

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI**

**O papel das proteínas dedo de zinco TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP no  
metabolismo de RNA do *Trypanosoma cruzi*.**

**CURITIBA/PR**

**2020**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI**

**O papel das proteínas dedo de zinco TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP no metabolismo de RNA do *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia

Orientadores: Dra. Lysangela Ronalte Alves

Dr. Samuel Goldenberg

**CURITIBA/PR**

**2020**

**#ELENÃO**

## AGRADECIMENTOS

**A todos que contribuíram para a execução desse trabalho e para a minha formação:**

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, Dra. Lysangela Ronalte Alves e Dr. Samuel Goldenberg pela orientação, incentivo, confiança, paciência e por serem exemplos na minha vida. Devo muito da minha formação como cientista e pesquisador a vocês. Reforço minha admiração, carinho e respeito pelos profissionais e pessoas que vocês são.

Aos membros da banca, Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera, Dra. Angela Kaysel Cruz e Dr. Wanderson Duarte da Rocha por aceitarem participar desse momento tão especial na minha vida e contribuírem com esse trabalho;

Às minhas avaliadoras da jornada da pós-graduação, Dra. Gisele Picchi e Dra. Andréa Rodrigues Ávila pelas discussões produtivas e contribuições valiosas;

Às doutoras Priscila Mazzochi Hiraiwa e Gisele Picchi pela colaboração, discussões e grande auxílio no desenvolvimento da metodologia proposta nesse trabalho;

Às plataformas de citometria e de microscopia do Instituto Carlos Chagas pela capacitação na operação dos citômetros e microscópios, além, claro, dos inúmeros serviços de alta qualidade prestados;

À coordenação da Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia e a direção do Instituto Carlos Chagas que sempre buscaram oferecer a melhor infraestrutura possível e políticas de incentivo aos estudantes;

À Raquel Keller e a Franciele de Jesus Mendes por todo o auxílio envolvendo as questões da pós-graduação. Vocês são pessoas fantásticas, iluminadas e muito queridas;

À equipe do preparo de materiais e reagentes do Instituto Carlos Chagas por serem fundamentais no desenvolvimento das pesquisas do Instituto. Agradeço em especial à Sibelli e à Vanessa pela manutenção da sala de cultivo de parasitas e, sobretudo, pelo convívio ao longo desses anos. Vocês moram no meu coração!

À equipe de TI do Instituto Carlos Chagas por todo o apoio técnico e pessoal. Vocês têm a minha gratidão. Quero aproveitar e agradecer em especial à Alessandra por toda dedicação e enorme auxílio com o movimento unidos pela ciência.

Aos estudantes do Instituto Carlos Chagas e aos membros do colegiado pela oportunidade ímpar de ser representante estudantil e ter tido essa experiência incrível. Sem dúvidas ter participado disso foi um aprendizado gigantesco;

À doutora Sheila Cristina Nardelli pela amizade ao longo desses anos. Obrigado por fazer parte da minha vida, Sheilão!

Aos integrantes do LABREG por todos os momentos de alegria, confraternização e reflexão. Tenho muito carinho por todos e sou muito grato pelo

apoio e pelas discussões filosóficas sobre a vida, a ciência e tudo mais que se pode imaginar, basicamente. Trabalhar nesse laboratório foi/é um enorme privilégio;

A todos os amigos que fiz no Instituto Carlos Chagas no decorrer desses anos. Desde os amigos do grupo de futebol, do movimento unidos pela ciência, os que visito e me visitam, até os que encontro só nos bares e/ou nos corredores do Instituto. A minha saúde mental agradece imensamente a participação de vocês nesse processo;

Aos doutores e grandes amigos Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera e Diogo Kuczera pela incrível amizade ao longo desses anos. Poder desfrutar da companhia de vocês nos almoços no RISA é algo incomensurável! Obrigado por todo o apoio emocional! Vocês são fonte de inspiração para mim!

Aos órgãos de financiamento à pesquisa, CAPES, CNPq e à Fiocruz, por todo o auxílio financeiro. Manifesto meu apoio à manutenção desses órgãos e torço para que esse cenário nefasto que nos encontramos atualmente seja revertido o quanto antes possível. Afinal, país que não investe em educação, saúde, ciência e tecnologia não tem futuro!

À minha família, pelo apoio e amor incondicional. Reconheço e agradeço imensamente todo os esforços feitos para que eu tivesse a melhor educação possível. Minha trajetória acadêmica é consequência desses esforços. Agora, embora a educação tenha sido prioridade na minha criação, a razão pela qual sou mais realizado e grato é pelo amor que sinto de vocês. Meus pais, irmãos e avós são pessoas que me ensinaram a amar e a respeitar o próximo, começando pelo amor e respeito que tiveram/tem comigo. Apesar da importância da educação que recebi essa, sem dúvidas, é a maior lição que levarei na minha vida. Vocês me inspiram! E eu os amo muito! Obrigado por tudo!

À pessoa que redefiniu o sentido da palavra vida na minha existência, Beatriz Santana Borges. Durante esse doutorado pude experienciar muitas transformações na parte pessoal e profissional, tendo sido esse período repleto de grandes aprendizados. Alcancei conquistas e enfrentei situações adversas, das quais não saberia dizer se conseguiria passar sem você. Fato é que, para minha sorte e alegria, você esteve presente em todas, me apoiando incondicionalmente. No meio de tantas emoções, alegrias e choros, ter formado a nossa família foi a melhor coisa que já me aconteceu. Me sinto realizado por ter a sua presença na minha vida, tanto na parte pessoal quanto profissional, pois, além de ser a melhor companheira que eu poderia ter, ainda é uma excelente cientista, microscopista e colaboradora. Obrigado por escolher trilhar comigo o árduo e infinito caminho de ser um ser humano melhor e por contagiar meus dias com a sua alegria e o seu amor. Te amo demais!

Ao ser vivo que redefiniu o sentido da palavra amor na minha vida, Muvuca. Por mais inusitado que isso seja, a presença da Muvs foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Abandonada no Instituto Carlos Chagas em 2016, após alguns contratempos, eu e Bia conseguimos adotá-la e hoje ela é um componente essencial na nossa família. Por diversas vezes durante o doutorado, em especial durante a escrita desse documento, procurei forças entre um ou vários abraços prontamente correspondidos por essa cachorra extremamente linda, gentil e amorosa. A expressividade com a qual ela manifesta seus sentimentos de gratidão, alegria ou mesmo tristeza, me permitiu experienciar e nutrir um amor incondicional por esse ser fantástico. Definitivamente a Muvs desempenhou um papel crucial no meu amadurecimento como ser humano.

**A todos vocês, o meu sincero muito obrigado!**

## RESUMO

A regulação pós-transcricional da expressão gênica é essencial para a adaptação e sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* às diferentes condições impostas pelos seus hospedeiros durante seu ciclo de vida. Parte dessa regulação é exercida por proteínas de ligação ao RNA (RBPs) que interagem com os RNAs e coordenam seus destinos na célula. Dentre as diferentes famílias de proteínas que compõem o repertório de RBPs no *T. cruzi*, estão as que apresentam o domínio dedo de zinco C3H. As proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP possuem esse domínio e foram objetos de estudo de trabalhos anteriores, os quais avaliaram a expressão, localização celular e os possíveis transcritos alvos dessas proteínas. Uma estratégia que permite avaliar um fenótipo associado a um gene específico é a utilização de abordagens de genética reversa como o nocaute gênico. Recentemente a implementação do sistema de edição gênica CRISPR/Cas9 emergiu como um método alternativo às estratégias existentes, em geral de baixa eficiência, para realização de nocaute gênico em *T. cruzi*. Sendo assim, como forma de avaliar o papel dessas três proteínas dedo de zinco na regulação da expressão gênica desse parasito, propôs-se utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para nocautear os genes de TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP e avaliar os respectivos fenótipos associados. Inicialmente, propôs-se uma adaptação às estratégias descritas anteriormente para o nocaute gênico via sistema CRISPR/Cas9 em *T. cruzi*. Após o estabelecimento dessa metodologia, partiu-se para o nocaute dos genes *tczc3h39* e *tczc3h29* e *tczc3http*. A indução do nocaute dessas RBPs promoveu grandes alterações morfológicas no ciclo celular, além do comprometimento da viabilidade dos parasitos afetados, sugerindo que esses genes poderiam ser essenciais para o *T. cruzi*. No entanto, apesar das evidências de interrupção dos genes *tczc3h29* e *tczc3http* a nível proteico, não foi possível confirmar a edição desses genes a nível de DNA. Para contornar essa situação, implementou-se na estratégia de nocaute desenvolvida a presença de uma molécula de DNA simples fita (DNA *donor*), contendo um sítio de restrição enzimático e sequência correspondente a códons de paradas, para direcionar o reparo e garantir a interrupção gênica dos genes alvos. A incorporação do DNA *donor* à estratégia reduziu, mas não eliminou, a presença dos fenótipos aberrantes encontrados na indução do nocaute dessas RBPs, indicando, portanto, uma relação entre os fenótipos observados e os genes afetados. A partir dessa nova adaptação, foi observada a presença de parasitos hemi-nocautes para TcZC3H39, TcZC3H29 ou TcZC3HTTP. Uma nova eletroporação, com gRNAs e DNA *donors* para edição do alelo remanescente, resultou na obtenção de clones nocautes para TcZC3HTTP. Apesar de viáveis, os parasitos apresentaram uma redução na proliferação na ausência de TcZC3HTTP. Os clones hemi-nocautes para TcZC3H39 e TcZC3H29 também impactaram negativamente na curva de crescimento de *T. cruzi*, sustentando a possibilidade desses genes serem essenciais para esse parasito. Todavia, novas tentativas de se obter mutantes nulos para essas duas RBPs estão em curso. Dessa forma, a partir desses resultados, novas perspectivas se abrem para o aprofundamento do estudo não só das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP, mas também para todas as RBPs em *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Regulação da expressão gênica; *Trypanosoma cruzi*; Proteínas de ligação ao RNA; Dedo de zinco C3H; CRISPR/Cas9; nocaute gênico.



## ABSTRACT

Gene expression regulation is essential for *Trypanosoma cruzi* to adapt to the different conditions the parasite faces during its life cycle. In trypanosomatids, this control is mainly mediated by post-transcriptional mechanisms which act on the metabolism of mRNAs and proteins. In this context, RNA binding proteins (RBPs) are key players due to their interaction with the mRNA by coordinating its fate in the cell. The RBPs repertoire of *T. cruzi* comprises different groups of proteins, including those with the C3H zinc finger domain. TcZC3H39, TcZC3H29 and TcZC3HTTP are proteins that have this domain and have been the object of study in previous studies, which evaluated the expression, cell location and possible transcripts associated to these proteins. One strategy that allows the evaluation of a phenotype associated with a specific gene is the use of reverse genetic approaches such as gene knockout. Recently, the implementation of the CRISPR / Cas9 gene editing system has emerged as an alternative method to existing strategies, that in general presents low efficiency, for performing gene knockout in *T. cruzi*. Therefore, as a way to evaluate the role of these three zinc finger proteins in gene expression regulation of this parasite, it was proposed to use the CRISPR / Cas9 system to knock out the TcZC3H39, TcZC3H29 and TcZC3HTTP genes and evaluate the respective associated phenotypes. Initially, an adaptation to previously described strategies for gene knockout via CRISPR / Cas9 system in *T. cruzi* was adopted. After establishing this methodology, we started to knock out *tczc3h39* and *tczc3h29* and *tczc3http* genes. The knockout induction of these RBPs promoted major morphological changes in cell cycle, in addition to compromised viability of affected parasites, suggesting that these genes could be essential for *T. cruzi*. However, despite the evidences regarding disruption of *tczc3h29* and *tczc3http* proteins, it was not possible to visualize the edition at DNA level. To circumvent this situation, the presence of a single stranded DNA molecule (donor DNA), containing an enzymatic restriction site and sequence corresponding to stop codons, was introduced in the developed knockout strategy to direct the repair and ensure gene disruption of target genes. The incorporation of donor DNA into the strategy reduced, but did not eliminate, the presence of aberrant phenotypes found in these RBPs knockout, indicating that there is a connection between observed phenotypes and affected genes. From this new adaptation, presence of hemi-knockout parasites for TcZC3H39, TcZC3H29 or TcZC3HTTP was observed. A new electroporation, with gRNAs and DNA donors to edit the remaining allele, resulted in obtaining knockout clones for TcZC3HTTP. Although viable, the parasites showed a reduction in proliferation in the absence of TcZC3HTTP. The hemi-knockout clones for TcZC3H39 and TcZC3H29 also negatively impacted *T. cruzi*'s growth curve sustaining the possibility of these genes being essential for this parasite. However, new attempts to obtain null mutants for these two RBPs are underway. From these results, new perspectives open up for a deeper study not only of the TcZC3H39, TcZC3H29 and TcZC3HTTP proteins, but also for all RBPs in *T. cruzi*.

**Key-words:** Gene expression regulation; *Trypanosoma cruzi*; RNA binding proteins; zinc finger C3H protein; CRISPR/Cas9; gene knockout.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	11
Regulação da expressão gênica e o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
Regulação pós transcricional e as proteínas de ligação ao RNA (RBPs) .....	14
Genética reversa no estudo das RBPS .....	19
Utilização do sistema CRISPR/CAS9 para geração de nocautes em <i>T. cruzi</i> ....	21
As RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP de <i>T. cruzi</i> .....	23
OBJETIVO GERAL .....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS/METAS .....	26
INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS .....	27
CAPÍTULO 1. ....	28
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1 .....	43
DISCUSSÃO – CAPITULO 1 .....	47
CAPÍTULO 2. ....	51
MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2.....	71
DISCUSSÃO – CAPÍTULO 2 .....	75
PERSPECTIVAS.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	88
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE .....	96

## INTRODUÇÃO

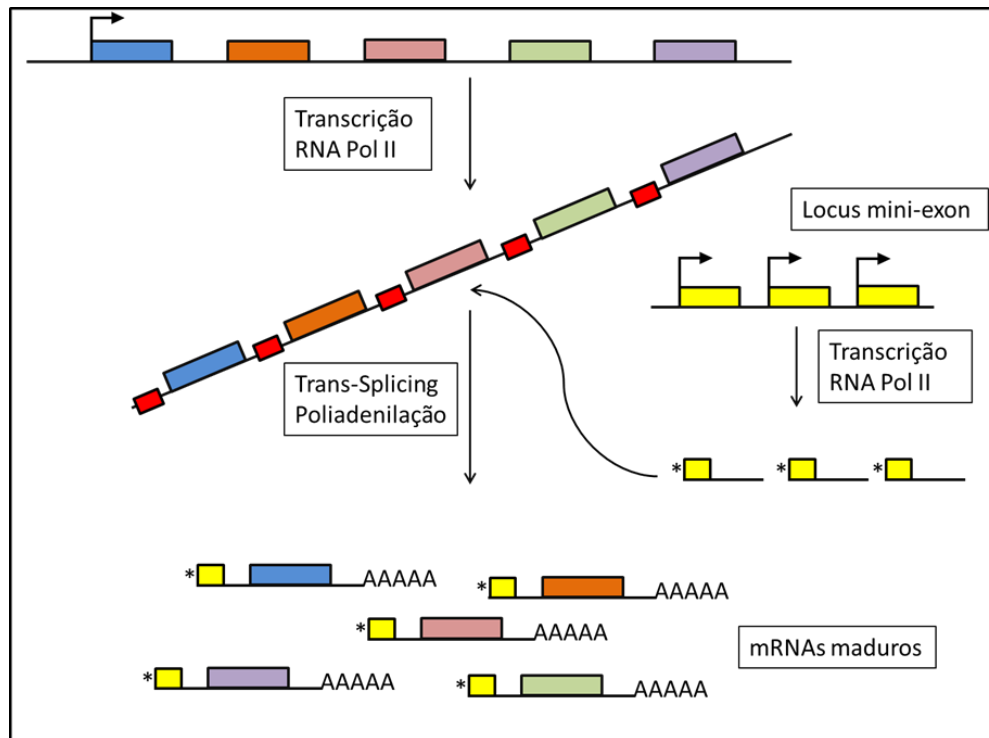
### **Regulação da expressão gênica e o *Trypanosoma cruzi***

A regulação da expressão gênica é fundamental para a manutenção da homeostase celular em todos os seres vivos. Essa capacidade de modular os níveis de ativação ou repressão dos genes permite que as células transitem entre seus repertórios fenotípicos e é a responsável por promover a adaptação dos organismos às possíveis alterações ambientais (Schwanhäusser et al. 2011; Van Assche et al. 2015). Como na natureza as condições ambientais são passíveis de mudanças bruscas e/ou frequentes, entende-se que as células estão sob constante ação de mecanismos regulatórios, e que esses mecanismos atuam de forma sistemática e dinâmica para garantir a sobrevivência celular. De fato, a modulação da expressão gênica possui um caráter dinâmico e resulta da combinação de mecanismos que atuam em diferentes níveis, desde o acesso da maquinaria de transcrição às regiões codificadoras no DNA, até o controle da síntese, localização, atividade e estabilidade dos respectivos produtos gênicos finais, sejam eles RNAs ou proteínas (Moore 2005).

Dentre essas etapas, o processo de transcrição é considerado de grande importância para o controle da expressão gênica, uma vez que a expressão dos genes inicia nessa etapa (Chen et al. 2007). É nessa fase que fatores transcricionais ou repressores interagem com as regiões promotoras gênicas, de modo a facilitar/permitir ou impedir/dificultar o acesso da maquinaria de transcrição, influenciando assim, na ativação ou repressão da atividade transcricional em si (Wyrick et al. 2002). Contudo, embora a capacidade de regular transcricionalmente a expressão gênica seja compartilhada de procariotos à eucariotos e represente um dos, senão o principal, ponto de controle para a maioria dos seres vivos, há organismos em que esse tipo de regulação se mostra pouco expressiva.

Entre esses organismos se encontra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, um tripanossomatídeo de relevância médica por ser o agente etiológico da doença de Chagas (Chagas 1909) e que, dentre seu repertório de peculiaridades, apresenta a característica de regular a expressão de seus genes essencialmente a nível pós-transcricional (Clayton 2002; Fernández-Moya et al. 2010; Martínez-Calvillo et al. 2010). Entre os indícios que suportam essa afirmação estão a organização genômica, a maneira como os genes são transcritos e a correlação dos níveis de expressão gênica de *T. cruzi*.

Os genomas dos tripanossomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, são organizados de modo que os genes codificadores de proteínas são encontrados sequencialmente em grandes grupos policistrônicos, presentes em uma mesma fita do DNA e de até 100 genes cada, os quais são unidirecionalmente co-transcritos, resultando em uma única molécula precursora de RNA policistrônica (Figura 1.1)(Martínez-Calvillo et al. 2003; Jennifer B Palenchar et al. 2006; Siegel et al. 2009; Martínez-Calvillo et al. 2010). Essa transcrição é mediada pela RNA polimerase II e, ao contrário do que se observa nos demais eucariotos, onde a RNA polimerase II reconhece e se liga a uma região promotora individual de cada gene para transcrevê-lo, nos tripanossomatídeos essa enzima parece reconhecer regiões não bem definidas ao longo dos cromossomos e que são responsáveis pela transcrição dos grupos gênicos adjacentes. Curiosamente, essas regiões reconhecidas pela RNA polimerase II não possuem sequências canônicas como a TATA box ou de outros elementos promotores transcricionais típicos encontrados nos demais eucariotos, e uma única região pode ser responsável pela expressão de um cromossomo inteiro, conforme reportado em *Leishmania major* (Martínez-Calvillo et al. 2003; Clayton 2016). Entretanto, cabe ressaltar que há exceções a esse padrão observado nos tripanossomatídeos, como, por exemplo, o caso do gene que codifica para o mini-éxon, no qual foi identificada a região promotora associada à sua transcrição e reconhecida pela RNA polimerase II (Figura 1.1) (Nunes et al. 1997; Campbell et al. 2000; Gilinger 2001).



**Figura 1.1. Transcrição policistrônica e o *trans-splicing*.** No topo da figura está representado um cromossomo contendo um agrupamento de cinco genes. Esses genes são co-transcritos pela RNA polimerase II em uma única molécula de RNA policistrônica. Nessa molécula estão presentes sítios de clivagem (representados pelos pequenos retângulos vermelhos no RNA policistrônico) que serão reconhecidos pela maquinaria de processamento e, conseqüentemente, processados por trans-splicing e poliadenilação. Ocorre então a separação do policistron em unidades monocistrônicas independentes, cada qual com seu mini-éxon na porção 5' (representado pelos quadrados amarelos) e com a cauda poli(A) na extremidade 3' UTR. Essa figura foi adaptada e traduzida de Calvillo *et al* (2010).

O arranjo em conjuntos dos genes e o fato deles serem co-transcritos em RNAs policistrônicos, caracterizam a transcrição dos tripanossomatídeos como sendo policistrônica (Kramer 2011; Kolev et al. 2014). É válido destacar que apesar dos genes serem co-expressos, não há indícios que apontem para uma relação funcional entre os genes pertencentes a um mesmo agrupamento genômico (Clayton et al. 2007; Goldenberg et al. 2011). Nesse contexto, o pré-mRNA gerado, contendo as unidades monocistrônicas respectivas aos genes transcritos, precisa ser processado para dar origem aos correspondentes mRNAs individualizados, maduros e funcionais. Como a maioria dos genes encontrados em

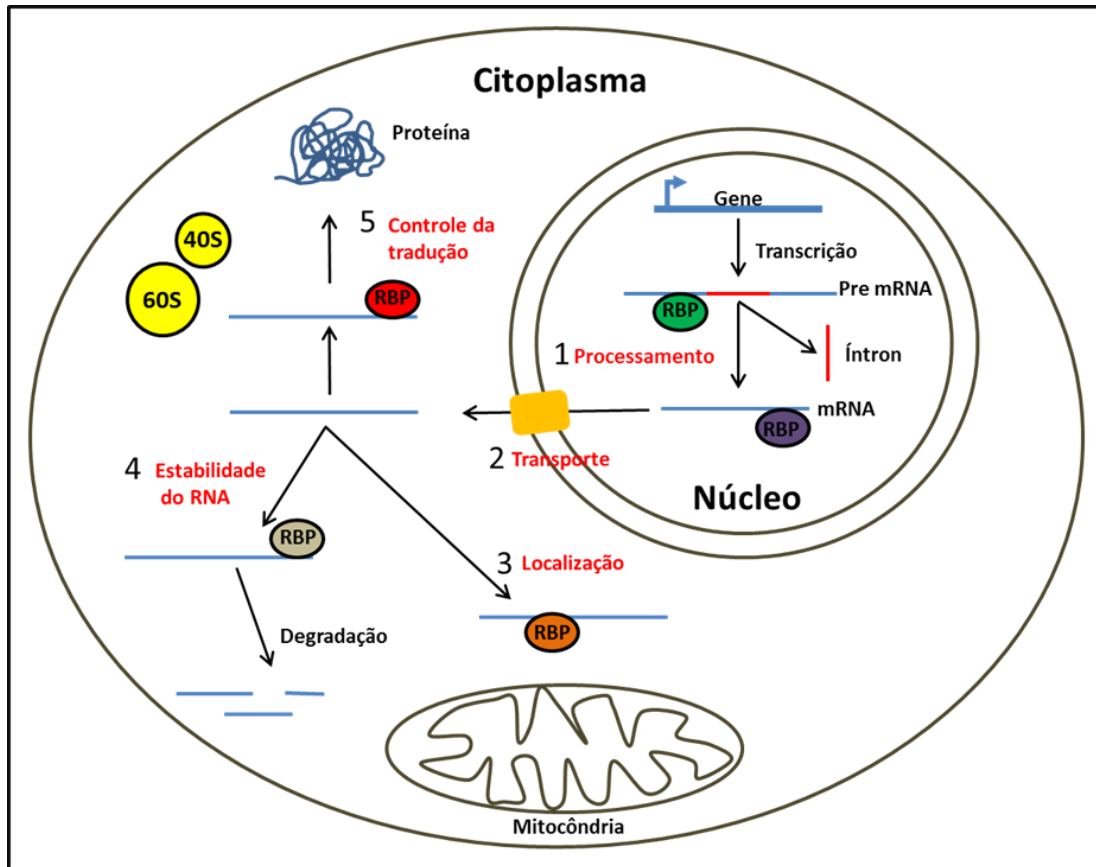
tripanossomatídeos não possui íntrons, o processamento dos transcritos ocorre por meio do trans-splicing e da poliadenilação (Liang et al. 2003; Clayton et al. 2007). Enquanto que no trans-splicing é incorporada uma sequência de RNA conservada, denominada de mini-éxon ou spliced leader (SL RNA), na porção 5' de cada unidade monocistônica, a poliadenilação adiciona uma cauda poli(A) na extremidade 3' dos transcritos. Dessa forma, esses dois processos atuam colaborativamente na separação das unidades monocistônicas e contribuem para a maturação dos mRNAs (Figura 1.1) (Liang et al. 2003; Jennifer B. Palenchar et al. 2006; Preußner et al. 2012).

Outro ponto relevante, relacionado ao fato dos tripanossomatídeos transcreverem seus genes policistronicamente, implica que as taxas de expressão dos genes pertencentes a um mesmo agrupamento genômico deveriam ser, inevitavelmente, idênticas. De fato, considera-se que todos os genes que fazem parte de um mesmo agrupamento são transcritos numa mesma taxa (Martínez-Calvillo et al. 2010; Kramer et al. 2011). No entanto, ao final do processamento dos mRNAs, o que se observa é que os mRNAs maduros oriundos de um mesmo RNA policistônico, podem apresentar concentrações e/ou expressão estágio-específica independentes entre si. Isso significa que a discrepância nas taxas de expressão dos genes nos tripanossomatídeos ocorre em etapas posteriores ao processo de transcrição, ou seja, que nesses organismos a regulação da expressão gênica ocorra essencialmente a nível pós-transcricional (Clayton 2002; Haile et al. 2007; Martínez-Calvillo et al. 2010).

### **Regulação pós transcricional e as proteínas de ligação ao RNA (RBPs)**

A regulação pós-transcricional é caracterizada pela ação de mecanismos regulatórios envolvidos com o metabolismo dos RNAs e das proteínas da célula. Dessa forma, esse controle é exercido em diversas etapas, dentre as quais, destacam-se: o processamento do pré-mRNA; o transporte dos mRNAs maduros do núcleo para o citoplasma e sua localização subcelular, a estabilidade dos

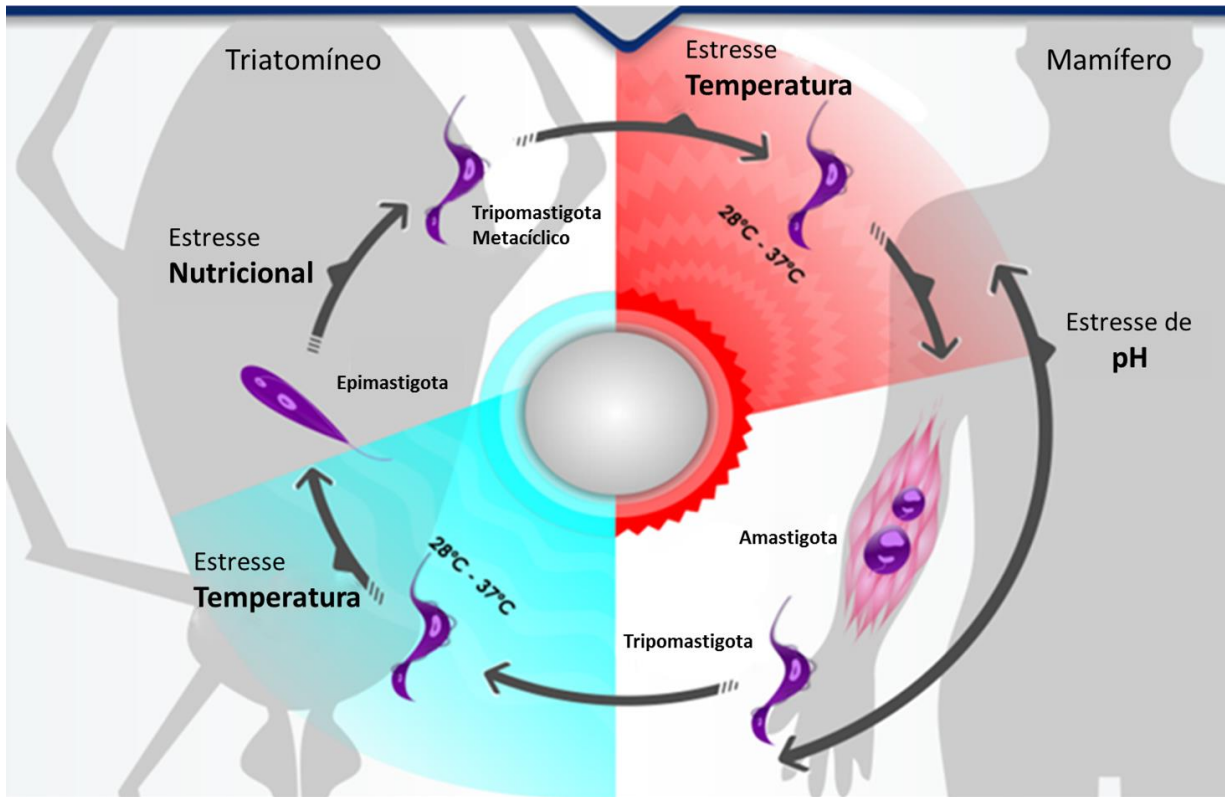
transcritos; a tradução dos mRNAs; a estabilidade das proteínas, a ativação proteica e as possíveis modificações pós-traducionais (Figura 1.2) (Glisovic et al. 2008; Mittal et al. 2009).



**Figura 1.2. Etapas de controle pós-transcricionais.** A figura mostra as principais etapas no controle pós-transcricional, indicadas pelos números de 1 a 5 sendo: 1 – Processamento do RNA (Splicing); 2- Transporte do núcleo para o citoplasma; 3- Localização subcelular dos transcritos; 4- Estabilidade do RNA e 5- Controle da tradução dos mRNAs. Adaptado e traduzido de Mittal *et al*, (2009).

Como os mecanismos envolvidos nesse nível de regulação tem como característica a interação e modulação dos transcritos e/ou proteínas já existentes na célula, entende-se que a regulação pós-transcricional é responsável pela capacitação das células em responder rapidamente às alterações ambientais. Essa característica é crucial para a sobrevivência e a adaptação do *T. cruzi*, uma vez que,

no decorrer de seu ciclo de vida, o parasita precisa modular rapidamente a expressão de genes e transitar por distintos estágios de desenvolvimento como resposta às alterações das condições ambientais (como mudanças de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes) impostas pelos seus diferentes hospedeiros (Figura 1.3)(Alves et al. 2016).



**Figura 1.3. Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Essa ilustração representa os estresses fisiológicos e os processos de diferenciação aos quais o *T. cruzi* está sujeito no decorrer de seu ciclo de vida. Extraído e traduzido de Alves & Goldenberg (2016).

Nesse contexto, elementos que possuem a capacidade de interação com RNAs e proteínas são componentes chave nos processos regulatórios pós transcricionais e, conseqüentemente, fundamentais para os processos de adaptação/diferenciação celulares. Dentre esses elementos estão as RBPs (*RNA*



*binding proteins*), um diverso grupo de proteínas que possuem domínios de ligação a RNAs e atuam na modulação dos transcritos em todas as etapas, da transcrição ao decaimento dos RNAs na célula (Keene 2007; Glisovic et al. 2008; Gaudenzi et al. 2011; Clayton 2016). Além da capacidade de se ligar a RNAs, muitas RBPs também apresentam domínios adicionais envolvidos em interações proteicas (Caro et al. 2005). Essa propriedade é determinante na capacidade das RBPs mediar a formação de complexos ribonucleoproteicos (mRNPs).

O reconhecimento das RBPs e a interações com os RNAs são mediados por domínios de ligação ao RNA, os quais reconhecem sequências e/ou estruturas específicas presentes nos seus transcritos alvos. Estudos vêm reforçando que a interação das RBPs ocorre principalmente nas regiões intergênicas não traduzíveis dos RNAs, principalmente na porção 3'-UTR (*UTR - untranslated region*) dos transcritos (Myung et al. 2002; Wickens et al. 2002; Noé et al. 2008; Kramer et al. 2011; Vindry et al. 2014; Romaniuk et al. 2018).

A partir da associação das RBPs com essas regiões é que os transcritos têm sua estabilidade, taxa de tradução e localização subcelular modulados (Fernández-Moya & Estévez 2010). No entanto, embora diversos estudos já tenham mostrado a importância de apenas uma RBP na destinação de um ou mesmo um grupo de transcritos, os avanços no conhecimento a respeito dos mecanismos de atuação das RBPs, têm evidenciado que o destino dos mRNAs na célula são determinados a partir do conjunto de RBPs ligados a eles (Keene 2007). Por exemplo, em *T. brucei* estima-se que um mRNA com uma região 3'-UTR de extensão média de 300 nt possui o potencial de interagir com até quinze RBPs diferentes simultaneamente. Isso implica que essas combinações definidas por quais RBPs estão associadas aos transcritos, bem como pelas suas afinidades e concentrações relativas tanto das RBPs quanto dos seus alvos, é que vão definir o destino dos mRNAs nas células (Clayton 2016).

Uma vez que organismos como o *T. cruzi* exercem a regulação da expressão de seus genes quase que exclusivamente a nível pós-transcricional, o estudo das funções das RBPs é fundamental para a compreensão dos mecanismos

responsáveis pela modulação dos mRNAs nesse organismo. Estudos *in silico* identificaram um grande repertório de RBPs em *T. cruzi* (De Gaudenzi et al. 2005; Kramer et al. 2010). Há décadas, grupos de pesquisa vêm investigando o papel das RBPs em *T. cruzi* a partir da obtenção de dados de expressão e localização dessas proteínas ao longo do ciclo de vida do parasita, bem como dos mRNAs alvos e das proteínas parceiras. Outra estratégia utilizada envolve a construção de vetores episomais para aumentar os níveis de expressão dessas proteínas na célula.

Com base nessas abordagens, foi possível avançar na caracterização funcional das RBPs nesse tripanossomatídeo, confirmando o envolvimento dessas proteínas na modulação dos mRNAs na célula e reforçando o fato de que suas funções podem impactar importantes processos celulares nesse parasita, como, por exemplo, na diferenciação, proliferação celular e infecção (Alves et al. 2016; Romaniuk et al. 2018). É o caso da proteína TcRBP19 que, quando superexpressa, afeta negativamente o processo de diferenciação de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas e acarreta em parasitos com uma menor taxa de infectividade ao final do processo (Pérez-Díaz et al. 2012). A proteína TcUBP1 é um outro exemplo da importância de uma RBP na biologia de *T. cruzi*. Ao realizar a superexpressão de TcUBP1 foi observado um aumento de até dez vezes na expressão de seus transcritos alvos além de resultar em formas tripomastigotas metacíclicas com uma maior capacidade de infecção (Sabalette et al. 2019).

A partir de estudos como esses, é coerente considerar a relevância individual das RBPs na modulação da expressão gênica e, de forma direta ou indireta (através de seus alvos) nos processos biológicos desempenhados pelo *T. cruzi* ao longo de seu ciclo de vida e/ou nos processos de adaptação relacionados. No entanto, apesar de todos os avanços feitos, grande parte das RBPs permanecem com suas funções desconhecidas quanto ao seu papel nessa rede regulatória da expressão gênica de *T. cruzi*. Um fator que contribui para esse cenário consiste na dificuldade de se aplicar técnicas tradicionais de genética reversa para realização de estudos funcionais dos genes nesse parasita, considerado como sendo um organismo de difícil manipulação genética (Taylor et al. 2011; Burle-Caldas et al. 2015).

## Genética reversa no estudo das RBPS

Abordagens de genética reversa que tenham como objetivo reduzir ou mesmo interromper a expressão gênica são de grande valia na compreensão da função dos genes na biologia dos organismos. Isso porque, os fenótipos observados, a partir da modulação negativa de uma determinada proteína, podem ser correlacionados direta ou indiretamente à sua ausência/diminuição, fornecendo importantes pistas quanto à(s) sua(s) função(ões) na célula.

Dentre essas abordagens está o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi), uma ferramenta de genética reversa na qual moléculas de RNA dupla fita induzem a degradação de mRNAs alvos por meio da interação com sequências específicas nos transcritos e da formação de complexos com proteínas com atividade nucleasse (Han 2018). Por se tratar de uma técnica que utiliza de vias e maquinarias existentes em muitos organismos e de relativa fácil aplicação, logo seu emprego permitiu grandes avanços no descobrimento da função de genes em muitos organismos (Fire et al. 1998; Hammond et al. 2001; Hannon et al. 2004). Em *T. brucei*, por exemplo, muito do que se sabe a respeito das RBPs nesse parasita veio de estudos que utilizaram essa técnica para investigar o papel dessas proteínas regulatórias (Estévez 2008; Archer et al. 2009; Ling et al. 2011; Subota et al. 2011; Das et al. 2012; Wurst et al. 2012; Droll et al. 2013; Levy et al. 2015). Inclusive estudos em larga escala já foram realizados a partir da utilização de bibliotecas de RNAi, o que permitiu ampliar de maneira significativa as informações referentes aos genes desse parasito (Wurst et al. 2009; Alsford et al. 2011; Jones et al. 2014; Mony et al. 2014).

Todavia, apesar do sucesso resultante da aplicação dessa metodologia em *T. brucei*, o silenciamento gênico por RNAi não é aplicável para *T. cruzi*. Acontece que em *T. cruzi* a maquinaria envolvida no reconhecimento e processamento dos RNAs de dupla fita, o que é necessário para degradação dos mRNAs alvos, não está completa nesse parasito. A falta de componentes proteicos dessa maquinaria

no genoma de *T. cruzi*, bem como, o insucesso de tentativas de complementar essa via sugerem que essa estratégia não é funcional nesse organismo (Darocho et al. 2004; Balaña-Fouce et al. 2007).

Como consequência disso, o estudo funcional dos genes em *T. cruzi* se limitou a utilização do nocaute gênico como principal ferramenta de genética reversa para *T. cruzi*. A estratégia classicamente utilizada para promoção do nocaute gênico consiste na produção e recombinação de cassetes contendo genes marcadores de seleção (resistências a drogas) flanqueados por sequências homólogas às adjacentes ao gene alvo para o nocaute. Dessa forma, esses cassetes são produzidos (usualmente por reações de amplificação e clonagem/ligação) e transfectados nas células para que ocorra a troca entre o gene marcador de seleção e o gene alvo, de modo que, as células são então submetidas a um processo de seleção para que sejam obtidas apenas as células que sofreram o processo de recombinação e, conseqüentemente, da remoção de um dos alelos do gene. Essa abordagem é problemática por diversas razões. A construção desses cassetes não é nada trivial, pois, além de laboriosa, acaba consumindo uma quantidade significativa de tempo (semanas a meses) e o processo de recombinação em si apresenta baixa eficiência. Além disso, é necessário realizar a construção, transfecção e seleção dos cassetes para cada alelo, sendo, portanto, necessário ao menos dois cassetes em casos de genes de cópia única. Já em casos nos quais estão sendo analisados genes com múltiplas cópias, os esforços tendem a ser ainda maiores, ao ponto de ser inviável recombinar os múltiplos alelos existentes. Lembrando que para cada alelo é necessário utilizar um marcador de seleção diferente, o que também acaba sendo uma limitação (Clayton 1999; Xu et al. 2009; Peng et al. 2014).

Outra desvantagem dessa metodologia está relacionada a análise de genes essenciais. Enquanto que, na indução do silenciamento gênico por RNAi, é possível acompanhar as alterações fenotípicas decorrentes da diminuição da expressão de determinado gene (justamente pelo fato de ser um sistema induzível), o nocaute gênico em *T. cruzi* impossibilita a obtenção de mutantes nulos para genes essenciais, uma vez que, como é necessário selecionar as populações nocaute, os

possíveis efeitos deletérios podem ser mascarados pelo próprio processo de seleção dos parasitos (Burle-Caldas et al. 2015).

A falta de um sistema como o de RNAi e as desvantagens apresentadas pela metodologia clássica de nocaute gênico em *T. cruzi*, fizeram com que os avanços feitos nesse parasito no estudo funcional de seus genes não fossem tão expressivos quanto o observado para *T. brucei* (Burle-Caldas et al. 2015). Essa problemática é acentuada em casos que os objetos de estudo são genes regulatórios, como o caso das RBPs, uma vez que, conforme tem sido demonstrado em *T. brucei*, muitos apresentam-se como sendo essenciais para esse organismo (Wurst et al. 2012; Levy et al. 2015) . No entanto, é válido destacar que um estudo foi reportado utilizando essa metodologia de nocaute na geração de mutantes nulos para a RBP TcZC3H31 (Alcantara et al. 2018). Nesse trabalho, Alcantara e colaboradores obtiveram êxito no nocaute gênico dessa proteína e puderam observar que, embora os parasitos nocaute não apresentassem efeitos deletérios, a ausência dessa proteína inibiu por completo o processo de metaciclogênese (Alcantara et al. 2018). Apesar do sucesso no emprego dessa metodologia nesse trabalho, infelizmente, esse é o único relato até o momento da utilização dessa estratégia no estudo de RBPs em *T. cruzi*.

Dessa forma, em prol da expansão dessa área de estudo em *T. cruzi*, novas metodologias são necessárias para superar os desafios encontrados nesse organismo e permitir que a caracterização funcional de genes, como os codificadores de RBPs, possa ser realizada a partir de estratégias de genética reversa com maior êxito.

### **Utilização do sistema CRISPR/CAS9 para geração de nocautes em *T. cruzi***

Diante desse cenário, a descoberta do sistema CRISPR/Cas9 emergiu como uma alternativa promissora às estratégias até então utilizadas em *T. cruzi*. Identificado originalmente a partir de mecanismos de defesa encontrado em

bactérias contra DNA exógenos, o sistema CRISPR/Cas9 logo foi adaptado como uma versátil e poderosa ferramenta de edição gênica (Jinek et al. 2012; Jinek et al. 2013).

Esse sistema é composto por uma endonuclease, Cas9, que forma um complexo com uma molécula híbrida de RNA, denominada de RNA guia (gRNA), o qual é direcionado até uma região específica do genoma e, na presença de um motivo PAM (*Protospacer adjacent motif*) realiza uma quebra de dupla fita no DNA. O gRNA é resultado do desenho e síntese de uma molécula de RNA que possui duas funções: (I) adotar uma conformação estrutural responsável pela formação do complexo com a endonuclease, Cas9; (II) direcionar a Cas9 até uma ou mais regiões específicas do genoma com base na complementariedade de bases. A adaptação desse sistema permitiu que essa molécula de RNA fosse programável para qualquer região do genoma, de modo que, basta sintetizá-la para que seja complementar à região desejada para definir essa região como alvo do sistema (Jinek et al. 2012). Outra característica interessante está relacionada ao fato de ser possível editar genes que apresente múltiplas cópias ou mesmo famílias multigênicas, uma vez que, ao utilizar gRNAs que reconheçam regiões conservadas, é viável editar mais de uma cópia/gene simultaneamente (Wang et al. 2016).

A partir da quebra de dupla fita no DNA, gerada pelos dois sítios catalíticos presentes na Cas9, a célula precisa imediatamente reparar a região clivada para manter suas atividades transcricionais e/ou de replicação. Nesse momento, é que a edição gênica ocorre, podendo ela ser direcionada ou não. Isso porque as células possuem mecanismos de reparo que podem depender de homologia ou não para acontecer. No caso de *T. cruzi*, por exemplo, trabalhos vêm evidenciando que, na ausência de um molde para o reparo, as quebras de dupla fita no DNA são reparadas por meio da junção das extremidades por microhomologia (MMEJ), o que acaba acarretando sempre em deleções de sequência, alteração no quadro de leitura dos genes e, conseqüentemente, promovendo a disrupção gênica (McVey et al. 2008; Peng et al. 2014).

Como esse sistema depende de poucos elementos para promover alterações no DNA e é capaz de promovê-las de maneira rápida, precisa e eficaz, logo tornou-se atraente aplicá-lo em organismos de difícil manipulação genética, como o caso do já mencionado *T. cruzi*. De fato, a partir da descoberta do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição gênica, logo esse sistema foi aplicado a diversos outros organismos, incluindo no *T. cruzi* (Peng et al. 2014; Lander et al. 2015). Sendo assim, tendo em vista o êxito no emprego da metodologia CRISPR/Cas9 nesses trabalhos pioneiros, a aplicação dessa ferramenta tornou-se extremamente oportuna para o estudo das RBPs em *T. cruzi*.

### **As RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3H11P de *T. cruzi***

Esse trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos acerca das RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3H11P. Essas proteínas foram objetos de estudos anteriores de nosso grupo, os quais avaliaram o perfil de expressão e localização delas ao longo do ciclo de vida desse parasita além de investigar os seus possíveis mRNAs alvos e proteínas parceiras (Alves 2010; Alves et al. 2014; Romagnoli 2016).

A proteína TcZC3H39 é uma proteína citoplasmática e de expressão constitutiva que foi inicialmente identificada associada a mRNAs em complexos mRNPs. Análises dos perfis de sedimentação dessa proteína em parasitas em condições normais de cultivo ou em condições de estresse nutricional e, na presença/ausência de estabilizadores/dissociadores da maquinaria de tradução, demonstraram que essa proteína responde a essas situações de estresse (nutricional e/ou bloqueio da tradução), ampliando e modificando seu repertório de interações com os mRNAs, quando esses são liberados dos polissomos (Alves et al. 2014).

O isolamento e sequenciamento dos mRNAs associados a TcZC3H39 revelou 49 transcritos em epimastigotas nas condições normais de cultivo. Todavia, esse número quadruplicou durante o estresse nutricional, chegando a 199 mRNAs

identificados. Apesar dessa diferença expressiva, o dado mais impactante foi, no entanto, o fato dos transcritos associados a essa proteína durante o estresse nutricional serem distintos dos encontrados nas condições normais de cultivo e apresentarem uma menor estabilidade nessa situação. Essa observação aponta para uma função dinâmica de TcZC3H39 em *T. cruzi*, em especial na modulação de mRNAs em resposta ao estresse (Alves et al. 2014).

A partir dos resultados promissores obtidos para essa RBP, foram realizadas buscas por proteínas com o domínio dedo de zinco C3H no genoma de *T. cruzi*. Assim foram selecionados os genes que codificam para as proteínas TcZC3H29 e TcZC3HHTTP, as quais venho estudando desde a minha iniciação científica. Essas duas RBPs citoplasmáticas são reguladas durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, sendo encontradas expressas apenas em formas epimastigotas. Curiosamente, a versão fusionada à etiqueta FLAG dessas proteínas, embora tenha resultado num aumento de expressão significativo durante o processo de diferenciação, também não foi detectada no estágio tripomastigota metacíclico. Como essas fusões foram feitas a partir da clonagem apenas das respectivas CDS de TcZC3H29 e TcZC3HHTTP em um plasmídeo de expressão, é sugestivo que existam mecanismos regulatórios modulando negativamente a expressão dessas proteínas, que sejam independentes de elementos presentes nas suas UTRs (Romagnoli 2016).

Ainda, ensaios de imunoprecipitação seguida de extração e sequenciamento dos mRNAs associados a TcZC3H29 ou TcZC3HHTTP em epimastigotas sob estresse nutricional ou não, revelou um número maior de transcritos na condição de estresse. Ao todo, foram identificados 260 e 296 mRNAs associados a TcZC3H29 em epimastigotas não estressados e estressados nutricionalmente, respectivamente. Embora a maioria dos transcritos identificados estejam anotados como proteínas hipotéticas (> 55%), as análises de GO (*gene ontology*) e a comparação entre mRNAs encontrados nas duas situações revelou que essas populações eram completamente distintas. De fato, do total de mRNAs enriquecidos identificados, apenas 16 transcritos foram comuns às duas condições analisadas (Romagnoli 2016).



Para TcZC3HTTP, 150 mRNAs foram identificados como enriquecidos em epimastigotas e 156 nos parasitos submetidos ao estresse nutricional. Ao contrário do que foi observado para TcZC3H29, houve uma grande sobreposição dos mRNAs nas duas condições, de modo que, do total, 110 transcritos foram identificados compartilhados. Dos mRNAs encontrados, 44,6 % codificam para proteínas ribossomais em epimastigotas, ao passo que esse percentual sobe para 60,8 % em epimastigotas nutricionalmente estressados (Romagnoli 2016).

A partir dessas informações, considera-se que as proteínas TcZC3H29 e TcZC3HTTP, assim como foi demonstrado para TcZC3H39, sejam relevantes na regulação da expressão gênica de *T. cruzi* e que, portanto, estudos que visem compreender melhor de que forma elas colaboram nessa rede regulatória e quais seus mecanismos de atuação, são de grande interesse.

Diante desse cenário apresentado, o presente trabalho teve como finalidade utilizar a ferramenta de edição gênica, CRISPR/Cas9, para investigar a função dessas três RBPs em *T. cruzi*. A abordagem para alcançar esse objetivo consistiu em utilizar essa poderosa ferramenta para gerar parasitos nocaute para essas RBPs e avaliar os efeitos da ausência dessas proteínas na biologia desse protozoário e, principalmente, na modulação de seus respectivos alvos. A partir do emprego dessa metodologia foi possível não só aprofundar os conhecimentos acerca dessas proteínas regulatórias, mas também estabelecer uma nova abordagem que permita avançarmos na compreensão das RBPs no contexto da regulação da expressão gênica de *T. cruzi*.

## **OBJETIVO GERAL**

Elucidar o papel das proteínas com domínio dedo de zinco C3H TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HHTTP na regulação da expressão gênica do *Trypanosoma cruzi*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS/METAS**

1. Utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para gerar parasitas nocautes dos genes que codificam as proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HHTTP.

2. Caracterizar os parasitas nocaute

2.1. Analisar os fenótipos dos mutantes nulos;

2.1.1. Verificar mudanças morfológicas por microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão;

2.1.2. Avaliar alterações no ciclo celular e viabilidade das células por citometria de fluxo;

2.2. Analisar a expressão dos mRNAs nos parasitos nocaute;

2.2.1. Investigar a expressão dos transcritos alvos das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e ZC3HHTTP;

2.2.2. Correlacionar alterações na expressão dos mRNAs com os fenótipos observados para cada nocaute;

## INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS

Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dessa tese foram divididos em dois capítulos. A escrita e a divisão desses capítulos foram feitas com o intuito de melhorar a compreensão dos resultados alcançados, de modo que, cada capítulo contém uma pequena parte introdutória ao conteúdo abordado, os resultados correspondentes dispostos em formato de artigo e uma discussão.

**O capítulo 1** aborda os resultados referentes a utilização e ao aprimoramento da ferramenta molecular, CRISPR/Cas9, na geração de nocautes gênicos em *Trypanosoma cruzi*. Nessa seção, está descrito como foi feita a padronização da técnica, quais foram os problemas encontrados durante sua implementação e como a solução para esses desafios culminou em uma adaptação às estratégias até então existentes, resultando em uma melhoria da aplicação desse sistema para geração de nocaute nesse parasito.

**O capítulo 2** traz uma revisão atualizada das RBPs caracterizadas em *T. cruzi* e aborda a utilização da técnica de edição gênica, CRISPR/Cas9, na geração de parasitos nocaute como estratégia de aprofundar os conhecimentos acerca do papel dessas proteínas na regulação da expressão gênica desse protozoário. Nesse capítulo também constam os achados relacionados ao nocaute gênico das RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HHTTP, objetos de estudo dessa tese.

## **CAPÍTULO 1.**

**Padronização e aprimoramento da técnica CRISPR/Cas9 para edição gênica  
em *Trypanosoma cruzi*.**

No início do desenvolvimento dessa tese, haviam dois artigos científicos publicados utilizando o sistema de edição gênica CRISPR/Cas9 para o nocaute gênico em *T. cruzi* (Peng et al. 2014; Lander et al. 2015). Esses dois trabalhos foram pioneiros em propor e estabelecer estratégias para utilização desse sistema nesse parasito e, embora o princípio da técnica tenha sido o mesmo, as estratégias propostas por esses dois grupos divergem metodologicamente.

A estratégia proposta por Peng e colaboradores consiste em obter uma população expressando constitutivamente a endonuclease SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) fusionada a etiqueta FLAG e, a partir dessa população, eletroporar esses parasitas transfectantes com as moléculas de RNA guia



, as quais são previamente geradas por transcrição *in vitro* (Peng et al. 2014). Dessa forma, os autores afirmam que é possível observar num curto prazo (dois dias após a transfecção com os RNAs guia) as consequências do nocaute gênico.

A metodologia descrita por Lander e colaboradores tem como base a transfecção dos parasitos com vetores em que foram clonadas as sequências do gene que codifica para a proteína SpCas9 e da sequência referente ao RNA guia. Essas sequências foram clonadas tanto num mesmo plasmídeo (estratégia de apenas um vetor) ou em plasmídeos separados (estratégia de dois vetores) (Lander et al. 2015). Por essa abordagem, os autores demonstraram o aumento no sucesso da edição gênica ao conseguir clonar a população transfectante expressando a enzima SpCas9 e o gRNA, simultaneamente.

Apesar do sucesso demonstrado por ambos os trabalhos científicos na utilização do sistema CRISPR/Cas9 em *T. cruzi*, o fato do trabalho desenvolvido por Peng e colaboradores ter sido publicado 6 meses antes em relação ao de Lander e colaboradores fez com que, no início do desenvolvimento dessa tese, essa tenha sido a metodologia escolhida para ser aplicada nesse trabalho. Por conta disso,

foram desenhados os oligonucleotídeos necessários para a síntese dos gRNAs e obtido o vetor contendo o gene da endonuclease Cas9 fusionada a etiqueta FLAG.

Com o intuito de padronizar essa técnica e utilizá-la para o nocaute gênico dos genes alvos desse trabalho, TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP, iniciou-se o estabelecimento desse protocolo. Os parasitos foram transfectados com o plasmídeo pTREX-b-NLS-hSpCas9 (Peng et al. 2014) e selecionados, o RNA guia produzido por transcrição *in vitro* e a transfecção da população SpCas9-FLAG com os guias feita. No entanto, mesmo após algumas tentativas, não foi possível reproduzir os dados publicados pelos autores quanto a edição do gene repórter (GFP), nesse sistema. Ao investigar as possíveis razões desse insucesso, verificou-se que: a proteína SpCas9-FLAG apresentava um padrão de degradação em ensaios de imunodeteção por *western blot*; a endonuclease não estava presente no núcleo conforme constatado por imunofluorescência indireta, e também foi incapaz de nocautear o gene repórter GFP na presença de RNAs guia específicos para este gene (dados não mostrados).

Diante desse cenário, cogitou-se testar a abordagem proposta por Lander e colaboradores uma vez que o plasmídeo contendo a SpCas9-GFP estava disponível em nosso instituto. No entanto, para a aplicação dessa estratégia, seria necessário sintetizar novos oligonucleotídeos para realizar a clonagem das sequências referentes aos gRNAs no mesmo plasmídeo (estratégia de um vetor), o que, embora fosse viável, inevitavelmente, demandaria tempo e recursos extras. Foi nesse momento então que, após nossa avaliação crítica quanto a utilização de ambas as metodologias e de suas respectivas vantagens e desvantagens, levantou-se a possibilidade de hibridizar as duas abordagens de modo a combinar os pontos considerados fortes em cada uma.

A metodologia envolvendo os dois procedimentos experimentais, consistiu em utilizar os parasitos transfectados com o vetor Cas9/pTREX-n (Lander et al. 2015), mas sem uma sequência de gRNA clonada. O intuito de utilizar o plasmídeo contendo apenas a SpCas9 fusionada à etiqueta GFP, era pela possibilidade de selecionar uma população enriquecida quanto a expressão da SpCas9 por meio,



tanto da marca de seleção presente no plasmídeo (resistência a neomicina), quanto por citometria de fluxo, a partir da fluorescência proveniente da fusão com a proteína GFP. Dessa forma, foi possível obter populações em que > 99.5% das células estivessem expressando a fusão SpCas9-GFP. É válido destacar que a associação da SpCas9 com a GFP nessas populações foi verificada através de ensaios de imunodeteção por *western blot*.

Após a seleção dessa população SpCas9-GFP positiva, os parasitos foram submetidos a uma nova eletroporação, sendo transfectados com os gRNAs específicos para cada alvo. Esses gRNAs foram originados a partir da transcrição *in vitro* (seguindo a estratégia do trabalho de Peng) a partir de uma molécula de DNA, sintetizada previamente por PCR e utilizada como molde para a produção dos RNAs guia. Com essa proposta, descartou-se a necessidade de sintetizar novos oligonucleotídeos e, principalmente, solucionou-se algumas das desvantagens levantadas para ambas as estratégias descritas, as quais serão discutidas a seguir.

Na estratégia de Peng e colaboradores, os autores relataram a toxicidade da Cas9 resultando no impacto negativo de sua expressão na proliferação dos parasitos. Nós acreditamos que o fato desse trabalho ter relatado efeitos tóxicos a partir da expressão SpCas9 e, ainda, dessa endonuclease estar fusionada a etiqueta FLAG, interferiu tanto na seleção de uma cultura homogênea que expressasse essa proteína, quanto na eficiência do sistema, haja visto que essas duas questões estão atreladas. Por outro lado, como a indução da quebra de dupla fita só ocorre após a transfecção dessa população expressando SpCas9 com os gRNAs, acredita-se que com essa estratégia seja viável investigar os fenótipos logo após a transfecção, isto é, sem a necessidade de previamente ter que clonar ou selecionar a população. Por essa razão, considerou-se que essa abordagem permitia a análise da disrupção de genes potencialmente essenciais para o parasito.

Já para a estratégia descrita por Lander e colaboradores, a fusão da SpCas9 com a GFP facilita a seleção e o enriquecimento de uma população expressando a endonuclease. No entanto, o fato da sequência do gRNA também ser clonada no plasmídeo SpCas9/pTREX-n pode ser tanto positivo quanto negativo, dependendo

da situação. O aspecto positivo é termos todos os componentes necessários para a promoção da edição gênica em um único plasmídeo (estratégia de um vetor), bastando apenas um evento de transfecção para realizar o nocaute gênico de um determinado gene. No entanto, como aspecto negativo, para a construção desse plasmídeo, é necessário clonar cada sequência de gRNA individualmente, o que, inevitavelmente, demanda um investimento maior de tempo em etapas de clonagem. Outro ponto a ser considerado é que a população selvagem transfectada com esse plasmídeo Cas9/pTREX-n, contendo também a sequência do gRNA, precisa ser selecionada e/ou enriquecida para avaliação/obtenção dos parasitas nocaute. Embora essas questões levantadas não sejam impeditivas no estudo de genes não essenciais para o parasito, essas duas necessidades tornam-se limitações em casos onde o gene alvo apresente algum fenótipo que afete negativamente a proliferação do parasita ou mesmo seja um gene essencial. Isso porque, o processo de seleção e obtenção das populações clonais leva ao menos quinze dias de cultivo e, nesse período, as células nocauteadas poderiam morrer como consequência da disrupção do gene alvo, e esse efeito ser mascarado pelo próprio processo de seleção em si, o qual é realizado através do uso de marcadores de seleção. Como, nessa abordagem, a população originalmente transfectada é selvagem, os parasitos que tiverem seus genes potencialmente essenciais nocauteados irão morrer juntamente com as células que, por ventura, não receberam o plasmídeo contendo o sistema de edição. Por essa razão, a utilização dessa estratégia seria inviável na seleção dos parasitos nocauteados e na própria determinação do fenótipo deletério.

Com base nas vantagens e desvantagens dessas duas abordagens, a estratégia híbrida foi elaborada e executada. A partir dela foram obtidos resultados consistentes e reprodutíveis quanto ao funcionamento do sistema CRISPR/Cas9. Como prova de conceito da atividade de edição gênica da SpCas9, os parasitos expressando essa endonuclease foram transfectados com RNA guias específicos para o gene que codifica para a proteína GFP, presente no próprio plasmídeo Cas9/pTREX-n. Após a transfecção observou-se uma redução no sinal de GFP nas células já nas primeiras 24 h, sendo que, no terceiro dia, mais de 95 % dos parasitos

foram encontrados apresentando sinais de fluorescência de GFP equivalentes aos dos parasitos selvagem, o que foi interpretado consequência direta do sucesso na edição desse gene) (Romagnoli et al. 2018). Esse dado revela a alta eficiência dessa abordagem uma vez que: essa significativa redução ocorreu a nível populacional já nas primeiras 24h; não houve a necessidade de etapas de clonagem e/ou seleção dos parasitos; a proporção de células editadas atingiu percentuais superiores (> 95 %) ao que foi relatado por Peng e colaboradores (entre 50 e 60 % para GFP) (Peng et al. 2014).

Uma vez passada por essa primeira prova de conceito, foi incluída na validação dessa nossa metodologia proposta o nocaute gênico de genes endógenos de *T. cruzi*. Foram escolhidos inicialmente genes que haviam sido editados e descritos em publicações anteriores, como o caso dos genes da  $\alpha$ -tubulina (Peng et al. 2014), e da GP72 (Lander et al. 2015), a qual também já teve seu fenótipo mutante analisado por outras metodologias de nocaute envolvendo recombinação homóloga de cassetes contendo marcadores de seleção (Cooper et al. 1993). Além desses, foi escolhido ainda o gene da  $\beta$ -tubulina por ser um componente *a priori* essencial do citoesqueleto e que, até então, não haviam informações a respeito das consequências de sua ausência em *T. cruzi*. Após a utilização de gRNAs específicos para esses genes, os respectivos fenótipos encontrados corroboraram com os descritos na literatura para o nocaute de  $\alpha$ -tubulina e GP72. As alterações inéditas visualizadas para  $\beta$ -tubulina também corresponderam às expectativas, tendo em vista a relação de  $\beta$ -tubulina e  $\alpha$ -tubulina no contexto celular.

Outro ponto avaliado com relação a padronização dessa abordagem foi a quantidade de gRNA necessária para obter sucesso no nocaute gênico e a possibilidade de se utilizar tampões de eletroporação alternativos àquele comercialmente disponível, sem perder eficiência do processo. A razão pela qual surgiu interesse nessa questão fundamentou-se no alto custo envolvido com a utilização dos kits comerciais, tanto para a geração dos RNAs guia quanto para transfecção dos parasitos. Foram testadas diferentes concentrações de gRNA (de 7.5  $\mu$ g a 75  $\mu$ g) e diferentes tampões para avaliar a possibilidade de redução de custo dessa abordagem sem haver prejuízo na eficiência do método. Os dados

encontrados apontaram para a viabilidade na redução da dependência de kits comerciais e, conseqüentemente, dos custos financeiros para utilizar essa técnica.

O conjunto dos resultados mostrou que a estratégia híbrida proposta tornou a aplicação da ferramenta CRISPR/Cas9 em *T. cruzi* mais rápida, prática e eficiente. Os dados obtidos foram compilados em um artigo científico publicado na revista Acta Tropica (fator de impacto 2,629 / Qualis B1 na área CB-I).



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*

Bruno A.A. Romagnoli<sup>a,1</sup>, Gisele F.A. Picchi<sup>b,1</sup>, Priscila M. Hiraiwa<sup>c,1</sup>, Beatriz S. Borges<sup>d</sup>, Lysangela R. Alves<sup>a,\*</sup>, Samuel Goldenberg<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Curitiba, 81350-010, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Curitiba, 81350-010, Brazil

<sup>c</sup> Flow Cytometry Facility, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Curitiba, 81350-010, Brazil

<sup>d</sup> Microscopy Facility, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Curitiba, 81350-010, Brazil



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Trypanosoma cruzi*

Knockout

CRISPR/Cas9

Improved technology

Essential genes

### ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects millions of individuals around the world. Although it has been known for more than a century, the study of *T. cruzi* has been a challenge, particularly due to the scarcity of tools for genome inquiries. Recently, strategies have been described allowing gene disruption in *T. cruzi* by the CRISPR/Cas9 nuclease system. Although these strategies demonstrated success in deleting some genes, several aspects could be improved to increase the efficiency of the CRISPR/Cas9 system in *T. cruzi*. Here, we report a strategy, based on adaptations and improvements of the two previously described systems, that results in efficient gene disruption that can be applied to any target, including the study of essential genes.

### 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (Chagas, 1909), is a protozoan parasite that affects millions of individuals, particularly in Latin America, with reports in North America and Europe (WHO, 2015). Although it has been isolated and characterized for more than a century, many biological aspects of this parasite remain to be unveiled due to its peculiarities and genome complexity (El-Sayed et al., 2005). Moreover, *T. cruzi* has a substantial number of genes whose function cannot be assigned based only on sequence homology and for which methods to study gene function (as gene deletion, complementation of mutants, protein overexpression and reporter gene analysis) have been of limited value due to the lack of efficient genetic tools (Burle-Caldas et al., 2015; Taylor et al., 2011). Efforts to delete genes by homologous recombination (gene knockout) are not trivial given that the parasite is diploid and therefore two rounds of gene replacement are required. This approach is also unfeasible for genes with multiple copies or multigenic families, which comprise one-third of its genes (El-Sayed et al., 2005). In addition to that, attempts to obtain null mutants of essential genes can generate parasites bearing planned replacements (resistance cassettes inserted at the right loci) and new copies of the gene (as seen in *Leishmania*) (Minning et al., 2009; Murta

et al., 2009; Obado et al., 2005). Gene knockdown using RNA interference (RNAi) – a well-established method to downregulate gene expression in *Trypanosoma brucei* – is not possible in *T. cruzi* since its RNAi machinery is not complete.

The availability of a system with RNA-guided nucleases utilizing clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats – the CRISPR-associated (CRISPR/Cas) nuclease system – represents an important step forward, allowing targeted genome editing in diverse organisms. This system is a prokaryotic protective response to viruses that are recognized by small guide RNAs that complex with the Cas9 nuclease leading to site-specific DNA cleavage. The CRISPR/Cas system arose as a powerful technique because of its high-throughput capacity for genome editing, efficiency and easiest to use as compared to other genome engineering procedures; it is possible to reach multicopy genes and/or many genes at a time (reviewed by Barrangou and Doudna, 2016). By adapting CRISPR/Cas9 for use in *T. cruzi*, two groups described different strategies showing that it is possible to disrupt exogenous and endogenous single or multicopy genes in this parasite (Lander et al., 2015; Peng et al., 2015). One of the strategies generates null mutants for essential genes and allows for monitoring the loss of protein activity over time, although the system efficiency is low and Cas9 expression shows a negative impact on *T. cruzi* growth. The other

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [lysangela.alves@fiocruz.br](mailto:lysangela.alves@fiocruz.br) (L.R. Alves), [sgoldenb@fiocruz.br](mailto:sgoldenb@fiocruz.br) (S. Goldenberg).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

strategy, using separate or single plasmids containing the small guide RNA (sgRNA) and a GFP-tagged Cas9, promotes rapid and efficient editing, allowing complete disruption of an endogenous gene without the Cas9 toxicity previously observed in the parasites. However, the need for cloning sgRNA sequences into vectors is laborious and time consuming, and transfection of these vectors requires selection of resistant parasites. This last step impairs the success of obtaining and analyzing null mutants for essential genes since it is practically impossible to separate cells dying as a consequence of gene disruption from those dying because they have not received the plasmid and are therefore not resistant to selection. An alternative procedure has been recently proposed using Cas9/sgRNA ribonucleoprotein complex from *Staphylococcus aureus* in protozoan parasites (Soares Medeiros et al., 2017).

Although previous studies have shown that the CRISPR/Cas9 system is useful for deleting genes from *T. cruzi*, both methods display disadvantages. Therefore, we propose modifications to improve its efficiency by using the major advantages of the two previously described systems: (1) a GFP-tagged version of the endonuclease Cas9 that enables rapid selection and enrichment of Cas9-GFP-expressing cells by fluorescence-activated cell sorting and (2) the transfection of *in vitro* transcribed sgRNAs which allows for analysis of knockout effects – even for essential genes – shortly after transfection. Finally, we show that it is possible to reduce costs and to maintain a highly efficient CRISPR/Cas9 system to disrupt genes in *T. cruzi*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasite cultures, transfection and cloning of Cas9-GFP parasites

*T. cruzi* Dm28c strain epimastigotes were cultured at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). For each transfection,  $5 \times 10^6$  early-log phase epimastigotes were washed in PBS (pH 7.4), resuspended in 100  $\mu$ L human T cell Nucleofector solution (Lonza, Basel, Switzerland) and 20  $\mu$ g of plasmid Cas9/pTREX-n (Lander et al., 2015) (Addgene Plasmid #68708) and electroporated using the U-33 program in an Amaxa Nucleofector device. After one electric pulse, parasites were cultured in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks with 10 mL LIT medium supplemented with 10% FBS. G418 (250  $\mu$ g/ml) was added 24 h post-transfection and GFP-positive parasites were sorted 15 days post-transfection by BD FACSAria II (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Fluorescence microscopy was performed to determine the presence and location of Cas9-GFP protein in transfected parasites. Expression of the Cas9-GFP protein was also assessed by western blot:  $5 \times 10^5$  early-log phase parasites were harvested (3000  $\times$  g, 5 min), washed twice in PBS and resuspended in Laemmli sample buffer. Total lysate fractionation was carried out by SDS-PAGE and proteins were transferred onto nitrocellulose Hybond-N membranes overnight at 20 V. Membranes were blocked with 5% nonfat skim milk in PBST (PBS supplemented with 0.05% of Tween-20) overnight at 4 °C. Later, blots were incubated with the polyclonal mouse antibodies anti-GFP (1:500) and anti-GAPDH (1:1000) for 1 h at 25 °C. Three wash steps were made with PBST and then membranes were incubated with secondary antibodies conjugated to peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) and chemiluminescent peroxidase substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Detection and documentation were performed using L-PIX Chemiexpress equipment (Loccus, Cotia, Brazil).

### 2.2. sgRNA preparation and transfection

sgRNA sequences were obtained from literature or designed using the Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool (EuPatGDT) (Peng and Tarleton, 2015) and are listed in Supplementary Table 1. DNA templates for sgRNA *in vitro* transcription were obtained as described previously (Peng et al., 2015) and sgRNAs were transcribed *in vitro*

using the MEGAShortscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) according to the manufacturer's instructions. An 80 base fragment of human 18S rRNA transcribed from MEGAShortscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) control template was used as control RNA. For each transfection,  $5 \times 10^6$  early-log phase Cas9-GFP expressing epimastigotes were washed in PBS (pH 7.4), resuspended in 100  $\mu$ L room temperature human T cell Nucleofector solution and electroporated using the U-33 program in an Amaxa Nucleofector device in the presence of 20  $\mu$ g of specific sgRNA. After one electric pulse, parasites were cultured in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks with 10 mL LIT medium supplemented with 10% FBS.

### 2.3. Flow cytometry cell analysis

Flow cytometry experiments were performed in a FACSCanto II machine (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). GFP and propidium iodide (PI) were excited by blue laser (488 nm) and emitted light was collected by 530/30 and 585/42 bandpass filters, respectively. The data were analyzed using FlowJo V10.1r7 software. For GFP and cell viability quantification,  $1 \times 10^6$  parasites were harvested (3000  $\times$  g, 5 min), resuspended in 5  $\mu$ g/ml propidium iodide (PI) in PBS and immediately analyzed by flow cytometry. Unstained cells and single-stained controls (GFP cells alone and cells stained with PI alone) were used to compensate dual-parameter flow cytometric data. For DNA content determination, a total of  $1 \times 10^6$  parasites were harvested (3000  $\times$  g, 5 min). The cell pellet was resuspended in 100  $\mu$ L of PBS and mixed with 100  $\mu$ L propidium iodide staining solution (3.4 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% NP40, 10  $\mu$ g/ml RNase A, 10 mM NaCl, 30  $\mu$ g/ml propidium iodide). Single cells were gated based on pulse area (PE-A) vs. pulse width (PE-W) of the PE channel, excluding cellular aggregates and debris, and the cell cycle was further analyzed (Nunez, 2001).

### 2.4. Morphological characterizations

For Panotico staining, a total of  $1-10 \times 10^5$  parasites was deposited on glass slides, let to dry and washed in methanol. After drying, samples were clarified for 4 min with 5 M HCl and washed 5 times with water. Then, dried samples were stained with Panotico (Laborclin) according to the manufacturer's instructions with minor modifications: 2 min in solution 1, 15 min in solution 2 and 15 min in solution 3. Parasites were observed by light microscopy. For Scanning Electron Microscopy, parasites were washed with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h; subsequently, cells were washed and adhered to coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma). Cells were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h then washed with buffer and dehydrated in a graded ethanol series (30° to 100° GL) for 10 min each step. Samples were critical point dried, mounted on metallic stubs and coated with gold sputtering of 20 nm. Finally, samples were examined under a JEOL JSM 6010 PLUS-LA (Akishima, Tokyo, Japan) scanning electron microscope operating at 20 kV.

### 2.5. DNA extraction, amplification and sequencing

For DNA extraction  $1 \times 10^8$  cells were pelleted, washed twice with PBS and incubated with 150  $\mu$ L of TELT lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 62.5 mM EDTA, pH 8.0, 2.5 M LiCl and 4% Triton X-100) for 5 min at room temperature. Then, DNA was purified using phenol/chloroform (1:1, v/v), precipitated with 100% ethanol (2.5:1, v/v) and resuspended in 100  $\mu$ L of TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 11 mM EDTA, pH 8.0) containing 10  $\mu$ g/ml RNase A. DNA amplification was carried out by PCR using specific primers for GFP, GP72 and ZFP29, a zinc finger protein family member (TCMDM\_11529), respectively (Supplementary Table 1). PCR conditions were as follows: 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C

for 1 min. The PCR products of GFP targeted clones were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced at WEMSeq Biotechnology (wemseq.com) for sequencing. Alignments were made using SnapGene version 4.0.2.

### 2.6. Disruption efficiency using two quantities of sgRNA

For each transfection,  $5 \times 10^6$  early-log phase Cas9-GFP expressing epimastigotes were washed in PBS (pH 7.4), resuspended in 100  $\mu$ L human T cell Nucleofector solution and electroporated in the presence of 7.5  $\mu$ g or 75  $\mu$ g of specific GFP sgRNA using the U-33 program in an Amaxa Nucleofector device. After one electric pulse, parasites were cultured in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks with 10 mL LIT medium supplemented with 10% FBS. Analysis of GFP fluorescence was performed following transfections.

### 2.7. Disruption efficiency using different transfection buffers

For each transfection,  $5 \times 10^6$  early-log phase Cas9-GFP expressing epimastigotes were washed in PBS (pH 7.4), resuspended in 100  $\mu$ L of specific buffer (Supplementary Table 2) at room temperature and electroporated in the presence of 7.5  $\mu$ g of specific GFP sgRNA using the U-33 program in an Amaxa Nucleofector device (Pacheco-Lugo et al., 2017; Padmanabhan et al., 2014; Schumann Burkard et al., 2011). After one electric pulse, parasites were cultured in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks with 10 mL LIT medium supplemented with 10% FBS. Analysis of cell viability (measured by propidium iodide staining) and GFP fluorescence were performed from the day following transfections.

## 3. Results

*T. cruzi* Dm28c parasites were transfected with Cas9/pTREX-n (Lander et al., 2015) to obtain a Cas9 protein-expressing population. This construct has some advantages such as the fusion of Cas9 protein to GFP – enabling Cas9 monitoring by fluorescence – and the fact that it does not affect parasite proliferation since it is not toxic. After selection and enrichment for GFP positive cells, expression and localization of Cas9-GFP were assessed by western blot and fluorescence assays, respectively, demonstrating that the Cas9 was indeed being expressed (Fig. 1A) and translocated into the cell nucleus (Fig. 1B).

### 3.1. High efficiency GFP silencing attests to the proposed hybrid system

To test the efficiency of the proposed strategy, we transfected Cas9-GFP expressing parasites with small guide RNA (sgRNA) targeting GFP itself and assayed GFP signal by flow cytometry for 5 days post-transfection. As shown in Fig. 1C, parasites lost GFP signal gradually over time. On the fifth day, more than 95% of the cells were GFP negative, presenting a fluorescence profile similar to wild type parasites. Of note, nearly 80% of parasites had already lost the GFP signal by the second day. No reduction in GFP expression was observed in parasites transfected with an RNA control.

Since previous works (Lander et al., 2015; Peng et al., 2015) reported side effects of Cas9 activity in *T. cruzi*, we decided to search for delays in parasite proliferation. Our findings show that Cas9 does not seem to be toxic to *T. cruzi* Dm28c cells since we did not find significant differences in the cell growth rate of wild type and Cas9-GFP mutant parasites either in the presence or absence of an RNA guide (Fig. 1D). However it cannot be excluded that differences in the toxicity might be related to peculiarities of different *T. cruzi* strains.

These results show that the proposed strategy is efficient, as attested by the remarkable efficiency of GFP disruption and by the fact that Cas9-GFP fusion is not toxic for *T. cruzi* Dm28c based on proliferation rates.

### 3.2. Null mutants for essential and nonessential genes can be obtained and analyzed

To confirm the efficiency of the strategy for disrupting endogenous genes, we targeted GP72,  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin due to their important roles in *T. cruzi* biology and known phenotypes of their knockouts using other techniques. GP72 and  $\alpha$ -tubulin were chosen not only due to the known morphological alterations in null mutant parasites but also for enabling comparisons with both studies that used them to validate their CRISPR/Cas9 knockout methods (Lander et al., 2015; Peng et al., 2015). In the case of  $\beta$ -tubulin, we decided to target its encoding gene because this protein is also an essential component of the *T. cruzi* cytoskeleton and the null mutant should present an evident phenotype (Da Silva et al., 2006; Seeback et al., 1990).

After transfection with the sgRNAs, the cell morphology and cell cycle of parasites were analyzed. Parasites transfected with sgRNAs targeting GP72,  $\alpha$ -tubulin or  $\beta$ -tubulin genes presented morphological alterations two days post-transfection, while RNA control transfected cells did not present any alteration compared to wild type (WT) cells (Fig. 2).

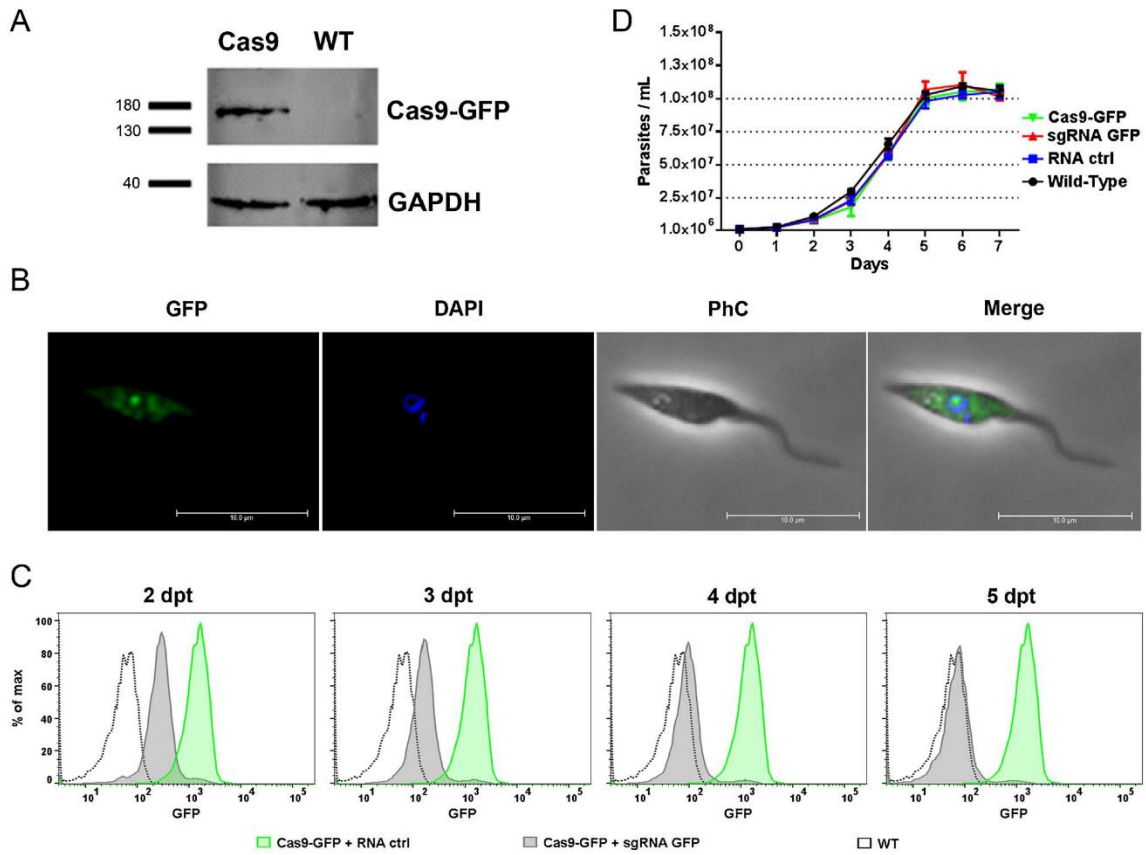
Parasites transfected with the sgRNA against GP72 presented flagellum detachment from the parasite's cell body, reproducing the previously described phenotype for the disrupted gene (Cooper et al., 1993; de Jesus et al., 1993). For the  $\alpha$ -tubulin targeted population, we observed loss of the original cell shape and the presence of multinucleated and multiflagellated cells as previously described (Da Silva et al., 2006; Peng et al., 2015; Seeback et al., 1990). Transfection with sgRNA against  $\beta$ -tubulin resulted in parasites presenting a morphological phenotype analogous to the disruption of  $\alpha$ -tubulin.

Targeting GP72 also resulted in an increased number of cells at the G2/M phase that was not noticed before. The disruption of  $\alpha$ -tubulin impaired the cell cycle, as parasites with more DNA than parasites in G2/M phase appeared at the third day post transfection. Parasites with sgRNAs targeting  $\beta$ -tubulin showed a similar, but attenuated, effect on cell cycle as well. Despite the previous reports regarding the morphological effects of  $\alpha$ -tubulin knock out (Da Silva et al., 2006; Peng et al., 2015) or knock down (Ngô et al., 1998) in *T. cruzi* and *T. brucei*, respectively, the impact of its disruption on the trypanosomatid cell cycle has never been investigated. In yeast, it was demonstrated that the overexpression or mutation of  $\alpha$ -tubulin or  $\beta$ -tubulin led to cell arrest at the G2/M phase and resulted in other consequences such as accumulation of large-budded cells, defects in nuclear division and/or nuclear migration (Cooper et al., 1993; de Jesus et al., 1993; Ngô et al., 1998).

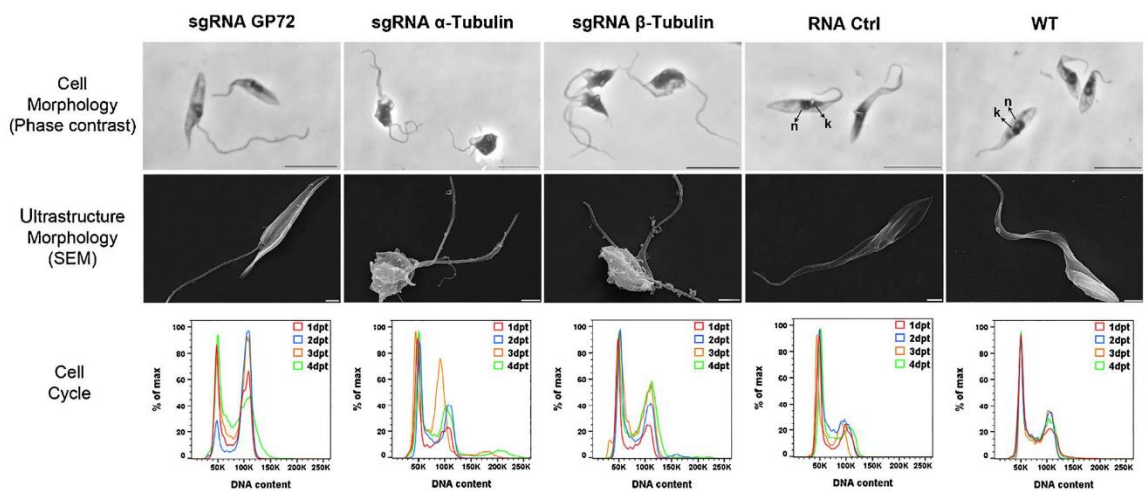
Therefore, our strategy to disrupt genes was also validated for endogenous genes, reproducing their previously described phenotypes. Furthermore, we provided new information about the impacts of GP72,  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin knockouts on the parasite's cell cycle.

### 3.3. Knockout efficiency

To confirm the GFP knockout, four clones were selected, the genomic DNA isolated and GFP fragments were PCR amplified and sequenced. The PCR product from all the clones was smaller than the original GFP gene size indicating that part of the gene was lost (Fig. 3A). Indeed, it was possible to identify the 33nt deletion in all the clones analyzed, however, the position of the deletion varied slightly in each clone with a core of 18nt shared among them (Fig. 3B). This result is in accordance with the previous observation, that in *T. cruzi* the microhomology-mediated end joining (MMEJ) can generate deletions with different sizes around the sgRNA target region (Peng et al., 2015). To confirm the GP72 knockout we obtained a clonal population, which maintained the detached flagellum phenotype even after several passages and attempt to amplify the GP72 by PCR. While it was possible to observe the GP72 amplicons in the WT cells we did not obtain any amplification in the *gp72* $\Delta$  KO strain with both combinations of primers tested (Fig. 3C and D). As a control we amplified the gene that codes for



**Fig. 1.** Challenging the system: analysis of GFP silencing. A) Expression of Cas9-GFP was confirmed by western blot using antibody against GFP in parasites transfected with the Cas9/pTIREX-n plasmid (Cas9). A loading control was done using an antibody against GAPDH. Wild type parasites (WT); B) Cas9-GFP is located in the cell nucleus of Cas9 parasites as visualized by fluorescence microscopy. The nucleus and kinetoplast are stained with DAPI. PhC – phase contrast. Bar: 10 µm; C) High efficiency reduction of GFP fluorescence signal in Cas9 parasites transfected with sgRNA-GFP and D) Growth curve indicating that Cas9-GFP is not toxic to *T. cruzi* since it does not alter the proliferation rate.



**Fig. 2.** Disruption of endogenous genes alters cell morphology and cell cycle. Cell morphology was analyzed by light microscopy (Bar: 10 µm) and Scanning Electron Microscopy (Bar: 2 µm). N and k show the nucleus and kinetoplast, respectively. The cell cycle was analyzed by DNA content quantification using flow cytometry.



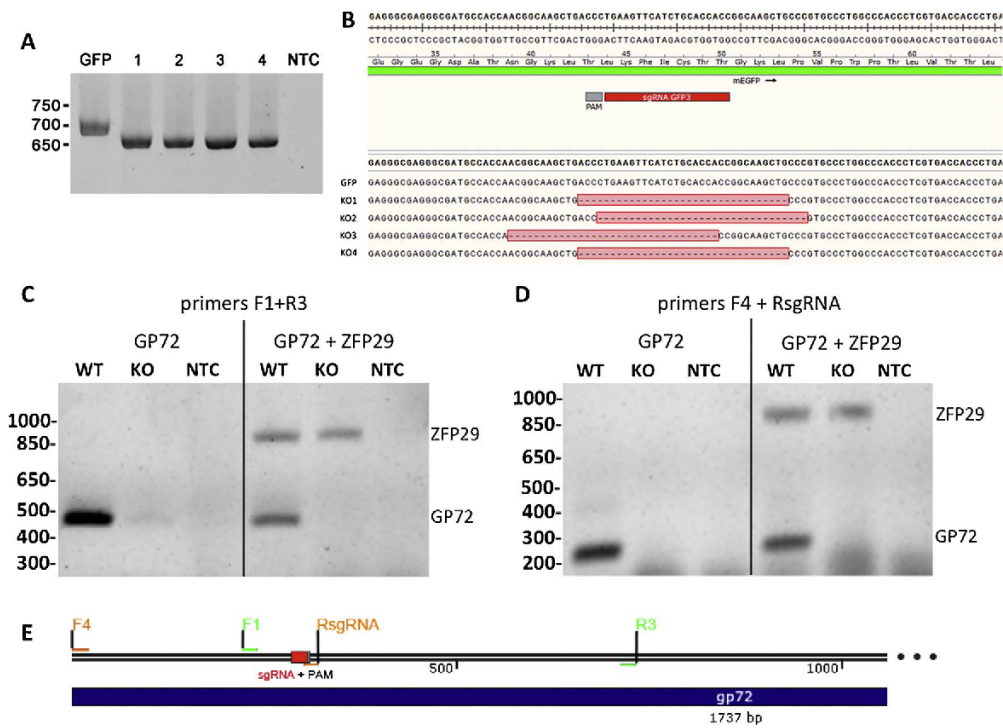


Fig. 3. Confirmation of knockouts by CRISPR/Cas9. GFP knockout confirmation A) DNA of four GFP-KO clones (1–4), control (GFP) and negative control (NTC) were PCR amplified and analyzed by acrylamide gel (5%) electrophoresis. B) DNA sequencing of four GFP-KO clones (KO1–4) and control (GFP) showing the deletion of 33 nt, PAM – protospacer adjacent motif. Confirmation of GP72 knockout with specific sgRNA by PCR (C–D). Genomic DNA of a clonal population GP72-KO (KO) or wild type (WT) were PCR amplified with specific primers for GP72 (F1 + R3 in C and F4 + RsgRNA in D). As a control, multiplex reactions were performed with primers for a zinc finger protein Family member (TCDM\_11529). Additionally, reactions without DNA (NTC) were used as negative control. (E) Scheme with primers used for GP72 amplification and their respective location.

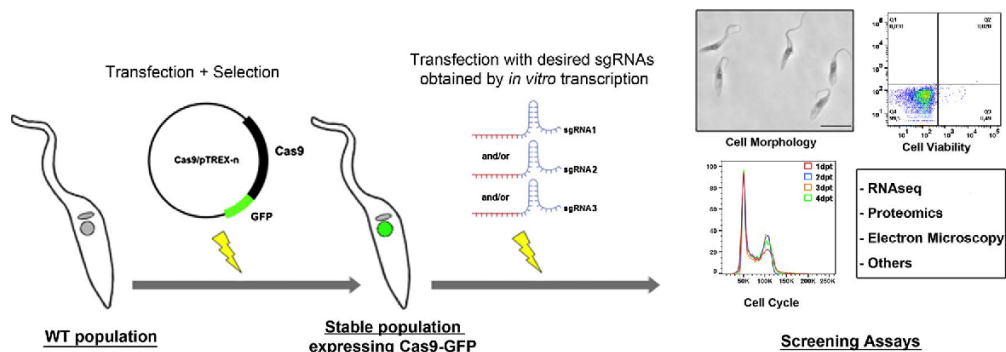


Fig. 4. Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *T. cruzi*.

ZFP29, a zinc finger protein family member (TCDM\_11529) in a multiplex reaction to validate our result, which shows that some sequence of the GP72 gene was removed between the primers regions (Fig. 3E).

### 3.4. Improving the methodology

As *in vitro* transcription and transfection steps are crucial to this method, we tested and introduced some adjustments to make the system more accessible while preserving its efficiency. Decreasing all components and the final reaction volume by half from the *in vitro* transcription reaction yielded enough sgRNA to transfect  $5 \times 10^6$  *T. cruzi*, as described in Methods. This minor adjustment reduces the *in vitro* transcription cost by half.

Aiming to verify if different amounts of sgRNA could result in

distinct responses in the CRISPR/Cas9 system, we tested two conditions with a 10-fold variation. Parasites were transfected using 7.5  $\mu$ g or 75  $\mu$ g of specific GFP sgRNA and the level of GFP fluorescence was measured. The GFP intensity reduced similarly in both conditions over time, as observed in Supplementary Fig. 1, indicating that it is possible to reduce the sgRNA quantity to obtain gene disruption.

Highly efficient sgRNA transfection and high levels of cell viability are essential to obtain success in this technique and is achieved by using the Nucleofector system (solutions kit and devices). Aiming to reduce costs, we tested the efficiency of several transfection buffers to substitute the solutions of the commercial kit. As shown in Supplementary Figs. 2 and 3, the parasites transfected with the sgRNA-GFP in the Tb-BSF buffer presented a notable loss of GFP signal and a high rate of cell viability starting 24 h after transfection, similar to the results observed

using commercial Amaxa buffer (Lonza, Basel, Switzerland). On the other hand, transfections with Opti-MEM and Tc-buffer did not reduce GFP fluorescence efficiently and showed high rates of cell viability. Finally, the low levels of fluorescence observed using Cytomix can be explained by the high rate of cell death. Therefore, simple homemade buffer (Tb-BSF) can be used to transfect sgRNA into *T. cruzi* maintaining the high efficiency of the CRISPR/Cas9 system and reducing the cost of transfection.

#### 4. Conclusions

The strategy for gene knockout presented here and depicted in Fig. 4 was developed based on CRISPR/Cas9 methods previously reported for *T. cruzi*. Merging the best benefits from each strategy, it was possible to optimize a method to obtain an efficient approach that can be applied to gene disruption in *T. cruzi*.

The procedure we have developed allows for obtaining a *T. cruzi* population expressing non-toxic Cas9-GFP. In addition, it is possible to transfect sgRNAs with no need for previous cloning. Some clear advantages of this method are:

- It is possible to transfect more than one sgRNA molecule simultaneously in the same population;
- Depending on the phenotype alterations, one can investigate mutant parasites from day one post-transfection, allowing for study of potential essential genes;
- It is possible to study the transfected population directly, avoiding selection and cloning mutant parasite steps.

We also propose screening assays to observe phenotypes and cell cycle alterations right after transfection. Furthermore, the proposed adaptations reduced the total cost of the methodology. It was observed that small amounts of sgRNA – as low as 7.5 µg – is enough to obtain gene disruption by CRISPR/Cas9 system and that a simple homemade buffer – Tb-BSF – maintains the high efficiency of sgRNA transfection.

#### Author contributions

B.A.A.R., G.F.A.P., P.M.H., L.R.A. and S.G conceived the experiments and interpreted the data. B.A.A.R., G.F.A.P., P.M.H. and B.S.B. conducted the experiments and analyzed the results. All authors prepared and reviewed the manuscript.

#### Competing financial interests

The authors declare no conflict of interests.

#### Acknowledgements

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for use of flow cytometry (RPT08L) and microscopy (RPT07C) facilities; we also thank the WEMSeq Biotechnology Company for the DNA sequencing. The authors thank Wagner Nagib de Souza Birbeire for Fig. 4 design.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.013>.

#### References

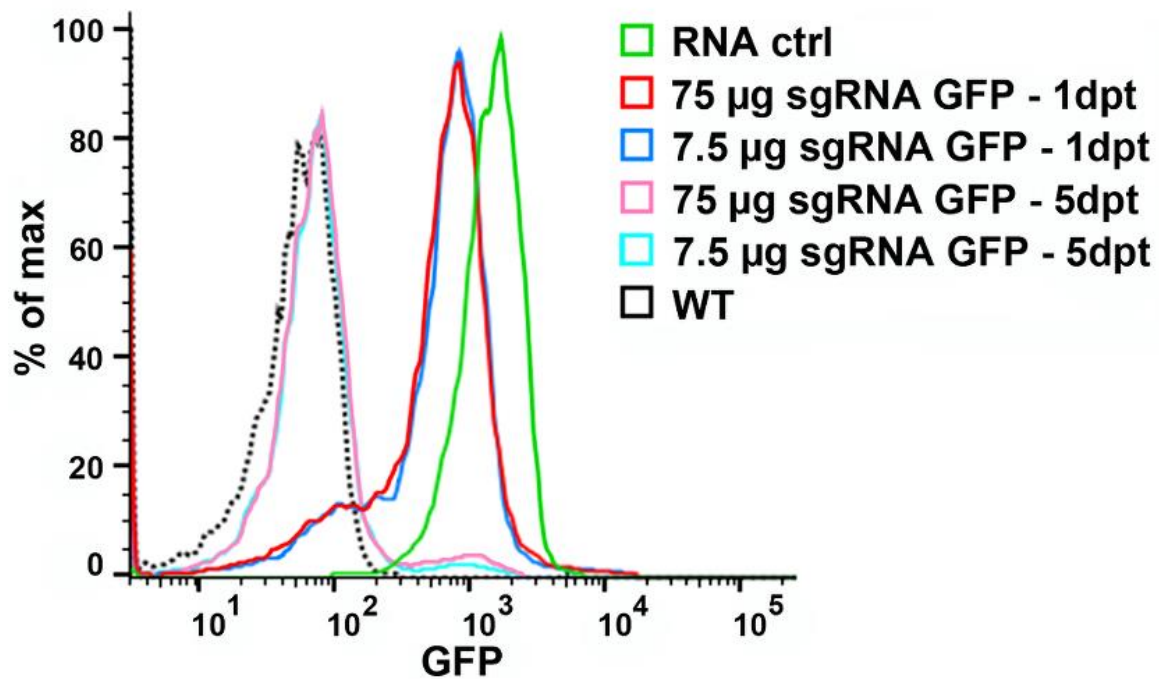
Barrangou, R., Doudna, J.A., 2016. Applications of CRISPR technologies in research and

- beyond. *Nat. Biotechnol.* 933–941. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3659>.
- Burle-Caldas, G., de, A., Grazielle-Silva, V., Laibida, L.A., DaRocha, W.D., Teixeira, S.M.R., 2015. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 203, 25–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.10.004>.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1 (2), 159–218. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- Cooper, R., De Jesus, A.R., Cross, G.A.M., 1993. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 122, 149–156. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.122.1.149>.
- Da Silva, R.A., Bartholomeu, D.C., Teixeira, S.M.R., 2006. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 36, 87–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.09.005>.
- de Jesus, A.R., Cooper, R., Espinosa, M., Gomes, J.E., Garcia, E.S., Paul, S., Cross, G.A., 1993. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J. Cell Sci.* 106 (Pt. 4), 1023–1033.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osogawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tamm, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112631>. (80-).
- Lander, N., Li, Z.H., Niyogi, S., Docampo, R., 2015. CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio* 6. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01012-15>.
- Minning, T.A., Weatherly, D.B., Atwood, J., Orlando, R., Tarleton, R.L., 2009. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 10, 370. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>.
- Murta, S.M.F., Vickers, T.J., Scott, D.A., Beverley, S.M., 2009. Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase and the synthesis of 10-CHO-THF are essential in *Leishmania major*. *Mol. Microbiol.* 71, 1386–1401. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06610.x>.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E., 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14687–14692. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.25.14687>.
- Nunez, R., 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3, 67–70.
- Obado, S.O., Taylor, M.C., Wilkinson, S.R., Bromley, E.V., Kelly, J.M., 2005. Functional mapping of a trypanosome centromere by chromosome fragmentation identifies a 16-kb GC-rich transcriptional strand-switch domain as a major feature. *Genome Res.* 15, 36–43. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2895105>.
- Pacheco-Lugo, L., Díaz-Olmos, Y., Sáenz-García, J., Probst, C.M., DaRocha, W.D., 2017. Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection. *Parasitol. Int.* 66, 236–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2017.01.019>.
- Padmanabhan, P.K., Polidoro, R.B., Barteneva, N.S., Gazzinelli, R.T., Burleigh, B.A., 2014. Transient transfection and expression of foreign and endogenous genes in the intracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 198, 100–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.02.001>.
- Peng, D., Tarleton, R., 2015. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microb. Genomics* 1. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000033>.
- Peng, D., Kurup, S.P., Yao, P.Y., Minning, T.A., Tarleton, R.L., 2015. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio* 6, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02097-14.Editor>.
- Schumann Burkard, G., Jutz, P., Roditi, I., 2011. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 91–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.002>.
- Seebach, T., Hemphill, A., Lawson, D., 1990. The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitol. Today* 6, 49–52. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90069-G](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(90)90069-G).
- Soares Medeiros, L.C., South, L., Peng, D., Bustamante, J.M., Wang, W., Bunkofské, M., Perumal, N., Sanchez-Valdez, F., Tarleton, R.L., 2017. Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *MBio* 8, 17–e01788. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01788-17>.
- Taylor, M.C., Huang, H., Kelly, J.M., 2011. Genetic techniques in *trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 75, 231–250. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00011-3>.
- WHO, 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis) [WWW document]. Fact Sheet (n°340).

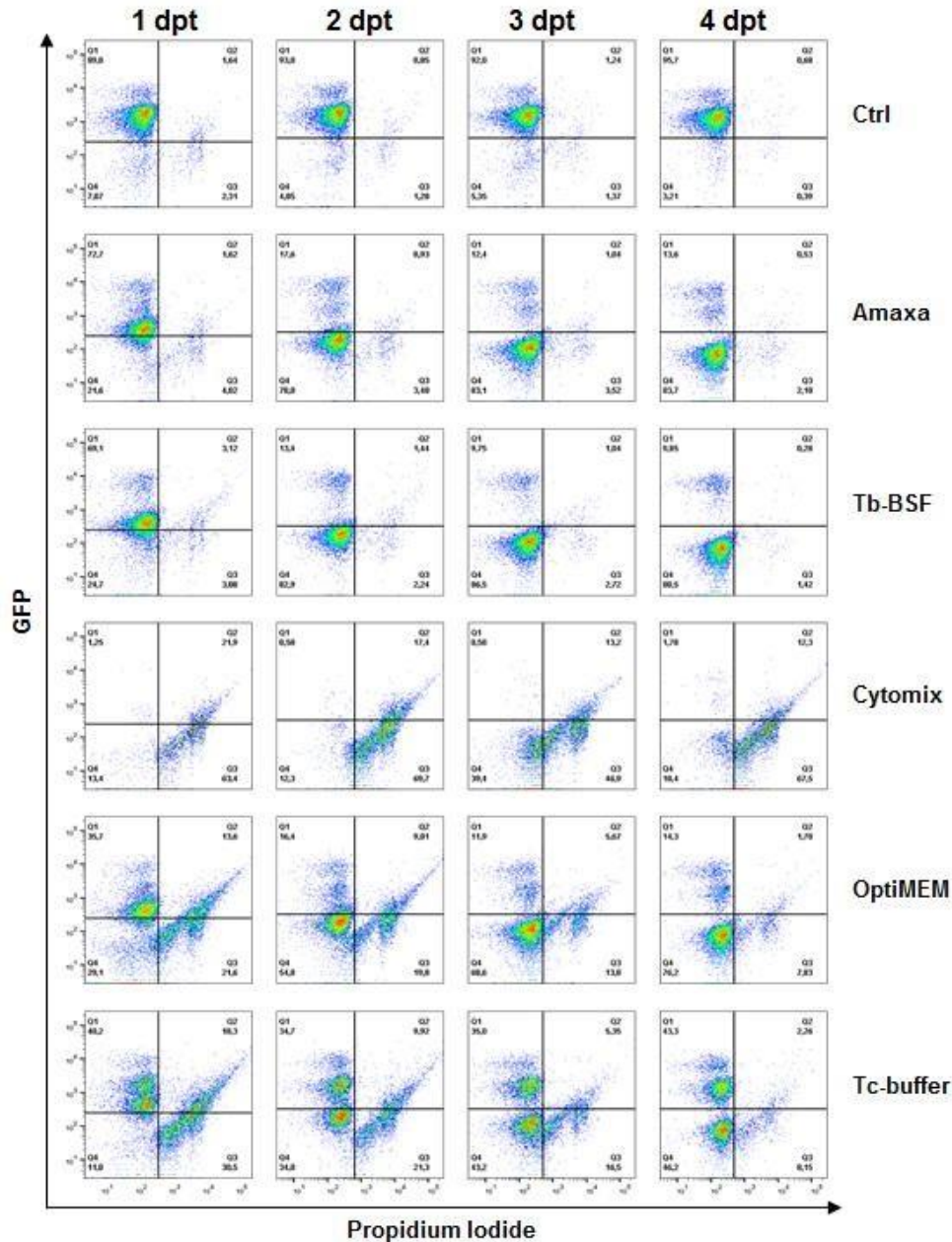
## MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 1

Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*

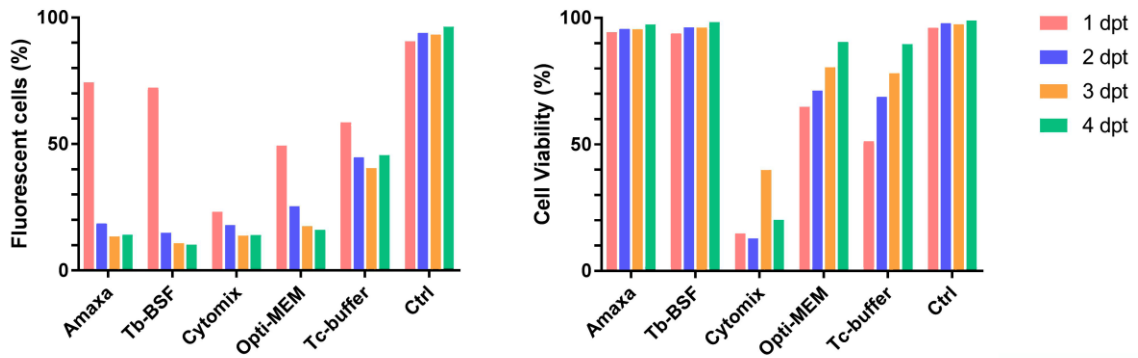
Bruno A. A. Romagnoli<sup>1,\*</sup>, Gisele F. A. Picchi<sup>2,\*</sup>, Priscila M. Hiraiwa<sup>3,\*</sup>, Beatriz S. Borges<sup>4</sup>, Lysangela R. Alves<sup>1,\*</sup> and Samuel Goldenberg<sup>1,\*</sup>



**Supplementary Figure 1.** CRISPR/Cas9 system presented the same efficiency using different quantities of sgRNA. Cas9-GFP parasites were transfected with 7.5 µg or 75 µg of sgRNA targeting GFP and the GFP fluorescence signal was assessed from days 1 to 5 post-transfection by flow cytometry.



**Supplementary Figure 2.** Evaluation of GFP fluorescence and cell viability after transfection with homemade buffers. Cas9-GFP parasites were transfected with 7.5  $\mu$ g or 75  $\mu$ g of sgRNA targeting GFP. GFP fluorescence signal and cell viability was assessed simultaneously by flow cytometry. As negative control (Ctrl), Cas9-GFP population was transfected with Amaxa electroporation buffer in the absence of sgRNA. dpt: days post-transfection. Q1: undamaged cells without GFP disruption. Q2 and Q3: damaged cells. Q4: undamaged cell with GFP disruption.



**Supplementary Figure 3.** Homemade Tb-BSF buffer shows high efficiency in GFP disruption and high cell survival rates. Parasites expressing Cas9-GFP were transfected with 7.5  $\mu$ g of sgRNA targeting GFP using different electroporation buffers. As negative control (Ctrl), Cas9-GFP population was transfected with Amaxa electroporation buffer in the absence of sgRNA. Bars represent the average of 10,000 events analyzed. dpt: days post-transfection.

**Supplementary Table 1. sgRNA targeting sequences and primers used in this work**

sgRNA/Primer	targeted gene	sgRNA targeting sequence (PAM)
eGFP sgRNA <sup>3</sup>	eGFP	GGTGGTGCAGATGAACTTCAG
$\alpha$ -tubulin sgRNA <sup>1</sup>	$\alpha$ -tubulin	GTGCTGGGAGCTGTTCTGTCT
$\beta$ -tubulin sgRNA	$\beta$ -tubulin	GTTGTTGCCGACAAAGGTGAG
GP72 sgRNA <sup>2</sup>	GP72	GTGCGTTTGGTGAACAAATCG
GFP_F	GFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP_R	GFP	AGCTCGTCCATGCCGAGAG
TCDM_11529_F	TCDM_11529	ATGACACAGATCATCACTGAG
TCDM_11529_R	TCDM_11529	TTACCATTCCACATCCTGTACA
GP72_F1	GP72	TGGTTCGCTTGGCAATGATG
GP72_R3	GP72	GTTTGTGGCTCCCTGCATAT
GP72_F4	GP72	ATGTTTTCAAAAAGGACGTCG
GP72_RsgRNA	GP72	CGGTGAAAATGCCGATTTG

**Supplementary Table 2. Electroporation buffers**

ID	Buffer Composition
Amaxa	Amaxa Human T Cell Nucleofector® Kit - Catalog # VPA – 1002 (Lonza, Basel, Switzerland)
Tb-BSF	5 mM KCl, 0.15 mM CaCl <sub>2</sub> , 90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50 mM HEPES, pH 7.3
Cytomix	120 mM KCl, 0.15 mM CaCl <sub>2</sub> , 2 mM EDTA, 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES, 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Opti-MEM	Opti-MEM® I Reduced Serum Medium – Catalog # 31985062 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA)
Tc-buffer	140 mM NaCl, 0.74 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES, pH 7.5

1. Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A. & Tarleton, R. L. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio* **6**, 1–11 (2015).
2. Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S. & Docampo, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *MBio* **6**, e01012-15- (2015).

## DISCUSSÃO – CAPÍTULO 1

A manipulação genética em *T. cruzi* sempre foi considerado um grande desafio a ser superado, em especial se tratando do nocaute gênico. A metodologia classicamente designada para deleção de genes nesse parasito consiste na utilização de cassetes com marcadores de seleção para recombinação homóloga. Essa abordagem clássica de genética reversa além de demandar um alto consumo de tempo e esforços para sua execução, ainda apresenta um baixo percentual de sucesso (Clayton 1999; Xu et al. 2009; Peng et al. 2014).

Diante desse cenário, o surgimento do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta de edição gênica (Jinek et al. 2012), além de despertar o interesse da comunidade científica como um todo, tornou-se extremamente atraente para os grupos que buscam modificar os genes de *T. cruzi*. O princípio de que esse sistema pode, em tese, ser aplicado a qualquer tipo celular, logo fez com que grupos buscassem implementar essa técnica nesse parasito. No ano de 2015, dois grupos pioneiros relataram o sucesso obtido no nocaute gênico em *T. cruzi* através da ação da endonuclease SpCas9 (Peng et al. 2014; Lander et al. 2015).

Os autores alcançaram esse objetivo com a utilização de duas metodologias propostas, cada qual com suas vantagens e desvantagens. No decorrer do desenvolvimento desse trabalho e na tentativa de estabelecer um protocolo para realização de edição gênica por CRISPR/Cas9, nos deparamos com a possibilidade de adaptar uma nova estratégia para implementação desse sistema. A estratégia híbrida desenvolvida, embora não seja uma revolução metodológica, fornece uma melhor perspectiva na aplicabilidade dessa ferramenta, sobretudo quanto a eficiência de nocaute observada e no tempo necessário para sua execução e análise.

Um ponto de destaque, o qual é compartilhado da metodologia desenvolvida por Peng e colaboradores (Peng et al. 2014), é a possibilidade de análise de fenótipos de genes essenciais, uma vez que a indução do sistema de edição ocorre após a eletroporação dos gRNAs nos parasitos SpCas9-GFP. No entanto, ao contrário do encontrado por esses autores, nós não observamos

efeitos tóxicos nas células expressando SpCas9-GFP (Romagnoli et al. 2018). Dessa forma, num sistema no qual essa endonuclease não parece interferir negativamente nos processos, têm-se uma maior segurança de que, em situações nas quais o nocaute de um determinado gene promove alterações fenotípicas deletérias os efeitos oriundos da ação da SpCas9-GFP sejam específicos da disrupção de seu alvo e não decorrentes de uma ação inespecífica da própria endonuclease. Todavia, é importante ressaltar que apenas com o sequenciamento e análise do genoma desses parasitos expressando a SpCas9 será possível confirmar a inexistência de efeitos secundários oriundos desse sistema. Infelizmente, os elevados custos relacionados a esse procedimento inviabilizam sua execução.

A fusão de SpCas9 com GFP é outra grande vantagem advinda da estratégia publicada por Lander e colaboradores (Lander et al. 2015). A seleção e manutenção de uma população que expressa a enzima fusionada à GFP é de extrema facilidade, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência direta. No entanto, cabe ressaltar duas questões relacionadas à população SpCas9-GFP e que foram observadas neste trabalho.

Primeiramente, após a seleção/enriquecimento dos parasitos SpCas9-GFP, observou-se que essa população se mantém positiva para a expressão da endonuclease fluorescente na ausência do marcador de seleção (o antibiótico análogo à neomicina, G418). Essa manutenção da expressão foi constatada mesmo após dez passagens sem a presença da droga (dados não mostrados). A partir dessa informação, acredita-se que as sequências codificadoras de SpCas9 e de GFP tenham sido integradas no genoma desses parasitos. Um dado que suporta essa hipótese é o fato das sequências dos genes de SpCas9 e de GFP estarem no vetor Cas9/pTREX-n (Lander et al. 2015) (Addgene Plasmid #68708). Esse plasmídeo foi construído a partir do vetor pTREX (Vazquez et al. 1999), o qual possui capacidade de integrar-se ao genoma no locus ribossomal (Lorenzi et al. 2003). Nós não checamos se, realmente, houve essa integração, mas diante do exposto é muito provável que sim.

Outra questão relevante foi com relação ao surgimento de uma subpopulação, dentro da população SpCas9-GFP, cuja fluorescência de GFP era maior do que a população original (dados não mostrados). Conforme o



número de passagens das células expressando Cas9-GFP aumentava verificou-se que após a décima quinta passagem, parasitos apresentando níveis fluorescência para GFP dez vezes acima do restante da população, que se manteve GFP positiva. Esse aumento na ordem de uma grandeza foi verificado por citometria de fluxo e, através da mesma técnica e com o intuito de investigar o surgimento dessa população, esses parasitos foram separados por *single cell sorting*, cultivados separadamente da população original e a atividade da SpCas9 foi analisada para efeito de comparação entre essas duas populações SpCas9-GFP positivas.

A medição da atividade dessas duas populações foi feita a partir da transfecção de gRNA contra GFP e posterior análise por citometria de fluxo. Curiosamente a subpopulação isolada cuja expressão de SpCas9-GFP era dez vezes maior foi incapaz de reduzir os níveis de GFP, enquanto que a população expressando níveis “normais” da endonuclease reproduziu a alta eficiência descrita anteriormente (dados não mostrados). Esse experimento, indicou, portanto, que, nas células que apresentavam essa maior expressão da SpCas9, o sistema não estava ativo. A razão dessa inatividade ainda é desconhecida, no entanto, nós especulamos que a elevação de uma ordem de grandeza nos níveis de Cas9-GFP nesses parasitos pudesse resultar numa maior dispersão dessa endonuclease por toda a célula. Isso significaria que haveria uma concentração significativa de SpCas9 capaz de se associar com as moléculas de gRNA no citoplasma da célula ao em vez do núcleo, e, embora essa endonuclease apresente sinais de endereçamento nuclear, o acesso do complexo ao DNA poderia ser dificultado. Contudo, se essa hipótese fosse verdadeira, teria sido observado ao menos uma atividade parcial da endonuclease, o que não ocorreu.

Fato é que, apesar da falta de dados adicionais acerca do porquê surgiu essa subpopulação não funcional, por segurança, foram tomadas duas medidas para precaver a presença da mesma. Primeiramente, realizou-se o constante monitoramento e seleção da população funcional de SpCas9-GFP por citometria de fluxo para averiguar a presença dessa subpopulação. Ainda, optou-se por utilizar as culturas SpCas9-GFP positivas por até no máximo dez passagens, sendo necessário descongelar novas alíquotas dessas culturas sempre que

necessário. Tomadas essas precauções. foi possível manter a estratégia desenvolvida nesse trabalho de maneira eficiente e reprodutível.

No geral, quanto a perspectiva de aplicação desse sistema para a edição gênica em *T. cruzi* é preciso levar em conta que o sistema ainda apresenta algumas limitações e carece de melhorias, principalmente, para o estudo de genes essenciais. Isso porque, muito embora a metodologia desenvolvida nesse trabalho permita analisar os fenótipos desses genes, mesmo que num curto espaço de tempo, ainda assim existem desvantagens como: (I) o fato do período de análise das culturas ser próximo com o evento da transfecção, podendo haver interferência nos resultados; (II) o fato das análises serem feitas em uma população de células na qual não há garantia de que todos parasitos irão receber o(s) gRNA(s); (III) a dependência da alta eficiência da transfecção, bem como dos gRNAs utilizados, para compensar o fato de se analisar uma população de células. O cuidado na seleção e produção dos gRNAs e a utilização dos devidos controles nas transfecções conseguem minimizar essas questões, todavia.

A solução ideal para essas desvantagens, no entanto, seria a implementação de um sistema de controle de expressão induzido da SpCas9 e/ou do gRNA, de modo que a cultura pudesse ser selecionada, clonada e então o sistema fosse induzido. Com essa abordagem seria possível confirmar possíveis efeitos deletérios resultantes da edição gênica minimizando ou mesmo anulando as desvantagens mencionadas acima.

## **CAPÍTULO 2.**

**O papel das proteínas dedo de zinco TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP  
no metabolismo de RNA do *Trypanosoma cruzi*.**

Após a implementação e o aprimoramento da ferramenta de edição gênica, CRISPR/Cas9, a próxima etapa para o desenvolvimento dessa tese foi utilizar esse sistema para gerar parasitas nocaute para os genes que codificam as RBPs com domínio dedo de zinco C3H TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP em *T. cruzi*. Conforme mencionado anteriormente, essas proteínas foram objetos de estudos anteriores de nosso grupo, os quais as apontaram como interessantes alvos para estudos mais aprofundados (Alves 2010; Alves et al. 2014; Romagnoli 2016).

Apropriando-se dessa ideia, o presente trabalho teve como objetivo principal aprofundar os conhecimentos acerca do papel das RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP na regulação da expressão gênica de *T. cruzi*. A partir da utilização do sistema CRISPR/Cas9, foi feita a edição gênica dos genes que codificam para essas RBPs e avaliadas as alterações fenotípicas relacionadas. A proposta inicial do projeto de tese era investigar os efeitos dos nocautes de TcZC3H39, TcZC3H29 ou TcZC3HTTP na biologia de *T. cruzi*, sobretudo, na regulação dos transcritos associados a essas proteínas. Contudo, os primeiros ensaios de transfecção com os gRNAs específicos para os genes *tczc3h39*, *tczc3h29* e *tczc3http* resultaram no aparecimento de parasitos com drásticas alterações morfológicas, no ciclo celular e, ao que tudo indicava, inviáveis. Várias tentativas de isolar/selecionar esses parasitos fenotipicamente alterados foram realizadas por diluição seriada ou citometria de fluxo (*single cell sorting* ou mesmo enriquecimento), mas sem sucesso. As alterações observadas foram reproduzidas com diferentes gRNAs para cada gene e, embora os fenótipos fossem similares, essas alterações eram distinguíveis entre os nocautes pra RBPs diferentes.

Ao longo do desenvolvimento desse trabalho, dúvidas surgiram quanto a especificidade dos fenótipos obtidos. Todavia, através de análises de western blot, observou-se que as proteínas TcZC3H29 e TcZC3HTTP não estavam sendo detectadas nas populações transfectadas com os gRNAs específicos contra seus respectivos genes. Apesar dessa evidência, não havia sido possível confirmar as alterações a nível de DNA dessas populações, aparentemente, nocautes pra TcZC3H29 ou TcZC3HTTP. Nesse momento, viu-se a necessidade

de modificar a estratégia de nocaute que estava sendo utilizada desde então (a qual foi descrita no capítulo anterior).

Incorporou-se então, a utilização de oligonucleotídeos simples fita de DNA (DNA *donor*), contendo braços de homologia às regiões flanqueadoras da quebra de dupla fita (gerada pelo complexo SpCas9-gRNA) e uma sequência de 17 nt com um sítio de restrição e stop códons em três fases de leitura diferentes, para direcionar o reparo dos parasitos editados. A partir dessa alteração metodológica, foi possível confirmar que a edição mediada pela SpCas9 estava, de fato, ocorrendo nos genes correspondentes às RBPs.

Os dados obtidos nesse trabalho, referentes aos nocautes de TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3H11P, foram aceitos para publicação na revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (fator de impacto 3,518 / Qualis A1 na área CB-I) na forma de uma revisão mais detalhada das RBPs e uma prova de conceito visando utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para nocautear e estudar as RBPs em *T. cruzi*.



# RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*

Bruno A. A. Romagnoli, Fabiola B. Holetz, Lysangela R. Alves and Samuel Goldenberg\*

Gene Expression Regulation Laboratory, Institute Carlos Chagas, Curitiba, Brazil

The regulation of gene expression in trypanosomatids occurs mainly at the post-transcriptional level. In the case of *Trypanosoma cruzi*, the characterization of messenger ribonucleoprotein (mRNP) particles has allowed the identification of several classes of RNA binding proteins (RBPs), as well as non-canonical RBPs, associated with mRNA molecules. The protein composition of the mRNPs as well as the localization and functionality of the mRNAs depend on their associated proteins. mRNPs can also be organized into larger complexes forming RNA granules, which function as stress granules or P-bodies depending on the associated proteins. The fate of mRNAs in the cell, and consequently the genes expressed, depends on the set of proteins associated with the messenger molecule. These proteins allow the coordinated expression of mRNAs encoding proteins that are related in function, resulting in the formation of post-transcriptional operons. However, the puzzle posed by the combinatorial association of sets of RBPs with mRNAs and how this relates to the expressed genes remain to be elucidated. One important tool in this endeavor is the use of the CRISPR/CAS system to delete genes encoding RBPs, allowing the evaluation of their effect on the formation of mRNP complexes and associated mRNAs in the different compartments of the translation machinery. Accordingly, we recently established this methodology for *T. cruzi* and deleted the genes encoding RBPs containing zinc finger domains. In this manuscript, we will discuss the data obtained and the potential of the CRISPR/CAS methodology to unveil the role of RBPs in *T. cruzi* gene expression regulation.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, gene expression regulation, RNA binding proteins, CRISPR/CAS, zinc finger protein, RNA granules

## INTRODUCTION

*Trypanosoma cruzi*, as well as other trypanosomatids, displays several biological features that makes it unique in nature (De Souza, 1984; Rodrigues et al., 2014). One of the most striking features of organisms in the Kinetoplastida order is related to the transcription process, since mRNAs are transcribed as polycistronic units that are later processed to give rise to mature mRNAs (De Gaudenzi et al., 2011; Goldenberg and Avila, 2011). There are some special points concerning this process that should be highlighted. Although RNA polymerase II (RNA pol II) is involved in mRNA transcription, no canonical RNA polymerase II promoters have been identified in trypanosomatids (Clayton, 2016); the mRNAs within a given polycistron are not related in function or in temporal expression during the life cycle of the cells. Additionally, primary transcripts, with a few exceptions, are intronless. The mRNAs are processed by the mechanism of trans-splicing: a common 5'-leader

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Noelia Lander,  
University of Georgia, United States

### Reviewed by:

Javier De Gaudenzi,  
IIBIO-UNSAM-CONICET, Argentina  
Zhuhong Li,  
University of Georgia, United States

### \*Correspondence:

Samuel Goldenberg  
samuel.goldenberg@fiocruz.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Parasite and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology

**Received:** 24 October 2019

**Accepted:** 03 February 2020

**Published:** 20 February 2020

### Citation:

Romagnoli BAA, Holetz FB, Alves LR  
and Goldenberg S (2020) RNA  
Binding Proteins and Gene Expression  
Regulation in *Trypanosoma cruzi*.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:56.  
doi: 10.3389/fcimb.2020.00056

sequence of ~50 nucleotides (varying in size and sequence according to the species) is added to each mRNA within the polycistronic unit, concomitantly with the addition of a 3' poly-A tail (Palenchar and Bellofatto, 2006; Preußner et al., 2012). Some major questions have been raised concerning the points described above: How are the mRNAs selected for transport to the cytoplasm? How are stage-specific mRNAs selected for translation? To date, definitive answers to these questions are not available, but there are some clues regarding the key players in these processes, hence paving the way to unveiling the mechanisms involved in gene expression regulation in trypanosomes.

In the primitive RNA world, it is conceivable that RNAs existed as naked molecules. However, in all cells, RNAs are covered with proteins and exist as ribonucleoprotein complexes. The proteins associated with RNAs are named RNA-binding proteins (RBPs). There are different classes of RBPs based on the motifs that constitute the RNA binding domains (RBDs). The most common domains, such as the RNA recognition motif (RRM) and zinc finger (ZF) domain, will be discussed below. In addition to the canonical RBPs, there are several proteins involved in metabolism or the stress response that are also associated with RNA and are generally named unconventional RNA binding proteins. It is estimated that 3–10% of a given genome codes for RBPs, corroborating their important role in cell function (Glisovic et al., 2008).

RBPs participate in several biological processes, from RNA transcription to decay (Figure 1). In the course of transcription, RNA is wrapped up by RBPs that, in addition to protecting RNA from degradation, play a crucial role in RNA metabolism and fate in the cell. The processing of RNAs (splicing, alternative splicing or trans-splicing) depends on the correct recognition and exposure of RNA sequences to the splicing machinery (Lee and Rio, 2015). After processing, the mRNAs must be transported to the cytoplasm (Björk and Wieslander, 2017) and, once there, the mature mRNAs can be sequestered to the translation machinery for protein synthesis or stored in RNA granules, where they will be kept silent or targeted for degradation. RNA processing, transport within the cell and localization are mediated by RBPs that determine the fate of the mRNA according to their composition in a given mRNP complex (Gerstberger et al., 2014; Re et al., 2014).

The arrangement and assembly of RBPs in mRNP complexes is very dynamic (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Ross Buchan, 2014). Different sets of RBPs associate with the mRNA to provide its functionality. The combinatorial arrangement of proteins onto a given mRNP complex has yet to be elucidated and is undoubtedly a great challenge for researchers. It is possible that in addition to the genetic and the histone code, there exists an RBP code. Considering the number of known RBPs and moonlighting proteins with RBP functions, this code is complex and would ultimately determine the genes to be expressed.

The study and characterization of RBPs have greatly increased and improved recently with the development of modern tools that allow interactome studies (Castello et al., 2015; Smirnov et al., 2017). High-throughput techniques, such as mass spectrometry and NGS associated with immunoprecipitation

have allowed the isolation and characterization of RBP complexes. This has enabled confirmation of the existence of unconventional RBPs in addition to those that exhibit characteristic features.

## mRNA DECAY AND TRANSLATION

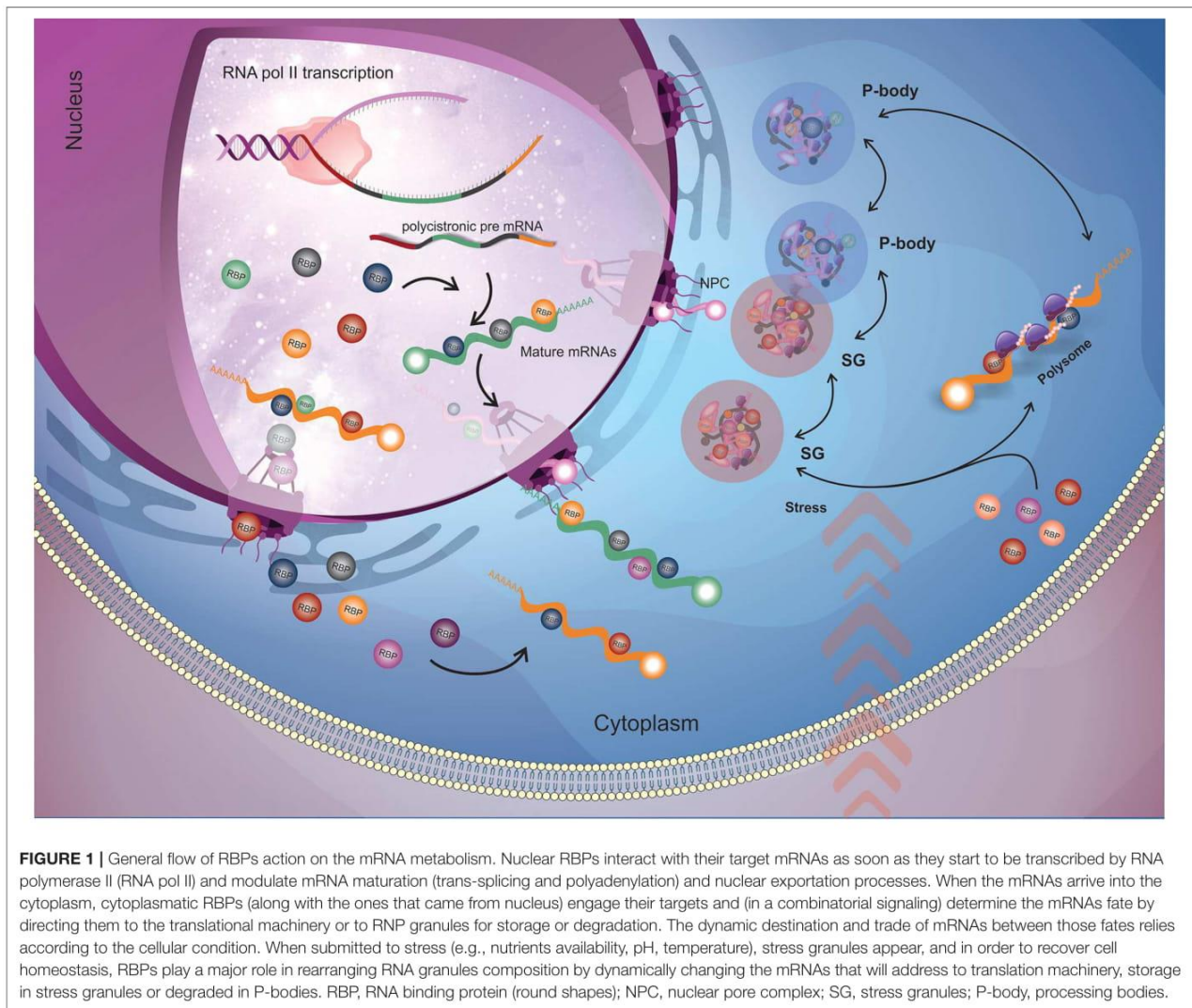
Control of mRNA degradation and access to the translation machinery are very important post-transcriptional processes in *T. cruzi* gene expression regulation. mRNA decay and translation are closely related and can influence each other according to the specific binding proteins associated with the mRNA molecule.

In eukaryotes, the decay of most mRNAs is initiated by the removal of the poly(A) tail. The major mRNA decay pathway of many eukaryotes then proceeds by decapping (by the Dcp1/Dcp2 complex), followed by 5'-3' exonucleolytic degradation by the exoribonuclease Xrn1 (Parker and Song, 2004).

In trypanosomatids, the 5'-3' mRNA decay pathway is currently unknown, although deadenylation and mRNA cleavage processes have been extensively studied and appear to be conventional (Erben et al., 2013; Fadda et al., 2014). Removal of the mRNA cap has already been demonstrated *in vitro* (Milone, 2002), but these parasites seem to have developed a decapping mechanism that is different from the Dcp2/Dcp1-mediated decapping found in all other eukaryotes. In fact, the cap structure of trypanosomes is highly unusual: the m<sup>7</sup>GTP residue is followed by four methylated nucleotides forming the cap4 structure (Perry et al., 1987), justifying the need for a distinct decapping enzyme. Recently, Kramer and colleagues (Fritz et al., 2015) standardized a method for the isolation and purification of stress granules in *T. brucei*. From proteomic analyses of these granules, Kramer identified the TbALPH1 protein as the long-sought trypanosome decapping enzyme from trypanosomatids (Kramer, 2017). Depletion of TbALPH1 is lethal and results in a massive, global increase in mRNAs that are deadenylated but have not yet being degraded. This protein has all the characteristics of a decapping enzyme and is colocalized with the TbXRNA protein in the posterior pole granule. Although this posterior pole granule contains two enzymes that are involved directly in mRNAs decay, no mRNA decay intermediates have been found, raising the hypothesis that this granule maintains the separation of degradation enzymes from the pool of mRNAs in the cytoplasm, regulating mRNA decay in a global way. Such a tight, global regulation of mRNA decay is critical for life-cycle progression.

All trypanosomatid digenetic parasites possess non-proliferative life-cycle stages, which are essential for progression between insect and mammalian host. It is known that transcription and translation are downregulated in these stages (Elias et al., 2001; Tonelli et al., 2011), but the exact mechanisms that regulate these processes remain unknown.

Protein biosynthesis is considered a critical step and the ultimate goal for gene expression regulation in trypanosomatids. Recently, Smircich et al. (2015) assessed the extent of regulation of the transcriptome and the translome in both the non-infective (epimastigote) and infective (metacyclic



trypomastigote) forms of *T. cruzi* using RNA-Seq and ribosome profiling methods. The authors showed that a large subset of genes is modulated at the translation level between these two different developmental stages of *T. cruzi*, indicating a key role of translation control during differentiation into the infective form.

Translation initiation is a major contributing step to gene expression regulation and involves several translation initiation factors (eIFs). In eukaryotes, translation initiates with the binding of the tripartite mRNA-binding complex eIF4F (formed by the translation initiation factors eIF4E, eIF4A, and eIF4G) to the cap present at the 5' end of the mRNAs (Jagus et al., 2012), enabling the attachment of the 43S complex and the two ribosomal subunits to the initiation codon. eIF4E binds directly to the cap and represents a central control point in translational regulation (Jackson et al., 2010). eIF4G, a large scaffold protein, interacts with eIF4E, eIF4A, and PABP. eIF4A, a DEAD-box RNA helicase, unwinds the 5'

proximal region of mRNA. Trypanosomatids possess a large and unusual number of eIF4F translation initiation factor paralogs relative to mammals cells (Freire et al., 2017). There are six eIF4E (eIF4E1-6), five eIF4G (eIF4G1-5), and two eIF4A (eIF4A1-2) homologs. Moreover, trypanosomes have two PABPs (PABP1-2) and *Leishmania* has an additional PABP paralog (PABP3) (da Costa Lima et al., 2010).

The interactions between the different translation initiation factors that form the eIF4F complex have already been determined in *T. brucei* and *Leishmania*, and there are at least five distinct eIF4F (-like) complexes: eIF4E3:eIF4G4; eIF4E4:eIF4G3:PABP1; eIF4E5:eIF4G1; eIF4E5:eIF4G2; and eIF4E6:eIF4G2. It is currently accepted that eIF4E4:eIF4G3:PABP1 is the major translation initiation complex (Freire et al., 2017). However, the exact role of distinct eIF4F-like complexes has not yet been determined, although it is believed that they may be involved in the differential selection of



mRNAs. Despite extensive studies on these multiple homologs in *T. brucei* and *Leishmania*, little is known about these factors in *T. cruzi*, and no specific function for each homolog has been characterized. Nevertheless, we have performed a two-hybrid assay comprising screening for all eIF4Es, eIF4Gs, and PABPs from *T. cruzi*. We have identified and confirmed three new interactions: TceIF4E3:TcPABP1, TceIF4E3:TcPABP2, and TceIF4E5:TceIF4G5 (unpublished data). These results strongly suggest a distinct mechanism regarding the translational control of *T. cruzi*.

## RNA GRANULES

In mammalian and yeast cells, mRNAs that are not being translated, or those destined for degradation, are compartmentalized into distinct cytoplasmic structures generally termed “RNA Granules” or “mRNP Granules” (messenger ribonucleoprotein granules). These granules can be classified in Processing bodies (P-bodies) and stress granules (SG), depending on the presence of specific proteins, and play key roles in the post-transcriptional regulation of gene expression. Stress granules are defined by the presence of translation initiation factors and are involved in the sorting and storage of mRNAs, whereas P-bodies are sites of storage and/or degradation of several transcripts formed by the presence of translation-repressor proteins and components of the mRNA degradation machinery (Sheth and Parker, 2003; Teixeira et al., 2005; Holetz et al., 2007; Anderson and Kedersha, 2008; Kedersha and Anderson, 2009). In addition, eukaryotic studies demonstrate that these structures can interact and exchange their components in a dynamic cycle with the exchange of mRNAs between translation, storage and degradation, indicating the decisive role of these structures in the control of gene expression at the posttranscriptional level (Decker and Parker, 2012).

Our previous work pioneered the identification of RNA granules with similarities to P-bodies in *T. cruzi* (Holetz et al., 2007, 2010). Since then, several studies have described the presence of different mRNP granules in *T. cruzi* and *T. brucei*. There are at least six types of mRNP granules in trypanosomatids, namely, P-body-like RNA granules, nutritional stress-induced RNA granules, heat shock-induced RNA granules, nuclear peripheral granules, posterior pole granule, and granules formed by tRNAs (Kramer, 2014). This vast repertoire of mRNP granules can be justified as an adaptation to the loss of transcriptional control. However, despite the importance of translational control and control of mRNA stability in the regulation of gene expression in trypanosomes, the connection between mRNP granules and life cycle regulation remains unknown in these parasites.

Proteins known to be involved in the formation of RNA granules in eukaryotes have been characterized in *T. cruzi*. TcDHH1 is present as a free protein or in polysome-independent complexes localized in *foci* that vary in number and size in response to nutritional stress and to cycloheximide/puromycin treatments, indicating that these structures are in equilibrium

with the translation machinery (Cassola et al., 2007; Holetz et al., 2007). Furthermore, TcDHH1 associates with developmentally regulated mRNAs. Accordingly, mRNAs associated with TcDHH1 in the epimastigote stage are those mainly expressed in the other forms of the *T. cruzi* life cycle (Holetz et al., 2010). Interestingly, Dallagiovanna et al. (2008) demonstrated the association of TcPUF6 with TcDHH1 in epimastigote forms but not in metacyclic trypomastigotes. Since TcPUF6 promotes the degradation of its target mRNAs in epimastigotes, it is likely that TcPUF6 regulates the degradation of its associated transcripts by its association with TcDHH1-containing complexes involved in mRNA degradation.

Recently, TcXRNA, the trypanosome Xrn1 homologous protein, was characterized in *T. cruzi* (Costa et al., 2018a). TcXRNA exhibits granular cytoplasmic cell localization, is constitutively expressed throughout the life cycle of *T. cruzi* and accumulates at the nuclear periphery when mRNA processing is inhibited. TcXRNA does not colocalize with TcDHH1 and TcCAF1 (a catalytic subunit of the Ccr4-Not deadenylase complex) granules in the cytoplasm. On the other hand, the colocalization of TcXRNA with distinct mRNP granules occurs mainly around the nucleus, which suggests the existence of an mRNA quality control checkpoint at the nuclear periphery, involving the activity of distinct proteins, such as TcXRNA, TcDHH1, and TcCAF1.

The precise function of mRNP granules as well as their relationship with translational control and life-cycle regulation remain poorly understood in *T. cruzi*. The data obtained so far indicate the existence of several types of granules formed as a result of different stimuli, whose assembly is dependent on mRNAs. Furthermore, although they can share several proteins, there are distinct structures that interact with each other dynamically. The mechanism that distinguishes mRNAs destined for storage or degradation in *T. cruzi* seems to depend on the combination of different protein components associated with the mRNAs, according to their expression levels during the life cycle, corroborating the complexity of the process of regulation of gene expression in this parasite.

## RNA-BINDING PROTEINS IN TRYPANOSOMA CRUZI

### RBPs With RRM Domains in *T. cruzi*

The RNA-recognition motif (RRM) is the most common and versatile domain found in RBPs as it can bind different molecules, such as single- and double- stranded RNA and DNA and interact with proteins. Due to its plasticity, RBPs that contain this domain are key players in RNA metabolism, acting from mRNA splicing to mRNA turnover (Cléry et al., 2008; Cléry and Frédéric, 2012). A summary of the RBPs studied in *T. cruzi* are described in **Table 1**.

In *T. cruzi*, most of the RBPs characterized to date present RRM domains and are involved in RNA metabolism by controlling the transcripts stability and turnover. One well-characterized RBP is TcUBP1, which presents a single RRM domain and form both stabilizing or destabilizing interactions

**TABLE 1** | List of RBPs characterized in *T. cruzi*.

RBP name	RBP domain	Stage expression				Regulated throughout life cycle	Localization	References
		A	E	M	T			
TcAlba 30	ALBA	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Pérez-Díaz et al., 2017
EF-1 $\alpha$	Non canonical	•	•	•	•	Yes	Cytoplasmatic	Alves et al., 2015
TcPIWI-tryp	PIWI/OB-fold	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Garcia Silva et al., 2010; Garcia-Silva et al., 2014
TcPUF1	PUF	–	•	–	–	Not reported	Cytoplasmatic	Caro et al., 2006
TcPUF6	PUF	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Dallagiovanna et al., 2005, 2008
PABP1	RRM	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Batista et al., 1994
TcDRBD2	RRM	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Wippel et al., 2019
TcDRBD4/PTB2	RRM	Nr	•	Nr	Nr	Not reported	Cytoplasmatic /Nuclear	Jäger et al., 2007; De Gaudenzi et al., 2016
TcNrBD1	RRM	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Oliveira et al., 2016
TcRBP3	RRM	–	•	–	–	Yes	Cytoplasmatic	De Gaudenzi et al., 2003
TcRBP4	RRM	–	•	–	–	Yes	Cytoplasmatic	De Gaudenzi et al., 2003
TcRBP5	RRM	•	•	•	•	Yes	Cytoplasmatic	De Gaudenzi et al., 2003
TcRBP6	RRM	•	•	•	•	Not reported	Cytoplasmatic	De Gaudenzi et al., 2003
TcRBP9	RRM	Nr	•	–	Nr	Yes	Cytoplasmatic	Wippel et al., 2018a
TcRBP19	RRM	•	–	–	–	Yes	Cytoplasmatic	Pérez-Díaz et al., 2007, 2012, 2013
TcRBP40	RRM	•	•	–	•	Yes	Cytoplasmatic *	Guerra-Slompo et al., 2012
TcRBP42	RRM	•	•	•	•	Not reported	Cytoplasmatic	Tyler Weisbarth et al., 2018
TcRBSR1	RRM	•	•	–	•	Yes	Cytoplasmatic /Nuclear	Wippel et al., 2018b
TcTRRM1/TcSR62	RRM/ZF(C2HC)	Nr	•	Nr	Nr	Not reported	Nuclear	Názer et al., 2011; Wippel et al., 2018b
TcUBP1	RRM	•	•	•	•	Yes	Cytoplasmatic	D'Orso and Frasch, 2002
TcUBP2	RRM	•	•	–	–	Yes	Cytoplasmatic	D'Orso and Frasch, 2002
TcZC3H29	ZF(C3H)	–	•	–	–	Yes	Cytoplasmatic	This work
TcZC3H31	ZF(C3H)	•	•	•	•	Yes	Cytoplasmatic	Alcantara et al., 2018
TcZC3H39	ZF(C3H)	•	•	•	•	No	Cytoplasmatic	Alves et al., 2014
TcZC3HHTTP	ZF(C3H)	–	•	–	–	Yes	Cytoplasmatic	This work
TcZFP1	ZF(C3H)	•	•	•	•	Yes	Not reported	Mörking et al., 2004
TcZFP2	ZF(C3H)	•	•	•	•	Yes	Cytoplasmatic	Mörking et al., 2012
TcZFP8	ZF(C3H)	•	•	•	•	No	Nuclear	Ericsson et al., 2006

\*TcRBP40 localizes in reservosomes in epimastigotes forms.

Nr, Not reported.

Other RBPs investigated in *T. cruzi* but without further characterization are TcPUF3, TcPUF5, TcPUF8 (Caro et al., 2006) and TcRBP10 (Wippel et al., 2018a).

depending on its partners in the mRNP complex (D'Orso and Frasch, 2002; Volpon et al., 2005; Li et al., 2012; Sabalette et al., 2019). The protein recognizes the AU-rich elements located at the 3'-untranslated region (UTR) of mucin *SMUGL* mRNAs (D'Orso and Frasch, 2002; Li et al., 2012). In addition, it has been recently shown that overexpression of TcUBP1 in epimastigotes increases by 10-fold the amount of transcripts coding for surface proteins and that they were being actively translated (Sabalette et al., 2019). The ectopic expression of TcUBP1 in trypomastigotes increased the infectivity rates, demonstrating the important role of this protein for the parasite virulence (Sabalette et al., 2019). TcUBP2 is another RRM-containing protein and is part of the TcUBP1 complex. It acts by binding to the poly(U) region of the *SMUGL* mucin mRNA that acts to control the expression of this transcript (D'Orso and Frasch, 2002).

TcDRBD4/PTB2 is an RBP presenting two RRM domains that play a role in the destabilization of the *ubp1* and *ubp2* mRNAs. It regulates splicing and prevents trans-splicing by binding in the regulatory elements present in the intercistronic region (ICR) of the *ubp1* and *ubp2* genes. These results indicate that TcDRBD4/PTB2 might act by covering the trans-splicing/polyadenylation signals (De Gaudenzi et al., 2016).

TcRBP19 presents a single RRM domain, whose ectopic overexpression impairs the parasite's life cycle and infection ability. This RBP led to a reduction in the number of infected cells (Pérez-Díaz et al., 2012). TcRBP19 presents a low level of expression in the epimastigote forms of the parasite. It was shown that this protein binds to the 3'-UTR region of its own transcript, decreasing its stability and suggesting its role as a destabilizing factor (Pérez-Díaz et al., 2013).

TcRBP40 also presents a single RRM domain. It binds to AG-rich regions in the 3'-UTR of target mRNAs coding for transmembrane proteins. In addition, the TcRBP40 protein is localized in reservosomes in the replicative epimastigote form; this organelle is associated with protein and lipid storage. In the mammalian-host forms of the parasite, amastigotes and trypomastigotes, it is diffused in the cytoplasm. This suggests a regulatory function for this protein due to its shift in cellular localization according to the developmental stage of the parasite (Guerra-Slompo et al., 2012).

TcRBP9 is a cytoplasmic protein that presents one RRM domain. The protein is associated with translational complexes, suggesting its involvement in translation regulation. RBP9 associates with other RBPs involved in RNA metabolism, such as ZC3H39, UBP1/2, NRBD1, and ALBA3/4. When parasites under stress were analyzed, irrespective of RBPs, the translation initiation factors eIF4E5, eIF4G5, eIF4G1, and eIF4G4 were also identified. In addition, the RBP9-mRNP complex regulates transcripts coding other RBPs, such as RBP5, RBP6, and RBP10 and proteins involved in metabolic processes. These results indicate that RBP9 is part of a cytoplasmic mRNP complex involved in mRNA metabolism and translation regulation (Wippel et al., 2018a).

TcNRBD1 is an RBP that contains two RRM domains and is expressed throughout the life cycle of *T. cruzi*. This protein is orthologous to the P34 and P37 proteins from *T. brucei*, although the role they play in these organisms is distinct. TcNRBD1 is localized at the perinuclear region and associates with either 80S ribosomes or polysomes, indicating its role in the translation process. This observation was corroborated by ribonomic analysis that showed several transcripts encoding ribosomal proteins associated with TcNRBD1. Proteomic analysis also indicated that TcNRBD1 associates with several ribosomal proteins from both the 40S and 60S subunits, reinforcing its role in the translation process (Oliveira et al., 2016).

TcRBSR1 is a predominantly nuclear RBP that contains one RRM domain and a serine-arginine (SR)-rich region; this protein seems to be developmentally regulated since no expression is detected in the infective metacyclic trypomastigote forms. Proteomic data showed that TcRBSR1 interacts with other RBPs, such as TcUBP1, TcUBP2, and TcTRRM1. An immunoprecipitation assay followed by RNA-seq indicated that RBSR1-mRNP binds to snoRNAs and snRNAs, leading to a hypothesis regarding its role in RNA processing in the nucleus (Wippel et al., 2018b).

TcRBP42 is a cytoplasmic RBP that presents one RRM domain and one NTF2-like domain. The NTF2 domain is associated with nuclear-cytoplasmic transport (Aibara et al., 2015). RBP42 is expressed in all developmental forms of *T. cruzi*, suggesting a role in gene expression regulation throughout the life cycle of the parasite. It was shown that overexpression of the protein did not lead to any alteration in the capacity of *T. cruzi* to differentiate into the metacyclic trypomastigote form or in cell infection capacity, as previously described for its ortholog in *T. brucei* (Tyler Weisbarth et al., 2018).

## RBPs With the CCCH Zinc Finger Domain in *T. cruzi*

Zinc finger proteins (ZFP) were originally identified as DNA binding proteins with a molecular arrangement of two cysteine and two histidine residues that coordinate a zinc ion. However, it was later demonstrated that a class of zinc finger proteins characterized by the presence of the domain Cys-Cys-Cys-His (CCCH)- binds to RNA molecules (Hall, 2005).

In *T. cruzi*, the ZFP protein TcZFP1 presents a C(2)H(2) domain and specifically binds cytosine-rich repetitive sequences *in vitro* present in untranslated regions of many mRNAs in trypanosomatids (Mörking et al., 2004). TcZFP2 is also a C(2)H(2) ZFP that binds transcripts associated with parasite-host interactions. It was shown that the mRNAs bound to this protein are downregulated in the replicative forms, indicating that the TcZFP2 protein might act as a destabilizing factor (Mörking et al., 2012). In addition, TcZFP1 and TcZFP2 interact with each other via WW domain in TcZFP2A (Caro et al., 2005). TcZFP8 is a zinc finger protein that presents a nuclear localization that might act in RNA metabolism in *T. cruzi* nucleus (Ericsson et al., 2006).

The ZFP protein TcZC3H39 presents a CCCH domain and a U-box domain. The U-box domain is involved in substrate specificity for ubiquitination (Christensen and Klevit, 2009). TcZC3H39 is associated with the stress response in *T. cruzi*: it binds to highly expressed mRNAs that code for cytochrome c oxidase (COX) enzymes and ribosomal proteins, slowing their translation under stress conditions. Interestingly, TcZC3H39 associates with transcripts that are related in function, hence providing support to the RNA regulon theory (Alves et al., 2014).

TcZC3H31 is a cytoplasmic CCCH ZFP expressed in epimastigotes and metacyclic trypomastigotes. Deletion of *zc3h31* led to the impairment of epimastigote differentiation into the metacyclic trypomastigote form. In addition, when insects were infected with *zc3h31* KO cells, the parasites presented an altered morphology relative to wild-type cells, indicating a delay in differentiation. Moreover, in cells overexpressing TcZC3H31, the differentiation rate from epimastigotes into metacyclic trypomastigotes was more efficient than that in wild-type epimastigotes. These results indicate that this ZFP is an important cell cycle regulator in *T. cruzi* (Alcantara et al., 2018).

## Other RBP Domains in *T. cruzi*

The PUF (Pumilio/Fem-3 mRNA binding factor) protein family of RBPs is very common in higher eukaryotes; these proteins recognize cis-elements in the 3'-UTR of the mRNAs, regulating their stability and function. In *T. cruzi*, there are eight putative PUF proteins annotated in the genome (Caro et al., 2006); the protein TcPUF6 was characterized in epimastigotes and demonstrated to be involved in the destabilization of specific mRNAs that are upregulated in the infective trypomastigote forms of the parasite (Dallagiovanna et al., 2008).

TcSR62 belongs to the family of serine/arginine (SR)-rich proteins; it is a cytoplasmic RBP implicated in the stress response in *T. cruzi* upon actinomycin D (ActD) treatment. TcSR62 relocates to the nucleolus when transcription is inhibited

in epimastigotes along with other RBPs, specifically PTB (polypyrimidine tract-binding protein) and PABP1 (poly A binding protein 1). Interestingly, the same pattern of nucleolar localization was observed with poly(A+) mRNAs after ActD treatment. Altogether, these results suggest that the nucleolus could play a role in accumulating and protecting mRNAs and associated RBPs when cells are subjected to a specific stress condition (Názer et al., 2011).

The canonical RNAi pathway is not functional in *T. cruzi*; however, a canonical Argonaute (AGO/PIWI), named TcPIWI-tryp, is present and expressed throughout the life cycle of the parasite (Garcia Silva et al., 2010). Sequencing of TcPIWI-tryp-associated RNAs showed enrichment for small RNAs, mainly derived from rRNAs and tRNAs. The composition of small RNAs in the *T. cruzi* TcPIWI/AGO protein is distinct from those identified in other eukaryotes, suggesting that in this parasite, the protein might present distinct biological functions (Garcia-Silva et al., 2014).

Members of the Alba (acetylation lowers binding affinity) protein family bind DNA and interact with distinct RNA molecules and form mRNP complexes. TcAlba30 is an Alba protein in *T. cruzi* that is expressed in all stages of the parasite life cycle. Ribonomic analysis showed that TcAlba30 can interact with  $\beta$ -amastin mRNA. When the protein was overexpressed, the levels of  $\beta$ -amastin decreased by 50%, indicating a role in the negative control of  $\beta$ -amastin expression (Pérez-Díaz et al., 2017).

There is much evidence showing that proteins without canonical RNA-binding domains (RBDs) can interact with RNA molecules; these are known as moonlighting proteins, and they have been extensively studied (Collingridge et al., 2010; Huberts et al., 2010; Lindner et al., 2013; Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Gil-Bona et al., 2015). One example of an RNA binding protein lacking RBD in *T. cruzi* is elongation factor 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), which plays a canonical role in translation. This protein responds to stress conditions by binding a specific subset of mRNAs. The associated mRNAs showed enrichment of gene sets involved in single-organism metabolic processes, amino acid metabolic processes, ATP and metal ion binding and glycolysis. EF-1 $\alpha$  co-sedimented with heavy complexes that were not associated with the translation machinery, reinforcing the “moonlighting” role of this protein during stress conditions (Alves et al., 2015).

## KNOCKOUT OF RBP GENES

Despite all the advances regarding the function of RBPs in trypanosomes, the roles of many of these proteins in the parasite's gene regulatory network remain unknown. To address this issue, in addition to the already mentioned high-throughput techniques, other resourceful methodologies are being used to study RBPs. They consist essentially of genetic reverse approaches, such as overexpression and/or gene knockdown/knockout. Indeed, our current knowledge about the roles of individual RBPs came mostly from studies that modulated their endogenous levels by increasing and/or

decreasing/abolishing their expression and investigating the impact on the vital processes of the parasites, such as proliferation, differentiation, and infection, among others.

In *T. brucei*, studies involving RBP gene silencing (knockdown) by the interference RNA (RNAi) machinery provided a major contribution to the field and allowed the investigation of many RBP functions (Estévez, 2008; Archer et al., 2009; Ling et al., 2011; Subota et al., 2011; Das et al., 2012; Wurst et al., 2012; Droll et al., 2013; Levy et al., 2015). In *T. cruzi*, however, since the RNAi machinery is not functional, to understand the impact of the absence of a specific RBP, researchers had to attempt gene knockout by incorporating a DNA cassette containing a selective drug marker into a target gene by homologous recombination. However, due to the limitations of this methodology, only one group reported success in knocking out RBPs with this approach (Alcantara et al., 2018). Accordingly, this approach is not feasible in cases where the target gene is essential, which seems to be the case for many RBPs, as reported in *T. brucei* through gene silencing assays (Das et al., 2012; Wurst et al., 2012; Droll et al., 2013; Fernández-Moya et al., 2014; Jha et al., 2015; Levy et al., 2015).

Therefore, in order to further advance comprehension of this important set of regulatory proteins in *T. cruzi*, new and more efficient genetic editing technologies are required. Fortunately, the CRISPR/Cas9 DNA editing system has recently emerged as a resourceful and promising tool for reverse genetics approaches and has already been adapted for several organisms, including those that are considered challenging to manipulate genetically, as is the case with *T. cruzi* (Lander et al., 2015, 2016; Peng et al., 2015; Soares Medeiros et al., 2017; Costa et al., 2018b; Romagnoli et al., 2018). Recently, we proposed some modifications to previous CRISPR/Cas9 (Lander et al., 2015; Peng et al., 2015) methods for knockout generation in *T. cruzi* (Romagnoli et al., 2018). Our goal was to establish a protocol with maximum disruption efficiency and a way to investigate/confirm related phenotypes as quickly as possible, which is crucial considering that disruption of important regulatory elements is likely to be essential to the parasite. Briefly, our current strategy consists of generating a highly enriched and stable population expressing Cas9-GFP and then transfecting this population with desired *in vitro*-produced guide RNAs (gRNAs) to target RBP genes along with a repair single-stranded DNA template containing a unique restriction site and a sequence that encodes the stop codons in three different frames. Our initial strategy did not use a DNA donor for direct double-strand break repair (Romagnoli et al., 2018). However, based on other reports that highlighted an increase in gene disruption efficiency and specificity in the presence of a single-strand DNA donor (Lander et al., 2015; Zhang et al., 2017; Burle-Caldas et al., 2018), we incorporated the use of a DNA template into our strategy as well.

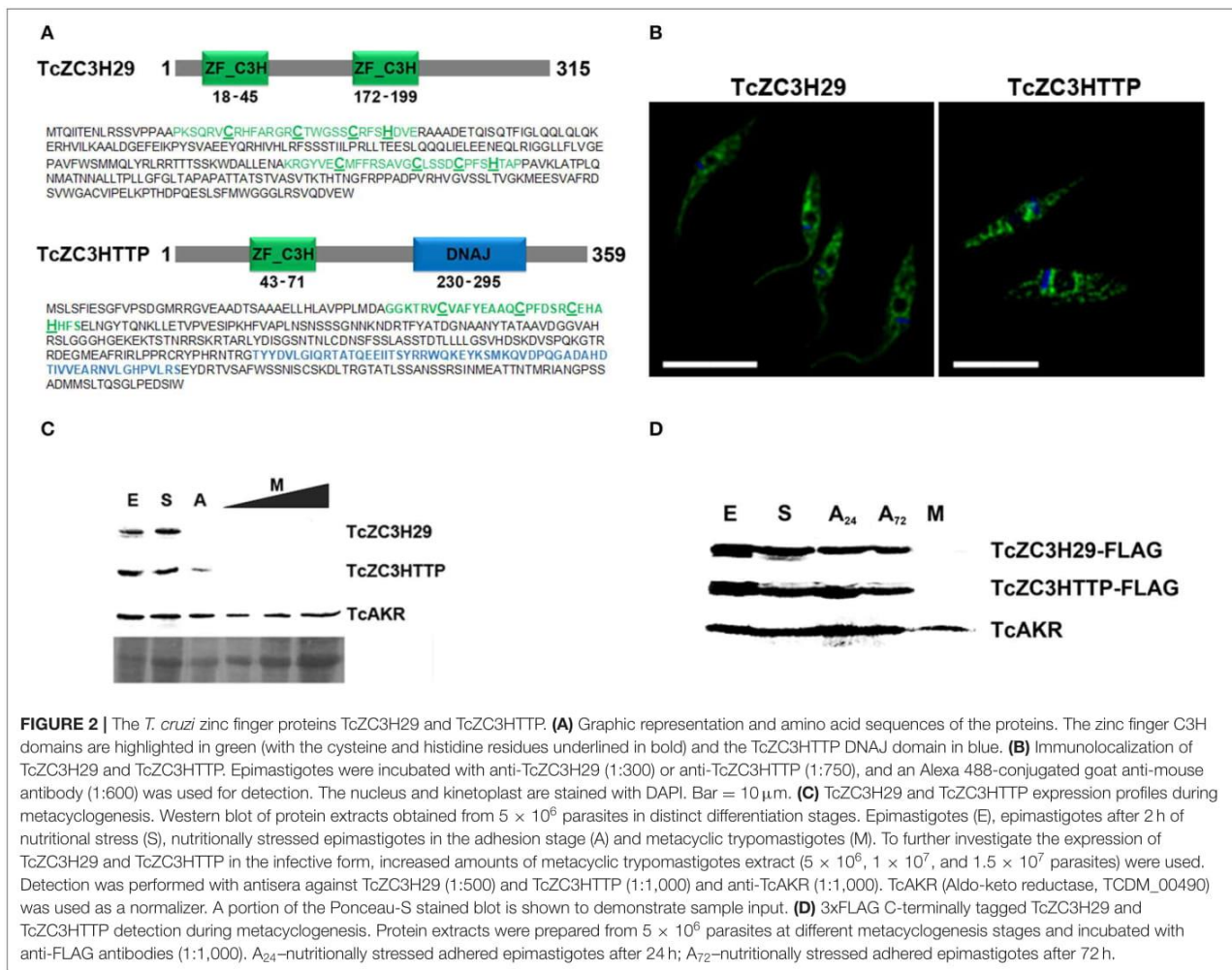
To date, a few reports with slightly different application strategies have used the CRISPR/Cas9 system to manage gene disruption in *T. cruzi*, but as yet, none have reported its use to knock out and study RBP genes. The knockout of RBP genes in *T. cruzi* should provide new clues about the role of RBPs in gene expression regulation of the parasite. We will show and

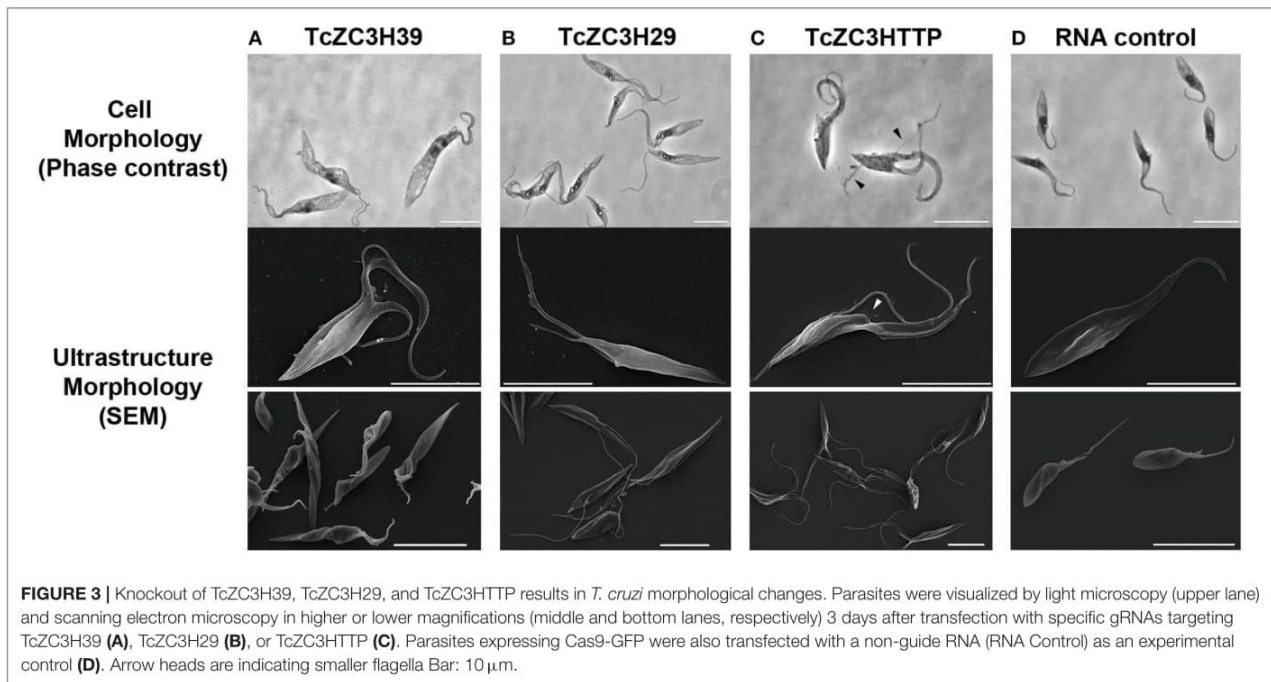
discuss below a CRISPR/Cas9 approach to perform the knockout of RBPs in *T. cruzi*, using as examples some of the RBPs that we are investigating.

In addition to the already mentioned TcZC3H39, we also present data from the knockout assays of two other RBPs, TcZC3H29 (TCDM\_11529), and TcZC3HTTP (TCDM\_03704). These two zinc finger proteins are unique to Kinetoplastida and contain C3H domains (Kramer et al., 2010). While TcZC3H29 has two C3H domains (C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>5</sub>-CX<sub>3</sub>-H and C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>3</sub>-H), TcZC3HTTP has one C3H domain (C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H), and a DNAJ domain (Figure 2A). Proteins TcZC3H29 and TcZC3HTTP present cytoplasmatic localization with a granular pattern (Figure 2B), similar to that reported for TcZC3H39 (Alves et al., 2014). Our interest in these two particular RBPs was dictated by the fact that they are exclusively expressed in the non-infective epimastigote form (data not shown). Accordingly, they are downregulated in the course of differentiation into infective metacyclic trypomastigotes (Figure 2C). Interestingly, even ectopically overexpressed Flag-tagged TcZC3H29 and TcZC3HTTP were not detected in metacyclic trypomastigotes

(Figure 2D), thus indicating the existence of tight regulatory control acting at stage-specific expression levels and pointing their crucial role in *T. cruzi* development.

Initial attempts to use the CRISPR/Cas system involved knocking out *T. cruzi* GP72, and the cells presented the typical flagellum detachment phenotype (Lander et al., 2015; Romagnoli et al., 2018). Next, we attempted to knock out TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP by performing electroporation with specific guide RNAs to target their respective genes (Supplementary Table 1). After transfection, major morphological changes were observed in the cultures (Figures 3A–C). For TcZC3H39 and TcZC3H29, cells presented a larger size, an extension of the posterior region and more than one flagellum per cell (Figures 3A–B, respectively). The cultures targeted with TcZC3H29 gene disruption presented additional flagella that were thinner and longer than those found in control parasites or when targeting TcZC3H39 or TcZC3HTTP (Figure 3 comparing B–D, A, and C, respectively). The targeting of TcZC3HTTP resulted in larger cells, but they did not have the body extension that was observed for the two other zinc





**FIGURE 3** | Knockout of TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP results in *T. cruzi* morphological changes. Parasites were visualized by light microscopy (upper lane) and scanning electron microscopy in higher or lower magnifications (middle and bottom lanes, respectively) 3 days after transfection with specific gRNAs targeting TcZC3H39 (A), TcZC3H29 (B), or TcZC3HHTTP (C). Parasites expressing Cas9-GFP were also transfected with a non-guide RNA (RNA Control) as an experimental control (D). Arrow heads are indicating smaller flagella Bar: 10  $\mu$ m.

finger RBP knockouts (Figure 3C). In addition, the cell division process of the transfected parasites seemed to be affected, as two fully formed flagella and duplication of the anterior region were frequently observed (Figure 3C). Surprisingly, parasites in final stages of cell division (just before cytokinesis, when cells are connected by their posterior end with one flagellum in each anterior end (Alcantara et al., 2017) were observed with another new flagellum already in each anterior end (Supplementary Figure 1), thus reinforcing the idea that these cells somehow lost at least part of their cell cycle coordination.

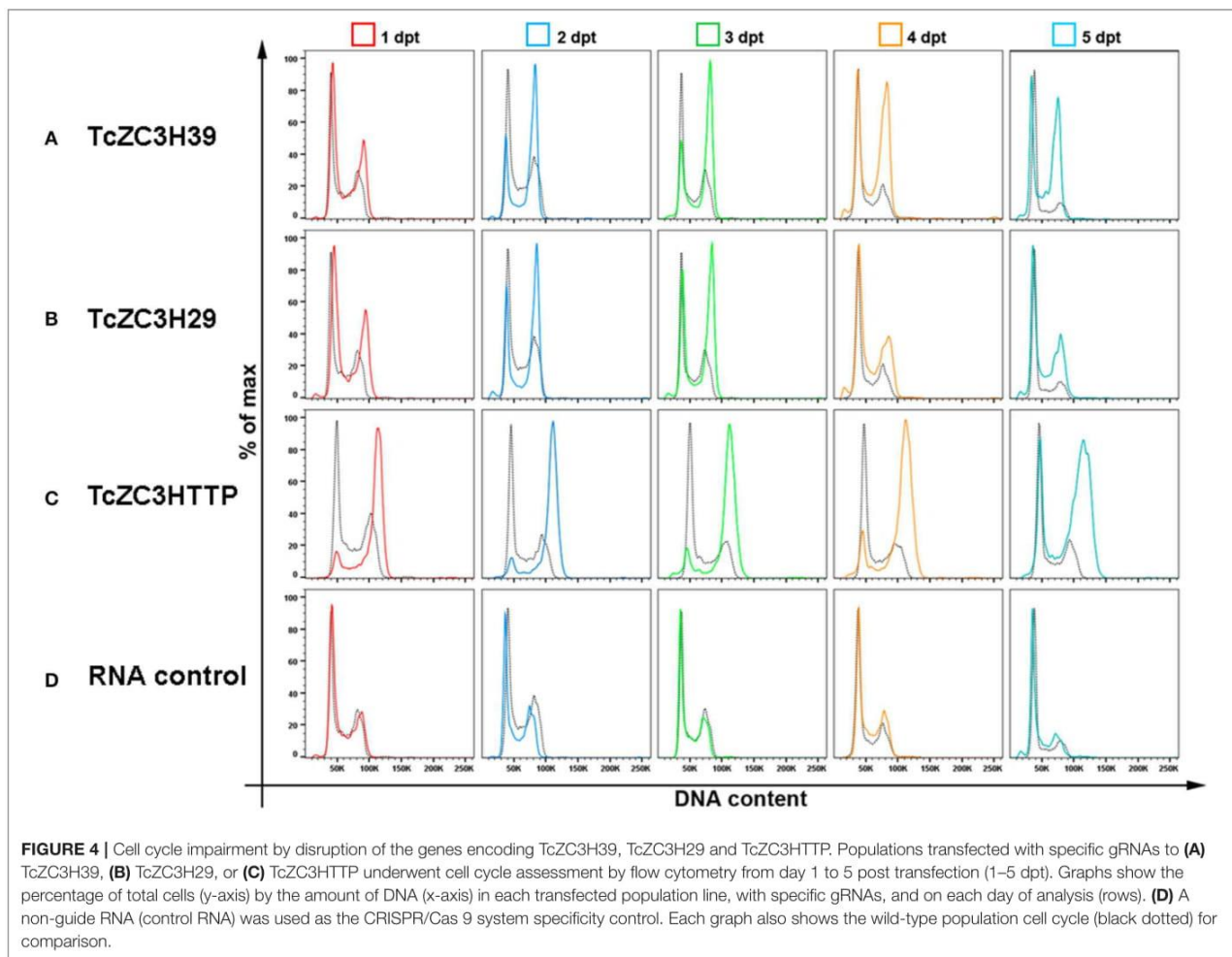
To further investigate the impact of targeting these zinc finger proteins on cell cycle, we analyzed the DNA content of transfected cells by flow cytometry from day 1 to 5 after gRNA transfection. In general, cell cycle kinetic analysis revealed an increase in the number of parasites at the G2/M phase when targeting TcZC3H39, TcZC3H29, or TcZC3HHTTP (Figures 4A–C, respectively). The TcZC3H29 gene disruption attempt provoked a significant accumulation of parasites with double DNA content in the first 3 days of the analysis (Figure 4A), whereas TcZC3H39 and TcZC3HHTTP presented this phenomenon throughout the entire kinetic analysis (Figures 4B–C). Interestingly, TcZC3HHTTP targeting resulted in a significant number of parasites with DNA content slightly above the value considered to be double (Figure 4C). The meaning of this observation remains to be elucidated. Nevertheless, cell cycle analysis indicates that the attempt to knock out any of these zinc finger proteins impaired cell cycle progression, likely due to the inability of the cells to complete the division process, thus raising the possibility that TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP are essential genes in *T. cruzi*.

Accordingly, all the attempts to clone (or even enrich) and culture the morphologically affected parasites have been unsuccessful (data not shown).

It is important to mention that TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP gene disruption was performed at least three times using different designed gRNAs, and the observed effects were reproduced in all attempts with all guide RNAs (Supplementary Figure 2). In addition, the phenotypes observed for the zinc finger targets were not observed in the control Cas9-GFP expressing population, wild-type cells or even the Cas9-GFP population parasites transfected with a control RNA (Supplementary Figure 3). Additionally, these experiments were performed in parallel with the knockout of other known proteins, such as GP72 and  $\alpha$ -tubulin, which presented previously described morphological phenotypes [data published elsewhere (Lander et al., 2015; Romagnoli et al., 2018)].

The changes observed in the TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP knockout populations are specific and likely due to the absence of these proteins in *T. cruzi*. Western blot analysis to assess the expression of TcZC3H29 and TcZC3HHTTP in the transfected populations showed the absence of the proteins only in the cultures electroporated with gRNAs targeting their encoding gene (Supplementary Figure 4). However, as yet we were not able to detect gene editing at the DNA level (data not shown).

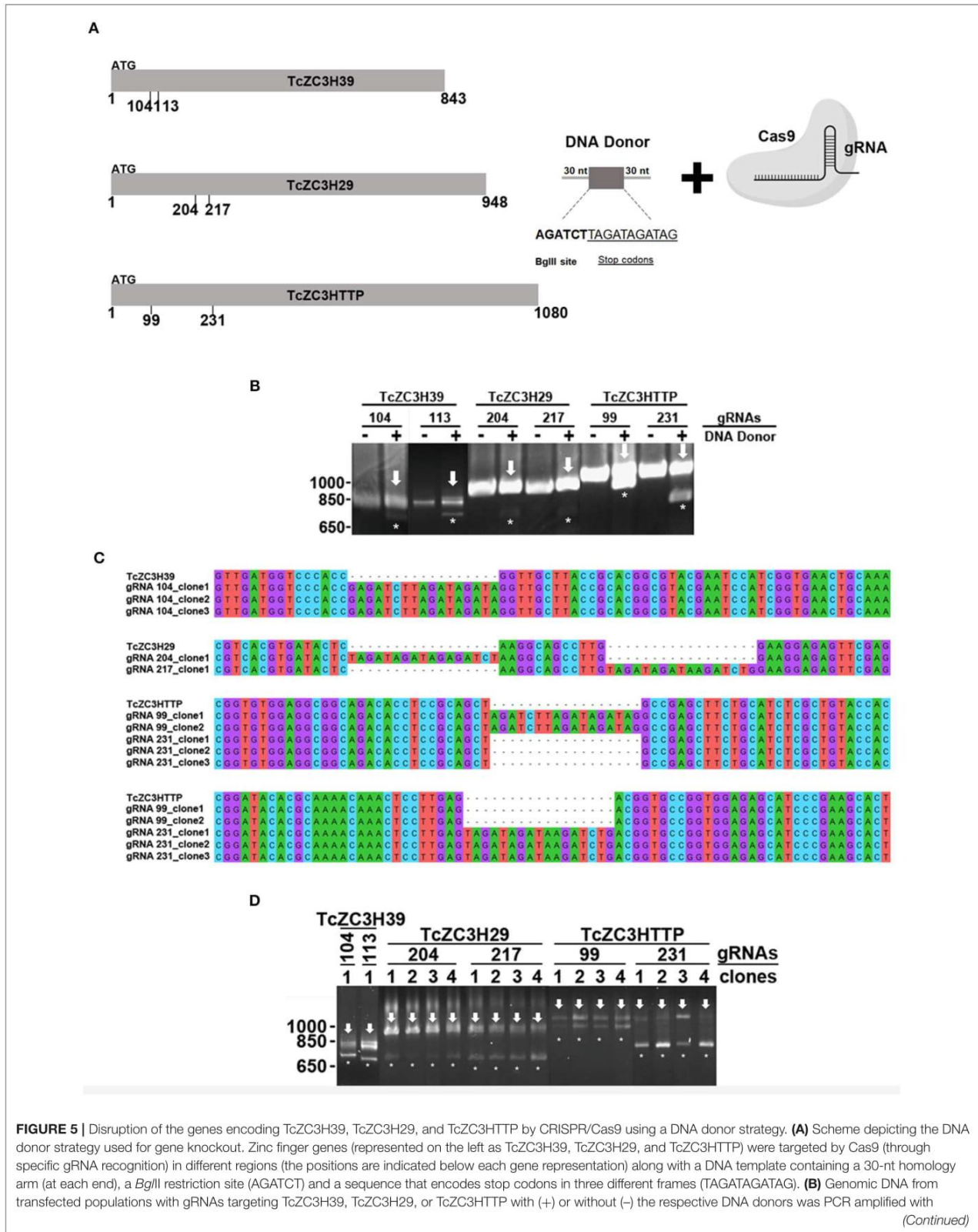
This concern led us to adapt the experimental approach in order to improve the gene disruption identification capability. Hence, for TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP knockouts, in addition to the respective designed guide RNAs to specifically target the genes, a DNA template was designed and included into the transfection process to direct specific gene repair.



This DNA template strategy was designed based on previous reports (Zhang and Matlashewski, 2015; Zhang et al., 2017; Burle-Caldas et al., 2018) and consists of a 77-nt single strand oligo DNA donor containing homology arms (30 nt at each end), a restriction site for *Bgl*II, and a sequence that encodes three stop codons in three different frames (Figure 5A). After transfecting the gRNAs along with their corresponding DNA donors (the TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP genes), repair/disruption was confirmed by polymerase chain reaction directly from liquid culture (Alcantara et al., 2014). The amplified target gene products were digested with the *Bgl*II enzyme (Figure 5B). As shown, only the cultures co-transfected with the gRNAs and the related single-stranded DNA oligos successfully incorporated the *Bgl*II restriction site at the target gene although the DNA donor incorporation occurred with distinct efficiencies (Supplementary Figure 5). Furthermore, the amplified target genes were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced for correct repair visualization (Figure 5C). However, some of the PCR product remained undigested (Figure 5B, arrows), indicating that in the transfected

cultures there were parasites that did not have the target RBP gene disrupted/repared, or the editing may have occurred in one allele only. To test the hemi-knockout hypothesis, single-cell sorting was performed to individualize the transfected parasites. After growth, clones from all sorted cultures were tested again by PCR and *Bgl*II digestion. In all sorted populations, clones were observed that did not exhibit incorporation of the *Bgl*II restriction site (data not shown), thus pointing to the fact that gene disruption did not achieve 100% efficiency.

In order to further explore the hemi-knockout hypothesis, the clones that presented the *Bgl*II restriction site but also showed undigested product (meaning that they were not null mutants) were single cell cloned once more and further analyzed by PCR following a *Bgl*II digestion. All clones tested were partially digested with *Bgl*II (data not shown), indicating that they were in fact hemi-knockouts. Thus, at least two hemi-knockout clones for each ZFP target gene were submitted to a new transfection round with the corresponding gRNA and DNA donor previously used. This approach allowed to confirm the knockout of TcZC3HTTP gene by detecting the DNA donor insertion and complete PCR



**FIGURE 5 |** Disruption of the genes encoding TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP by CRISPR/Cas9 using a DNA donor strategy. **(A)** Scheme depicting the DNA donor strategy used for gene knockout. Zinc finger genes (represented on the left as TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP) were targeted by Cas9 (through specific gRNA recognition) in different regions (the positions are indicated below each gene representation) along with a DNA template containing a 30-nt homology arm (at each end), a *Bgl*III restriction site (AGATCT) and a sequence that encodes stop codons in three different frames (TAGATAGATAG). **(B)** Genomic DNA from transfected populations with gRNAs targeting TcZC3H39, TcZC3H29, or TcZC3HTTP with (+) or without (-) the respective DNA donors was PCR amplified with

*(Continued)*



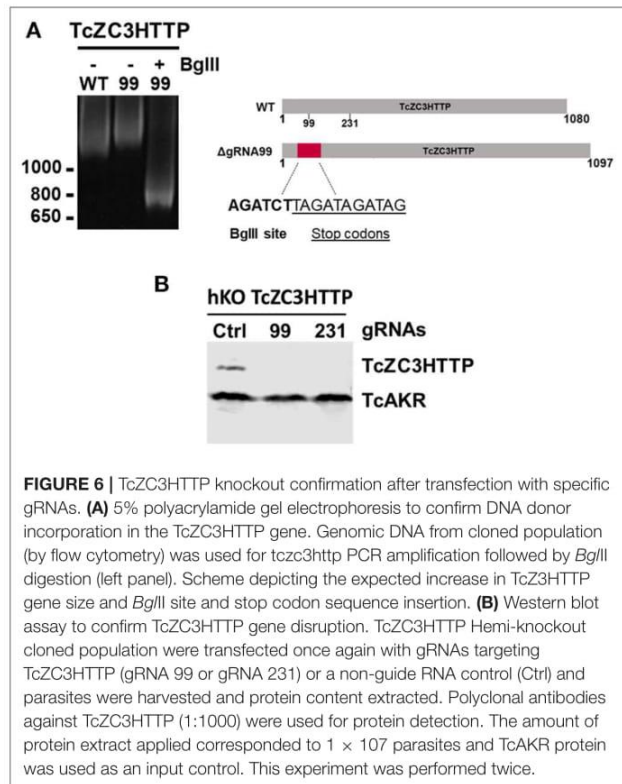
**FIGURE 5** | specific primers for each zinc finger gene and digested with *Bgl*II for gene disruption visualization. Asterisks (\*) highlight *Bgl*II restriction site incorporation by showing the digested products, whereas the remaining undigested amplicon is indicated by an arrow. **(C)** DNA sequencing of the *tczc3h39*, *tczc3h29*, and *tczc3http* genes showing correct insertion of the DNA donor. After transfection, zinc finger targeted genes were amplified from genomic DNA, cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and transformed into the TOP10 chemically competent *Escherichia coli* strain. Then, plasmids were isolated from the positive clones (identified by PCR and *Bgl*II digestion) and sent for sequencing for gene disruption confirmation. **(D)** Confirmation of single cell sorted clones containing the *tczc3h39*, *tczc3h29*, or *tczc3http* disrupted genes. Genomic DNA from the single cell cloned (by flow cytometry) population was used for *tczc3h39*, *tczc3h29*, or *tczc3http* PCR amplification followed by *Bgl*II digestion. At least one clone is representatively shown for each gene according to the specific gRNA used to achieve gene knockout (indicated above).

product *Bgl*II digestion and also loss of TcZC3HHTTP protein expression by Western blot (**Figure 6**). We keep searching for null mutant clones to TcZC3H39 and TcZC3H29 coding genes as we will advance with the TcZC3HHTTP knockout parasites to the next step, that is to further investigate its related phenotype, specially regarding its impact in the context of *T. cruzi* gene expression regulation.

## DISCUSSION

RBPs are considered essential factors in gene expression regulation, especially in trypanosomatids, where posttranscriptional processes are predominant. Indeed, advances in the understanding of RBP functions reinforce their actions as key players in coordinating mRNA metabolism and maintaining cell homeostasis. However, the contributions of several RBPs to the *T. cruzi* regulatory network remain to be determined. From all the RBPs studied in *T. cruzi* presented in this review, until now, only the function of TcZC3H31 has been investigated by a gene knockout approach (Alcantara et al., 2018). This lack of studies regarding RBP knockout in *T. cruzi* is mainly due to the challenge of genetically manipulating this parasite using classical knockout approaches, which are limited in the case of essential genes. In this context, the development and adaptation of the genetic editing tool, CRISPR/Cas9, has emerged as a great alternative to achieve RBP knockout in *T. cruzi*.

As a proof of concept, along with this review we present data from the knockout of three RBPs with C3H zinc finger domains in *T. cruzi* by using the CRISPR/Cas9 technique. TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP knockouts were achieved using two distinct approaches. One consisted of transfecting specific gRNAs for each target gene only into a Cas9-GFP-expressing population. The other approach involved co-transfecting a specific DNA donor template along with the related gRNA. By targeting the *tczc3h39*, *tczc3h29*, or *tczc3http* gene, we were able to see major morphological changes, cell cycle impairment (**Figures 3, 4**, respectively) and viability loss (data not shown). There were characteristic morphological alterations for each culture, and all modifications involved an increase in cell size and in the number and/or shape of the flagellum (**Figure 3**). Burle-Caldas and colleagues reported that disrupting GP72 without a DNA donor sequence to direct repair could lead to abnormal morphology depending on the gRNA used (Burle-Caldas et al., 2018). Although the changes observed in the knockout cultures for TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HHTTP were not seen in the controls (RNA control, gRNA-GFP, Cas9-GFP transfected with PBS), or even with the targeting of other non-RBP genes



**FIGURE 6** | TcZC3HHTTP knockout confirmation after transfection with specific gRNAs. **(A)** 5% polyacrylamide gel electrophoresis to confirm DNA donor incorporation in the TcZC3HHTTP gene. Genomic DNA from cloned population (by flow cytometry) was used for *tczc3http* PCR amplification followed by *Bgl*II digestion (left panel). Scheme depicting the expected increase in TcZ3HHTTP gene size and *Bgl*II site and stop codon sequence insertion. **(B)** Western blot assay to confirm TcZC3HHTTP gene disruption. TcZC3HHTTP Hemi-knockout cloned population were transfected once again with gRNAs targeting TcZC3HHTTP (gRNA 99 or gRNA 231) or a non-guide RNA control (Ctrl) and parasites were harvested and protein content extracted. Polyclonal antibodies against TcZC3HHTTP (1:1000) were used for protein detection. The amount of protein extract applied corresponded to  $1 \times 10^7$  parasites and TcAKR protein was used as an input control. This experiment was performed twice.

[e.g., GP72,  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin (Romagnoli et al., 2018)], this raises a question about the specificity of the phenotypes observed for the zinc finger gene knockouts. However, it is worth mentioning that morphological changes similar to those we observed for TcZC3H39 and TcZC3H29 knockouts were also described when overexpressing TbZFP3 (Paterou et al., 2006) or when knocking down the RBPs ALBA3/4 (Subota et al., 2011), TbRRM1 (Levy et al., 2015), and TbZFP2 (Hendriks et al., 2001) in *T. brucei*. In 2001, Hendriks et al. identified a posterior end elongation phenotype in TbZFP2 knockdown parasites (caused by the polar extension of microtubules) that they termed a “nozzle” (Hendriks et al., 2001). Interestingly, TcZC3H39 and TcZC3H29 knockout parasites displayed a morphological phenotype resembling the “nozzle.” Moreover, the G2/M phase cell cycle arrest observed in the zinc finger RBP knockouts described herein (**Figure 4**) was also described in *T. brucei* when suppressing the genes encoding the RBPs TbPUF9 (Archer et al.,

2009), ALBA3/4 (Subota et al., 2011), TbZC3H11 (Droll et al., 2013), TbRRM1 (Levy et al., 2015), and TbZFP2 (Hendriks et al., 2001) by RNAi. These data corroborate the notion that the cell cycle alterations identified in the knockout populations for TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP are specific and not the result of the non-specific activity of endonuclease Cas9. In addition to all the controls used in our experiment, the phenotypes reported in *T. brucei* came from RNAi studies and, therefore, did not involve DNA editing (double-strand breaks). When the expression levels of the aforementioned *T. brucei* RBPs were suppressed/abolished, there were effects on the cell cycle accompanied by major morphological changes, such as the nozzle phenotype. Hence, there is a strong correlation between cell cycle and cell morphology maintenance with RBPs. It remains to be elucidated whether this is a direct or indirect relation (through their RNA targets). Either way, this is the first evidence showing the nozzle phenotype and relating these morphological changes with cell cycle arrest due to the knockout of zinc finger proteins in *T. cruzi*.

To further support the idea that the observed phenotypes are specific to TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP knockout, the co-transfection of DNA donor along with gRNAs allows detection of the precise insertion of the repair template into the target genes (Figure 5). However, although the previously described phenotypes (without DNA donor transfection) were reproduced, they were significantly less frequent relative to the approach using only gRNAs (Supplementary Figure 6). We found evidence that this was due to the selection of hemi-knockout populations (Figure 5D). How unintentional heterozygote parasites are generated by CRISPR/Cas9 remains to be explained, but it seems to occur preferably when cells are co-transfected with the DNA donor. Curiously, another group working with *T. cruzi* also observed this phenomenon (Soares Medeiros et al., 2017). In their report, Soares Medeiros et al. (2017) attempted to knock out the Galf and calreticulin (CRT) genes by CRISPR/Cas9 but only found clones presenting both WT and mutant alleles. Since those genes are single-copy genes and, for CRT, knockout by conventional approaches was unfruitful, authors associated the heterozygosity to genes that are potentially essential to the parasite (Soares Medeiros et al., 2017). According to this and based on all the evidence gathered from the phenotypes related to the disruption of TcZC3H39, TcZC3H29, and TcZC3HTTP, we believed that the generation of a hemi-knockout population reinforces the idea that these zinc finger genes may be essential for *T. cruzi*.

Performing a new round of transfection in those hemi-knockout populations allowed us to obtain null mutant clones for TcZC3HTTP, thus indicating that this protein is not essential in epimastigotes. However, since TcZC3HTTP is downregulated throughout metacyclogenesis, a lethal phenotype could be observed in this differentiation process. Therefore, it is very important to characterize these clones during this development stage.

The use of the CRISPR/Cas9 technique for RBP knockout will start to open a new era in gene expression regulation studies and advance the uncovering and mapping of regulatory gene networks in *T. cruzi*.

## MATERIALS AND METHODS

### *T. cruzi* Culture, gRNA and DNA Donor Preparation and Transfections

*T. cruzi* Dm28c epimastigotes were cultured at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). The guide RNAs were obtained using the online Eukaryotic Pathogen CRISPR gRNA Design Tool (EuPaGDT) (Peng and Tarleton, 2015) and produced by *in vitro* transcription as previously described (Peng et al., 2015; Romagnoli et al., 2018). DNA donor sequences were designed to have a *Bgl*III restriction site (AGATCT) and a sequence encoding stop codons in three different frames (TAGATAGATAG), all flanked by 30-nt homology arms (according to their specific gRNA target sequence). gRNAs and donor sequences are in Supplementary Table 1. For transfection,  $5 \times 10^6$  early-log phase Cas9-GFP expressing epimastigotes were harvested by centrifugation ( $3,000 \times g$ , 5 min), washed in PBS (pH 7.4) and resuspended in 100  $\mu$ l of human T cell nucleofector solution at room temperature. For target gene disruption, 20  $\mu$ g of a specific gRNA and 20  $\mu$ g of respective donor DNA were added to the solution before electroporating the parasites with one electric pulse using the X-014 program in an Amaxa Nucleofector device. A DNA fragment of human 18S rRNA provided by the MEGAShortscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific) was transcribed and used as a control (RNA control). After transfection, parasites were cultured in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks containing 10 ml of LIT medium supplemented with 10% FBS.

### Immunolocalization and Immunoblot Assays

For immunofluorescence assays, epimastigotes were harvested from culture, washed, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and added to poly-L-lysine-coated slides. Cells were then permeabilized with Triton X-100 in PBS (pH 8.0) for 5 min and blocked with bovine serum albumin (BSA, 1.5%). Parasites were incubated with anti-TcZC3H29 (1:300) or anti-TcZC3HTTP (1:750), and an Alexa 488-conjugated goat anti-mouse antibody (1:600) was used for detection. The nuclei and kinetoplast were stained with DAPI. Images were collected on Leica DMI6000 B (Leica-microsystems) equipment. Captured images were processed by deconvolution with LAS AF–Leica (Leica microsystems) software. Bar = 10  $\mu$ m.

For western blot assays, wild-type and transfected epimastigotes (expressing TcZC3H29-3xFLAG or TcZC3HTTP-3xFLAG) were differentiated into metacyclic trypomastigotes as previously described (Contreras et al., 1985), and protein extract from different stages during differentiation was prepared. Protein extracts were separated by SDS-PAGE (13%) and transferred to a nitrocellulose membrane. After Ponceau S staining and blocking non-specific binding sites with 5% non-fat skim milk in PBST (PBS supplemented with 0.05% of Tween 20) for 1 h at 25°C, membranes were incubated with anti-TcZC3H29 (polyclonal, 1:500), anti-TcZC3HTTP (polyclonal, 1:1000), anti-TcAKR (polyclonal, 1:1000) or anti-FLAG antibodies (monoclonal, 1:1000) for 1 h at 25°C, washed three times with

PBST and incubated with goat anti-mouse IgG secondary antibodies conjugated to the fluorophore IRDye®680LT (LI-COR Biosciences). Fluorescence detection was performed with an Odyssey® scanner (LI-COR Biosciences).

### Morphological Characterization

Panoptic staining and sample preparation and acquisition for scanning electron microscopy were performed as previously described (Romagnoli et al., 2018).

### Flow Cytometry

DNA content determination was performed in a FACSCanto II machine (Becton-Dickinson). A total of  $1 \times 10^6$  parasites were harvested ( $3,000 \times g$ , 5 min) and resuspended in 100  $\mu$ l of PBS and mixed with 100  $\mu$ l propidium iodide (PI) staining solution (3.4 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% NP40, 10  $\mu$ g/ml RNase A, 10 mM NaCl, 30  $\mu$ g/ml propidium iodide). PI was excited by a blue laser (488 nm), and emitted light was collected by 585/42 bandpass. Single cells were gated based on pulse area (PE-A) vs. pulse width (PE-W) of the PE channel. Cellular aggregates and debris were excluded from cell cycle analysis. At least 10,000 events were recorded for each replicate, and data were analyzed using FlowJo V10.1r7 software. For single-cell sorting and cell enrichment, a BD FACSARIA II (Becton-Dickinson) machine was used.

### DNA Amplification, Digestion, and Sequencing

DNA amplification was carried out by PCR with specific primers for TcZC3H39 (TCDM\_00519), TcZC3H29 (TCDM\_11529), and TcZC3HTTP (TCDM\_03704) (Supplementary Table 1) directly from liquid culture as previously described (Alcantara et al., 2014). PCR conditions were as follows: 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 1 min and 15 s. Additionally, for pGEM-T easy (Promega) amplicon cloning, a final step of 72°C for 10 min

was included. PCR products were digested by BglII (New England Biolabs) at 37°C overnight. Amplified DNA and digestion products were visualized in a 3% agarose gel. For sequencing, plasmids containing the disrupted genes (previously confirmed by PCR and digestion) were purified with the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) and sequenced at WEMSeq Biotechnology (wemseq.com). Alignments were made using MEGA version 10.0.5.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR performed the experiments and wrote the manuscript. FH discussed the results and wrote the manuscript. LA collaborated on the discussion of the results and wrote the manuscript. SG collaborated on the discussion of the results and wrote the manuscript. All authors approve the submitted version.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and from Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brazil). SG was a research fellow awardee from CNPq. We thank Wagner Nagib Birbeire for the schematic Figure 1.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00056/full#supplementary-material>

### REFERENCES

- Aibara, S., Valkov, E., Lamers, M., and Stewart, M. (2015). Domain organization within the nuclear export factor Mex67:Mtr2 generates an extended mRNA binding surface. *Nucleic Acids Res.* 43, 1927–1936. doi: 10.1093/nar/gkv030
- Alcantara, C., de, L., Vidal, J. C., de Souza, W., and Cunha-e-Silva, N. L. (2017). The cytosome–cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes disassembles during cell division. *J. Cell Sci.* 130, 164–176. doi: 10.1242/jcs.187419
- Alcantara, M. V., Fragoso, S. P., and Assine Picchi, G. F. (2014). Knockout confirmation for hurries: rapid genotype identification of trypanosoma cruzi transfectants by polymerase chain reaction directly from liquid culture. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 511–513. doi: 10.1590/0074-0276140010
- Alcantara, M. V., Kessler, R. L., Gonçalves, R. E. G., Marlière, N. P., Guarneri, A. A., Picchi, G. F. A., et al. (2018). Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. *Mol. Biochem. Parasitol.* 221, 1–9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2018.01.006
- Alves, L. R., Oliveira, C., and Goldenberg, S. (2015). Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 15:104. doi: 10.1186/s12866-015-0436-2
- Alves, L. R., Oliveira, C., Mörking, P. A., Kessler, R. L., Martins, S. T., Romagnoli, B. A. A., et al. (2014). The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. *RNA Biol.* 11, 921–933. doi: 10.4161/rna.29622
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33, 141–150. doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003
- Archer, S. K., Luu, V. D., De Queiroz, R. A., Brems, S., and Clayton, C. (2009). *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog.* 5:e1000565. doi: 10.1371/journal.ppat.1000565
- Batista, J. A. N., Teixeira, S. M. R., Donelson, J. E., Kirchhoff, L. V., and de, S.á, C. M. (1994). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 301–312. doi: 10.1016/0166-6851(94)00133-2
- Björk, P., and Wieslander, L. (2017). Integration of mRNP formation and export. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2875–2897. doi: 10.1007/s00018-017-2503-3
- Burle-Caldas, G. A., Soares-Simões, M., Lemos-Pechnicki, L., DaRocha, W. D., and Teixeira, S. M. R. (2018). Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *Int. J. Parasitol.* 48, 591–596. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.02.002
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J., and Vázquez, M. P. (2005). Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of

- Trypanosoma cruzi*: implications for their functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1017–1025. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.007
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J., and Vázquez, M. P. (2006). *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Exp. Parasitol.* 113, 112–124. doi: 10.1016/j.exppara.2005.12.015
- Cassola, A., De Gaudenzi, J. G., and Frasch, A. C. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* 65, 655–670. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x
- Castello, A., Horos, R., Strein, C., Fischer, B., Eichelbaum, K., Steinmetz, L. M., et al. (2015). Comprehensive identification of RNA-binding proteins by RNA interactome capture. *Methods Mol. Biol.* 1358, 131–139. doi: 10.1007/978-1-4939-3067-8\_8
- Christensen, D. E., and Kleivit, R. E. (2009). Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination. *FEBS J.* 276, 5381–5389. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07249.x
- Clayton, C. E. (2016). Gene expression in kinetoplasts. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 46–51. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.018
- Cléry, A., Blatter, M., and Allain, F. H. T. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 290–298. doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.002
- Cléry, A., and Frédéric, H.-T. A. (2012). *From Structure to Function of RNA Binding Domains*. Austin, TX: Landes Bioscience, 137–158.
- Collingridge, P. W., Brown, R. W., and Ginger, M. L. (2010). Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology* 137, 1467–1475. doi: 10.1017/S0031182010000259
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985). *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 315–327. doi: 10.1016/0166-6851(85)90073-8
- Costa, F. C., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Calderano, S. G., Lewis, M. D., Olmo, F., et al. (2018b). Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: a parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid *in vivo* localisation and phenotyping. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12:e0006388. doi: 10.1371/journal.pntd.0006388
- Costa, J. F., Ferrarini, M. G., Nardelli, S. C., Goldenberg, S., Ávila, A. R., and Holecz, F. B. (2018a). *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 113:e170531. doi: 10.1590/0074-02760170531
- da Costa Lima, T. D., Moura, D. M. N., Reis, C. R. S., Vasconcelos, J. R. C., Ellis, L., Carrington, M., et al. (2010). Functional characterization of three leishmania poly(A) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryot. Cell* 9, 1484–1494. doi: 10.1128/EC.00148-10
- Dallagiovanna, B., Correa, A., Probst, C. M., Holecz, F., Smircich, P., de Aguiar, A. M., et al. (2008). Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283, 8266–8273. doi: 10.1074/jbc.M703097200
- Dallagiovanna, B., Pérez, L., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., Duhagon, M. A., and Garat, B. (2005). *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein. *Exp. Parasitol.* 109, 260–264. doi: 10.1016/j.exppara.2005.01.003
- Das, A., Morales, R., Bandy, M., Garcia, S., Hao, L., Cross, G. A., et al. (2012). The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism. *RNA* 18, 1968–1983. doi: 10.1261/rna.033829.112
- De Gaudenzi, J. G., D'Orso, I., and Frasch, A. C. C. (2003). RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278, 18884–18894. doi: 10.1074/jbc.M301756200
- De Gaudenzi, J. G., Jäger, A. V., Izcovich, R., and Campo, V. A. (2016). Insights into the regulation of mRNA processing of polycistronic transcripts mediated by DRBD4/PTB2, a trypanosome homolog of the polypyrimidine tract-binding protein. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63, 440–452. doi: 10.1111/jeu.12288
- De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C., and Cassola, A. (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* 51, 31–46. doi: 10.1042/bse0510031
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86, 197–283. doi: 10.1016/S0074-7696(08)60180-1
- Decker, C. J., and Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a012286. doi: 10.1101/cshperspect.a012286
- D'Orso, I., and Frasch, A. C. C. (2002). TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 277, 50520–50528. doi: 10.1074/jbc.M209092200
- Droll, D., Minia, I., Fadda, A., Singh, A., Stewart, M., Queiroz, R., et al. (2013). Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein. *PLoS Pathog.* 9:e1003286. doi: 10.1371/journal.ppat.1003286
- Elias, M. C. Q. B., Marques-Porto, R., Freymüller, E., and Schenkman, S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 79–90. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00349-2
- Erben, E., Chakraborty, C., and Clayton, C. (2013). The CAF1-NOT complex of trypanosomes. *Front. Genet.* 4:299. doi: 10.3389/fgene.2013.00299
- Ericsson, A. O., Faria, L. O., Cruz, W. B., Martins, de Sá C., and Lima, B. D. (2006). TcZFP8, a novel member of the *Trypanosoma cruzi* CCHC zinc finger protein family with nuclear localization. *Genet. Mol. Res.* 5, 553–563.
- Estévez, A. M. (2008). The RNA-binding protein Tb DRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* 36, 4573–4586. doi: 10.1093/nar/gkn406
- Fadda, A., Ryten, M., Droll, D., Rojas, F., Färber, V., Haanstra, J. R., et al. (2014). Transcriptome-wide analysis of trypanosome mRNA decay reveals complex degradation kinetics and suggests a role for co-transcriptional degradation in determining mRNA levels. *Mol. Microbiol.* 94, 307–326. doi: 10.1111/mmi.12764
- Fernández-Moya, S. M., Carrington, M., and Estévez, A. M. (2014). Depletion of the RNA-binding protein RBP33 results in increased expression of silenced RNA polymerase II transcripts in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 9:e107608. doi: 10.1371/journal.pone.0107608
- Freire, E., Sturm, N., Campbell, D., and de Melo Neto, O. (2017). The role of cytoplasmic mRNA Cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. *Pathogens* 6:E55. doi: 10.3390/pathogens6040055
- Fritz, M., Vanselow, J., Sauer, N., Lamer, S., Goos, C., Siegel, T. N., et al. (2015). Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic Acids Res.* 43, 8013–8032. doi: 10.1093/nar/gkv731
- García Silva, M. R., Tosar, J. P., Frugier, M., Pantano, S., Bonilla, B., Esteban, L., et al. (2010). Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene* 466, 26–35. doi: 10.1016/j.gene.2010.06.012
- García-Silva, M. R., Sanguinetti, J., Cabrera-Cabrera, F., Franzén, O., and Cayota, A. (2014). A particular set of small non-coding RNAs is bound to the distinctive argonaute protein of *Trypanosoma cruzi*: insights from RNA-interference deficient organisms. *Gene* 538, 379–384. doi: 10.1016/j.gene.2014.01.023
- Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15, 829–845. doi: 10.1038/nrg3813
- Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C. M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., et al. (2015). Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J. Proteome Res.* 14, 142–153. doi: 10.1021/pr5007944
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582, 1977–1986. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.004
- Goldenberg, S., and Avila, A. R. (2011). Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Adv. Parasitol.* 75, 285–305. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7
- Guerra-Slompo, E. P., Probst, C. M., Pavoni, D. P., Goldenberg, S., Krieger, M. A., and Dallagiovanna, B. (2012). Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 302–307. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.154
- Hall, T. M. T. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 367–373. doi: 10.1016/j.sbi.2005.04.004
- Hendriks, E. F., Robinson, D. R., Hinkins, M., and Matthews, K. R. (2001). A novel CCHC protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J.* 20, 6700–6711. doi: 10.1093/emboj/20.23.6700

- Holetz, F. B., Alves, L. R., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Manque, P., et al. (2010). Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J.* 277, 3415–3426. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07747.x
- Holetz, F. B., Correa, A., Avila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., and Goldenberg, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1062–1067. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.104
- Huberts, D. H., Venselaar, H., Vriend, G., Veenhuis, M., and van der Klei, I. J. (2010). The moonlighting function of pyruvate carboxylase resides in the non-catalytic end of the TIM barrel. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1038–1042. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.03.018
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127. doi: 10.1038/nrm2838
- Jäger, A. V., De Gaudenzi, J. G., Cassola, A., D'Orso, I., and Frasch, A. C. (2007). mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2035–2042. doi: 10.1073/pnas.0611125104
- Jagus, R., Bachvaroff, T. R., Joshi, B., and Place, A. R. (2012). Diversity of eukaryotic translational initiation factor eIF4E in protists. *Comp. Funct. Genomics* 2012:134839. doi: 10.1155/2012/134839
- Jha, B. A., Gazestani, V. H., Yip, C. W., and Salavati, R. (2015). The DRBD13 RNA binding protein is involved in the insect-stage differentiation process of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 589, 1966–1974. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.036
- Kedersha, N., and Anderson, P. (2009). Chapter 4 regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 90, 155–185. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90004-7
- Kramer, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 263–284. doi: 10.1002/wrna.1207
- Kramer, S. (2017). The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathog.* 13:e1006456. doi: 10.1371/journal.ppat.1006456
- Kramer, S., Kimblin, N. C., and Carrington, M. (2010). Genome-wide *in silico* screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics* 11:283. doi: 10.1186/1471-2164-11-283
- Lander, N., Chiurillo, M. A., Storey, M., Anibal, X., Vercesi, E., and Docampo, X. R. (2016). CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of *Trypanosoma cruzi* genes reveals the acidocalcisome localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 291, 25505–25515. doi: 10.1074/jbc.M116.749655
- Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S., and Docampo, R. (2015). CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio* 6:e01012-15. doi: 10.1128/mBio.01012-15
- Lee, Y., and Rio, D. C. (2015). Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 291–293. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316
- Levy, G. V., Bañuelos, C. P., Nittolo, A. G., Ortiz, G. E., Mendiondo, N., Moretti, G., et al. (2015). Depletion of the SR-related protein TbRRM1 leads to cell cycle arrest and apoptosis-like death in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 10:e136070. doi: 10.1371/journal.pone.0136070
- Li, Z. H., De Gaudenzi, J. G., Alvarez, V. E., Mendiondo, N., Wang, H., Kissinger, J. C., et al. (2012). A 43-nucleotide U-rich element in 3'-untranslated region of large number of *Trypanosoma cruzi* transcripts is important for mRNA abundance in intracellular amastigotes. *J. Biol. Chem.* 287, 19058–19069. doi: 10.1074/jbc.M111.338699
- Lindner, S. E., Mikolajczak, S. A., Vaughan, A. M., Moon, W., Joyce, B. R., Sullivan, W. J., et al. (2013). Perturbations of plasmodium Puf2 expression and RNA-seq of Puf2-deficient sporozoites reveal a critical role in maintaining RNA homeostasis and parasite transmissibility. *Cell. Microbiol.* 15, 1266–1283. doi: 10.1111/cmi.12116
- Ling, A. S., Trotter, J. R., and Hendriks, E. F. (2011). A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 286, 20152–20162. doi: 10.1074/jbc.M110.139261
- Milone, J. (2002). Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Nucleic Acids Res.* 30, 4040–4050. doi: 10.1093/nar/gkf521
- Mörking, P. A., Dallagiovanna, B. M., Foti, L., Garat, B., Picchi, G. F., Umaki, A. C., et al. (2004). TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 169–177. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.162
- Mörking, P. A., Rampazzo, R. C., Walrad, P., Probst, C. M., Soares, M. J., Gradia, D. F., et al. (2012). The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 790–799. doi: 10.1590/S0074-02762012000600014
- Müller-McNicoll, M., and Neugebauer, K. M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat. Rev. Genet.* 14, 275–287. doi: 10.1038/nrg3434
- Názer, E., Verdún, R. E., and Sánchez, D. O. (2011). Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 6:e19920. doi: 10.1371/journal.pone.0019920
- Oliveira, C., Carvalho, P. C., Alves, L. R., and Goldenberg, S. (2016). The role of the *Trypanosoma cruzi* TcNRBD1 protein in translation. *PLoS ONE* 11:e164650. doi: 10.1371/journal.pone.0164650
- Palenchar, J. B., and Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 135–141. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.12.008
- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 121–127. doi: 10.1038/nsmb724
- Paterou, A., Walrad, P., Craddy, P., Fenn, K., and Matthews, K. (2006). Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development. *J. Biol. Chem.* 281, 39002–39013. doi: 10.1074/jbc.M604280200
- Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Manning, T. A., and Tarleton, R. L. (2015). CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio* 6:e02097-14. doi: 10.1128/mBio.02097-14
- Peng, D., and Tarleton, R. (2015). EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microb. Genomics* 1:e000033. doi: 10.1099/mgen.0.000033
- Pérez-Díaz, L., Correa, A., Moretão, M. P., Goldenberg, S., Dallagiovanna, B., and Garat, B. (2012). The overexpression of the trypanosomatid-exclusive TcRBP19 RNA-binding protein affects cellular infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 1076–1079. doi: 10.1590/S0074-02762012000800021
- Pérez-Díaz, L., Duhagon, M. A., Smirich, P., Sotelo-Silveira, J., Robello, C., Krieger, M. A., et al. (2007). *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of an RNA binding protein differentially expressed in the parasite life cycle. *Exp. Parasitol.* 117, 99–105. doi: 10.1016/j.exppara.2007.03.010
- Pérez-Díaz, L., Pastro, L., Smirich, P., Dallagiovanna, B., and Garat, B. (2013). Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 295–299. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.096
- Pérez-Díaz, L., Silva, T. C., and Teixeira, S. M. R. (2017). Involvement of an RNA binding protein containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 211, 1–8. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.12.005
- Perry, K. L., Watkins, K. P., and Agabian, N. (1987). Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8190–8194. doi: 10.1073/pnas.84.23.8190
- Preußner, C., Jaé, N., and Bindereif, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *Int. J. Med. Microbiol.* 30, 221–224. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.07.004
- Re, A., Joshi, T., Kulberkyte, E., Morris, Q., and Workman, C. T. (2014). RNA-protein interactions: an overview. *Methods Mol. Biol.* 1097, 491–521. doi: 10.1007/978-1-62703-709-9\_23
- Rodrigues, J. C. F., Godinho, J. L. P., and de Souza, W. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell. Biochem.* 74, 1–42. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9\_1
- Romagnoli, B. A. A., Picchi, G. F. A., Hiraiwa, P. M., Borges, B. S., Alves, L. R., and Goldenberg, S. (2018). Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 178, 190–195. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.013
- Ross Buchan, J. (2014). MRNP granules assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* 11, 1019–1030. doi: 10.4161/rna.29034

- Sabalette, K. B., Romaniuk, M. A., Noé, G., Cassola, A., Campo, V. A., and De Gaudenzi, J. G. (2019). The RNA-binding protein TcUBP1 up-regulates an RNA regulon for a cell surface-associated *Trypanosoma cruzi* glycoprotein and promotes parasite infectivity. *J. Biol. Chem.* 294:jbc.RA118.007123. doi: 10.1074/jbc.RA118.007123
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808. doi: 10.1126/science.1082320
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., et al. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16:443. doi: 10.1186/s12864-015-1563-8
- Smirnov, A., Schneider, C., Hör, J., and Vogel, J. (2017). Discovery of new RNA classes and global RNA-binding proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 39, 152–160. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.016
- Soares Medeiros, L. C., South, L., Peng, D., Bustamante, J. M., Wang, W., Bunkofské, M., et al. (2017). Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *MBio* 8:e01788-17. doi: 10.1128/mBio.01788-17
- Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., et al. (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Mol. Biol. Cell* 22, 4205–4219. doi: 10.1091/mbc.e11-06-0511
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M., and Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382. doi: 10.1261/rna.7258505
- Tonelli, R. R., da Silva Augusto, L., Castilho, B. A., and 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:e27904. doi: 10.1371/journal.pone.0027904
- Tyler Weisbarth, R., Das, A., Castellano, P., Fisher, M. A., Wu, H., and Bellofatto, V. (2018). The *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. *Parasitol. Res.* 117, 1095–1104. doi: 10.1007/s00436-018-5787-9
- Volpon, L., D'Orso, I., Young, C. R., Frasc, A. C., and Gehring, K. (2005). NMR structural study of TcUBP1, a singleRRM domain protein from *Trypanosoma cruzi*: contribution of a beta hairpin to RNA binding. *Biochemistry* 44, 3708–3717. doi: 10.1021/bi047450e
- Wippel, H. H., Inoue, A. H., Vidal, N. M., Costa, J. F., da, Marcon, B. H., Romagnoli, B. A. A., et al. (2018a). Assessing the partners of the RBP9-mRNP complex in *Trypanosoma cruzi* using shotgun proteomics and RNA-seq. *RNA Biol.* 15, 1106–1118. doi: 10.1080/15476286.2018.1509660
- Wippel, H. H., Malgarin, J. S., Inoue, A. H., Leprevost, F. D. V., Carvalho, P. C., Goldenberg, S., et al. (2019). Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex, an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2. *BMC Microbiol.* 19:128. doi: 10.1186/s12866-019-1505-8
- Wippel, H. H., Malgarin, J. S., Martins, S., de, T., Vidal, N. M., Marcon, B. H., Miot, H. T., et al. (2018b). The nuclear RNA-binding protein RBSR1 interactome in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 244–253. doi: 10.1111/jeu.12666
- Wurst, M., Seliger, B., Jha, B. A., Klein, C., Queiroz, R., and Clayton, C. (2012). Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream-form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*: trypanosome RBP10 function. *Mol. Microbiol.* 83, 1048–1063. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07988.x
- Zhang, W., Lypaczewski, P., and Matlashewski, G. (2017). Optimized CRISPR-Cas9 genome editing repair mechanisms. *Msp. Mol. Biol. Physiol.* 2:e00340-16. doi: 10.1128/mSphere.00340-16
- Zhang, W. W., and Matlashewski, G. (2015). CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *MBio* 6:e00861-15. doi: 10.1128/mBio.00861-15

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Romagnoli, Holetz, Alves and Goldenberg. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## MATERIAL SUPLEMENTAR – CAPÍTULO 2

### RNA binding proteins and gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*

Bruno A. Romagnoli<sup>1</sup>, Fabiola B. Holetz<sup>1</sup>, Lysangela R. Alves<sup>1</sup>, Samuel Goldenberg<sup>1\*</sup>

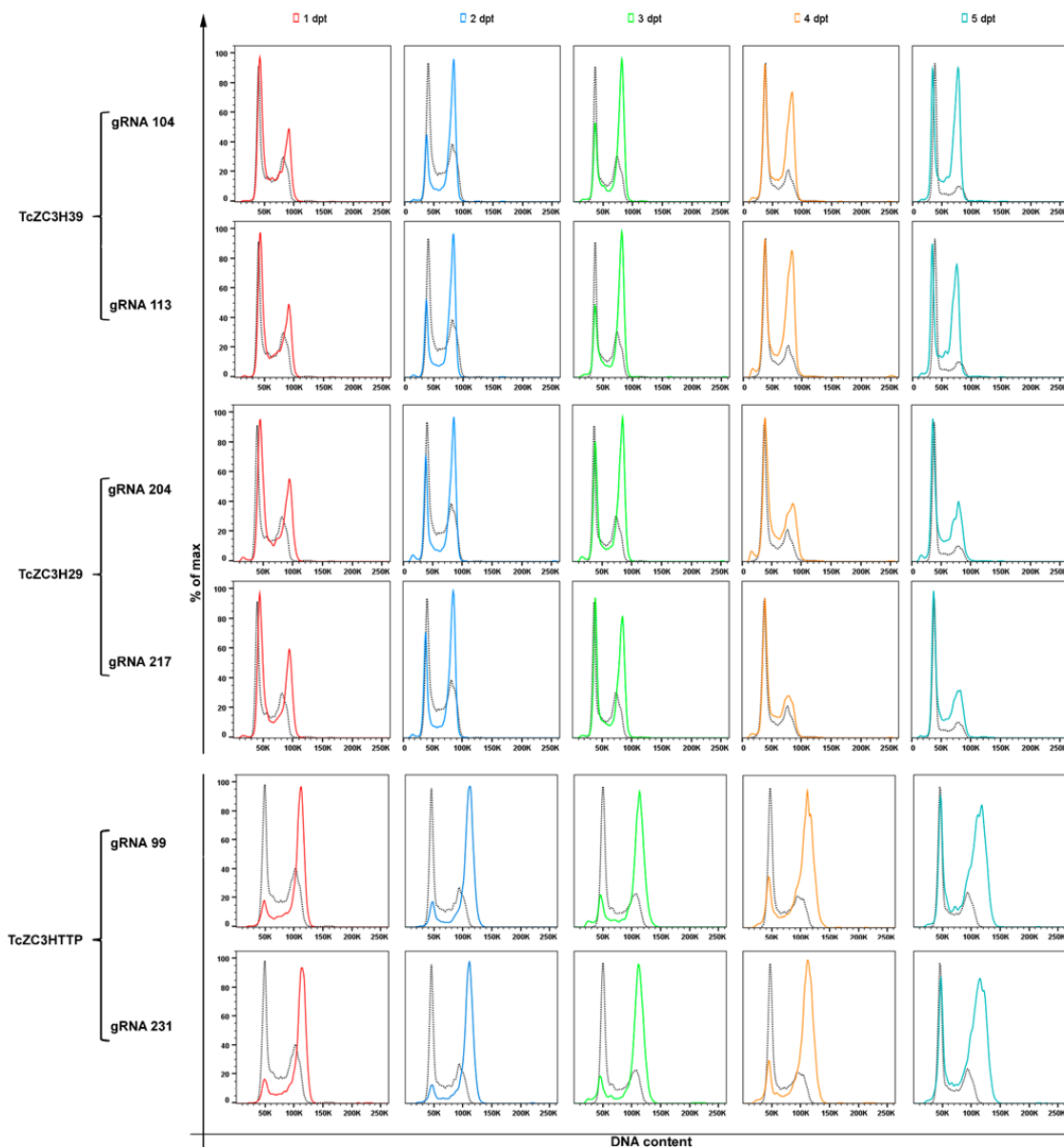
Supplementary Table 1. Sequences of gRNAs, DNA donors and primers used.

gRNAs	Sequence   (PAM)	Target gene	DNA donor sequence (homology arms + BglII site + Stop codon sequence)
gRNA 104	GCCGTGCGGTAAGCAACCGG   TGG	TcZC3H39	CAATCGGATGCACGGTTGATGGTCCCACCGAGATCTTAGATAGATAGGTTGCTTACCGCACGGCGTACGAATCCATC
gRNA 113	GCTATTTTGCAGTTCACCGA   TGG	TcZC3H39	GCTTACCGCACGGCGTACGAATCCATCGGTAGATCTTAGATAGATAGGAACTGCAAAATAGCCTACAAGGTTACGAT
gRNA 204	GGAGCGTCACGTGATACTCA   AGG	TcZC3H29	TATCTCGAACTCTCCTTCCAAGGCTGCCTTAGATCTCTATCTATCTAGAGTATCACGTGACGCTCCTTCTGCAGCTG
gRNA 217	ATACTCAAGGCAGCCTTGA   AGG	TcZC3H29	ACTGTACGGTTTTATCTCGAACTCTCCTTCCAGATCTTATCTATCTACTACAAGGCTGCCTTGAGTATCACGTGACGCTC
gRNA 99	ATGCAGAAGCTCGGCAGCTG   CGG	TcZC3H11P	GGTGTGGAGGCGGCAGACACCTCCGCAGCTAGATCTTAGATAGATAGGCCGAGCTTCTGCATCTCGTGTACCACCG
gRNA 231	GCAAAACAACCTCCTTGAGA   CGG	TcZC3H11P	GTGCTTCGGGATGCTCTCCACCGGCACCGTCAGATCTTATCTATCTACTCAAGGAGTTTGTITTTGCGTGTATCCGTT
Primers	Sequence (5' - 3')	Gene	
TcZC3H39 F	ATGAGCGGTGTAAGAGGAGGTT	TcZC3H39	
TcZC3H39 R	GTTGGCAGGTCCGTGGTTC	TcZC3H39	
TcZC3H29 F	ATGACACAGATCATCACTGAGAAT	TcZC3H29	
TcZC3H29 R	TTACCATTCCACATCCTGTACA	TcZC3H29	
TcZC3H11P F	ATGTCGCTTTCATTATCGAGT	TcZC3H11P	
TcZC3H11P R	TCACCAGATGCTGTCCTCAG	TcZC3H11P	

### gRNA-TcZC3H11P

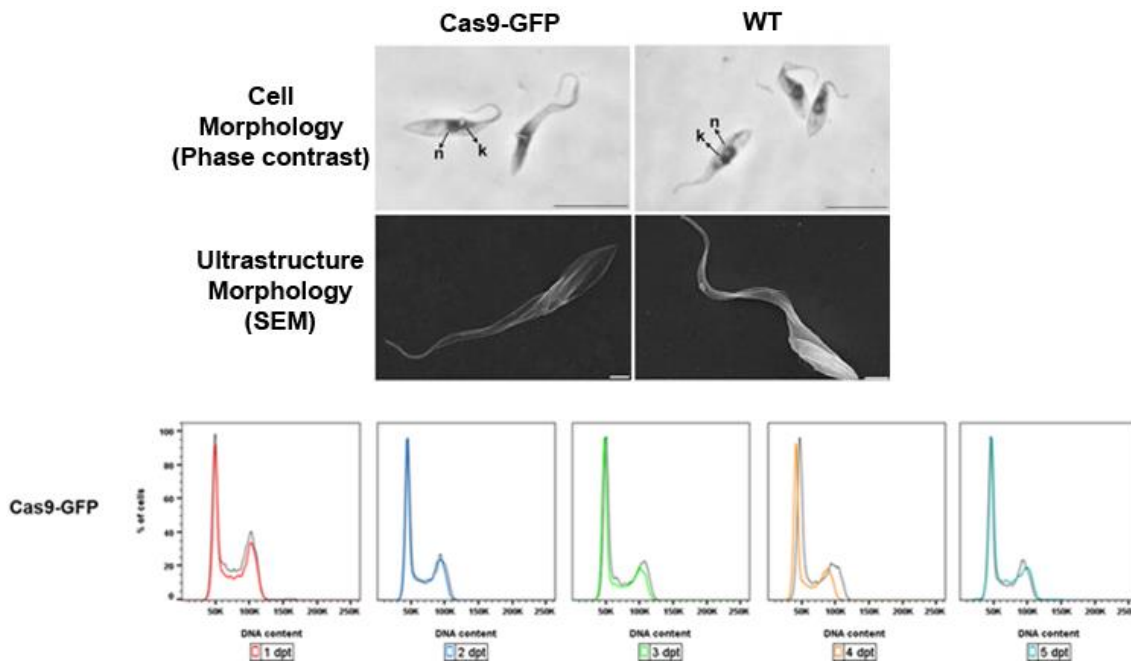


Supplementary Figure 1. Targeting TcZC3H11P affects cell division coordination. After 3 days post transfection with gRNAs targeting TcZC3H11P, parasites at final stages of cell division were seen with two flagella at each end.

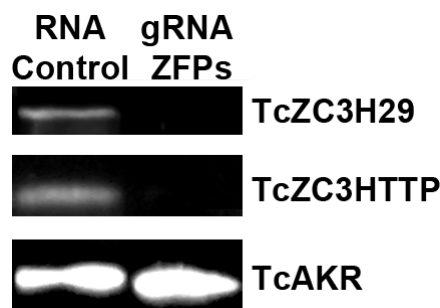


**Supplementary Figure 2. Cell cycle impairment in cultures transfected with gRNAs targeting *tczc3h39*, *tczc3h29* or *tc3http*.** Cas9-GFP expressing parasites were transfected with guide RNAs targeting TcZC3H39, TcZC3H29 or TcZC3HHTTP encoding genes and had their DNA content assessed by flow cytometry. Graphs show percentage of total cells (y axis) by the amount of DNA (x axis) at each day (columns) in comparison to the wild-type population (black dotted). Each row presents data obtained from one gRNA as two different guides were used to edit each ZFP target gene.

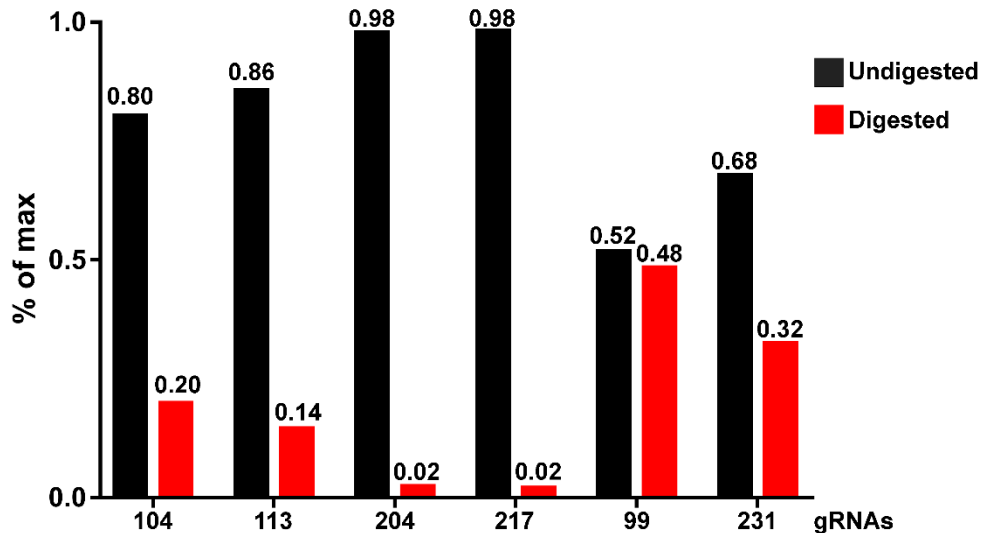




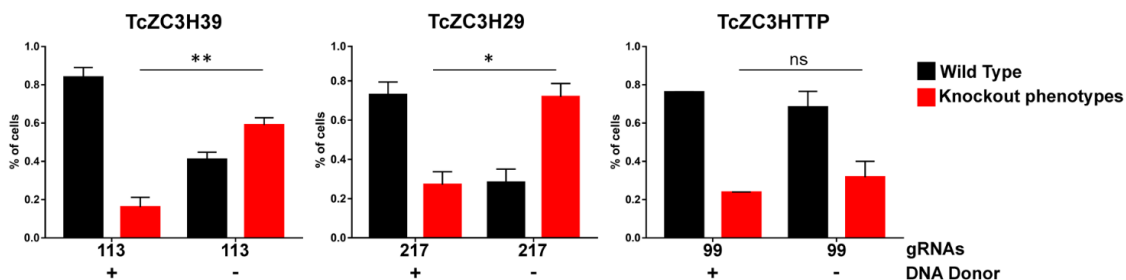
**Supplementary Figure 3. Cell cycle and morphology of transfected control cultures.** Cas9-GFP expressing (Cas9-GFP) and wild-type parasites (WT) were visualized by light microscopy (upper lane) and scanning electron microscopy (bottom lane) after transfection with PBS (instead of gRNAs). The nucleus (n) and kinetoplast (k) are indicated. Bar: 10  $\mu$ m (light microscopy) and 2  $\mu$ m (SEM). Cell cycle analysis revealed that transfected Cas9-GFP expressing parasites (without gRNAs) had no impact on their cell cycle during the whole experiment (from day 1 to 5 after transfection) Graphs show percentage of total cells (y axis) by the amount of DNA (x axis) in each day (columns) in comparison to the wild-type population (black dotted).



**Supplementary Figure 4. TcZC3H29 and TcZC3HTTP knockout confirmation after transfection with specific gRNAs.** Western blot assay to confirm target genes disruption. Populations were transfected with a specific gRNA to TcZC3H29 or TcZC3HTTP (gRNA ZFPs) or a non-guide RNA control (RNA ctrl) and, in the third day posttransfection, parasites were harvested and protein content extracted. Polyclonal antibodies against TcZC3H29 (1:500) or TcZC3HTTP (1:1000) were used for protein detection. In both lanes the amount of protein extract applied corresponded to  $2 \times 10^7$  parasites. The TcAKR protein was used as an input control.



**Supplementary Figure 5. Band intensity quantification to measure % of DNA donor incorporation.** Digested and undigested bands were identified and quantified using the ImageJ software v1.52a. The intensities of each lane (digested or undigested PCR product from a transfected culture) were calculated based on the overall intensity for that lane (digested + undigested signal) and then individual signals were calculated proportionally (% are expressed above each corresponding bar). Graphs were plotted with the Graphpad Prism 7 software.



**Supplementary Figure 6. Comparison of knockout phenotypes frequencies in populations transfected with specific gRNAs targeting TcZC3H39, TcZC3H29 or TcZC3HTTP with (+) or without (-) the related DNA donor.** Three days post transfection parasites were harvested, washed, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and added to poly-L-lysine-coated slides. For phenotype quantification, images were taken from distinct fields and parasites were classified according their morphology. At least a hundred parasites were counted in each condition (with or without the DNA donor). Graphs were plotted and data analyzed with the Graphpad Prism 7 software. Statistical analysis was performed using 2way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. N=2; \* p<0.05; \*\* p<0.01; ns – not significant).

## DISCUSSÃO – CAPÍTULO 2

Nas últimas décadas, as RBPs assumiram uma posição de destaque na investigação científica em virtude de seu papel funcional nos mecanismos regulatórios pós-transcricionais dos seres vivos. Diversos estudos, tanto em procariotos como eucariotos, têm consolidado esse grupo de proteínas como fundamental na regulação da expressão gênica (Gerstberger et al. 2014; Kafasla et al. 2014; Van Assche et al. 2015; Holmqvist et al. 2018). No caso dos tripanossomatídeos, a participação dessas proteínas na coordenação do destino dos mRNAs é de suma importância para os processos adaptativos desses organismos. Não coincidentemente, diversas RBPs já caracterizadas apresentaram-se envolvidas em processos de diferenciação celular nos tripanossomatídeos (Hendriks et al. 2001; Kolev et al. 2012; Wurst et al. 2012; Jha et al. 2015; Alcantara et al. 2018; Romaniuk et al. 2018).

Grande parte do conhecimento a respeito dessas RBPs é proveniente de estudos envolvendo ensaios de silenciamento gênico pela maquinaria de RNA de interferência (RNAi), em *T. brucei* (Archer et al., 2009; Das et al., 2012; Droll et al., 2013; Estévez, 2008; Levy et al., 2015; Ling et al., 2011; Subota et al., 2011; Wurst et al., 2012). De acordo com o que foi visto em *T. cruzi* e algumas espécies do gênero *Leishmania*, essa maquinaria não é funcional por ser incompleta (Robinson et al. 2003; Darocha et al. 2004; Duncan et al. 2017). Além disso, para essas espécies, as técnicas existentes de genética reversa além de laboriosas também apresentam baixa eficiência, sem contar o fato que muitos dos genes em *T. cruzi* apresentam várias cópias (Xu et al. 2009). Essas dificuldades contribuíram para um cenário onde os avanços nos estudos das RBPs em *T. cruzi* não conseguiram acompanhar os progressos feitos em *T. brucei*. Nesse contexto, o estabelecimento de um sistema como o CRISPR/Cas9 para edição gênica e geração de nocautes em *T. cruzi* é extremamente oportuno e abre novas perspectivas nos estudos voltados aos mecanismos de regulação da expressão gênica.

Essa tese tinha como objetivo investigar a contribuição das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3H11P no contexto regulatório da expressão dos

genes de *T. cruzi*. Dados obtidos anteriormente já apontavam a relevância dessas proteínas no parasito. Contudo, a real contribuição nessa rede regulatória envolvendo os mRNAs e proteínas com as quais elas (potencialmente) se associam, permanece desconhecida. Por essa razão, a proposta desse trabalho foi utilizar a ferramenta CRISPR/Cas9 para gerar parasitos mutantes nulos dos genes que codificam essas proteínas, de modo a avaliar as alterações fenotípicas associadas a um contexto em que elas estiverem ausentes.

O desenvolvimento dessa etapa da tese teve início a partir da utilização da metodologia de edição gênica adaptada (capítulo 1) e do desenho dos RNAs guias para os genes alvo. Como desconhecia-se quais seriam os efeitos oriundos da ausência dessas proteínas e, sabendo que os RNAs guia podem apresentar diferentes eficiências (Sander et al. 2014), optou-se por utilizar no mínimo três diferentes gRNAs para cada gene.

Após a transfecção com os gRNAs específicos para os genes *tczc3h39*, *tczc3h29* e *tczc3http*, as populações transfectadas apresentaram alterações significativas no ciclo celular e na morfologia (Figuras 3 e 4).

Nos parasitos que tiveram como alvo a TcZC3H39 observou-se um fenótipo aberrante caracterizado pelo aumento no tamanho celular, em particular na região posterior e alteração no número e formato dos flagelos (Figura 3A). Quando o alvo foi TcZC3H29, as células apresentaram um maior volume celular e a presença de flagelos com menor espessura e maior comprimento (Figure 3B).

Esses fenótipos observados nas populações que tiveram como alvo TcZC3H39 e TcZC3H29 se assemelham ao descrito na literatura como “nozzle” (Hendriks et al. 2001) em *T. brucei*. A morfologia que descreve esse fenótipo, o qual tem como característica a alongação da região posterior da célula via extensão dos microtúbulos, já foi observada no silenciamento de diversas RBPs em *T. brucei* (Hendriks et al. 2001; Hendriks et al. 2005; Paterou et al. 2006; Subota et al. 2011; Levy et al. 2015). Além disso, para muitas dessas proteínas foi visto uma correlação entre o fenótipo “nozzle” e a alteração do ciclo celular, como no caso das proteínas TbZFP2, TbZFP3, ALBA3/4 e TbRRM1 (Hendriks

et al. 2001; Paterou et al. 2006; Subota et al. 2011; Levy et al. 2015). Esse paralelo entre o fenótipo “nozzle” e o ciclo celular também foi observado em *T. brucei* no silenciamento da ciclina CYC2 (Hammarton et al. 2004). No entanto, nesse caso os parasitos morfológicamente alterados permaneciam bloqueados de forma irreversível no estágio G1 do ciclo celular nas formas procíclicas (Hammarton et al. 2004). Importante destacar que, até o momento, não foram encontrados trabalhos relatando esse fenótipo “nozzle” em *T. cruzi*, muito menos correlacionando esse tipo de alteração morfológica com efeitos de parada do ciclo celular mediante a disrupção de proteínas com domínio dedo de zinco C3H.

As células transfectadas com gRNAs específicos para TcZC3HTTP também demonstraram modificações morfológicas expressivas (Figura 3C). Além do aumento de tamanho observado em relação às células controle, os parasitos apresentaram uma ramificação da região posterior com a presença de múltiplos flagelos associados. Conforme visualizado por citometria de fluxo, essas células estão acumuladas entre as fases G2/M e pós G2 (Figura 4C), logo era esperado que nesse estágio do ciclo celular esses parasitos apresentassem ao menos dois núcleos, dois cinetoplastos e dois flagelos (2N2K2F) (Elias et al. 2007; Alcantara et al. 2017). No entanto, ao analisar a ultraestrutura dessas células observamos que essas possuem apenas um núcleo, um cinetoplasto e um número variável de até cinco flagelos (1N1KXF) (Apêndice 1).

Um ensaio de dupla marcação de DNA e dos flagelos com DAPI e o anticorpo  $\alpha$ -TcFCaBP, respectivamente, corroborou com essas evidências (Apêndice 2). Importante salientar que, considerando a fase de desenvolvimento dos flagelos adicionais, era esperado encontrar ao menos duas bolsas flagelares. Isso porque, no parasito selvagem, conforme ocorre a formação do segundo flagelo, a bolsa flagelar divide-se em duas, de modo que fiquem os flagelos “antigo” e “novo” cada um em uma bolsa flagelar (Alcantara et al. 2017).

Durante a divisão celular em *T. cruzi*, no final do processo de citocinese, as duas células em processo de formação ficam com as regiões posteriores opostas e a somatória de núcleos, cinetoplastos e flagelos é 2N2K2F (Alcantara et al. 2017). Conforme visto no nocaute de TcZC3HTTP, ao final da etapa de citocinese, os parasitos mantiveram o número de flagelos alterados durante o processo de divisão celular (Figura suplementar 1). Diferente do que ocorre nas

células selvagens, ao final da citocinese os parasitos foram encontrados portando 2N2K4F (Apêndice 2). Com base nisso, acredita-se que o processo de formação dos flagelos perdeu a sincronia com os eventos de divisão do núcleo e do cinetoplasto nessas células.

Apesar dessas células aberrantes terem sido visualizadas em estágios avançados da divisão celular, não foi possível identificar se esse processo chegou a ser finalizado. Como, até então, não havia sido possível cultivar os parasitos morfológicamente alterados (tanto para TcZC3HHTTP quanto para TcZC3H29 e TcZC3H39), acreditava-se que esses fenótipos acarretavam na morte desses parasitos. De fato, da análise da viabilidade das populações que tiveram TcZC3HHTTP como alvo, foi observada uma grande porcentagem de células com um comprometimento da integridade da membrana. As porcentagens de células positivas para iodeto de propídeo (PI +) nas populações transfectadas chegaram a ultrapassar 50 % após a transfecção (Apêndice 3). Com isso, os dados apontavam que a seleção desses parasitos fosse inviável mediante o comprometimento da viabilidade dessas células. Contudo, os mecanismos envolvidos na morte dessas células permanecem a ser investigados.

Conforme mencionado, a transfecção com gRNAs contra as RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HHTTP resultou em significativas alterações no ciclo celular. De maneira similar, o fenótipo decorrente da disrupção dos três genes alvo foi um acúmulo de células em fase G2/M do ciclo celular. Para TcZC3H39, essa alteração iniciou-se de maneira tímida no primeiro dia após a eletroporação e pronunciou-se a partir do dia dois até o último dia analisado (Figura 4A). As populações, que tiveram TcZC3H29 como alvo, apresentaram o acúmulo significativo de parasitos em G2/M apenas nas 48 h e 72 h que sucederam a transfecção com os gRNAs (Figura 4B). É válido destacar que os três RNAs guias utilizados contra TcZC3H29 demonstraram a mesma cinética no aumento de parasitos nesse estágio do ciclo celular.

Já a disrupção do gene que codifica para TcZC3HHTTP apresentou um perfil de alteração distinto, sendo observado um grande número de parasitos portando uma quantidade de DNA superior ao esperado para uma célula em estágio G2/M (Figura 4C). Na figura 4, o eixo x no gráfico representa unidades

arbitrárias, mas está ajustado de tal forma que, no ponto 50K se encontram as células em G1, entre 50 e 100K estão as células em processo de síntese (S), e em 100K os parasitas em G2/M. Utilizando esses pontos como referência, é possível ver que as populações transfectadas com os gRNAs específicos para TcZC3HTTP são compostas por células que se situam entre 100 e 150K.

Os genes *tczc3h39*, *tczc3h29* e *tczc3http*, ao serem alvos do sistema CRISPR/Cas9, causaram um acúmulo de células nos estágios de G2/M do ciclo celular. Curiosamente, esse fenômeno é distinto daquele observado para o nocaute do gene que codifica  $\alpha$ -tubulina, utilizada como controle positivo de alteração no ciclo celular (Romagnoli et al. 2018). Os parasitos nocauteados para esse componente do citoesqueleto chegaram a apresentar até o quádruplo de DNA (~200K) em relação a uma célula em G1 (50K). Esse dado corrobora a observação em *T. brucei* onde os autores relataram o surgimento de células 4N após o silenciamento gênico de  $\alpha$ -tubulina (Ngo et al. 1998); os autores correlacionam a presença dessas células 4N com o bloqueio na etapa de citocinese dessas células (Ngo et al. 1998). Assim, podemos hipotetizar que o nocaute dos genes que codificam para as proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP também possam estar influenciando o evento da divisão celular.

Nós nos perguntamos se seria possível atribuir esse impacto no ciclo celular como sendo uma consequência da ação do próprio sistema CRISPR/Cas9. Isso porque a disrupção gênica mediada por esse sistema ocorre a partir da quebra de dupla fita. Esse ataque ao DNA poderia vir a desencadear respostas celulares envolvidas no reparo da sequência danificada, as quais, por sua vez, promoveriam o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (Branzei et al. 2008). Conforme visto no tratamento com camptotecina (inibidor da topoisomerase I de *T. cruzi*), danificar o DNA acarreta na parada do ciclo celular e, caso a célula não consiga ter sucesso no reparo, pode resultar na perda da viabilidade celular (Zuma et al. 2014). Embora a origem do dano ao DNA não seja necessariamente a mesma quando comparados os mecanismos de ação do sistema CRISPR/Cas9 com a da droga camptotecina, a resposta celular associada poderia ser comum entre esses dois casos.

No entanto, se essa hipótese de que os efeitos observados nesse trabalho são consequência da ação da Cas9 e não genes específicos estiver correta, teria

que ser observado exatamente o mesmo fenótipo para todas as populações transfectadas com os gRNAs para as diferentes RBPs. Como foram encontradas diferenças consistentes entre os fenótipos para cada gene, acreditamos que essas alterações estejam ocorrendo de fato devido a edição gênica de TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP.

Há relatos na literatura demonstrando a associação de RBPs com o ciclo celular em *T. brucei*. O silenciamento da proteína dedo de zinco TbZC3H11, por exemplo, promove a geração de parasitos multinucleados, alterando a relação G1/G2 do ciclo celular (Droll et al. 2013). Outro caso diz respeito a depleção da proteína TbPUF9 por RNAi, que também acarreta no aumento de células na fase G2/M e no surgimento de parasitos com poliploidia. Foi visto, ainda que essas alterações decorrem da desestabilização dos transcritos alvos de TbPUF9, quando essa proteína é depletada (Archer, V.D. Luu, et al. 2009). Esse fenômeno de interrupção do ciclo celular e acúmulo de parasitos no estágio G2/M também foi observado no silenciamento de TbRRM1. Além disso, os autores descrevem que a ausência dessa proteína desencadeia a morte celular por um processo similar a apoptose (Levy et al. 2015). Dessa forma, essas evidências suportam que os resultados obtidos quanto às alterações no ciclo celular não seriam decorrentes de alguma atividade inespecífica do sistema CRISPR/Cas9, uma vez que os achados para TbZC3H11, TbPUF9 e TbRRM1 provém do emprego da técnica de silenciamento por RNAi, a qual não envolve a edição de DNA/dano ao DNA.

Somados esses dados de alterações no ciclo celular, mudanças morfológicas e comprometimento da viabilidade se relacionam e apontam a importância da manutenção dos níveis das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP para a homeostase de *T. cruzi*. Entretanto, evidentemente que essa importância não é restrita apenas a esses genes, uma vez que diversas outras RBPs, ao serem depletadas, acarretaram em modificações drásticas na biologia dos tripanossomas, desde a inibição do crescimento (Ling et al. 2011; Subota et al. 2011; Wurst et al. 2012; Levy et al. 2015), alterações na morfologia (Hendriks et al. 2001; Paterou et al. 2006; Subota et al. 2011; Levy et al. 2015), no ciclo celular (Archer et al. 2009; Subota et al. 2011; Levy et al. 2015) até o comprometimento da viabilidade celular (Wurst et al. 2012; Levy et al. 2015).



Durante o desenvolvimento dessa tese, foi publicado um trabalho demonstrando que, ao realizar a quebra de dupla fita com a Cas9 e, na ausência de um molde DNA para direcionamento do reparo, é possível que ocorra rearranjos no genoma decorrentes ação do reparo mediado por MMEJ. Segundo os autores, esses rearranjos podem ocasionar alterações na morfologia e viabilidade dos parasitos (Burle-Caldas et al. 2018). Supreendentemente, quando co-transfectaram uma molécula de DNA molde para promover o reparo por recombinação homóloga, os autores não observaram as alterações visualizadas anteriormente para o mesmo gRNA na ausência do DNA molde (Burle-Caldas et al. 2018). Entre as alterações visualizadas estava a presença de múltiplos flagelos em parasitos nocauteados para GP72, uma glicoproteína cujo nocaute resulta em células com o flagelo descolado. (Jesus et al. 1993; Lander et al. 2015; Romagnoli et al. 2018).

A disrupção gênica de TcZC3H29 e TcZC3HTTP em populações transfectadas com gRNAs contra seus respectivos genes foi confirmada por *western blot*, corroborando com a especificidade do sistema (Figura S4). Entretanto, o fato de não ter sido possível observar a edição propriamente dita na sequência desses genes, aliado ao relato reportado por Burle-Caldas e colaboradores, levantou a dúvida quanto à especificidade dos fenótipos observados no nocaute das RBPs. Embora o emprego da nossa metodologia de CRISPR/Cas9 para a GP72 não tenha gerado parasitos com outros fenótipos além do descolamento do flagelo, ainda sim, nós tivemos dificuldades para mostrar que esse gene havia sido editado. Nesse trabalho, a confirmação do nocaute de GP72 se deu através de um ensaio de PCR multiplex no qual, usando diferentes combinações de oligonucleotídeos inicializadores, não foi possível amplificar o gene *gp72* (Romagnoli et al. 2018).

Por essas razões, e com a intenção de confirmar a edição dos genes alvo a nível de DNA, optamos por testar a estratégia de promover o reparo dos genes *tczc3h39*, *tczc3h29* e *tczc3http* por recombinação homóloga através da cotransfecção de oligonucleotídeos simples fita de DNA (DNA *donor*) juntamente com os gRNAs. A estratégia de utilizar esses oligonucleotídeos, bem como a forma como eles foram desenhados (com o sítio de restrição e os códons de

parada) foi inspirada em trabalhos prévios (Lander et al. 2015; Zhang et al. 2017; Burle-Caldas et al. 2018).

A partir da cotransfecção dos gRNAs e de seus respectivos “DNA donor”, logo foi possível visualizar a incorporação do sítio de restrição da enzima *BglII* nas sequências dos genes alvos desse trabalho (Figura 5). Com base na quantificação das bandas dos fragmentos correspondentes aos produtos gênicos amplificados digeridos e não digeridos, foi possível ter uma estimativa do número de células que foram editadas. Essa porcentagem oscilou bastante entre as populações transfectadas com diferentes gRNAs para genes distintos, variando de 2 % a 48 % de produto digerido (Figura S5).

Inesperadamente, no entanto, a incorporação dos DNA *donors* ao processo de transfecção resultou numa diminuição significativa, ao menos, para TcZC3H39 ( $p < 0,01$ ) e TcZC3H29 ( $p < 0,05$ ), na porcentagem de parasitas apresentando o fenótipo “*nozzle*” (Figura S6). A análise do ciclo celular dessas culturas, e das que tiveram TcZC3HTTP como alvo, também demonstrou que a presença dos oligonucleotídeos reduziu o número de células presentes na fase G2/M, quando comparado às culturas transfectadas apenas com os gRNAs (Dados não mostrados).

Outro ponto importante, relacionado à cotransfecção dos “DNA *donor*”, foi o fato de ter sido possível obter clones contendo os genes *tczc3h39*, *tczc3h29* ou *tczc3http* editados nas populações que receberam os oligos para o reparo. Curiosamente, quando analisados, esses clones se mostraram ser hemi-nocautes (Figura 5D). A imunodeteção por *western blot* nessas populações hemi-nocautes para TcZC3H29 ou TcZC3HTTP, demonstrou que essas proteínas ainda apresentavam níveis de expressão equivalentes aos dos parasitas selvagens ou da cultura transfectada com um RNA controle (Apêndice 4). A falta de um antissoro contra TcZC3H39, no entanto, inviabilizou essa análise na cultura hemi-nocaute para essa proteína.

A obtenção de populações hemi-nocautes obtidas para TcZC3H39, TcZC3H29 ou TcZC3HTTP foi totalmente inesperada, uma vez que a expectativa era que o sistema CRISPR/Cas9 fosse capaz de reconhecer e editar os dois alelos desses genes de cópia única. Uma explicação possível para a ocorrência

desses hemi-nocautes seria a existência de diferenças na sequência reconhecidas pelos gRNAs entre os alelos. No entanto, a probabilidade de que todas as regiões alvo escolhidas para os três genes apresentem algum tipo de polimorfismo é baixa. Ao buscar na literatura relatos da geração/seleção de clones com apenas um alelo editado pelo sistema CRISPR/Cas9, encontramos apenas o trabalho de Soares Medeiros e colaboradores que, coincidentemente ou não, também realizado em *T. cruzi* (Soares Medeiros et al. 2017). Nesse trabalho, os autores tentaram realizar o nocaute dos genes *Galf* e *CRT*, mas também encontraram apenas clones hemi-nocautes (Soares Medeiros et al. 2017).

Com base nisso, nós hipotetizamos que: (I) apenas os parasitos com os dois alelos editados apresentam fenótipos deletérios e, por isso, são selecionados negativamente; (II) o complexo SpCas9-gRNA pode estar tendo dificuldades em acessar os dois alelos, possivelmente por questões epigenéticas e/ou devido a interações de elementos de ligação ao DNA dos parasitos.

Um estudo feito em células tronco embrionárias de camundongos, demonstrou que o *imprinting* genômico pode influenciar na interação/atividade da Cas9 dependendo do padrão de metilação e do nível de compactação da cromatina do local alvo (Kallimasioti-Pazi et al. 2018). No entanto, os autores viram que a inibição da atividade da Cas9 em regiões de heterocromatina estava relacionada a baixos níveis de expressão da endonuclease (Kallimasioti-Pazi et al. 2018). No nosso sistema de expressão constitutiva da SpCas9, certamente, o nível de expressão dessa proteína não deve ser considerado baixo. Entretanto, pouco se sabe sobre os padrões de metilação e sobre a existência/repertório de elementos ligados ao DNA em *T. cruzi*. Assim, é plausível que o surgimento dessas populações hemi-nocautes seja direcionado de alguma forma por mecanismos epigenéticos.

Na tentativa de obter o nocaute do segundo alelo dos genes *tczc3h39*, *tczc3h29* e *tczc3http*, esses clones foram submetidos a uma nova transfecção utilizando os mesmos gRNAs que editaram o primeiro alelo. A ideia consistiu no fato de que, como o alelo editado apresenta a sequência originalmente reconhecida pelo complexo Cas9-gRNA quebrada pela incorporação do “DNA donor”, apenas o alelo não editado poderia ser reconhecido. Após uma nova

etapa de transfecção e tentativas de selecionar/clonar as populações transfectadas, foi possível obter clones que apresentassem os dois alelos do gene *tczc3http* editados (Figura 6). Ainda estamos procurando por mutantes nulos para TcZC3H39 ou TcZC3H29.

Os clones nocaute para TcZC3HTTP mostraram-se viáveis, embora apresentando uma menor taxa proliferativa em relação ao controle e aos clones hemi-nocautes (Apêndice 5 A e B). Interessante, as alterações fenotípicas descritas anteriormente não foram observadas nesses parasitos mutantes nulos. Aqui cabe destacar que os clones hemi-nocautes para as outras duas RBPs também apresentaram uma redução na proliferação quando comparado ao controle selvagem, sendo essa redução bastante significativa no caso da TcZC3H39 (Apêndice 5 C e D).

Essas informações avivam a discussão acerca da especificidade dos fenótipos, uma vez que o que havia sido identificado para TcZC3HTTP, agora com a confirmação do nocaute (pela ausência da proteína e pela edição dos dois alelos), não está mais sendo visto. A questão instigante é que, se esses fenótipos não são de alguma forma específicos dos genes editados, não teria sido possível distinguir as alterações observadas entre os genes, lembrando que elas foram reprodutíveis em transfecções independentes e para gRNAs distintos.

Diante desse cenário, é razoável supor que as alterações morfológicas, no ciclo celular e de viabilidade, que, ao que tudo indica estão interligadas, sejam específicas dos genes afetados. Todavia, não se pode excluir a hipótese que essas alterações não sejam consequência direta da ausência de suas respectivas proteínas, mas sim relacionadas ao contexto genômico em que seus genes se encontram. Como os genes estão presentes em cromossomos e grupos policistrônicos gênicos distintos, é possível que a interação e atividade do complexo SpCas9-gRNA nessas porções desencadeiem respostas similares, consequência de um mecanismo comum (quebra de dupla fita de DNA), mas distintas porque estarem relacionadas a contextos genômicos diferentes.

Como forma de elucidar as hipóteses mencionadas acima, foram utilizados os clones nocaute para TcZC3HTTP obtidos a partir de gRNAs diferentes (gRNA 99 e gRNA 231). Essas populações clonais distintas foram

submetidas a uma nova transfecção, de maneira que, os clones gerados através do gRNA 99 fossem transfectados com o gRNA 231 e vice-versa. Para efeito de comparação, essas transfecções foram feitas tanto na presença quanto na ausência do “DNA *donor*”. Curiosamente, o que se observou foi que as populações, que já eram nocautes para TcZC3HHTTP, apresentaram as alterações fenotípicas quanto à morfologia e ciclo celular descritas anteriormente, sendo que essa frequência fenotípica foi menor e não apresentou diferenças significativas em relação às transfecções somente do gRNA ou em associação com o respectivo “DNA *donor*” (Apêndice 6). Paralelamente a esse experimento, no terceiro dia a após a transfecção uma segunda rodada de eletroporação foi feita com os gRNAs 99 ou 231 e seus respectivos “DNA *donors*” nas população nocaute para TcZC3HHTTP, resultando no aparecimento de células com uma maior quantidade de DNA (> G2/M) em relação ao que foi observado ao controle (Apêndice 7). Esse resultado corrobora com a hipótese de que os efeitos na morfologia, ciclo celular e na viabilidade, possam estar atrelados a atuação do sistema CRISPR/Cas9 em contextos genômicos distintos. Todavia, mais informações são necessárias para confirmar/refutar essa possibilidade.

Por outro lado, é possível que as alterações fenotípicas observadas sejam consequências de uma resposta “genérica”, a desregulação provocada pela modulação negativa dos níveis das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29 ou TcZC3HHTTP. Embora não tenham sido constadas alterações nos níveis de expressão de TcZC3H29 ou TcZC3HHTTP nas populações hemi-nocautes, os clones para TcZC3H29 apresentaram uma redução da proliferação celular, assim como os parasitos nocaute para TcZC3HHTTP. Vale ressaltar que alterações na taxa proliferativa, bem como no ciclo celular e/ou a presença do fenótipo “*nozzle*” já foram associadas a modulação negativa nos níveis de diferentes RBPs em *T. brucei* (Hendriks et al. 2001; Hammarton et al. 2004; Hendriks et al. 2005; Paterou et al. 2006; Archer, V.D. Luu, et al. 2009; Subota et al. 2011; Wurst et al. 2012; Droll et al. 2013; Levy et al. 2015).

Em todo caso, por conta dos desafios e desvios de percurso atrelados a geração e análise das populações e clones hemi-nocautes e/ou nocautes, pouco acabou sendo explorado quanto a real pergunta biológica desse trabalho. A ideia

original era obter esses parasitos mutantes nulos como ferramenta para analisar o impacto na rede regulatória da expressão gênica. Todavia, os achados referentes às alterações fenotípicas do nocaute dos genes alvos, foram inesperados, interessantes, mas sobretudo, desafiadores quanto à sua interpretação. De maneira que a discussão a respeito desses efeitos serem diretos ou indiretos permanece aberta.

Diante do exposto, os resultados obtidos nesse trabalho destacam a relevância do papel das RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP na biologia de *T. cruzi* e reforçam a necessidade de se investigar o potencial dessas proteínas como elementos regulatórios nesse parasito. Ainda, a partir dos avanços feitos nessa tese na utilização e aperfeiçoamento do sistema CRISPR/Cas9 na geração de parasitos mutantes, acredito que será possível ampliar significativamente o conhecimento acerca das RBPs, de modo a podermos, finalmente, começar a mapear e montar a rede da regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.

## PERSPECTIVAS

Ao longo do desenvolvimento dessa tese, os achados e os desafios encontrados, acabaram por alterar o rumo inicialmente proposto. Devido a isso, algumas questões e objetivos permaneceram em aberto ou pouco exploradas. Desse modo as perspectivas para o término desse trabalho e/ou continuação de trabalhos futuros são:

- Obter e confirmar o nocaute de TcZC3H39 e TcZC3H29 a partir de uma nova transfecção com os gRNAs e os DNA *donors* correspondentes;

- Analisar os respectivos transcritos alvos de TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HHTTP quanto aos seus níveis de expressão relativa, estabilidade, expressão estágio-específica;

- Avaliar os efeitos dos nocautes e hemi-nocautes dessas RBPs em processos de diferenciação (ex: metaciclogênese), infecção e situações de estresse (ex: nutricional, temperatura, pH);

- Avaliar a composição ribonucleoproteica dos complexos aos quais TcZC3H39, TcZC3H29 e/ou TcZC3HHTTP fazem parte nos parasitos nocaute;

- Investigar a teoria do contexto genômico influenciando nos fenótipos observados na atividade do sistema CRISPR/Cas9;

- Caracterizar fenotipicamente os clones nocaute para TcZC3HHTTP (ex: morfologia, ciclo celular, motilidade, diferenciação, infecção)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese de doutorado começou a ser desenvolvida em um cenário no qual o estudo das RBPs em *T. cruzi* apresentava limitações técnicas quanto ao emprego de metodologias de genética reversa, em especial, do nocaute gênico nesse parasito. A partir desse contexto e dos resultados alcançados ao longo desse trabalho, conclui-se que:

- A partir de pequenas adaptações nas estratégias pré-existentes foi possível estabelecer uma metodologia de edição gênica por CRISPR/Cas9 com alta eficiência, reprodutível e que possibilita, mesmo que com limitações, o estudo de genes com fenótipos deletérios;
- Com base nessa metodologia desenvolvida foi possível obter clones hemi-nocautes para TcZC3H39 ou TcZC3H29 ou nocautes para TcZC3HTTP;
- A obtenção de apenas clones hemi-nocautes para TcZC3H39 e TcZC3H29 sugerem uma possível função essencial dessas proteínas, a qual, certamente, deve ser melhor investigada.
- A disrupção gênica de TcZC3H39 e TcZC3H29 com os gRNAs específicos e na presença ou ausência do respectivos DNA *donors* resultou em parasitos apresentando o fenótipo “*nozzle*”. Essa foi a primeira vez que esse fenótipo é observado em *T. cruzi*.
- Os dados obtidos a partir dos parasitos nocautes apontam para uma associação entre a morfologia, o ciclo celular e a viabilidade celular. Especula-se que possa haver uma “resposta comum” atrelada a uma desregulação gerada pela ausência de elementos regulatórios, tais quais as RBPs estudadas;



## REFERÊNCIAS

- Alcantara C de L, Vidal JC, de Souza W, Cunha-e-Silva NL. 2017. The cytostome–cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes disassembles during cell division. *J. Cell Sci.* 130:164–176.
- Alcantara MV, Kessler RL, Gonçalves REG, Marlière NP, Guarneri AA, Picchi GFA, Fragoso SP. 2018. Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. *Mol. Biochem. Parasitol.* 221:1–9. Elsevier
- Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C, Horn D. 2011. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* 21:915–924.
- Alves LR. 2010. Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas ( mRNPs ) em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado 2010. Instituto Carlos Chagas, Curitiba.
- Alves LR, Goldenberg S. 2016. RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. *World J. Biol. Chem.* 7:78.
- Alves LR, Oliveira C, Mörking PA, Kessler RL, Martins ST, Accioly B, Romagnoli A, Marchini FK, Goldenberg S. 2014. The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. *RNA Biol.* 11:921–933.
- Archer SK, Luu V-D, de Queiroz RA, Brems S, Clayton C. 2009. *Trypanosoma brucei* PUF9 Regulates mRNAs for Proteins Involved in Replicative Processes over the Cell Cycle. *PLoS Pathog.* 5:e1000565.
- Van Assche E, Van Puyvelde S, Vanderleyden J, Steenackers HP. 2015. RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6:141.
- De Assis Burle-Caldas G, Grazielle-Silva V, Laibida LA, DaRocha WD, Teixeira SMR. 2015. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 203:25–33. Elsevier B.V.
- Balaña-Fouce R, Reguera RM. 2007. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? *Trends Parasitol.* 23:348–351.
- Branzei D, Foiani M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:297–308.
- Burle-Caldas GA, Soares-Simões M, Lemos-Pechnicki L, DaRocha WD, Teixeira SMR. 2018. Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *Int. J. Parasitol.* 48:591–596.
- Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. 2000. Transcription of the kinetoplastid spliced

- leader RNA gene. *Parasitol. Today* 16:78–82.
- Caro F, Bercovich N, Atorrasagasti C, Levin MJ. 2005. Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: Implications for their functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:1017–1025.
- Chagas C. 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159–218.
- Chen K, Rajewsky N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 8:93–103.
- Clayton C, Shapira M. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156:93–101.
- Clayton CE. 1999. Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol. Today* 15:372–378.
- Clayton CE. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21:1881–8.
- Clayton CE. 2016. Gene expression in Kinetoplastids. *Curr. Opin. Microbiol.* 32:46–51.
- Cooper R, Jesus AR De, Cross GAM. 1993. Deletion of An Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Surface Glycoprotein Disrupts Flagellum-Cell Adhesion. 122:149–156.
- Darocho WD, Otsu K, Teixeira SMR, Donelson JE. 2004. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133:175–186.
- Das A, Morales R, Banday M, Garcia S, Hao L, Cross G a. M, Estevez a. M, Bellofatto V. 2012. The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism. *Rna* 18:1968–1983.
- Droll D, Minia I, Fadda A, Singh A, Stewart M, Queiroz R, Clayton C. 2013. Post-Transcriptional Regulation of the Trypanosome Heat Shock Response by a Zinc Finger Protein. *PLoS Pathog.* 9.
- Duncan SM, Jones NG, Mottram JC. 2017. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 216:30–38. Elsevier
- Elias MC, da Cunha JPC, de Faria FP, Mortara RA, Freymüller E, Schenkman S. 2007. Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. *Protist* 158:147–157.
- Estévez AM. 2008. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* 36:4573–4586.
- Fernández-Moya SM, Estévez AM. 2010. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan

parasites. *Wiley Interdiscip. Rev. - RNA* 1:n/a-n/a.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- De Gaudenzi J, Frasch AC, Clayton C. 2005. RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. *Eukaryot. Cell* 4:2106–2114.
- Gaudenzi J, De Noe G, Campo V, Frasch AC, Cassola A. 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 51:31–46.
- Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. 2014. A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15:829–845. Nature Publishing Group
- Gilinger G. 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29:1556–1564.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582:1977–86.
- Goldenberg S, Ávila AR. 2011. Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. 1st ed. Elsevier Ltd. Elsevier Ltd.
- Haile S, Papadopoulou B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:569–577.
- Hammarton TC, Engstler M, Mottram JC. 2004. The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. *J. Biol. Chem.* 279:24757–24764.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2:110–119.
- Han H. 2018. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. In: DiStefano JK, editor. Vol. 1706. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. p. 293–302. New York, NY: Springer New York
- Hannon GJ, Rossi JJ. 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431:371–378.
- Hendriks EF, Matthews KR. 2005. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. *Mol. Microbiol.* 57:706–16.
- Hendriks EF, Robinson DR, Hinkins M, Matthews KR. 2001. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J.* 20:6700–11.
- Holmqvist E, Vogel J. 2018. RNA-binding proteins in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:601–615.
- Jesus AR De, Cooper R, Espinosa M, Gomes JEPL, Garcia ES, Paul S, Cross GAM. 1993. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J.*

*Cell Sci.* 1033:1023–1033.

- Jha BA, Gazestani VH, Yip CW, Salavati R. 2015. The DRBD13 RNA binding protein is involved in the insect-stage differentiation process of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 589:1966–1974. Federation of European Biochemical Societies
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-. )*. 337:816–822.
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J a. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2:e00471.
- Jones NG, Thomas EB, Brown E, Dickens NJ, Hammarton TC, Mottram JC. 2014. Regulators of *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Progression and Differentiation Identified Using a Kinome-Wide RNAi Screen. *PLoS Pathog.* 10.
- Kafasla P, Skliris A, Kontoyiannis DL. 2014. Post-transcriptional coordination of immunological responses by RNA-binding proteins. *Nat. Immunol.* 15:492–502.
- Kallimasioti-Pazi EM, Thelakkad Chathoth K, Taylor GC, Meynert A, Ballinger T, Kelder MJE, Lalevée S, Sanli I, Feil R, Wood AJ. 2018. Heterochromatin delays CRISPR-Cas9 mutagenesis but does not influence the outcome of mutagenic DNA repair. *PLoS Biol.* 16:1–22.
- Keene JD. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 8:533–543.
- Kolev NG, Ramey-Butler K, Cross GAM, Ullu E, Tschudi C. 2012. Developmental Progression to Infectivity in *Trypanosoma brucei* Triggered by an RNA-Binding Protein. *Science (80-. )*. 338:1352–1353.
- Kolev NG, Ullu E, Tschudi C. 2014. The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Cell. Microbiol.* 16:482–489.
- Kramer S. 2011. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181:61–72. Elsevier B.V.
- Kramer S, Carrington M. 2011. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol.* 27:23–30. Elsevier Ltd
- Kramer S, Kimblin NC, Carrington M. 2010. Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *BMC Genomics* 11:283.
- Lander N, Li Z-H, Niyogi S, Docampo R. 2015. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *MBio* 6:12–15.
- Levy G V., Bañuelos CP, Níttolo AG, Ortiz GE, Mendiondo N, Moretti G, Tekiel VS, Sánchez DO. 2015. Depletion of the SR-Related Protein TbRRM1 Leads

- to Cell Cycle Arrest and Apoptosis-Like Death in *Trypanosoma brucei*. Elias MC, editor. *PLoS One* 10:e0136070.
- Liang X, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. 2003. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryot. Cell* 2:830–840.
- Ling AS, Trotter JR, Hendriks EF. 2011. A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 286:20152–20162.
- Lorenzi HA, Vazquez MP, Levin MJ. 2003. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 310:91–99.
- Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. 2010. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:1–15.
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol. Cell* 11:1291–1299.
- McVey M, Lee SE. 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24:529–38.
- Mittal N, Roy N, Babu MM, Janga SC. 2009. Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:20300–5.
- Mony BM, MacGregor P, Ivens A, Rojas F, Cowton A, Young J, Horn D, Matthews K. 2014. Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 505:681–685.
- Moore MJ. 2005. From Birth to Death: The Complex Lives of Eukaryotic mRNAs. *Science (80-. )*. 309:1514–1518.
- Myung KS, Beetham JK, Wilson ME, Donelson JE. 2002. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *J. Biol. Chem.* 277:16489–97.
- Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14687–14692.
- Noé G, De Gaudenzi JG, Frasch AC. 2008. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol. Biol.* 9:107.
- Nunes LR, Carvalho MRC, Shakarian AM, Buck GA. 1997. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 188:157–168.
- Padmanabhan PK, Polidoro RB, Barteneva NS, Gazzinelli RT, Burleigh BA. 2014. Transient transfection and expression of foreign and endogenous genes in the intracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 198:100–103.
- Palenchar Jennifer B, Bellofatto V. 2006. Gene transcription in trypanosomes.

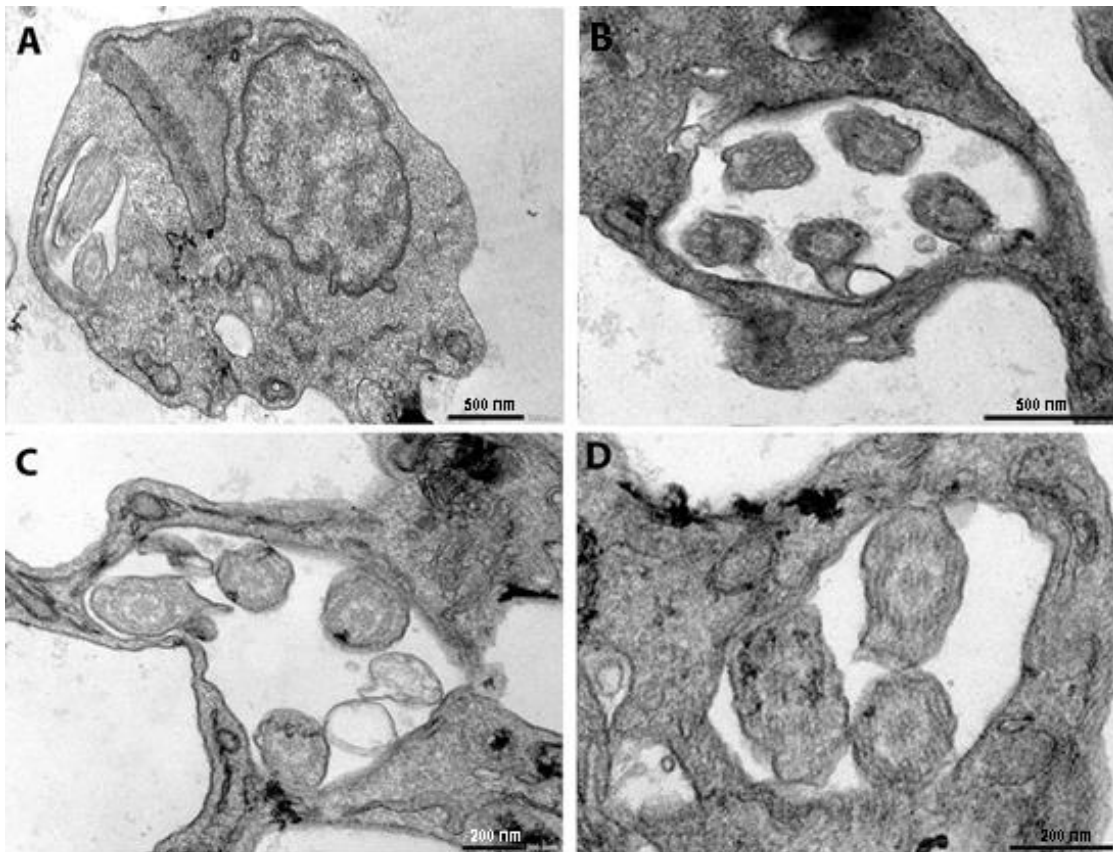
*Mol. Biochem. Parasitol.* 146:135–141.

- Paterou A, Walrad P, Craddy P, Fenn K, Matthews K. 2006. Identification and Stage-specific Association with the Translational Apparatus of TbZFP3 , a CCCH Protein That Promotes Trypanosome Life-cycle Development\*,s. *J. Biol. Chem.* 281:39002–39013.
- Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. 2014. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. Johnson PJ, editor. *MBio* 6:1–11.
- Pérez-Díaz L, Correa A, Moretão MP, Goldenberg S, Dallagiovanna B, Garat B. 2012. The overexpression of the trypanosomatid-exclusive TcRBP19 RNA-binding protein affects cellular infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107:1076–1079.
- Preußner C, Jaé N, Bindereif A. 2012. mRNA splicing in trypanosomes. *Int. J. Med. Microbiol.* 302:221–224. Elsevier GmbH.
- Robinson KA, Beverley SM. 2003. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128:217–228.
- Romagnoli BAA. 2016. Análise de Proteínas de Ligação ao RNA com o domínio dedo de zinco ZFP29 e ZFPTTP em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado. Instituto Carlos Chagas, Curitiba.
- Romagnoli BAA, Picchi GFA, Hiraiwa PM, Borges BS, Alves LR, Goldenberg S. 2018. Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 178:190–195. Elsevier B.V.
- Romaniuk MA, Frasc AC, Cassola A. 2018. Translational repression by an RNA-binding protein promotes differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 14.
- Sabalette KB, Romaniuk MA, Noé G, Cassola A, Campo VA, De Gaudenzi JG. 2019. The RNA-binding protein TcUBP1 up-regulates an RNA regulon for a cell surface-associated *Trypanosoma cruzi* glycoprotein and promotes parasite infectivity. *J. Biol. Chem.* 294:10349–10364.
- Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32:347–55. Nature Publishing Group
- Schumann Burkard G, Jutzi P, Roditi I. 2011. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175:91–94. Elsevier B.V.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337–342.
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, Wang X, Dewell S, Cross GAM. 2009. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.*

23:1063–1076.

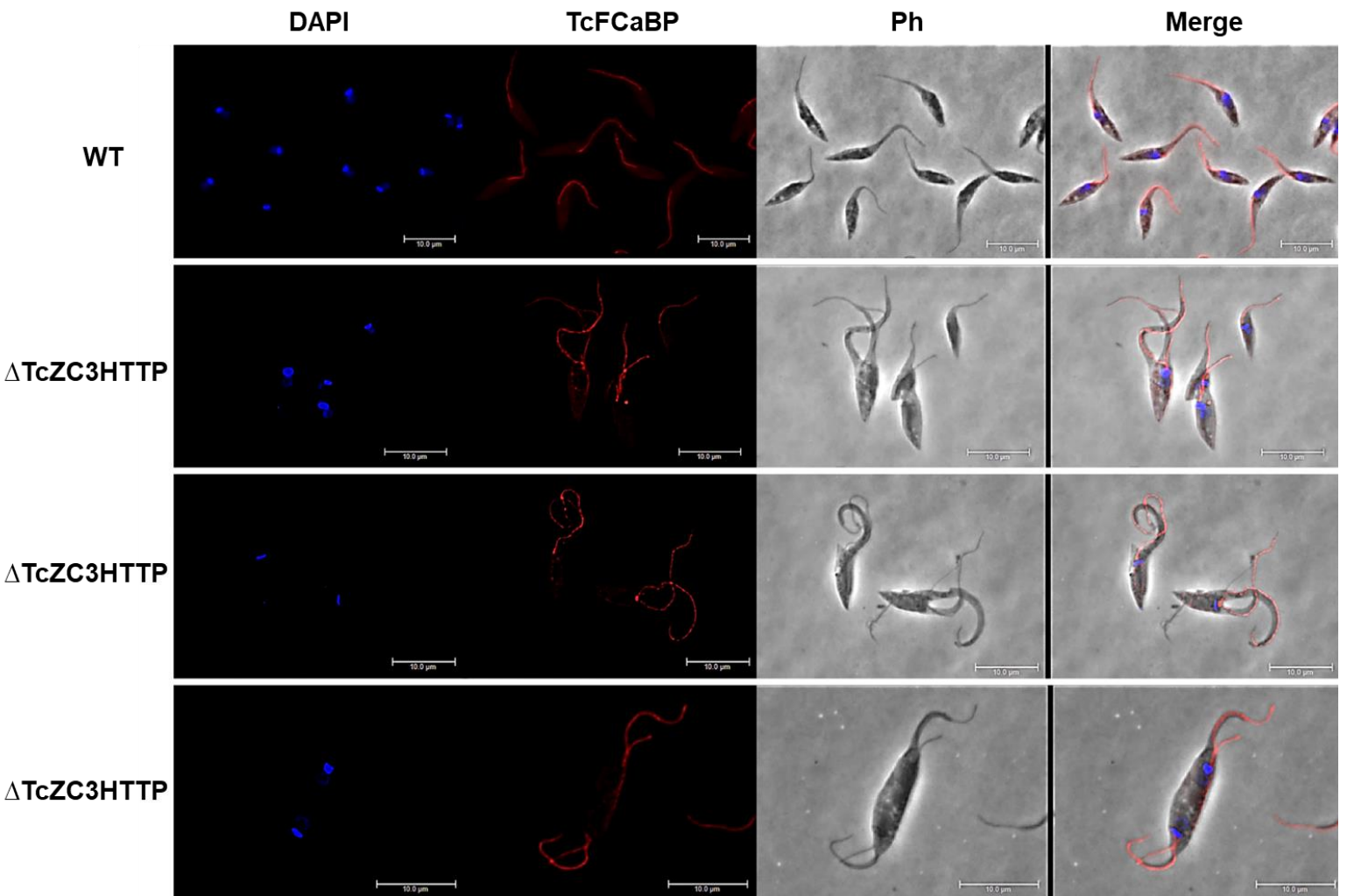
- Soares Medeiros LC, South L, Peng D, Bustamante JM, Wang W, Bunkofske M, Perumal N, Sanchez-Valdez F, Tarleton RL. 2017. Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. Boothroyd JC, editor. *MBio* 8:1–15.
- Subota I, Rotureau B, Blisnick 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. *Mol. Biol. Cell* 22:4205–4219.
- Taylor MC, Huang H, Kelly JM. 2011. Genetic Techniques in *Trypanosoma cruzi*. 1st ed. Elsevier Ltd. Elsevier Ltd.
- Vazquez MP, Levin MJ. 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 $\beta$  gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239:217–225.
- Vindry C, Vo Ngoc L, Kruys V, Gueydan C. 2014. RNA-binding protein-mediated post-transcriptional controls of gene expression: Integration of molecular mechanisms at the 3' end of mRNAs? *Biochem. Pharmacol.* 89:431–440. Elsevier Inc.
- Wang F, Qi LS. 2016. Applications of CRISPR Genome Engineering in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 26:875–888.
- Wickens M, Bernstein DS, Kimble J, Parker R. 2002. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* 18:150–157.
- Wurst M, Robles A, Po J, Luu VD, Brems S, Marentije M, Stoitsova S, Quijada L, Hoheisel J, Stewart M, et al. 2009. An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163:61–65.
- Wurst M, Seliger B, Jha BA, Klein C, Queiroz R, Clayton C. 2012. Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream-form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 83:1048–1063.
- Wyrick JJ, Young RA. 2002. Deciphering gene expression regulatory networks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:130–136.
- Xu D, Brandán CP, Basombrío MA, Tarleton RL. 2009. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 9:90.
- Zhang W, Lypaczewski P, Matlashewski G. 2017. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing Repair Mechanisms. *Msph. Mol. Biol. Physiol.* 2:e00340-16.
- Zuma AA, Mendes IC, Reignault LC, Elias MC, De Souza W, Machado CR, Motta MCM. 2014. How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 193:93–100. Elsevier B.V.

## APÊNDICE

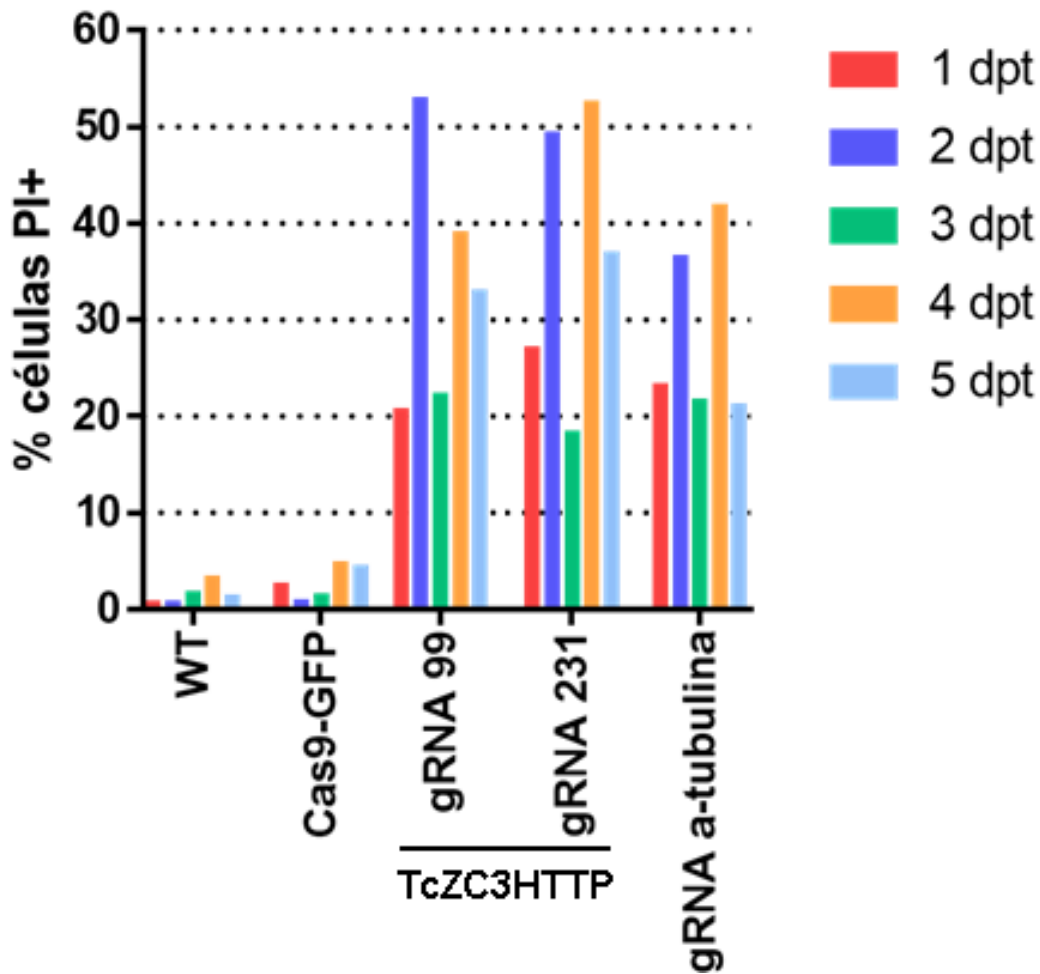


**Apêndice 1. Análise ultraestrutural, por microscopia eletrônica de transmissão, das células após a transfecção. A parasito selvagem. B, C e D - parasitos transfectados com gRNAs contra TcZC3H1TP destacando a presença de vários flagelos numa mesma bolsa flagelar.**





**Apêndice 2. Imunolocalização de TcFCaBP nas células nocaute para TcZC3HTTP.** Ensaio de imunofluorescência indireta para marcação flagelar. WT – selvagem; KO TcZC3HTTP – parasitos transfectados com gRNAs contra TcZC3HTTP; DAPI – marcação do DNA nuclear e mitocondrial com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroclorato); TcFCaBP – marcação flagelar com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -TcFCaBP (1:1000); Ph – contraste de fase; Merge – sobreposição das imagens de uma mesma linha. A barra representa 10  $\mu$ m.

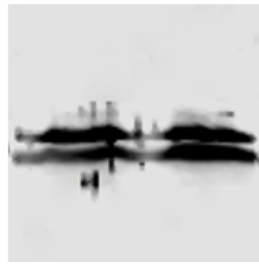


Z

**Apêndice 3. Viabilidade dos parasitos após a transfecção com os gRNAs contra ZFPTTP.** Análise da marcação com iodeto de propídeo (PI) após a transfecção dos parasitos por citometria de fluxo. No eixo y está representado a porcentagem de células positivas para PI para cada uma das populações transfectadas (eixo x). As cores da barra correspondem aos dias após a eletroporação em que o dado foi obtido. Para concepção do gráfico foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

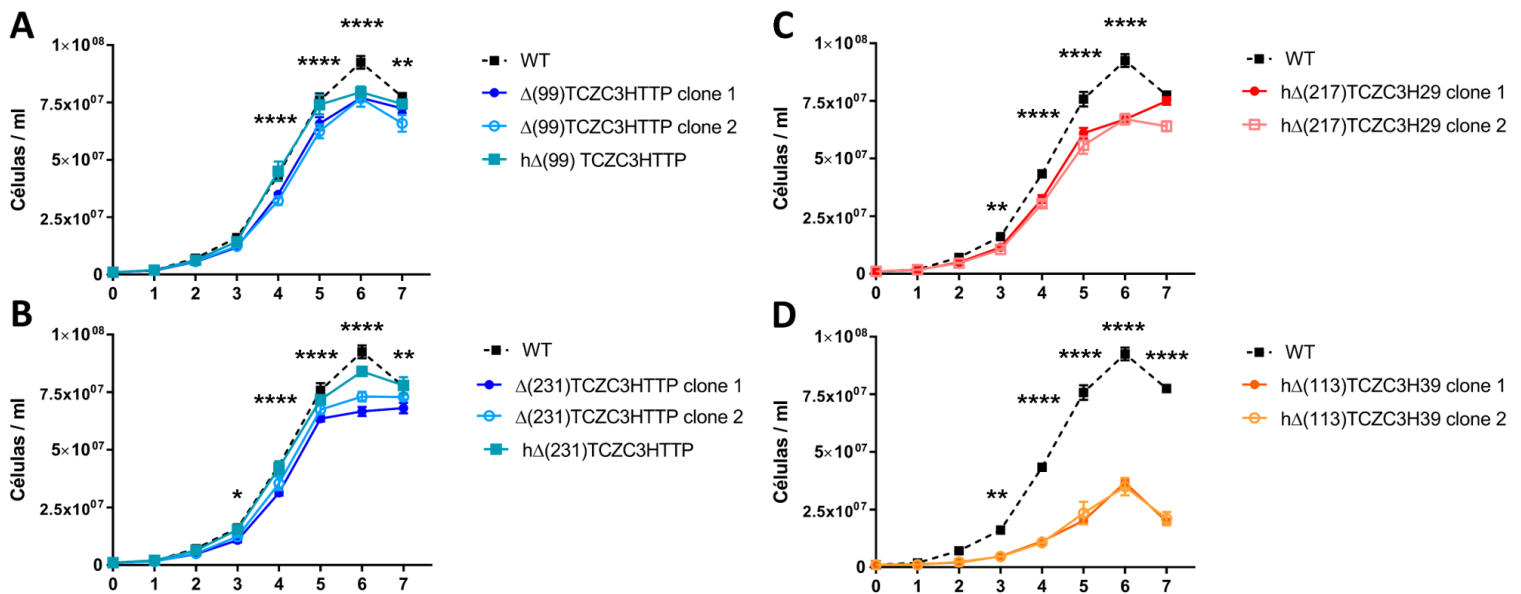
## hΔ TcZC3H29

Ctrl 217 gRNAs

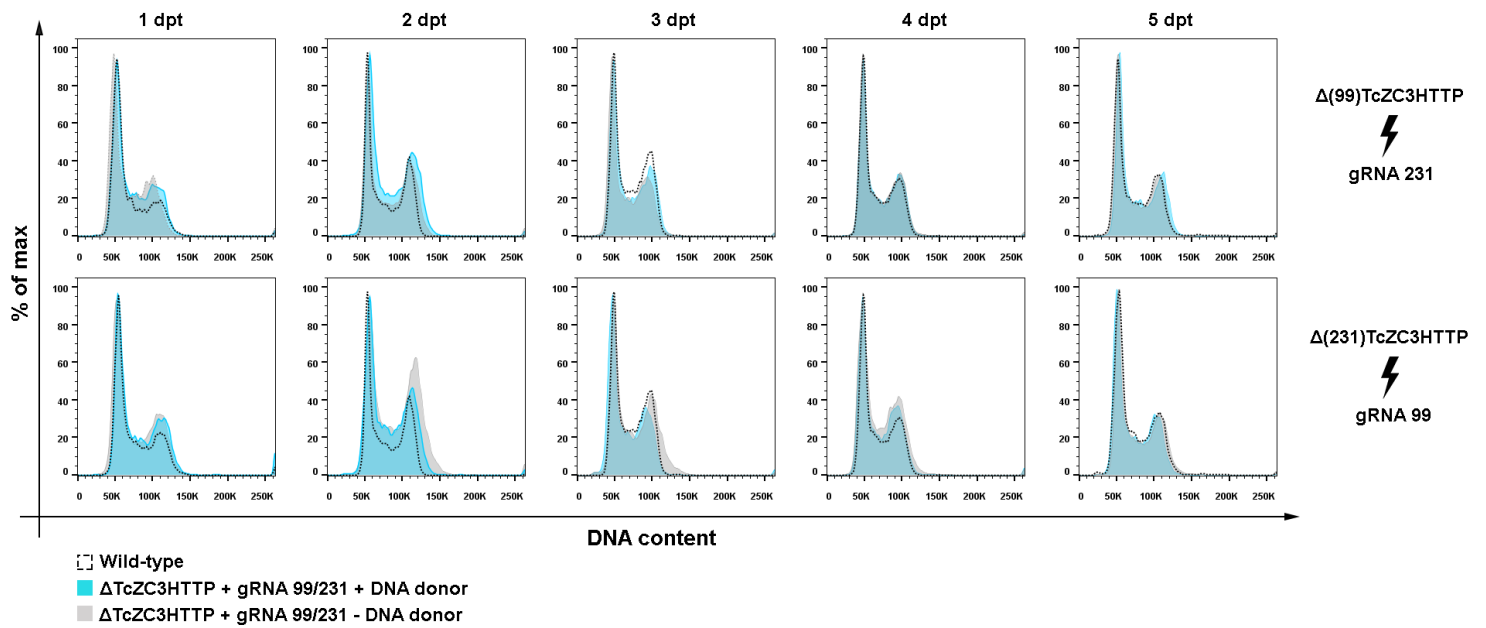


TcZC3H29  
TcAKR

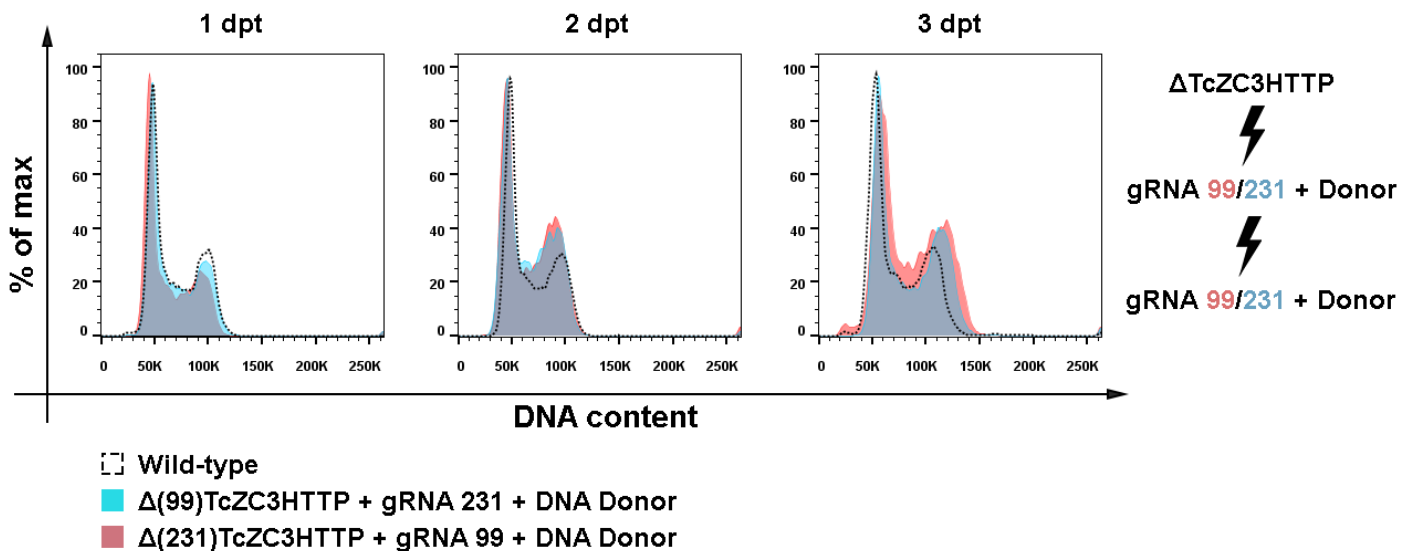
**Apêndice 4. Análise da expressão de TcZC3H29 nos parasitos hemi-nocautes transfetados.** Ensaio de imunodeteção por *western blot* na população clonal hemi-nocaute (confirmada por PCR seguida de digestão com *BglIII*) para TcZC3H29. Essa população foi transfetada novamente com gRNA específico contra TcZC3H29 (gRNA 217) ou com um RNA controle (Ctrl) e o extrato proteico obtido e analisado com anticorpos policlonais  $\alpha$ -TcZC3H29 (1:500). A proteína TcAKR foi utilizada como normalizadora.



**Apêndice 5. Análise da proliferação celular por curva de crescimento das culturas clonais hemi-nocautes (hΔ) e/ou nocautes (Δ) das RBPs TcZC3H39, TcZC3H29 ou TcZC3HHTTP.** (A-B) Clones nocautes e hemi-nocautes para TcZC3HHTTP obtidos a partir dos gRNAs 99 (A) e 231 (B). (C) Clones hemi-nocautes para TcZC3H29. (D) Clones hemi-nocautes para TcZC3H39. O gráfico demonstra o número de células por mL (eixo y) para cada um dos dias analisados (eixo x) após o mesmo inóculo inicial de  $10^6$  parasitas / mL para cada cultura. Os dados plotados no gráfico são oriundos de uma triplicata técnica, sendo que ao menos dois clones foram analisados para o nocaute de TcZC3HHTTP ou o hemi-nocaute de TcZC3H39 ou TcZC3H29. A significância estatística foi calculada a partir do método 2way-Anova e teste Tukey para múltiplas comparações. N=3; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001. A concepção do gráfico, bem como a análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).



**Apêndice 6. Análise do ciclo celular das culturas nocautes para *tczc3http* transfetadas com outro gRNA contra esse gene.** As populações clonais nocaute para TcZC3HTTP, geradas a partir da transfecção do gRNA 99 ( $\Delta(99)\text{TcZC3HTTP}$ ) ou gRNA 231 ( $\Delta(231)\text{TcZC3HTTP}$ ), foram transfetadas com o outro gRNA na presença/ausência do respectivo “DNA donor” e avaliadas ao longo de 5 dias após a transfecção (representados nas colunas de 1 a 5 dpt). Os gráficos trazem a porcentagem total do número de células (eixo y) em relação a quantidade de DNA presente (eixo x).



**Apêndice 7. Análise do efeito de uma segunda transfecção no ciclo celular das culturas nocautes para *tczc3http* transfetadas com outro gRNA contra esse gene.** Inicialmente as populações nocaute para TcZC3HTTP ( $\Delta(99)\text{TcZC3HTTP}$  e  $\Delta(231)\text{TcZC3HTTP}$ ) foram transfetadas com os gRNAs e respectivos “DNA donors” de modo que, as células nocauteadas com o gRNA 99 receberam o gRNA 231 e vice-versa. No terceiro dia após essa transfecção as células foram eletroporadas novamente com os mesmos gRNAs e “DNA donors”, e tiveram seu ciclo celular analisado por citometria

de fluxo. Os gráficos trazem a porcentagem total do número de células (eixo y) em relação a quantidade de DNA presente (eixo x).