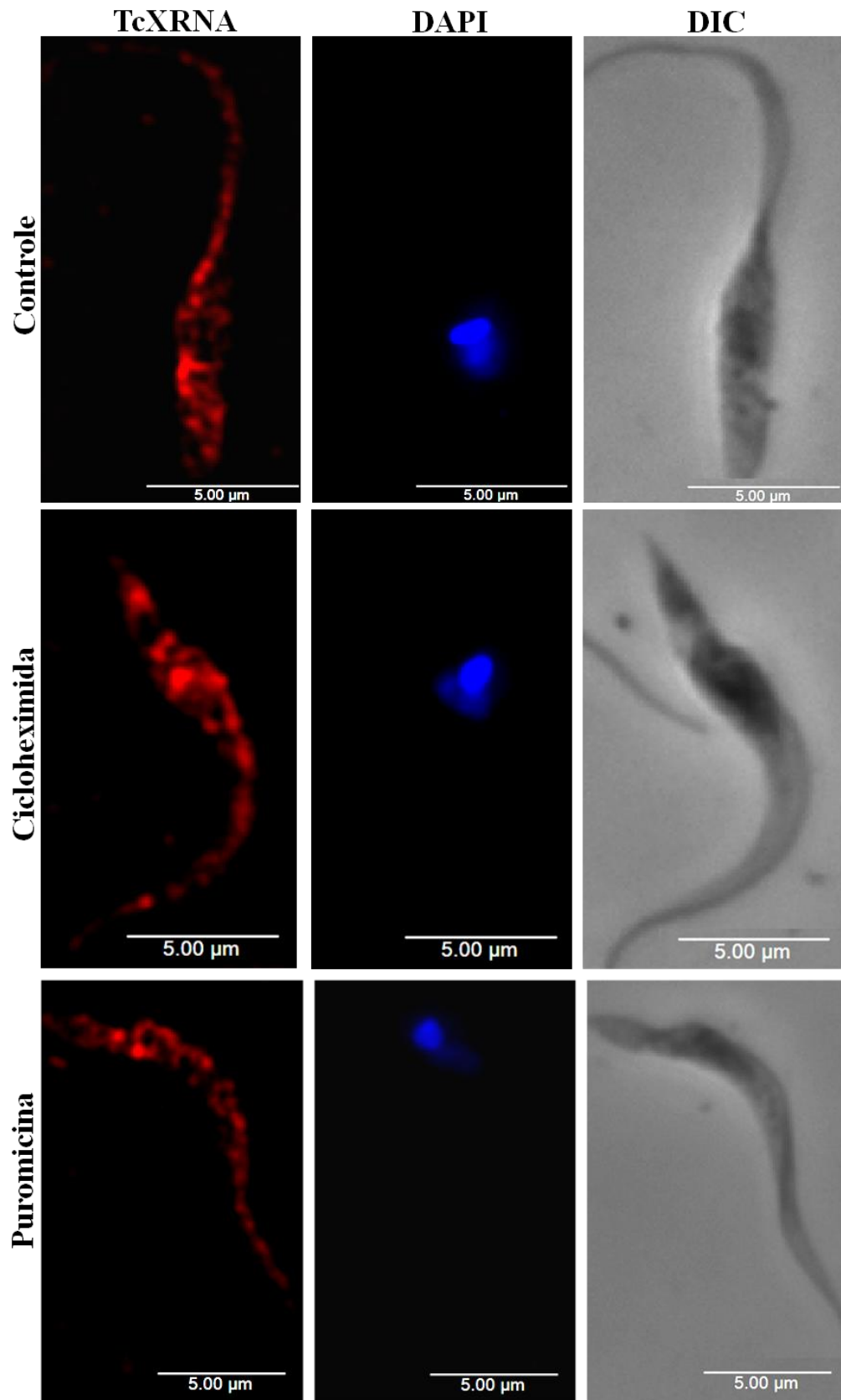
**Figura 4.7:** Histograma do controle da ação das drogas cicloheximida e puromicina, mostrando a média do número de grânulos que contém a proteína TcDHH1 nas formas epimastigota, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato com e sem tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina. Eixo y representa número de grânulos  $\pm$  o desvio padrão ( $n = 100$ ). (\*\*\*) indicam uma diferença significativa entre o número de grânulos (\*\*\*)  $p < 0,01$ ;). (ns) indica que não há diferença significativa entre o número de grânulos. Eixo x representa as formas em diferenciação celular e os tratamentos.



**Figura 4.8: Imunolocalização dos grânulos de TcXRNA em epimastigota em fase logarítmica de crescimento.** Ensaio de imunofluorescência Indireta A proteína TcXRNA foi detectada por anticorpo policlonal anti-TcXRNA e anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado a Alexa 594. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida: epimastigotas tratados com 100  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.9: Imunolocalização da proteína TcXRNA nas formas epimastigota em fase logarítmica de crescimento sob estresse nutricional.** Ensaio de imunofluorescência Indireta. A proteína TcXRNA foi detectada por anticorpo policlonal anti-TcXRNA e anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado a Alexa 594. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida: epimastigotas tratados com 100  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



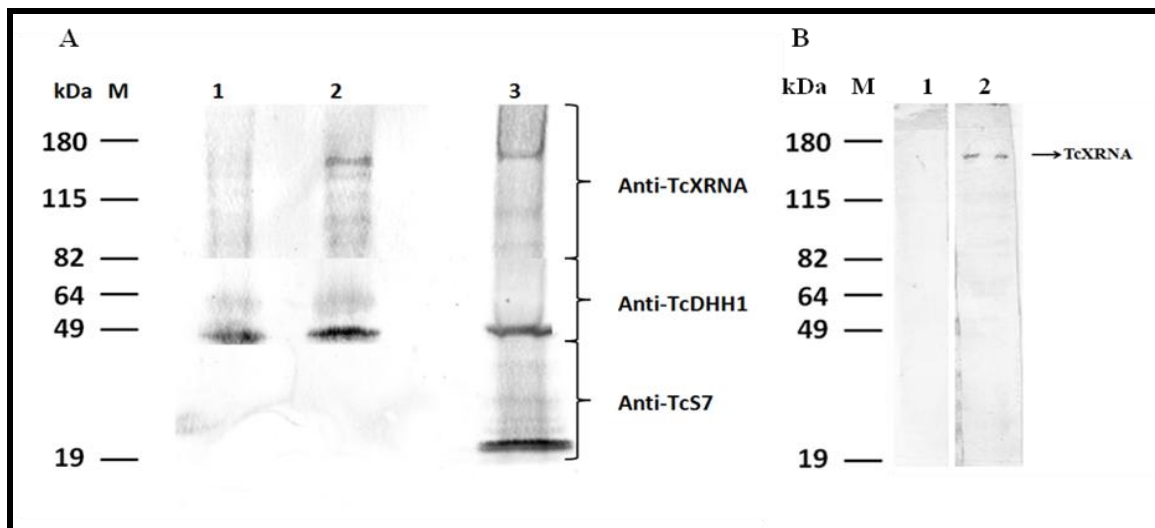
**Figura 4.10: Imunolocalização da proteína TcXRNA nas formas epimastigota em diferenciação aderidas ao substrato. Ensaio de imunofluorescência Indireta. A proteína TcXRNA foi detectada por anticorpo policlonal anti-TcXRNA e anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado a Alexa 594. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida:**

epimastigotas tratados com 100 µg/ml de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5 µm.

### **4.3. Análise da composição ribonucleoprotéica do complexo que contém a proteína TcXRNA**

#### **4.3.1. Imunoprecipitação do complexo contendo TcXRNA e identificação de proteínas por espectrometria de massas**

Um dos objetivos iniciais deste trabalho foi verificar se TcDHH1, uma marcadora de grânulos de RNA em eucariotos, presente em grânulos de RNA em de *T. cruzi* (Holetz *et al.*, 2007), estaria interagindo com XRNA, pois em leveduras e células de mamíferos ambas as proteínas estão presentes em grânulos de degradação (C. Clayton & Shapira, 2007). Por isso, após a imunoprecipitação do complexo de TcXRNA, nós procuramos identificar a presença de TcDHH1 no imunocomplexo por ensaios tipo *Western blot*. Com este ensaio, pudemos verificar que a proteína TcXRNA foi capturada pela imunoprecipitação (Figura 4.11A, canaleta 2, banda próxima à 180 kDa) TcDHH1 eluiu com o imunoprecipitado de TcXRNA (Figura 4.11A, canaleta 2, banda próxima à 49 kDa). Contudo, uma banda de mesma massa molecular de TcDHH1 e com baixa representatividade, também aparece na amostra controle onde a imunoprecipitação foi feita com soro pré-imune (Figura 4.11A, canaleta 1, banda próxima à 49 kDa). O anticorpo da proteína TcS7, o qual foi gentilmente cedido pelo grupo do Dr. Stênio P. Fragoso, foi utilizado no ensaio de *Western blot* da imunoprecipitação como controle negativo, e como esperado a TcS7 não eluiu com TcXRNA, sendo marcada apenas no FT (Figura 4.11A, canaleta 3, banda próxima à 19 kDa), pois a proteína ribossomal S7 não é constituinte de *P-bodies*. (Figura 4.11A). Após observarmos que a proteína TcDHH1 foi identificada com o soro pré-imune, nós realizamos um ensaio de *Western blot* com o soro pré-imune utilizado na imunoprecipitação, a fim de verificar se o mesmo reconheceria a proteína TcDHH1 em extrato total de *T. cruzi*. Ao que indica a (Figura 4.11B), o soro pré-imune não identificou a proteína TcDHH1 em extrato de *T. cruzi*. A proteína TcXRNA foi utilizada como um controle da técnica. Nós acreditamos que, devido ao fato da proteína TcDHH1 ser mais abundante que a proteína TcXRNA, ela poderia estar se ligando inespecificamente com a resina.



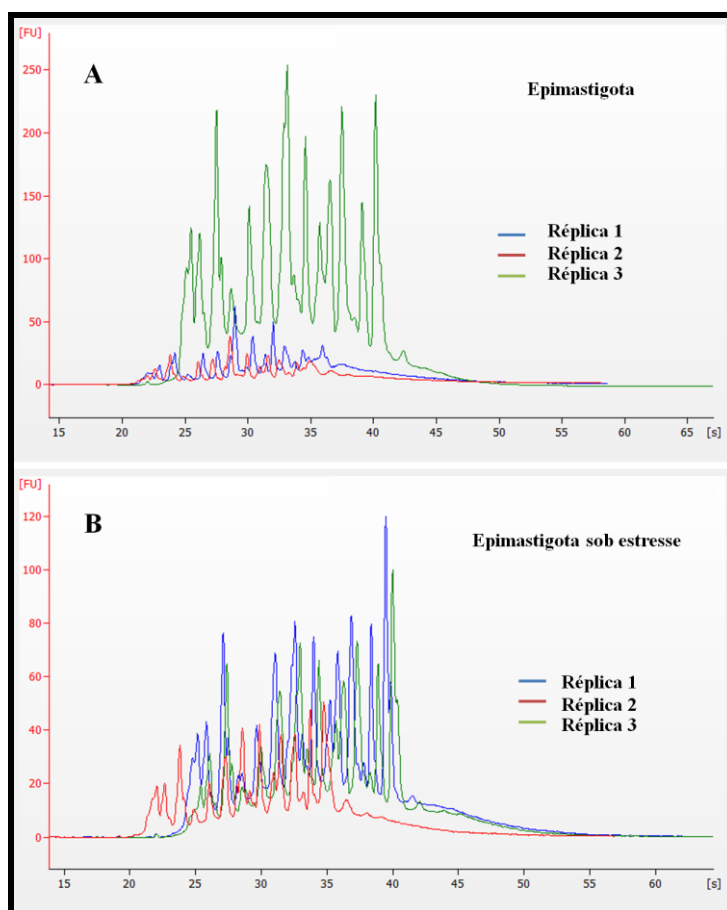
**Figura 4.11: Western blot da imunoprecipitação de TcXRNA e teste do soro pré-imune.**

M: marcador de peso molecular em kDa (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen). A membrana foi corada com o corante ponceau e cortada em duas regiões obtendo assim três partes: um corte foi feito próximo a banda correspondente a 80 kDa e o outro corte abaixo de 49 kDa do marcador de peso molecular. A parte superior da membrana contendo as proteínas de maior peso molecular foi incubada com anticorpo anti-TcXRNA produzido em camundongo. A parte do meio da membrana, foi incubada com anticorpo anti-TcDHH1 produzido em coelho, e a parte inferior a qual continha as proteínas de menor peso molecular foi incubada com o anticorpo para a proteína ribossomal TcS7 produzido em camundongo, o qual foi utilizado como controle negativo da imunoprecipitação. Para o *Western blot*, foram utilizados os soros policlonais anti-TcXRNA (camundongo) na diluição 1:250, soro policlonal anti-TcDHH1 (coelho) na diluição 1:100 e soro policlonal anti-TcS7 (camundongo) na diluição 1:500. A) *Western blot* da imunoprecipitação. A proteína TcXRNA possui aproximadamente 162 kDa, a proteína TcDHH1 possui aproximadamente 47 kDa e a proteína TcS7 possui aproximadamente de 22 kDa. 1. Soro pré-imune: Controle da imunoprecipitação utilizando soro pré-imune previamente incubado com a resina. 2. Soro imune: imunoprecipitação com soro policlonal anti-TcXRNA. 3. Extratos citoplasmáticos das formas epimastigotas livre de beads obtido após a imunoprecipitação (*FlowTrough*). B) Teste do soro pré-imune em extrato de *T. cruzi* na forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento. 1. *Western blot* com soro pré-imune utilizado na imunoprecipitação (diluição 1:50). 2. *Western blot* com soro anti-TcXRNA usado como controle da técnica (diluição 1:250).

As mostras resultantes do ensaio de imunoprecipitação foram obtidas em triplicata e enviadas para análise por espectrometria de massas. No entanto, não conseguimos identificar os possíveis parceiros desta proteína, pois pelas análises obtidas por espectrometria de massas não foi possível detectar as proteínas TcXRNA e TcDHH1, embora as mesmas tenham sido identificadas pela técnica de *Western blot*. Novos ensaios de imunoprecipitação serão realizados para tentar identificar os parceiros de TcXRNA, pois acreditamos que a proteína TcXRNA seja um bom marcador para grânulos de degradação em *T. cruzi*, uma vez que outros estudos já mostram que a ortóloga de humanos XRN1 está presente em *P-bodies* (Parker & Sheth, 2007).

### 4.3.2. Sequenciamento em larga escala dos mRNAs associados à TcXRNA

Esta etapa do trabalho pretende identificar os RNAs alvos de grânulos de TcXRNA nas formas epimastigotas e epimastigotas sobre estresse nutricional para comparar o perfil de mRNA entre os grânulos destas duas formas. Para tanto, realizamos ensaios de imunoprecipitação conforme descrito no item 3.5.1, e com estas amostras foram obtidos RNAs que estariam presentes em complexos que contém a proteína TcXRNA. Estes RNAs foram analisados primeiramente no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, e observamos que os perfis de RNAs eram semelhantes tanto para epimastigota como para epimastigota sob estresse em duas das três réplicas analisadas (Figura 4.12). Os dados do Bioanalyzer mostram que os RNAs estão íntegros e passíveis de sequenciamento. As amostras estão sendo processadas para o sequenciamento na plataforma Illumina.

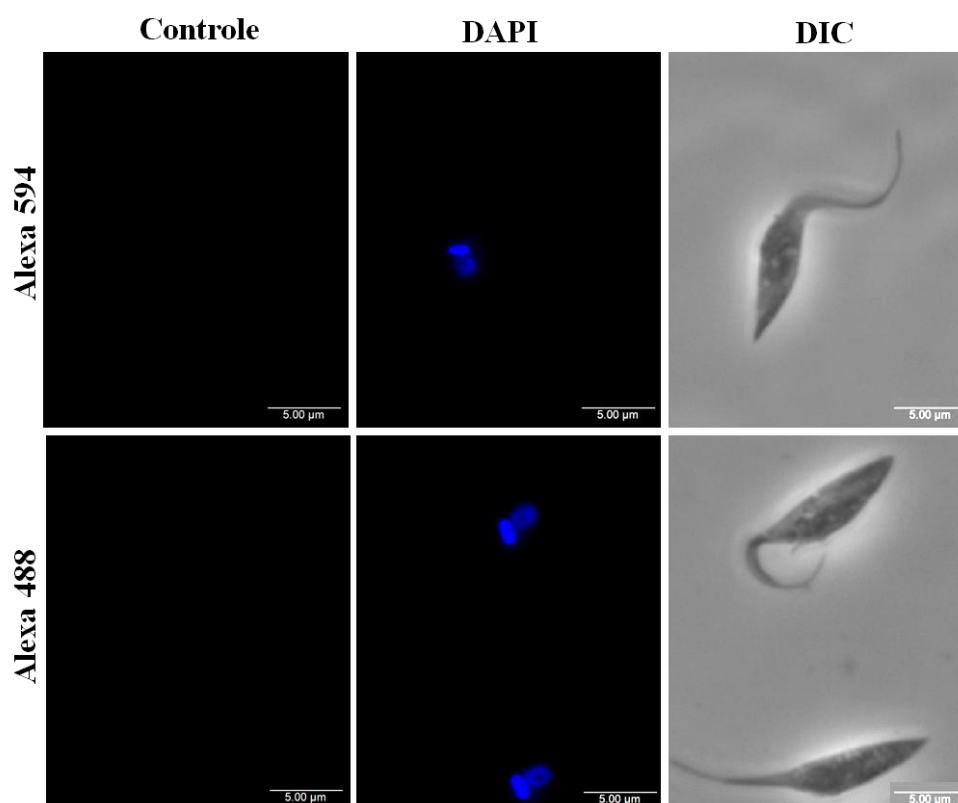


**Figura 4.12: Eletroferograma após corrida em eletroforese de capilar dos RNAs obtidos nas réplicas das imunoprecipitações de TcXRNA através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.** O perfil dos RNAs são mostrados nos espectros em cores, cada cor representa uma das réplicas obtidas pelos ensaios de imunoprecipitação de TcXRNA. A) RNAs de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. B) RNAs de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento sob estresse nutricional. Eixo Y: (FU) Intensidade de fluorescência. Eixo X: (S) Tempo de eluição em segundos.



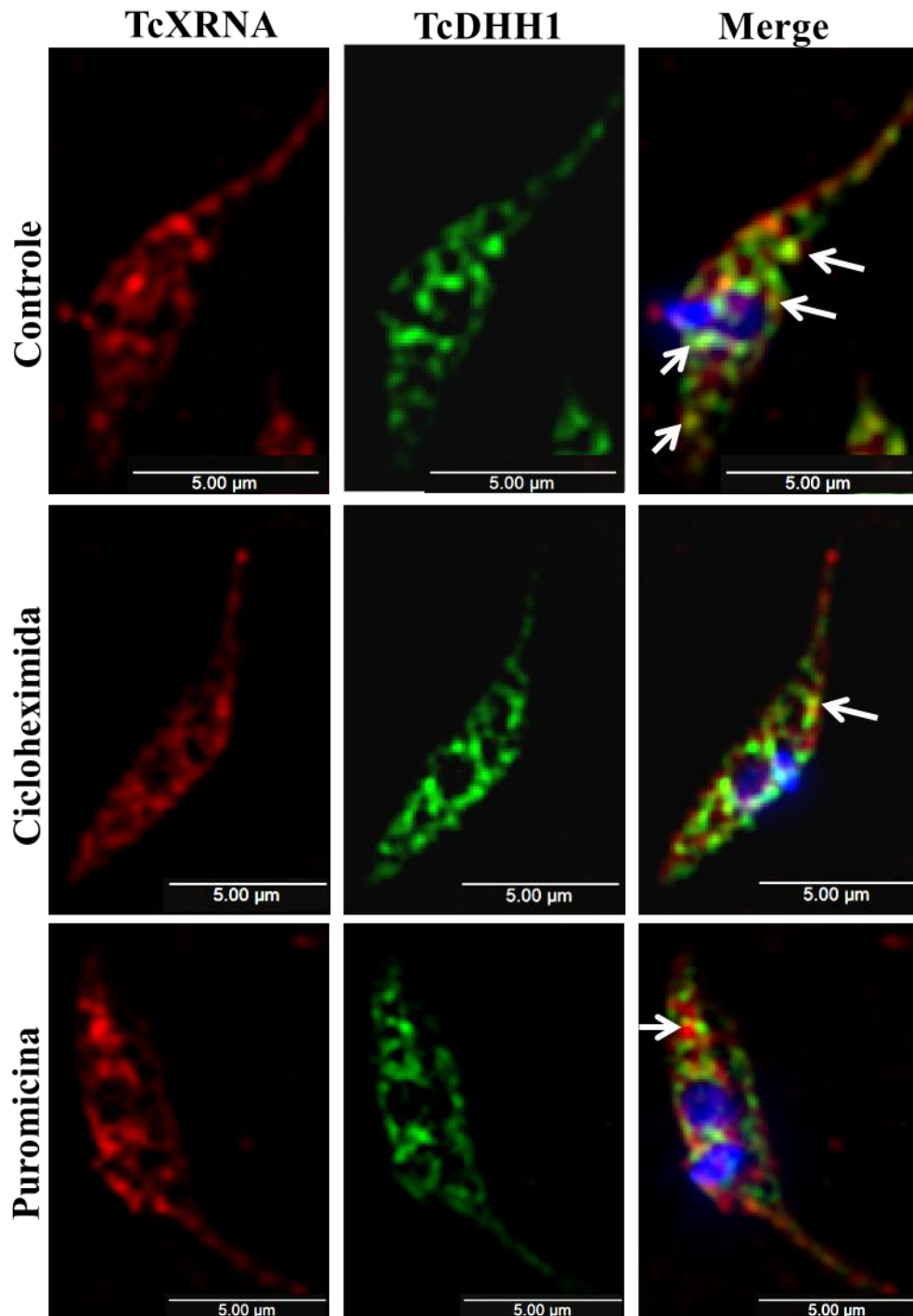
### 4.3.3. A proteína TcXRNA co-localiza parcialmente com a proteína TcDHH1

Paralelamente às imunoprecipitações, realizamos ensaios de imunofluorescência de todas as etapas da metaciclo-gênese para verificar se há possível co-localização entre os grânulos marcados por anti-TcXRNA e anti-TcDHH1. Incluindo também neste experimento os tratamentos com cicloheximida e puromicina, pois Holetz e colaboradores (2007) já mostraram que o número e a dinâmica de formação dos grânulos que contém TcDHH1 são alterados pela ação dessas drogas. Esperamos com estas análises, verificar até que ponto a disponibilização ou não dos mRNAs presentes nos polissomos afeta a formação dos grânulos de TcXRNA e seu padrão de co-localização com a proteína TcDHH1, uma vez que TcDHH1 parece estar presente tanto em grânulos de estocagem quanto de degradação em outros eucariotos (Anderson & Kedersha, 2007; Zayat *et al.*, 2015). Os soros pré-ímmunes de ambas as proteínas já haviam sido testados em trabalhos anteriores do nosso grupo (Ferrari, 2012; Holetz, 2008), então realizamos aqui apenas o controle dos anticorpos secundários conjugados a Alexa 488 (anti-coelho) e Alexa 594 (anti-camundongo) ambos produzidos em galinha a fim de evitar reação cruzada entre os anticorpos (Figura 4.13).

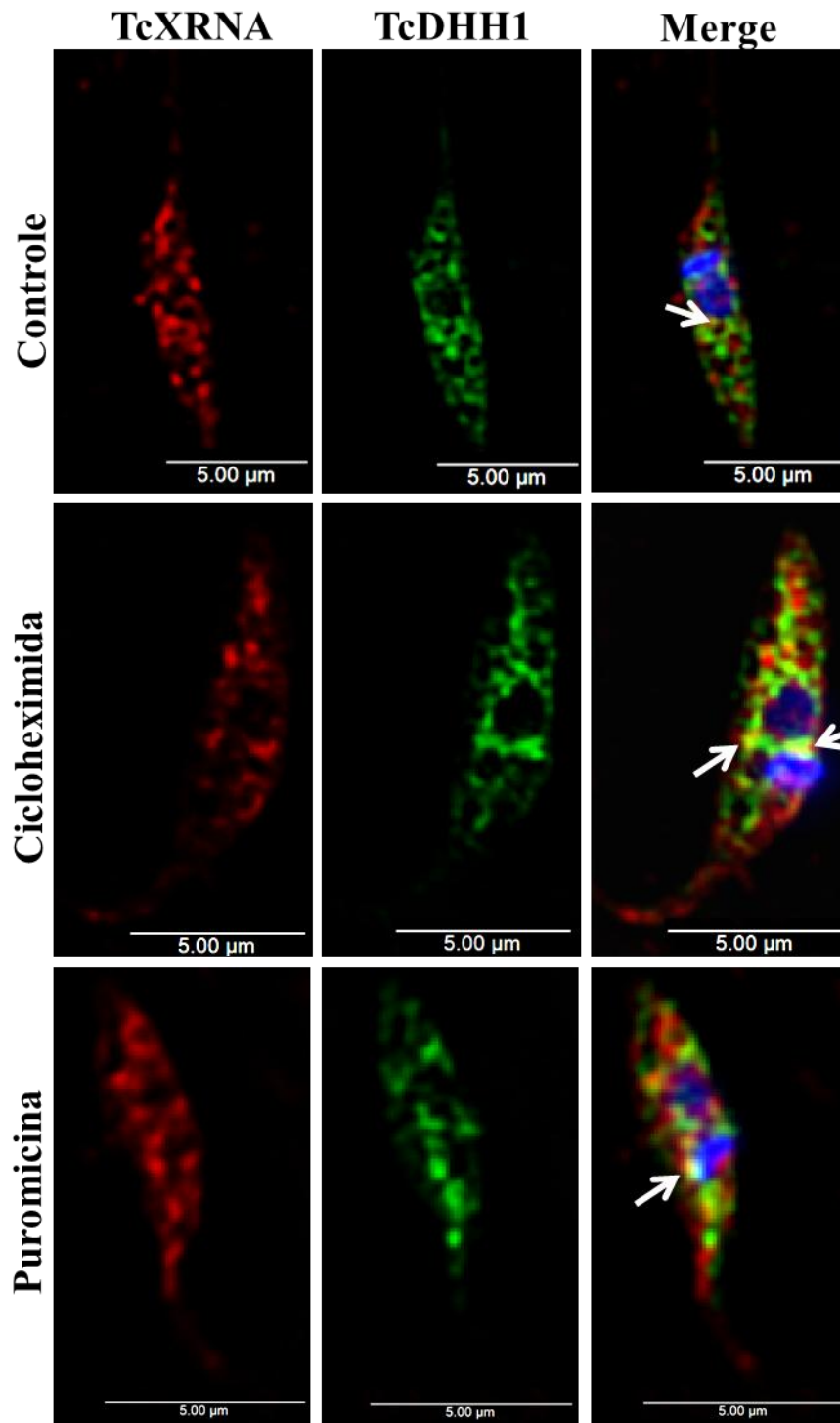


**Figura 4.13: Controle dos anticorpos secundários Alexa 594 e Alexa 488. Ausência de anticorpo primário. Barra = 5 µm.**

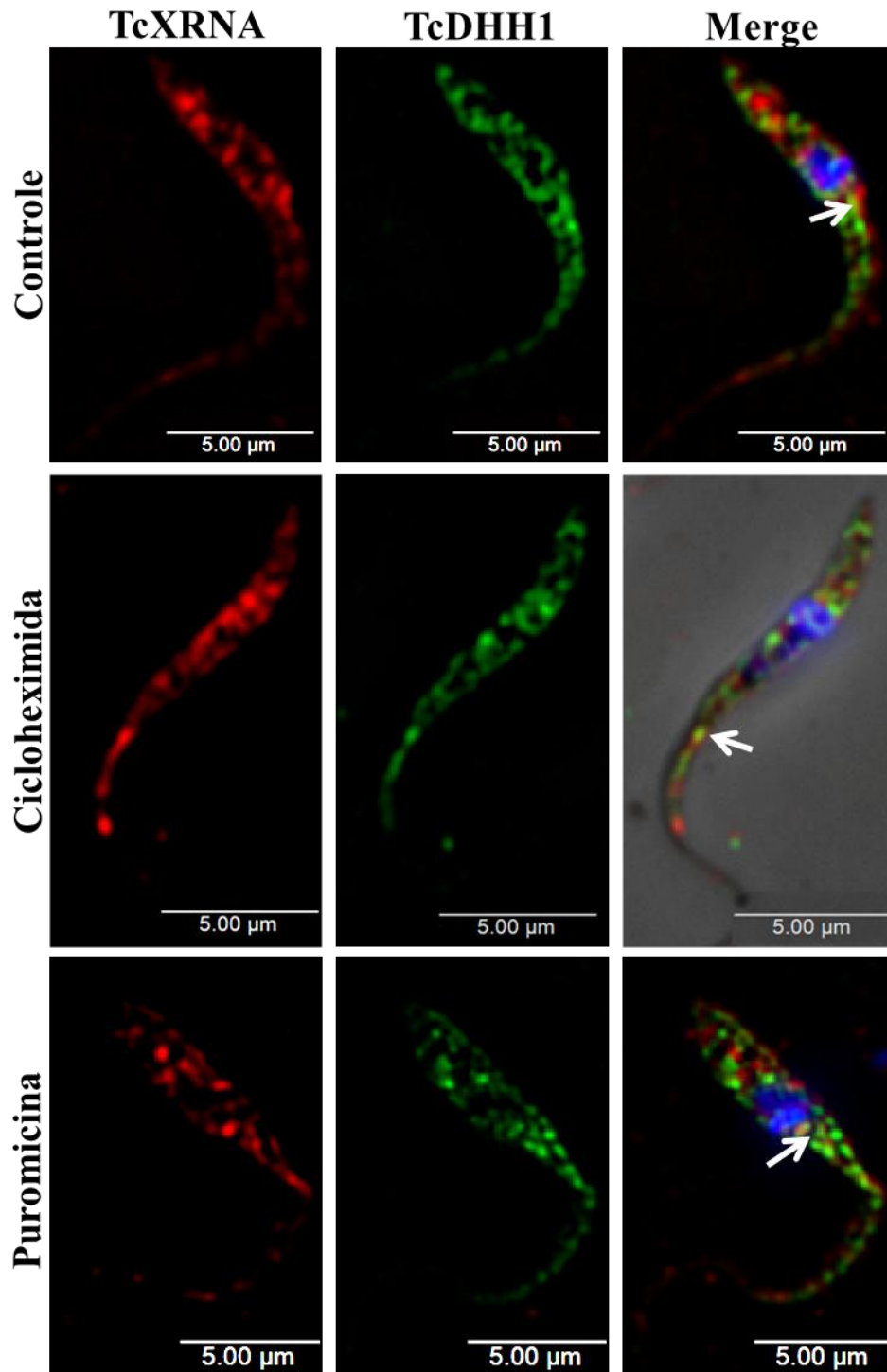
Tanto nas formas de *T. cruzi* tratadas, como nas não tratadas com cicloheximida e puromicina, verificamos o mesmo resultado quanto à co-localização entre TcXRNA e TcDHH1. Para epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, observamos que as proteínas se co-localizam parcialmente em *foci* citoplasmático (Figura 4.14), assim também foi observado para epimastigotas sob estresse nutricional (Figura 4.15). Nas formas epimastigotas em diferenciação aderidas ao substrato (Figura 4.16), quando comparadas com as formas epimastigotas (Figuras 4.14 e 4.15), visualizamos uma redução nos grânulos que se co-localizam, esta redução pode estar relacionada com a diminuição dos grânulos de TcXRNA nestas formas, evento que não ocorre com TcDHH1, com base nas figuras 7x e 8x do item 4.2. Em tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.17), verificamos que os *foci* de co-localização se reduzem drasticamente, provavelmente devido à diminuição na intensidade de fluorescência apresentada por ambas as proteínas.



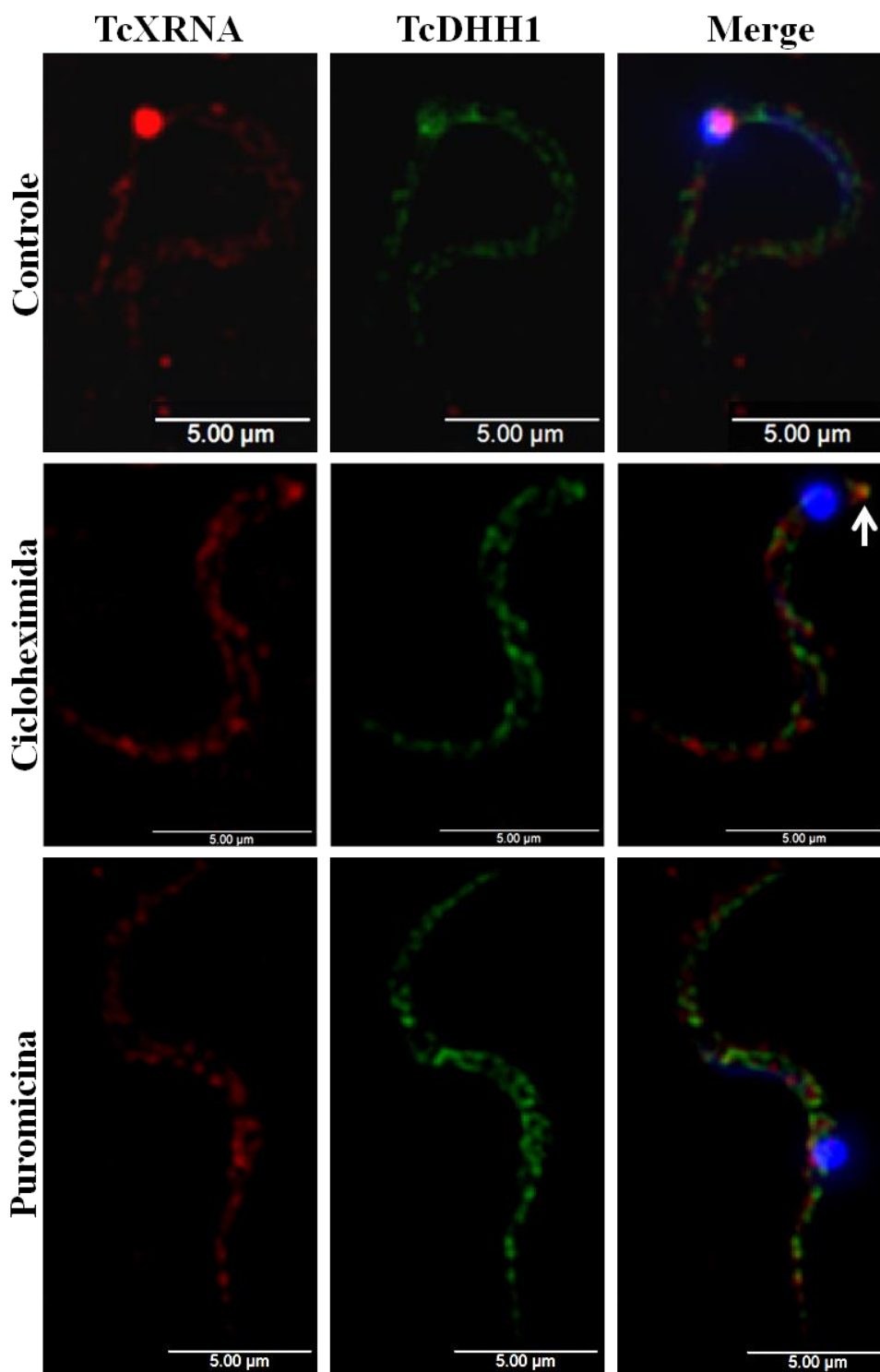
**Figura 4.14: Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota em fase logarítmica de crescimento.** A proteína TcXRNA foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcXRNA (camundongo) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a Alexa 594. A proteína TcDHH1 foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcDHH1 (coelho) e anti-corpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa 488. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida: epimastigotas tratados com 100 µg/ml de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5 µm.



**Figura 4.15: Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota sob estresse nutricional.** A proteína TcXRNA foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcXRNA (camundongo) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a Alexa 594. A proteína TcDHH1 foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcDHH1 (coelho) e anti-corpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa 488. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida: epimastigotas tratados com 100  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.16: Análise de co-localização entre TcXRNA e TcDHH1 em epimastigota em diferenciação aderidos ao substrato.** A proteína TcXRNA foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcXRNA (camundongo) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a Alexa 594. A proteína TcDHH1 foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcDHH1 (coelho) e anti-corpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa 488. Controle: epimastigotas sem tratamento. Cicloheximida: epimastigotas tratados com 100  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida. Puromicina: epimastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .



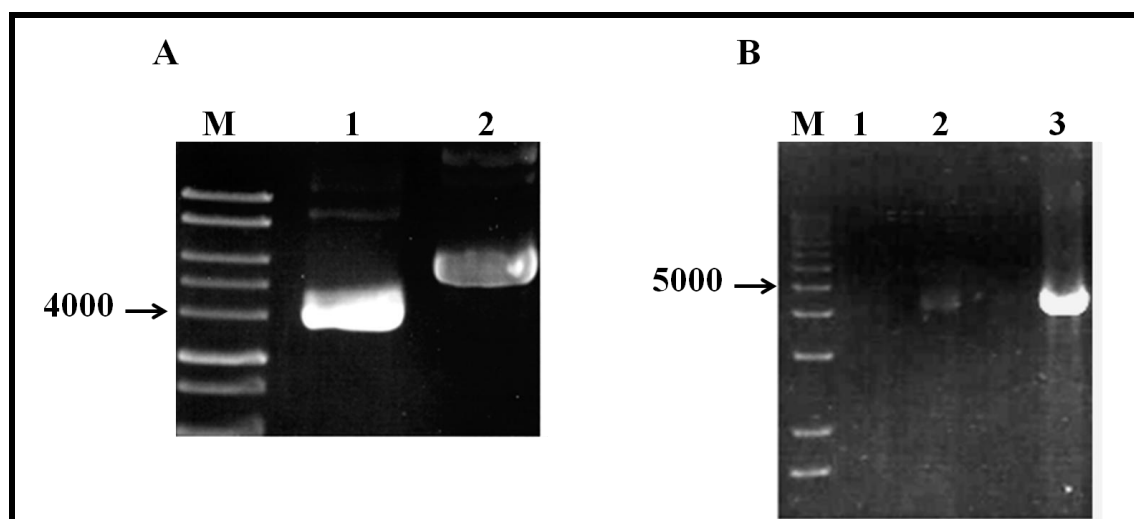
**Figura 4.17: Colocalização parcial entre TcXRNA e TcDHH1 em Tripomastigotas metacíclicos.** A proteína TcXRNA foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcXRNA (camundongo) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a Alexa 594. A proteína TcDHH1 foi detectada com anticorpo policlonal anti-TcDHH1 (coelho) e anti-corpo secundário anti-rabbit conjugado a Alexa 488. Controle: tripomastigotas sem tratamento. Cicloheximida: tripomastigotas tratados com 100  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida. Puromicina: tripomastigotas tratados com 2 mM de puromicina. Imagens processadas por deconvolução. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Obtenção de linhagens de *T. cruzi* mutantes contendo *TcXRNA* fusionada às etiquetas FLAG e GFP

A produção de linhagens de *T. cruzi*, expressando a proteína TcXRNA fusionada à diferentes etiquetas é uma estratégia alternativa ao uso de anticorpos para estudos futuros. Além disso, podemos confirmar com essas linhagens mutantes dados obtidos com o soro policlonal, como por exemplo, a massa molecular da proteína, sua localização celular, bem como os dados obtidos nos experimentos de imunoprecipitação.

Para produzir as linhagens transfectantes foi necessário seguir os seguintes passos: amplificação do gene por PCR, recombinação do gene no vetor de entrada da plataforma Gateway, nova recombinação do vetor de entrada para o vetor de destino e transfecção das células com o vetor de destino contendo o gene.

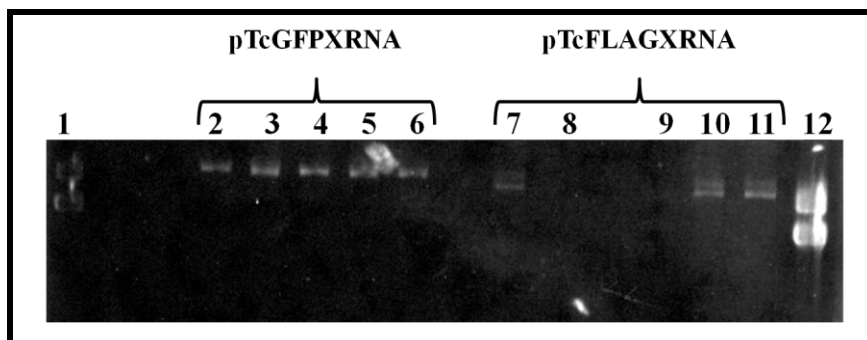
Na Figura 4.18 podemos confirmar a amplificação do gene de TcXRNA, o qual possui 4326 pares de bases e foi recombinado no vetor de entrada pDONR<sup>TM</sup>221 conforme descrito no item 3.6.4.



**Figura 4.18: Análise da clonagem do gene de TcXRNA no vetor pDONR<sup>TM</sup>221.** A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio mostrando a diferença de tamanho entre os vetores pDONR<sup>TM</sup>221 sem e com o gene de TcXRNA clonado. M: marcador de peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). 1. pDONR<sup>TM</sup>221 sem o gene de TcXRNA; 2: pDONR<sup>TM</sup>221 com o gene de TcXRNA. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. PCR usando plasmídeo do clone de TcXRNA em pDONR<sup>TM</sup>221. M: marcador de peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). 1. Controle negativo da reação de PCR na ausência de DNA. 2: controle positivo da reação de PCR na presença de DNA genômico. 3: gene de TcXRNA amplificado partir de plasmídeo.

Cinco clones provenientes da recombinação em pDONR<sup>TM</sup>221 foram sequenciados e para a recombinação nos vetores de destino pTcGFP e pTcFLAG foi escolhido um clone o qual não teve nenhuma mutação que poderia ter ocorrido pela amplificação por PCR. Após a

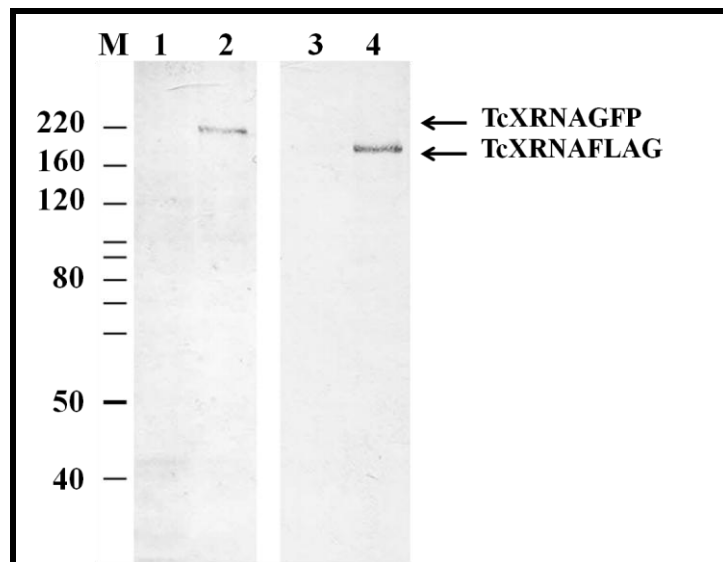
recombinação, pela técnica de *Toothpick*, descrita no item 3.6.6, identificamos alguns clones que apresentavam um perfil de corrida diferente dos controles (Figura 4.19) os quais pela diferença de tamanho e pelo resultado do sequenciamento podíamos inferir que eram de fato vetores contendo o gene de TcXRNA.



**Figura 4.19: Análise da clonagem gene da proteína TcXRNA em vetores pTcGFP e pTcFLAG.** Esta análise foi feita pelo método de *Toothpick* das colônias selecionadas. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado brometo de etídio. 1: Vetor pTcGFP sem o gene de TcXRNA. 2-6: colônias após recombinação do gene TcXRNA em pTcGFP. 7-11: colônias após recombinação do gene TcXRNA em pTcFLAG. 12: pTcFLAG sem o gene de TcXRNA.

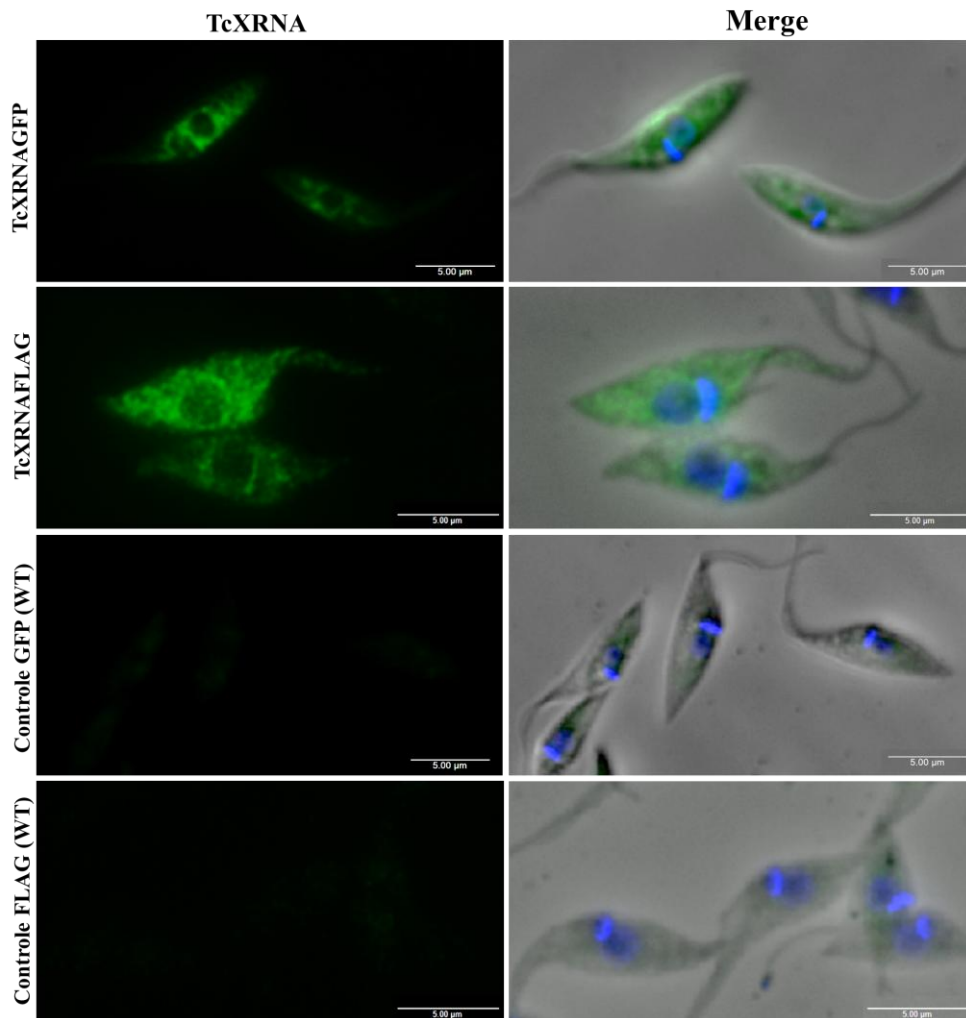
Um clone positivo para cada etiqueta foi escolhido para a obtenção de maior quantidade dos vetores purificados para serem usados na transfecção de parasitas *T. cruzi* para produzir linhagens que expressam a proteína TcXRNA fusionada às etiquetas GFP ou FLAG. A proteína TcXRNA fusionada à etiqueta FLAG fica próxima a 160 kDa, pois corresponde à massa molecular da proteína a partir da sequência do gene contendo as três repetições de FLAG que juntas somam 2,73 kDa. Já a proteína TcXRNA fusionada à etiqueta GFP fica mais próxima a 220 kDa, mais especificamente 190 kDa, pois a etiqueta GFP contém 30 kDa (Figura 4.20). Esses resultados reforçam os dados obtidos com o soro policlonal, o qual identificou a proteína TcXRNA em parasitas selvagens com massa molecular próxima à 160 kDa.





**Figura 4.20: Análise da expressão da proteína TcXRNA fusionada com as etiquetas GFP e FLAG em linhagens de *T. cruzi*. As análises foram feitas através de ensaios de *Western blot*. As diluições dos anticorpos de camundongo anti-GFP e anti-FLAG utilizadas foram de 1:500 e 1:1000, respectivamente. Gel SDS-PAGE 8% contendo extrato proteico de *T. cruzi* de formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento – aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/canal. M: Marcador de peso molecular representado em kDa (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen). 1 e 3: Extrato proteico de parasita selvagem. 2: Extrato proteico de parasitas transfectantes expressando TcXRNA fusionada à etiqueta GFP. 4: Extrato proteico de parasitas transfectantes expressando TcXRNA fusionada à etiqueta FLAG.**

Com estes transfectantes, realizamos ensaios de imunofluorescência indireta e confirmamos que a proteína fusionada as etiquetas apresentou localização citoplasmática granular similar ao observado quando os ensaios foram feitos com ao anticorpo policlonal anti-TcXRNA (Figura 4.21).



**Figura 4.21: Localização celular da proteína TcXRNAGFP e TcXRNAFLAG em *T. cruzi*.** Na imunofluorescência para TcXRNAGFP foi utilizado anticorpo primário anti-GFP produzido em coelho na diluição de 1:500 seguido de anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa 594 na diluição 1:200 e, por questões didáticas optou-se por mudar a cor da fluorescência para verde. Na imunofluorescência para TcXRNAFLAG foi utilizado anticorpo primário anti-FLAG produzido em camundongo na diluição de 1:1000 seguido de anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa 488 na diluição 1:200. Núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI. Como controle foram utilizados parasitas selvagens, os quais foram incubados com os anticorpos nas mesmas condições dos respectivos testes. Barra = 5 µm.

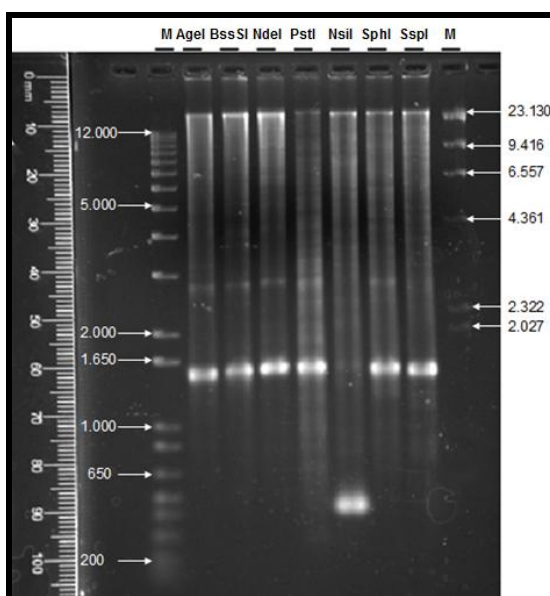
#### **4.5. Análise da estabilidade de mRNAs mediante nocaute da proteína TcXRNA**

O nocaute gênico é uma das ferramentas de genética reversa utilizada para descobrir a função de um gene em um determinado organismo, através do fenótipo e atividade bioquímica após a deleção parcial ou total do gene em questão. Uma das formas de realizar o nocaute gênico é através da recombinação homóloga do gene endógeno por um gene de resistência à droga, como por exemplo, neomicina e higromicina. A recombinação homóloga é um processo de rearranjo físico que ocorre entre duas fitas de DNA, o qual requer o alinhamento de sequências similares. O processo de recombinação homóloga ocorre

naturalmente durante o *crossover* de cromossomos, que ocorre na meiose em organismos eucarióticos e resulta num rearranjo do material genético. Esse processo tem sido bem documentado em *T. cruzi* como um meio de nocautear genes em estratégias experimentais (revisado por Xu, 2007).

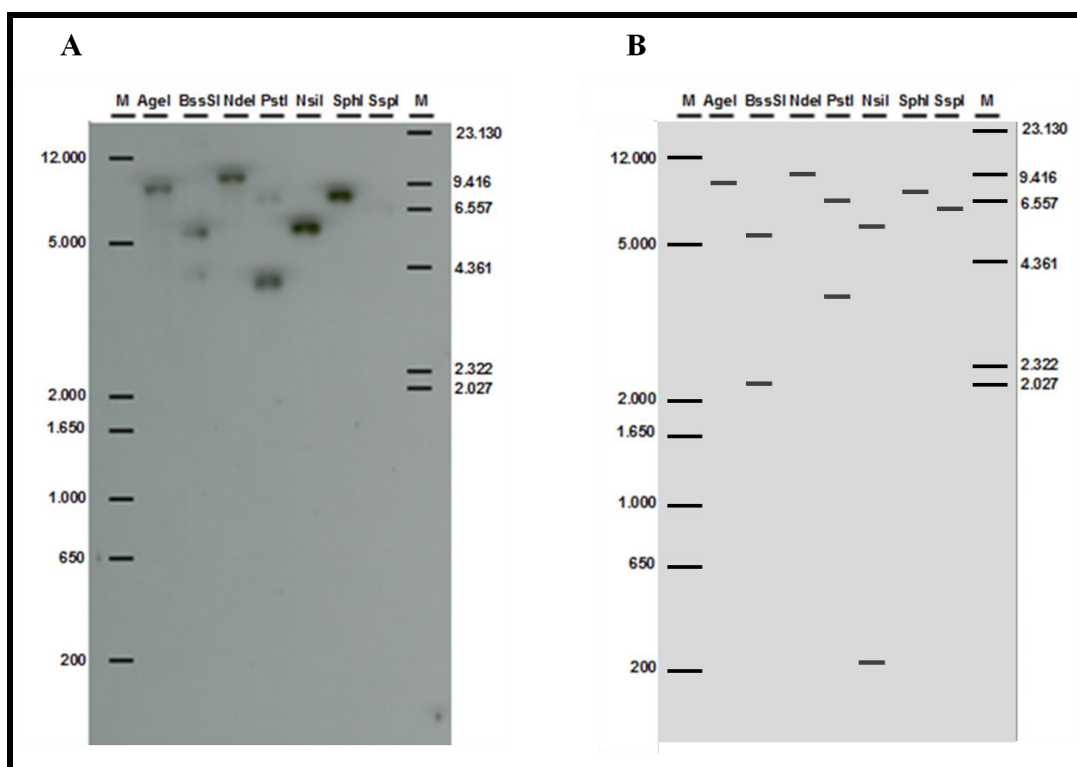
#### 4.5.1. *Southern blot* para identificar número de cópias do gene de TcXRNA

A técnica de *Southern blot* foi utilizada para verificar a quantidade de cópias do gene de TcXRNA. Essa técnica foi realizada através da digestão do DNA genômico de *T. cruzi* com enzimas de restrição presentes na Tabela 3.2 e, o perfil eletroforético do DNA genômico digerido é mostrado na Figura 4.22. Com a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana, seguida de hibridização da sonda e revelação do filme é possível observar na Figura 4.23 que os fragmentos corresponderam ao padrão esperado de um gene cópia única, visto que está de acordo com a Tabela 3.2 e a representação do mapa de restrição da Figura 3.4. Na Figura 4.23B, o fragmento de 200 nucleotídeos presente na enzima NsiI exemplificado, não foi detectado pela técnica de revelação radioativa devido a diferença entre o tamanho do fragmento e o tamanho da sonda, a qual possui 2,4 kb, tornando a manutenção da hibridização instável neste caso. O fragmento de aproximadamente 4300 nucleotídeos presente na enzima BssSI não correspondeu ao esperado (2183 nucleotídeos). Esta diferença pode estar relacionada ao fato do mapa de restrição (Figura 3.4, item 3.7.1) ter sido feito com base na sequência da cepa CL Brener e não Dm28c, a qual foi utilizada para o ensaio de *Southern blot*.



**Figura 4.22: Ensaio de *Southern blot*. Eletroforese em gel de agarose 1% das digestões do DNA genômico de *T. cruzi* com enzimas de restrição. M: marcador de peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). AgeI até SspI: enzimas de restrição.**

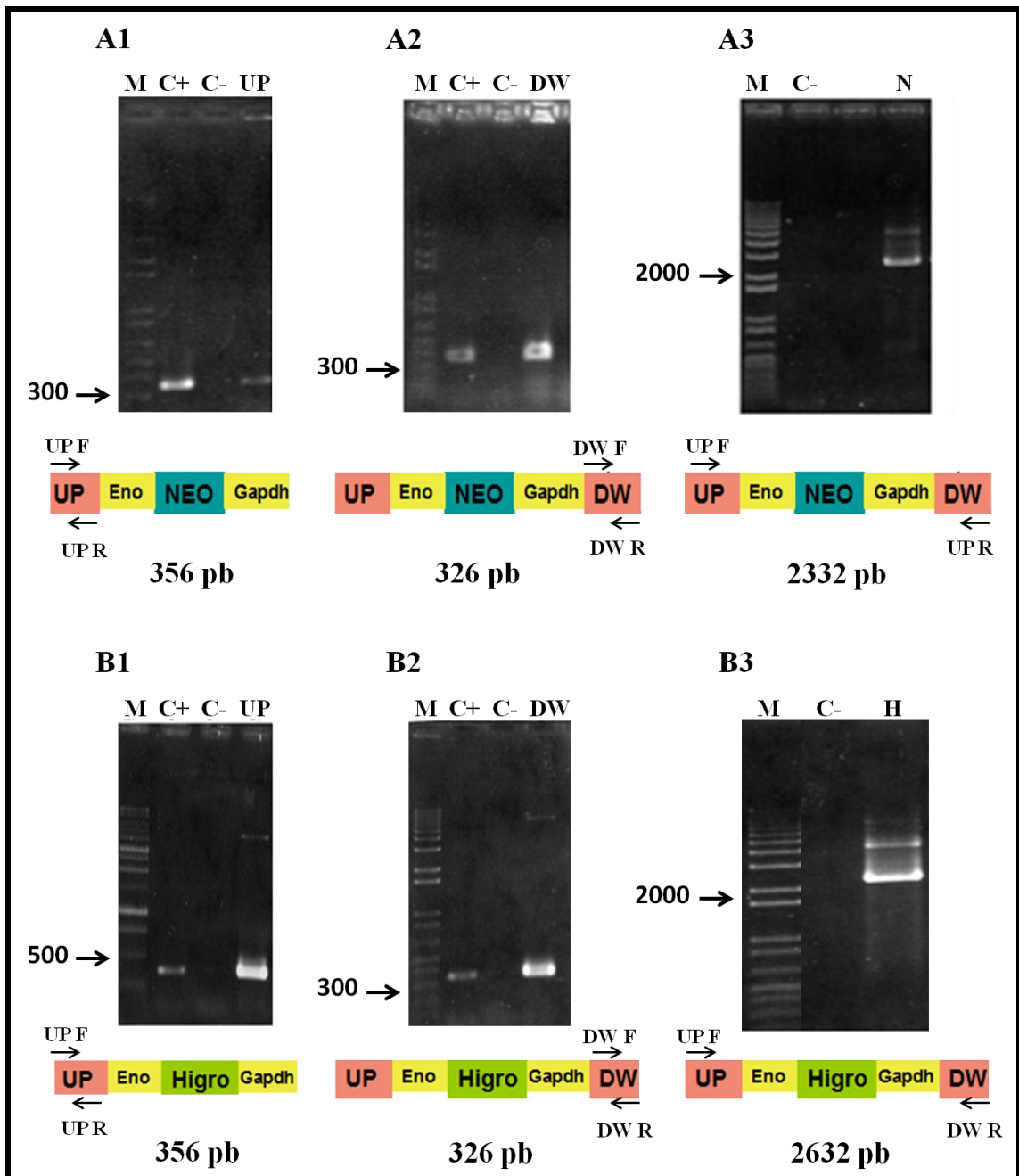
O gel é fotografado com a presença da régua para análise do tamanho do fragmento marcado com a sonda.



**Figura 4.23: Ensaio de Southern blot.** A) Filme radiográfico após exposição com a membrana de nylon contendo os fragmentos de DNA digeridos com as respectivas enzimas de restrição e revelados com a sonda específica marcada com fósforo radioativo ( $P^{32}$ ). M: peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). B) Desenho esquemático do padrão de bandas esperado após digestão do DNA genômico e hibridação da sonda específica. M: peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen).

#### 4.5.2. Obtenção de vetores para nocaute da proteína TcXRNA

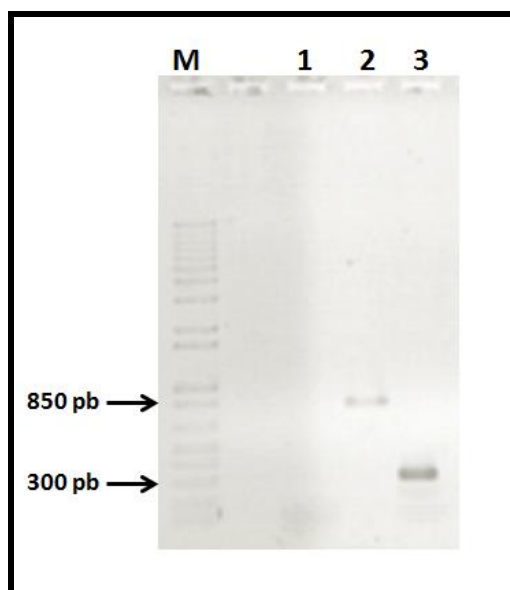
Com a obtenção dos insertos e vetores digeridos e purificados, as ligações foram realizadas na proporção de 1:20 (relação vetor : inserto). Na sequência, a ligação foi transformada em bactérias cálcio competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , e a confirmação dos clones contendo a região intergênica *downstream* do gene de interesse foi feita por análise de PCR utilizando plasmídeos purificados a partir das colônias, onde pode-se observar que as ligações tanto para pNEO2 quanto para pHIGRO produziram clones positivos (Figura 4.24).



**Figura 4.24: Análise de clonagem das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* nos vetores pNEO2 e pHygro2.** A análise foi feita por PCR e eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). A: Análise da ligação em pNEO2. B: Análise da ligação em pHygro2. A1 e B1: PCR de plasmídeos com *primers* para amplificação de região intergênica *upstream*. A2 e B2: PCR de plasmídeos com *primers* para amplificação de região intergênica *downstream*. A3 e B3: PCR de plasmídeos com *primers forward* amplificação de região intergênica *upstream* e *reverse* amplificação de região intergênica *downstream*. N: Fragmento de DNA/KO com gene para resistência à neomicina. H: Fragmento de DNA/KO com gene para resistência à higromicina. M: marcador de peso molecular em pares de bases; C+: controle positivo na presença de DNA genômico; C-: controle negativo na ausência de DNA.

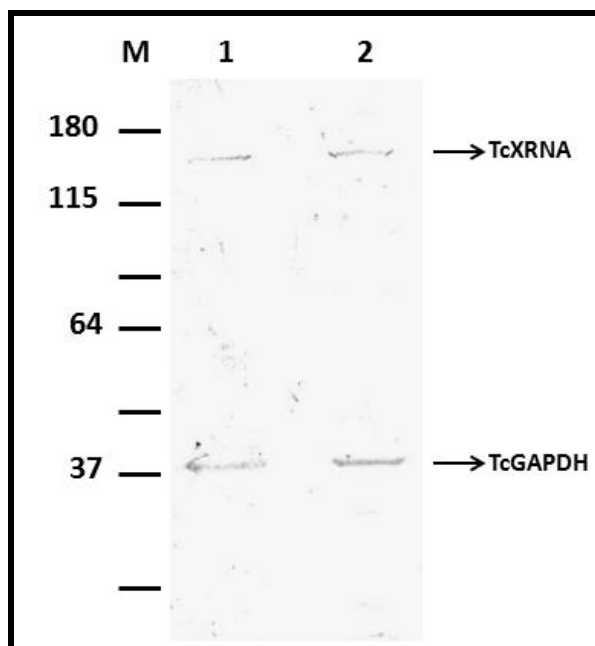
#### 4.5.3. Produção de linhagens de *T. cruzi* para nocaute do gene TcXRNA

Esta etapa tem como objetivo usar as linhagens nocaute do gene para avaliar o efeito na estabilidade de mRNAs. Para obtenção das linhagens, as construções feitas com os vetores, nocaute serviram com molde para as reações de PCR, em volume apropriado para obter o fragmento de DNA/KO. Esses fragmentos foram purificados e transfectados em *T. cruzi* selvagem conforme descrito no item 3.6.9. Porém, mesmo após inúmeras tentativas de selecionar parasitas mutantes nocaute para TcXRNA com resistência tanto para neomicina quanto para higromicina, não foi possível alcançar esse objetivo. Na última tentativa, conseguimos selecionar mutantes com resistência para neomicina. Decidimos então utilizar os *primers* descritos no Quadro 3.1 para confirmar o nocaute, porém os testes parecem indicar que o fragmento de DNA/KO pode ter integrado em uma região diferente do esperado no genoma de *T. cruzi* (Figura 4.25), pois quando combinamos os *primers* NEO F e Ext DW R não há amplificação (Canaleta 1 da Figura 4.25) sendo que os *primers* tanto para neomicina como para região *downstream* amplificam com outras combinações (Canaletas 2 e 3 da figura 4.25).



**Figura 4.25: Análise da transfecção para obtenção de parasitas mutantes selecionados com neomicina.** A análise foi feita com PCR usando DNA genômico dos parasitas selecionados. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. M: marcador de peso molecular em pares de bases (1 kb plus DNA Ladder- Invitrogen). 1: PCR com *primers* NEO F e Ext DW. 2: PCR com *primers* NEO F e NEO R. 3: PCR com *primers* Inter DW e Ext DW.

Realizamos também ensaio de *Western blot* para verificar se havia diminuição na expressão da proteína TcXRNA, no entanto de acordo com a Figura 4.26, não houve diferença na expressão da proteína quando comparada com o parasita selvagem.

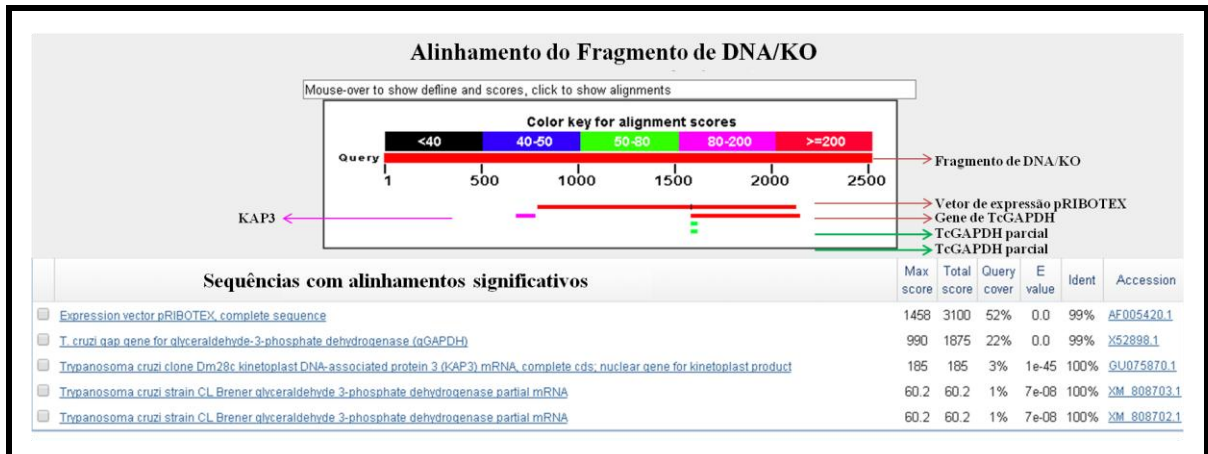


**Figura 4.26: Ensaio de *Western blot* para verificar a expressão da proteína TcXRNA em parasitas mutantes selecionados com neomicina.** M: marcador de peso molecular em kDa (BenchMark™ Protein Ladder- Invitrogen). 1: Extrato proteico de *T. cruzi* na forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Parasitas selecionados com neomicina. 2: Extrato proteico de *T. cruzi* na forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Parasitas selvagens.

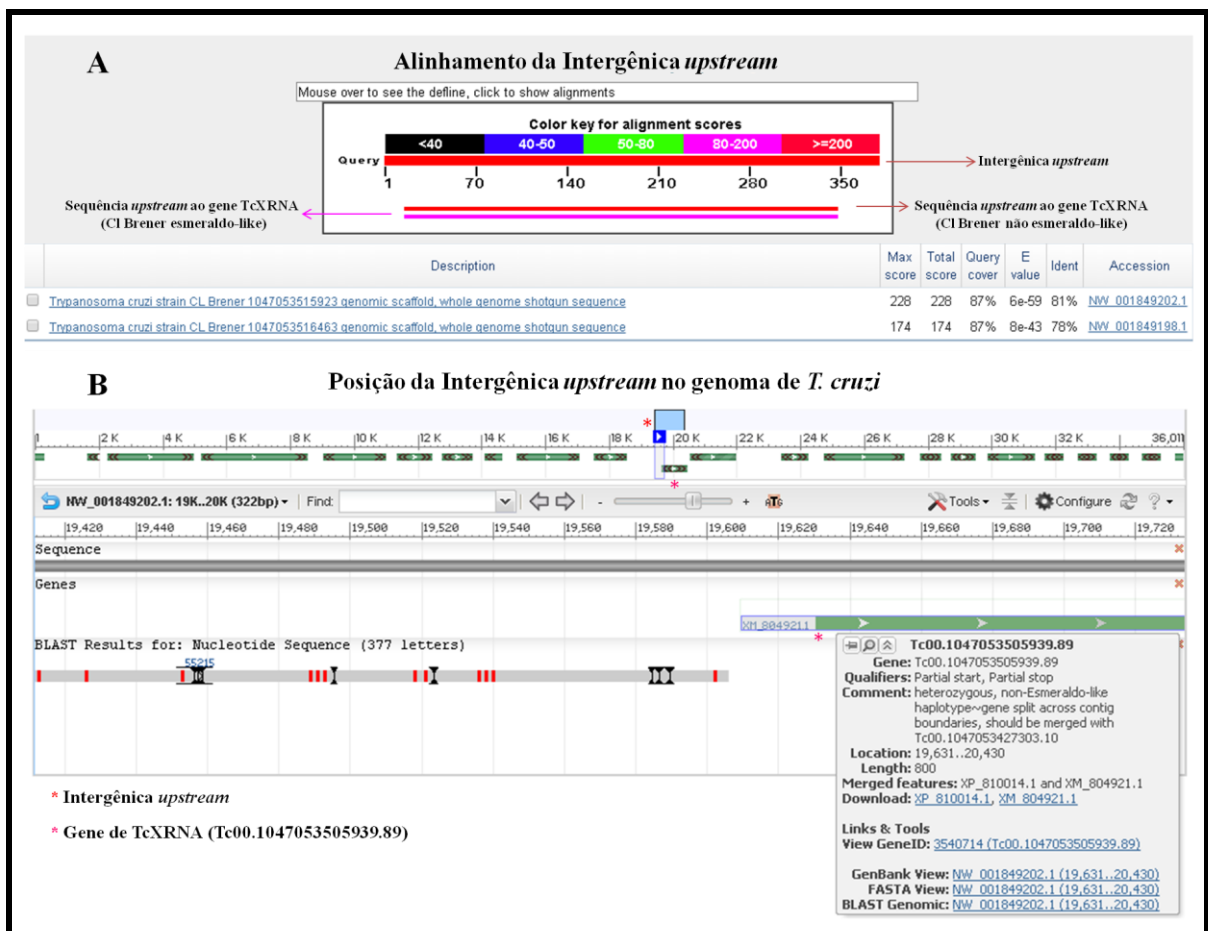
Por análise de alinhamento de sequências nucleotídicas utilizamos a ferramenta BLAST (NCBI) verificamos se as sequências, fragmento de DNA/KO e cada intergênica utilizada para a obtenção dos vetores para nocaute, ou seja, intergênicas *upstream* e *downstream* do gene de TcXRNA alinhavam com regiões presentes no genoma de *T. cruzi*. Na Figura 4.27, algumas sequências alinharam em determinadas regiões com o fragmento de DNA/KO. A sequência pRIBOTEX, a qual alinhou com 1336 nucleotídeos, na verdade é um vetor de expressão para *T. cruzi* construído a partir do vetor pTEX (Martínez-Calvillo *et al.*, 1997), esse vetor está anotado no banco de dados e não é uma sequência nucleotídica presente no genoma do *T. cruzi*. A sequência KAP3 possui em torno de 400 nucleotídeos e está contida no genoma de *T. cruzi*. Esta sequência também está presente nos vetores pNEO2 e pHigro2, porém constitui apenas uma parte, a qual contém 99 nucleotídeos. As demais sequências que correspondem à TcGAPDH alinharam com o fragmento por que a sequência do gene que codifica a proteína GAPDH está contida tanto no genoma de *T. cruzi* como nos vetores para nocaute. Sendo assim, é possível verificar com esses resultados que nenhuma sequência obtida pela ferramenta BLAST alinhou completamente com o fragmento de DNA/KO. Para as regiões das intergênicas *upstream* (Figura 4.28) e *downstream* (Figura 4.29), o alinhamento

encontrou apenas as regiões que estão contidas antes e depois do gene de TcXRNA respectivamente, as quais correspondem às intergênicas do gene.

Novas tentativas para a obtenção de parasitas mutantes nocaute para TcXRNA serão realizadas. Nosso objetivo com esta estratégia é verificar até que ponto a ausência desta proteína interfere na estabilidade dos mRNAs de *T. cruzi*.



**Figura 4.27: Alinhamento do fragmento de DNA/KO.** Acima está o alinhamento obtido com a sequência do fragmento de DNA/KO contra sequências contidas no banco de dados para *T. cruzi*, as quais estão listadas abaixo do alinhamento. As setas indicam as sequências identificadas contendo alguma significância com o Fragmento de DNA/KO.







## 5. DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos divergiram muito cedo dos demais eucariotos durante a evolução e várias linhas de evidência sugerem que estes protozoários parecem ter perdido a habilidade de regular a transcrição de genes individualmente (Clayton, 2002). Em virtude disso, os eventos pós-transcricionais são alvos majoritários para a regulação da expressão gênica durante seu ciclo de vida. Estes parasitas apresentam um ciclo de vida complexo que envolve diferentes hospedeiros e a progressão do ciclo celular está intimamente relacionado com a capacidade de diferenciação celular acompanhada de uma mudança significativa do padrão de expressão de seus genes. Assim, nestes organismos a repressão traducional e a regulação pós transcricional da expressão gênica são essenciais para o sucesso de sobrevivência destes organismos (Clayton & Shapira, 2007).

Um dos processos de controle pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos ocorre através da regulação da taxa de mRNA presentes na célula. Os níveis de mRNA em células eucarióticas são regulados em parte pela alteração da estabilidade dos mRNA e consequentemente dos níveis de mRNAs presentes na células. O tempo de meia-vida de cada mRNA pode ser alterado em resposta à vários sinais internos e externos. Estes sinais são capazes de modificar a expressão de genes através da regulação das vias de rotatividade de RNAs. Os processos que regulam a estabilidade do mRNA são mediados por um conjunto complexo de interações proteína-proteína e proteína-RNA. No centro destas interações estão o *cap* 5' m<sup>7</sup>GpppN e a cauda poli(A) 3' do mRNA. A remoção destas duas estruturas conduz a instabilidade do mRNA e expõe a molécula à degradação pela maquinaria de degradação celular (Parker & Sheth, 2007). Em tripanossomatídeos muitos componentes homólogos da maquinaria de degradação de mRNAs tem sido identificados, implicando na conservação da maquinaria molecular básica responsável por este processo (Cassola, 2011).

Em eucariotos, os RNAs que não estão sendo traduzidos, ou aqueles que estão destinados para a degradação, podem ser compartimentalizados em estruturas citoplasmáticas distintas: os grânulos de RNP (ribonucleoproteínas). Estes grânulos são amplamente descritos em células de mamíferos e leveduras, têm papel fundamental na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional e estão divididos em quatro classes - *P-bodies*, grânulos de estresse, grânulos de células germinativas e grânulos neuronais de transporte. A classificação dos mesmos depende do contexto celular em que se encontram, de proteínas marcadoras específicas e de sua provável função na célula. Apesar da grande diversidade entre eles, todos compartilham características em comum, mas apenas os *P-bodies* parecem estar envolvidos na degradação de mRNA (Revisado por Buchan, 2014). Uma das evidências de que os *P-bodies* podem atuar como sítios de degradação de mRNA é a presença de todos os

componentes da via de degradação de mRNA 5'-3' nestes *foci*. Dentre eles podemos citar: as enzimas de decapping Dcp1/Dcp2 e seus co-ativadores, Dhh1/Rck/p54 (Dhh1 em levedura e Rcp/54 em mamífero), Pat1, Edc3p, o complexo heptamérico Lsm1-Lsm7, e a exonuclease 5'-3' XRN1 (Eulalio *et al.*, 2007; Parker & Sheth, 2007). Além desses, o complexo de desadenilação CCR4/POP2/NOT também acumula em *P-bodies* de células de mamíferos (Cougot *et al.*, 2004).

Devido a importância dos grânulos de mRNP na regulação da expressão gênica, vários grupos têm tentado definir a função exata destas estruturas, principalmente no que diz respeito à distinção entre grânulos de estocagem ou de degradação de mRNAs. Em tripanossomatídeos nosso grupo foi pioneiro em identificar grânulos de mRNA semelhantes à *P-bodies* de leveduras e mamíferos (Holetz *et al.*, 2007, 2010). Entretanto, utilizamos a proteína TcDHH1 como alvo de estudo, e apesar desta proteína ser cogitada como marcadora de *P-bodies* em eucariotos, alguns estudos sugerem que a mesma possa atuar como repressora traducional quando existe uma redução da atividade de *decapping* (Gao *et al.*, 2008; Pitt *et al.*, 2000; Seydoux & Fire, 1994; Shepard *et al.*, 2003) e até o momento, não se pode afirmar que os grânulos que contenham esta proteína estejam efetivamente comprometidos com a degradação de mRNAs.

Assim, para verificar a possível co-existência de grânulos de degradação e estocagem em *T. cruzi* decidimos investigar a função da proteína TcXRNA na formação dos grânulos de mRNP, cuja função em eucariotos é a degradação de mRNAs pelo caminho dependente de desadenilação na direção 5'→3' (Nagarajan *et al.*, 2013). Neste estudo seria possível também, definir populações de mRNAs presentes nestes grânulos que sejam regulados pós transcricionalmente durante o ciclo de vida deste parasita, e ajudar a identificar como estes grânulos estão alterando a expressão destes mRNAs.

A proteína XRNA foi identificada no genoma de tripanossomas, por Li e colaboradores em 2006. A XRNA de *T. brucei* possui 36% de identidade, com base no domínio XRN\_N, com a exonuclease Xrn1 de *S. cerevisiae*. Em *T. brucei* ensaios de fracionamento mostraram que a proteína está presente tanto no citoplasma como no núcleo. Além disso, por ensaios de RNAi foi demonstrado que a depleção de TbXRNA aumenta quatro vezes mais a estabilidade de mRNAs instáveis e que essa proteína é essencial para o crescimento do parasita (Li *et al.*, 2006).

Análises realizadas pela ferramenta BLAST (NCBI) mostram que a proteína XRNA em *T. cruzi* (TcXRNA), assim como em *T. brucei*, é em teoria, uma exonuclease 5'→3', pois apresenta o domínio amino-terminal XRN\_N sendo também homóloga à proteína Xrn1 de *S. cerevisiae* com a qual apresenta 43 % de identidade. Com *T. brucei*, a porcentagem de

identidade é de 69 %. A conservação da proteína TcXRNA, com relação ao domínio funcional, mostra que a mesma pode apresentar funções similares ou relacionadas às outras exonucleases 5'→3' de outros eucariotos, pois existe um consenso de que proteínas com identidade acima de 40 % têm alta probabilidade de apresentarem a mesma função (Petsko & Ringe, 2003 citados por Liberman, 2004).

Resultados obtidos no nosso trabalho e no trabalho de Ferrarini (2012) demonstraram que o gene da proteína TcXRNA possui 4326 pares de bases e a proteína apresenta massa molecular em torno de 162 kDa. Essa massa molecular da proteína foi predita por *Western blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-TcXRNA e confirmada, pelo mesmo ensaio, com extratos protéicos dos parasitas mutantes expressando as etiquetas GFP e FLAG (Figuras 4.1 e 4.20). Visto que o gene de TcXRNA está anotado no banco de dados como mais de uma sequência apresentando diferentes massas moleculares da proteína para duas cepas distintas (CL Brener e Sylvio) e que na anotação da cepa Dm28c está faltando cerca de 279 nucleotídeos no início do gene, os dados obtidos no nosso trabalho são importantes para a comunidade científica, uma vez que, poderá contribuir para aperfeiçoar a anotação desta proteína nos bancos de dados genômicos. Com o anticorpo policlonal, verificamos ainda que a proteína TcXRNA é constitutivamente expressa ao longo da metaciclogênese e nas formas epimastigotas em diferenciação aderidas ao substrato e nas formas tripomastigotas metacíclicas o anticorpo detecta também uma proteína de tamanho superior a 180 kDa (Figura 4.2). Entretanto, ainda não foi possível definirmos a identidade desta banda, mas cogitamos a possibilidade de se tratar de uma interação extremamente forte com outra proteína, ou até mesmo um processamento diferencial do pré-mRNA produzindo duas isoformas da proteína TcXRNA. Provavelmente ensaios de imunoprecipitação, poderia ajudar a verificar se existe a interação, caso essa banda do tamanho correspondente a 180kDa fosse imunoprecipitada junto com TcXRNA. E análises de espectrometria de massas desta proteína ajudariam a identificar a sua sequência.

Com relação aos mecanismos de processamento diferencial do pré-mRNA, estudos têm demonstrado que um sistema de *trans-splicing* alternativo em tripanossomatídeos pode gerar mRNAs de tamanhos diferentes, os quais podem estar envolvidos na dupla localização de proteínas e no controle pós-transcricional durante a regulação da expressão gênica. Dados como esse foram vistos por Helma e colaboradores (2009), que ao inserir um gene repórter de luciferase no locus do gene de rRNA, foi visto que nas formas procíclicas de *T. brucei* o *spliced leader* foi adicionado na posição esperada do pré-mRNA da luciferase, ao passo que nas formas sanguíneas, múltiplas adições do *spliced leader* ocorreram no mesmo RNA da luciferase gerando assim três mRNA maduros para a luciferase (Helma *et al.*, 2009). Outro

dado a respeito do *trans-splicing* alternativo em tripanossomas foi demonstrado em *T. brucei* por Rettig e colaboradores (2012), onde o *trans-splicing* alternativo levou a produção de dois transcritos para a proteína isoleucina-tRNA sintetase gerando duas isoformas da enzima, sendo que o transcrito maior codifica para proteína com localização citoplasmática e o transcrito menor para localização mitocondrial (Rettig *et al.*, 2012). Assim, testes como PCR transtriptase reversa (RT-PCR) para detecção e identificação de mRNAs poderão ser realizados a fim de ajudar a solucionar esta questão.

Cassola e colaboradores em 2007 foram os primeiros a investigar a proteína XRNA em *T. cruzi*. Neste trabalho os autores fusionaram a proteína com a etiqueta GFP e verificaram que TcXRNA é predominantemente citoplasmática com pouca fluorescência observada no núcleo.

Em *T. brucei*, Kramer e colaboradores (2008) demonstraram um padrão de localização celular diferente para a proteína TbXRNA. Neste organismo, esta proteína está localizada em foci citoplasmáticos que co-localizam com a proteína TbDHH1 e SCD6, e também está presente em um grânulo na parte posterior da célula, onde não há co-localização com as duas proteínas citadas e aumenta drasticamente em tamanho quando o parasita é submetido a choque térmico. Os autores propõem que este grânulo possa ter uma origem evolucionária comum aos grânulos polares presentes em oócitos de *Drosophila*, podendo estar relacionado à degradação de mRNAs específicos que são transportados por microtúbulos até o polo posterior do parasita. Porém, no nosso trabalho não foi observada a localização da proteína TcXRNA no polo posterior de *T. cruzi* em nenhuma das formas de diferenciação analisadas, nem mesmo quando o parasita foi submetido a estresse nutricional. Apesar desta diferença de localização quanto a presença da proteína em “grânulo polar-like”, não podemos descartar que isso realmente não aconteça em *T. cruzi*, pois o ideal seria verificar em diferentes estresses, como por exemplo choque térmico, para confirmar a ausência deste padrão de localização.

Um dado curioso que observamos com os ensaios de imunofluorescência indireta foi o padrão de grânulos de TcXRNA que se concentravam ao redor do núcleo de algumas células, principalmente aquelas que se encontram na fase G2 do ciclo celular, que segundo Elias e colaboradores (2007), são caracterizadas pela presença de um núcleo, um cinetoplasto e dois flagelos (Figura 4.4 (controle) e Figura 4.5). Este resultado também foi observado nos parasitas mutantes que expressam a proteína TcXRNA fusionada a GFP e FLAG (Figura 4.21). Em *C. elegans*, os grânulos que se formam na periferia do núcleo são ditos Grânulos Perinucleares (GPNs) e essa formação se dá a partir do acúmulo de pré-mRNA quando o *trans-splicing* é inibido (Sheth *et al.*, 2010). Em tripanossomas já foi apontado que estes

grânulos podem conter proteínas envolvidas na ligação à RNAs, iniciação da tradução e degradação de mRNA (DHH1, SCD6, CAF1, XRNA, eIF4E1, eIF4E3, PABP2, UPF1, e VASA) (Kramer, 2014). Semelhantes aos grânulos germinativos encontrados em *C. elegans*, acredita-se que os GPNs de tripanosomas atuem como uma triagem no controle de qualidade de mRNAs. Além disso, esses grânulos são dependentes da integridade do complexo de poro nuclear e da transcrição ativa, contudo, não são afetados pela interferência na tradução. (Kramer, 2012, 2014; Sheth *et al.*, 2010). Kramer (2012) apresentou em *T. brucei* algumas proteínas que se localizavam na periferia nuclear ao tratar as células com sinefungina, uma droga que inibe o *trans-splicing* por impedir a metilação do SL-RNA. As proteínas XRNA, DHH1, eIF4E1, CAF1 e SCD6 se localizam em *P-bodies*, porém quando a célula é tratada com sinefungina, essas proteínas aparecem ao redor do núcleo. Portanto, acreditamos que a marcação que vimos na imagem de imunofluorescência possa representar uma característica da proteína XRNA em *T. cruzi* quanto a sua presença em grânulos perinucleares. Sendo assim pretendemos realizar experimentos para confirmar estes dados através de testes com drogas que promovam a inibição do *trans-splicing* e acúmulo de pré-mRNA como, por exemplo, a droga sinefungina. Além disso, a presença de GPNs em parasitas que se encontram na fase G2 do ciclo celular nunca foi demonstrada e também será melhor investigada. A fase G2 é tradicionalmente considerada "passiva" quando comparada à fase G1 em relação a atividade transcricional, pois em G1 existe transcrição ativa da maioria dos genes para entrar na fase S, enquanto em G2 uma proporção menor de genes são transcritos, destacando-se aqueles requeridos durante a mitose (Desvoyes *et al.*, 2014). Logo, com base nestes dados especulamos a presença de grânulos de TcXRNA na região perinuclear durante a fase G2 possa ser em decorrência da redução na atividade transicional, que deve alterar a disponibilidade de mRNA, semelhante ao que ocorre com o tratamento com sinefungina, e isso pode estar contribuindo para a formação dos GPNs. Assim, experimentos de sincronização do cultivo celular seguido por ensaios de IFI, bem como ensaios de *run on* para verificar transcrição ativa nas células, serão realizados para testar esta hipótese.

Aqui, nós demonstramos por ensaios de IFI com o soro policlonal, que a proteína TcXRNA apresenta-se preferencialmente em *foci* citoplasmáticos. Utilizamos também os parasitas expressando TcXRNA fusionada à GFP e FLAG para confirmar essa localização celular. Além disso, demonstramos que *foci* contendo TcXRNA apresentam padrões distintos de número, tamanho e dinâmica de formação durante a metaciclogênese. Quando comparadas as formas epimastigota em fase logarítmica de crescimento, parasitas submetidos a estresse nutricional, formas epimastigotas em diferenciação aderidas ao substrato e as formas tripomastigota metacíclicas essa dinâmica fica evidente (Figura 4.4). O fato de que os

grânulos de TcXRNA estejam presentes em parasitas em fase logarítmica de crescimento, e que estes grânulos aumentam em número quando o parasita é submetido a estresse nutricional, é um forte indicativo que estes grânulos se assemelhem a *P-bodies*, uma vez que *P-bodies* estão presentes mesmo na ausência de estresse e aumentam em número quando induzidos por condições adversas ao parasita (Bashkirov *et al.*, 1997; Brengues *et al.*, 2003; Teixeira & Sheth, 2005). Este aumento no número de grânulos coincide com a substancial redução da atividade traducional, que pode ser evidenciada pela diminuição da fração polissomal quando o extrato das formas estressadas é submetido à análise por gradiente de sacarose (Holetz *et al.*, 2007), aumentando a possibilidade de que estes grânulos possam constituir um pool de mRNPs traducionalmente silenciadas ou enviadas para degradação. Além disso, a quantidade dos grânulos e intensidade de fluorescência diminuem significativamente quando comparamos as formas epimastigota com a forma tripomastigota metacíclica (Figura 4.4). Esse evento também foi visto por Holetz e colaboradores (2007), onde a quantidade e intensidade de fluorescência dos grânulos que contém a proteína TcDHH1 são drasticamente diminuídas nas formas não replicativas de *T. cruzi*. Neste trabalho, Holetz e colaboradores demonstraram que os mRNAs que se associam a TcDHH1 são regulados durante o ciclo de vida do parasita e que mRNAs presentes nos grânulos na forma epimastigotas, são preferencialmente traduzidos nas formas tripomastigotas metacíclicas. Este fato sugere a princípio que alguns grânulos de TcDHH1 pudessem funcionar na estocagem destes mRNAs para posterior tradução na forma metacíclica. Por outro lado, outro trabalho do grupo demonstrou que a proteína TcPuf6 está presente em grânulos que contém a proteína TcDHH1 e promove a degradação de seus mRNAs alvos (Dallagiovanna *et al.*, 2008). Estes dados fornecem indícios de que grânulos de estocagem e degradação co-existam em *T. cruzi* e reforçam a importância deste trabalho em identificar a participação da TcXRNA, na formação dos grânulos de RNP neste parasita, visto se tratar em outros tripanossomatídeos de uma proteína sabidamente envolvida com a degradação de mRNA. Dessa forma, resolvemos investigar se condições que inibem a tradução, seja pela dissociação dos polissomos e liberação de mRNAs traducionalmente reprimidos, seja pelo "congelamento" dos mRNAs nos polissomos, alterariam a dinâmica de formação dos grânulos de TcXRNA e sua co-localização com a proteína TcDHH1 durante o processo de metaciclogênese *in vitro*. Trabalhos prévios em *T. cruzi* e *T. brucei* demonstraram que os *foci* que contém a proteína TcDHH1 e TbXRNA, respectivamente, variam em número quando o parasita é submetido a estresse nutricional e quando a tradução é inibida (Holetz *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2008). Neste caso, utilizamos duas drogas que comprometem a tradução: cicloheximida e puromicina. A cicloheximida é uma droga que paralisa a elongação da

tradução por que inibe a função do fator de tradução eEF2 (Landau, 2012). Já a puromicina é um análogo ao peptidil-tRNA e favorece a liberação dos mRNAs da maquinaria de tradução (Starck & Roberts, 2002). Nosso trabalho mostrou que as alterações no número de grânulos de TcXRNA perante os tratamentos foram pequenas, porém com base em testes estatísticos aqui aplicados essas diferenças foram significativas. Quando as formas epimastigotas eram tratadas com cicloheximida havia a diminuição no número de grânulos e quando o tratamento foi realizado com puromicina os grânulos aumentaram em quantidade. Em epimastigotas em fase logarítmica de crescimento sob estresse nutricional houve um aumento no número de grânulos quando este foi comparado com epimastigotas sem a presença do estresse. No entanto, quando tratamos os parasitas sob estresse com puromicina o aumento dos grânulos não foi evidenciado. Esta situação pode estar relacionada à disponibilidade de mRNAs na célula, uma vez que, o parasita já encontra-se em uma condição anormal que leva à alteração na taxa de tradução. Em epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato, foi visto que além dessas formas terem o número de grânulos reduzido naturalmente, esses parasitas também responderam à ação das drogas. De modo geral, os resultados obtidos por esta análise, mostram que os grânulos de TcXRNA na presença de situações que interferem na tradução, seja pelo estresse nutricional ou pela ação das drogas cicloheximida e puromicina, são estruturas dinâmicas que podem ser alteradas conforme o comprometimento dos mRNAs com a maquinaria de tradução. Quando verificamos o padrão de co-localização das proteínas TcXRNA e TcDHH1 tanto nas formas epimastigotas controle e naquelas tratadas com cicloheximida e puromicina, observamos que alguns grânulos que continham ambas as proteínas (Figura 4.14). Outra característica que observamos foi que à medida que os parasitas entraram em processo de diferenciação, os *foci* de co-localização pareceram diminuir (Figuras 4.16 e 4.17). Este evento pode estar relacionado à diminuição do número de grânulos de TcXRNA em epimastigotas em processo de diferenciação, e essa redução se acentua nas formas tripomastigotas, os quais já apresentam a mudança na intensidade de fluorescência e na quantidade de grânulos para ambas as proteínas. O fato de termos observado poucos *foci* de co-localização entre as proteínas TcXRNA e TcDHH1 pode ser justificado pela ideia de que os grânulos de mRNA são altamente dinâmicos e sua composição proteica pode ser alterada a todo momento na célula, mas também, indica fortemente a coexistência de grânulos envolvidos tanto na estocagem como na degradação de mRNAs, onde a proteína TcDHH1 possa estar participando no transporte dos RNAs de um tipo de grânulo para o outro, e a proteína TcXRNA esteja atuando nos grânulos efetivamente envolvidos com a degradação dos RNAs.



Encontrar os parceiros funcionais de TcXRNA e sequenciar os RNA presentes no complexo está entre um dos dos objetivo estabelecidos para este trabalho. Em outros eucariotos como leveduras e mamíferos muitas proteínas que compõe os *P-bodies* já estão bem caracterizadas. *P-bodies* são estruturas formadas por componentes envolvidos na degradação de mRNAs. Dentre esses componentes estão o complexo Lsm, o complexo de *deccaping* Dcp1/Dcp2 e a exonuclease 5'→3'Xrn1, os quais formam o cerne do PB juntamente com o mRNA alvo. Alguns estudos também apontam a presença de proteínas que se ligam à RNA e fatores de início da tradução (Kedersha & Anderson, 2009) bem como, micro RNAs (miRNAs) e componentes associados à maquinaria de RNA de interferência (Jackson & Standart, 2007). Em tripanossomatídeos, algumas proteínas semelhantes à componentes de *P-bodies* já foram identificadas, como por exemplo, XRNA e DHH1 em *T. brucei* e *T. cruzi*, PUF6 em *T. cruzi* e SCD6 em *T. brucei*. Neste trabalho, nós procuramos identificar proteínas presentes em grânulos contendo TcXRNA a fim de enriquecer os estudos a respeito da composição de grânulos de degradação em tripanossomatídeos. A proteína Xrn1 nos demais eucariotos já está bem caracterizada como uma proteína pertencente a *P-bodies*, o qual é formado por um complexo mRNP (Parker & Sheth, 2007). As evidência na literatura apontam a XRNA como uma exonuclease 5'→3' similar a Xrn1 de *S. cerevisiae*, e estudos já identificaram sua relação com RNAs em tripanossomas (Cassola *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Contudo os parceiros de TcXRNA ainda não foram identificados, portanto neste trabalho nós procuramos identificar as proteínas que se associam a TcXRNA nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e os RNAs presentes nos grânulos que contém esta proteína tanto em epimastigotas quanto em parasitas submetidos a estresse nutricional. Após realizarmos vários ensaios conseguimos padronizar a imunoprecipitação e demonstramos por ensaio de *Western blot* que a proteína foi efetivamente capturada pelo anticorpo acoplado às *beads* magnéticas (Figura 4.11). Porém, não foi possível determinar quais são as proteínas que interagem com TcXRNA, pois após a análise da fração proteica eluída por espectrometria de massas, nem a proteína TcXRNA, nem a proteína TcDHH1 foram identificadas. Esta situação não rejeita a possibilidade das proteínas estarem na amostra, uma vez que as mesmas foram identificada pela técnica de *Western blot*. A razão de uma determinada proteína não ser identificada pela técnica de espectrometria de massas pode ser devido ao fato de que proteínas menos abundantes podem ter seus espectros mascarados pela presença de proteínas mais abundantes numa determinada amostra (Berger *et al.*, 2006). No entanto, o resultado da espectrometria de massas também não revelou a presença de proteínas compatíveis com componentes de grânulos de degradação ou estocagem, o que nos levou a rejeitar a amostra.

Novos ensaios de imunoprecipitação serão realizados diferindo os tampões, detergentes para lise e métodos de captura, a fim de solucionarmos este problema.

Para identificar os mRNAs presentes nos grânulos que contém a proteína TcXRNA realizamos experimentos de imunoprecipitação para obtenção e sequenciamento dos RNA presentes nos complexos que contém a proteína TcXRNA nas formas epimastigotas e epimastigotas sobre estresse nutricional, para podermos inferir, mesmo que de forma preliminar, um possível papel desta proteína na regulação da expressão gênica do *T. cruzi*. Os RNAs presentes no imunocomplexo foram analisados primeiramente no equipamento Agilent 2100 *Bioanalyzer*, e observamos pelo padrão do eletroferograma que os picos de RNAs eram semelhantes tanto para epimastigota como para epimastigota sob estresse em duas das três réplicas analisadas (Figura 4.12). Os dados do *Bioanalyzer* mostram que os RNAs estão íntegros e passíveis de sequenciamento, e neste momento as amostras estão em processo de preparação para o sequenciamento na plataforma Illumina.

Por fim, nós tentamos realizar o nocaute da proteína TcXRNA por recombinação homóloga dos dois alelos do gene de TcXRNA pelos genes de resistência à neomicina e higromicina, visto que abordagens de genética reversa são ideias para analisar a função de um gene num organismo, pois permitem verificar o fenótipo causado pela ausência do gene. Assim, uma das abordagens utilizadas para este objetivo é o nocaute gênico através de recombinação homóloga (Xu, 2007). Nós conseguimos obter os vetores contendo os insertos a serem recombinados, porém após várias tentativas de transfecção e seleção sem sucesso nós obtivemos uma cultura de parasitas mutantes, a qual expressava o gene para resistência à neomicina. No entanto, após alguns testes por PCR e *Western blot* acreditamos que o inserto, o qual chamamos de Fragmento de DNA/KO, tenha recombinado em uma região diferente à esperada. A dificuldade em selecionar parasitas nocaute por recombinação homóloga pode ser atribuída à baixa eficiência de recombinação em *T. cruzi* (Peng *et al.*, 2015). Outro dado que sempre proporciona dúvida a respeito da recombinação homóloga é o tamanho da intergênica utilizada para esta técnica. Em *Leishmania* são necessários pelo menos 150 nucleotídeos para que ocorra a recombinação, já em *T. brucei* existem relatos de que apenas 42 nucleotídeos já são suficientes para recombinar (Xu *et al.*, 2009). Contudo as regiões que selecionamos das intergênicas continham mais de 300 nucleotídeos e, com isso acreditamos que a dificuldade em selecionar parasitas mutantes não tenha sido pelo tamanho da sequência intergênica selecionada. O alinhamento das sequências Fragmento de DNA/KO e de cada intergênica utilizada para a obtenção dos vetores para nocaute foi realizado com o auxílio da ferramenta BLAST (NCBI). Como esperado, o Fragmento de DNA/KO não alinhou totalmente com sequências gênicas de *T. cruzi* e as porções das intergênicas utilizadas

para o nocaute alinham-se com as respectivas intergênicas do gene de TcXRNA. Porém, estes alinhamentos não descartam a possibilidade da existência de outra região similar, uma vez que, erros de anotação do genoma podem facilmente existir (Koonin & Galperin, 2003).

Enfim, com os dados obtidos neste trabalho, acreditamos que a proteína TcXRNA, assim como nos demais eucariotos, é componente de grânulos de RNA cuja formação é dinâmica, visto que o número é alterado em resposta a diferenciação do parasita, assim como, alterações no estado de tradução. Por isso, e com base no que foi descrito na literatura para outros organismos, acreditamos estes grânulos de TcXRNA podem também estar ligados aos processos de degradação e/ou estocagem de mRNA em *T. cruzi*. Sem dúvida, mais evidências deverão ser obtidas a fim de compreender se TcXRNA teria uma função mais específica de degradação ou estocagem de mRNAs, e como sua função estaria associada a alterações no perfil de expressão de mRNA/proteínas nesse organismo.

## 6. CONCLUSÃO

1. O gene de XRNA em *T. cruzi* possui 4326 pares de bases e codifica uma proteína de 162 kDa.
2. A proteína TcXRNA é constitutivamente expressa ao longo da metaciclogênese e apresenta-se em *foci* citoplasmáticos que aumentam em número quando o parasita é submetido ao estresse nutricional e diminuem significativamente a partir da diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos.
3. Esta proteína está presente em *foci* citoplasmáticos ao redor do núcleo, com maior evidência em parasitas na fase G2 do ciclo celular. Estes grânulos podem ser semelhantes aos grânulos perinucleares observados em oócitos de *Drosophila*, os quais são responsáveis pelo controle de qualidade de mRNAs.
4. A TcXRNA tem a dinâmica de seus grânulos modificada em situações que interferem com o processo de tradução, como a exposição à estresse nutricional e tratamentos com as drogas cicloheximida e puromicina.
5. Os ensaios de co-localização da proteína TcXRNA e TcDHH1 sugerem que ambas as proteínas interagem parcialmente e de forma dinâmica, esta interação parece diminuir ao longo da diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas. Esta observação sugere a co-existência de grânulos de RNPs distintos em *T. cruzi*, que podem estar envolvidos tanto com a estocagem como com a degradação de mRNAs.
6. Não foi possível até o momento identificar os parceiros funcionais, bem como os RNAs associados à proteína TcXRNA. Nos ensaios de imunoprecipitação seguidos por espectrometria de massas não foi detectada a proteína TcXRNA. Assim, novas padronizações das condições de imunoprecipitação serão realizadas para solucionar este problema. Os RNAs associados a TcXRNA estão sendo processados para sequenciamento na plataforma Illumina.

7. Por fim, com base na dinâmica da formação de grânulos contendo TcXRNA ao longo da metaciclogênese e frente à eventos que comprometem a tradução, podemos inferir que esta proteína exerça um papel importante no metabolismo de mRNA em *T. cruzi*.

## 7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem base para novas perspectivas, entre elas:

1. Confirmar se a proteína XRNA de *T. cruzi* de fato pode se localizar em grânulos perinucleares através de tratamento com drogas que interfiram no trans-*splicing* como a sinefungina.
2. Realizar ensaios de co-localização pela técnica de imunofluorescência indireta entre a proteína TcXRNA e outras proteínas, as quais podem estar envolvidas com a regulação de RNAs específicos, entre elas (ZFP2, Puf6 e Alba), com proteínas de grânulos de estresse (Hsp70 e PABPs), e com proteínas envolvidas no processo de degradação de mRNAs, (POP2, CCR4 e SCD6).
3. Trabalhar na padronização das condições de imunoprecipitação para identificar as proteínas presentes no complexo contendo TcXRNA por espectrometria de massas e investir em novas tentativas de nocaute do gene de TcXRNA. Estes experimentos trarão maior clareza a respeito da composição dos grânulos que contém a proteína TcXRNA bem como o seu envolvimento com o metabolismo de mRNA em *T. cruzi*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). Os fatores de extensão direcionam a tradução e aumentam a exatidão do processo. In *Biologia Molecular da Célula*, 377.

Anderson, P., & Kedersha, N. (2007). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), 141–50.

Ayub, M., Lapadula, W., Hoebeke, J., & Smulski, C. (2012). Ribosomes from Trypanosomatids: Unique Structural and Functional Properties. In *Cell-Free Protein Synthesis - InTech*, 3–28.

Bangs, J. D., Crainll, P. F., Hashizumell, T., Mccloskeyllii, J. A., & Boothroyd, J. C. (1992). Spectrometry of mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805–9815.

Bashkirov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J., & Heyer, W. (1997). A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates, *136*(4), 761–773.

Batista, M., Marchini, F. K., Celedon, P. a F., Fragoso, S. P., Probst, C. M., Preti, H., Ozaki, L. S., Buck, G. A., Goldenberg, S., Krieger, M. a. (2010). A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, 10(1), 259.

Berger, S. ., Millea, K. ., Krull, I. ., & Cohen, S. . (2006). Middle-out proteomics: incorporating multidimensional protein fractionation and intact protein mass analysis as elements of a proteomic workflow. In *Separation methods in proteomics*, 388.

Bonaldo, M. C., Souto-padron, T., Souza, W. De, & Goldenberg, S. (1988). Cell-Substrate Adhesion during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. *Cell Biology*, 106, 1349–1358.

Brener, Z. (1997). *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*, 25–31.

Bregues, M., Teixeira, D., & Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, 310, 1–5.

Buchan, J. R. (2014). mRNP granules. *RNA Biology*, 11(8), 1019–30.

Buchan, J. R., Muhlrud, D., & Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 183(3), 441–55.

Camargo, E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trupanosomes in liquid media. *Revista Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 6, 93–100.

Cassola, A. (2011). RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. *Current Chemical Biology*, 5(2), 108–117.

Cassola, A., De Gaudenzi, J. G., & Frasch, A. C. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Molecular Microbiology*, 65(3), 655–670.

Cavalier-Smith, T. (2009). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters Evolutionary Biology, Epub ahead of print*, 4–7.

Chagas, C. (1909). Nova Tripanozomiaze Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159–218.

Chagas, C. (1911). Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 3, 219–275.

Chow, C., Cloutier, S., Dumas, C., Chou, M.-N., & Papadopoulou, B. (2011). Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2 $\alpha$  kinase-dependent eIF2 $\alpha$  phosphorylation. *Cellular Microbiology*, 13(7), 1059–77.

Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal*, 21(8), 1881–1888.

Clayton, C., & Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 93–101.

Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Thomas, N.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 315–327.

Contreras, V.T.; Salles, J.M.; Thomas, N.; Morel, C.N.; Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 315–327.

Costa Lima, T. D., Moura, D. M. N., Reis, C. R. S., Vasconcelos, J. R. C., Ellis, L., Carrington, M., Figueiredo, R. C. B. Q., de Melo Neto, O. P. (2010). Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic Cell*, 9(10), 1484–94.

Cowling, V. H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *The Biochemical Journal*, 425(2), 295–302.

Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–72.

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. a, Olsen, J. V, & Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1794–805.

- Cuevas, I. C., Frasc, A. C. C., & D'Orso, I. (2005). Insights into a CRM1-mediated RNA-nuclear export pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *139*(1), 15–24.
- Dallagiovanna, B., Pérez, L., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., Duhagon, M., & Garat, B. (2005). *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. *Experimental Parasitology*, *109*, 260–4.
- Dallagiovanna, B., Correa, A., Probst, C. M., Holetz, F., Smircich, P., de Aguiar, A. M., Mansur, F., Silca, C. V., Mortara, R., Garat, B., Buck, G. A., Goldenberg, S., Krieger, M. A. (2008). Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(13), 8266–73.
- Das, A., Banday, M., & Bellofatto, V. (2008). RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryotic Cell*, *7*(3), 429–34.
- De Souza, F. S. P., Rampazzo, R. D. C. P., Manhaes, L., Soares, M. J., Cavalcanti, D. P., Krieger, M. A., Goldenberg, S., Fragoso, S. P. (2010). Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *172*(2), 90–8.
- De Souza, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, *86*, 197–283.
- De Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*, 17–36.
- De Souza, W. (2002). Kinetoplastid Biology and Disease From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, *21*, 1–21.
- Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a012286.
- Decker, C. J., Teixeira, D., & Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, *179*(3), 437–49.
- Desvoyes, B., Fernández-Marcos, M., Sequeira-Mendes, J., Otero, S., Vergara, Z., & Gutierrez, C. (2014). Looking at plant cell cycle from the chromatin window. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 369.
- Dhalia, R., Reis, C. R. S., Freire, E. R., Rocha, P. O., Katz, R., Muniz, J. R. C., Standat, N., de Melo Neto, O. P. (2005). Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *140*(1), 23–41.
- Dias, E. (1939). O gênero *Schizotrypanum* Chagas, 1909. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *34*, 193–211.



- Dostalova, A., Käser, S., Cristodero, M., & Schimanski, B. (2013). The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. *Molecular Microbiology*, 88(4), 728–39.
- El-sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309, 409–415.
- Estévez, A., Kempf, T., & Clayton, C. (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, 20(14), 3831–3839.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), 3970–81.
- Fernández-Moya, S. M., García-Pérez, A., Kramer, S., Carrington, M., & Estévez, A. M. (2012). Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*. *PloS One*, 7(11), e48870.
- Ferrarini, M. . (2012). *Investigação da função de grânulos de TcDHH1 na regulação da estabilidade e tradução de mRNAs alvos em Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR, Curitiba, 2012.
- Ferreira, L., Dossin, F., Ramos, T., Müller, E., & Schenkman, S. (2008). Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 80, 157–166.
- Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N., & Taylor, D. J. (2007). The process of mRNA-tRNA translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19671–8.
- Franzén, O., Ochaya, S., Sherwood, E., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. a, & Andersson, B. (2011). Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e984.
- Freire, E. R., Dhaliá, R., Moura, D. M. N., da Costa Lima, T. D., Lima, R. P., Reis, C. R. S., Hughes, K., Figueiredo, R. C. B. Q., Standart, N., Carrington, M., de Melo Neto, O. P. (2011). The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176(1), 25–36.
- Freire, E., Vashisht, A., & Malvezzi, A. (2014). eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *Rna*, 20, 1–15.
- Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M. K., & Carson, J. H. (2008). Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 19(5), 2311–27.
- Garcia-Silva, M. R., Frugier, M., Tosar, J. P., Correa-Dominguez, A., Ronalte-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., Cayota, A. (2010). A population of

tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 171(2), 64–73.

Grams, J., Morris, J., Drew, M., Wang, Z., Englund, P., & Hajduk, S. (2002). A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 16952–59.

Grisard, E. C., Ribeiro, M., Paula, G., & Stoco, H. (2014). *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announcements*, 2(1), 2–3.

Gupta, S. ., Chikne, V., Eliaz, D., Tkacz, I. ., Naboishchikov, I., Carmi, S., Michaeli, S. (2014). Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *RNA Biology*, 11, 715–31.

Helma, J., Wilsonb, M. ., & Donelsona, J. . (2009). Different trans RNA splicing events in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 159(2), 134–137.

Henriksson, J.; Aslund, L.; Pettersson, U. (1996). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 12, 108–114.

Hernández-Osorio, L. a, Márquez-Dueñas, C., Florencio-Martínez, L. E., Ballesteros-Rodea, G., Martínez-Calvillo, S., & Manning-Cela, R. G. (2010). Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 283842.

Herrera, L. (2010). Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología Y Salud Ambiental*, L, 3–15.

Holetz, F. B. (2008). *Grânulos de processamento de mRNAs em Trypanosoma cruzi*. Tese (doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR, Curitiba, 2008.

Holetz, F. B., Alves, L. R., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Manque, P., Buck, G., Krieger, M., Correa, A., Goldenberg, S. (2010). Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *The FEBS Journal*, 277(16), 3415–26.

Holetz, F. B., Correa, A., Avila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., & Goldenberg, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4), 1062–7.

Inoue, A. H., Serpeloni, M., Hiraiwa, P. M., Yamada-Ogatta, S. F., Muniz, J. R. C., Motta, M. C. M., Vidal, N. M., Goldenberg, S., Avila, A. R. (2014). Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes. *PloS One*, 9(10), e109521.

Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–27.

- Jackson, R., & Standart, N. (2007). How do microRNAs regulate gene expression? *Science Signaling*, 1–13.
- Jäger, A., Gaudenzi, J. De, Cassola, A., D’Orso, I., & Frash, A. (2007). mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2035–42.
- Jankowska-Anyszka, M., Lamphear, B. J., Aamodt, E. J., Harrington, T., Darzynkiewicz, E., Stolarski, R., & Rhoads, R. E. (1998). Multiple Isoforms of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4E in *Caenorhabditis elegans* Can Distinguish between Mono- and Trimethylated mRNA Cap Structures. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10538–10542.
- Jannin, J., & Villa, L. (2007). An overview of Chagas disease treatment. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 95–97.
- Jia, H., & Wang, X. (2012). RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 7292–97.
- Jurberg, C. (2009). Chagas: one hundred years later. *Bulletin of the World Health Organization*, 87(7), 491–492.
- Kapotas, N., & Bellofatto, V. (1993). Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 21(17), 4067–4072.
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2009). Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 90(09), 155–185.
- Kedersha, N., Chen, S., & Gilks, N. (2002). Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNAiMet)-Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules. *Molecular Biology of the Cell*, 13(January), 195–210.
- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*, 16(9), 381–387.
- Kong, J., & Lasko, P. (2012). Translational control in cellular and developmental processes. *Nature Reviews. Genetics*, 13(6), 383–94.
- Koonin, E., & Galperin, M. . (2003). Genome Annotation and Analysis. In *Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. (Capítulo 5).
- Kramer, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2), 61–72.
- Kramer, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(2), 263–84.
- Kramer, S., Bannerman-Chukualim, B., Ellis, L., Boulden, E. a, Kelly, S., Field, M. C., & Carrington, M. (2013). Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins

- to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PLoS One*, 8(1), e54004.
- Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Webb, H., Hoheisel, J. D., Clayton, C., & Carrington, M. (2008). Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(α) phosphorylation at Thr169. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 18), 3002–14.
- Krüger, T., Hofweber, M., & Kramer, S. (2013). SCD6 induces ribonucleoprotein granule formation in trypanosomes in a translation-independent manner, regulated by its Lsm and RGG domains. *Molecular Biology of the Cell*, 24(13), 2098–111.
- Lacerda, A. L. de. (2009). Fotografia e valor documentário : o arquivo de Carlos Chagas. *Manguinhos*, 16, 115–138.
- Landau, L. (2012). *Caracterização funcional de proteínas poli-q em Trypanosoma cruzi – envolvimento na regulação da expressão gênica*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- Laufer, G., & Günzl, A. (2001). In-vitro competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113, 55–65.
- Laufer, G., Schaaf, G., Bollgo, S., & Gu, A. (1999). In Vitro Analysis of a -Amanitin-Resistant Transcription from the rRNA , Procyclic Acidic Repetitive Protein , and Variant Surface Glycoprotein Gene Promoters in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5466–5473.
- LeBowitz, J., & Smith, H. (1993). Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes & Development*, 7, 996–1007.
- Lewdorowicz, M., & Yoffe, Y. (2004). Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *Rna*, 10, 1469–1478.
- Li, C., Irmer, H., Gudjonsdottir-Planck, D., Freese, S., Salm, H., Haile, S., Estévez, A. M., Clayton, C. (2006). Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→ 3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *Rna*, 12, 2171–2186.
- Liang, X., Haritan, A., Uliel, S., & Michaeli, S. (2003). trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 830–840.
- Liberman, F. (2004). *Análise dos fatores determinantes para a qualidade da anotação genômica automática*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Ciências Genômicas) – Universidade católica de Brasília, Brasília, 2004.
- Ling, S. H. M., Decker, C. J., Walsh, M. a, She, M., Parker, R., & Song, H. (2008). Crystal structure of human Edc3 and its functional implications. *Molecular and Cellular Biology*, 28(19), 5965–76.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Voty, J., Zikova, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 495–502.

- MacRae, J. I., Obado, S. O., Turnock, D. C., Roper, J. R., Kierans, M., Kelly, J. M., & Ferguson, M. a J. (2006). The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *147*(1), 126–36.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., ... Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism : cis -splicing of pre-mRNA. *RNA*, *6*, 163–169.
- Malecki, M., Viegas, S. C., Carneiro, T., Golik, P., Dressaire, C., Ferreira, M. G., & Arraiano, C. M. (2013). The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *The EMBO Journal*, *32*(13), 1842–54.
- Mani, J., Güttinger, A., Schimanski, B., Heller, M., Acosta-Serrano, A., Pescher, P., ... Roditi, I. (2011). Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PloS One*, *6*(7), e22463.
- Martínez-Calvillo, S., López, I., & Hernández, R. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, *199*, 71–76.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2009). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2010*, 1–15.
- Martins, A. V., Gomes, A. P., Mendonça, E. G. de, Fietto, J. L. R., Santana, L. A., Oliveira, M. G. de A., Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, *16*(1), 45–58.
- Mazzoni, C., D'Addario, I., & Falcone, C. (2007). The C-terminus of the yeast Lsm4p is required for the association to P-bodies. *FEBS Letters*, *581*(25), 4836–40.
- Milone, J., Wilusz, J., & Bellofatto, V. (2002). Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Nucleic Acids Research*, *30*(18), 4040–4050.
- Moore, M. . (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, *309*, 1514–8.
- Moraes, M. C. S., Jesus, T. C. L., Hashimoto, N. N., Dey, M., Schwartz, K. J., Alves, V. S., Castilho, B. a. (2007). Novel membrane-bound eIF2alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, *6*(11), 1979–91.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *LI*, 263–273.
- Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F., & Green, P. J. (2013). XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1829*(6-7), 590–603.
- Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., & de Souza, W. (2005). Visualization of the cytosome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiology Letters*, *242*(2), 227–30.

- Olsen, J. V., de Godoy, L. M. F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., ... Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 4(12), 2010–21.
- Palenchar, J. B., & Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146(2), 135–41.
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–46.
- Parsons, M., Worthey, E. a, Ward, P. N., & Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 6, 127.
- Peng, D., Kurup, S., Yao, P., Minning, T., & Tarleton, R. (2015). CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 6(1), 1–11.
- Pestova, T. V, Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V, Shatsky, I. N., Agol, V. I., & Hellen, C. U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7029–36.
- Petsko, G. ., & Ringe, D. (2003). Protein structure and function. In *New Science Press Ltd, Waltham, MA*.
- Pitt, J. N., Schisa, J. a, & Priess, J. R. (2000). P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Developmental Biology*, 219(2), 315–33.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., & Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry*, 75, 663–70.
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–402.
- Reddy, R., Singh, R., & Shimba, S. (1992). Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: Structure, synthesis and functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 54(3), 249–267.
- Regmi, S., Rothberg, K. G., Hubbard, J. G., & Ruben, L. (2008). The RACK1 signal anchor protein from *Trypanosoma brucei* associates with eukaryotic elongation factor 1A: a role for translational control in cytokinesis. *Molecular Microbiology*, 70(3), 724–45.
- Reijns, M. a M., Alexander, R. D., Spiller, M. P., & Beggs, J. D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 15), 2463–72.
- Rettig, J., Wang, Y., Schneider, A., & Ochsenreiter, T. (2012). Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in *Trypanosoma brucei* is mediated through alternative trans-splicing. *Nucleic Acids Research*, 40(3), 1299–306.
- Sakyama, J., Zimmer, S. L., Ciganda, M., Williams, N., & Read, L. K. (2013). exoribonuclease for rRNA processing in *Trypanosoma brucei* Ribosome biogenesis requires a

- highly diverged XRN family 5' → 3' exoribonuclease for rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, *19*, 1–13.
- Serpeloni, M., Moraes, C. B., Muniz, J. R. C., Motta, M. C. M., Ramos, A. S. P., Kessler, R. L., Avila, A. R. (2011). An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. *PLoS One*, *6*(6), e20730.
- Seydoux, G., & Fire, A. (1994). Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, *2834*, 2823–2834.
- Shepard, K. a, Gerber, a P., Jambhekar, a, Takizawa, P. a, Brown, P. O., Herschlag, D., ... Vale, R. D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11429–34.
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5620), 805–8.
- Sheth, U., Pitt, J., Dennis, S., & Priess, J. R. (2010). Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development*, *137*(8), 1305–14.
- Simpson, A. G. B., Lukes, J., & Roger, A. J. (2002). The Evolutionary History of Kinetoplastids and Their Kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.*, *19*, 2071–2083.
- Sonenberg, N., & Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current Opinion in Structural Biology*, *13*(1), 56–63.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. . (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, *136*(4), 731–745.
- Southern, E. M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, *98*, 503–517.
- Starck, S. ., & Roberts, R. . (2002). Puromycin oligonucleotides reveal steric restrictions for ribosome entry and multiple modes of translation inhibition. *RNA*, *8*, 890–903.
- Stevens, JR; Noyes, HA; Schofield, CJ and Gibson, W. (2001). The Molecular Evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, *48*, 1–56.
- Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., & Bastin, P. (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(22), 4205–19.
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(3), 592–630.
- Teixeira, D., & Sheth, U. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna*, *11*, 371–382.

- Tonelli, R. R., Augusto, L. D. S., Castilho, B. a., & Schenkman, S. (2011). Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One*, 6(11), e27904.
- Vanhamme, Luc; Pays, E. (1995). Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews*, 59(2), 223–240.
- Walker, J. M. (2002). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *The Protein Protocols Handbook* (pp. 61–67).
- Xu, D. A. . (2007). *Development of high-throughput gene knockout strategies in Trypanosoma cruzi for production of attenuated lines*. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade da Georgia, Georgia, 2007.
- Xu, D., Brandán, C. P., Basombrío, M. A., & Tarleton, R. L. (2009). Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, 9, 90.
- Yoffe, Y., Léger, M., Zinoviev, A., Zuberek, J., Darzynkiewicz, E., Wagner, G., & Shapira, M. (2009). Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3243–53.
- Yoffe, Y., Zuberek, J., Lerer, A., Lewdorowicz, M., Stepinski, J., Altmann, M., Shapira, M. (2006). Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in Leishmania. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1969–79.
- Zamudio, J. ., Mittra, B., Campbell, D. ., & Sturm, R. (2009). Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. *Mol Microbiol*, 72, 1100–1110.
- Zayat, V., Balcerak, A., Korczynski, J., Trebinska, A., Wysocki, J., Sarnowska, E., Grzybowska, E. a. (2015). HAX-1: A Novel P-Body Protein. *DNA and Cell Biology*, 34(1), 43–54.
- Zeiner, G. M., Sturm, N. R., & Campbell, D. a. (2003). The Leishmania tarentolae spliced leader contains determinants for association with polysomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38269–75.
- Zhang, W., Murphy, C., & Sieburth, L. E. (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15981–5.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., & Guhl, F. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051–1054.
- Zingales, B., Miles, M. a, Campbell, D. a, Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 240–53.



Zinoviev, A., & Shapira, M. (2012). Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 813718.

## **9. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS**

NCBI - 5'-3' exonuclease XRNA [Trypanosoma cruzi Dm28c]

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/557859550?report=genbank&log\\$=protalign&blast\\_rank=3&RID=8TA5MFK801R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/557859550?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=3&RID=8TA5MFK801R)

Acessado em: 15/12/2014

eBioscience – **Immunoprecipitation Protocol**

<http://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/immunoprecipitation.pdf>

Acessado em: 20/12/2014