

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

RAFAEL FOGAÇA DE ALMEIDA

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO E PARCEIROS DE INTERAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES
PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS EM *Trypanosoma cruzi***

CURITIBA
2021



INSTITUTO CARLOS CHAGAS
DOUTORADO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

RAFAEL FOGAÇA DE ALMEIDA

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO E PARCEIROS DE INTERAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES
PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS EM *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora:
Dr^a. Lyris Martins Franco de Godoy

CURITIBA
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de Doutor em
Biociências e Biotecnologia.

Aos **14 dias do mês de dezembro de dois mil e vinte um, às 13:00 horas**, através de teleconferência <https://us06web.zoom.us/j/4096776887>, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: **Dra. Sheila Cristina Nardelli, Dr. Carlos André Ornelas Ricart e Dr. Christian Macagnan**, com a finalidade de julgar a tese do candidato **Rafael Fogaça de Almeida**, intitulada: “**Análise da modulação e parceiros de interação das modificações pós-traducionais de histonas em Trypanosoma cruzi**”, sob a orientação de **Dra. Lyris Martins Franco de Godoy**, para obtenção do grau de **Doutor** em Biociências e Biotecnologia. O candidato teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do (a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente: **Dra. Sheila Cristina Nardelli**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 14 de dezembro de 2021

Dra. Sheila Cristina Nardelli – ICC/PR

Dr. Carlos André Ornelas Ricart – UnB

Dr. Christian Macagnan Probst – ICC/PR

Candidata: Rafael Fogaça de Almeida

Agradecimentos

À Lyris M. F. de Godoy, pela oportunidade de desenvolver um trabalho de pesquisa tão interessante e desafiador e pelos ensinamentos ao longo do Doutorado.

Aos colegas de laboratório, especialmente Matheus e Junior, pela parceria e ajuda nos experimentos, mas, principalmente, pelas risadas.

Ao pessoal dos laboratórios de Genômica Funcional e de Biologia Molecular e Sistêmica de Tripanossomatídeos pela ajuda, suporte e amizade.

Ao Alejandro e Sheila, pelas avaliações e conselhos ao longo do projeto.

Ao Michel Batista, pela solicitude, parceria e trabalho na plataforma de espectrometria de massas.

Aos colegas da secretaria da pós-graduação do Instituto Carlos Chagas.

Aos técnicos dos laboratórios de suporte à pesquisa do Instituto.

À banca avaliadora desta tese.

À minha família, especialmente aos meus pais, Antonia e Sebastião, por fazerem sempre o melhor possível dentro da condição disponível e pelo incentivo e apoio ininterruptos; e ao meu irmão João Daniel, a primeira pessoa a me falar sobre Ciência.

À Janaína, minha esposa, pelo apoio e companheirismo no desenvolvimento do Doutorado e, principalmente, na minha vida.

“Small changes modifying the distribution in time and space of the same structures are sufficient to affect deeply the form, the functioning, and the behavior of the final product... It is always a matter of using the same elements, of adjusting them, of altering here or there, of arranging various combinations to produce new objects of increasing complexity. It is always a matter of tinkering.”

– François Jacob, “Evolution and Tinkering” (Science, 1977).

RESUMO

Modificações pós-traducionais de histonas (*histone post-translational modifications*, hPTMs) constituem um dos principais mecanismos reguladores do estado da cromatina nos eucariotos, influenciando processos como transcrição e reparo de DNA. Recentemente, a presença de diferentes hPTMs foi descrita em *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, sugerindo que um código de histonas regule a sua cromatina. No entanto, como essas hPTMs são moduladas em condições ambientais importantes no seu ciclo de vida, como durante o estresse nutricional e quais são os parceiros ligantes que as reconhecem, são questões importantes na elucidação dos mecanismos de regulação epigenética de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos. O protocolo aqui otimizado na identificação de hPTMs, permitiu a identificação de 201 marcas de hPTMs de 13 tipos distintos, nas histonas canônicas, variantes e *linker* de *T. cruzi* na sua forma epimastigota em fase exponencial, sendo que 107 destas marcas de histonas foram descritas pela primeira vez, expandindo o número conhecido de hPTMs em quase 2 vezes nesse tripanossomatídeo. Em seguida, o protocolo foi empregado para identificar as hPTMs e analisar sua regulação ao longo das condições exponencial (Epi-3d), estacionário (Epi-5d) e sob estresse nutricional durante 2h (St-2h) e 6h (St-6h) na forma epimastigota de *T. cruzi*. As histonas H2A, H2B, H3 e H3.V apresentaram diferença de abundância entre as condições Epi-3d e St-6h e entre St-2h e St-6h. Os tipos de hPTMs com maior nível global foram monometilação e acetilação e a dimetilação, trimetilação e crotonilação apresentaram diferença significativa entre condições envolvendo St-6h. Um total de 16 peptídeos das histonas H2A, H2B, H3, H4, H2A.Z e H3.V, com um total de 20 hPTMs, apresentaram modulação entre as diferentes condições. Dentre os grupos modulados, destacam-se as acetilações da N-terminal da H2A.Z que aumentaram significativamente de abundância ao longo das condições Epi-3d até St-6h. Em seguida, empregando uma abordagem baseada em XL-MS, o subproteoma e o interatoma do núcleo de epimastigotas de *T. cruzi* foram analisados. A análise do subproteoma da fração enriquecida de núcleos do parasito permitiu a identificação de um total de 1303 proteínas, sendo que 576 (44,2%) possuem localização nuclear de acordo com sua ontologia gênica. Estas proteínas nucleares são funcionalmente relacionadas com ligação de ácidos nucleicos, ribossomo, helicases, subunidades da RNA polimerase II (pol II) e histonas, constituindo o mais amplo estudo do subproteoma nuclear em *T. cruzi*. A análise do interatoma nuclear mostrou que 254 proteínas possuem anotação de interação na base de dados STRING. A análise da subrede envolvendo histonas revelou a interação direta das histonas com outras 42 proteínas identificadas, dentre elas as subunidades da pol II, fatores de transcrição e proteínas com domínios ligantes de cromatina. A análise de proteínas interagindo via *crosslink* (XL-MS) identificou 37 proteínas, dentre elas as histonas H1, H2B e H3. A histona H1 foi identificada em uma espécie de complexo envolvendo outras 10 proteínas, dentre elas uma proteína que apresenta um bromodomínio e um sítio acetilado na C-terminal. A H2B foi identificada interagindo com uma proteína “hipotética” com domínio ENTH/VHS e interage com outras cinco proteínas. A H3 foi identificada interagindo com uma proteína contendo cinco domínios RRM, uma possível *RNA-binding protein*. Interessantemente, a presença de PTMs (mono, di-, trimetilação e crotonilação) foi detectada em 13 das proteínas identificadas interagindo via *crosslinking*. Por fim, os resultados apresentados nesta tese podem servir de base para estudos voltados a compreender os mecanismos epigenéticos de *T. cruzi*, através (i) de um amplo mapa de hPTMs que pode servir de base para estudos funcionais; (ii) de perfis de modulação de hPTMs em importantes condições do ciclo de vida do parasito; e (iii) de um conjunto de proteínas nucleares e suas interações proteína-proteína, através de uma abordagem XL-MS, especialmente as envolvendo histonas e suas PTMs.

Palavras-chave: epigenética; *Trypanosoma cruzi*; modificações pós-traducionais de histona; parceiros de interação; interação proteína-proteína.

ABSTRACT

Histone post-translational modifications (hPTMs) are one of the main regulatory mechanisms of chromatin status in eukaryotes, influencing processes such as transcription and DNA repair. Recently, the presence of different hPTMs was described in *T. cruzi*, the etiologic agent of Chagas Disease, suggesting that a possible histone code regulates its chromatin. However, how these hPTMs are modulated under important environmental conditions in their life cycle, such as during nutritional stress and which are the hPTMs interaction partners, are important points in the elucidation of epigenetic mechanisms of *T. cruzi* and other trypanosomatids. The protocol optimized here for the identification of hPTMs, allowed the identification of 201 hPTM marks of 13 different types, in the canonical, variant and linker histones of *T. cruzi* epimastigote and 107 of these histone marks were described for the first time, expanding the known number of hPTMs by almost 2-fold in this trypanosomatid. Then, the protocol was used to identify hPTMs and analyze their regulation in different *T. cruzi* epimastigote conditions, namely exponential (Epi-3d), stationary (Epi-5d) and under nutritional stress during 2h (St-2h) and 6h (St-6h). Histones H2A, H2B, H3 and H3.V showed differences in abundance between Epi-3d and St-6h conditions and between St-2h and St-6h. The hPTMs with the highest global level were monomethylation and acetylation and the dimethylation, trimethylation and crotonylation showed a significant difference between conditions involving St-6h. A total of 16 peptides, with a total of 20 hPTMs from the histones H2A, H2B, H3, H4, H2A.Z and H3.V, showed modulation between different conditions. Among the modulated clusters, the N-terminal acetylations of H2A.Z significantly increased in abundance from Epi-3d to St-6h conditions. Then, employing an XL-MS-based approach, the subproteome and interactome of the epimastigote nucleus of *T. cruzi* were analyzed. The subproteome analysis of the enriched fraction of parasite nuclei allowed the identification of a total of 1303 proteins, of which 576 (44.2%) have nuclear localization according to their gene ontology. These nuclear proteins are functionally related to the binding of nucleic acids, ribosomes, helicases, RNA polymerase II (pol II) subunits and histones, constituting the largest study of the nuclear subproteome in *T. cruzi*. The nuclear interactome analysis showed that 254 proteins have an interaction annotation in the STRING database. The analysis of the subnetwork involving histones revealed the direct interaction of histones with 42 other identified proteins, including pol II subunits, transcription factors and proteins with chromatin-binding domains. The analysis of proteins interacting by crosslinking (XL-MS) identified 37 proteins, including histones H1, H2B and H3. Histone H1 was identified in a complex that involves 10 other proteins, including a protein with a bromodomain and an acetylated site at C-terminus. H2B was identified interacting with a “hypothetical” protein bearing an ENTH/HSV domain that interacts with five other proteins. H3 was identified interacting with a protein containing five RRM domains, a possible RNA-binding protein. Interestingly, the presence of PTMs (monomethylation, dimethylation, trimethylation and crotonylation) was detected in 13 of the proteins interacting by crosslinking. Finally, the results presented in this thesis can serve as a basis for studies aimed at understanding the epigenetic mechanisms of *T. cruzi*, through (i) a broad map of hPTMs that can serve as a basis for functional studies; (ii) hPTM modulation profiles in important conditions of the parasite's life cycle; and (iii) a set of nuclear proteins and their protein-protein interactions, through an XL-MS approach, especially those involving histones and their PTMs.

Keywords: epigenetics; *Trypanosoma cruzi*; histone post-translational modifications; interaction partners; protein-protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – GENÉTICA x EPIGENÉTICA
- FIGURA 2 – NUCLEOSSOMOS VISTOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA
- FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO NUCLEOSSOMO
- FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DAS HISTONAS CANÔNICAS E VARIANTES
- FIGURA 5 – EFEITOS DAS hPTMs NOS NUCLEOSSOMOS
- FIGURA 6 – LIGANTES DAS hPTMs
- FIGURA 7 – ESTUDO DE PROTEÍNAS E DE hPTMs
- FIGURA 8 – CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*
- FIGURA 9 – EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS
- FIGURA 10 – MODELO DE EVENTOS REGULANDO A TRANSCRIÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS
- FIGURA 11 – EXEMPLOS DE PADRÕES DE hPTMs IDENTIFICADOS EM *T. cruzi*
- FIGURA 12 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EMPREGADA NA ANÁLISE DAS hPTMs DE *T. cruzi*
- FIGURA 13 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EMPREGADA NA IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO DAS hPTMs DE *T. cruzi*
- FIGURA 14 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NO ENRIQUECIMENTO DE NÚCLEOS DE *T. cruzi*
- FIGURA 15 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NO PREPARO DE AMOSTRAS DE XL-MS
- FIGURA 16 – ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, FASE ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 17 – NÚMEROS GLOBAIS DE IDENTIFICAÇÃO EM *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 18 – NÍVEL DAS HISTONAS DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 19 – INTENSIDADE DAS hPTMs DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 20 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS hPTMs DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 21 – NÍVEL GLOBAL DE CADA TIPO DE hPTM DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 22 – QUANTIFICAÇÃO DAS hPTMs DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL
- FIGURA 23 – hPTMs REGULADAS AO LONGO DAS CONDIÇÕES EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL DE *T. cruzi*
- FIGURA 24 – OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE NÚCLEOS DE *T. cruzi*
- FIGURA 25 – OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE *CROSSLINKING* DO PROTEOMA DO NÚCLEO DE *T. cruzi*
- FIGURA 26 – NÚMEROS GLOBAIS E QUALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DO SUBPROTEOMA NUCLEAR DE *T. cruzi*
- FIGURA 27 – PROTEÍNAS DO NÚCLEO DE *T. cruzi*
- FIGURA 28 – INTERACTORES DAS HISTONAS IDENTIFICADOS NO SUBPROTEOMA DO NÚCLEO DE *T. cruzi*
- FIGURA 29 – MAPA DAS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA NUCLEARES DE *T. cruzi* IDENTIFICADAS POR XL-MS
- FIGURA A1 – CORREÇÕES PONTUAIS DA FIGURA 5 DO ARTIGO
- FIGURA A2 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS HISTONAS H3 E H3.V DE *T. cruzi*
- FIGURA A3 – PERFIL CROMATOGRÁFICO REPRESENTATIVO DOS PEPTÍDEOS DE EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL EM GeLC-MS/MS e LC/MS/MS
- FIGURA A4 – GRUPOS DE PEPTÍDEOS MODULADOS NA ABORDAGEM LC-MS/MS
- FIGURA A5 – GRUPOS DE PEPTÍDEOS MODULADOS NA ABORDAGEM GeLC-MS/MS
- FIGURA A6 – *CROSSLINKING* DE BSA COM CONCENTRAÇÃO CRESCENTE DE DSSO
- FIGURA A7 – EXEMPLO DE ESPECTRO DE *CROSSLINK* IDENTIFICADO EM AMOSTRA DE NÚCLEO DE *T. cruzi*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS

TABELA 2 – ESTRATÉGIAS (BASEADAS EM LC-MS) DE IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO DE hPTMs

TABELA 3 – DIFERENTES VERSÕES PEPTÍDICAS MODIFICADAS IDENTIFICADAS NAS HISTONAS DE *T. cruzi*

TABELA 4 – ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS NUCLEARES DE *T. cruzi*

TABELA 5 – RESUMO DAS PROTEÍNAS NUCLEARES IDENTIFICADAS POR XL-MS EM *T. cruzi*

LISTA DE ABREVIATURAS

ac	acetilação
AcAm	acetato de amônio
ACN	acetonitrila
BDF	<i>bromodomain fator</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i>
cr	crotonilação
cit	citrulinação
CSM	<i>Crosslink Spectrum Match</i>
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloro
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSBU	<i>disuccinimidyl dibutyric urea</i>
DSSO	<i>disuccinimidyl sulfoxide</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetate</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
gl	glutarilação
HCD	<i>Higher energy Collisional Dissociation</i>
HCl	ácido clorídrico
hib	2-hidroxiisobutirilação
hPTM	<i>histone post-translational modification</i>
kDa	kilo Dalton
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>
LFQ	<i>label-free quantification</i>
LIT	<i>liver infusion tryptose</i>
ma	malonilação
MBT	<i>malignant brain tumour</i>
me	metilação
me ₂	dimetilação
me ₃	trimetilação
MS	<i>mass spectrometry</i>
NaCl	cloreto de sódio
ncRNAs	<i>non-coding RNA</i>
NH ₄ HCO ₃	bicarbonato de amônio
NH ₄ OH	hidróxido de amônio
oh	hidroxilação
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	pares de base
ph	fosforilação
PHD	<i>plant homeodomain</i>
pol II	RNA polimerase II

PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i>
PTM	<i>post-translational modification</i>
PWWP	<i>Pro-Trp-Trp-Pro</i>
RBP	<i>RNA-Binding Protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	<i>retention time</i>
SCX	<i>strong cation exchange</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
StageTip	<i>stop-and-go extraction tip</i>
su	<i>succinilação</i>
TAU	<i>triatomine artificial urine</i>
ub	<i>ubiquitinação</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
	1.1 A epigenética.....	2
1.1.1	É na cromatina onde atuam os mecanismos epigenéticos	3
1.1.2	As histonas canônicas e variantes	5
1.1.3	As modificações pós-traducionais de histonas (hPTMs).....	7
1.1.4	Funções das hPTMs na cromatina.....	11
1.1.5	Como as hPTMs e seus parceiros de interação são estudados?.....	13
	1.2 Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas.....	17
1.2.1	<i>T. cruzi</i> possui um ciclo de vida complexo	18
1.2.2	A importância do estresse nutricional no ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	19
1.2.3	Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos	20
1.2.4	Regulação epigenética em <i>T. cruzi</i>	23
1.2.5	hPTMs de <i>T. cruzi</i>	24
1.2.6	Parceiros de interação de hPTMs de <i>T. cruzi</i>	26
2	OBJETIVOS	29
	2.1 Objetivo geral	29
	2.2 Objetivos específicos	29
3	METODOLOGIA.....	30
	3.1 Preparo de amostras e análise das hPTMs de <i>T. cruzi</i>.....	30
3.1.1	Cultura de células.....	31
3.1.2	Extração e enriquecimento de histonas	31
3.1.3	Derivatização de histonas em gel (GeLC-MS/MS).....	32
3.1.4	Derivatização de histonas em solução (LC-MS/MS)	32
3.1.5	Proteólise de histonas em gel (GeLC-MS/MS).....	33
3.1.6	Proteólise de histonas em solução (LC-MS/MS)	33
3.1.7	Análise dos peptídeos de histonas por nanoLC-MS/MS.....	34
3.1.8	Identificação dos peptídeos e hPTMs.....	34
3.1.9	Análise da modulação dos peptídeos modificados por hPTMs.....	35
	3.2 Identificação de parceiros de interação de histonas e suas PTMs em <i>T. cruzi</i>.....	36
3.2.1	Enriquecimento de núcleos de <i>T. cruzi</i>	36
3.2.2	Análise dos núcleos por microscopia de fluorescência	37

3.2.3	<i>Crosslinking</i> e espectrometria de massas (XL-MS) na identificação de ligantes de histonas e suas PTMs	38
3.2.4	Aquisição de dados LC-MS/MS para identificação dos parceiros de interação.....	39
3.2.5	Análise bioinformática do proteoma nuclear e dos parceiros de interação	40
CAPÍTULO 1.....		41
AMPLIAÇÃO DO MAPA DE hPTMs EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>		41
1.1	Otimização do protocolo de identificação de hPTMs de <i>T. cruzi</i>	42
1.2	Atualização do mapa das hPTMs de <i>T. cruzi</i>	46
DISCUSSÃO – Capítulo 1		60
CAPÍTULO 2.....		64
ANÁLISE DA MODULAÇÃO DAS hPTMs DE <i>T. cruzi</i> AO LONGO DO ESTRESSE NUTRICIONAL		64
2.1	Identificação dos sítios de PTMs de histonas canônicas, variantes e <i>linker</i> de <i>T. cruzi</i> em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional	65
2.2	Modulação de PTMs de histonas canônicas, variantes e <i>linker</i> de <i>T. cruzi</i> em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional	68
DISCUSSÃO – Capítulo 2		76
CAPÍTULO 3.....		79
IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS LIGANTES DAS HISTONAS E SUAS PTMs EM <i>T.cruzi</i>		79
3.1	Identificação <i>in situ</i> de interações proteína-proteína nucleares de <i>T. cruzi</i>	80
3.2	Análise do subproteoma nuclear de <i>T. cruzi</i>	81
3.3	Análise XL-MS de parceiros de interação de histonas e hPTMs em <i>T. cruzi</i>	88
DISCUSSÃO - Capítulo 3		92
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS		95
REFERÊNCIAS		98
ANEXOS		109

1 INTRODUÇÃO

1.1 A epigenética

A epigenética é, atualmente, um dos campos mais estudados da Biologia. O entendimento sobre o que é epigenética vem evoluindo desde que Conrad Hal Waddington esboçou seus primeiros conceitos nos anos 1930 como uma maneira de integrar genética e embriologia (NICOGLOU, 2018). E em 1942, Waddington sugere o termo ‘epigenética’ a fim de qualificar os estudos dos mecanismos de desenvolvimento embrionário e “epigenótipo” para os complexos processos entre (e que conectam) o genótipo e fenótipo (WADDINGTON, 1942).

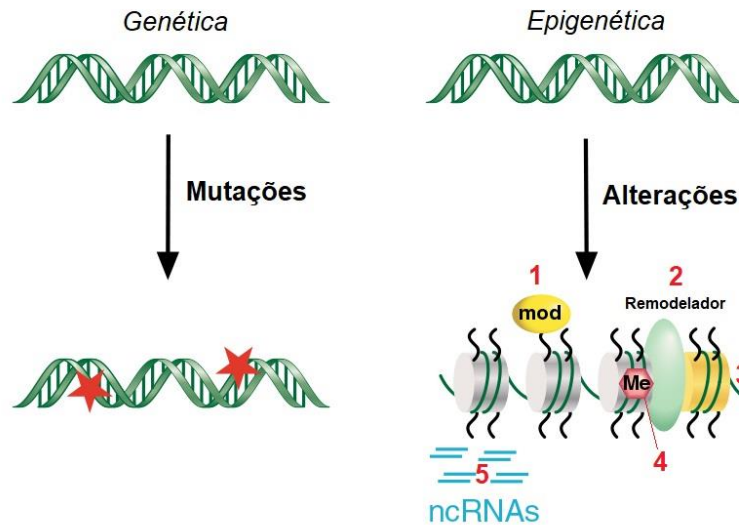
Foi somente a partir dos anos 1990 que os estudos e o conceito *molecular* de epigenética ganharam cada vez mais força, e sua definição passou a incluir três características específicas: 1) a estabilidade celular ou a "memória" de mudanças epigenéticas; 2) o impacto das mudanças epigenéticas na expressão gênica/função gênica; 3) o fato de que as mudanças não envolvem modificações da sequência de DNA (NICOGLOU; MERLIN, 2017).

Novos avanços no conhecimento estão ajustando essas características e ampliando o conceito de epigenética para todas as alterações da atividade gênica que não são devidas a mudanças na sequência do DNA, mas a outras alterações moleculares, envolvendo mecanismos como modificações pós-traducionais de histonas (hPTMs, do inglês *histone Post-Translational Modifications*), mudanças na estrutura da cromatina e ação de RNAs não-codificantes. Algumas regiões de DNA metilado, alterações estruturais de nucleossomos e até mesmo algumas modificações de histonas (como metilação da arginina), podem ser estáveis através de divisões celulares. Outros, no entanto, ao menos até o momento, não se mostraram preservados através da divisão e proliferação celular, e ainda são chamados, na literatura, como “mecanismos epigenéticos”. Ou seja, sua estabilidade/hereditariedade não é mais uma condição *sine qua non* de epigenética. Ainda, muitas dessas modificações e mudanças da cromatina são reversíveis e, portanto, é improvável que todas sejam propagadas através da linha germinativa. Conseqüentemente, qualquer variação fenotípica que não seja atribuível à variação genética (sequência de DNA), mas sim a qualquer outra modificação molecular da cromatina poderia, na verdade, ser considerada, em termos gerais, epigenética (NICOGLOU, 2018; NICOGLOU; MERLIN, 2017).

Dentre os mecanismos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina e modulam o uso

do genoma os principais são: hPTMs, remodeladores da cromatina, histonas variantes, metilação do DNA e RNAs não codificantes (ncRNAs) (FIGURA 1). Juntos, esses mecanismos fornecem um conjunto de caminhos inter-relacionados que criam variação na estrutura da cromatina.

FIGURA 1 – GENÉTICA x EPIGENÉTICA



FONTE: adaptado de ALLIS et al., 2015. Na Genética as mutações (estrelas vermelhas) do DNA são hereditárias somaticamente e através da linha germinativa. Na Epigenética, alterações na estrutura da cromatina, modulam o uso do genoma por (1) hPTMs, (2) remodeladores da cromatina, (3) histonas variantes, (4) metilação do DNA e (5) ncRNAs. As marcas no molde da cromatina podem ser hereditárias através da divisão celular e contribuir coletivamente para determinar o fenótipo celular.

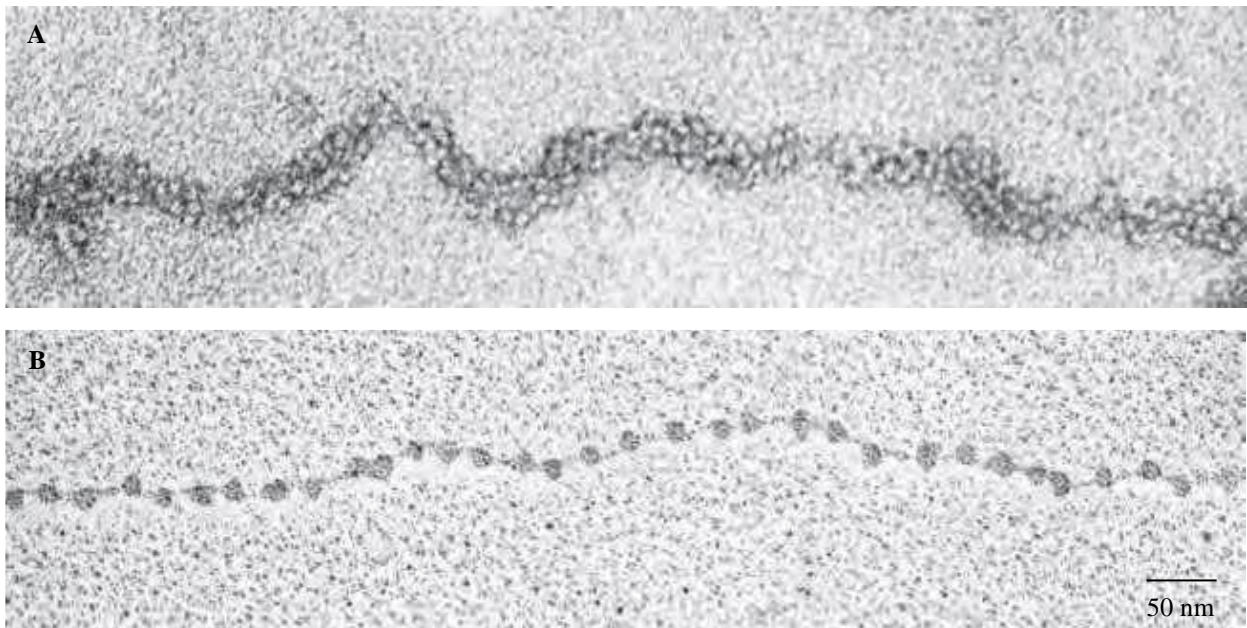
Modificações transitórias, como hPTMs, são interessantes porque impõem mudanças na cromatina em resposta a estímulos intrínsecos e externos e, ao fazê-lo, regulam o acesso da maquinaria transcricional, necessária para ler o DNA. Isso estabelece "estados epigenéticos" ou meios de conseguir a memória celular. Nesta perspectiva, estas "assinaturas" da cromatina podem ser vistas como um sistema altamente organizado de armazenamento de informações que podem indexar regiões distintas do genoma e acomodar uma resposta aos estímulos do ambiente, ditando a expressão gênica (ALLIS et al., 2015).

1.1.1 É na cromatina onde atuam os mecanismos epigenéticos

Como mencionado, a cromatina é o palco onde atuam os mecanismos epigenéticos. A cromatina é formada por material genético (DNA) e proteínas, majoritariamente histonas. Esse

complexo DNA-proteína está organizado em unidades repetitivas chamadas nucleossomos (KORNBERG, 1974, 1977). Quando o conteúdo do núcleo interfásico é analisado por microscopia eletrônica a cromatina aparece como uma fibra de aproximadamente 30 nm (FIGURA 2A) e se for levemente descompactada, até aproximadamente 11 nm, é possível visualizar os nucleossomos conectados pelo DNA, como um colar de contas (FIGURA 2B).

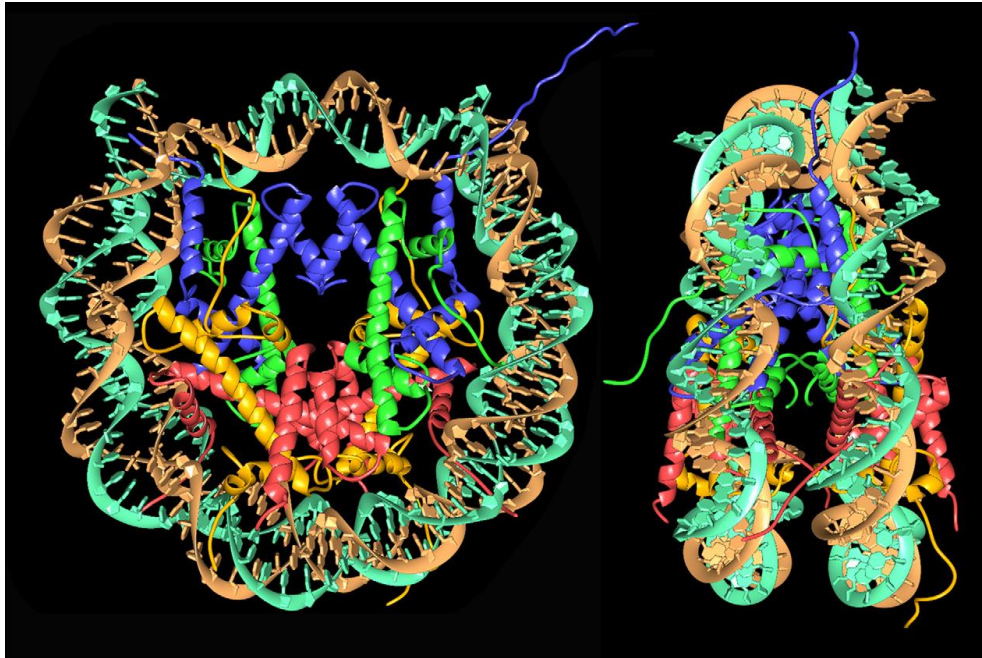
FIGURA 2 – NUCLEOSSOMOS VISTOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA



FONTE: ALBERTS et al., 2015. (A) A cromatina isolada de um núcleo interfásico aparece por microscopia eletrônica como um fio de 30 nm de espessura. (B) Eletromicrografia da cromatina que foi experimentalmente descompactada, (ou descondensada), até aproximadamente 11 nm, mostrando os nucleossomos como “contas em um colar”.

Cada nucleossomo consiste em um octâmero (ou *core*) de histonas (contendo duas cópias de cada histona central H2A, H2B, H3 e H4) enovelado por ~146 pb de DNA e os nucleossomos encontram-se separados entre si por ~50 pb de DNA livre, chamado DNA de ligação (FIGURA 3). Além das histonas centrais, existe a histona H1 (ou *linker*), que está associada ao DNA que liga diferentes nucleossomos e contribui para o enovelamento e estabilização da cromatina na forma de cromossomos (LUGER et al., 1997; MCGHEE; FELSENFELD, 1980; WIDOM, 1989).

FIGURA 3 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO NUCLEOSSOMO



FONTE: LUGER et al., 1997. As fitas de DNA estão em marrom e turquesa. A histona H2A está em amarelo; H2B, em vermelho; H3 em azul; H4 em verde.

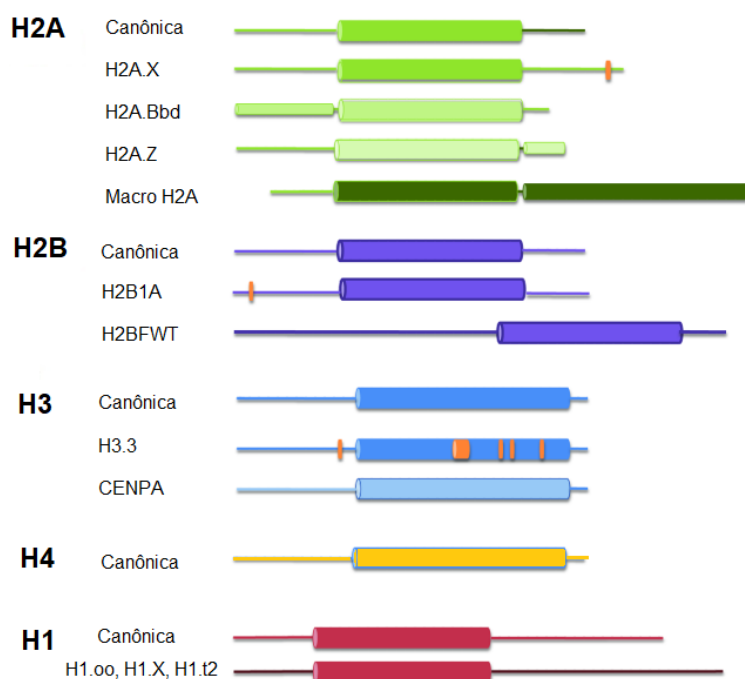
A regulação da estrutura da cromatina depende de como estão organizados os nucleossomos. Um “estado heterocromático” ocorre quando há uma maior ordem de organização, ou seja, maior compactação dos nucleossomos e por consequência expressão gênica limitada nessa região. Já um “estado eucromático” ocorre quando os nucleossomos estão em menor ordem de condensação e, dessa forma, maior nível de expressão gênica é observado. No entanto, a fibra de cromatina nem sempre é formada por arranjos espaciais regulares. Os nucleossomos podem ser irregularmente compactados e dobrados em estruturas de diferentes ordens e em diferentes regiões do genoma durante um momento específico da célula ou estágio do ciclo celular (ALLIS et al. 2015). Diferentes mecanismos contribuem para esse dinamismo (FIGURA 1).

1.1.2 As histonas canônicas e variantes

As histonas são proteínas com carga positiva (possuem elevada quantidade de lisinas e argininas) que estão associadas ao DNA eucariótico. As histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) possuem tamanho variando de 11 a 15 kDa e a H1 humana apresenta aproximadamente 21 kDa

(ALBERTS et al., 2015). As histonas canônicas podem apresentar versões cujas sequências apresentam diferentes aminoácidos em sua sequência, são chamadas de histonas variantes. Tanto histonas canônicas quanto as variantes apresentam uma estrutura constituída por um domínio globular (ou enovelado) relativamente conservado e regiões das caudas N e C terminal, menos conservadas (FIGURA 4). As regiões N e C-terminal ficam expostas no nucleossomo, ou seja, não ficam em contato direto com o DNA.

FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA DAS HISTONAS CANÔNICAS E VARIANTES



Fonte: adaptado de (ARNAUDO; MOLDEN; GARCIA, 2011). Representação da estrutura básica das histonas canônicas e variantes. Histonas que estão em diferentes tons da mesma cor são da mesma família de histonas, mas têm diferenças na sequência. As caixas representam de maneira simplificada o domínio globular da histona que é formado por três regiões α -hélices separadas por duas alças curtas. As linhas laranja representam variações de sequência sítio específicas.

Os genes das histonas canônicas não possuem íntrons e ocorrem em grupos, facilitando sua regulação conjunta, sua expressão é dependente da replicação, ou seja, está ligada à fase S do ciclo celular. Em contraste, os genes das histonas variantes são independentes da replicação e ficam fora dos grupos, podem conter íntrons e ocorrem em baixo número de cópias (ARNAUDO; MOLDEN; GARCIA, 2011). Desse modo, os nucleossomos podem conter histonas variantes que alteram a sua função e, ademais, as cópias destas histonas no nucleossomo podem ainda serem

assimetricamente modificadas por hPTMs, diversificando ainda mais as funções de cada nucleossomo na cromatina (KURUMIZAKA; KUJIRAI; TAKIZAWA, 2021; VOIGT et al., 2012).

1.1.3 As modificações pós-traducionais de histonas (hPTMs)

As histonas podem ser modificadas de maneira enzimática através da ligação covalente de grupos químicos, como acetil e metil, a aminoácidos como lisina e arginina, por enzimas específicas, como acetiltransferases e metiltransferases, respectivamente. As histonas também podem ser modificadas de maneira não-enzimática através da adução covalente de grupos químicos reativos a um aminoácido com cadeia lateral nucleofílica (HARMEL; FIEDLER, 2018).

Cada uma destas modificações nas histonas – também denominadas “marcas de histona” – podem ser adicionadas e removidas de maneira dinâmica e são reconhecidas por proteínas ou complexos proteicos que interpretam esse sinal e desencadeiam funções específicas (GARDNER; ALLIS; STRAHL, 2011; JENUWEIN; ALLIS, 2001; STRAHL; ALLIS, 2000). Disfunções na maneira como as histonas são modificadas, por exemplo devido a mutações nas enzimas modificadora e/ou presença em níveis aberrantes, podem levar a alterações no funcionamento celular relacionados a regulação do ciclo celular, reparo e replicação de DNA, etc., o que pode levar a condições graves, como o câncer (NOBERINI et al., 2019; SHEN; LAIRD, 2013).

Até 2015, haviam sido descritos 20 tipos diferentes de hPTMs em eucariotos (ZHAO; GARCIA, 2015). Desde então, outros tipos de hPTMs foram descritos, incluindo modificações não-enzimáticas (CHAN; MAZE, 2020; GARCÍA-GIMÉNEZ; ROMÁ-MATEO; PALLARDÓ, 2019), resultando em 36 tipos de hPTMs atualmente conhecidas (TABELA 1). Muitas das recentes hPTMs são classificadas como acilações de cadeia curta, similares a acetilação de lisina, mas com comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, hidrofobicidade e cargas distintos, como, por exemplo, crotonilação, 2-hidroxiisobutirilação, malonilação, succinilação e glutarilação (SABARI et al., 2017). Em sua maioria, as hPTMs já descritas são catalisadas de maneira enzimática e afetam, de modo geral e em algum grau, principalmente a transcrição e/ou a estabilidade do nucleossomo.

TABELA 1 – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS

<i>hPTM</i>	<i>aa</i>	<i>Efeito</i>	<i>Organismo</i>	<i>Exemplo(s) de Sítio(s)</i>	<i>Referência</i>
Acetilação	K	Ativação da transcrição; dinâmica do nucleossomo; deposição de histona	Sc; Hs; Dm	H2AK7;H2BK5; H3K9; H3K64; H4K5; H4K12; H4K16	(AKHTAR; BECKER, 2000; DI CERBO et al., 2014; KRUHLAK et al., 2001; PUERTA et al., 1995; SUKA et al., 2001)
Monometilação	K;R	Ativação da transcrição	Hs; Sc	H3K4; H3K9; H3K27; H3K36; H3K79	(BARSKI et al., 2007; MARTIN; ZHANG, 2005)
Dimetilação	K;R	Ativação da transcrição; Repressão da transcrição	Hs	H3R2; H1K16; H4K20	(LU et al., 2008; MIGLIORI et al., 2012; TWEEDIE-CULLEN; RECK; MANSUY, 2009)
Trimetilação	K	Repressão da transcrição	Hs	H3K9; H3K27; H4K20	(BARSKI et al., 2007; LU et al., 2008; MARTIN; ZHANG, 2005)
Fosforilação	S;T;Y	Fosforilação específica da mitose; reparo de DNA; ativação da transcrição	Sc; Dm; Hs	H3T11; H4S1; H3S10	(CHEUNG et al., 2005; LO et al., 2001; PREUSS; LANDSBERG; SCHEIDTMANN, 2003)
Butirilação	K	Regulação da transcrição	Hs	H4K5; H4K8	(CHEN et al., 2007; GOUDARZI et al., 2016)
Crotonilação	K	Associada a sítios de início da transcrição	Hs; Mm	H2AK119; H2BK34	(TAN et al., 2011)
2-hidroxi-isobutirilação	K	Ativação da transcrição	Mm	H4K8	(DAI et al., 2014)
Malonilação	K	Regulação da estrutura e função da cromatina; relacionada a oxidação de ácidos graxos e metabolismo mitocondrial	Hs; Mm	H2BK5;H2BK34; H3K79; H3K122	(COLAK et al., 2015)
Succinilação	K	Regulação da estrutura e função da cromatina	Hs; Sc; Mm; Dm	H4K77;H3K79; H4K31	(XIE et al., 2012)
Glutarilação	K	Desestabilização do nucleossomo, transcrição permissiva	Hs	H2BK5;H2BK116; H2BK120	(TAN et al., 2014)

TABELA 1 – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS (CONTINUAÇÃO)

<i>hPTM</i>	<i>aa</i>	<i>Efeito</i>	<i>Organismo</i>	<i>Exemplo(s) de Sítio(s)</i>	<i>Referência</i>
Hidroxilação	Y	Regulação da estrutura do nucleossomo	Hs	H2BY83; H4Y88	(TAN et al., 2011)
5-Hidroxilação	K	Possível regulação da transcrição ou rearranjo cromossômico	Mm	H3 ₂₁₋₄₀ ; H4 ₁₋₂₃	(UNOKI et al., 2013)
O-GlcNAcilação	S;T	Regulação da transcrição	Hs	H4S47; H2AT101	(SAKABE; WANG; HART, 2010)
Propionilação	K	Ativação da transcrição	Hs	H3K14	(KEBEDE et al., 2017)
Ubiquitinação	K	Reparo de DNA; ativação da transcrição	Hs	H2AK13;H2AK15; H2BK34	(GATTI et al., 2012; MATTIROLI et al., 2012; WU et al., 2011)
SUMOilação	K	Repressão da transcrição	Hs; Sc	H2AK126;H2BK16; H2BK17; H4K59	(NATHAN et al., 2006; SHIIO; EISENMAN, 2003)
ADP-ribosilação	E	Ativação da transcrição; reparo de DNA e replicação	Hs	H1E2; H1E14; H2BE2	(OGATA et al., 1980; OGATA; UEDA; HAYAISHI, 1980; VISOCHEK, 2005)
Isomerização de prolina	P	Ativação da transcrição	Sc	H3P30; H3P38	(NELSON; SANTOS-ROSA; KOUZARIDES, 2006)
Citrulinação	R	Reprogramação celular; ligação de nucleossomos	Mm	H1R54	(CHRISTOPHOROU et al., 2014)
Biotinilação	K	Diminuição em resposta a quebras de DNA; efeitos na proliferação celular	Hs	H4K12	(KOTHAPALLI; SARATH; ZEMPLINI, 2005; STANLEY; GRIFFIN; ZEMPLINI, 2001)
Lactilação	K	Transcrição permissiva	Hs; Mm	H3K18	(ZHANG et al., 2019)
Benzoilação	K	Transcrição permissiva	Hs	H2AK9; H3K23	(HUANG et al., 2018)

TABELA 1 – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE HISTONAS (*CONTINUAÇÃO*)

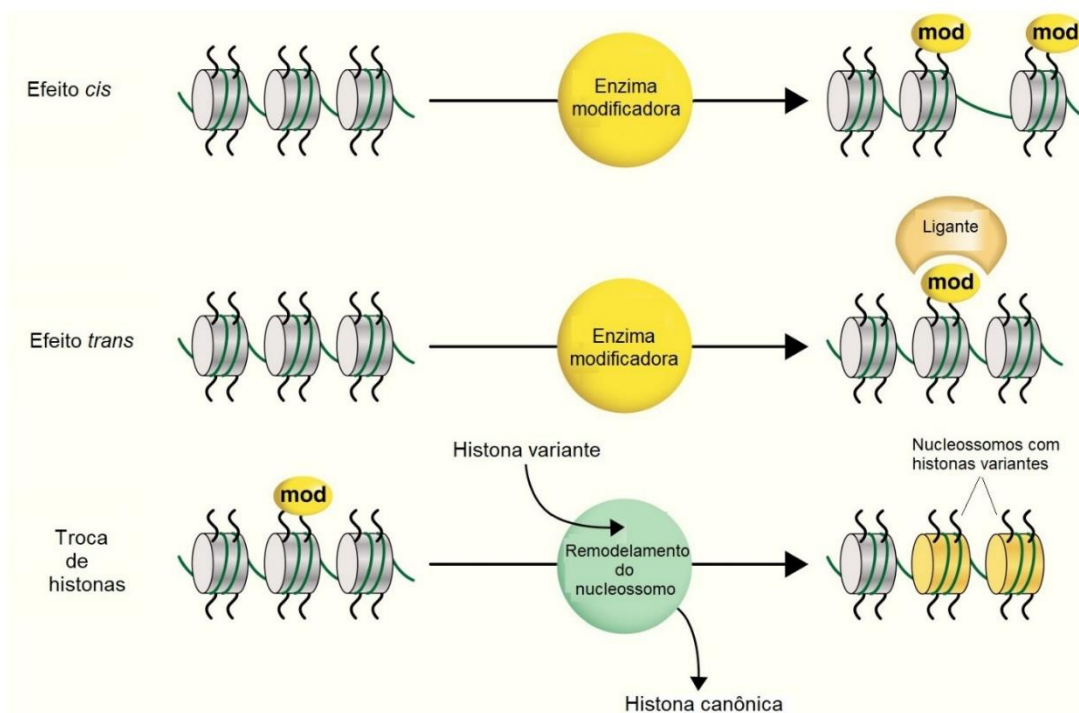
<i>hPTM</i>	<i>aa</i>	<i>Efeito</i>	<i>Organismo</i>	<i>Exemplo(s) de Sítio(s)</i>	<i>Referência</i>
Dopaminilação	Q	Transcrição alterada (permissiva? repressiva? ainda não se sabe)	Mm	H3Q5	(LEPACK et al., 2020)
Serotonilação	Q	Transcrição permissiva	Hs; Mm	H3Q5	(FARRELLY et al., 2019)
S-Palmitoilação	C	Organização nuclear; regulação da cromatina	Hs	H3.1/H3.2/H3.2C110	(WILSON et al., 2011)
O-Palmitoilação	S	Transcrição repressiva	Hs	H4S47	(ZOU et al., 2011)
<u>Formilação</u>	K	Regulação da cromatina	Hs	H1K16;H2BK34; H3K64; H4K79	(JIANG et al., 2007; WIŚNIEWSKI; ZOUGMAN; MANN, 2008)
Glicação	K;R	Altera a estabilidade do nucleossomo	Hs	H3R8; H3R26; H3R53	(GALLIGAN et al., 2018; ZHENG et al., 2019)
4-Oxonanoilação (ou 4-ONilação)	K	Desestabilização do nucleossomo	Hs; Mm	H3K23; H3K27	(GALLIGAN et al., 2014; JIN et al., 2016)
Acroleinação	K	Desestabilização do nucleossomo	Hs	H4K5; H4K12	(FANG et al., 2016)
S-glutationilação	C	Desestabilização do nucleossomo	Hs	H3.2/H3.3C110	(GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013)
Homocisteinilação	K	Transcrição repressiva	Hs	H3K14;H3K18; H3K27; H3K79	(XU et al., 2015; ZHANG et al., 2018)
Nitrosilação	C;T	Estabilização o nucleossomo (?)	Hs	H4T72; H3T41	(GARCÍA-GIMÉNEZ; ROMÁ-MATEO; PALLARDÓ, 2019)
Sulfonilação	C	Desestabilização de nucleossomo	Hs	H3.1C96; H3.1C110	(GARCÍA-GIMÉNEZ; ROMÁ-MATEO; PALLARDÓ, 2019)

FONTE: o autor (2021). hPTMs enzimáticas (negrito) e não-enzimáticas. Exemplos de sítios se referem a posição sítio-específica da hPTM cujo efeito na cromatina foi observado. aa: aminoácido; C: cisteína; E: ácido glutâmico; K: lisina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: treonina; Y: tirosina; Dm: *Drosophila melanogaster*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.4 Funções das hPTMs na cromatina

O arranjo dos nucleossomos pode ser alterado por efeitos *cis* e *trans* resultantes da adição e remoção das hPTMs e também pela substituição de histonas canônicas e variantes (FIGURA 5).

FIGURA 5 – EFEITOS DAS hPTMs NOS NUCLEOSSOMOS

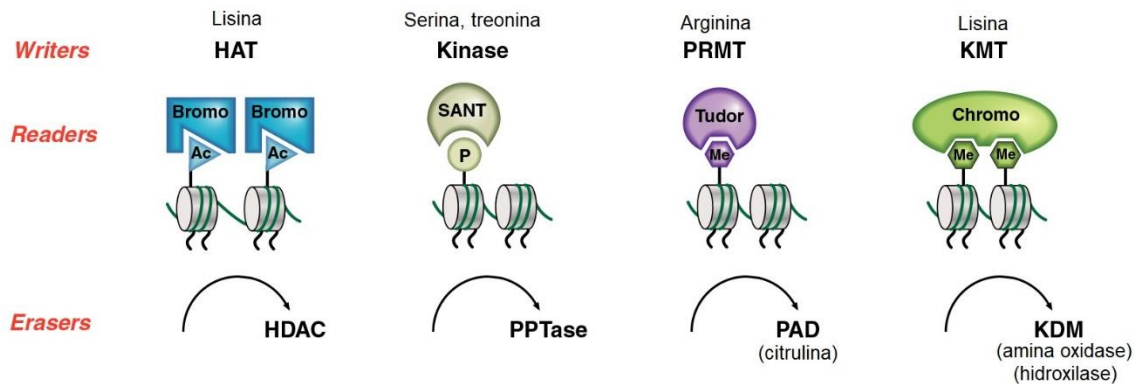


Fonte: adaptado de ALLIS et al. 2015. No efeito *cis* uma modificação (mod) covalente de um resíduo de histona altera a estrutura ou carga e muda a organização da cromatina. No efeito *trans* a modificação no resíduo de histona (por exemplo, metilação de H3K9), resulta no aumento de afinidade para um ligante (por exemplo, a proteína de heterocromatina 1, HP1). A troca de histonas canônicas por variantes, através de um complexo de remodelação, altera a organização da cromatina.

As hPTMs podem modular diretamente o empacotamento da cromatina alterando o estado de carga das histonas (efeito *cis*). Um exemplo desse tipo de ação é a acetilação que neutraliza as cargas positivas da histona, gerando uma expansão localizada da fibra de cromatina e facilitando o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. As hPTMs também podem recrutar ligantes e seus parceiros de ligação associados (efeito *trans*). É o que ocorre, por exemplo, no recrutamento de fatores de transcrição, que mudam o grau de acessibilidade ao DNA e a ordem da estrutura da cromatina, regulando a transcrição. Estes ligantes possuem domínios de ligação conservados que reconhecem tipos distintos de modificações, conforme exemplificado na FIGURA 6. É interessante

destacar que algumas enzimas que realizam a modificação possuem também domínios que podem reconhecer hPTMs, e desse modo funcionam tanto como *writer* quanto como *reader* (ZHANG; COOPER; BROCKDORFF, 2015).

FIGURA 6 – LIGANTES DAS hPTMs



FONTE: adaptado de ALLIS et al., 2015. As hPTMs são adicionadas por enzimas modificadoras de histonas (*writers*), reconhecidas por proteínas que possuem domínios conservados específicos (*readers*) e são removidas das histonas por enzimas hPTM-específicas (*erasers*). HAT: histona acetiltransferase; PRMT: proteína arginina metiltransferase; KMT: lisina metiltransferase; HDAC: histona desacetilase; PPTase: proteína fosfatase; PAD: peptidilarginina desiminase; KDM: lisina demetilase; Ac: acetilação; P: fosforilação; Me: metilação.

Diferentes hPTMs podem ter efeitos (*cis*) distintos mesmo ocorrendo em um mesmo sítio ou em regiões próximas na histona. Exemplos desse efeito hPTM-específico ocorrem nas lisinas 9, 27 e 79 da H3 (H3K9me/K27me/K79me), foram detectados monometiladas próximas de promotores ativos em sítios de início da transcrição. Por outro lado, quando estes mesmos sítios da H3 estão trimetilados (me₃), foram observados associados a repressão gênica (BARSKI et al., 2007). Outro exemplo é a adição de grupos acetil na lisina 16 da histona H4 (H4K16Ac), que provoca a descompactação da cromatina e aumenta a transcrição *in vitro* e *in vivo* (AKHTAR; BECKER, 2000), por outro lado, um sítio muito próximo a este, a lisina 20 da histona H4 trimetilada (H4K20me₃) pode aumentar a compactação da cromatina (LU et al., 2008). Outro exemplo é a lisina 79 da histona H3 (H3K79), que dependendo do tipo de metilação (me, me₂ ou me₃) apresenta diferentes efeitos, enquanto que H3K79me foi detectada modestamente associada com ativação, H3K79me₃ foi observada associada com repressão em células humanas e a H3K79me₂ não demonstrou nenhuma preferência na ativação ou silenciamento gênico (BARSKI et al., 2007). Outros estudos com este sítio monometilado demonstraram que está envolvida no

silenciamento dos telômeros em leveduras (NG et al., 2002) e mamíferos (JONES et al., 2008).

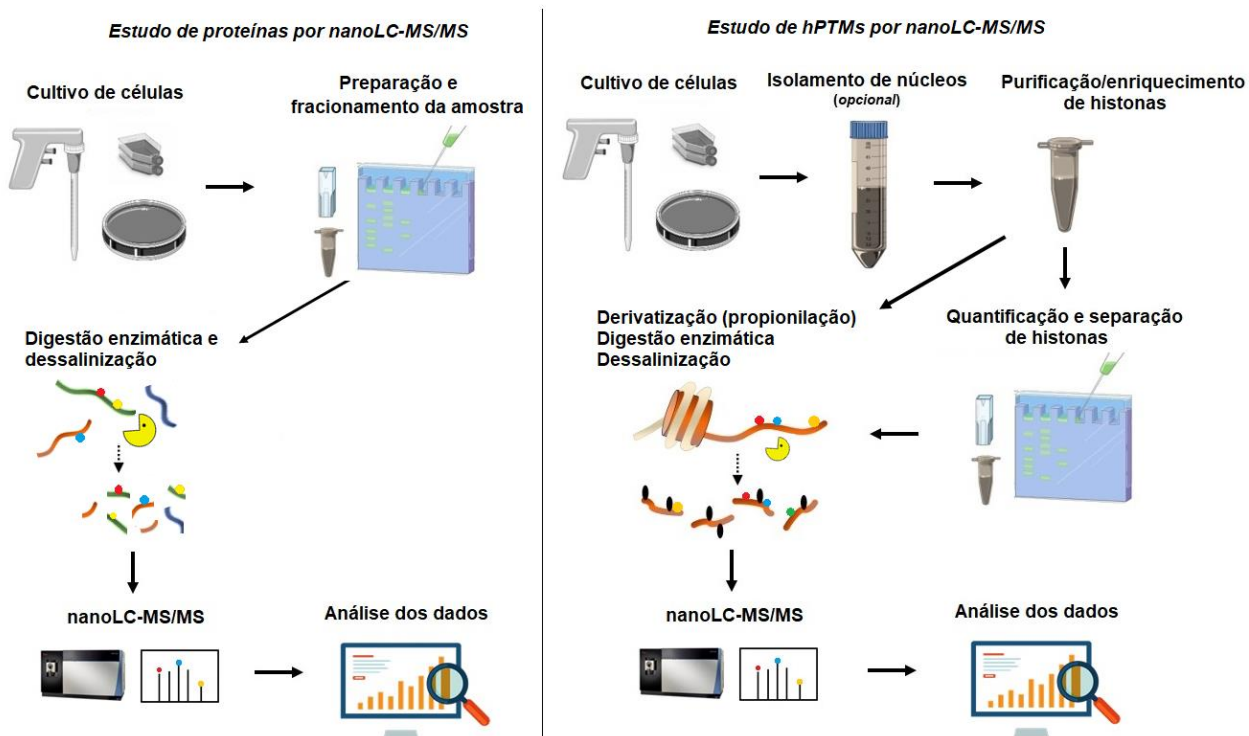
Quando observamos o efeito *trans* das hPTMs temos, por exemplo, os que envolvem o recrutamento de ligantes (*readers*) mediado pela acetilação de lisinas, estes ligantes possuem domínios Bromo (FIGURA 6), que contém quatro regiões helicoidais que formam uma profunda e hidrofóbica cavidade que se liga a um ou múltiplos sítios de acetilação. Outros domínios que reconhecem lisina acetilada são DBD, DPF e Double PH. A fosforilação de serina e treonina é reconhecida por parceiros ligantes chamados SANT, 14-3-3, BIR e Tandem BRCT (MUSSELMAN et al., 2012). A metilação de arginina é reconhecida por ligantes com domínio Tudor e WD40. Já a metilação de lisina é reconhecida por ligantes que possuem domínios Cromo, PHD, MBT, Tudor, ADD, PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro), WD40 e zinc finger CW (MUSSELMAN et al., 2012). Interessantemente, existem ligantes que reconhecem hPTMs pré-existentes (*readers*) que também funcionam como *writers*. Essa capacidade ajuda a manter determinados estados transcricionais que podem ser propagados entre divisões de células, ou seja, como herança epigenética (ZHANG; COOPER; BROCKDORFF, 2015).

1.1.5 Como as hPTMs e seus parceiros de interação são estudados?

A principal estratégia empregada no estudo global de hPTMs é a proteômica baseada em espectrometria de massas (LIN; GARCIA, 2012; SIDOLI; CHENG; JENSEN, 2012), uma abordagem sensível de química analítica que envolve a (nano)cromatografia líquida associada a espectrometria de massas em tandem (nanoLC-MS/MS) e que há muito vem sendo empregada no estudo da biologia molecular, celular e de sistemas (AEBERSOLD; MANN, 2003). Essa estratégia permite a identificação e quantificação em larga escala das hPTMs, análise de sua correção (*crosstalk*) e identificação de seus parceiros ligantes (HUANG et al., 2015).

Em virtude das características bioquímicas das histonas, o estudo de hPTMs requer algumas etapas experimentais específicas em relação ao estudo global de outras proteínas por nanoLC-MS/MS (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ESTUDO DE PROTEÍNAS E DE hPTMs



Fonte: adaptado de (SIDOLI et al., 2016). O estudo proteômico de hPTMs tem algumas peculiaridades em virtude das características bioquímicas das histonas. Após serem enriquecidas na amostra, as histonas precisam ser derivatizadas quimicamente por propionilação, pois são ricas em lisinas, que são os sítios de clivagem da tripsina (enzima utilizada para gerar os peptídeos antes da análise LC-MS), esse processo bloqueia estes sítios evitando que a digestão gere peptídeos muito pequenos e pouco hidrofóbicos, cuja identificação se torna prejudicada na análise por espectrometria de massas.

No estudo de hPTMs por nanoLC-MS/MS é fundamental a redução da complexidade da amostra, que pode ser feita isolando os núcleos, enriquecendo as histonas nas amostras e as separando por eletroforese. Geralmente o enriquecimento das histonas é realizado através de extração ácida ou pela sua purificação por métodos cromatográficos. Devido ao fato de as histonas serem muito ricas em lisinas, que são os sítios de clivagem da tripsina (enzima utilizada para gerar os peptídeos), outra importante etapa experimental é a derivatização das amostras (através da propionilação) para bloqueio das lisinas. A propionilação evita que a digestão com a tripsina gere peptídeos muito pequenos e pouco hidrofóbicos, cuja identificação se tornaria prejudicada na análise por nanoLC-MS/MS. No processo de propionilação, os grupos amina livres das lisinas não-modificadas e monometiladas são convertidas para propionil amidas, o que por sua vez, anula as cargas positivas, necessária para a ligação iônica com a tripsina (que tem um aspartato carregado

negativamente no sítio de ligação) (LIN; GARCIA, 2012). Na sequência, é necessário o emprego de um espectrômetro de massas adequado na caracterização de hPTMs, ou seja, de alta resolução e acurácia de massa capaz de diferenciar massas nominais próximas, como a acetilação e trimetilação de peptídeos de histonas, as quais diferem entre si em apenas 0.03 Da. E, por fim, a análise dos dados deve ser realizada através de *softwares* cujos algoritmos deem conta de identificar diferentes modificações, preferencialmente também capazes de identificar e quantificar peptídeos e modificações através da busca *de novo* nos espectros (NESVIZHSHKII; VITEK; AEBERSOLD, 2007).

Outro ponto importante na compreensão da epigenética da célula é o estudo dos parceiros de interação das hPTMs, pois permite avaliar o efeito de sinalização das hPTM no recrutamento de ligantes e complexos (“*readers*”) e, assim, identificar alvos que desempenham funções específicas no contexto biológico. A identificação destes ligantes pode ser feita através de diferentes estratégias baseadas em espectrometria de massas, como, por exemplo, empregando peptídeos sintéticos modificados em ensaios de *pull-down* (WYSOCKA et al., 2005, 2006) e com marcação metabólica com SILAC (VERMEULEN et al., 2007), em ambos os casos são empregados peptídeos sintéticos com modificações específicas e os possíveis parceiros ligantes são “capturados”. Uma outra estratégia baseada em LC-MS permite o estudo em larga-escala de interatores, ela utiliza um reagente *crosslinker* (XL-MS) que se liga a lisinas que estejam a curtas distâncias (alguns poucos ângstroms, dependendo do reagente), tanto na mesma proteína quanto entre proteínas, permitindo estudos estruturais e de interações entre proteínas, respectivamente (FASCI et al., 2018). E mais recentemente foram sintetizados reagentes *crosslinker* que possuem a capacidade de serem permeáveis a membranas (como o DSSO e o DSBU) (MATZINGER; MECHTLER, 2021), permitindo estudos de proteínas em células vivas (*in vivo* XL-MS) e em organelas (*in situ* XL-MS), desse modo, identificando interações proteína-proteína nativas e até mesmo transitórias (SER; CIFANI; KENTSIK, 2019).

As principais características, vantagens e desvantagens das estratégias empregadas na identificação de parceiros de interação de hPTMs estão compiladas na TABELA 2.

TABELA 2 - ESTRATÉGIAS (BASEADAS EM LC-MS) DE IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO DE hPTMs

Método	Como funciona	Vantagem	Desvantagem	Referência
<i>Pull-down</i> e LFQ-MS	Peptídeos contendo modificações específicas “pescam” ligantes baseado em purificação por afinidade em ensaios sem marcação metabólica (LFQ-MS) e com marcação metabólica (SILAC-MS)	Preparação simples e fácil; permite identificar novos parceiros	Difícil na identificação de parceiros de baixa afinidade; Não elimina parceiros não-específicos	CHAN et al., 2009; EBERL et al., 2013; WYSOCKA et al., 2005, 2006)
<i>Pull-down</i> e SILAC-MS	Peptídeos contendo modificações específicas “pescam” ligantes baseado em purificação por afinidade em ensaios sem marcação metabólica (LFQ-MS) e com marcação metabólica (SILAC-MS)	Quantificação acurada; Elimina a interferência do <i>background</i> de proteínas; permite identificar novos parceiros	Dificuldade na identificação de parceiros de baixa afinidade	LANG et al., 2013; VERMEULEN et al., 2007
<i>Photo-crosslinking</i>	Peptídeos modificados contendo <i>crosslinker</i> capturam ligantes por ligação covalente após serem ativados por UV que torna a interação do ligante irreversível, capturando mesmo interações fracas (como as que envolvem hPTMs)	Permite identificar parceiros de baixa afinidade; Obtém informações sobre a interação entre hPTM e parceiro	Complexo e laborioso; requer a síntese de <i>probes</i> ; Não adequado a análises em larga-escala de interação de parceiros e hPTMs	LI; KAPOOR, 2010; MONTGOMERY; SORUM; MEIER, 2014
<i>Photo-crosslinking</i> e SILAC, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Lisados “leve” e “pesado” são incubados com peptídeo modificado e não modificado, respectivamente. Estes peptídeos contêm <i>photo-crosslinker</i> . Combinam-se os lisados. As proteínas são biotinizadas, purificadas por afinidade e analisadas por LC-MS/MS. As proteínas enriquecidas na fração “leve” são parceiros do peptídeo modificado. Faz-se então o experimento “reverso”. As proteínas identificadas em ambos os experimentos são específicas da hPTM.	Permite identificar parceiros de baixa afinidade; permite a identificação <i>in vivo</i> de interações	Complexo e laborioso; Não adequado a análises em larga-escala de interação de parceiros e hPTMs.	KLEINER et al., 2018; LI et al., 2013
<i>Crosslinker</i> clivável e permeável a membranas (por exemplo, DSSO e DSBU)	Pode-se usar complexos de proteína, organelas ou cultura de células na reação com o reagente <i>crosslinker</i> . Após a digestão os peptídeos <i>crosslink</i> são enriquecidos por SCX e analisados por LC-MS/MS.	É adequado a amostras complexas e estudos de interatomos (é clivado por CID); é permeável a membranas permitindo estudos <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> ; Permite identificar interação de ligantes e hPTMs em larga-escala	A eficiência do <i>crosslinker</i> e a permeabilidade a membranas ainda são baixas; o enriquecimento de peptídeos <i>crosslink</i> ainda é um gargalo; poucos <i>softwares</i> disponíveis para analisar os dados	(BARTOLEC et al., 2020; FASCI et al., 2018; LIU et al., 2018)

Fonte: o autor (2021).

1.2 *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. É um protozoário parasita que ao longo de seu ciclo de vida passa por hospedeiros invertebrados e vertebrados. Dentre estes hospedeiros invertebrados estão insetos da subfamília Triatominae (família Reduviidae) e dentre os hospedeiros vertebrados estão diversos mamíferos, incluindo o homem, no qual provoca a enfermidade conhecida como Doença de Chagas (CHAGAS, 1909). É importante mencionar que antes desse ciclo doméstico, o parasito estabelece um ciclo peridoméstico, quando triatomíneos e alguns animais selvagens (e.g., marsupiais) visitam a área humana em busca de alimento e, antes ainda, apresenta seu ciclo selvagem. Estes três ciclos conectaram os reservatórios, o *T. cruzi*, os vetores e os humanos, e desse modo, o estabelecimento da Doença de Chagas (COURA, 2013).

A Doença de Chagas afeta de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, a maioria na América do Sul, região onde é endêmica e ainda é um grave problema de saúde pública por ser uma doença negligenciada. Na região endêmica da doença, a transmissão ocorre majoritariamente de maneira vetorial. O inseto vetor é um triatomíneo que, devido a seu hábito hematófago, quando infectado, transmite o *T. cruzi* a um hospedeiro vertebrado. Além de vetorial, outras formas de transmissão do *T. cruzi* incluem a ingestão de alimentos contaminados com fezes, urina ou com o próprio triatomíneo que contenham o parasito. O parasito pode ainda ser transmitido de forma congênita, ou ainda através de transfusão de sangue, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (WHO, 2021).

Quanto às implicações clínicas da doença, há duas fases. Na fase aguda podem ocorrer sintomas como febre, inflamação e edema no local de entrada do parasito e hepatoesplenomegalia. Neste período há um grande número de parasitos presentes na circulação, devido ao processo de sucessivos ciclos de invasão celular, multiplicação e liberação de parasitos para a corrente sanguínea. Entre 1-5% dos pacientes pode apresentar sintomas mais severos como miocardite aguda e meningoencefalite (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Essa fase aguda dura de 4-8 semanas e, então, a parasitemia diminui substancialmente. A maioria das pessoas não apresenta sintomatologia ou danos mais severos nessa fase, a doença então se cronifica e 10-30 anos mais tarde, 30-40% desses pacientes desenvolvem sintomas como cardiomiopatia, megaesôfago ou

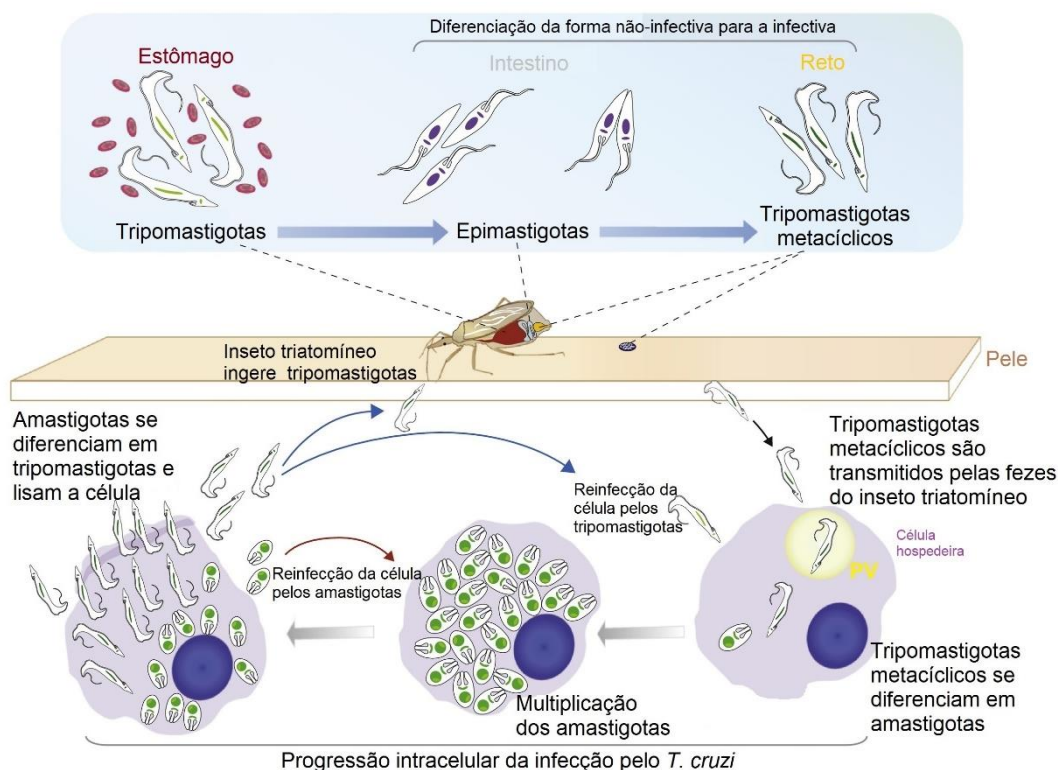
megacólon (ou ambos) e cerca de 10% desenvolvem neuropatias (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Somente dois medicamentos são licenciados para o tratamento da Doença de Chagas, o Benznidazole ou Nifurtimox. Os efeitos colaterais do Nifurtimox são frequentes (43-97%), dentre eles, anorexia, perda de peso, irritabilidade, insônia, náusea, vômito, febre. Já o Benznidazole é mais eficaz e mais tolerável, mas ainda assim, o tratamento é descontinuado em 9-29% dos casos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Estima-se que o custo global anual da doença seja de cerca de US\$ 627,5 milhões em custos de saúde (LEE et al., 2013). Na América do Sul estima-se que a doença causa a perda de 752.000 dias de trabalho por ano devido a mortes prematuras e 1,2 bilhão em produtividade, sendo que no Brasil o absenteísmo dos trabalhadores leva a uma perda de 5-6 milhões por ano (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010). No entanto, mesmo já tendo ultrapassado as fronteiras de sua região endêmica e ganhado caráter de epidemia global (SCHMUNIS; YADON, 2010), a Doença de Chagas é uma enfermidade negligenciada que ainda carece de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de um tratamento realmente eficaz ou mesmo de uma vacina.

1.2.1 *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo

O *T. cruzi* passa, ao longo de seu ciclo de vida, por diferentes hospedeiros e para se adaptar a esses diferentes ambientes o parasito sofre alterações dramáticas em sua morfologia (FIGURA 8). As principais formas que *T. cruzi* apresenta no seu ciclo são as encontradas no tubo digestivo do inseto triatomíneo, a forma epimastigota, que é replicativa e tripomastigota metacíclico, a forma infectiva, que surge a partir da diferenciação do epimastigota no intestino do inseto. As outras formas são os tripomastigotas sanguíneos, que estão presentes na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, reinfectando novas células e podem ser ingeridas pelo triatomíneo hematófago e, por fim, a forma amastigota, presente no interior das células do hospedeiro vertebrado, trata-se de uma forma replicativa e infectiva. Recentemente, a forma epimastigota recém diferenciada demonstrou também ter capacidade infectiva (KESSLER et al., 2017). Estas mudanças ambientais e diferentes morfologias ao longo de seu ciclo implicam no ajuste de ciclos metabólicos e expressão de moléculas internas e de superfície, dentre outros mecanismos adaptativos.

FIGURA 8 - CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*



FONTE: adaptado de (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020). A forma tripomastigota metacíclico do *T. cruzi* é liberada nas fezes durante a ingestão do sangue pelo inseto triatomíneo e entra na corrente sanguínea através de feridas na pele ou mucosas e invadem as células. Após a invasão celular, tripomastigotas metacíclicos são contidos dentro de um vacúolo parasitóforo (PV), de onde escapam, se transformam em amastigotas e se multiplicam no citosol. Mais tarde, após a divisão binária, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas altamente móveis que são liberados após a lise celular. Eles podem infectar células vizinhas, migrar para diferentes tecidos ou ser ingeridos por um inseto vetor. Os parasitos nos tecidos, associados a uma resposta imune, contribuem para os sintomas crônicos da doença. A diferenciação da forma não-infectiva (epimastigota) no intestino do inseto para a forma infectiva (tripomastigota metacíclico) no intestino posterior (reto) envolve uma importante condição de estresse nutricional.

1.2.2 A importância do estresse nutricional no ciclo de vida de *T. cruzi*

Um dos processos fundamentais para que *T. cruzi* adquira a capacidade infectiva é a sua diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclico, processo que ocorre no trato digestivo do vetor triatomíneo e é chamado de metaciclogênese. O processo de metaciclogênese pode ser reproduzido *in vitro* sob condições definidas quimicamente que mimetizam a urina do triatomíneo, permitindo que diferentes características celulares e bioquímicas possam ser estudadas (CAMARGO, 1964; CONTRERAS et al., 1988, 1985). Desde

os trabalhos iniciais da metaciclologênese (CAMARGO, 1964) sabe-se que os tripomastigotas metacíclicos surgem a partir da fase estacionária do ciclo de crescimento do parasito, a partir do momento em que há o esgotamento dos nutrientes. A equivalência da fase estacionária obtida em culturas pode ser encontrada no intestino do vetor carente de nutrientes (HERNÁNDEZ et al., 2012). A fase estacionária é um estágio pré-adaptativo para a metaciclologênese e o estresse nutricional um dos gatilhos na diferenciação do parasito (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; HERNÁNDEZ et al., 2012).

Apesar de poder ser reproduzida *in vitro* e já ter sido estudada sob diferentes aspectos: expressão diferencial de genes (KRIEGER et al., 1999; YAMADA-OGATTA et al., 2004), proteômica (DE GODOY et al., 2012; PARODI-TALICE et al., 2007) e fosfoproteômica (AMORIM et al., 2017; LUCENA et al., 2019; MARCHINI et al., 2011), pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares chave que desencadeiam ou regem o processo de metaciclologênese. Um dos fatores que contribuem para isso é a própria heterogeneidade fenotípica da população, sendo que além de alterações na morfologia celular, o parasito está se tornando não proliferativo e desenvolvendo infectividade (FERREIRA et al., 2008).

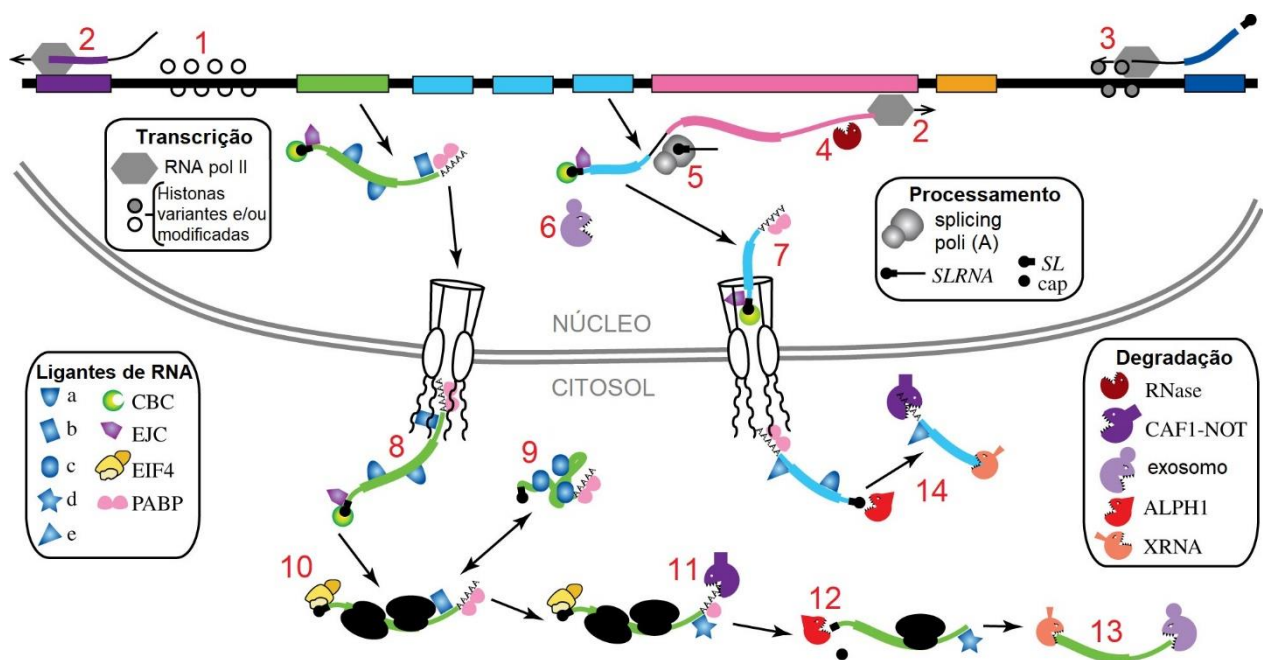
1.2.3 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

A regulação da expressão gênica em um organismo pode ocorrer em diferentes etapas, no entanto, à luz do atual conhecimento, de *Escherichia coli* ao homem, um dos pontos chave da regulação da expressão gênica é a iniciação da transcrição que regula o acesso da RNA polimerase ao DNA na cromatina (CLAYTON, 2002).

Em *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos o controle da expressão dos genes se dá, majoritariamente, após a transcrição gênica, ou seja, ocorre a nível de RNA e proteína (FIGURA 9). A razão para essa peculiaridade se deve a organização do genoma, onde, por exemplo, não há regiões promotoras clássicas para a RNA polimerase II (pol II) e a transcrição de seus genes ocorre de maneira policistrônica (grupos de 10-100 genes unidirecionais são transcritos pela pol II) onde os transcritos policistrônicos são na sequência processados por *trans-splicing* e poliadenilação, dando origem a diferentes RNAm monocistrônicos (CLAYTON, 2016; KELLY et al., 2012). A falta de um controle da transcrição de cada gene individual é compensada por mecanismos de regulação que atuam desde o processamento do pré-RNA, seu transporte do núcleo ao citoplasma,

sua estabilidade, localização, tradução e degradação (CLAYTON, 2019). É importante salientar que a regulação envolvendo transcrição policistrônica e *trans-splicing* ocorre também em diversos outros eucariotos, desde ascídias, cnidários, dinoflagelados, nematoides, platelmintos e rotíferos (KELLY et al., 2012), em tripanossomatídeos, no entanto, existem mecanismos moleculares exclusivos como, por exemplo, seis homólogos do fator de iniciação da tradução, uma enzima exclusiva que remove o cap 5' do RNAm e um complexo de estabilização de RNAm que é recrutado por proteínas de ligação a RNA (CLAYTON, 2019).

FIGURA 9 – EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS



Fonte: adaptado de (CLAYTON, 2019). A linha espessa superior representa o genoma, cada bloco colorido está representando um mRNA. Os mRNAs correspondentes são mostrados com regiões codificantes mais espessas do que as regiões não traduzidas. As etapas numeradas são 1: Histonas modificadas em uma região de iniciação da RNA polimerase II (pol II). 2: alongamento da pol II. 3: terminação da pol II. 4: Clivagem por endonuclease do precursor (postulado). 5: *Trans-splicing* e poliadenilação. 6: mRNAs incompletamente processados podem ser degradados pelo exossomo. 7: Exportação de um mRNA completo, com proteína de ligação de poli (A) (PABP), complexo de junção de exon (EJC) e complexo nuclear de ligação de cap (CBC). 8: Emergência de um mRNA maduro incluindo proteínas na região codificadora (a) e uma proteína estabilizadora específica (b) ligada à região 3' não traduzida (3'-UTR). 9: Ligação por uma proteína de ligação a RNA silenciadora ou agregadora (c) e condensação em grânulos. 10: Ligação de EIF4E, EIF4G e EIF4A e tradução. 11: A proteína (b) é substituída por uma proteína de ligação ao RNA destabilizadora (d) e início da deadenilação. 12: Decapagem por ALPH1. 13: Degradação por XRNA e o exossomo. 14: Via de decaimento rápido - decapagem imediata promovida por proteína (e). mRNA: RNA mensageiro; SL: *spliced leader*; PABP: *poly(A) binding protein*; EJC: *exon junction complex*; CBC: *cap-binding complex*; UTR: *untranslated region*.

Mesmo apresentando uma aparente falta de regulação transcricional (genes organizados em unidades policistrônicas e regiões promotoras pouco definidas), os tripanossomatídeos apresentam elementos epigenéticos importantes no seu núcleo, como modificação de DNA, histonas variantes e hPTMs, elementos conhecidamente importantes na regulação transcricional em outros eucariotos. Estes elementos começaram a ser estudados apenas recentemente em tripanossomatídeos e seu papel na regulação epigenética ainda é pouco compreendido.

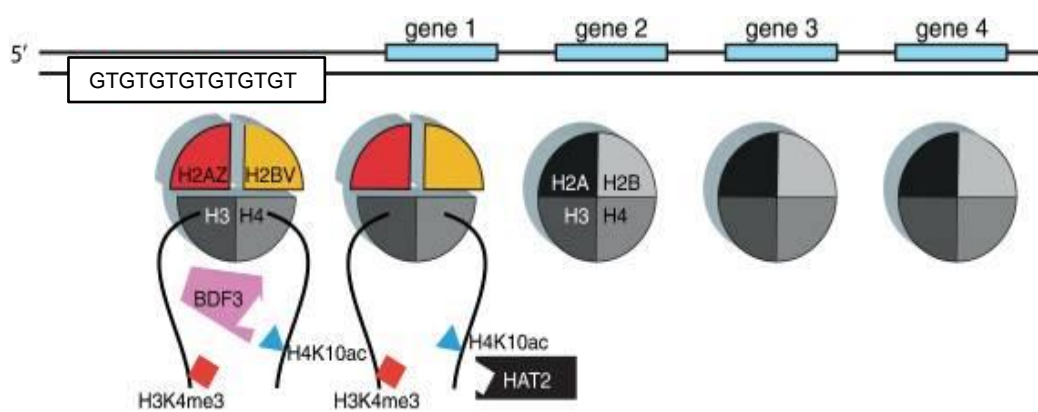
Um dos primeiros trabalhos em tripanossomatídeos identificou a presença de 16 hPTMs (acetilação, mono-, di- e trimetilação) nas histonas canônicas de *T. brucei* (JANZEN et al., 2006a). Neste trabalho, a região C-terminal da H2A foi encontrada hiper-acetilada e a alanina N-terminal de H2A, H2B e H4 foi detectada monometilada, demonstrando a presença de marcas de histona ainda não descritas em outros eucariotos. Outro importante tripanossomatídeo, *Leishmania donovani*, também teve a identificação de alguns poucos sítios específicos de histonas modificados por acetilação, metilação e fosforilação (KUMAR et al., 2012; ROSENZWEIG et al., 2008). Em outro estudo, ao estudar os alvos da metiltransferase DOT1 que metila a lisina 76 da histona H3 em *T. brucei* (equivalente a lisina 79 da H3 em humanos), foi observado que dependendo se o sítio é mono ou dimetilado, diferentes efeitos ocorrem na regulação do ciclo celular (JANZEN et al., 2006b).

Desde então, diferentes estudos têm revelado algumas peças envolvidas na regulação epigenética em tripanossomatídeos. Por exemplo, sabe-se que as histonas variantes H2A.Z e H2B.V são essenciais para a viabilidade em *T. brucei* (SIEGEL et al., 2009) e em *L. major* (ANDERSON et al., 2013). A presença destas histonas variantes (H2A.Z e H2B.V), das modificações H4K10ac e H3K4me3 e fatores com bromodomínio (BDF3), marcam regiões de iniciação e terminação da transcrição pela pol II nestes organismos (SIEGEL et al., 2009; WRIGHT; SIEGEL; CROSS, 2010). Também foi observado que especialmente regiões ricas em GT favorecem a deposição de H2A.Z e transcrição pela pol II em *T. brucei* (WEDEL et al., 2017). E mais recentemente foi visto que um grande número de marcas acetil e metil estão em sítios de início da transcrição em *T. brucei*, postulando que este parasito possua amplas "regiões de início de transcrição" ao invés de locais precisos de início de transcrição (KRAUS et al., 2020). Um modelo para essa cascata de eventos envolvendo esses elementos está ilustrado na FIGURA 10.

Um dos estudos mais amplos no estudo de hPTMs em tripanossomatídeos foi realizado em *T. cruzi* (PICCHI et al., 2017) e, mais recentemente, um estudo semelhante caracterizando o perfil

de hPTMs foi realizado com *T. brucei* e *T. evansi* (ZHANG et al., 2020). Estes estudos caracterizaram a presença de diferentes tipos de PTMs nas histonas canônicas e variantes nestes parasitos, incluindo além dos tipos mais estudados (acetilação, metilação e fosforilação) também as modificações recentemente descobertas como as acilações não-acetilação (glutarilação, succinilação, 2-hidroxiisobutirilação, butirilação, crotonilação e malonilação). Estes estudos demonstraram a ampla presença de diferentes tipos de hPTMs nas histonas de tripanossomatídeos, incluindo a presença de sítios multimodificados por diferentes tipos de modificação e reforçaram que a regulação da cromatina em tripanossomatídeos possa ocorrer através de um código de histonas.

FIGURA 10 – MODELO DE EVENTOS REGULANDO A TRANSCRIÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS



FONTE: adaptado de (SIEGEL et al., 2009; WEDEL et al., 2017). Histona H3 trimetilada na lisina 4 (H3K4me3) está enriquecida em sítios de início da transcrição e funciona como um sítio de ligação para a acetiltransferase 2 (HAT2) que possui um sítio de ligação a metil (cromodomínio). HAT2 por sua vez acetila H4K10 e essa modificação serve de sítio de ligação para BDF3, esse fator recruta fatores de transcrição da pol II e/ou um complexo de remodelamento da cromatina que incorpora as histonas variantes H2A.Z e H2B.V ao nucleossomo, tornando-o menos estável e permitindo o acesso da maquinaria de transcrição. A região rica em GT funciona como promotora na ligação de fatores de transcrição da pol II e também a deposição de nucleossomos com H2A.Z.

1.2.4 Regulação epigenética em *T. cruzi*

De modo similar a outros eucariotos, os elementos básicos da cromatina, estão presentes em *T. cruzi* como, por exemplo, o DNA está organizado em nucleossomos, apresenta histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) e variantes (H2A.Z, H2B.V e H3.V), histona *linker* (H1) e

apresenta diferentes PTMs (PICCHI et al., 2017). As sequências das histonas canônicas divergem em relação a outros eucariotos, particularmente nas caudas N-terminais e as histonas variantes são específicas dentro dos tripanossomatídeos (ALSFORD; HORN, 2004; TORO; GALANTI, 1988). A cromatina está na forma de fibras de 10 nm, sendo que fibras de 30 nm ou cromossomos condensados não são observados na mitose (ELIAS; NARDELLI; SCHENKMAN, 2009; HECKER et al., 1994), provavelmente devido à ausência da região globular da histona H1 (TORO et al., 1993).

Durante a diferenciação de *T. cruzi* da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico ocorre uma acentuada redução da transcrição e tradução, essa redução é associada a mudanças na estrutura da cromatina e também à fosforilação de eIF2 α (MORETTI; SCHENKMAN, 2013). A fosforilação desse fator é desencadeada pelo estresse nutricional e é fundamental para a diferenciação de *T. cruzi* (TONELLI et al., 2011). Outra característica importante observada na cromatina de *T. cruzi* foi a presença de um número maior de proteínas associadas à cromatina (especialmente proteínas ligadoras ao RNA e proteínas ribossomais) na forma replicativa (epimastigota) em relação a sua forma não-replicativa (tripomastigota), uma possível consequência do maior metabolismo de DNA e RNA na forma replicativa (DE JESUS et al., 2017).

1.2.5 hPTMs de *T. cruzi*

Os primeiros estudos de hPTMs em *T. cruzi* mostraram a existência de hPTMs nos tripanossomatídeos e indícios de seu potencial papel na regulação da transcrição e outros processos importantes para o parasito. A histona H1 foi encontrada fosforilada e acetilada (DA CUNHA et al., 2005; MARQUES PORTO et al., 2002) e posteriormente a histona H4 foi identificada contendo sítios de acetilação, monometilação e dimetilação (DA CUNHA et al., 2006). Nesse trabalho o resíduo de alanina N-terminal da H4 foi encontrado metilado, assim como havia sido reportado em *T. brucei* (JANZEN et al., 2006a), sugerindo que essa marca de histona seria específica de tripanossomatídeos.

Histonas e sítios hPTM específicos com funções importantes demonstradas em outros organismos foram estudados em *T. cruzi*, como acetilações da N-terminal da H4 (H4K4, H4K10 e H4K14) e se verificou que cada sítio possuía um papel diferente no parasito durante o ciclo celular, diferenciação e após dano ao DNA. Por exemplo, enquanto H4K4ac ocorreu preferencialmente

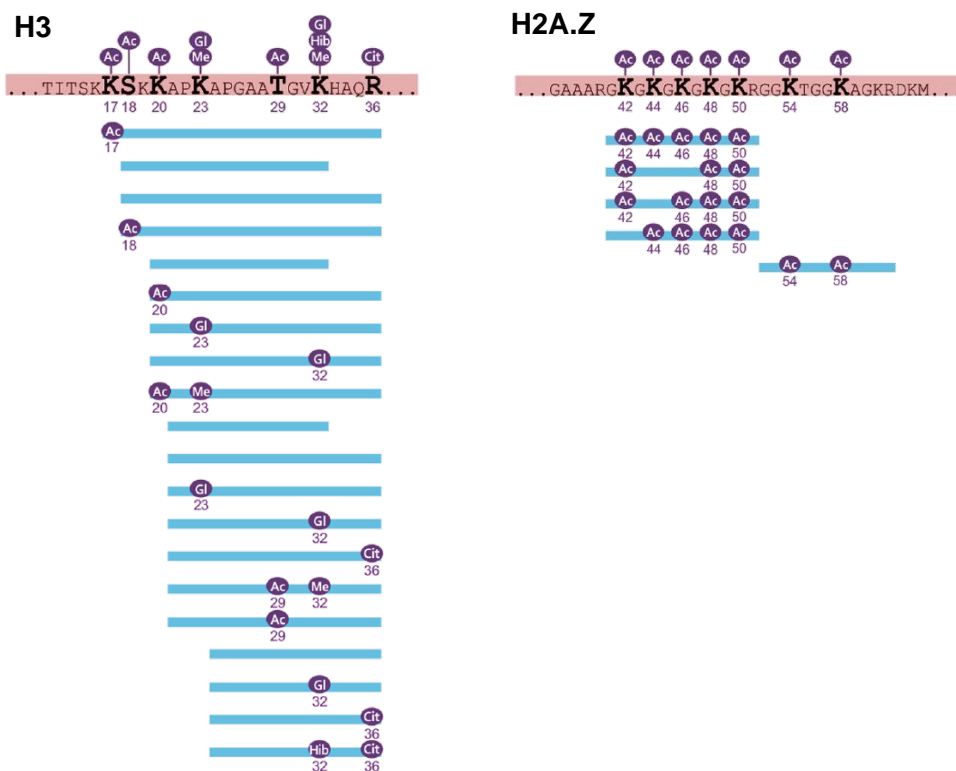
durante a proliferação e se acumulou na cromatina condensada, H4K10ac e H4K14ac distribuíram-se entre a cromatina condensada e não-condensada (NARDELLI et al., 2009).

Um interessante trabalho identificou acetilações em H3 e H4 (H3K9/K14 e H4K5/K8/K12/K16) e trimetilação (H3K4me3) como indicadores de regiões de início da transcrição policistrônica em *T. cruzi* e essas regiões contêm promotores bidirecionais (RESPUELA et al., 2008). Curiosamente, estas histonas acetiladas não foram identificadas associadas a regiões promotoras de genes altamente expressos (rRNA, *spliced leader*, DNA satélite e retrotransposons), provavelmente devido a um processo de depleção de nucleossomos em regiões com genes altamente transcritos já descrito em outros organismos (LEE et al., 2004; RESPUELA et al., 2008).

Recentemente, um estudo mais amplo na caracterização do perfil de diferentes hPTMs em histonas canônicas e variantes em *T. cruzi* revelou uma gama de hPTMs abrindo novos questionamentos quanto a função e regulação destas modificações nas histonas de *T. cruzi* e demais tripanossomatídeos (PICCHI et al., 2017). Nesse trabalho, foram encontrados 168 sítios de hPTMs de 13 tipos distintos, distribuídos tanto nas caudas livres quanto nas regiões globulares das histonas canônicas e variantes de *T. cruzi*, indicando que as hPTMs estejam afetando a estrutura interna do nucleossomo e interação com DNA.

O estudo de Picchi e colaboradores demonstrou que as histonas de *T. cruzi* (como a H3 e H2A.Z) apresentam diferentes padrões de hPTMs (FIGURA 11), um indicativo de que as hPTMs possam funcionar como plataformas de sinalização para outras proteínas e que isso ocorra através de um código de histonas (PICCHI et al., 2017) como postulado para os outros organismos (JENUWEIN; ALLIS, 2001; STRAHL; ALLIS, 2000). Este trabalho também mostrou que *T. cruzi* expressa isoformas das histonas H2A, H2B e H4 que carregam PTMs únicas nestas formas alternativas dos peptídeos.

FIGURA 11 – EXEMPLOS DE PADRÕES DE hPTMs IDENTIFICADOS EM *T. cruzi*



FONTE: PICCHI et al., 2017. A região da histona está em vermelho claro, os peptídeos identificados estão em azul abaixo da sequência e as hPTMs indicadas nos círculos em roxo com suas posições na sequência. Ac: acetilação; Gl: glutarilação; Me: metilação; Hib: 2-hidroxiisobutirilação; Cit:citrulinação.

1.2.6 Parceiros de interação de hPTMs de *T. cruzi*

Uma importante função das hPTMs na regulação epigenética é seu papel sinalizador no recrutamento de proteínas ligantes e complexos de remodelamento e transcrição em diferentes eucariotos (FIGURAS 5 e 6). Em *T. cruzi* os ligantes de hPTMs funcionalmente estudados são os que reconhecem lisina acetilada, ou seja, *readers* contendo bromodomínios. Em *T. cruzi*, dos cinco fatores com bromodomínios preditos em seu genoma (TcBDF1-5), três foram caracterizados (JEFFERS et al., 2017). O primeiro foi TcBDF2 que interage com H4K10ac e H4K14ac, e seu provável papel é influenciar o remodelamento da cromatina como um componente de um complexo maior (VILLANOVA et al., 2009). Interessantemente, TcBDF1 e TcBDF3 não foram localizados no núcleo, mas localizados no glicosomo e flagelo, respectivamente (JEFFERS et al., 2017).

Além dos *readers* de lisina acetilada, estão preditos no genoma de *T. cruzi* nove *readers* de lisina metilada possuindo os seguintes domínios: quatro com *PHD finger*, três com *PWWP*, um com domínio Tudor e um com domínio Cromo. Estes ligantes de metil-lisina ainda não foram caracterizados em *T. cruzi* (SAHA, 2020).

Outro grupo de interatores de hPTMs pouco estudados são os que compõem os complexos remodeladores de cromatina, envolvidos na montagem e reorganização dos nucleossomos, que podem conter diferentes *readers* (BOWMAN; POIRIER, 2015). Por exemplo, a subunidade BPTF do complexo NURF (um remodelador do tipo ISWI), preferencialmente liga-se a nucleossomos possuindo tanto H3K4me3 e H4K16ac através de um módulo PHD–bromodomínio (RUTHENBURG et al., 2011). Recentemente um complexo remodelador tipo ISWI foi caracterizado em *T. cruzi* (DÍAZ-OLMOS et al., 2020), no entanto, nenhum de seus componentes possuem domínios que reconhecem hPTMs.

Além de proteínas que leem as hPTMs, há também as que as removem (*erasers*). No genoma de *T. cruzi* estão preditas quatro deacetilases dependentes de Zn²⁺ (HDACs), duas deacetilases dependentes de NAD⁺ (sirtuinas) e quatro demetilases de lisina (jumonji) (SAHA, 2020). Recentemente as marcas H2AT85ac, H4K10ac e H4K78ac foram indicadas como prováveis alvos da deacetilase TcHDAC4 em *T. cruzi* (PICCHI-CONSTANTE et al., 2021).

Estes ligantes são muito importantes na compreensão do funcionamento da dinâmica da cromatina e são potenciais candidatos a alvos de drogas no parasito, como, por exemplo, os bromodomínios (ALONSO et al., 2019). No entanto, como ainda são poucos os parceiros ligantes de hPTMs identificados em *T. cruzi* e mesmo em outros tripanossomatídeos, mais estudos são necessários na identificação e caracterização de outros parceiros de interação das hPTMs.

Justificativa da tese

T. cruzi é um ótimo modelo no estudo da regulação epigenética, justamente devido as suas peculiaridades genéticas e pela necessidade de adaptação a diferentes ambientes ao longo de seu ciclo de vida (que passa por alterações de pH, temperatura, escassez de nutrientes, etc.), o que requer uma rápida adaptação dos mecanismos de regulação gênica. Recentemente, a presença de diferentes hPTMs foi descrita em *T. cruzi* e sabe-se que estas modificações constituem um dos principais mecanismos reguladores do estado da cromatina nos eucariotos. No entanto, a maneira como essas modificações são moduladas durante diferentes condições ambientais enfrentadas pelo parasito, bem como quais são os parceiros ligantes de histonas e que reconhecem as hPTMs e suas prováveis funções em cada determinado contexto, são questões importantes na elucidação dos mecanismos de regulação epigenética de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos, que ainda precisam ser melhor compreendidas. Responder estas questões, além de ajudar a entender a biologia deste parasito, pode lançar luz na compreensão da evolução dos próprios mecanismos epigenéticos, uma vez que *T. cruzi* pertence a um dos grupos mais antigos dos eucariotos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar as PTMs de histonas canônicas e variantes de epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional e identificar seus parceiros de interação.

2.2 Objetivos específicos

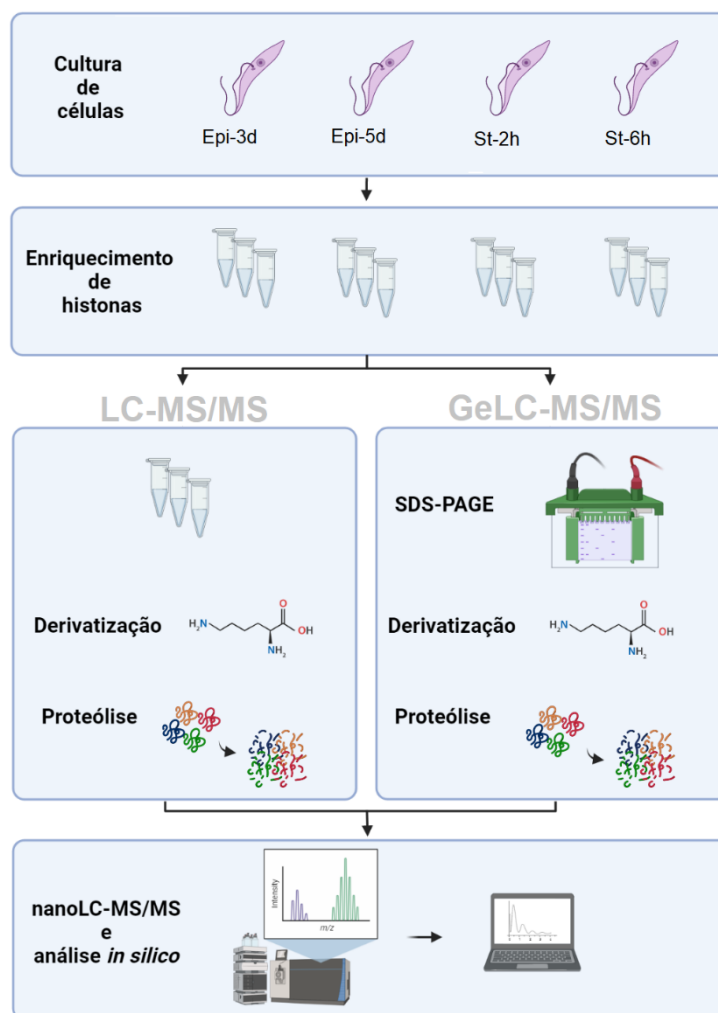
- Otimizar o protocolo de identificação de PTMs de histonas canônicas e variantes e ampliar o mapa das hPTMs das formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial;
- Identificar e localizar os sítios de PTMs de histonas canônicas e variantes da forma epimastigota de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional;
- Analisar a modulação das PTMs de histonas canônicas e variantes da forma epimastigota de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional;
- Identificar e analisar, em larga escala, parceiros ligantes de histonas canônicas e variantes e de suas hPTMs em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparo de amostras e análise das hPTMs de *T. cruzi*

A FIGURA 12 resume a estratégia experimental empregada na identificação de hPTMs de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional por 2h e 6h.

FIGURA 12 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EMPREGADA NA ANÁLISE DAS hPTMs DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). Etapas empregadas no preparo de amostras para a análise da identificação e modulação dos sítios de PTMs nas histonas de *T. cruzi* em fase exponencial (Epi-3d), fase estacionária (Epi-5d) e sob estresse nutricional durante 2 horas (St-2h) e 6 horas (St-6h). As células foram cultivadas em meio LIT e estressadas nutricionalmente em meio TAU. As histonas foram enriquecidas por extração ácida a partir de triplicatas com 1×10^9 células de cada condição. Os extratos enriquecidos de histonas de cada condição foram diretamente processados (LC-MS/MS) e também resolvidos por SDS-PAGE (GeLC-MS/MS), então derivatizados com anidrido propiônico e digeridos com tripsina por 16h. Os peptídeos tripticos foram analisados por nanocromatografia líquida associada à espectrometria de massas (nanoLC-MS/MS), as hPTMs identificadas no software Peaks Studio X (v. 10) e analisadas *in silico*.

3.1.1 Cultura de células

Para a análise das hPTMs de *T. cruzi* sob estresse nutricional, epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c em fase exponencial de crescimento foram cultivados em meio LIT, a 28 °C, sem agitação. Após três passagens com 1×10^6 células, foi realizada a expansão e crescimento das culturas até a densidade de 3×10^9 parasitos/mL em quatro condições. Os epimastigotas em fase exponencial (Epi-3d) e em fase estacionária (Epi-5d) de crescimento foram coletados em triplicata (1×10^9 células/replicata) centrifugando a 5000 g, a 4°C por 10 minutos. Para estudar os epimastigotas sob estresse nutricional, as células em fase estacionária foram lavadas em meio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, e 8 mM tampão fosfato, pH 6) e incubadas no mesmo meio por 2 horas (St-2h) e por 6 horas (St-6h) a 28 °C. Em seguida foram coletadas em triplicata (1×10^9 células/replicata) por centrifugação a 5000 g, a 4°C por 10 minutos.

3.1.2 Extração e enriquecimento de histonas

A extração e enriquecimento de histonas se baseou em PICCHI e colaboradores (2017), com modificações. Brevemente, as células de cada replicata foram ressuspensas em agitador vortex com tampão de extração A (250 mM Sacarose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5% (v/v) Saponina; inibidor de proteases (Complete mini EDTA free, Roche)). As amostras foram centrifugadas a 6000 g, a 4 °C por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado em tampão de extração B (tampão de extração A sem saponina). As amostras foram centrifugadas a 6000 g, a 4 °C por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado em tampão de extração C (1% (v/v) Triton X-100; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8; inibidor de proteases (Complete mini EDTA free, Roche)). As amostras foram centrifugadas a 12000 g, a 4 °C por 20 minutos e o *pellet* foi lavado três vezes com 100 mM de Tris-HCl pH 8, centrifugando a 6000 g, a 4 °C por 10 minutos e ressuspensado o *pellet* em 1 ml de HCl 0,4 N. As amostras foram incubadas a 4 °C sob agitação *overnight*. Recuperadas as proteínas do sobrenadante centrifugando a 10000 g, a 4 °C por 15 minutos, adicionado oito volumes de acetona e incubado *overnight* a -20 °C. As amostras foram centrifugadas a 3100 g, a 4 °C por 15 minutos. Removida a acetona cuidadosamente e lavado o *pellet* três vezes com 1 ml de acetona. Após ressuspensão em água, as amostras foram quantificadas pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Na sequência, os extratos enriquecidos de histona

foram tanto resolvidos por SDS-PAGE 15% e coradas com Coomassie Blue R250 quanto processados diretamente em solução, como descrito a seguir.

3.1.3 Derivatização de histonas em gel (GeLC-MS/MS)

A faixa de massa correspondente ao conjunto das histonas H2A, H2B, H3 e H4 foi excisada do gel em cada replicata e cada bloco foi cortado em pedaços menores (~1x1 mm). Esses pedaços de gel foram descorados duas vezes com a solução de 25 mM de NH_4HCO_3 em 50% de etanol agitando em *thermomixer* a 800 rpm, a 25 °C por 10 minutos. Deixado *overnight* no *thermomixer* a 800 rpm a 25 °C. Após a remoção do sobrenadante os pedaços de gel foram desidratados com etanol 100% agitando nas mesmas condições.

As histonas excisadas do gel e descoradas foram derivatizadas com anidrido propiônico (FORNÉ; BARTH; IMHOF, 2012). Os pedaços de géis foram reidratados com 100 mM NH_4HCO_3 e a eles adicionada solução de propionilação (anidrido propiônico em 100 mM de NH_4HCO_3 , 1:10). A partir dessa etapa foi mantido o pH 8 nas amostras. Adicionado 1M NH_4HCO_3 e incubado por 1h em temperatura ambiente. Após esse período o sobrenadante foi descartado e repetida a propionilação com solução de propionilação fresca. Em seguida, os pedaços de géis foram lavados com 100 mM NH_4HCO_3 , em seguida com água ultra pura (ddH_2O) e com solução de 50% de ACN, cada etapa agitando no *thermomixer* a 1300 rpm e a 37 °C. Os pedaços de géis foram desidratados com 100% de ACN, removido o sobrenadante e as amostras secadas em *SpeedVac*.

3.1.4 Derivatização de histonas em solução (LC-MS/MS)

Os extratos enriquecidos de histonas foram derivatizados diretamente em solução com anidrido propiônico (LIN; GARCIA, 2012). Brevemente, a 60 µg de extrato de histonas foi adicionado 100 mM NH_4HCO_3 pH 8,0 e concentrada a amostra até um volume de 20-30 µl. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de solução de propionilação (anidrido propiônico em 2-propanol, 1:3) e ajustado o pH em 8 com NH_4OH . As amostras foram incubadas a 37 °C por 15 minutos e concentradas até um volume de 5-10 µl em *SpeedVac*. Diluídas as amostras com ddH_2O até o volume de 30 µl e repetida a reação de propionilação com solução de propionilação fresca.

3.1.5 Proteólise de histonas em gel (GeLC-MS/MS)

As amostras propioniladas a partir do SDS-PAGE foram então digeridas para a análise por nanoLC-MS/MS de acordo com o protocolo previamente descrito (SHEVCHENKO et al., 2006). As amostras foram incubadas a 800 rpm, a 25 °C por 20 minutos, primeiramente com tampão de digestão (50 mM NH_4HCO_3) e em seguida com etanol (100%). Repetida uma vez a etapa com tampão de digestão e duas vezes com o etanol. O sobrenadante foi descartado em cada incubação. Concentradas as amostras em *SpeedVac* até os géis secarem. Adicionado aos pedaços de gel a solução de tripsina (12,5 ng/uL de tripsina diluída em 50 mM NH_4HCO_3) e tampão de digestão. Incubadas as amostras na estufa a 37 °C por 16 horas. Na sequência foi coletado o sobrenadante em novo tubo. Aos pedaços de géis foi adicionada solução de extração (TFA 3% e ACN 30%), agitado a 800 rpm, A 25 °C por 10 minutos. Coletado o sobrenadante e adicionado ao novo tubo. Repetida essa etapa com a solução de extração. Adicionado ACN (100%) aos pedaços de géis até cobri-los, agitado a 800 rpm, a 25 °C por 10 minutos e coletado o sobrenadante. Repetida essa etapa. Concentrada a amostra até 10% do volume original em *SpeedVac*. Os peptídeos foram dessalinizados e carregados em *StageTips* C18 (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007) para análise por nanoLC-MS/MS.

3.1.6 Proteólise de histonas em solução (LC-MS/MS)

As amostras com os extratos de histona propioniladas diretamente em solução foram digeridas de acordo com protocolo descrito previamente (LIN; GARCIA, 2012). Brevemente, a partir de 20 µg de histonas propioniladas foram adicionados 15 µl de 100 mM NH_4HCO_3 e ddH₂O até no máximo 50-100 µl. Adicionada a tripsina aos extratos de histona (1:20) e incubado a 37 °C por 16 horas. Parada a reação de digestão com ácido acético até atingir pH 3.0 e concentradas as amostras até 10% do volume original em *SpeedVac*. Na sequência os peptídeos foram dessalinizados e carregados em *StageTips* C18 (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007) para análise por nanoLC-MS/MS.

3.1.7 Análise dos peptídeos de histonas por nanoLC-MS/MS

As misturas peptídicas foram eluídas das *StageTips* com 0,1% de ácido fórmico, 5% de DMSO e 5% de ACN e separadas por nanocromatografia líquida (nanoLC) e analisadas por ionização eletrospray (ESI-MS/MS) em um UHPLC Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplada a um LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) na Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (PDTIS RPT02H). A separação dos peptídeos foi em uma coluna de 30 cm (75 µm de diâmetro interno) com resina de fase reversa C18 (ReproSil-PurC18-AQ1.9 µm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany), mantida a temperatura constante de 60 °C. O solvente A foi 0,1% de ácido fórmico, 5% de DMSO em água; solvente B foi 5% de DMSO, 0,1% de ácido fórmico em ACN. O gradiente foi de 5-40% de ACN por 128 minutos. O espectrômetro de massas operou no modo DDA, fragmentando por CID e HCD os 5 peptídeos mais intensos e com 2 ou mais estados de carga detectados em cada espectro de MS1. Foram corridas duas réplicas técnicas de cada amostra.

3.1.8 Identificação dos peptídeos e hPTMs

Peptídeos e sítios hPTMs foram identificados e quantificados através de busca automática em bancos de dados de sequência de *T. cruzi* utilizando a plataforma de proteômica computacional PEAKS Studio X (MA et al., 2003). Foram usados os algoritmos PEAKS DB (ZHANG et al., 2012) e PEAKS PTM (HAN et al., 2011) na identificação de peptídeos e hPTMs. As proteínas e hPTMs foram buscadas contra um banco de dados contendo 20257 sequências de *T. cruzi* Dm28c baixado em 15/08/2018 do TritypDB (“*T. cruzi* Dm28c 2017”) (<http://www.tritypdb.org/>). Nas buscas PEAKS DB e PEAKS PTM foi configurada uma tolerância de massa do íon precursor de 10 ppm e do íon fragmento de 0,5 Da. A enzima configurada para a digestão teórica foi Arg-C com modo de digestão específica. Tamanho mínimo de peptídeo de cinco aminoácidos, permitindo duas clivagens perdidas. A carbamidometilação foi buscada como PTM fixa no PEAKS DB e as PTMs variáveis foram monometilação (K/R), dimetilação (K/R), trimetilação (K), acetilação (K), acetilação (N-term), propionilação (K), propionilação (N-term), metilpropionilação (K), fosforilação (STY) e oxidação (M). No PEAKS PTM foram buscadas monometilação (N-term), dimetilação (N-term), glutarilação (K), 2-hidroxiisobutirilação (K), hidroxilação (Y), malonilação

(K), succinilação (K), ubiquitinação (K), crotonilação (K), citrulinação (R), metilação (Q), fosforilação (H), butirilação (K), acetilação (S/T), formilação (K) e deamidação (N/Q)). Para peptídeos e proteínas, o FDR foi de 1%. Na validação da localização dos sítios hPTM foi empregado um Ascore ≥ 20 .

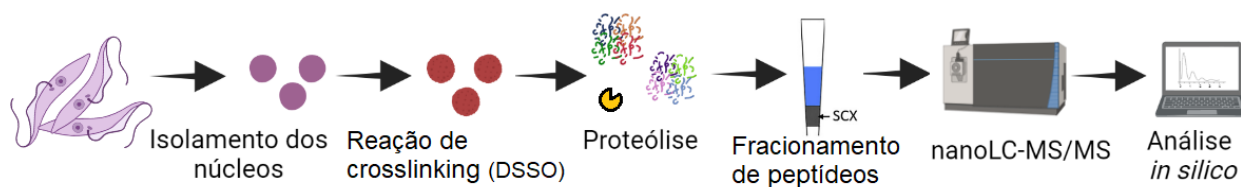
3.1.9 Análise da modulação dos peptídeos modificados por hPTMs

Os peptídeos modificados de histona identificados nas fases exponencial, estacionária e sob estresse nutricional 2h e 6h em triplicata de cada estratégia (LC-MS/MS e GeLC-MS/MS) foram analisados quanto à sua modulação entre as diferentes condições. A intensidade dos peptídeos/hPTMs foi normalizada pelo nível de intensidade da histona: valor da intensidade LFQ da PTM na amostra dividido pelo *ratio* da proteína na amostra. Basicamente, a intensidade LFQ da histona em cada amostra foi dividida pela intensidade média das amostras, obtendo um *ratio* da histona na amostra. A intensidade de cada peptídeo/hPTM foi dividida pelo *ratio* da sua respectiva histona. Calculada a média de intensidade do peptídeo detectado nas duas réplicas técnicas (duplicata de injeção no espectrômetro) de cada réplica biológica. A análise de nível global de cada tipo de PTMs foi feita somando a intensidade dos peptídeos modificados com cada tipo de modificação em cada réplica, analisada sua variação entre condições através de ANOVA (FDR 5%). A análise da modulação das hPTMs entre as condições foi feita no Perseus v.1.6.15.0. Primeiramente, a intensidade dos peptídeos contendo as hPTMs foi transformada em \log_2 e os peptídeos com detecção em ≥ 2 réplicas biológicas em cada condição foram analisados quanto a sua variação entre as condições. Para isso, foi aplicado o teste ANOVA com FDR 5% (q-value), onde os valores de p foram ajustados usando um método baseado em permutação para controlar o FDR, com 250 randomizações (TYANOVA et al., 2016; TYANOVA; COX, 2018). Em seguida, para determinar entre quais condições existia a diferença estatística foi aplicado o teste *Tukey's Honest Significant Difference* (THSD) (FDR 5%). Os peptídeos regulados no ANOVA foram clusterizados hierarquicamente usando distância Euclidiana no Perseus v.1.6.15.0.

3.2 Identificação de parceiros de interação de histonas e suas PTMs em *T. cruzi*

Na identificação de parceiros de interação de histonas e suas PTMs em *T. cruzi* foi empregada uma estratégia baseada em *crosslinking* químico associado a espectrometria de massas (XL-MS). Esta estratégia permite a identificação, em larga escala, de interações endógenas entre proteínas e PTMs em células e organelas (FASCI et al., 2018; KLYKOV et al., 2018). A estratégia experimental empregada é mostrada na FIGURA 13 e cada etapa foi detalhada a seguir.

FIGURA 13 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL EMPREGADA NA IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO DAS hPTMs DE *T. cruzi*



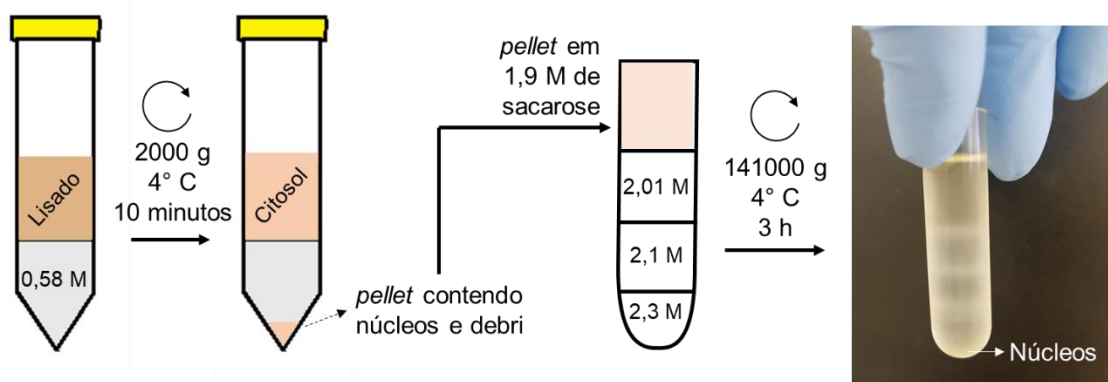
Fonte: adaptado de (FASCI et al., 2018). Formas epimastigotas de *T. cruzi* tiveram seus núcleos enriquecidos conforme o protocolo descrito em (SANTOS JÚNIOR et al., 2015) e as amostras de núcleos foram incubadas com o reagente *crosslinker* DSSO de acordo com o protocolo (KLYKOV et al., 2018). O reagente se difunde para dentro do núcleo e promove o *crosslinking* das proteínas nucleares. Após a lise dos núcleos, as proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina e os peptídeos fracionados por *StageTip*-SCX, então foram identificados por nanoLC-MS/MS e os dados analisados *in silico*.

3.2.1 Enriquecimento de núcleos de *T. cruzi*

A fim de identificar os parceiros de interação de hPTMs, primeiramente os núcleos de *T. cruzi* foram enriquecidos com base no protocolo descrito anteriormente (DOS SANTOS JÚNIOR et al., 2015) com algumas modificações (FIGURA 14). Brevemente, 1×10^9 células de epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial foram ressuspensas em tampão hipotônico (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl, 5 mM β-mercaptoetanol) e turgidez das células confirmada por microscopia óptica. Adicionado Nonidet P40 0,5% (v/v) e inibidor de protease (Complete Mini, Roche) e lisadas as células com um homogenizador Dounce. A lise das células foi checada por microscopia óptica. A osmolaridade do lisado foi reestabelecida adicionando sacarose a uma concentração final de 0,25 M e então transferido lentamente o lisado para um tubo já contendo 1 ml de 0,58 M de sacarose em tampão hipotônico, então centrifugado a 2000 g, 4 °C

por 10 minutos. A camada superior contendo o citosol foi removida e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 M de sacarose em tampão hipotônico. A suspensão foi carregada cuidadosamente em um tubo de ultracentrífuga (SW65) contendo um gradiente descontínuo de sacarose (de baixo para cima 2,30 M; 2,10 M e 2,01 M, todos preparados em tampão hipotônico com inibidores de protease). O tubo foi centrifugado a 141000 g, a 4 °C por 3 horas. O *pellet* continha a fração enriquecida de núcleos quando observado por microscopia óptica e de fluorescência.

FIGURA 14 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NO ENRIQUECIMENTO DE NÚCLEOS DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021) baseado em (SANTOS JÚNIOR et al., 2015). As células de epimastigotas de *T. cruzi* foram lisadas mecanicamente em Dounce em tampão hipotônico. O lisado foi então adicionado lentamente sobre um “colchão” de sacarose 0,58 M e centrifugado. As fases formadas foram avaliadas por microscopia e o *pellet* continha os núcleos e debri celular. O *pellet* foi ressuspensionado em sacarose 1.9 M e centrifugado em um gradiente de sacarose. Após a centrifugação, a fração enriquecida de núcleos de *T. cruzi* encontrava-se no *pellet*.

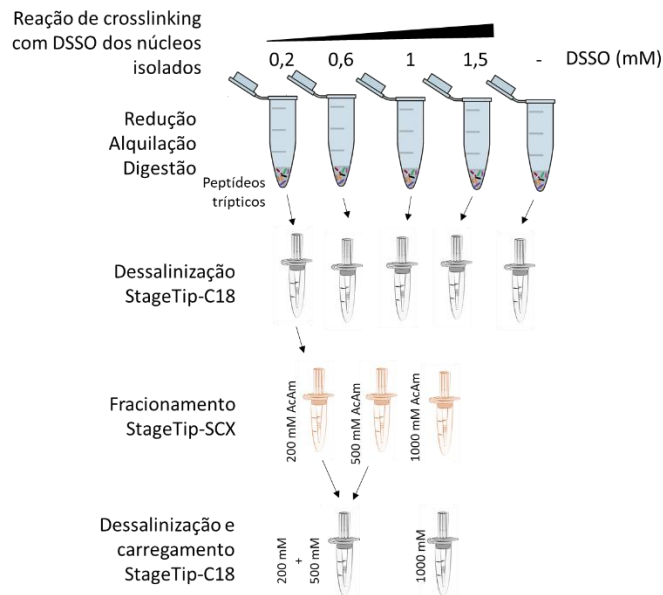
3.2.2 Análise dos núcleos por microscopia de fluorescência

A análise dos núcleos de *T. cruzi* por microscopia de fluorescência foi realizada marcando com DAPI. Brevemente, a amostra foi fixada com paraformaldeído (PFA) e a lâmina de três poços foi preparada adicionando poli-lisina aos poços e lavados e adicionado a amostra. Após incubação de 15 minutos foi lavada a lâmina com Phosphate-buffer PBS. Adicionado tampão PGN-saponina com DAPI aos poços, incubando por 15 minutos. Removido o tampão dos poços, lavados com PBS e H₂O 18.2 e adicionado o anti-fade N-propil galato. Observado os núcleos em microscópio invertido de fluorescência Leica.

3.2.3 *Crosslinking* e espectrometria de massas (XL-MS) na identificação de ligantes de histonas e suas PTMs

A identificação de parceiros de interação de histonas e suas PTMs em *T. cruzi* foi através de *crosslinking* associado a espectrometria de massas (XL-MS) baseada no protocolo previamente descrito para células humanas (FASCI et al., 2018; KLYKOV et al., 2018) (FIGURA 15). Basicamente, os núcleos enriquecidos de *T. cruzi* foram lavados com tampão de reação de *crosslinking* (Hepes 20 mM, 10 mM NaCl, 1 mM de MgCl₂·6H₂O, pH 8) e incubados com *disuccinimidyl sulfoxide* (DSSO, Thermo Fisher Scientific). Para determinar a concentração ideal de DSSO, os núcleos foram incubados com concentrações crescentes de DSSO (0,2; 0,6; 1 e 1,5 mM) por 25 minutos em temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 mM Tris-HCl pH 8, incubando por 10 minutos. Os núcleos foram peletados, centrifugando a 3000 g, 4 °C, por 10 minutos. A fração nuclear total foi obtida coletando o sobrenadante após os núcleos serem lisados em 50 mM Tris, pH 8, 2% SDS, aquecidos a 95 °C por 3 minutos, sonicados, e centrifugados a 20000 g por 30 minutos. As amostras foram precipitadas com acetona e peletadas centrifugando a 6000 g, 4 °C, por 15 minutos. Ressuspendido o *pellet* em 50 mM de bicarbonato de amônio (AmBic) e 8 M de ureia. Reduzido com dithiothreitol (DTT) a uma concentração final de 15 mM por 1 h em temperatura ambiente. Alquiladas com 50 mM de iodoacetomida por 2 h no escuro. Parada a alquilação com tiourea a uma concentração final de 150 mM e diluídas as amostras quatro vezes com 50 mM de AmBic. As amostras foram digeridas com tripsina (1:100), a 37 °C, por 16 h. Os peptídeos foram dessalinizados em *StageTip*-C18. Os peptídeos dessalinizados foram então carregados e fracionados em *StageTip*-SCX conforme descrito previamente (KLYKOV et al., 2018), sendo eluídas com tampões contendo diferentes concentrações de acetato de amônio (200, 500 e 1000 mM). Os eluatos de 200 e 500mM foram combinados. As amostras foram dessalinizadas e carregadas em *StageTip*-C18 e então analisadas por nano-LC-MS/MS.

FIGURA 15 – ESTRATÉGIA EMPREGADA NO PREPARO DE AMOSTRAS DE XL-MS



Fonte: o autor (2021). Amostras enriquecidas de núcleos de *T. cruzi* foram incubadas com diferentes concentrações do reagente DSSO. Após 25 minutos a reação foi parada com Tris-HCl pH 8 e feita a lise dos núcleos. Em seguida foi feita a redução, alquilação e digestão das proteínas em solução com tripsina. Na sequência, foi feita a dessalinização em *StageTip-C18* e o fracionamento das amostras por *StageTip-SCX* com três concentrações (200 mM, 500 mM e 1000 mM) de acetato de amônio (AcAm). Os eluatos de 200 e 500 mM foram combinados. As amostras foram carregadas em *StageTip-C18* e analisadas por espectrometria de massas.

3.2.4 Aquisição de dados LC-MS/MS para identificação dos parceiros de interação

As análises nanoLC-MS/MS para a identificação de parceiros de interação baseadas em *crosslinking* (XL-MS) foram realizadas no espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific) na plataforma de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas. Os parâmetros para aquisição de dados foram baseados em KLYKOV et al. (2018), com ajustes. Basicamente, o tempo de aquisição foi de 120 minutos, com gradiente 0-100 (5-40% B), 100-105 min (40-100% B), 105-120 (100% B), 120-121 e (100-5% B). Fase B: 95% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. O método de aquisição foi CID-MS2-MS3-ETD-MS2 (KLYKOV et al., 2018; LIU et al., 2017). Brevemente, aquisições sequenciais CID-ETD (MS2) foram realizadas para cada precursor (MS1). Então, CID (MS3) foram adquiridos se a diferença de massa de 31.9721 Da foi observada no espectro CID (MS2). As varreduras MS1 e MS2 foram adquiridas no Orbitrap com resolução de massa de 60.000 e 30.000, respectivamente. A varredura MS3 foi adquirida no ion

trap. A janela de isolamento do precursor foi de 1,6 m/z no MS1 e de 3 m/z no MS2. A energia de colisão no CID-MS2 foi de 25%. A energia de colisão no CID-MS3 foi de 35%.

3.2.5 Análise bioinformática do proteoma nuclear e dos parceiros de interação

As proteínas do núcleo foram identificadas no Proteome Discoverer 2.5 através do SEQUEST com FDR 1% a nível de peptídeos e proteínas, enzima tripsina com até cinco *missed cleavages* e banco de sequências de *T. cruzi* Dm28c baixado em 21/10/2021 do TritypDB (“Dm28c 2017”) (<http://www.tritypdb.org>). A localização subcelular das proteínas foi feita na ferramenta CELLO2GO (YU et al., 2014) e o enriquecimento de termos GO feito na ferramenta de busca do TritypDB, com p-value 0,05. A clusterização funcional das proteínas nucleares feita em DAVID v.6.8 (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009), com EASE 0,1. A rede de interação das proteínas foi buscada no banco de interações STRING v.11.5 (SZKLARCZYK et al., 2019) e construída no Cytoscape v.3.9 (SHANNON et al., 2003). Os peptídeos com *crosslinking* foram buscados no XlinkX v.2.5 (LIU et al., 2017) dentro do Proteome Discoverer v2.5. Em “XlinkX Detect” foi empregado o template de análise de *crosslink* MS2-MS2-MS3, buscando pelo DSSO (+158,004 Da) em lisina (K) e N-terminal da proteína. Foi usado o mesmo banco de sequências de *T. cruzi* Dm28c (“Dm28c 2017”) na busca dos peptídeos. O FDR foi controlado a 1% em duas etapas (LENZ et al., 2021), no “XlinkX Validator” do workflow de processamento, que controla a identificação a nível de espectro (MS2 e MS3) e validando inter e intralinks; e no workflow consenso, controlando o *false positive rate* a nível de CSMs. Em “XlinkX Search” foram feitas buscas com acetil (+42,01 Da, K), metil (+14,01 Da, K/R), dimetil (+28,03 Da, K/R), trimetil (+42,05 Da, K) e crotonil (+68,03 Da, K) como modificações dinâmicas. A rede de interação de proteínas com *crosslink* foi criada e analisada através do XlinkCyNET v.1.4 (LIMA; ZHU; LIU, 2021) dentro do Cytoscape v.3.9 onde também foram buscados domínios de sequência com base no Supfam e Pfam para as proteínas anotadas como não-caracterizadas nos bancos de dados TritypDB e Uniprot.

CAPÍTULO 1

AMPLIAÇÃO DO MAPA DE hPTMs EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Resumo do capítulo

*A determinação da localização e tipos de hPTMs em *T. cruzi* é o primeiro passo para compreender a extensão da presença de modificações de histonas e para posteriores análises funcionais e comparativas com outros organismos. Essa determinação passa pela otimização de protocolos de identificação de hPTMs nesse parasito. Neste capítulo apresentamos um protocolo otimizado, que além de confirmar a identificação de 13 tipos distintos de hPTMs, identificou diferentes versões modificadas de peptídeos de histonas com um total de 201 marcas distribuídas nas histonas canônicas, variantes e linker de *T. cruzi* epimastigota em fase exponencial, sendo 107 descritas pela primeira vez. Este conjunto expandiu o número conhecido de marcas hPTM em quase 2 vezes nesse tripanossomatídeo. A acetilação e a monometilação foram os tipos mais abundantes de hPTMs. O mapa atualizado compilando as hPTMs já identificadas em *T. cruzi* reforça que vários resíduos são alvos de modificações múltiplas, que alguns tipos de modificação são mais abundantes que outros e que as hPTMs são amplamente distribuídas e diversas tanto nas caudas quanto nos domínios globulares das histonas. O mapa pode ser usado como base para estudos funcionais sobre a regulação dinâmica da cromatina por mecanismos epigenéticos e a seleção de candidatos para o desenvolvimento de drogas epigenéticas contra tripanossomatídeos.*

1.1 Otimização do protocolo de identificação de hPTMs de *T. cruzi*

No trabalho de Picchi e colaboradores (PICCHI et al., 2017) foram empregadas diferentes estratégias proteômicas para mapear, em larga escala, as hPTMs de *T. cruzi*. O protocolo empregou o preparo de amostras em solução (LC-MS/MS) e em gel (GeLC-MS/MS) que se ramificavam em diferentes estratégias como, por exemplo, a derivatização das histonas pré-digestão; o emprego de diferentes enzimas e diferentes tempos de digestão e o emprego de diferentes tipos de fragmentação dos peptídeos em MS2. A estratégia com mais detecções de peptídeos modificados foi a que empregou a derivatização (propionilação) das histonas pré-digestão em parte das amostras de GeLC-MS/MS.

O nosso objetivo inicial consistiu em otimizar esse protocolo de identificação de hPTMs de *T. cruzi*, tornando-o eficiente na identificação de sítios modificados e simplificado, otimizando tempo e custos na execução. Para isso foi realizada a propionilação de todas as amostras tanto em LC-MS/MS quanto em GeLC-MS/MS, foram simplificadas etapas não cruciais na identificação de hPTMs do parasito (como redução e alquilação), foi empregado apenas tripsina na digestão das histonas e na aquisição de dados por nanoLC-MS/MS, os peptídeos foram fragmentados com CID e HCD, sem o emprego de ETD como no protocolo anterior, reduzindo assim o tempo de análise no espectrômetro de massas. Desse modo, nosso protocolo permitiu a identificação de peptídeos modificados que não foram identificados no trabalho anterior (PICCHI et al., 2017). Quando comparadas as mesmas regiões de histonas identificadas com o nosso protocolo e com o protocolo empregado em Picchi e colaboradores (2017), nota-se que um número maior de versões modificadas, ou seja, contendo diferentes hPTMs ou combinações delas, foi identificado em nosso trabalho (TABELA 3 e TABELA S1). Assim, a otimização do protocolo, especialmente a propionilação das amostras tanto em LC-MS/MS quanto GeLC-MS/MS, contribuiu para a identificação de diferentes versões modificadas de peptídeos e novas hPTMs em todas as histonas identificadas em *T. cruzi*.

TABELA 3 – DIFERENTES VERSÕES PEPTÍDICAS MODIFICADAS IDENTIFICADAS NAS HISTONAS DE *T. cruzi*

Região da histona	Picchi et al. 2017	de Almeida et al. 2021	Modificação
H2A (19-36)	SAKAGLIFPVGRVGSLLR	SAK(prop)AGLIFPVGRVGSLLR	Não modificado
		SAK(prop)AGLIFPVGRVGS(ac)LLR	S33ac
		SAK(prop)AGLIFPVGRVGS(ac)LLR(me)	S33acR36me
		S(prop)AK(prop)AGLIFPVGR(me)VGS(ac)LLR	R30meS33ac
H2B (20-31)	KPKRTWNVYISR	K(prop)PK(prop)RTWNVYISR	Não modificado
		K(ac)(me)PK(prop)RTWNVYISR	K20me
		K(ac)PKRTWNVYISR	K20ac
		K(prop)(ac)PK(meprop)RTWNVYISR	K20acK22me
		K(ac)PK(prop)R(me2)TWNVYISR	K20acR23me2
		K(prop)PK(ac)R(me)TWNVYISR	K22acR23me
		K(ac)(ac)PK(meprop)R(me)TWNVYISR	K20acK22meR23me
		K(prop)(ac)PK(ac)R(me2)TWNVYISR	K20acK22acR23me2
		K(prop)PK(meprop)RT(ac)WNVYISR	K22meT24ac
		K(meprop)(prop)PK(ac)RTWNVYISR	K20meK22ac
	K(prop)PK(ma)RTWNVYISR	K22ma	
H2B(88-111)	LVLPADLAKHAMAEGTKAVSHASS	LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	Não modificado
	LVLPADLAKHAMAEGTK(me2)AVSHASS		K104me2
	LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(hib)AVSHASS	LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(hib)AVSHASS	K104hib
	LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(meprop)AVSHASS	LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(meprop)AVSHASS	K104me
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(ma)AVSHASS	K104ma
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGTK(me3)AVS(ac)HASS	K104me3
		LVLPADLAK(ac)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	K96ac
		LVLPADLAK(cro)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	K96cro
		LVLPADLAK(ma)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	K96ma
		LVLPADLAK(hib)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	K96hib
	LVLPADLAK(meprop)HAMAEGTK(prop)AVSHASS	K96me	

Região da histona	Picchi et al. 2017	de Almeida et al. 2021	Modificação
H2B(88-111) <i>(continuação)</i>		LVLPADLAK(me2)H(ph)AMAEGTK(prop)AVSHASS	K96me2H97ph
		LVLPADLAKHAMAEGT(ac)K(prop)AVSHASS	T103ac
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGT(ac)AVSHASS	K104ac
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGT(cro)AVSHASS(ph)	K104cro
		LVLPADLAK(meprop)HAMAEGT(ac)AVSHASS	K96meK104ac
		LVLPADLAK(meprop)HAMAEGT(meprop)AVSHASS	K96meK104me
		LVLPADLAK(meprop)HAMAEGT(ac)K(prop)AVSHASS	K96meT103ac
		LVLPADLAK(ma)HAMAEGT(meprop)AVS(ac)HASS	K96maK104me
		LVLPADLAK(ub)HAMAEGT(me)AVS(ac)HASS	K96ubK104me
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGT(ac)K(meprop)AVSHASS	T103acK104me
		LVLPADLAK(prop)HAMAEGT(ac)K(me3)AVSHASS	T103acK104me3
		LVLPADLAKHAMAEGT(ac)K(hib)AVSHASS	T103acK104hib
		LVLPADLAK(ac)HAMAEGT(ac)K(meprop)AVSHASS	K96ac T103acK104me
H3 (50-66)	QFQRSTDLLLQKAPFQR	QFQRSTDLLLQK(prop)APFQR	Não modificado
		R.QFQR(me)STDLLLQK(prop)APFQR.L	R53me
H3.V (1-25)		G(ac)SLK(meprop)K(prop)VASVEK(prop)HSAFSSASQLPK(prop)PR	G1ac
		G(ac)SLK(meprop)K(prop)VASVEK(prop)HSAFSSASQLPKPR	G1acK4me
		GSLK(meprop)K(meprop)VASVEK(prop)HSAFSSASQLPK(prop)PR	K4meK5me
		GSLK(meprop)K(meprop)VASVEK(prop)HSAFSSASQLPK(ac)PR(me)	K4meK5meK23acR25me
H4 (76-89)	KKTVTAVDVVNALR	KKTVTAVDVVNALR	Não modificado
	K(ac)K(prop)TVTAVDVVNALR		K76ac
	K(prop)(cro)KTVTAVDVVNALR		K76cro
	K(prop)K(ac)TVTAVDVVNALR		K77ac
	K(prop)K(cro)TVTAVDVVNALR		K77cro
	K(prop)(ac)K(cro)TVTAVDVVNALR		K76acK77cro
	K(prop)(cro)K(ac)TVTAVDVVNALR		K76croK76ac

Região da histona	Picchi et al. 2017	de Almeida et al. 2021	Modificação
H4 (76-89) (continuação)	K(prop)(ma)K(meprop)TVTAVDVVNLR		K76maK77me
	K(hib)K(hib)TVTAVDVVNLR		K76hibK77hib
	K(ac)(prop)K(me)TVTAVDVVNLR		K76acK77me
	K(prop)K(prop)TVTAVDVVNLR(cit)	K(prop)K(prop)TVTAVDVVNLR(cit)	R89cit
	K(ac)K(ac)TVTAVDVVNLR	K(ac)K(ac)TVTAVDVVNLR	K76acK77ac
		K(meprop)K(suc)T(ac)VTAVDVVNLR	T78ac
		K(prop)K(prop)T(ph)VTAVDVVNLR	T78ph
		K(prop)K(prop)TVTAVDVVNLR(me)	R89me
		K(prop)K(prop)TVTAVDVVNLR(me2)	R89me2
		K(cro)K(cro)T(ac)VTAVDVVNLR	K76croK77cro
		K(prop)K(meprop)T(ac)VTAVDVVNLR	K77me T78ac
		K(meprop)K(meprop)T(ac)VTAVDVVNLR	K76meK77me T78ac
H1(29-42)	KTAAKKTAKKPAVR	K(prop)TAAK(prop)K(prop)TAK(prop)K(prop)PAVR	Não modificado
		K(prop)TAAKK(meprop)TAK(prop)K(ac)PAVR	K38ac
		K(prop)TAAKK(ac)TAKKPAVR	K34ac
		K(prop)TAAK(meprop)K(prop)TAK(prop)K(prop)PAVR	K33me
		K(prop)TAAK(meprop)K(ac)TAK(me)K(ac)PAVR	K37meK38ac
		K(prop)TAAKKTAK(ac)K(ac)PAVR	K37acK38ac
		K(prop)TAAK(meprop)K(ac)TAK(prop)K(ac)PAVR	K33meK34acK38ac

Fonte: o autor (2021). Regiões de histonas são comparadas quanto a seus peptídeos identificados em nosso trabalho e em Picchi et al. (2017). Note a presença da propionilação (prop e meprop) em diferentes formas dos peptídeos de nosso trabalho. As hPTMs em negrito na coluna “Modificação” foram identificadas em nosso trabalho e não foram identificadas em Picchi et al (2017). A comparação completa das regiões de histonas identificadas e seus peptídeos está na TABELA S1.

1.2 Atualização do mapa das hPTMs de *T. cruzi*

Uma vez otimizado o preparo de amostras na identificação de hPTMs em *T. cruzi*, as amostras de cada estratégia proteômica (LC-MS/MS e GeLC-MS/MS) compostas por duas réplicas biológicas cada, divididas em três réplicas técnicas durante a preparação da amostra e em duas ou três réplicas de injeção de corrida nanoLC-MS/MS, totalizando 27 arquivos .raw, tiveram seus peptídeos identificados em ferramenta auxiliada por busca *de novo* e as PTMs identificadas por algoritmo voltado para detecção de múltiplas PTMs (HAN et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Nosso trabalho expandiu o número de hPTMs de *T. cruzi* conhecidos em quase duas vezes, e ao compilarmos com as hPTMs já descritas, o mapa atualizado representa o maior conjunto de hPTMs disponível para qualquer tripanossomatídeo até o momento. Os dados e resultados dessa etapa do trabalho são mostrados a seguir e foram publicados sob o título *An updated map of histone post-translational modifications of Trypanosoma cruzi* na revista *Scientific Data* (<https://www.nature.com/articles/s41597-021-00818-w>) em 25 de março de 2021.



OPEN

DATA DESCRIPTOR

An updated map of *Trypanosoma cruzi* histone post-translational modifications

Rafael Fogaça de Almeida, Matheus Fernandes  & Lyrís Martins Franco de Godoy 

In humans and other eukaryotes, histone post-translational modifications (hPTMs) play an essential role in the epigenetic control of gene expression. In trypanosomatid parasites, conversely, gene regulation occurs mainly at the post-transcriptional level. However, our group has recently shown that hPTMs are abundant and varied in *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas Disease, signaling for possible conserved epigenetic functions. Here, we applied an optimized mass spectrometry-based proteomic workflow to provide a high-confidence comprehensive map of hPTMs, distributed in all canonical, variant and linker histones of *T. cruzi*. Our work expands the number of known *T. cruzi* hPTMs by almost 2-fold, representing the largest dataset of hPTMs available to any trypanosomatid to date, and can be used as a basis for functional studies on the dynamic regulation of chromatin by epigenetic mechanisms and the selection of candidates for the development of epigenetic drugs against trypanosomatids.

Background & Summary

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas Disease, is a flagellated protozoan belonging to the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae¹. About 6 to 7 million people are estimated to be infected with *T. cruzi* worldwide², making it a serious public health problem. In its life cycle, *T. cruzi* passes through different hosts, including mammals and insects and, to adapt to these different environments, undergoes dramatic changes in its phenotype, which require a fine regulation of gene expression.

The regulation of gene expression in an organism can occur in different levels. In humans and most other eukaryotes, one of the key points of gene expression control is the regulation of transcription initiation by epigenetic mechanisms, such as the occurrence of hPTMs³, and “epigenetic drugs” are already in use for the treatment of different diseases, such as cancer and neurological disorders^{4–6}. In *T. cruzi* and other trypanosomatids, on the other hand, the control of gene expression occurs mainly post-transcriptionally, at the level of RNA and protein⁷. Despite that fact, the chromatin of *T. cruzi* is similar to that of other eukaryotes. It is organized into chromosomes containing canonical (H2A, H2B, H3 and H4), variant (H2A.Z, H2B.V and H3.V) and linker (H1) histones⁸ and the presence of common hPTMs (acetylation, methylation and phosphorylation) has been detected in both their replicative and non-replicative forms^{9–19}. More recently, our group identified a plethora of 13 different hPTM types in *T. cruzi* epimastigotes, starting to unravel a histone code that potentially supports the existence of chromatin regulation via post-translational modification in this parasite²⁰.

The importance of a few modification types and specific hPTM marks for trypanosomatids have been demonstrated. In *T. brucei*, di- and trimethylation of H3K76 regulate the cell cycle²¹; methylation and acetylation act as signaling for histone writers and erasers in the regulation of variant surface glycoproteins (VSGs)^{22,23} and variant histones and H3 trimethylation are enriched in probable transcription initiation sites^{24,25}. Similarly, the origins of polycistronic transcription seem to be regulated by histone acetylation in *Leishmania major*²⁶ and, in *T. cruzi*, acetylation and methylation indicate regions of transcriptional initiation of divergent polycistronic transcription units, which contain evolutionarily conserved bidirectional promoters¹¹. However, the global impact of hPTMs, as well as the mechanisms underlying their function in trypanosomatids and the language of crosstalk regulation between different PTMs, are still poorly understood.

For trypanosomatids of medical interest, particularly for *T. cruzi*, the lack of basic information about epigenetic molecular players, such as the thorough identification and site-specific localization of histone PTMs marks, has hindered functional research that would allow the understanding of epigenetic control and the identification

Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Parana, Curitiba, Parana, Brazil. ✉e-mail: lyris.godoy@fiocruz.br

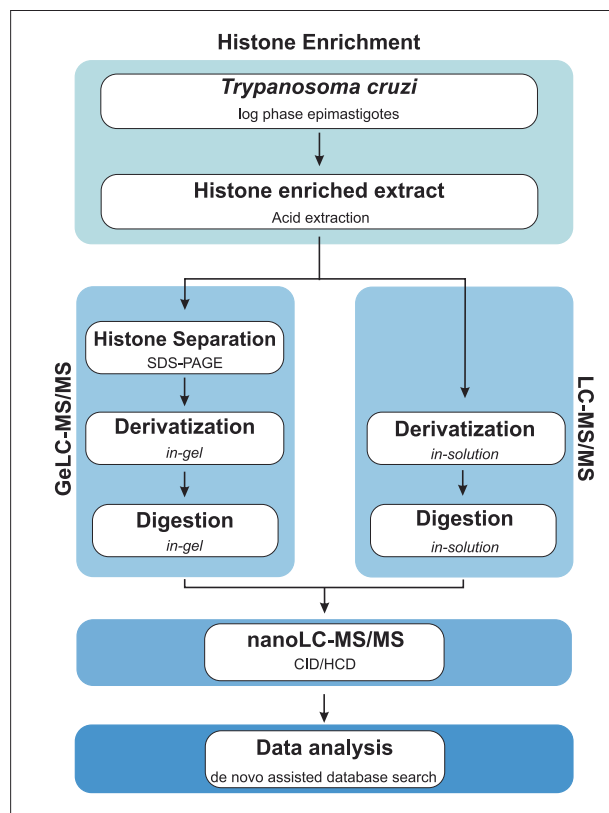


Fig. 1 Experimental workflow for the comprehensive profiling of *T. cruzi* hPTMs.

of targets for epigenetic drugs. Nevertheless, due to the high degree of similarity of its orthologous genes, it is very likely that epigenetic components are also essential for the growth and survival of this parasite and can represent important targets for the development of new therapies for Chagas Disease.

In this context, our group has been working on large-scale proteomic analysis to provide a global view of the PTM landscape for each of the *T. cruzi* histones, aiming to smooth this gap of information and to pave the way for functional epigenetic studies on trypanosomatids. Here, we applied optimized sample preparation, two parallel mass spectrometry-based proteomic approaches (GeLC-MS/MS and LC-MS/MS) with complimentary sensitive/high-resolution fragmentation techniques (CID/HCD) and *de novo* assisted database search (Fig. 1) to deeply profile the PTMs of *T. cruzi* canonical, variant and linker histones, increasing to 189 the number of hPTM sites and to 353 the number of hPTM marks described for this parasite (Fig. 2) and contributing to the hypothesis of the existence of dynamic regulation of chromatin by hPTMs in trypanosomatids. A summary of the global numbers of *T. cruzi* hPTMs described up to this date is available in Table 1 and detailed in Fig. 3. Our updated *T. cruzi* hPTM dataset represents the most comprehensive available for any trypanosomatid to date, and can be used as a basis for future functional studies and selection of targets for the development of anti-parasitic epigenetic drugs.

Methods

Cell culture and histone enrichment. *T. cruzi* Dm28c epimastigotes were cultured to log phase in liver infusion tryptose (LIT) medium²⁷, supplemented with 10% fetal bovine serum without agitation at 28 °C. Histone extraction and enrichment were performed as previously described²⁰, with some modifications. Briefly, 1×10^9 epimastigote cells were collected by centrifugation (10 minutes, 5000 g at 4 °C). Cells were lysed resuspending the obtained pellet in 1 ml of extraction buffer A (250 mM Sucrose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.5% (v/v) Saponin; 10 mM sodium butyrate, 1x protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA free, Roche) and 1x phosphatase inhibitor cocktail (Roche)) and centrifuged for 10 minutes at 6000 g, 4 °C. Cell pellet was washed in 1 ml of extraction buffer B (extraction buffer A without saponin) and centrifuged for 10 minutes at 6000 g, 4 °C. The pellet, containing the cell nuclei, was resuspended in 1 ml of Buffer C (1% (v/v) Triton X-100; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM sodium butyrate, 1x protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA free, Roche) and 1x phosphatase inhibitor cocktail (Roche)) and then centrifuged for 20 minutes at 12000 g, 4 °C. The pellet was washed 3 times in 100 mM Tris-HCl pH 8, resuspended in 1 ml of 0.4 N HCl and incubated on a rotator overnight at 4 °C. Acid soluble proteins were recovered in the supernatant after sample centrifugation for 15 minutes at 10000 g, 4 °C. The supernatant was transferred to a clean tube; acetone (8 x the initial volume) was added and incubated overnight at -20 °C. The sample was centrifuged for 15 minutes at 3100 g, 4 °C. Acetone was removed carefully and the pellet was washed 3 times with 1 ml of acetone. The protein pellet was carefully dried at 37 °C and then resuspended in 50 µl of water.

	This work			Total described	
	Sequence coverage (%)	hPTM sites (confirmed/novel)	hPTM marks (confirmed/novel)	hPTM sites	hPTM marks
H2A	64	13 (8/5)	33 (11/22)	26	49
H2B	95	32 (17/15)	68 (21/47)	36	87
H3	97	21 (17/4)	34 (25/9)	32	64
H4	97	26 (21/5)	43 (28/15)	34	74
H2A.Z	34	6 (6/0)	7 (6/1)	19	23
H2B.V	38	1 (1/0)	1 (1/0)	11	17
H3.V	65	8 (1/7)	9 (2/7)	13	19
H1	27	5 (0/5)	6 (0/6)	18	20
	Total	112 (71/41)	201 (94/107)	189	353

Table 1. Global numbers for hPTM identification of *T. cruzi* histones.

Derivatization and digestion of histones. Samples were processed by two different proteomic strategies (GeLC-MS/MS and LC-MS/MS) based on the protocol described in our previous study²⁰, with some modifications. For GeLC-MS/MS, histone-enriched extracts were resolved on 15% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie blue. Histone bands were excised, destained (25 mM NH₄HCO₃ in 50% ethanol, shaking in a thermomixer at 800 rpm, 25 °C), derivatized with propionylation solution (propionic anhydride in 100 mM NH₄HCO₃, 1:10)²⁸ and digested *in gel*²⁹ with trypsin (sequencing modified, Promega) at a concentration of 12.5 ng/μL for 16 h at 37 °C. For LC-MS/MS, histone-enriched extracts were directly derivatized with propionylation solution (propionic anhydride in 2-propanol, 1:3)³⁰ and digested *in solution*³⁰ with trypsin (sequencing modified, Promega) at a protease/protein ratio of 1/20, for 16 h at 37 °C. For both proteomic strategies, reduction and alkylation were not performed and peptide digests were desalted using C18 StageTips³¹ prior to nanoLC-ESI-MS/MS.

NanoLC-ESI-MS/MS analysis. Peptide mixtures were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry in tandem (ESI MS/MS). The experiments were performed at the mass spectrometry facility P02-004 (Carlos Chagas Institute - Fiocruz Parana), with an EASY nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) system connected to an LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Phoenix S&T). Chromatographic separation of the peptides took place in a one-column set-up, with a 30-cm analytical column (75 μm inner diameter, 350 μm outer diameter) in-house packed with reversed-phase C18 resin (ReproSil-Pur C18-AQ 1.9 μm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany), kept at a constant temperature of 60 °C. Solvent A was 0.1% formic acid, 5% DMSO in water, and solvent B was 5% DMSO, 0.1% formic acid in acetonitrile. Samples were injected onto the column and subsequently eluted with a flow rate of 250 nL/min and peptide mixtures were separated with a linear gradient from 5% to 40% acetonitrile in 128 min. The mass spectrometer operated in Data-Dependent Acquisition (DDA) mode to automatically switch between MS and MS/MS (MS²) acquisition, using, applying both Collision-Induced Dissociation (CID) and Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) to the 5 most intense peptides detected in each MS spectrum. For all samples duplicate or triplicate LC-MS/MS runs were performed. Survey full scan MS spectra (at 300–1600 m/z range) were acquired in the Orbitrap analyzer with resolution R = 60,000 at m/z 400 (after accumulation to a target value of 1,000,000 in the linear ion trap), with preview scan enabled. Singly-charged precursor ions were not selected for fragmentation. Former target ions selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 seconds. Total cycle time was approximately three seconds. Other mass spectrometric conditions were: spray voltage, 2.4 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature, 100 °C; collision gas pressure, 1.3 mTorr; normalized collision energy using wide-band activation mode 35% for MS2. The ion selection threshold was 250 counts for MS2. An activation q = 0.25 and activation time of 30 ms was applied in MS2 acquisitions. The lock mass³² option, using DMSO peaks³³ was enabled in all full scans to improve the mass accuracy of precursor ions.

Data analysis. Peptides and hPTM sites were identified with the software Peaks Studio (version 10, Bioinformatics Solutions Inc)^{34–36}. The sequential analysis by Peaks Studio started with *de novo* sequencing of fragment spectra (Peptide *De Novo*), followed by peptide sequence match of the high quality *de novo* tags with (Peaks DB)³⁶, considering the most frequent modifications, and then by peptide sequence match of the remaining high quality *de novo* only peptide tags (Peaks PTM)³⁵. Proteins were searched against a database containing 20257 sequences of *T. cruzi* Dm28c strain (downloaded on Aug 15, 2018 from TriTrypDB, <http://www.tritrypdb.org>). In all Peaks searches (Peptide *De Novo*, Peaks DB and Peaks PTM) the precursor mass tolerance was set to 10 ppm and the fragment ion mass tolerance was set to 0.5 Da (ion trap spectra) or 20 ppm (Orbitrap spectra). Minimum peptide size was set to five amino acids, allowing for two missed cleavages. The enzyme for theoretical digestion was Arg-C with specific digestion mode. For Peaks DB, monomethylation (K/R), dimethylation

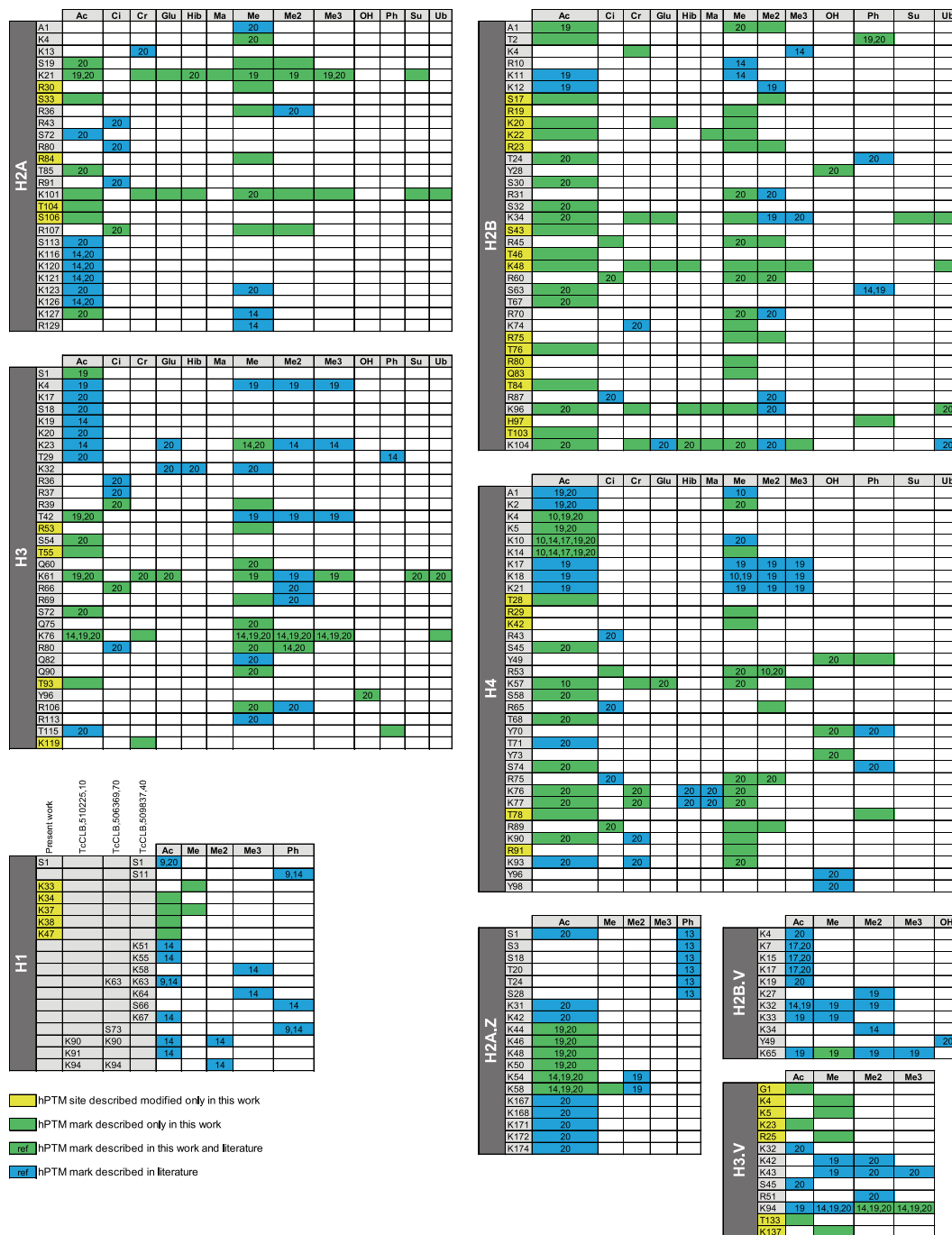


Fig. 3 Summary of the *T. cruzi* hPTMs described in the present work and the literature. Colors indicate which hPTM sites and marks were confirmed and which ones are novel. For the confirmed ones, the reference numbers indicate the respective work(s) where each modification site or PTM mark was previously described. Ac (acetylation), Ci (citrullination), Cr (crotonylation), Glu (glutarylation), Hib (hydroxyisobutyrylation), Ma (malonylation), Me (monomethylation), Me2 (dimethylation), Me3 (trimethylation), OH (hydroxylation), Ph (phosphorylation), (K), Su (succinylation), Ub (ubiquitination).

(K/R), trimethylation (K), acetylation (K), acetylation (N-term), propionylation (K), propionylation (N-term), methylpropionylation (K), phosphorylation (S/T/Y) and oxidation (M) were set as variable PTMs. For Peaks PTM, on top of those PTMs searched in PeaksDB, monomethylation (N-term), dimethylation (N-term), glutarylation (K), 2-hydroxyisobutyrylation (K), hydroxylation (Y), malonylation (K), succinylation (K), ubiquitination (K), crotonylation (K), citrullination (R), methylation (Q), phosphorylation (H), butyrylation (K), acetylation (S/T), formylation (K) and deamidation (N/Q) were added as variable PTMs. For identification of both peptides and proteins, the false discovery rate (FDR) was set to 1%. PTM sites with an Ascore ≥ 20 were automatically validated.

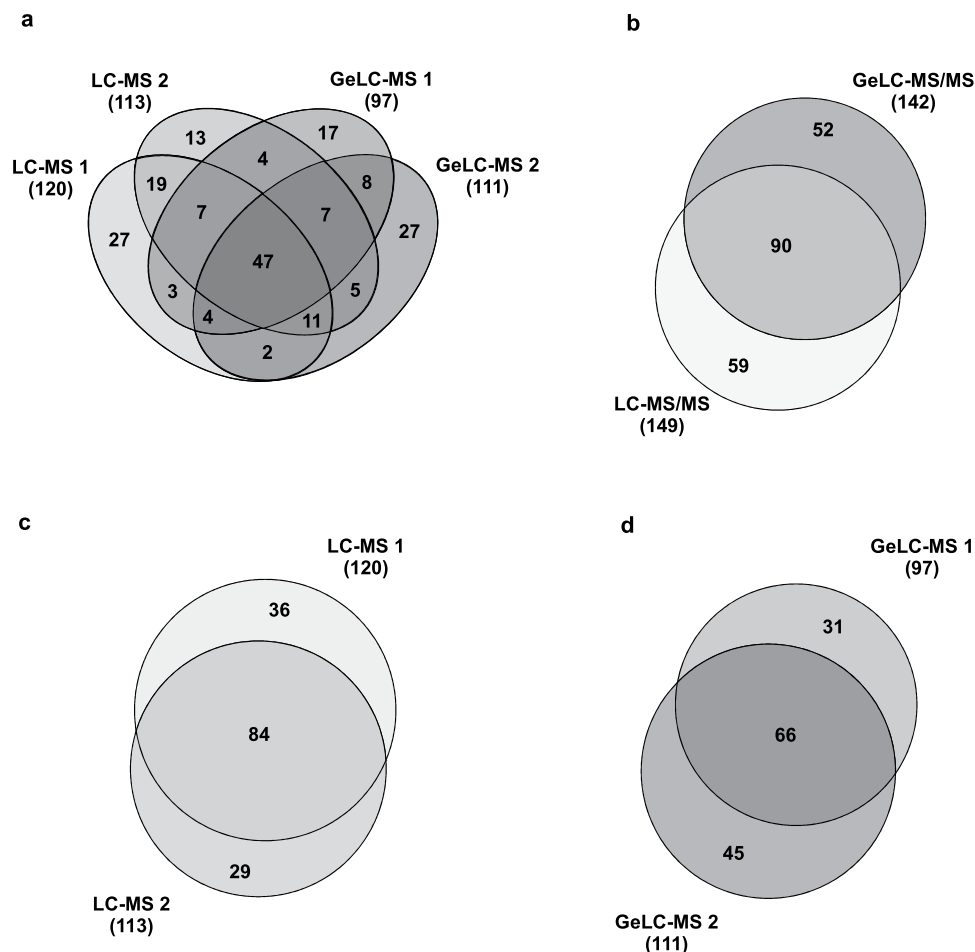


Fig. 4 Identification of *T. cruzi* hPTMs across different experiments. Venn diagrams showing the number of hPTMs identified (a) each individual experiment, (b) different proteomic approaches, (c) LC-MS/MS experiments and (d) GeLC-MS/MS experiments. The hPTMs contained in each part of the Venn diagrams are listed in figshare File 2³⁹.

Data Records

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE³⁷ partner repository with the dataset identifier <https://identifiers.org/pride.project:PX01910438>. Representative spectra for all novel hPTM marks and additional tables for supporting our dataset have been uploaded to figshare³⁹.

Technical Validation

In the present work, two parallel proteomic approaches (LC-MS/MS and GeLC-MS/MS) were used to deeply profile the hPTMs of canonical, variant and linker histones of *T. cruzi* epimastigotes (Fig. 1). Each proteomic approach was applied to two biological replicates, each of them divided into two or three technical replicates during sample preparation, and multiple LC-MS/MS runs were performed for each sample, totaling 27 raw files. The experimental design adopted in this study allowed us to substantially expand the repertoire of hPTMs and led to very reliable and complimentary data. One of the reasons for the improved identification of low abundance peptides and more PTM sites was the use of different approaches that not only decreased the complexity of the sample (histone enrichment by acid extraction and further separation by SDS-PAGE), but also explored different biochemical characteristics of histones. The derivatization of proteins before trypsin cleavage prevented over-cutting and reduced the charge of the lysine-rich histone regions, especially in the N-terminal tails, producing peptides with good size and charge (doubly and triply charged in electrospray ionization MS⁴⁰) for optimal high energy based peptide identification⁴¹. After protein propionylation, the samples from both proteomic strategies were directly submitted to the digestion. Thus, this simplified methodology was efficient in the identification of *T. cruzi* hPTMs.

A combined list of all histone supporting peptides identified in the present work is available in figshare File 1³⁹. Each non-redundant peptide sequence was unambiguously identified by multiple features. The identified peptides matched to several distinct gene products that represent each histone in the genome of *T. cruzi*, some of them demonstrating the expression of sequence divergent histone isoforms (Fig. S1a). Among the multiple isoforms

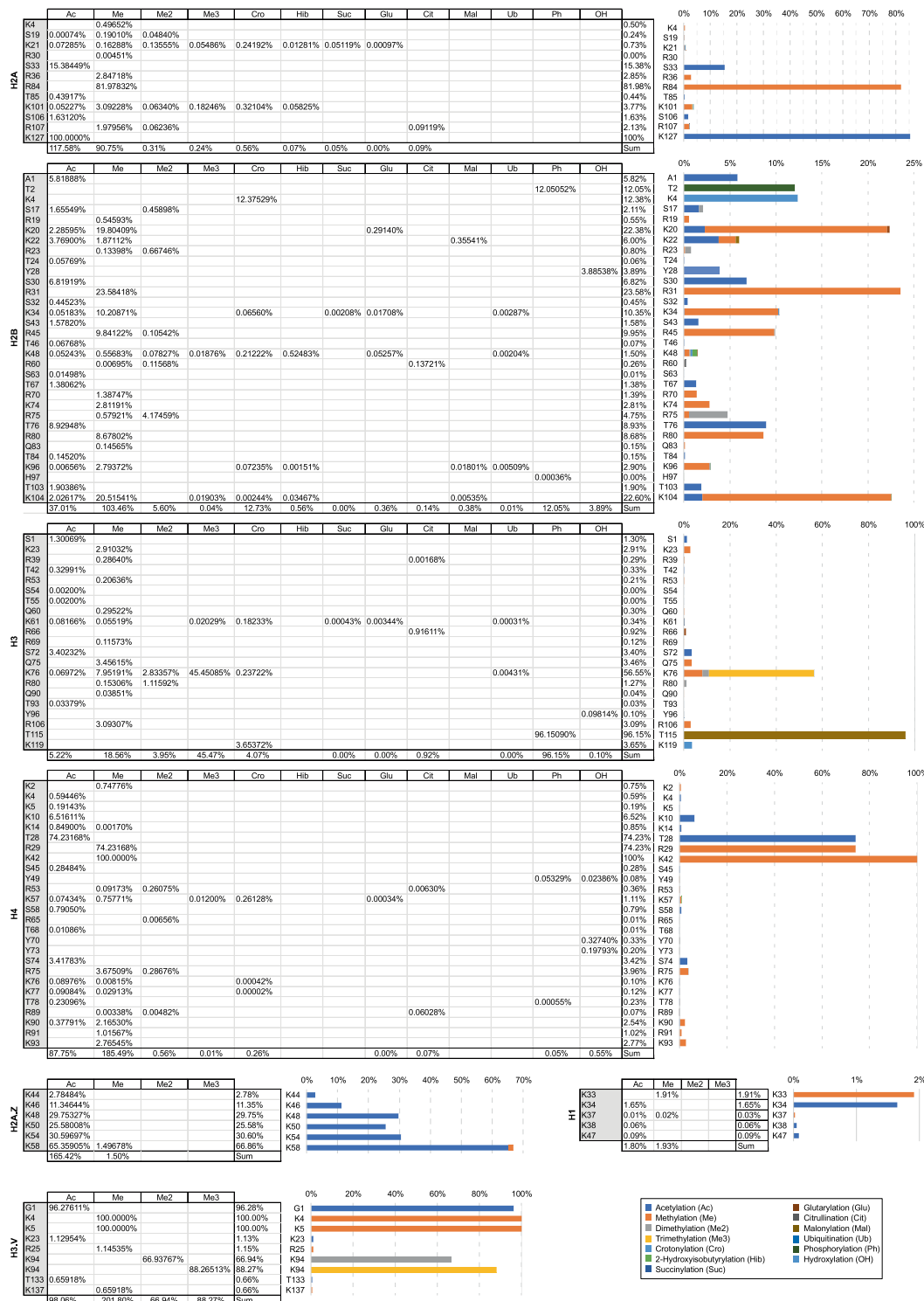


Fig. 5 Relative abundance of hPTM sites. For each hPTM site identified the relative abundance (occupancy) were calculated by dividing the intensity of the modified by the sum of the modified and unmodified hPTM site. The cases with 100% of abundance are due to the lack of intensity detection for its unmodified version.

detected for each given histone, the one with the highest score and number of PTMs (e.g. H2A, BCY84_17381; H2B, BCY84_06298; H3, BCY84_02638; H4, BCY84_15632; H2A.Z, BCY84_22061; H2B.V, BCY84_04421; H3.V, BCY84_18558 and H1, BCY84_14748), was chosen as the model sequence to be used throughout the article. All histones were identified by multiple MS/MS spectra in both biological replicates of the two proteomic strategies (Fig. S1b). The quality of hPTM peptide identification can be verified through their mass accuracy and score distribution (Fig. S2). Also, the majority of hPTMs were detected across multiple samples and experiments, strengthening the reliability of our data (Fig. 4 and figshare File 2³⁹).

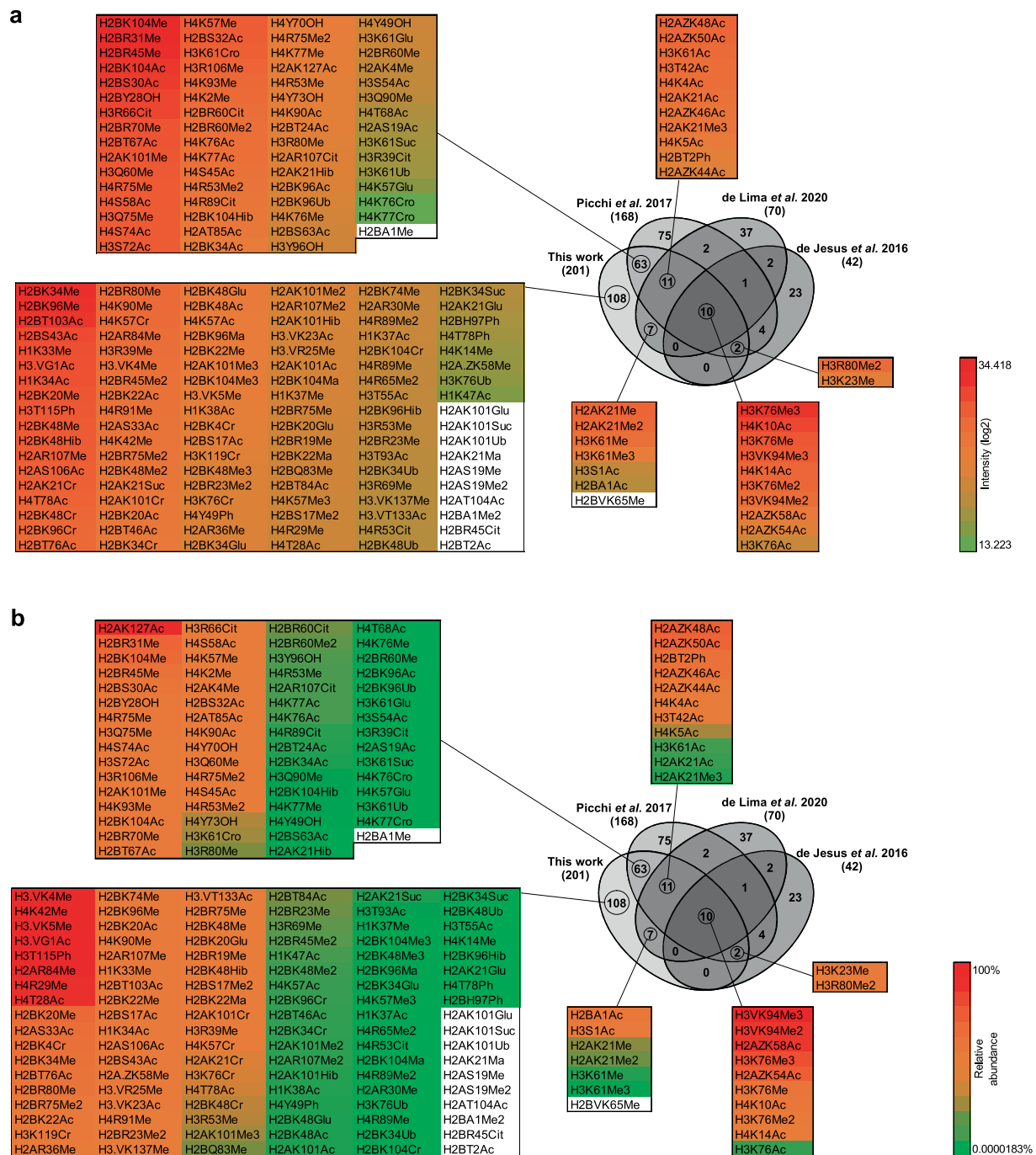


Fig. 6 Abundancy of exclusive and confirmed hPTM marks identified in this study compared to previously described analysis. Overlapping hPTMs to other studies are color coded according to (a) log₂ intensity and (b) relative abundance. Detailed data are listed in figshare File 3³⁹.

An aspect explored in our data is the relative abundance of hPTMs. In general, the hPTM marks identified displayed low abundance/occupancy. However, some sites of high abundance were also found, mainly for acetylation, methylation and a few phosphorylation sites (Fig. 5). These results seem to be in agreement with previous studies that show the low abundance of scarcely histone modifications in eukaryotes⁴² and that the methylation and acetylation are the most abundant hPTM in *T. cruzi*¹⁹. Among the hPTM marks with high abundance in our dataset and previously detected in compared studies are the H3K76me/me2/me3, H4K10ac and H4K14ac, important marks involved in cell cycle regulation in trypanosomes^{12,14,21}. Other marks in this group are present in variant histones, H3.VK94me2/me3, H2A.ZK54ac and H2A.ZK58ac, that seems to be trypanosome-specific¹⁴. The relative abundances of the modified peptides and individual modification sites identified in our dataset with a relative abundance equal or higher than 10% are shown in Fig. S3a, b, respectively.

A total of 201 hPTM marks identified in the present work passed the criteria of site localization score (Ascore >20). Among them, 94 confirmed the literature and 107 were newly described in the repertoire of *T. cruzi* hPTMs (representative spectra available in figshare File 5³⁹). Also, some hPTMs previously described were not detected here (n = 126) is probably due to technical and biological reasons (e.g. different proteomic strategies, different strains of parasites, regions of histones not covered in a given study, etc.). Also, the chance of identification of hPTM marks in multiple experiments and studies seems to have some correlation with their intensity and relative abundance (Fig. 6 and figshare File 3³⁹). In addition to the validated hPTM marks described here, we identified another 111 with Ascore <20, which were not added to our final map. However, several of them were either close to the threshold score and/or identified by multiple features/experiments. Therefore, to allow the reader to fully explore the data, a compiled list of all the hPTM marks identified in the present work (Ascore >20/<20 and literature) are available in figshare File 4³⁹.

Our updated and comprehensive profile of *T. cruzi* hPTMs, now available to be used for further studies, reinforces that several residues are targets of multiple modifications, that some modification types are more abundant than others and that hPTMs are widely distributed and diverse at both the tails and the globular domains of all histones, which are both regions with distinct and important roles in the epigenetic regulation of higher eukaryotes^{3,43}.

Received: 3 June 2020; Accepted: 22 December 2020;

Published online: 25 March 2021

References

- Chagas, C. Nova tripanozomiaze 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**, 159–218 (1909).
- WHO. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). WHO (World Health Organization) [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (2019).
- Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet.* **32**, 42–56 (2016).
- Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K. & Schapira, M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 384–400 (2012).
- Prachayasittikul, V. *et al.* Exploring the epigenetic drug discovery landscape. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 345–362 (2017).
- Jones, P. A., Issa, J. J. & Baylin, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* **17** (2016).
- Clayton, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol.* **9**, 190072 (2019).
- Elias, M. C., Nardelli, S. C. & Schenkman, S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. *Future Microbiol.* **4**, 1065–1074 (2009).
- Da Cunha, J. P. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **140**, 75–86 (2005).
- Da Cunha, J. P. C., Nakayasu, E. S., de Almeida, I. C. & Schenkman, S. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**, 268–277 (2006).
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A. & Åslund, L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **283**, 15884–15892 (2008).
- Nardelli, S. C., Cunha, J. P. C., Motta, M. C. M. & Schenkman, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. *Chromosoma* **118**, 487–499 (2009).
- Marchini, F. K. *et al.* Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. *PLoS One* **6** (2011).
- De Jesus, T. C. L. *et al.* Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *J. Proteome Res.* **15**, 2039–2051 (2016).
- Amorim, J. C. *et al.* Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
- De Jesus, T. C. L. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, 23–38 (2017).
- Moretti, N. S., Cestari, I., Anupama, A., Stuart, K. & Schenkman, S. Comparative Proteomic Analysis of Lysine Acetylation in *Trypanosomes*. *J. Proteome Res.* **17**, 374–385 (2018).
- Lucena, A. C. R. *et al.* Quantitative phosphoproteome and proteome analyses emphasize the influence of phosphorylation events during the nutritional stress of *Trypanosoma cruzi*: the initial moments of *in vitro* metacyclogenesis. *Cell Stress Chaperones* **24**, 927–936 (2019).
- de Lima, L. P. *et al.* Improvements on the quantitative analysis of *Trypanosoma cruzi* histone post translational modifications: Study of changes in epigenetic marks through the parasite's metacyclogenesis and life cycle. *J. Proteomics* **225**, 103847 (2020).
- Picchi, G. F. A. *et al.* Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* canonical and variant histones. *J. Proteome Res.* **16**, 1167–1179 (2017).
- Janzen, C., Hake, S. B., Lowell, J. E. & Cross, G. A. M. Selective Di- or Trimethylation of Histone H3 Lysine 76 by Two DOT1 Homologs Is Important for Cell Cycle Regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell* **23**, 497–507 (2006).
- Figueiredo, L. M., Janzen, C. J. & Cross, G. A. M. A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biol.* **6**, 1539–1548 (2008).
- Wang, Q. P., Kawahara, T. & Horn, D. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Mol. Microbiol.* **77**, 1237–1245 (2010).
- Siegel, T. N. *et al.* Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* **23**, 1063–1076 (2009).
- Wright, J. R., Siegel, T. N. & Cross, G. A. M. Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **172**, 141–144 (2010).
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A. & Myler, P. J. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* **10**, 1–15 (2009).
- Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med trop São Paulo* **6**, 93–100 (1964).
- Forné, I., Barth, T. & Imhof, A. Quantifying histone modifications using mass spectrometry (Prot 51). *Epigenesis* 1–14 (2012).
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. *In-gel* digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860 (2006).
- Lin, S. & Garcia, B. A. Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High Resolution Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.* **512**, 3–28 (2012).

31. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896–1906 (2007).
32. Olsen, J. V *et al.* Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics* 2010–2021, <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200> (2005).
33. Hahne, H. *et al.* DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments. *Nat. Methods* **10**, 989–91 (2013).
34. Ma, B. *et al.* PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2337–2342 (2003).
35. Han, X., He, L., Xin, L., Shan, B. & Ma, B. PeaksPTM: Mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications. *J. Proteome Res.* **10**, 2930–2936 (2011).
36. Zhang, J. *et al.* PEAKS DB: *De Novo* Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1–8 (2012).
37. Perez-riverol, Y. *et al.* The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic acid Res.* **47**, 442–450 (2019).
38. de Godoy, L. M. F. *et al.* Histone post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi*: a high-confidence comprehensive map. *PRIDE Archive* <https://identifiers.org/pride.project:PXD019104> (2021).
39. de Godoy, L. M. F. *et al.* Histone post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi*: a high-confidence comprehensive map. *figshare* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5221706> (2021).
40. Garcia, B. A. *et al.* Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**, 933–938 (2007).
41. Frese, C. K. *et al.* Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J. Proteome Res.* **10**, 2377–2388 (2011).
42. Simithy, J. *et al.* Characterization of histone acylations links chromatin modifications with metabolism. *Nat. Commun.* **8**, 1141 (2017).
43. Tropberger, P. & Schneider, R. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 657–661 (2013).

Acknowledgements

The authors thank CNPQ, CAPES and Fiocruz for their financial support. They also thank for the use of the Mass Spectrometry facility P02-004, at Carlos Chagas Institute, and for the technical support of Dr. Michel Batista.

Author contributions

All authors contributed to the writing and review of the article.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00818-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.M.F.d.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

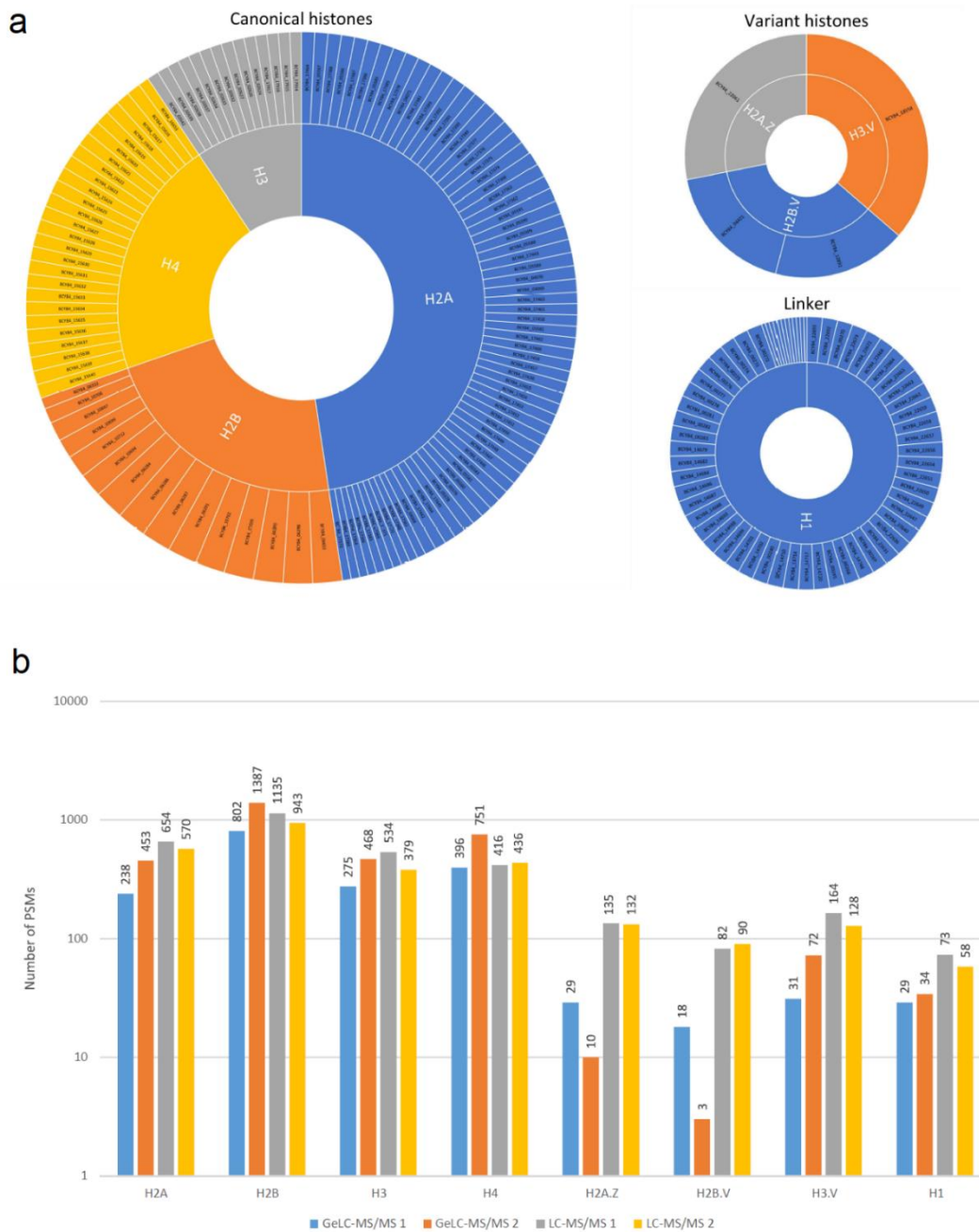


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

The Creative Commons Public Domain Dedication waiver <http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/> applies to the metadata files associated with this article.

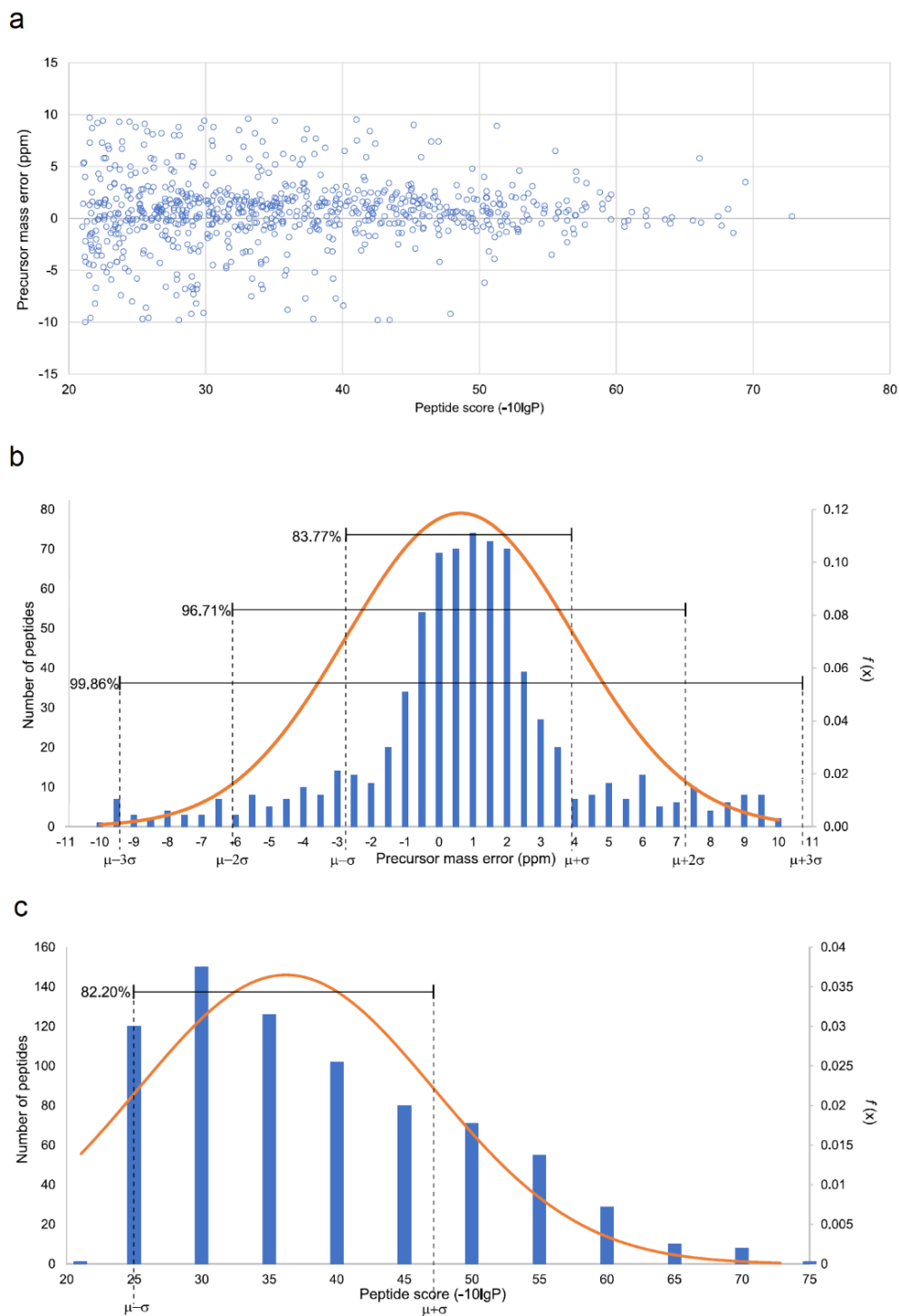
© The Author(s) 2021

FIGURE S1. PSMs IDENTIFICATION OF *T. cruzi* CANONICAL, VARIANT AND LINKER HISTONES



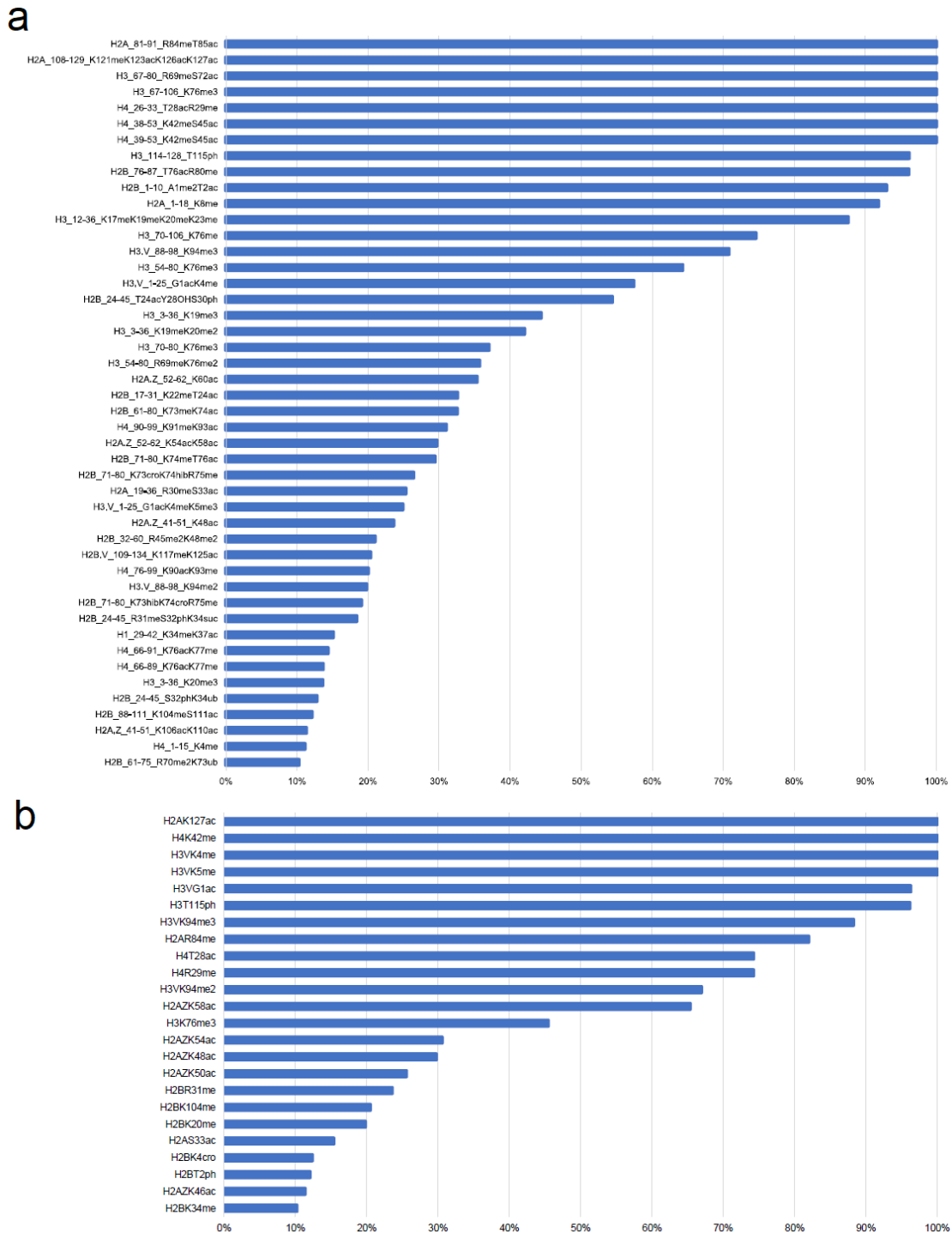
Number of PSMs matched to the distinct gene products of each histone (a). In the outer circle, the angle of each slice is proportional to the number of PSMs identifying that particular sequence. (b) Number of PSMs matched to the supporting peptides for each model histone.

FIGURE S2. MASS ACCURACY AND SCORE DISTRIBUTION OF THE MODIFIED PEPTIDES



Scatterplot of precursor mass error (ppm) versus -10lgP score for modified peptides (a). Histogram of the precursor mass error distribution of modified peptides. The average mass error of the peptides is +0.63 ppm (b). Histogram of score distribution of modified peptides, showing that 82.2% of the peptides are between a score range of 25.32 and 47.19 (c).

FIGURE S3. THE MOST ABUNDANT *T. cruzi* hPTMs IN THE DATASET



Histone PTM marks with relative abundance above 10% are shown for (a) modified peptides and (b) individual sites. The cases with 100% of abundance are due to the not intensity detection of its unmodified version.

DISCUSSÃO – Capítulo 1

O primeiro trabalho que mapeou, em larga escala, as hPTMs de *T. cruzi* (PICCHI et al., 2017) empregou diferentes estratégias de preparo de amostra e com isso obteve uma ótima cobertura de sequência de histonas, o que contribuiu muito na identificação de hPTMs nesse parasito. Por ter testado diferentes abordagens simultaneamente foi possível identificar diferenças entre elas na identificação de hPTMs.

Desse modo, no protocolo descrito neste capítulo buscou-se utilizar as melhores estratégias anteriormente descritas na identificação de hPTMs em *T. cruzi*. O protocolo também consistiu em duas abordagens proteômicas paralelas (LC-MS/MS e GeLC-MS/MS) que se mostraram complementares na identificação de hPTMs, porém simplificamos etapas não cruciais no preparo de amostra para identificar PTMs de histonas em *T. cruzi*, como redução e alquilação das histonas, reduzindo a introdução de modificações não-biológicas e o tempo de preparo. Diferentemente do protocolo anteriormente descrito, a propionilação foi realizada em todas as amostras tanto em LC-MS/MS quanto em GeLC-MS/MS, o que se mostrou importante na detecção de peptídeos de histonas e de diferentes versões modificadas (TABELA 3). A aquisição de dados foi simplificada na etapa de fragmentação dos íons precursores ao não empregar a fragmentação ETD, reduzindo assim o tempo total necessário na aquisição dos dados sem prejuízo na identificação de hPTMs. Ótimos resultados foram obtidos empregando dois tipos de fragmentação, CID e HCD, que fragmentaram bem os peptídeos com estados de carga +2 e +3, gerados com a propionilação (FRESE et al., 2011; GARCIA et al., 2007). Peptídeos com estes estados de carga correspondem a 85,2% dos peptídeos identificados em nosso trabalho (*figshare File 1*).

O protocolo aqui empregado, além de reduzir a complexidade da amostra através do enriquecimento de histonas e separação por SDS-PAGE, também explorou as características bioquímicas das histonas para otimizar a identificação de hPTMs. Por exemplo, a derivatização dos extratos de histonas com anidrido propiônico, reagente que apresenta alta sensibilidade e eficiência de ionização na análise de peptídeos de histona por espectrometria de massas (SIDOLI et al., 2015). Foi demonstrado por Garcia e colaboradores (GARCIA et al., 2007; LIN; GARCIA, 2012) que a propionilação não apenas evita a digestão dos resíduos de lisina com tripsina e reduz cargas dos peptídeos digeridos, como também permite uma melhor cromatografia em RP-HPLC e, assim, a identificação de diferentes formas de um mesmo peptídeo, ou seja, diferentes combinações

de modificações. Picchi e colaboradores (2017) realizaram a propionilação somente em parte das amostras da estratégia GeLC-MS/MS e estas foram as amostras que mais contribuíram com cobertura de sequência, principalmente da região das caudas e com maior número de hPTMs identificadas (PICCHI et al., 2017). No protocolo descrito nesta tese foi realizada a propionilação de todas as amostras nas duas estratégias GeLC-MS/MS e LC-MS/MS, e comparando com o protocolo anterior, mais formas peptídicas modificadas foram identificadas (TABELAs 3 e S1). A H2B, por exemplo, teve 47 novas marcas hPTMs reportadas de um total 68 identificadas (TABELA 1 do artigo), teve diferentes regiões cobertas com múltiplos peptídeos modificados identificados na estratégia LC-MS/MS (TABELA S1), abordagem que no protocolo anterior (PICCHI et al. 2017) não teve as amostras propioniladas.

Geralmente, o preparo de amostras proteômicas emprega o ditioneitol e iodoacetamida para reduzir e bloquear o grupo tiol das cisteínas nas proteínas, no entanto, as histonas de *T. cruzi* são pobres em cisteínas, existem apenas sete cisteínas nas histonas canônicas e variantes (H3C108 e H3C126, H2A.ZC94 e H2A.ZC102, H2B.VC91, H3.VC103 e H3.VC125). Assim, em nosso protocolo não realizamos as etapas de redução e alquilação das histonas antes da digestão, o que simplificou o protocolo, reduzindo a manipulação experimental das amostras e consumo de reagentes.

Os peptídeos identificados com o protocolo corresponderam a múltiplos produtos gênicos distintos que representam cada histona no genoma do *T. cruzi* (FIGURA S1a do artigo), de modo que cada histona foi identificada por múltiplos espectros nas réplicas biológicas das abordagens LC-MS/MS e GeLC-MS/MS (FIGURA S1b do artigo), conferindo robustez aos resultados. Além disso, a boa qualidade dos peptídeos modificados identificados pode ser atestada pela acurácia de massa e escores de identificação (FIGURA S2 do artigo). A maioria das hPTMs identificada foi também detectada em várias amostras e experimentos, reforçando a confiabilidade de nossos dados (FIGURA 4 do artigo) (DE ALMEIDA; FERNANDES; DE GODOY, 2021).

Foram identificados em nosso trabalho 201 marcas hPTMs, de 13 diferentes tipos, nas histonas de *T. cruzi*, deste total, 94 haviam sido anteriormente descritas e 107 foram identificadas pela primeira vez neste parasito (DE ALMEIDA; FERNANDES; DE GODOY, 2021). Um conjunto de 126 marcas hPTMs previamente descritas não foram identificadas em nosso trabalho, provavelmente por razões técnicas e biológicas, como, por exemplo, o uso de diferentes cepas do parasito, diferentes estratégias proteômicas, ocorrência de regiões das histonas não cobertas, etc.

Por outro lado, alguns tipos de modificações, assim como alguns sítios específicos, foram comumente identificados entre diferentes estudos, fato que parece estar relacionado com uma maior abundância relativa destas hPTMs (DE ALMEIDA; FERNANDES; DE GODOY, 2021).

De acordo com a abundância relativa global das modificações no nosso conjunto de dados, a acetilação e a metilação foram os mais abundantes tipos de hPTM em epimastigota de *T. cruzi* em fase exponencial. Dentre as marcas hPTMs comumente detectadas entre diferentes estudos, algumas possuem algum papel biológico conhecido, como as metilações de H3K76 (me/me2/me3) que atuam no ciclo celular de *T. cruzi* (NUNES et al., 2020) e de *T. brucei* (JANZEN et al., 2006b), as acetilações em H4K10 e H4K14 são importantes na transcrição do DNA em *T. cruzi* (RAMOS et al., 2015) e em *T. brucei* (SIEGEL et al., 2009) e as acetilações em H2A.ZK54 e H2A.ZK58 foram demonstradas presentes em regiões com sítios de início da transcrição em *T. brucei* (KRAUS et al., 2020). Porém algumas das marcas comumente encontrada em diferentes estudos, como H3K76ac e H3.VK94me2/me3 ainda não foram investigadas funcionalmente.

Quando olhamos para as histonas variantes uma das histonas que se destaca é a H2A.Z, que em *T. cruzi* apresenta a região N-terminal K42-K58 hiperacetilada assim como a sua região C-terminal (FIGURA 2 do artigo). Em *T. brucei* e *T. evansi* estas regiões também foram identificadas hiper-acetiladas (KRAUS et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Em *T. brucei*, recentemente foi demonstrado que o fator bromodomínio 2 (TbBDF2) liga-se ao dímero H2A.Z/H2B.V, exatamente na região N-terminal hiper-acetilada da H2A.Z (YANG et al., 2017). Em *T. cruzi*, TcBDF2 liga-se a H4K10 e H4K14 acetilados e parece estar envolvida na resposta a dano ao DNA (VILLANOVA et al., 2009) e também interage com H2B.V (ROSÓN et al., 2021), no entanto, a sua interação na região N-terminal acetilada da H2A.Z ainda não foi demonstrada. Kraus e colaboradores (2020) sugerem que a acetilação da H2A.Z encontrada em regiões de transcrição ativa pode indicar uma ligação evolutivamente conservada entre a acetilação de histona, deposição de H2A.Z e transcrição de RNA Pol II, mesmo em organismos que não possuem regiões promotoras canônicas e sítios definidos de início de transcrição, como os tripanossomatídeos (KRAUS et al., 2020).

As hPTMs mais abundantes na ocupação de seus sítios, são, de maneira geral, as acetilações e as monometilações e, em seguida, os sítios trimetilados H3K76 e H3.VK94 também apresentam alta ocupação (FIGURA 5). A ocupação da trimetilação (me3) em H3K76 foi de 45,4% e em H3.V foi de 71.3% em nossos dados (FIGURA 5 e FIGURA A1, anexos). Recentemente, foi mostrado que a trimetilação de K76 da H3 é fundamental para o adequado progresso do ciclo celular, ela está

presente em todas as fases do ciclo, inclusive contrabalanceando os efeitos da mono e dimetilação deste sítio (NUNES et al., 2020). Quando alinhadas as sequências de H3 e H3.V, fica claro que os sítios H3K76 e H3.VK94 são equivalentes (FIGURA A2, anexos). Isso pode indicar que um nucleossomo contendo a versão variante da histona, mantenha esse sítio trimetilado para manter a função dessa PTM na progressão do ciclo celular. Essa hipótese pode ser avaliada analisando a função das metilações em H3.VK94 durante o ciclo celular em *T. cruzi*.

As marcas hPTMs identificadas em nosso trabalho ampliaram em quase duas vezes o repertório de hPTMs de *T. cruzi* e o mapa compilado e atualizado mostra que as histonas desse parasito são tão decoradas de modificações quanto o mapa compilado de hPTMs de humanos e camundongos (HUANG et al., 2014). Essa diversidade de hPTMs em um eucarioto antigo como *T. cruzi* faz deste organismo um excelente modelo de estudos para entender os mecanismos epigenéticos, especialmente envolvendo as hPTMs. São necessários mais estudos voltados a compreender a função de sítios hPTM específicos e da combinação de diferentes hPTMs em contextos biológicos importantes ao parasito, como em seu ciclo celular ou durante suas diferenciações ao longo do ciclo de vida. Outra questão importante a ser investigada é se diferentes hPTMs compensam uma determinada função no nucleossomo para manter uma função importante para a célula, isso pode acontecer com as acilações não-acetilação, por exemplo.

O mapa de hPTMs descrito neste capítulo pode ser usado como base para estudos funcionais sobre a regulação dinâmica da cromatina por mecanismos epigenéticos e a seleção de candidatos para o desenvolvimento de drogas epigenéticas contra tripanossomatídeos.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA MODULAÇÃO DAS hPTMs DE *T. cruzi* AO LONGO DO ESTRESSE NUTRICIONAL

Resumo do capítulo

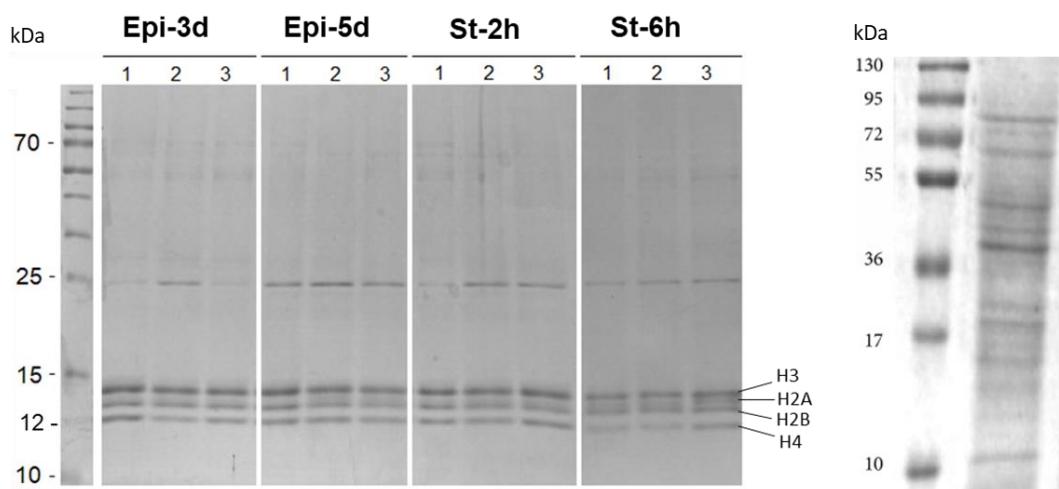
*As modificações constituem um dos principais mecanismos reguladores do estado da cromatina nos eucariotos. A presença de diferentes hPTMs foi descrita em *T. cruzi*, no entanto, a maneira como essas modificações estão moduladas durante condições importantes no ciclo de vida do parasito ainda é pouco conhecida. Uma destas condições é o estresse nutricional enfrentado pelo parasito no intestino do hospedeiro invertebrado, gatilho da sua diferenciação para a forma infectiva. Desse modo, nesse capítulo, foi analisada a modulação das hPTMs da forma epimastigota de *T. cruzi* nas fases exponencial (Epi-3d) e estacionária (Epi-5d) de crescimento e o parasito sob condição de estresse nutricional durante 2h (St-2h) e 6h (St-6h). Os resultados mostraram que as histonas H2A, H2B, H3 e H3.V apresentaram diferença de abundância entre as condições Epi-3d e St-6h e entre St-2h e St-6h. As hPTMs com maior nível global foram monometilação e acetilação e a dimetilação, trimetilação e crotonilação apresentaram diferença significativa entre condições envolvendo o estresse mais prolongado. Um total de 16 peptídeos das histonas H2A, H2B, H3, H4, H2A.Z e H3.V, com um total de 20 hPTMs, apresentaram modulação entre as diferentes condições. Destaque para a correção das acetilações da N-terminal da H2A.Z (K42-K58) que aumentaram significativamente de intensidade ao longo das condições Epi-3d até St-6h.*

2.1 Identificação dos sítios de PTMs de histonas canônicas, variantes e *linker* de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional

Uma das perguntas subsequentes ao mapeamento das hPTMs de *T. cruzi* em sua forma epimastigota em fase exponencial, foi como se comporta o perfil de hPTMs em um parasito que se encontra em fase estacionária e sob escassez nutricional, condições fundamentais na diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000).

Pra isso foram cultivadas e obtidas epimastigotas de *T. cruzi* em triplicatas de quatro diferentes condições biológicas: fase exponencial de crescimento (Epi-3d), fase estacionária de crescimento (Epi-5d) e sob estresse nutricional durante 2 horas (St-2h) e durante 6 horas (St-6h). O enriquecimento de histonas por extração ácida mostrou-se eficiente em todas as condições biológicas com a clara predominância de bandas correspondendo às histonas na região entre 12 e 15 kDa e resultando na obtenção de um extrato de menor complexidade, porém enriquecido de histonas, em relação ao extrato total de epimastigota (FIGURA 16).

FIGURA 16 – ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, FASE ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

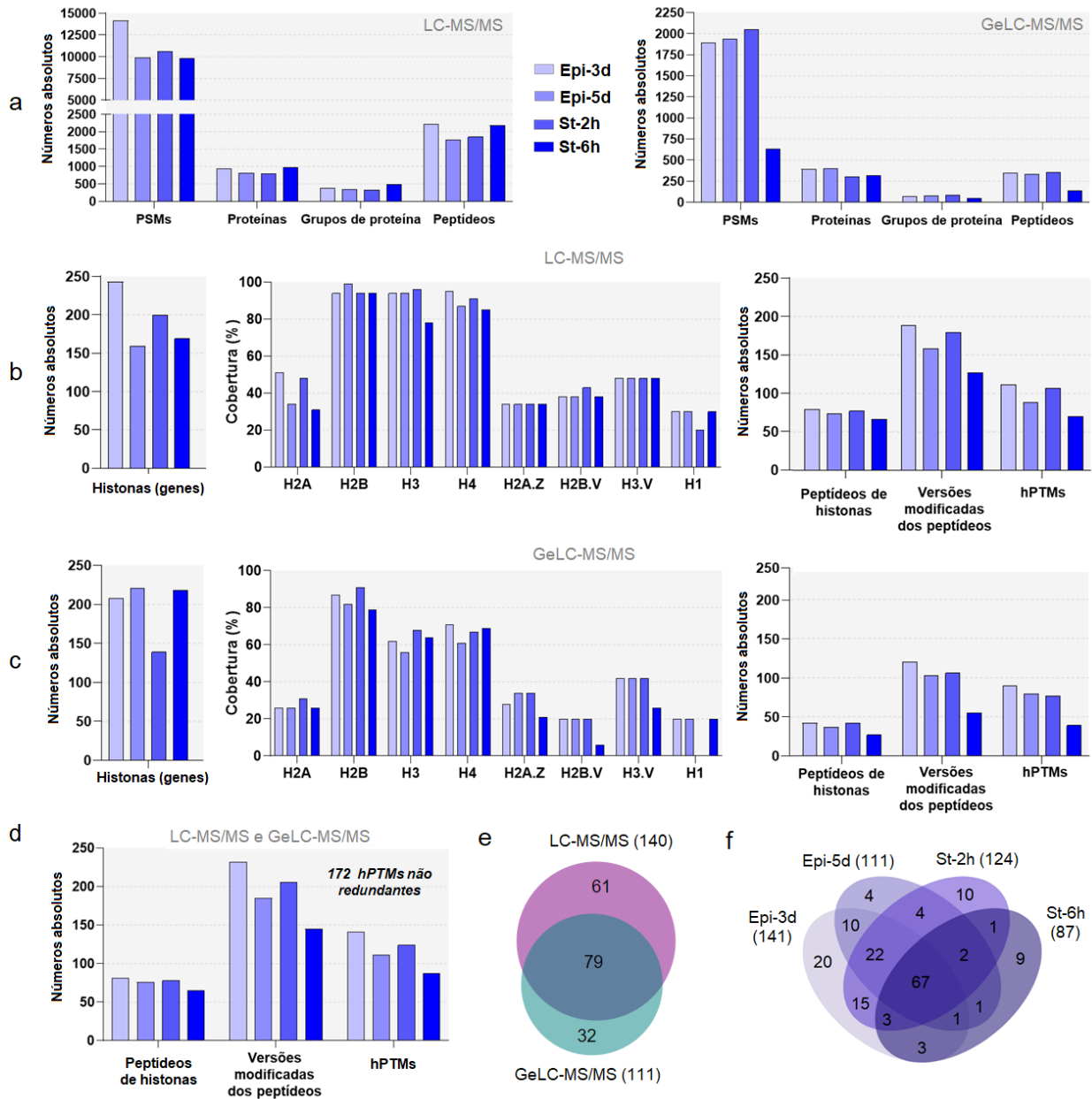


FONTE: o autor (2021). Análise SDS-PAGE das triplicatas de extrato enriquecido de histonas de *T. cruzi* das fases exponencial (Epi-3d), estacionária (Epi-5d) e sob estresse nutricional por 2h (St-2h) e por 6h (St-6h). As histonas estão indicadas entre aproximadamente 12 e 15 kDa. As amostras (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) foram resolvidas por SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250. O marcador de massa molecular (kDa) foi o PageRuler™. À direita, para fim de comparação com os extratos enriquecidos é mostrado a separação do extrato total de epimastigota (10 μg) por SDS-PAGE 12%. A imagem é ilustrativa e foi retirada de (CERVANTES-LANDÍN et al., 2014).

Para obter o perfil de hPTMs de *T. cruzi* nas diferentes condições estudadas, os extratos enriquecidos de histonas foram então analisados seguindo duas estratégias proteômicas paralelas: GeLC-MS/MS (em que os extratos enriquecidos foram resolvidos por SDS-PAGE e somente as bandas correspondentes às histonas foram digeridas em gel e analisadas) e LC-MS/MS (onde os extratos enriquecidos brutos foram digeridos diretamente em solução e analisados). Em cada estratégia, foram analisadas, triplicatas biológicas das quatro condições estudadas, e para cada réplica biológica, foram analisadas duas replicatas de injeção, totalizando 24 corridas para cada estratégia. Em ambas as estratégias os peptídeos eluíram entre 20 e 110 minutos. Os diferentes perfis de eluição das estratégias gel e solução refletem a diferente complexidade de cada amostra. No entanto, apresentam, dentro de cada estratégia, picos de eluição equivalentes nas quatro condições estudadas (FIGURA A3, anexos).

Os números globais de PSMs, peptídeos e proteínas identificados nos extratos enriquecidos de histonas analisado diretamente em solução (LC-MS/MS) é muito semelhante nas diferentes condições. No preparo em gel (GeLC-MS/MS) o número de PSMs e peptídeos identificados foi menor na condição sob estresse nutricional por 6h (FIGURA 17a). Entretanto, os produtos gênicos de histonas identificados foram similares nas diferentes condições analisadas em ambas as estratégias (FIGURA 17b e c). Dentre as sequências identificadas para cada histona, aquela com maior escore de identificação e número de hPTMs, foi selecionada como modelo para as análises subsequentes. As histonas modelo apresentaram cobertura de sequência muito similar em cada condição de *T. cruzi*, em ambas as estratégias (FIGURA 17b e c). As histonas canônicas, variantes e a *linker* H1 foram identificadas por ambas as estratégias. As histonas canônicas tiveram maior cobertura de sequência e PTMs identificadas em relação às histonas variantes e H1 em ambas as estratégias. O número total de peptídeos não redundantes de histonas e de suas diferentes versões modificadas, foi de respectivamente 87 e 334 em LC-MS/MS e de 48 e 213 em GeLC-MS/MS (TABELA S2). Foram identificadas 172 hPTMs não redundantes em ambas as estratégias e entre as quatro condições (FIGURA 17d). As diferentes estratégias foram complementares na identificação da hPTMs (FIGURA 17e) e um total de 67 hPTMs foram identificadas comumente nas quatro condições avaliadas (FIGURA 17f).

FIGURA 17 – NÚMEROS GLOBAIS DE IDENTIFICAÇÃO EM *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

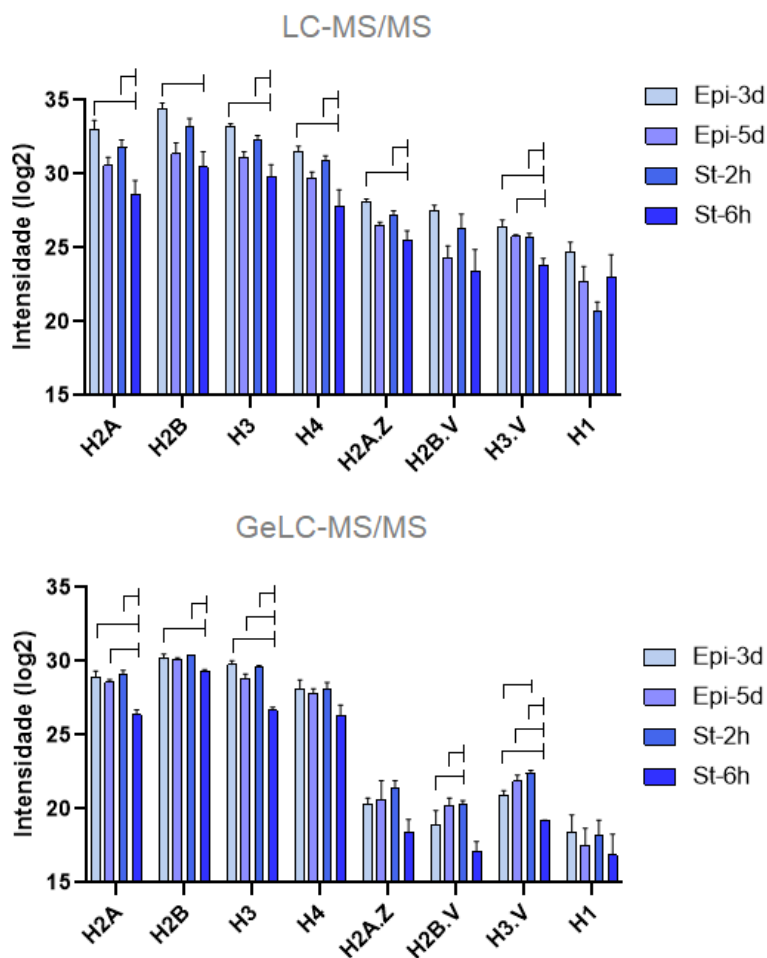


Fonte: o autor (2021). Números globais de identificação nas diferentes condições avaliadas nas estratégias LC-MS/MS e GeLC-MS/MS (a); número de genes de histonas identificadas, cobertura de sequência das histonas modelo e seus números de versões de peptídeos modificados e hPTMs, na estratégia LC-MS/MS (b) e GeLC-MS/MS (c). Números compilados de peptídeos diferentemente modificados e hPTMs em ambas as estratégias, em cada condição avaliada (d). Os Venns mostram o número (não redundante) de hPTMs identificadas em LC-MS/MS e GeLC-MS/MS (e) e em cada condição avaliada (f).

2.2 Modulação de PTMs de histonas canônicas, variantes e linker de *T. cruzi* em fase exponencial, fase estacionária e sob estresse nutricional

Primeiramente, analisamos a intensidade das histonas em cada condição (FIGURA 18), de modo geral as histonas canônicas são mais intensas que as variantes em ambas as estratégias. As histonas H2A, H2B, H3 e H3.V apresentaram diferença de abundância significativa entre as condições Epi-3d e St-6h e entre St-2h e St-6h em ambas as estratégias (com exceção da H2B em LC-MS/MS). As demais histonas não apresentaram diferença significativa de abundância entre os tempos.

FIGURA 18 – NÍVEL DAS HISTONAS DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL



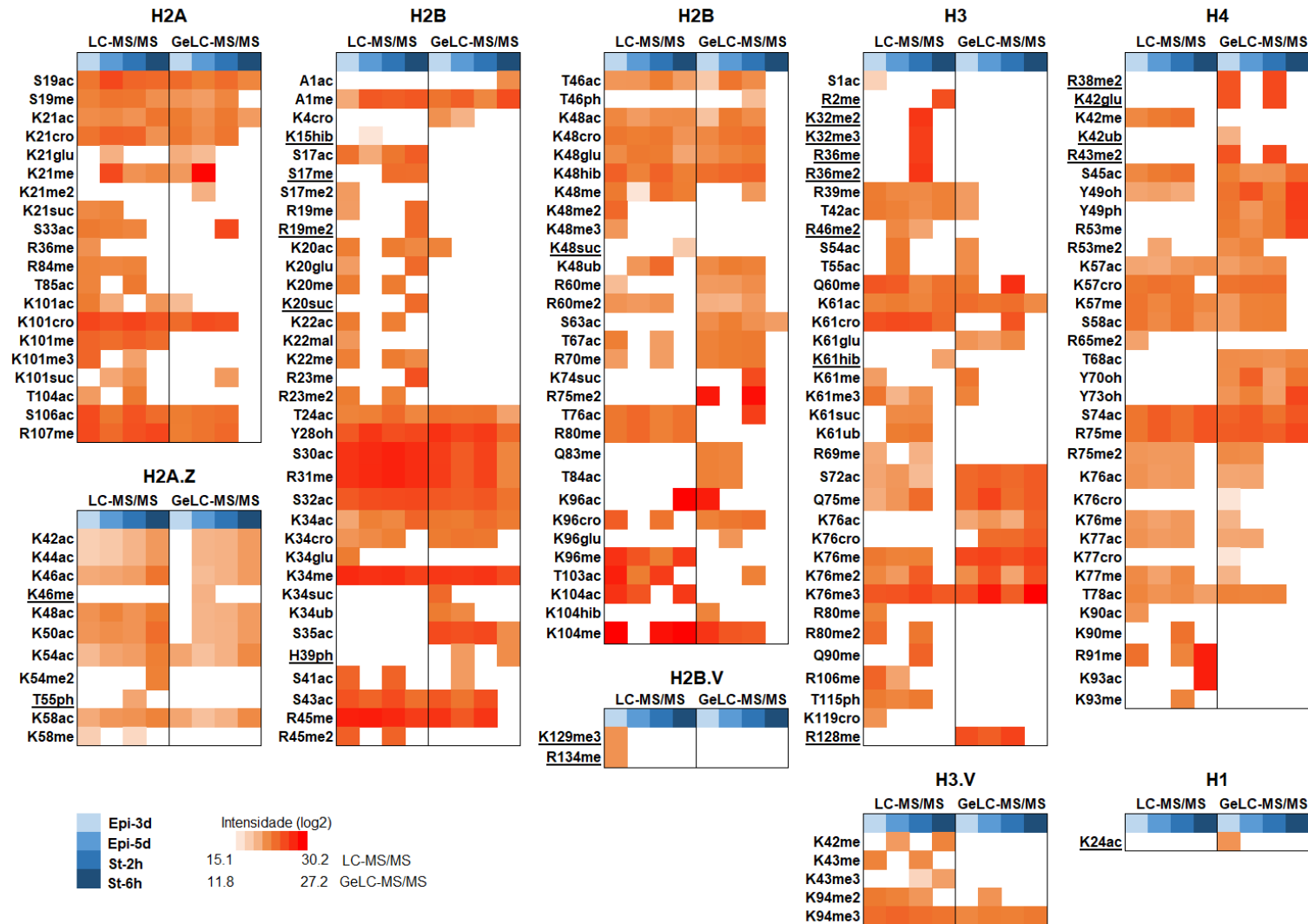
Fonte: o autor (2021). Intensidade das histonas identificadas em LC-MS/MS e GeLC-MS/MS. As barras de erro de desvio padrão são mostrados para as triplicatas de cada condição. As linhas indicam a comparação entre os tempos por ANOVA, seguido de Tukey FDR 5%.

Um total de 172 marcas hPTMs (não redundantes entre as condições) foram identificadas distribuídas nas histonas canônicas, variantes e *linker* de *T. cruzi* (TABELA S2). A modulação destas hPTMs entre as condições foi analisada após a normalização da sua intensidade pela intensidade da histona para que as variações observadas não fossem devido aos níveis da histona.

Primeiramente, este conjunto de hPTMs foi avaliado quanto a seu nível de intensidade (FIGURA 19) e ocupação do sítio (FIGURA 20) em cada condição e estratégia proteômica. Algumas hPTMs foram identificadas em todas as quatro condições analisadas e em ambas as estratégias (FIGURA 19), dentre estas marcas estão H2A.ZK54ac/K58ac, H2BA1me, H3K76me3 e H3.VK94me3. Também chama a atenção a região T24-K34 da H2B, com marcas hPTMs bem intensas. Apesar de a maior parte dos sítios hPTMs apresentarem baixa ocupação, alguns destes mesmos sítios detectados em todas as condições, apresentam também alta ocupação para algumas modificações nas quatro condições e ambas as estratégias (FIGURA 20), é o caso da H2A.ZK58ac, H2BA1me, H2BK34me, H3K76me3 e H3.VK94me3. Também interessante são as modificações do sítio H2BK48 (ac, cro, glu e hib) e a região hiper-acetilada da N-terminal da H2A.Z (não detectada apenas na condição Epi-3d em GeLC-MS/MS).

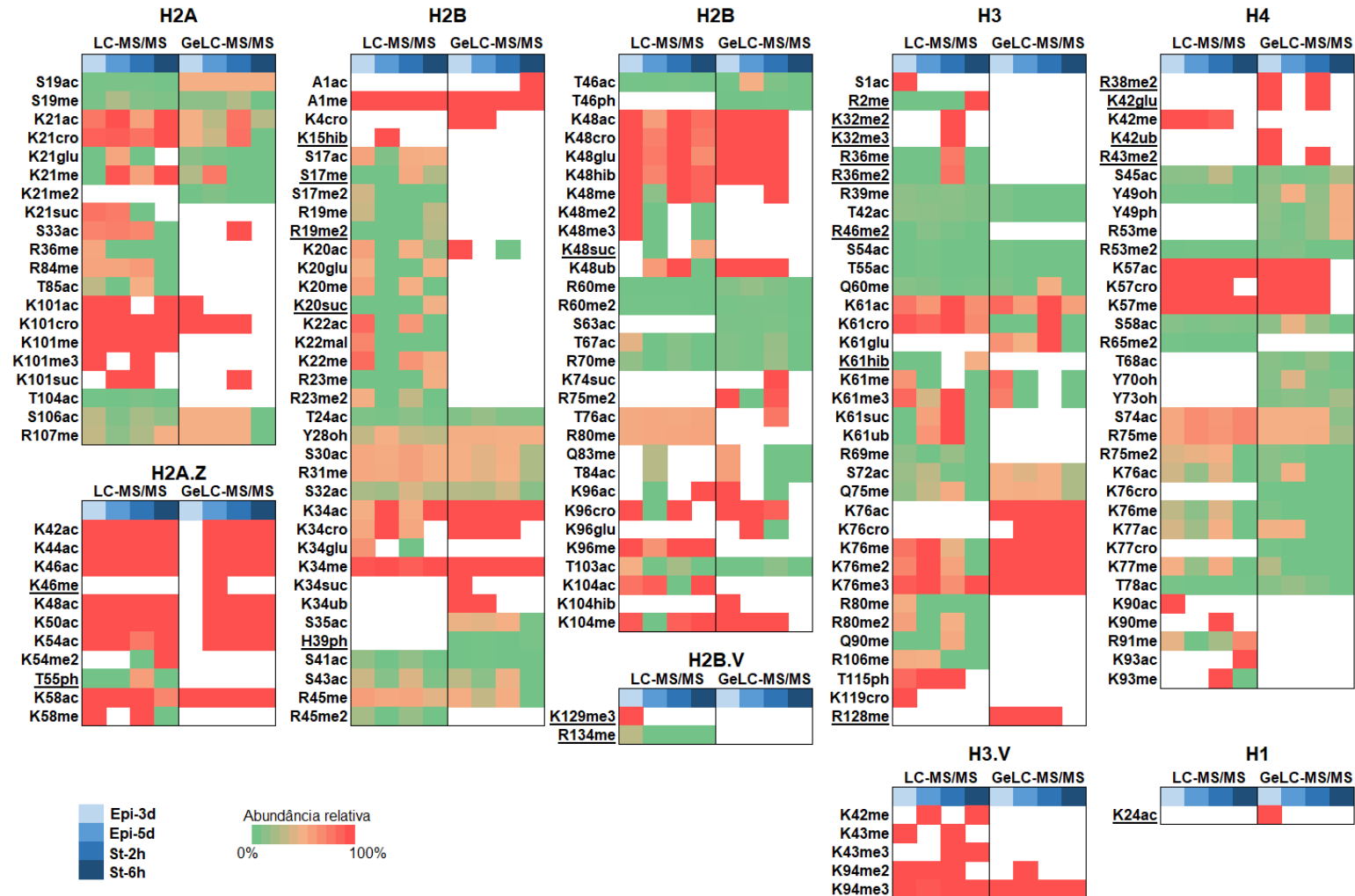
Foram identificadas 23 novas marcas hPTMs em relação às marcas descritas e compiladas de epimastigota de *T. cruzi* em fase exponencial no primeiro capítulo desta tese (hPTMs sublinhadas nas FIGURAS 19 e 20), 15 delas foram identificadas em condições diferentes da fase exponencial.

FIGURA 19 – INTENSIDADE DAS hPTMs DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL



FONTE: o autor (2021). Mapa das hPTMs identificadas nas diferentes condições de *T. cruzi* com seus níveis de intensidade em cada estratégia. As marcas hPTMs sublinhadas (n=23) são novas em relação às modificações de histonas descritas em epimastigota exponencial no trabalho publicado no primeiro capítulo (de Almeida et al. 2021). A intensidade de cada hPTM está normalizada em relação a intensidade da sua respectiva histona.

FIGURA 20 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS hPTMs DE *T. cruzi* EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL

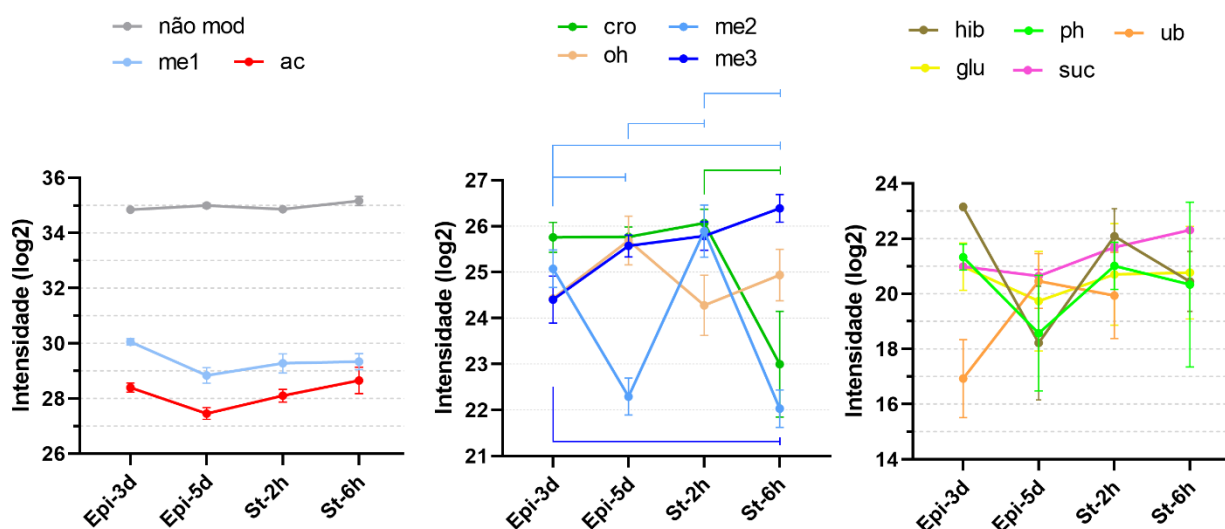


FONTE: o autor (2021). Mapa das hPTMs identificadas nas diferentes condições de *T. cruzi* com sua abundância relativa dentro do sítio (mod/ mod+unmod) em cada estratégia. As hPTMs com abundância de 100% não apresentaram detecção da intensidade da versão não modificada. As hPTMs com abundância de 0% representam peptídeos cujos sítios das versões modificadas não foram detectados. As marcas hPTMs sublinhadas (n=23) são novas em relação às modificações de histonas descritas em epimastigota exponencial no trabalho publicado no primeiro capítulo (de Almeida et al. 2021).

Uma vez identificadas as hPTMs de *T. cruzi* em cada condição biológica, foi analisada a modulação destas modificações, a fim de se identificar o efeito das mudanças de fase e do estresse nutricional na regulação das hPTMs. Os valores de detecção (intensidade) dos peptídeos modificados foram analisados e comparados em cada condição biológica.

As versões não modificadas dos peptídeos de histonas foram as mais abundantes e os peptídeos com cada tipo de hPTM foram detectados com três níveis distintos de intensidade (FIGURA 21). As hPTMs mais abundantes foram a monometilação e acetilação. Elas reduziram seus níveis entre as condições exponencial (Epi-3d) e estacionário (Epi-5d). No entanto, enquanto a monometilação estabilizou seus níveis entre o estresse nutricional 2h (St-2h) e estresse nutricional 6h (St-6h), a acetilação aumentou seus níveis entre estas condições. A análise estatística não demonstrou uma variação significativa das versões não modificadas, monometiladas e acetiladas entre as condições. Em um grupo intermediário de abundância foram detectadas a crotonilação, hidroxilação, dimetilação e trimetilação, e que apresentaram diferentes perfis de modulação entre as condições. Neste grupo, destaca-se a trimetilação que aumentou de nível ao longo das condições avaliadas e apresentou diferença estatística entre as condições Epi-3d e St-6h. Já o nível de crotonilação reduziu significativamente entre a condição de St-2h e St-6h. Os níveis de dimetilação oscilaram entre as condições. E no terceiro grupo de abundância estavam as demais acilações não-acetilação (glutarilação, succinilação e 2-hidroxiisobutirilação), ubiquitinação e fosforilação. Neste grupo não foi encontrada diferença estatística das hPTMs entre as condições.

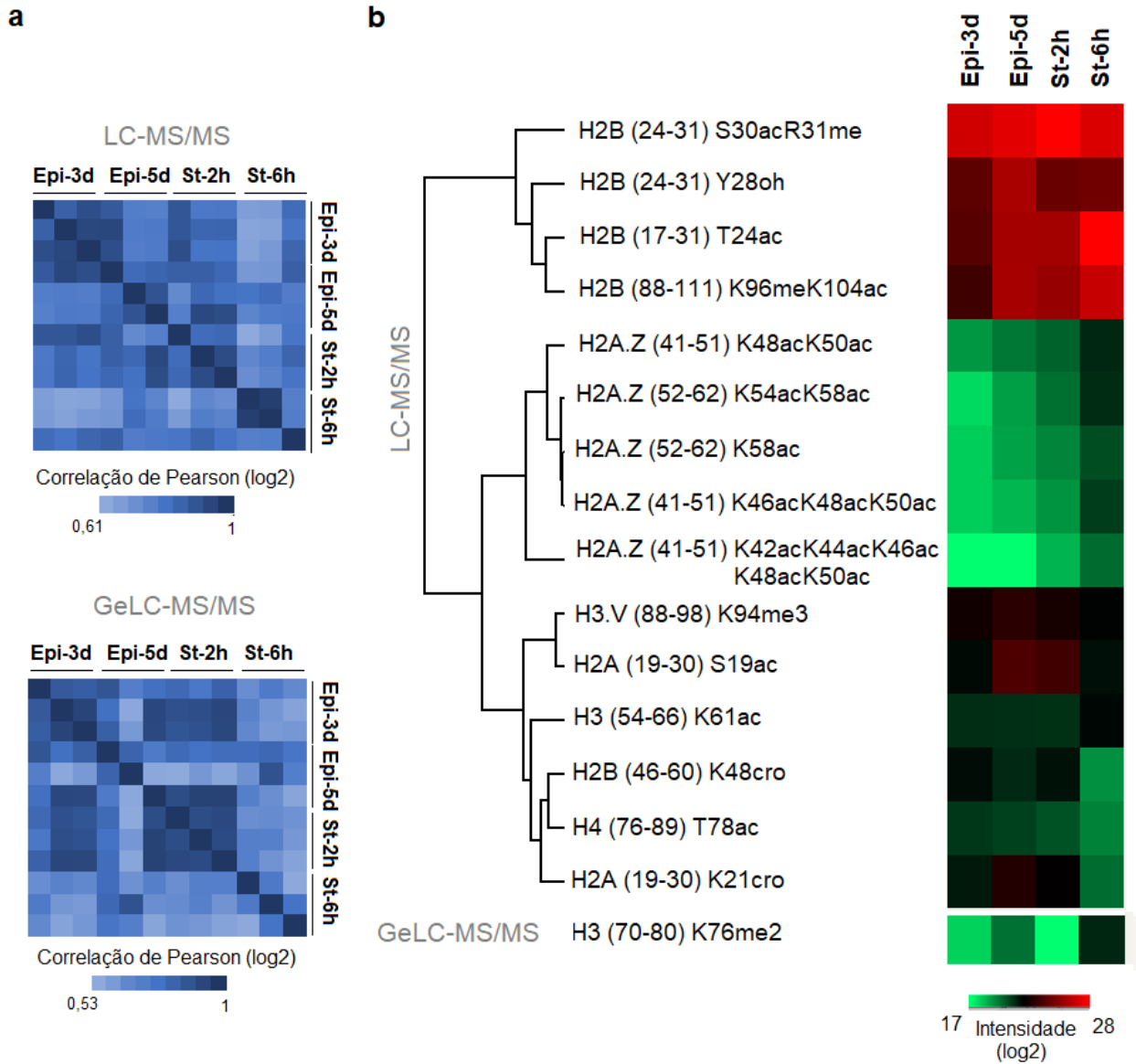
FIGURA 21 – NÍVEL GLOBAL DE CADA TIPO DE hPTM DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL



Fonte: o autor (2021). Perfis dos níveis globais de intensidade de cada tipo de hPTM identificada em *T. cruzi* ao longo das diferentes condições. O erro padrão da média das três réplicas biológicas é mostrado. As linhas acima dos pontos nas PTMs dimetilação (me2), trimetilação (me3) e crotonilação (cro) indicam diferença estatística entre condições (ANOVA, com correção Tukey 5%).

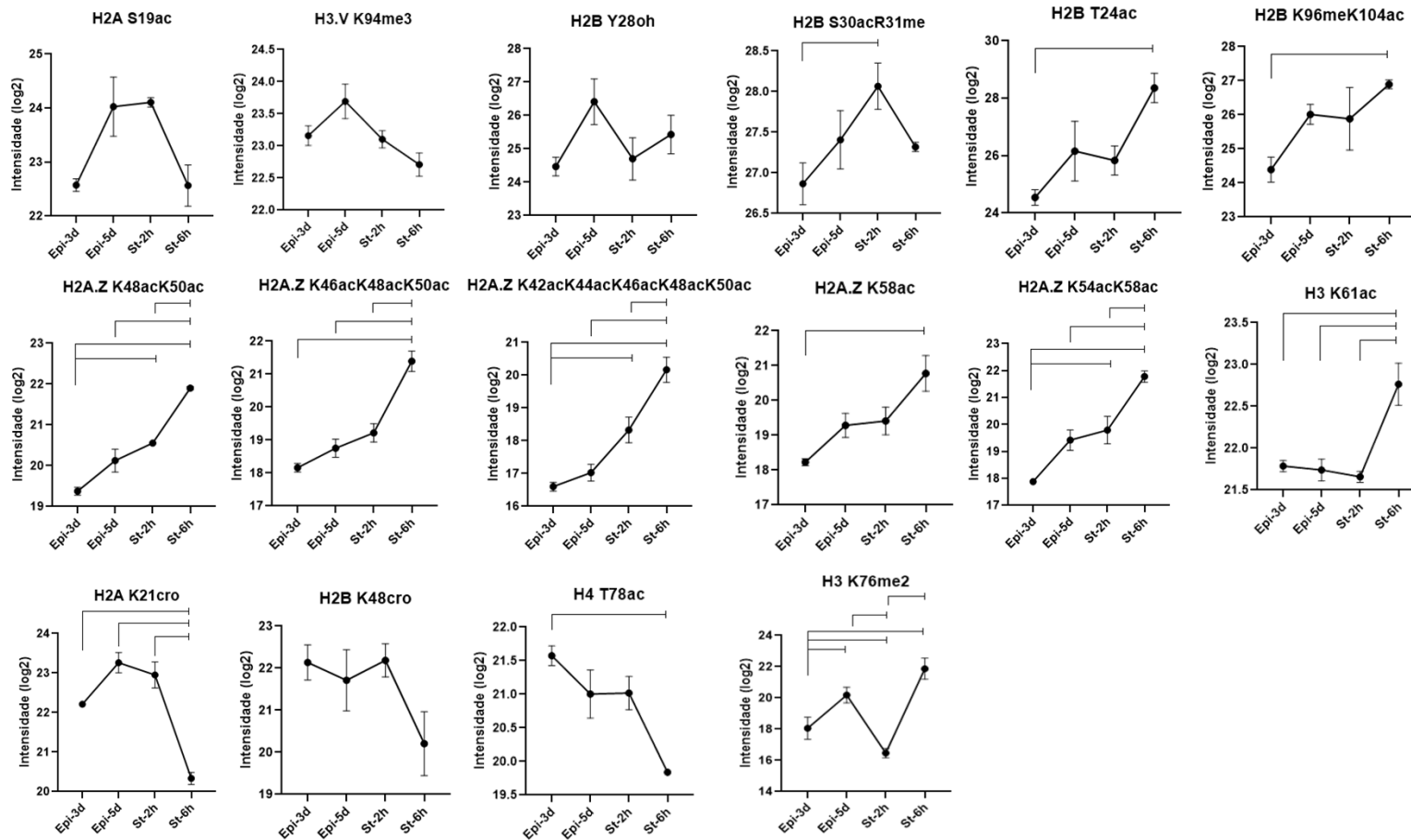
Uma vez que os peptídeos detectados nas réplicas biológicas de cada condição em cada estratégia apresentaram de moderada a alta correlação (FIGURA 22a), a análise de padrões gerais de modulação dos peptídeos identificados em LC-MS/MS e GeLC-MSMS revelou cinco grupos em cada conjunto de peptídeos (FIGURA A7 e A8, anexos). Então, para analisar a diferença estatística de peptídeos entre as condições, aplicamos o teste de variância ANOVA aos peptídeos detectados em ≥ 2 réplicas biológicas em cada condição e um total de 16 peptídeos das histonas H2A, H2B, H3, H4, H2A.Z e H3.V, que incluem um total de 20 hPTMs, apresentaram modulação entre as condições. A clusterização hierárquica destes peptídeos revelou 4 grupos de peptídeos modificados coregulados (FIGURA 22b). Em seguida, empregando o teste Tukey (FDR 5%) foi verificado que 12 dos peptídeos apresentaram diferença estatística entre diferentes condições (FIGURA 23). Dentre os peptídeos coregulados, destacam-se os peptídeos acetilados da H2A.Z (41-62) que aumentaram significativamente de intensidade ao longo das condições Epi-3d até St-6h.

FIGURA 22 – QUANTIFICAÇÃO DAS hPTMs DE *T. cruzi* EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL



Fonte: o autor (2021). Matriz de correlação, baseada no coeficiente de Pearson, dos peptídeos detectados nas réplicas biológicas de LC-MS/MS e GeLC-MS/MS (a). Clusterização hierárquica dos peptídeos de histonas regulados de LC-MS/MS e GeLC-MS/MS (b). Na clusterização foram comparados pelo teste ANOVA os valores de intensidade LFQ (log2) dos peptídeos detectados em pelo menos duas réplicas biológicas de cada condição. Os valores de p foram ajustados usando um método baseado em permutação para controlar o FDR (250 randomizações); FDR 5% (q-value).

FIGURA 23 - hPTMs REGULADAS AO LONGO DAS CONDIÇÕES EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). As barras em cada ponto indicam o erro padrão da média das triplicatas de cada condição. E as linhas acima dos pontos mostram entre quais grupos há diferença de acordo com o teste Tukey (FDR 5%).

DISCUSSÃO – Capítulo 2

O estresse nutricional, em *T. cruzi*, é um dos gatilhos da metaciclologênese (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000). Uma vez estimulado, o parasito regula sua expressão gênica e diferencia-se para a forma infectiva tripomastigota metacíclico. Quais são as hPTMs presentes e como elas são moduladas ao longo desse processo, ainda é um aspecto pouco compreendido. Com o objetivo de avaliar a modulação das PTMs de histona ao longo do estresse nutricional, estabelecemos as células de *T. cruzi* em quatro condições biológicas: epimastigota em fase exponencial (Epi-3d), em fase estacionária (Epi-5d) e sob estresse nutricional por 2 horas (St-2h) e 6 horas (St-6h).

Os números globais de identificação refletem as diferenças de complexidade das amostras analisadas em cada estratégia proteômica utilizada. O extrato enriquecido de histonas analisado diretamente (LC-MS/MS) é mais complexo em termos de número de proteínas identificadas, quando comparado com a análise das faixas de massa correspondente às histonas (GeLC-MS/MS). No entanto, ambas as estratégias permitiram identificar todas as histonas e mostraram-se complementares entre si na identificação de hPTMs (FIGURA 17e). Em relação a detecção das histonas, as canônicas são mais intensas que as variantes em todas as condições. As histonas H2A, H2B, H3 e H3.V apresentaram diferença de abundância significativa entre as condições Epi-3d e St-6h e entre St-2h e St-6h (com exceção da H2B em LC-MS/MS) em ambas as estratégias.

Compilando os resultados das duas estratégias, um total de 172 hPTMs não redundantes foram identificadas, distribuídas nas quatro condições de *T. cruzi*, incluindo 23 novas em relação às modificações de histonas descritas em Epi-3d no primeiro capítulo da tese (DE ALMEIDA; FERNANDES; DE GODOY, 2021). O número de hPTMs na condição estresse nutricional 6h foi menor que nas demais condições (FIGURA 17d), mas pode ser uma condição experimental e não biológica, vide o número de PSMs (FIGURA 17a).

O mapeamento das 172 hPTMs (FIGURAS 19 e 20) mostrou uma ampla variação na detecção, intensidade e abundância relativa nas diferentes condições de *T. cruzi*. Essa análise deixou claro, ainda, a complementariedade das estratégias proteômicas utilizadas, uma vez que várias hPTMs foram identificadas em apenas uma das duas estratégias. Interessante destacar, ainda, a existência de um conjunto de hPTMs identificadas em todas as condições analisadas e em ambas as estratégias. Esse fato pode estar relacionado com uma maior intensidade/abundância, o que sabidamente aumentaria sua chance de detecção. Entretanto, exemplos com menor

intensidade/abundância também foram encontrados nesse conjunto, sugerindo que estas hPTMs podem ter um possível papel essencial no parasito, assim como outra hipótese, a qual precisa ser investigada em estudos funcionais direcionados.

Dentre as hPTMs identificadas em todas as condições analisadas e em ambas as estratégias e apresentando alta ocupação, estão H2A.ZK54ac/K58ac, já detectadas em diferentes trabalhos em *T. cruzi* (DE ALMEIDA; FERNANDES; DE GODOY, 2021; DE JESUS et al., 2016; DE LIMA et al., 2020; PICCHI et al., 2017), H2BA1me, encontrada em *T. brucei* (JANZEN et al., 2006a), H3K76me3 presente em todas as fases do ciclo celular de *T. cruzi*, como um *checkpoint* da sua progressão (NUNES et al., 2020) e também H3.VK94me3, sítio equivalente em sequência ao H3K76 (FIGURA A2, anexos) e que pode ser seu equivalente de função, como anteriormente discutido no capítulo 1. Destacam-se também as hPTMs no sítio H2BK48 (ac, cro, glu e hib) e a região hiper-acetilada da N-terminal da H2A.Z, histona cuja presença aparece em regiões de início da transcrição e associada a fatores com bromodomínios em tripanossomatídeos (SIEGEL et al., 2009; YANG et al., 2017).

Em nosso trabalho, as versões peptídicas não modificadas foram as mais abundantes, e dentre os 13 tipos distintos de PTMs, as versões monometiladas e acetiladas foram as mais abundantes (FIGURA 21), onde a monometilação foi a PTM com níveis mais abundantes, acima de acetilação e das demais metilações (me2 e me3). Diferentemente do encontrado por de Lima e colaboradores (2020), onde a monometilação apresentou menores níveis globais em relação às demais metilações e a acetilação (DE LIMA et al., 2020). Estas diferenças nos níveis globais de cada tipo de metilação entre os estudos pode estar relacionada às diferentes condições avaliadas. Em nosso trabalho, a monometilação e a acetilação reduziram seus níveis entre Epi-3d e Epi-5d e então aumentam a partir do estresse nutricional 2h, atingindo níveis globais muito próximos na condição de estresse nutricional. Interessantemente, os níveis de dimetilação e trimetilação apareceram em níveis semelhantes a crotonilação e hidroxilação, com destaque para a crotonilação que apareceu em níveis mais elevados do que dimetilação e trimetilação em três das condições avaliadas, exceto no tempo mais prolongado de estresse nutricional.

No grupo de PTMs menos abundantes, estão as acilações-não acetilação e a fosforilação. As primeiras são modificações pouco abundantes em outros eucariotos, devido, como postulado recentemente, aos reduzidos níveis dos substratos Acil-CoA em relação ao Acetil-CoA (SABARI et al., 2017). Já a fosforilação é uma PTM transiente e instável (ZHAO; JENSEN, 2009), a qual

normalmente necessita de protocolos especiais de enriquecimento para melhor detecção não utilizados no presente trabalho, o que poderia justificar os baixos níveis aqui encontrados. De fato, os peptídeos modificados são menos abundantes em níveis estequiométricos quando comparados com suas versões não-modificadas e isso fica evidente também em nossos resultados. A abundância de cada tipo de PTM reflete a faixa dinâmica de detecção dos peptídeos que a carregam, uma vez que não foi realizado o enriquecimento PTM-específico.

Uma vez identificadas as hPTMs presentes em cada condição de epimastigota, analisamos como elas estão reguladas entre estas condições (FIGURA 22). Após a normalização da intensidade das hPTMs pela intensidade da histona a análise de variância entre grupos considerando a detecção do peptídeo em duas ou mais réplicas por condição, um total de 16 peptídeos contendo 20 hPTMs estavam regulados e quando analisados quanto a sua coregulação resultaram em quatro grupos de coregulação. Dentre eles, destacam-se as hPTMs S30acR31me que aumenta seu nível até o estresse nutricional de 2h e reduz em estresse nutricional de 6h. As hPTMs H2AK21cro, H2BK48cro e H4T78ac apresentaram um nível intermediário de intensidade até 2h e reduzem drasticamente em estresse nutricional por 6h. Interessantemente, o grupo coregulado que mais chama a atenção é o de peptídeos da N-terminal da H2A.Z (região $_{41}\text{GKGKGKGKGRGGKTGGKAGKR}_{62}$). Estes peptídeos apresentam diferentes combinações de sítios acetilados, mas todos aumentam de intensidade ao longo das diferentes condições, com diferença significativa principalmente em relação ao estresse nutricional mais prolongado (FIGURA 23). A H2A.Z está intimamente envolvida na regulação gênica em eucariotos e especialmente sua versão acetilada (GIAIMO et al., 2019). Em *T. brucei*, foi demonstrado que a H2A.Z dimeriza com H2B.V (YANG et al., 2017) e na sua N-terminal hiper-acetilada se liga o fator bromodomínio 2 (TbBDF2) e essa combinação de elementos foi observada em regiões de início da transcrição (SIEGEL et al., 2009), onde provavelmente torna o nucleossomo menos estável permitindo o acesso da maquinaria de transcrição (FIGURA 10). Em *T. cruzi* o papel desta região acetilada da H2A.Z na regulação gênica ainda não é conhecido.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS LIGANTES DAS HISTONAS E SUAS PTMs EM *T.cruzi*

Resumo do capítulo

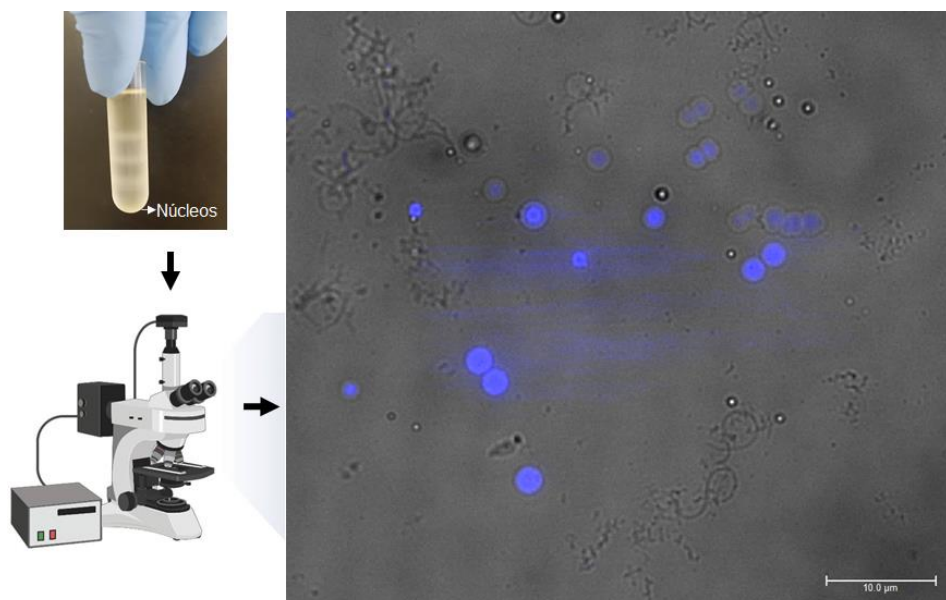
A interação entre proteínas é a base do funcionamento da célula. Neste capítulo, buscamos identificar as proteínas do núcleo de T. cruzi e suas interações envolvendo as histonas e suas PTMs. Para isso enriquecemos frações de núcleos de T. cruzi e fizemos o crosslinking in situ de suas proteínas. A abordagem permitiu a análise qualitativa do proteoma do núcleo do parasito e também das interações proteína-proteína. Identificamos um total de 1303 proteínas na fração nuclear, sendo 576 (44,2%) com localização nuclear de acordo com anotações e enriquecimento de GO. A análise in silico do interatoma nuclear mostrou que 254 proteínas possuem anotação de interação no STRING. Na subrede de interatores de histonas foram identificadas 42 proteínas interagindo diretamente com as histonas, dentre elas as subunidades da RNA polimerase II, fatores de transcrição e proteínas com domínios ligante de cromatina. A análise de proteínas interagindo via crosslinking identificou 37 proteínas, dentre elas as histonas H1, H2B e H3. Destas 37 proteínas, 16 são proteínas não caracterizadas (“hipotéticas”). A H1 foi identificada fazendo parte de uma espécie de complexo formado por outras 10 e interage diretamente com três delas. A H2B foi identificada metilada e interagindo com uma proteína não caracterizada que apresenta um domínio ENTH/VHS que por sua vez interage com outras cinco proteínas com funções relacionadas a membrana e vesículas. A H3 foi identificada interagindo com uma proteína com cinco domínios RRM, uma potencial proteína ligadora de RNA (RBP). Outras interações foram identificadas entre proteínas ribossomais e fatores de transcrição, além de proteínas hipotéticas interagindo com chaperona de base J e com domínio zinc finger. Algumas destas proteínas estão modificadas por acetilação, monometilação, dimetilação, trimetilação e crotonilação em sítios próximos ao sítio de interação identificado por XL-MS.

3.1 Identificação *in situ* de interações proteína-proteína nucleares de *T. cruzi*

Para identificar interações endógenas de parceiros ligantes de histonas e hPTMs em *T. cruzi*, utilizamos o *crosslinking* químico associado à espectrometria de massas (XL-MS) diretamente a partir dos núcleos de *T. cruzi*. Para isso foi empregado o reagente *crosslinker* DSSO que por ser permeável a membranas permite capturar interações proteína-proteína nativas.

Inicialmente, foi realizado o enriquecimento dos núcleos de epimastigotas de *T. cruzi*. As células foram lisadas e a fração enriquecida de núcleos foi obtida através de um gradiente de sacarose, conforme previamente descrito (SANTOS JÚNIOR et al., 2015). O processo de enriquecimento de núcleos mostrou-se bastante eficiente, conforme ilustrado na FIGURA 24.

FIGURA 24 – OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE NÚCLEOS DE *T. cruzi*

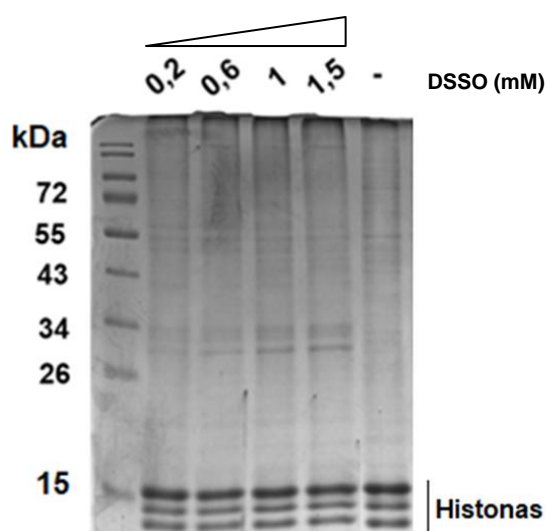


FONTE: o autor (2021). À esquerda são mostradas as interfaces após a ultracentrifugação em gradiente de sacarose e os núcleos presentes no *pellet*. À direita é mostrada a microscopia de fluorescência dessa fração enriquecida de núcleos de *T. cruzi* corada com DAPI. A barra corresponde a 10 µm.

Após obtida a fração enriquecida em núcleos, a amostra foi submetida à reação de *crosslinking* com base no protocolo previamente descrito para núcleos de células humanas (FASCI et al., 2018). A concentração de DSSO foi determinada por titulação para avaliar a melhor concentração do reagente (FIGURA 25). Como pode ser observado, as histonas estão bem aparentes (como esperado para um extrato nuclear) reforçando o enriquecimento de núcleos e

conforme aumenta a concentração de DSSO bandas intermediárias ficam mais aparentes assim como nas regiões de alta massa, indicando o *crosslinking* das proteínas. Paralelamente à reação de *crosslinking* do subproteoma do núcleo de *T. cruzi*, foi realizado também a reação de *crosslinking* com uma amostra de menor complexidade para comparação de titulação com DSSO e posterior análise, para isso foi utilizada a BSA, a qual também foi submetida a titulação com diferentes concentrações de DSSO (FIGURA A7 - Anexos).

FIGURA 25 – OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE *CROSSLINKING* DO PROTEOMA DO NÚCLEO DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). Análise SDS-PAGE da fração nuclear derivada dos núcleos intactos de *T. cruzi* com concentração crescente de DSSO. É nítida a presença das histonas o que reforça o enriquecimento de núcleos e o aumento da presença de bandas de tamanho intermediário aumenta com a maior concentração de DSSO, indicativo do *crosslinking* das proteínas, enquanto que na *lane* sem DSSO (-) essas bandas não estão presentes.

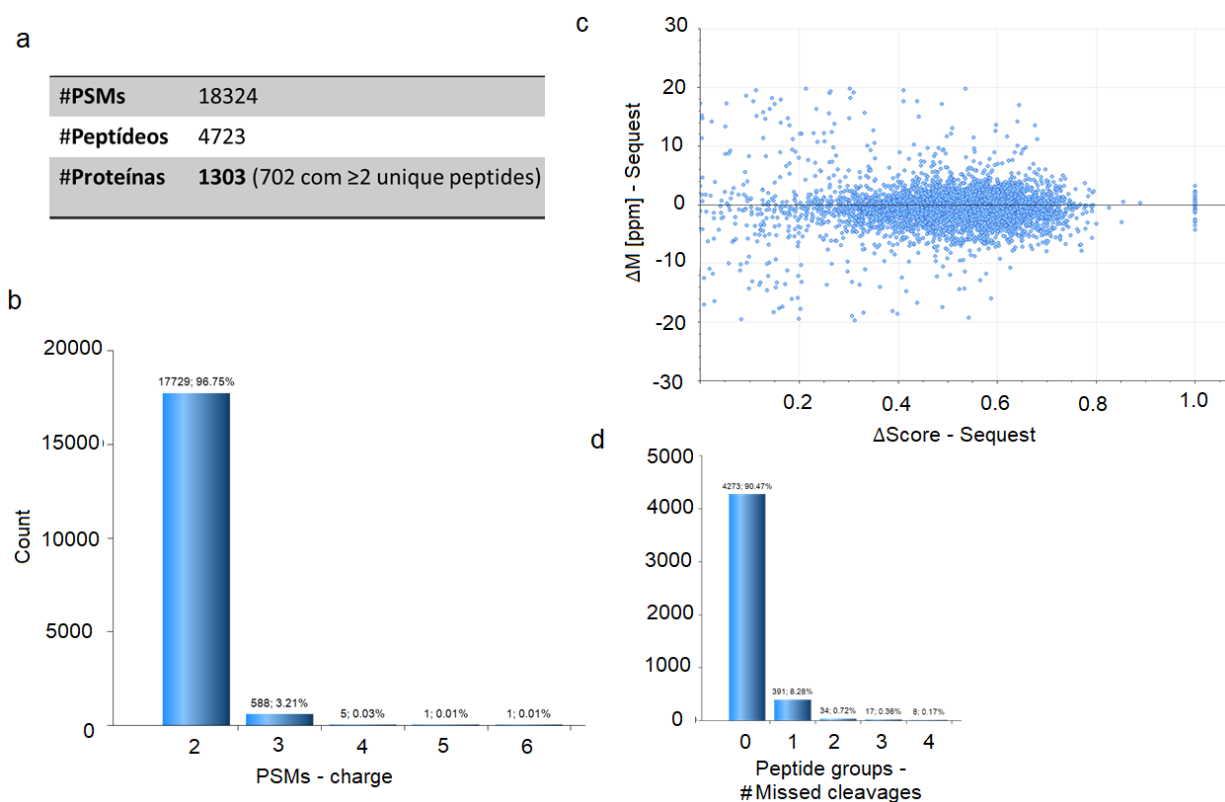
3.2 Análise do subproteoma nuclear de *T. cruzi*

Após a reação de *crosslinking* com diferentes concentrações de DSSO as amostras foram preparadas para a análise por nanoLC-MS/MS a fim de verificar qual concentração foi a mais eficiente no *crosslinking* das proteínas. Desse modo, as amostras de proteínas derivadas dos núcleos que receberam as quatro diferentes concentrações de DSSO (0,2 mM, 0,6 mM, 1 mM e 1,5 mM), foram preparadas em solução, sendo reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina e então cada uma dividida em duas frações por *StageTip*-SCX (200+500mM AcAm combinados e 1000

mM AcAm), totalizando 8 amostras que foram analisadas em duplicatas de injeção por nanoLC-MS/MS, totalizando 16 .raws.

Os dados gerados, além da análise do interatoma, permitiram também a análise qualitativa do subproteoma do núcleo de *T. cruzi*. Foram identificados 4723 peptídeos pertencentes a 1303 proteínas sendo que 702 identificadas com ≥ 2 peptídeos únicos (FIGURA 26 e TABELA S3). A maioria (96,75%) dos peptídeos foi identificada com estados de carga 2 (FIGURA 26b) e 97% com um erro de massa menor que 10 ppm (FIGURA 26c) e 98,75% identificados com 0-1 *missed cleavages* (FIGURA 26d).

FIGURA 26 – NÚMEROS GLOBAIS E QUALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DO SUBPROTEOMA NUCLEAR DE *T. cruzi*

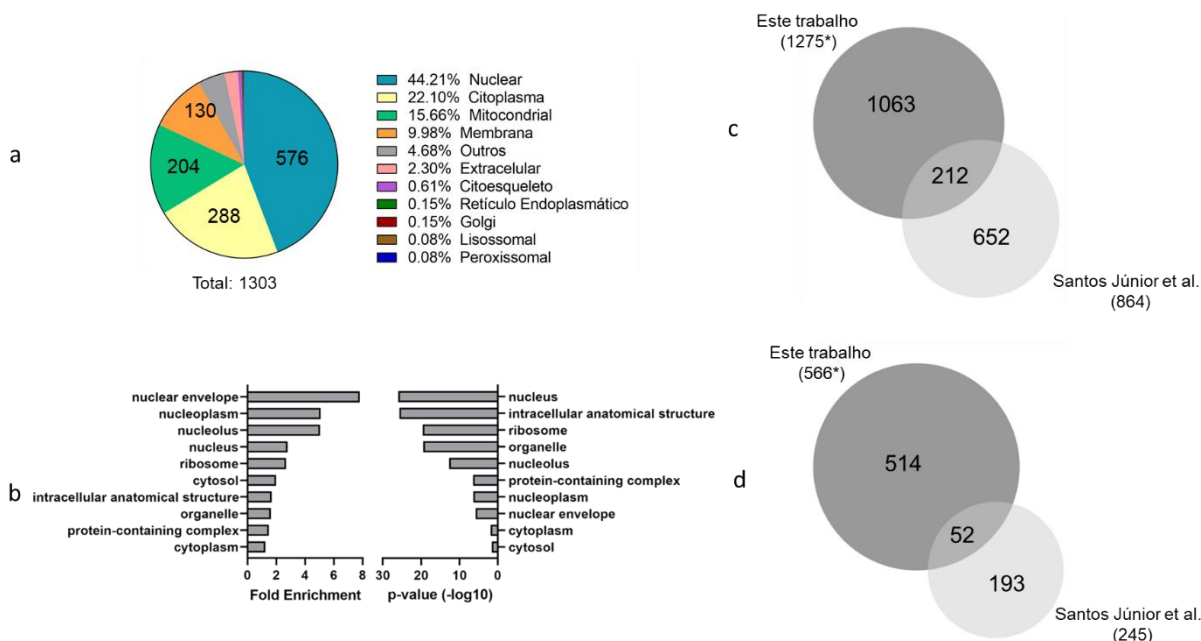


Fonte: o autor (2021). Números globais de PSMs, peptídeos e proteínas identificados (a); Distribuição dos estados de carga dos PSMs (b); Distribuição do erro de massa e escore Sequest dos peptídeos (c); Distribuição das *missed cleavages* dos peptídeos (d).

Das 1303 proteínas, 526 (40,3%) são proteínas anotadas como não-caracterizadas nos bancos de dados TritypDB e Uniprot. A análise das 1303 proteínas no preditor CELLO2GO (que combina análise de ontologia gênica e BLAST das sequências) mostrou que 44,21% das proteínas

possuem localização subcelular nuclear (FIGURA 27a e TABELA S4), além disso os termos de GO (componente celular) mais enriquecidos no conjunto de proteínas são relacionados ao núcleo, envelope nuclear, nucleoplasma e nucléolo (FIGURA 27b). Em relação ao trabalho anterior que também analisou e identificou proteínas da fração de núcleo de *T. cruzi* (SANTOS JÚNIOR et al., 2015), identificamos 1063 proteínas não identificadas nesse trabalho anterior (FIGURA 27c). Quando comparadas as proteínas com localização nuclear de ambos os trabalhos de acordo com o preditor CELLO2GO, 91% das proteínas de nosso conjunto são novas em relação às descritas anteriormente (FIGURA 27d).

FIGURA 27 - PROTEÍNAS DO NÚCLEO DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). (a) Localização subcelular das proteínas identificadas na fração de núcleo de *T. cruzi* de acordo com a ferramenta CELLO2GO, que por BLAST procura sequências homólogas com GO anotada em eucariotos (e-value 0,001). (b) Enriquecimento de GO das proteínas da fração de núcleo de *T. cruzi* feito na ferramenta de busca de GO do TritypDB para Componente Celular (*slim*), (pvalue cutoff: 0.05). (c) Comparação do número de proteínas da fração de núcleo de *T. cruzi* identificadas em nosso trabalho em relação ao número de identificadas previamente (SANTOS JÚNIOR et al., 2015). (d) Comparação do número de proteínas identificadas com localização subcelular “nuclear” de acordo com a ferramenta CELLO2GO em nosso trabalho em relação às identificadas previamente. *Número de proteínas da cepa Dm28c mapeadas na cepa CL Brener para a comparação (TABELAS S3 e S4).

Das 576 proteínas com localização nuclear (CELLO2GO) foram mapeadas um total de 566 em CL Brener para a análise de anotação funcional da ferramenta DAVID (que não possui um

banco de Dm28c para uma busca automática de termos anotados) a fim de identificar termos de GO (componente celular, processo biológico e função molecular), vias bioquímicas (KEGG) e domínios (INTERPRO e SMART) enriquecidos. A análise de clusterização funcional retornou 12 clusters (TABELA 4 e TABELA S5). Os três primeiros grupos mais enriquecidos possuem: (1) proteínas relacionadas a ligação de ácido nucleico, como *RNA-binding proteins* e RNA-helicases, (2) proteínas ribossomais 40S e 60S e (3) diferentes DNA e RNA helicases. Também estão enriquecidos grupos contendo as proteínas das subunidades da RNA polimerase II e histonas/nucleossomo, entre outros.

TABELA 4 – ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS NUCLEARES DE *T. cruzi*

Cluster 1 Enrichment Score: 9.29224						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Nucleotide-binding, alpha-beta plait	28	1.54E-12	5.367072952	3.84E-10	3.75E-10
GO MF	nucleic acid binding	41	3.61E-12	3.465858796	1.12E-10	1.01E-10
GO MF	nucleotide binding	28	5.76E-10	4.077064389	1.19E-08	1.08E-08
INTERPRO	RNA recognition motif domain	21	2.43E-09	5.248997347	2.02E-07	1.97E-07
SMART	RRM	20	4.43E-06	3.337236534	1.31E-04	1.29E-04
Cluster 2 Enrichment Score: 9.23174						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
GO CC	ribosome	32	9.23E-14	4.934157255	2.17E-12	2.03E-12
GO BP	translation	33	1.12E-09	3.310797886	7.16E-08	6.83E-08
GO MF	structural constituent of ribosome	32	1.30E-08	3.178446115	2.01E-07	1.81E-07
KEGG	Ribosome	35	8.84E-08	2.498945682	1.77E-06	1.77E-06
Cluster 3 Enrichment Score: 8.81812						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Helicase, C-terminal	24	1.51E-12	6.464282448	3.84E-10	3.75E-10
INTERPRO	Helicase, superfamily 1/2, ATP-binding domain	24	2.65E-12	6.301317344	4.40E-10	4.29E-10
INTERPRO	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	65	7.94E-11	2.380846505	9.89E-09	9.65E-09
INTERPRO	DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box	19	3.01E-10	6.670074211	3.00E-08	2.93E-08
INTERPRO	RNA helicase, DEAD-box type, Q motif	12	1.23E-08	10.13319951	8.74E-07	8.53E-07
SMART	HELICc	23	1.38E-08	4.093676815	1.23E-06	1.20E-06
INTERPRO	RNA helicase, ATP-dependent, DEAD-box	11	4.68E-08	10.41467728	2.92E-06	2.85E-06
SMART	DEXDc	23	9.42E-08	3.705483324	4.19E-06	4.10E-06
GO MF	helicase activity	17	6.02E-07	4.590231647	7.47E-06	6.75E-06

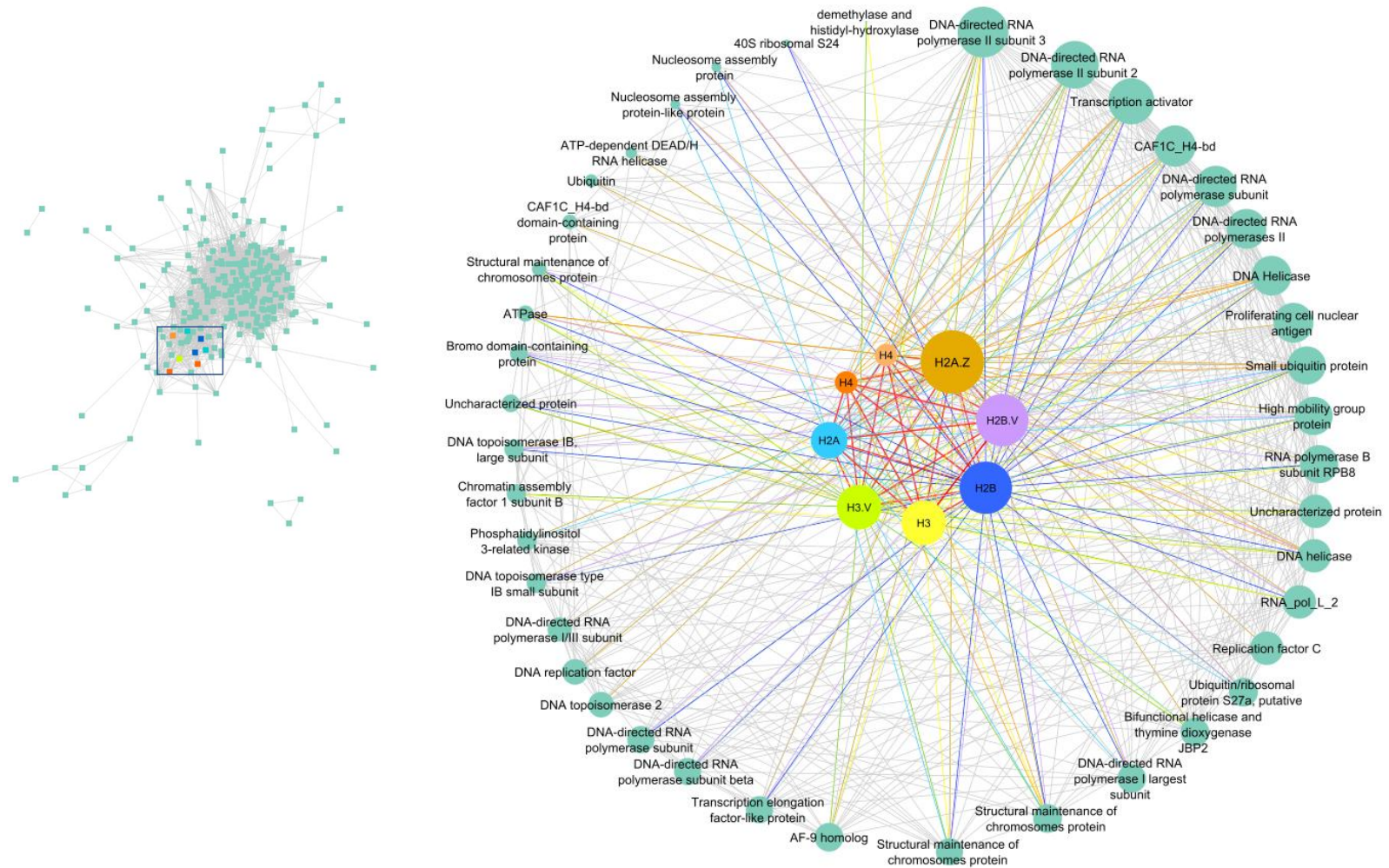
Cluster 4 Enrichment Score: 4.32324						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
GO BP	transcription, DNA-templated	15	4.07E-07	5.355127631	1.30E-05	1.24E-05
GO MF	DNA-directed RNA polymerase activity	12	7.07E-06	5.562280702	6.27E-05	5.66E-05
KEGG	RNA polymerase	10	7.92E-05	5.038690476	5.28E-04	5.28E-04
KEGG	Pyrimidine metabolism	11	0.022357619	2.204427083	0.074525397	0.074525
Cluster 5 Enrichment Score: 3.11370						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
GO CC	nucleosome	9	9.95E-05	6.013504155	0.00155893	0.001459
INTERPRO	Histone-fold	8	0.001924725	4.463433119	0.079032792	0.077128
INTERPRO	Histone core	6	0.002380506	6.248806366	0.079032792	0.077128
Cluster 6 Enrichment Score: 2.16794						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Homeodomain-like	6	1.96E-04	10.41467728	0.009765597	0.00953
INTERPRO	SANT/Myb domain	3	0.02505024	11.71651194	0.366912338	0.358071
SMART	SANT	3	0.063810538	7.008196721	0.631015317	0.616835
Cluster 7 Enrichment Score: 1.967543						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Brix domain	4	0.002348303	13.88623637	0.079032792	0.077128
SMART	SM00879	4	0.00981377	8.306010929	0.174685098	0.17076
INTERPRO	Anticodon-binding	3	0.054297519	7.811007958	0.680396251	0.664001
Cluster 8 Enrichment Score: 1.85243						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	RNA polymerase Rpb1, domain 4	3	0.005842903	23.43302387	0.181860351	0.177478
INTERPRO	RNA polymerase Rpb1, domain 3	3	0.009533094	18.7464191	0.263748931	0.257394
INTERPRO	RNA polymerase, N-terminal	3	0.013999309	15.62201592	0.289571829	0.282594
INTERPRO	RNA polymerase, alpha subunit	3	0.013999309	15.62201592	0.289571829	0.282594
INTERPRO	RNA polymerase Rpb1, domain 5	3	0.019188511	13.39029936	0.329351271	0.321415
SMART	RPOLA_N	3	0.0366643	9.344262295	0.407890336	0.398724
Cluster 9 Enrichment Score: 1.76341						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
GO BP	DNA replication	7	0.002438932	4.934040672	0.031218334	0.029755
KEGG	DNA replication	8	0.019222291	2.821666667	0.074525397	0.074525
INTERPRO	DNA polymerase III, clamp loader complex, gamma/delta subunit	3	0.02505024	11.71651194	0.366912338	0.358071
KEGG	Mismatch repair	5	0.075255507	3.04058908	0.188138767	0.188139
Cluster 10 Enrichment Score: 1.72790						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Structural maintenance of chromosomes protein	3	0.009533094	18.7464191	0.263748931	0.257394
INTERPRO	SMCs flexible hinge	3	0.013999309	15.62201592	0.289571829	0.282594
INTERPRO	RecF/RecN/SMC	3	0.02505024	11.71651194	0.366912338	0.358071
SMART	SM00968	3	0.0366643	9.344262295	0.407890336	0.398724

Cluster 11		Enrichment Score: 1.39232				
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Kinesin, motor domain	9	0.014536738	2.811962865	0.289571829	0.282594
INTERPRO	Kinesin, motor region, conserved site	6	0.02457755	3.605080596	0.366912338	0.358071
GO MF	microtubule motor activity	10	0.080387399	1.891932211	0.498401877	0.450169
GO BP	microtubule-based movement	10	0.093868204	1.820506965	0.600756505	0.572596
Cluster 12		Enrichment Score: 1.19507				
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
INTERPRO	Ribosomal protein L2 domain 2	4	0.048755216	4.806774128	0.674447162	0.658195
INTERPRO	Translation protein SH3-like domain	4	0.058658618	4.463433119	0.680396251	0.664001
INTERPRO	KOW	3	0.090868226	5.858255968	0.798009485	0.77878

Fonte: o autor (2021). Enriquecimento funcional das proteínas nucleares de *T. cruzi* na ferramenta DAVID. O *threshold* EASE foi de 0,1. Para mais detalhes da análise, como as Ids associados a cada termo ver a TABELA S5.

As proteínas nucleares (566) foram então analisadas quanto às suas interações de acordo com a base de dados STRING. Dentre elas, 254 puderam ser mapeadas com um total de 5198 interações, sendo 2741 (52,7%) com escore ≥ 0.9 (altíssima confiança) (TABELA S6). Dentre as proteínas mapeadas estão as histonas H2A, H2B, H3, H4, H2A.Z, H2B.V e H3.V. A subrede de interatores de histonas foi mapeada o que retornou 42 proteínas. Apenas duas estão não-caracterizadas nos bancos de dados. A H2A.Z foi a histona com mais interações. E dentre as não-histonas as proteínas com maior número de interações foram as subunidades da RNA polimerase II, um ativador da transcrição e uma proteína ligante de histonas com domínio CAF1C-H4bd. Também foram identificadas proteínas com bromodomínios que reconhecem acetilação e uma demetilase interagindo com H3 e sua variante H3.V.

FIGURA 28 – INTERATORES DAS HISTONAS IDENTIFICADOS NO SUBPROTEOMA DO NÚCLEO DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). À esquerda, do total de proteínas com localização nuclear, 254 tiveram interações mapeadas. À direita é mostrada a subrede com os 42 parceiros de interação direta das histonas que foram identificados no subproteoma de *T. cruzi*. O tamanho de cada proteína reflete seu número de interações. As cores das linhas de interação correspondem a interação feita com cada histona.

3.3 Análise XL-MS de parceiros de interação de histonas e hPTMs em *T. cruzi*

Parceiros ligantes de histonas e suas modificações foram buscados a partir do *crosslinking in situ* do núcleo de *T. cruzi* com DSSO. As amostras foram fracionadas por *StageTip*-SCX e analisadas em duplicatas de injeção (totalizando 16 .raws). Empregando um FDR de 1% a nível de *crosslink* e *CSM*, foram identificados 27 *crosslinks* (26 *interlinks* e 1 *intralink*) entre 36 proteínas (TABELA 5 e TABELA S7). Destes, cinco *crosslinks* foram identificados na amostra com 1 mM de DSSO e 22 na amostra com 1,5 mM de DSSO (TABELA S7). Dentre estas proteínas identificadas estão as histonas H1, H2B e H3 (TABELA 5 e FIGURA 29). Os espectros de identificação do *crosslink* LCPSKSAQK-AAEKPGKK são exemplificados na FIGURA A7.

Das 36 proteínas identificadas, 16 estão anotadas como “não-caracterizadas” nos bancos de dados TritypDB e Uniprot, foram numeradas de 1 a 16 e a presença de domínios de sequência foi buscada nestas proteínas (FIGURA 29).

Dentre as interações envolvendo histonas, a H3 foi identificada interagindo com uma proteína com cinco domínios RRM (uma possível proteína ligadora de RNA, *RBP*) que possui um sítio trimetilado. A histona H2B foi identificada interagindo com uma proteína não caracterizada com domínios anotado *ENTH/VHS* (liga a membranas e atua na sinalização no núcleo), que está conectada a outras cinco proteínas dentre elas três são não-caracterizadas e sem informações de domínio em sua sequência, as outras são com domínio tipo RING e uma esfingosina quinase putativa. O peptídeo da H2B conectando com a não-caracterizada “2” foi identificado com uma metilação (H2BK4me1). Já a proteína H1 foi identificada dentro de uma espécie de complexo formado por outras 10 proteínas e está interagindo diretamente com três proteínas, uma proteína com domínio de edição tRNA, uma outra anotada como *Leishmanolysin like peptidase* e uma terceira não-caracterizada, esta subrede da H1 conecta ainda outras proteínas que contém bromodomínio *EF-hand*, *RNI-like* e *Thioredoxin-like* (FIGURA 29).

Outras interações envolvendo proteínas ribossomais 40S e 60S e fatores de transcrição e proteínas que se associam a RNA foram identificadas. Uma chaperona de base J de DNA foi identificada interagindo com a proteína não-caracterizada “12” que não possui informações de domínio, mas foi identificada dimetilada. A proteína não-caracterizada “8” liga-se a uma manosiltransferase, identificada acetilada. E a proteína não-caracterizada “3” está interagindo com uma cisteinil tRNA sintetase, proteína ribossomal 60s L6.

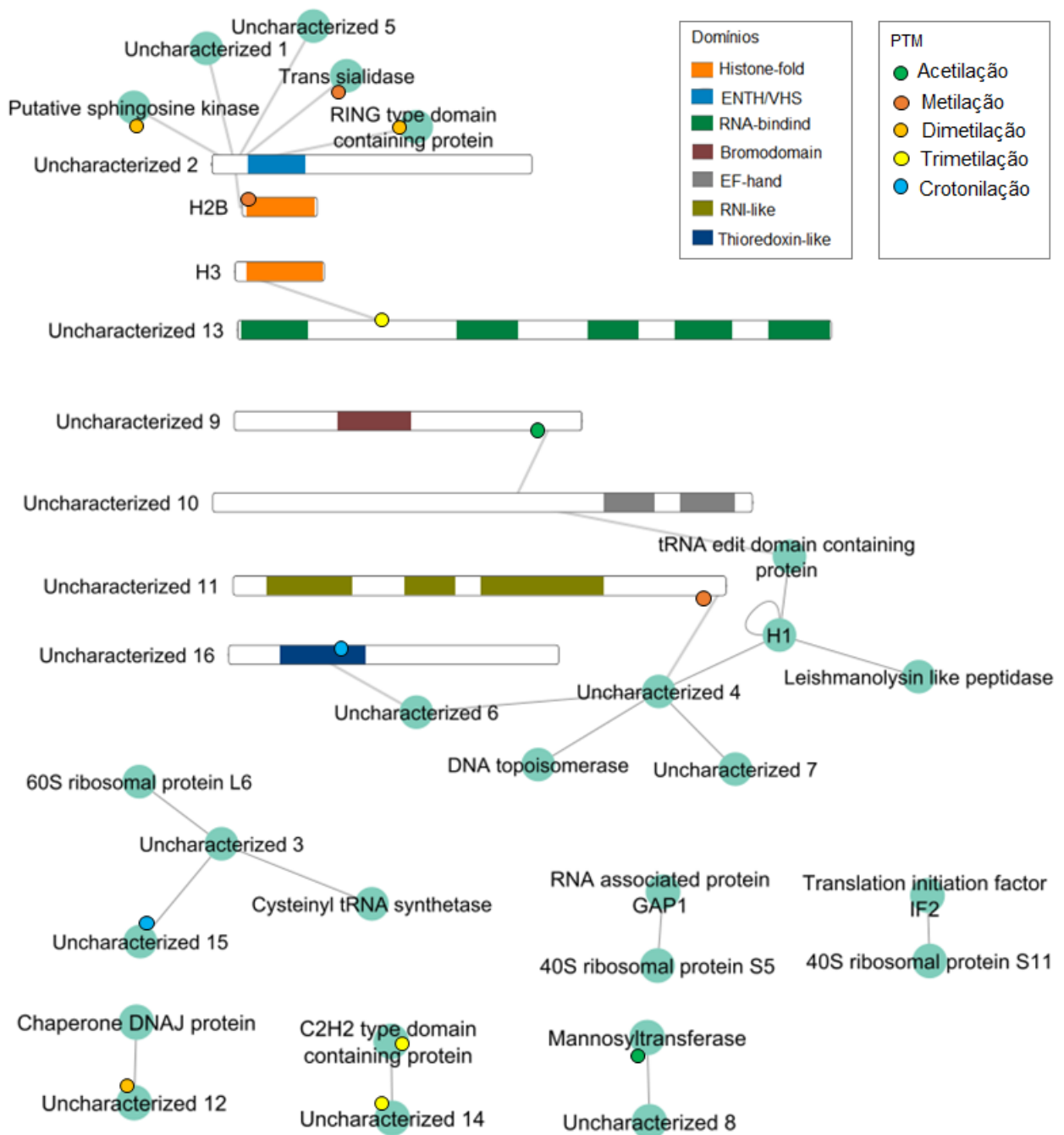
TABELA 5 – RESUMO DAS PROTEÍNAS NUCLEARES IDENTIFICADAS POR XL-MS EM *T. cruzi*

Proteína A	Proteína B	Sequência Crosslink	Sequência A	Modificações A	Id TritypDB (Uniprot) A	Posição A	Sequência B	Modificações B	Id TritypDB (Uniprot) B	Posição B
uncharacterized protein (1)	Uncharacterized protein (2)	EELDSRKR AAEKPGKK	EELDSR[K]R	DSSO [K7]	BCY84_10897 (V5AZV9)	186	AAEKPG[K]K	DSSO [K7]	BCY84_20595 (V5BKY3)	38
uncharacterized protein (3)	Cysteinyl-tRNA synthetase	NEKIEMLR LKPVSER	NE[K]IEMLR	DSSO [K3]	BCY84_11548 (V5BHC2)	397	L[K]PVSER	DSSO [K2]	BCY84_22444 (Q4CQ34)	309
H1	H1	KPAVR KPAAK	[K]PAVR	DSSO [K1]	BCY84_22663 (P40273)	39	[K]PAAK	DSSO [K1]	BCY84_22663 (P40273)	44
uncharacterized protein (4)	H1	QMHAKRAL KAAAK	QMHA[K]RAL	DSSO [K5]	BCY84_14509 (V5DQG3)	376	[K]AAAK	DSSO [K1]	BCY84_22663 (P40273)	15
uncharacterized protein (5)	Uncharacterized protein (2)	VQQKSSTDR AAEKPGKK	VQQ[K]SSTDR	DSSO [K4]	BCY84_19916 (V5DEF3)	726	AAEKPG[K]K	DSSO [K7]	BCY84_20595 (V5BKY3)	38
leishmanolysin-like peptidase	H1	KHDDRRK ASPKK	[K]HDDRRK	DSSO [K1]	BCY84_12312 (Q4CPL5)	551	ASP[K]K	DSSO [K4]	BCY84_22663 (P40273)	14
uncharacterized protein (4)	Uncharacterized protein (6)	QMHAKRAL KPASK	QMHA[K]RAL	DSSO [K5]	BCY84_14509 (V5DQG3)	376	[K]PASK	DSSO [K1]	BCY84_19412 (V5BF71)	440
40s ribosomal protein s11	Translation initiation factor IF-2	SAVNGKYIDR KTDQQKNSR	SAVNG[K]YIDR	DSSO [K6]	BCY84_11553 (V5BHG4)	67	[K]TDQQKNSR	DSSO [K1]	BCY84_11085 (V5BFL2)	848
H1	60S ribosomal protein L6	KPAVR +APAKK	[K]PAVR	DSSO [K1]	BCY84_14693 (P40273)	39	APAKK	DSSO [A1]	BCY84_10915 (Q4DR87)	1
Guide rna associated protein, gap1	40S ribosomal protein S5	KWAMR FRKAR	[K]WAMR	DSSO [K1]	BCY84_02872 (V5BAI0)	398	FR[K]AR	DSSO [K3]	BCY84_13039 (V5BRX6)	49
uncharacterized protein (4)	Uncharacterized protein (7)	QMHAKRAL SKAPK	QMHA[K]RAL	DSSO [K5]	BCY84_14509 (V5DQG3)	376	S[K]APK	DSSO [K2]	BCY84_02297 (V5BVS2)	3
uncharacterized protein (8)	Mannosyltransferase	+FCRLRAGSR IQKENKMR	FCRLRAGSR	DSSO [N-term]; Carbamidomethyl [C2]	BCY84_16763 (V5AXQ5)	1	IQ[K]ENKMR	DSSO [K3]; Acetyl [K6]; Oxidation [M7]	BCY84_16216 (V5DRF7)	4
uncharacterized protein (9)	Uncharacterized protein (10)	EGEKPPKK TGPKK	EGEKPP[K]K	DSSO [K7]; Acetyl [K4]	BCY84_20328 (V5AXS4)	475	TGP[K]K	DSSO [K4]	BCY84_01848 (Q4DYD8)	449
trans-sialidase	Uncharacterized protein (2)	LCPSKSAQK AAEKPGKK	LCPS[K]SAQK	DSSO [K5]; Carbamidomethyl [C2]; Methyl [K9]	BCY84_07651 (V5CK68)	481	AAEKPG[K]K	DSSO [K7]	BCY84_20595 (V5BKY3)	38
uncharacterized protein (4)	Uncharacterized protein (11)	QMHAKRAL AGKAK	QMHA[K]RAL	DSSO [K5]	BCY84_14509 (V5DQG3)	376	AGKA[K]	DSSO [K5]; Methyl [K3]	BCY84_19418 (V5AZQ5)	730
H2B	Uncharacterized protein (2)	+ATPKSSSNR AAEKPGKK	ATPKSSSNR	DSSO [N-term]; Methyl [K4]	BCY84_06652 (Q4CTD8)	1	AAEKPG[K]K	DSSO [K7]	BCY84_20595 (V5BKY3)	38

trna_edit domain-containing protein	H1	YRNKFAR ASPKK	YRN[K]FAR	DSSO [K4]	BCY84_15318 (A0A2V2VG49)	82	ASP[K]K	DSSO [K4]	BCY84_22663 (P40273)	14
uncharacterized protein (4)	DNA topoisomerase	QMHAKRAL SKPAK	QMHA[K]RAL	DSSO [K5]	BCY84_14509 (V5DQG3)	376	S[K]PAK	DSSO [K2]	BCY84_19807 (Q4DJ87)	874
putative sphingosine kinase	Uncharacterized protein (2)	GRTDDSKGGK AAEKPGKK	GRTDDS[K]GGK	DSSO [K7]; Dimethyl [K10]	BCY84_13396 (A0A2V2VTG7)	494	AAEKPG[K]K	DSSO [K7]	BCY84_20595 (V5BKY3)	38
trna_edit domain-containing protein	Uncharacterized protein (10)	YRNKFAR TGPKK	YRN[K]FAR	DSSO [K4]	BCY84_15318 (A0A2V2VG49)	82	TGP[K]K	DSSO [K4]	BCY84_01848 (Q4DYD8)	449
chaperone dnaj protein	Uncharacterized protein (12)	WSLEDKVR KKDEPR	WSLED[K]VR	DSSO [K6]	BCY84_13905 (V5BTK5)	1616	K[K]DEPR	DSSO [K2]; Dimethyl [K1; R6];	BCY84_16459 (V5BXR7)	1960
ring-type domain-containing protein	Uncharacterized protein (2)	ARSEEEKR AAEKPGKK	ARSEEE[K]R	DSSO [K7]; Dimethyl [R2];	BCY84_18515 (Q4DMP8)	1209	AAE[K]PGKK	DSSO [K4]	BCY84_20595 (V5BKY3)	35
H3	Uncharacterized protein (13)	SKETAR KSSSVK	S[K]ETAR	DSSO [K2]	BCY84_17924 (V5BEW0)	5	[K]SSSVK	DSSO [K1]; Trimethyl [K6];	BCY84_05341 (Q4DDV5)	256
uncharacterized protein (14)	C2H2-type domain-containing protein	KTGDIDWR DAKTVPR	[K]TGDIDWR	DSSO [K1]; Trimethyl [R8]	BCY84_17346 (Q4DEW2)	555	DA[K]TVPR	DSSO [K3]; Trimethyl [R7]	BCY84_15009 (Q4DWA4)	399
uncharacterized protein (3)	Uncharacterized protein (15)	NEKIEMLR KSEKLR	NE[K]IEMLR	DSSO [K3]	BCY84_11548 (V5BHC2)	397	KSE[K]LR	DSSO [K4]; Crotonyl [K1]	BCY84_06181 (V5DGL5)	622
uncharacterized protein (16)	Uncharacterized protein (6)	EKSVPAQK KPASK	E[K]SVPAQK	DSSO [K2]; Crotonyl [K8]	BCY84_06476 (V5B9R8)	132	[K]PASK	DSSO [K1]	BCY84_19412 (V5BF71)	440

Fonte: o autor (2021). As proteínas anotadas como “não-caracterizadas” nos bancos de dados TritypDB e Uniprot foram numeradas de 1 a 16 para facilitar as análises.

FIGURA 29 – MAPA DAS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA NUCLEARES DE *T. cruzi* IDENTIFICADAS POR XL-MS



Fonte: o autor (2021). As proteínas e *crosslinks* identificados na análise XL-MS no núcleo de *T. cruzi* foram mapeadas no XlinkCyNET dentro do Cytoscape v.3.9. Além das histonas, a presença de domínio na sequência (com base no *Supfam* e *Pfam*) foi buscada nas proteínas anotadas como não-caracterizadas nos bancos de dados TritypDB e Uniprot e são mostrados quando a informação existe para a sequência. As PTMs identificadas no peptídeo com *crosslink* são mostradas. As proteínas anotadas como não-caracterizadas nos bancos de dados foram numeradas de 1 a 16.

DISCUSSÃO - Capítulo 3

Com o intuito de identificar, em larga escala, ligantes de hPTMs de histonas em *T. cruzi*, empregamos uma estratégia que envolveu o *crosslinking in situ* das proteínas nucleares do parasito. Para isso, empregamos um protocolo de enriquecimento da fração de núcleos de *T. cruzi* (SANTOS JÚNIOR et al., 2015) e um protocolo de *crosslinking* de núcleos intactos descrito para células humanas (FASCI et al., 2018; KLYKOV et al., 2018). O protocolo empregado permitiu tanto a análise qualitativa do proteoma nuclear quanto a análise do interatoma nuclear de *T. cruzi*.

A análise proteômica dos núcleos de *T. cruzi* permitiu a identificação do mais amplo número de proteínas (n=1303) a partir da fração enriquecida desta organela, enquanto que o trabalho anterior de Santos Junior (2015) havia identificado 864 proteínas (FIGURA 27). Apesar de terem sido empregados os mesmos protocolos de enriquecimento de núcleos e ambos com um bom enriquecimento, os protocolos diferiram no preparo de amostras e análise por nanoLC-MS/MS. Empregamos o fracionamento dos peptídeos por *StageTip*-SCX a fim de enriquecer peptídeos com maior número de cargas (característica de peptídeos conectados pelo *crosslinker*) e um método de aquisição híbrido (MS2-MS2-MS3) em um espectrômetro de massas de alta resolução.

Uma etapa importante de padronização do protocolo envolveu o tampão de lavagem dos núcleos e reação de *crosslinking*. Os tampões usados na lavagem e reação de núcleos de células humanas dos protocolos de (FASCI et al., 2018) e de (KLYKOV et al., 2018) foram testados nos núcleos de *T. cruzi*, porém lisaram os núcleos. Então as concentrações de NaCl e MgCl₂·6H₂O do tampão descrito em (KLYKOV et al., 2018) foram diminuídas de 150 mM e 1,5 mM para 10 mM e 1 mM, respectivamente e esse tampão manteve a integridade dos núcleos para a reação de *crosslinking*.

O extrato nuclear total de *T. cruzi* pós reação de *crosslinking* com DSSO mostrou a presença das histonas e o aumento da presença de bandas de tamanho aprox. 34 kDa conforme aumenta a quantidade de DSSO, indicando o *crosslinking* das proteínas e acúmulo nessa região (FIGURA 25), esse acúmulo de proteínas em regiões intermediária do extrato total foi observado para núcleo de células humanas anteriormente (FASCI et al., 2018). A BSA, amostra de menor complexidade testada também apresentou um bom perfil de titulação de DSSO no gel (FIGURA A6). Foi identificada na busca SEQUEST, porém na busca por *crosslinking* não retornou nenhum peptídeo.

A análise de classificação e enriquecimento de ontologia gênica do nosso conjunto de proteínas nucleares de *T. cruzi* apresentou um número expressivo de proteínas com localização nuclear, demonstrando ser uma fração melhor enriquecida por proteínas nucleares quando comparado com o trabalho de Santos Junior (2015) (FIGURA 27). Além disso, a análise de clusterização funcional das proteínas reforçou a qualidade do subproteoma nuclear pois demonstrou que os grupos mais enriquecidos são de proteínas de ligação a ácidos nucleicos, ribossomo, helicases, subunidades da RNA polimerase II (pol II) e histonas (TABELA 4).

Analisando as interações das proteínas ligantes de histonas identificadas (FIGURA 28), observamos que as histonas interagem com praticamente todos os mesmos parceiros diretos, com algumas exceções como, por exemplo, uma demetilase/hidroxilase que interage apenas com H3 e sua variante H3.V. Interessante também foi observar as proteínas com maior número de interações na subrede, dentre elas as subunidades da RNA polimerase II, fator de transcrição e fator de montagem da cromatina com domínio ligador de histona (CAF1C-H4bd). Este último é um conhecido domínio, que juntamente com o domínio WD40, atua na montagem da cromatina após replicação do DNA, depositando H3-H4 no DNA recém sintetizado (SAUER et al., 2018).

A caracterização, em larga escala, de interações proteína-proteína dependentes de PTMs através de XL-MS ainda é um desafio, devido à natureza transiente deste tipo de interação, pelos baixos níveis estequiométricos das PTMs e pelos métodos de enriquecimento dos pares de peptídeos e os *pipelines* de análise computacional deste tipo de dado. Apesar disso, recentemente o grupo de Albert Heck demonstrou de maneira promissora a possibilidade de aplicar este tipo de estudo de interação com núcleos intactos de células humanas e identificação de hPTMs (FASCI et al., 2018). Aqui, na análise XL-MS do núcleo de *T. cruzi*, buscamos por *crosslink* entre peptídeos contendo hPTMs e foram identificadas proteínas cujos peptídeos estavam modificados por acetilação, mono-, di-, trimetilação e crotonilação (TABELA 5 e FIGURA 29). Estes sítios modificados foram identificados próximos aos sítios conectados pelos interlinks, de modo que a hPTM pode estar influenciando a interação entre ambas as proteínas.

Dentre estas proteínas identificadas modificadas está a H2B que foi encontrada monometilada e interagindo com uma proteína não-caracterizada com domínio ENTH/VHS que está relacionado a sinalização e membranas de vesículas. Esta proteína não-caracterizada interage com outras cinco proteínas e três delas com anotação relacionada a membrana ou função em membranas. Uma hipótese seria que as interações capturadas envolvam proteínas de vesícula ou

corpos lipídicos contendo a histona H2B, como já mostrado para outros eucariotos (LI et al., 2012; WELTE, 2007).

A histona H3 foi identificada interagindo com a proteína não-caracterizada “13”, que possui anotações de cinco domínios ligadores de RNA (RRM) e um sítio trimetilado (FIGURA 29). Foi demonstrado em *S. cerevisiae* que o domínio RRM presente em metiltransferases SET1 é necessário para a trimetilação da lisina 4 da H3 (SCHLICHTER; CAIRNS, 2005), ou seja essa proteína não-caracterizada “13” de *T. cruzi* pode ter um papel de metiltransferase. Ela pode ser ainda uma *RNA-binding protein* (RBP) devido a presença dos vários domínios RRM. Sabe-se que as RBPs nucleares interagem com RNAm logo que estes começam a ser transcritos pela RNA polimerase II (GÜNZL, 2010; ROMAGNOLI et al., 2020).

A histona H1 foi identificada em um conjunto de outras dez proteínas e interagindo diretamente com três proteínas (*tRNA edit domain*, Leishmanolysin peptidase e não-caracterizada “4”). As proteínas desse complexo possuem domínios EF-hand, RNI-like, Thioredoxin-like e bromodomínio, sendo que este último é um domínio que se liga a acetilação de histonas. A proteína não-caracterizada “14” liga-se a uma proteína com domínio *zinc finger* que pode ser também uma RBP (ROMAGNOLI et al., 2020).

Os estudos em larga escala XL-MS de organelas foram realizados até o momento em núcleo (FASCI et al., 2018; IHLING et al., 2021) e mitocôndria (LIU et al., 2018; SCHWEPPE et al., 2017) de células humanas, em núcleo de levedura (BARTOLEC et al., 2020) e em vesículas sinápticas (GONZALEZ-LOZANO et al., 2020; WITTIG et al., 2021). Estes trabalhos identificaram de centenas a milhares de *crosslinks* entre proteínas mostrando que o protocolo aplicado para *T. cruzi* pode ser bastante aprimorado. Por exemplo, chegar na etapa de fracionamento dos peptídeos com uma quantidade mínima de 100 µg de material (e idealmente 500 µg) e então realizar o enriquecimento dos peptídeos com *crosslinking* em um sistema HPLC-SCX especialmente quando se trabalha com amostras complexas como proteoma de organelas e de células, isso reduz a possibilidade de perda de amostra e/ou reduzida capacidade de captura de peptídeos com *crosslink*.

Ainda assim, ao melhor do nosso conhecimento, os resultados de XL-MS do núcleo de *T. cruzi* apresentados aqui são os primeiros dentro dos tripanossomatídeos (e mesmo entre protozoários) a começar a caracterizar, em larga escala, as interações proteína-proteína *in situ* de uma organela.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em nosso trabalho realizamos a otimização do protocolo de análises de hPTMs em *T. cruzi*, o que permitiu a identificação de mais versões de peptídeos diferentemente modificados. Foram identificadas 201 hPTMs de 13 tipos presentes em todas as histonas de *T. cruzi*, destas, 107 identificadas pela primeira vez. De modo geral, a monometilação e acetilação foram as modificações mais abundantes na ocupação de seus sítios, mas também se destacaram a trimetilação dos sítios H3K76 e H3.VK94. Estes sítios são equivalentes na sequência destas histonas e sua versão trimetilada merece ser melhor investigada quanto às suas funções em *T. cruzi*, especialmente quanto a uma possível equivalência funcional no ciclo celular do parasito. Além destes sítios trimetilados, demonstramos a existência de outras marcas hPTMs geralmente identificadas por outros trabalhos proteômicos de *T. cruzi*, por serem intensas e terem alta ocupação do sítio.

O mapa compilado de hPTMs de *T. cruzi* possui até o momento um total de 353 hPTMs, presentes nas caudas e domínio globular das histonas e há regiões multimodificadas como possíveis centros de sinalização. O repertório de hPTMs em *T. cruzi* pode ser equiparado a de outros eucariotos, como humanos e camundongos. Esse fato levanta muitos questionamentos quanto às funções das hPTMs em um organismo que possui uma forte regulação gênica a nível pós-transcricional. O mapa serve de base para estudos funcionais direcionados a compreender a regulação da cromatina em *T. cruzi* avaliando, por exemplo, a função de marcas hPTMs específicas ou *crosstalk* entre diferentes marcas na regulação direta da cromatina e em efeitos *downstream*.

A análise da modulação das 172 hPTMs identificadas em epimastigota em diferentes condições de crescimento e de estresse nutricional mostraram que, dentre os 13 tipos de hPTMs analisados, a acetilação e a monometilação foram as mais abundantes e não alteraram de forma drástica seus níveis globais entre as condições, diferentemente das demais hPTMs. Estas PTMs também são as mais abundantes em outros eucariotos e provavelmente são, também em *T. cruzi*, as mais utilizadas na regulação epigenética. Embora em sua maioria as demais hPTMs tenham aparecido em menores níveis de abundância global, a crotonilação apareceu em níveis mais elevados do que dimetilação e trimetilação em três das condições avaliadas, exceto no tempo mais prolongado de estresse nutricional (St-6h). A dimetilação, trimetilação e crotonilação apresentaram níveis globais variando significativamente entre diferentes condições, quase todas envolvendo a

condição de estresse nutricional mais prolongado.

Um total de 16 peptídeos com 20 hPTMs foram detectados regulados. A análise de coregulação demonstrou que os peptídeos contendo as acetilações na H2A.Z na região K42-K58 aumentaram significativamente seus níveis desde a fase exponencial de crescimento até a condição de estresse nutricional mais prolongado. Tendo em vista o papel da H2A.Z na transcrição em outros eucariotos, esta região acetilada da H2A.Z de *T. cruzi* tem grande potencial para ser também uma peça importante na transcrição gênica e outros mecanismos de regulação do DNA no parasito.

Quando foi analisado o proteoma nuclear de *T. cruzi* foi identificada um importante conjunto de novas proteínas e suas interações, especialmente envolvendo histonas. Foram identificadas 1303 proteínas na fração nuclear de *T. cruzi*, sendo 576 com localização nuclear de acordo com anotações e enriquecimento de GO, o mais amplo conjunto de proteínas identificadas no núcleo do parasito. Foram mapeadas as interações em 254 das proteínas nucleares identificadas. Dentre estas proteínas estão as histonas que interagem com 42 proteínas diretamente também identificadas no subproteoma nuclear, dentre elas as subunidades da RNA polimerase II, fatores de transcrição e proteínas com domínios ligante de cromatina.

Uma outra etapa importante do trabalho foi a identificação *in situ* de interações proteína-proteína, especialmente envolvendo histonas e suas PTMs, diretamente do núcleo de *T. cruzi*. A estratégia XL-MS permitiu a identificação de 36 proteínas conectadas através de *crosslink* químico, dentre elas as histonas H1, H2B e H3. Das 36 proteínas, 16 ainda não foram caracterizadas e apenas 6 destas possuem anotações de domínios de sequência. A histona H1 foi identificada fazendo parte de um conjunto com outras dez proteínas e interage diretamente com três delas, sete são proteínas não-caracterizadas. A H2B foi identificada metilada e interagindo com uma proteína com domínio ENTH/VHS porém ainda não-caracterizada. A H3 foi identificada interagindo com uma proteína com cinco domínios RRM, uma provável *RNA-binding protein* ou uma metiltransferase. Estudos funcionais são necessários para caracterizar estas proteínas e suas interações proteína-proteína através de estratégias complementares como, por exemplo, co-imunoprecipitação e análise estrutural.

O estudo dos ligantes e complexos que reconhecem hPTMs em *T. cruzi* tem um alto potencial em revelar candidatos para alvos de drogas epigenéticas. O fato de existirem ligantes com funções tanto de *reader* quanto de *writer* e considerando ainda que pode haver redundância no reconhecimento de diferentes hPTMs, ou seja, ligantes bifuncionais e “pan-específicos”, fazem

destas proteínas excelentes alvos para drogas contra o parasito.

Os resultados apresentados nesta tese podem servir de base para novos estudos voltados a compreender os mecanismos epigenéticos em *T. cruzi*. Primeiramente, fornece um mapa robusto das hPTMs de epimastigota de *T. cruzi* compilando as já descritas e adicionando novas marcas hPTMs identificadas com um protocolo otimizado. Segundo, apresenta perfis de modulação de diferentes hPTMs ao longo de importantes condições biológicas de *T. cruzi*, nas fases exponencial e estacionária de crescimento e durante o estresse nutricional, identificando grupos de hPTMs regulados. E, por fim, a caracterização, em larga escala, do proteoma nuclear e suas interações proteína-proteína endógenas envolvendo histonas e suas hPTMs, constituem um amplo conjunto de dados proteômicos desta organela em um tripanossomatídeo.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, mar. 2003.
- AKHTAR, A.; BECKER, P. B. Activation of Transcription through Histone H4 Acetylation by MOF, an Acetyltransferase Essential for Dosage Compensation in *Drosophila*. **Molecular Cell**, v. 5, p. 367–375, 2000.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 6. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015.
- ALLIS, C. D. et al. **Epigenetics**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- ALONSO, V. L. et al. Aim for the Readers! Bromodomains As New Targets Against Chagas' Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6544–6563, 13 dez. 2019.
- ALSFORD, S.; HORN, D. Trypanosomatid histones. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 365–372, 4 jun. 2004.
- AMORIM, J. C. et al. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 9899, p. 1–12, 2017.
- ARNAUDO, A. M.; MOLDEN, R. C.; GARCIA, B. A. Revealing histone variant induced changes via quantitative proteomics. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 4, p. 284–294, 25 ago. 2011.
- BARSKI, A. et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 823–837, maio 2007.
- BARTOLEC, T. K. et al. Cross-linking Mass Spectrometry Analysis of the Yeast Nucleus Reveals Extensive Protein–Protein Interactions Not Detected by Systematic Two-Hybrid or Affinity Purification–Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 1874–1882, 21 jan. 2020.
- BOWMAN, G. D.; POIRIER, M. G. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2274–2295, 25 mar. 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media** *Rev Inst Med trop São Paulo*, 1964. Disponível em: <<http://www.imtsp.fm.usp.br/portal/portal/images/pdf/revista/vol06/93-100.pdf>>
- CERVANTES-LANDÍN, A. Y. et al. High Molecular Weight Proteins of *Trypanosoma cruzi* Reduce Cross-Reaction with *Leishmania* spp. in Serological Diagnosis Tests. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- CHAGAS, C. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- CHAN, D. W. et al. Unbiased proteomic screen for binding proteins to modified lysines on histone H3. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 9, p. 2343–2354, maio 2009.
- CHAN, J. C.; MAZE, I. Nothing Is Yet Set in (Hi)stone: Novel Post-Translational Modifications Regulating Chromatin Function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 45, n. 10, p. 829–844, out.

2020.

- CHEN, Y. et al. Lysine Propionylation and Butyrylation Are Novel Post-translational Modifications in Histones. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 812–819, maio 2007.
- CHEUNG, W. L. et al. Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. **Current Biology**, v. 15, n. 7, p. 656–660, 2005.
- CHRISTOPHOROU, M. A. et al. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 104–108, 2014.
- CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open biology**, v. 9, n. 6, p. 190072, 2019.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.
- COLAK, G. et al. Proteomic and Biochemical Studies of Lysine Malonylation Suggest Its Malonic Aciduria-associated Regulatory Role in Mitochondrial Function and Fatty Acid Oxidation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 11, p. 3056–3071, 2015.
- CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.
- CONTRERAS, V. et al. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacylogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123–133, 1988.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.
- DA CUNHA, J. P. C. et al. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 75–86, mar. 2005.
- DA CUNHA, J. P. C. et al. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 268–277, dez. 2006.
- DAI, L. et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 365–370, 30 maio 2014.
- DE ALMEIDA, R. F.; FERNANDES, M.; DE GODOY, L. M. F. An updated map of *Trypanosoma cruzi* histone post-translational modifications. **Scientific Data**, v. 8, n. 1, p. 93, 25 mar. 2021.
- DE GODOY, L. M. F. et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacylogenesis. **Proteomics**, p. 2694–2703, 2012.
- DE JESUS, T. C. L. et al. Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p. 2039–2051, 3 jun. 2016.
- DE JESUS, T. C. L. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 23–38, 2017.
- DE LIMA, L. P. et al. Improvements on the quantitative analysis of *Trypanosoma cruzi* histone post translational modifications: Study of changes in epigenetic marks through the parasite's metacylogenesis and life cycle. **Journal of Proteomics**, v. 225, n. April, p. 103847, 2020.
- DI CERBO, V. et al. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. **eLife**, v. 3, p. 1–23, 2014.

DÍAZ-OLMOS, Y. et al. Characterising ISWI chromatin remodeler in *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 10, p. 1–14, 2020.

EBERL, H. C. et al. A Map of General and Specialized Chromatin Readers in Mouse Tissues Generated by Label-free Interaction Proteomics. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 368–378, 2013.

ELIAS, M. C.; NARDELLI, S. C.; SCHENKMAN, S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. **Future Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1065–1074, 2009.

FANG, L. et al. Mechanisms Underlying Acrolein-Mediated Inhibition of Chromatin Assembly. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 23, p. 2995–3008, 1 dez. 2016.

FARRELLY, L. A. et al. Histone seronylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. **Nature**, v. 567, n. 7749, p. 535–539, 13 mar. 2019.

FASCI, D. et al. Histone Interaction Landscapes Visualized by Crosslinking Mass Spectrometry in Intact Cell Nuclei. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 10, p. 2018–2033, out. 2018.

FERREIRA, L. R. P. et al. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 157–166, 2008.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213–8, 2000.

FORNÉ, I.; BARTH, T.; IMHOF, A. Quantifying histone modifications using mass spectrometry (Prot 51). **Epigenesys**, p. 1–14, 2012.

FRESE, C. K. et al. Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2377–2388, 2011.

GALLIGAN, J. J. et al. Stable Histone Adduction by 4-Oxo-2-nonenal: A Potential Link between Oxidative Stress and Epigenetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 34, p. 11864–11866, 27 ago. 2014.

GALLIGAN, J. J. et al. Methylglyoxal-derived posttranslational arginine modifications are abundant histone marks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 37, p. 9228–9233, 11 set. 2018.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. Histone H3 Glutathionylation in Proliferating Mammalian Cells Destabilizes Nucleosomal Structure. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 12, p. 1305–1320, 20 out. 2013.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L.; ROMÁ-MATEO, C.; PALLARDÓ, F. V. Oxidative post-translational modifications in histones. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 641–650, 11 set. 2019.

GARCIA, B. A. et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 933–938, 12 abr. 2007.

GARDNER, K. E.; ALLIS, C. D.; STRAHL, B. D. Operating on chromatin, a colorful language where context matters. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 1, p. 36–46, 2011.

GATTI, M. et al. A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. **Cell Cycle**, v. 11, n. 13, p. 2538–2544, 2012.

GIAIMO, B. D. et al. The histone variant H2A.Z in gene regulation. **Epigenetics & Chromatin**, v. 12, n. 1, p. 37, 14 dez. 2019.

GONZALEZ-LOZANO, M. A. et al. Stitching the synapse: Cross-linking mass spectrometry into resolving synaptic protein interactions. **Science Advances**, v. 6, n. 8, p. 1–15, 19 fev. 2020.

GOUDARZI, A. et al. Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters. **Molecular Cell**, v. 62, n. 2, p. 169–180, 2016.

GÜNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, ago. 2010.

HAN, X. et al. PeaksPTM: Mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 7, p. 2930–2936, 2011.

HARMEL, R.; FIEDLER, D. Features and regulation of non-enzymatic post-translational modifications. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 244–252, 14 mar. 2018.

HECKER, H. et al. The chromatin of trypanosomes. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 809–819, set. 1994.

HERNÁNDEZ, R. et al. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 509–514, 31 ago. 2012.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 18 jan. 2009.

HUANG, H. et al. SnapShot: Histone Modifications. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 458- 458.e1, out. 2014.

HUANG, H. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Histone Modifications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2376–2418, 25 mar. 2015.

HUANG, H. et al. Lysine benzoylation is a histone mark regulated by SIRT2. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3374, 28 dez. 2018.

IHLING, C. H. et al. Cross-Linking/Mass Spectrometry Combined with Ion Mobility on a timsTOF Pro Instrument for Structural Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 33, p. 11442–11450, 24 ago. 2021.

JANZEN, C. J. et al. Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**, v. 580, n. 9, p. 2306–2310, 17 abr. 2006a.

JANZEN, C. J. et al. Selective Di- or Trimethylation of Histone H3 Lysine 76 by Two DOT1 Homologs Is Important for Cell Cycle Regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Cell**, v. 23, n. 4, p. 497–507, ago. 2006b.

JEFFERS, V. et al. Bromodomains in Protozoan Parasites: Evolution, Function, and Opportunities for Drug Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, p. e00047-16, 11 mar. 2017.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the Histone Code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074–1080, 10 ago. 2001.

JIANG, T. et al. N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 1, p. 60–65, 2 jan. 2007.

JIN, J. et al. SIRT2 Reverses 4-Oxononanoyl Lysine Modification on Histones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 38, p. 12304–12307, 28 set. 2016.

JONES, B. et al. The Histone H3K79 Methyltransferase Dot1L Is Essential for Mammalian Development and Heterochromatin Structure. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 9, p. e1000190, 12 set. 2008.

KEBEDE, A. F. et al. Histone propionylation is a mark of active chromatin. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 24, n. 12, p. 1048–1056, 2017.

KELLY, S. et al. Genome organisation is a major component of gene expression control in response to stress and during the cell-division cycle in trypanosomes. **Open Biology**, v. 2, n. 4, p. 120033–120033, 2012.

KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712–736, 2017.

KLEINER, R. E. et al. A Chemical Proteomics Approach to Reveal Direct Protein-Protein Interactions in Living Cells. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 1, p. 110–120, 2018.

KLYKOV, O. et al. Efficient and robust proteome-wide approaches for cross-linking mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 13, n. 12, p. 2964–2990, 16 dez. 2018.

KORNBERG, R. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. **Science**, v. 184, p. 868–871, 1974.

KORNBERG, R. D. Structure of chromatin. **Annual review of biochemistry**, v. 46, p. 931–54, 1977.

KOTHAPALLI, N.; SARATH, G.; ZEMPLIENI, J. Biotinylation of K12 in Histone H4 Decreases in Response to DNA Double-Strand Breaks in Human JAr Choriocarcinoma Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 10, p. 2337–2342, 1 out. 2005.

KRAUS, A. J. et al. Distinct roles for H4 and H2A.Z acetylation in RNA transcription in African trypanosomes. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1498, 20 dez. 2020.

KRIEGER, M. A. et al. Differential Gene Expression during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 165–168, 1999.

KRUHLAK, M. et al. Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, 2001.

KUMAR, D. et al. Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 328–337, 2012.

KURUMIZAKA, H.; KUJIRAI, T.; TAKIZAWA, Y. Contributions of Histone Variants in Nucleosome Structure and Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 6, p. 166678, mar. 2021.

LANG, D. et al. Probing the acetylation code of histone H4. **Proteomics**, v. 13, p. 2989–2997, 2013.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, abr. 2013.

LEE, C.-K. et al. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 900–905, 11 ago. 2004.

LENZ, S. et al. Reliable identification of protein-protein interactions by crosslinking mass spectrometry. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3564, 11 dez. 2021.

LEPACK, A. E. et al. Dopaminylation of histone H3 in ventral tegmental area regulates cocaine seeking. **Science**, v. 368, n. 6487, p. 197–201, 10 abr. 2020.

LI, X. et al. Examining post-translational modification-mediated protein – protein interactions using a chemical proteomics approach. **Protein Science**, v. 22, p. 287–295, 2013.

LI, X.; KAPOOR, T. M. Approach to Profile Proteins That Recognize Post-Translationally Modified Histone “Tails”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 1, p. 2504–2505, 2010.

LI, Z. et al. Lipid Droplets Control the Maternal Histone Supply of Drosophila Embryos. **Current Biology**, v. 22, n. 22, p. 2104–2113, nov. 2012.

LIMA, D. B.; ZHU, Y.; LIU, F. XlinkCyNET: A Cytoscape Application for Visualization of Protein Interaction Networks Based on Cross-Linking Mass Spectrometry Identifications. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 4, p. 1943–1950, 2 abr. 2021.

LIN, S.; GARCIA, B. A. Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High Resolution Mass Spectrometry. **Methods in Enzymology**, v. 512, n. 609, p. 3–28, 2012.

LIU, F. et al. Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15473, 19 ago. 2017.

LIU, F. et al. The interactome of intact mitochondria by cross-linking mass spectrometry provides evidence for coexisting respiratory supercomplexes. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 17, n. 2, p. 216–232, 2018.

LO, W.-S. et al. Snf1 - A histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1142–1146, 2001.

LU, X. et al. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 10, p. 1122–1124, 14 out. 2008.

LUCENA, A. C. R. et al. Quantitative phosphoproteome and proteome analyses emphasize the influence of phosphorylation events during the nutritional stress of *Trypanosoma cruzi*: the initial moments of in vitro metacyclogenesis. **Cell Stress and Chaperones**, v. 24, n. 5, p. 927–936, 2019.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251–260, 1997.

MA, B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 20, p. 2337–2342, 2003.

MARCHINI, F. K. et al. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 22 set. 2011.

MARQUES PORTO, R. et al. Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 265–271, fev. 2002.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 838–849, 2005.

MATTIROLI, F. et al. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1182–1195, 2012.

MATZINGER, M.; MECHTLER, K. Cleavable Cross-Linkers and Mass Spectrometry for the Ultimate Task of Profiling Protein–Protein Interaction Networks in Vivo. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 1, p. 78–93, 1 jan. 2021.

MCGHEE, J. D.; FELSENFELD, G. Nucleosome structure. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 1115–1156, 1980.

MIGLIORI, V. et al. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 2, p. 136–145, 2012.

MONTGOMERY, D. C.; SORUM, A. W.; MEIER, J. L. Chemoproteomic Profiling of Lysine Acetyltransferases Highlights an Expanded Landscape of Catalytic Acetylation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 8869–8676, 2014.

MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 404–405, abr. 2020.

MORETTI, N. S.; SCHENKMAN, S. Chromatin modifications in trypanosomes due to stress. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 709–717, 2013.

MUSSELMAN, C. et al. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 12, p. 1218–1227, 2012.

NARDELLI, S. C. et al. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle,

parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, v. 118, n. 4, p. 487–499, 25 ago. 2009.

NATHAN, D. et al. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. **Genes and Development**, p. 966–976, 2006.

NELSON, C. J.; SANTOS-ROSA, H.; KOUZARIDES, T. Proline Isomerization of Histone H3 Regulates Lysine Methylation and Gene Expression. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 905–916, 2006.

NESVIZHSHKII, A. I.; VITEK, O.; AEBERSOLD, R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 4, n. 10, p. 787–797, 27 out. 2007.

NG, H. H. et al. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. **Genes and Development**, v. 16, p. 1518–1527, 2002.

NICOGLU, A. Waddington’s epigenetics or the pictorial meetings of development and genetics. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 40, n. 4, p. 1–25, 2018.

NICOGLU, A.; MERLIN, F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 66, n. March, p. 73–82, dez. 2017.

NOBERINI, R. et al. Profiling of Epigenetic Features in Clinical Samples Reveals Novel Widespread Changes in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 723, 24 maio 2019.

NUNES, V. S. et al. Trimethylation of histone H3K76 by Dot1B enhances cell cycle progression after mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 7, p. 118694, jul. 2020.

OGATA, N. et al. ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, the COOH-terminal lysine residue as modification sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 16, p. 7616–7620, 1980.

OGATA, N.; UEDA, K.; HAYAISHI, O. ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 25, p. 7610–7615, 1980.

PARODI-TALICE, A. et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1422–1432, 2007.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.

PICCHI-CONSTANTE, G. F. A. et al. Metacyclogenesis defects and gene expression hallmarks of histone deacetylase 4-deficient *Trypanosoma cruzi* cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21671, 4 dez. 2021.

PICCHI, G. F. A. et al. Post-translational Modifications of *Trypanosoma cruzi* Canonical and Variant Histones. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 3, p. 1167–1179, 3 mar. 2017.

PREUSS, U.; LANDSBERG, G.; SCHEIDTMANN, K. H. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 878–885, 2003.

PUERTA, C. et al. Acetylation of Histone H2A.H2B Dimers Facilitates Transcription. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, n. 2, 1995.

RAMOS, T. C. P. et al. Expression of non-acetylatable lysines 10 and 14 of histone H4 impairs transcription and replication in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 1–10, nov. 2015.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007.

RESPUELA, P. et al. Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15884–15892, jun. 2008.

ROMAGNOLI, B. A. A. et al. RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–17, 20 fev. 2020.

ROSENZWEIG, D. et al. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, v. 8, p. 1843–1850, 2008.

ROSÓN, J. N. et al. Histone H2B.V demarcates strategic regions in the *Trypanosoma cruzi* genome, associates with a bromodomain factor and affects parasite differentiation and host cell invasion. **bioRxiv**, p. 2021.06.08.447515, 2021.

RUTHENBURG, A. J. et al. Recognition of a Mononucleosomal Histone Modification Pattern by BPTF via Multivalent Interactions. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 692–706, maio 2011.

SABARI, B. R. et al. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 90–101, 7 fev. 2017.

SAHA, S. Histone Modifications and Other Facets of Epigenetic Regulation in Trypanosomatids: Leaving Their Mark. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 27 out. 2020.

SAKABE, K.; WANG, Z.; HART, G. W. β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 19915–19920, 2010.

SANTOS JÚNIOR, A. DE C. M. DOS et al. Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138667, 18 set. 2015.

SAUER, P. V. et al. Mechanistic insights into histone deposition and nucleosome assembly by the chromatin assembly factor-1. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 19, p. 9907–9917, 2 nov. 2018.

SCHLICHTER, A.; CAIRNS, B. R. Histone trimethylation by Set1 is coordinated by the RRM, autoinhibitory, and catalytic domains. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 6, p. 1222–1231, 23 mar. 2005.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SCHWEPPE, D. K. et al. Mitochondrial protein interactome elucidated by chemical cross-linking mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 7, p. 1732–1737, 2017.

SER, Z.; CIFANI, P.; KENTISIS, A. Optimized Cross-Linking Mass Spectrometry for in Situ Interaction Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 18, p. 2545–2558, 2019.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SHEN, H.; LAIRD, P. W. Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 38–55, mar. 2013.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHIO, Y.; EISENMAN, R. N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13225–13230, 2003.

SIDOLI, S. et al. Drawbacks in the use of unconventional hydrophobic anhydrides for histone derivatization in bottom-up proteomics PTM analysis. **PROTEOMICS**, v. 15, n. 9, p. 1459–1469, maio 2015.

SIDOLI, S. et al. Complete Workflow for Analysis of Histone Post-translational Modifications Using Bottom-up Mass Spectrometry: From Histone Extraction to Data Analysis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 111, p. 1–11, 2016.

SIDOLI, S.; CHENG, L.; JENSEN, O. N. Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3419–3433, 2012.

SIEGEL, T. N. et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Development**, v. 23, n. 9, p. 1063–1076, 1 maio 2009.

STANLEY, J. S.; GRIFFIN, J. B.; ZEMPLIEN, J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 20, p. 5424–5429, 15 out. 2001.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, jan. 2000.

SUKA, N. et al. Highly Specific Antibodies Determine Histone Acetylation Site Usage in Yeast Heterochromatin and Euchromatin. **Molecular cell**, v. 8, n. 2, p. 473–479, 2001.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019.

TAN, M. et al. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 1016–1028, set. 2011.

TAN, M. et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 605–617, 2014.

TONELLI, R. R. et al. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 α is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2011.

TORO, C. G.; GALANTI, N. H 1 Histone and Histone Variants in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Cell Research**, v. 174, p. 16–24, 1988.

TORO, G. C. et al. Unambiguous identification of histone H1 in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 52, n. 4, p. 431–439, ago. 1993.

TWEEDIE-CULLEN, R. Y.; RECK, J. M.; MANSUY, I. M. Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 4966–4982, 2009.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731–740, 27 set. 2016.

TYANOVA, S.; COX, J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In: **Cancer Systems Biology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Routledge, 2018. v. 1711p. 133–148.

UNOKI, M. et al. Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6053–6062, mar. 2013.

VERMEULEN, M. et al. Selective Anchoring of TFIID to Nucleosomes by Trimethylation of Histone H3 Lysine 4. **Cell**, v. 131, p. 58–69, 2007.

VILLANOVA, G. V. et al. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. **International Journal for Parasitology**, v. 39,

n. 6, p. 665–673, maio 2009.

VISOCHÉK, L. PolyADP-Ribosylation Is Involved in Neurotrophic Activity. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7420–7428, 10 ago. 2005.

VOIGT, P. et al. Asymmetrically Modified Nucleosomes. **Cell**, v. 151, n. 1, p. 181–193, set. 2012.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **Endeavour**, v. 1, n. 1, p. 18–20, fev. 1942.

WEDEL, C. et al. GT-rich promoters can drive RNA pol II transcription and deposition of H2A.Z in African trypanosomes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 17, p. 2581–2594, 12 set. 2017.

WELTE, M. A. Proteins under new management: lipid droplets deliver. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 363–369, ago. 2007.

WHO. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease)**. Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 9 nov. 2021.

WIDOM, J. Toward a unified model of Chromatin Folding. **Annual Review of Biophysical Chemistry**, v. 18, p. 365–395, 1989.

WILSON, J. P. et al. Proteomic Analysis of Fatty-acylated Proteins in Mammalian Cells with Chemical Reporters Reveals S-Acylation of Histone H3 Variants. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 3, p. M110.001198, mar. 2011.

WIŚNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; MANN, M. N ϵ -Formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 2, p. 570–577, 2008.

WITTIG, S. et al. Cross-linking mass spectrometry uncovers protein interactions and functional assemblies in synaptic vesicle membranes. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 858, 8 dez. 2021.

WU, L. et al. The RING Finger Protein MSL2 in the MOF Complex Is an E3 Ubiquitin Ligase for H2B K34 and Is Involved in Crosstalk with H3 K4 and K79 Methylation. **Molecular Cell**, v. 43, n. 1, p. 132–144, 2011.

WYSOCKA, J. et al. WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development. **Cell**, v. 121, p. 859–872, 2005.

WYSOCKA, J. et al. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. **Nature**, v. 442, n. July, p. 2–6, 2006.

XIE, Z. et al. Lysine Succinylation and Lysine Malonylation in Histones. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 100–107, 2012.

XU, L. et al. Crosstalk of homocysteinylation, methylation and acetylation on histone H3. **The Analyst**, v. 140, n. 9, p. 3057–3063, 2015.

YAMADA-OGATTA, S. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 171–179, 2004.

YANG, X. et al. Recognition of hyperacetylated N-terminus of H2AZ by TbBDF2 from *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 22, p. 3817–3830, 15 nov. 2017.

YU, C. et al. CELLO2GO: A Web Server for Protein subCELLular LOcalization Prediction with Functional Gene Ontology Annotation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99368, 9 jun. 2014.

ZHANG, D. et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. **Nature**, v. 574, n. 7779, p. 575–580, 24 out. 2019.

ZHANG, J. et al. PEAKS DB : De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 1–8, 2012.

ZHANG, N. et al. Landscapes of Protein Posttranslational Modifications of African Trypanosoma Parasites. **iScience**, v. 23, n. 5, p. 101074, maio 2020.

ZHANG, Q. et al. Elevated H3K79 homocysteinylation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defects. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3436, 24 dez. 2018.

ZHANG, T.; COOPER, S.; BROCKDORFF, N. The interplay of histone modifications – writers that read. **EMBO reports**, v. 16, n. 11, p. 1467–1481, 16 nov. 2015.

ZHAO, Y.; GARCIA, B. A. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 9, 1 set. 2015.

ZHAO, Y.; JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 20, p. 4632–4641, 1 out. 2009.

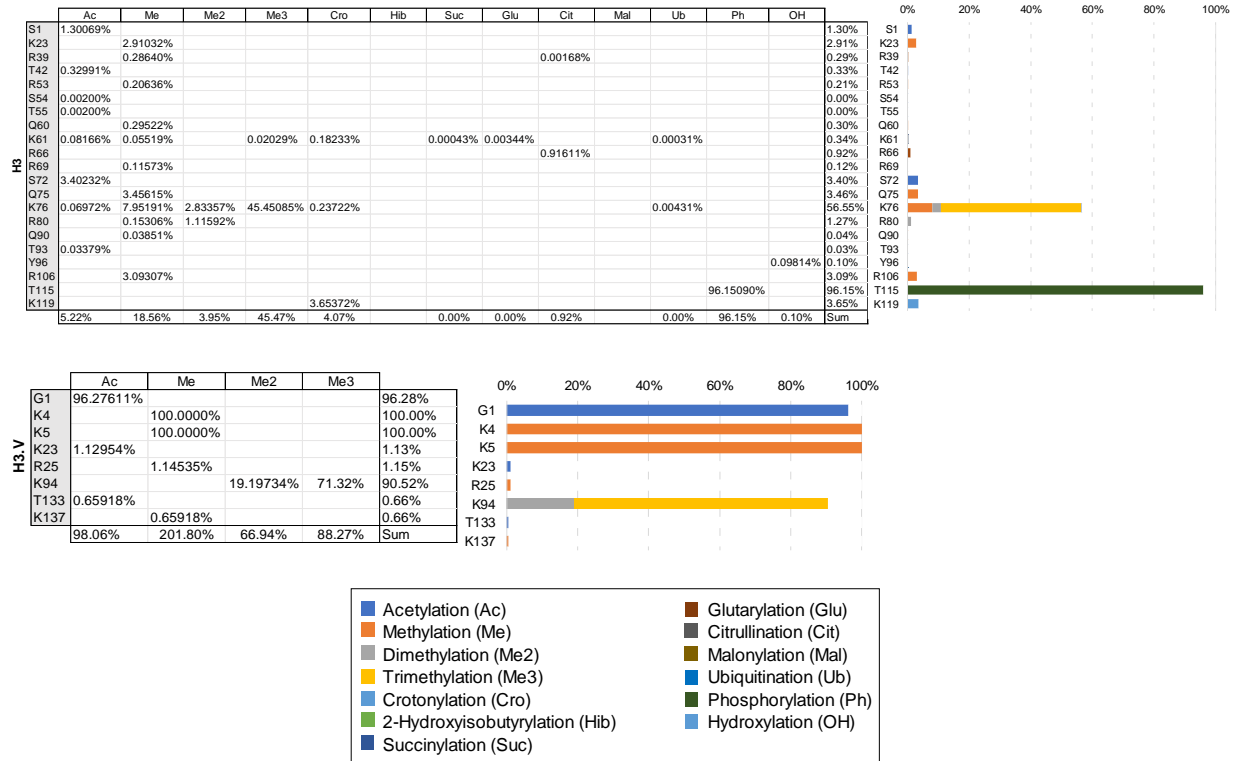
ZHENG, Q. et al. Reversible histone glycation is associated with disease-related changes in chromatin architecture. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1289, 20 dez. 2019.

ZOU, C. et al. Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholine Acyltransferase I (Lpcat1) Catalyzes Histone Protein O-Palmitoylation to Regulate mRNA Synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 28019–28025, ago. 2011.

ANEXOS

Capítulo 1

FIGURA A1 – CORREÇÕES PONTUAIS DA FIGURA 5 DO ARTIGO



Fonte: o autor (2021). Na figura 5 do artigo (capítulo 1), dois detalhes pontuais foram observados posteriormente à sua publicação, trata-se da cor da barra que representa fosforilação em H3T115, como pode ser visto na TABELA trata-se de uma fosforilação (95,15% de ocupação). A cor correta da fosforilação aparece aqui corrigida. Outro detalhe foi a correção do cálculo do sítio H3.VK94. Na figura do artigo, as abundâncias de me2 e me3 estão separadas, a ocupação correta de cada PTM neste sítio está mostrada aqui, sendo 19,19% (me2) e 71,32% (me3). No artigo não foi feita nenhuma inferência ou discussão a cerca desses sítios específicos, não comprometendo os resultados mostrados no mesmo.

Capítulo 1

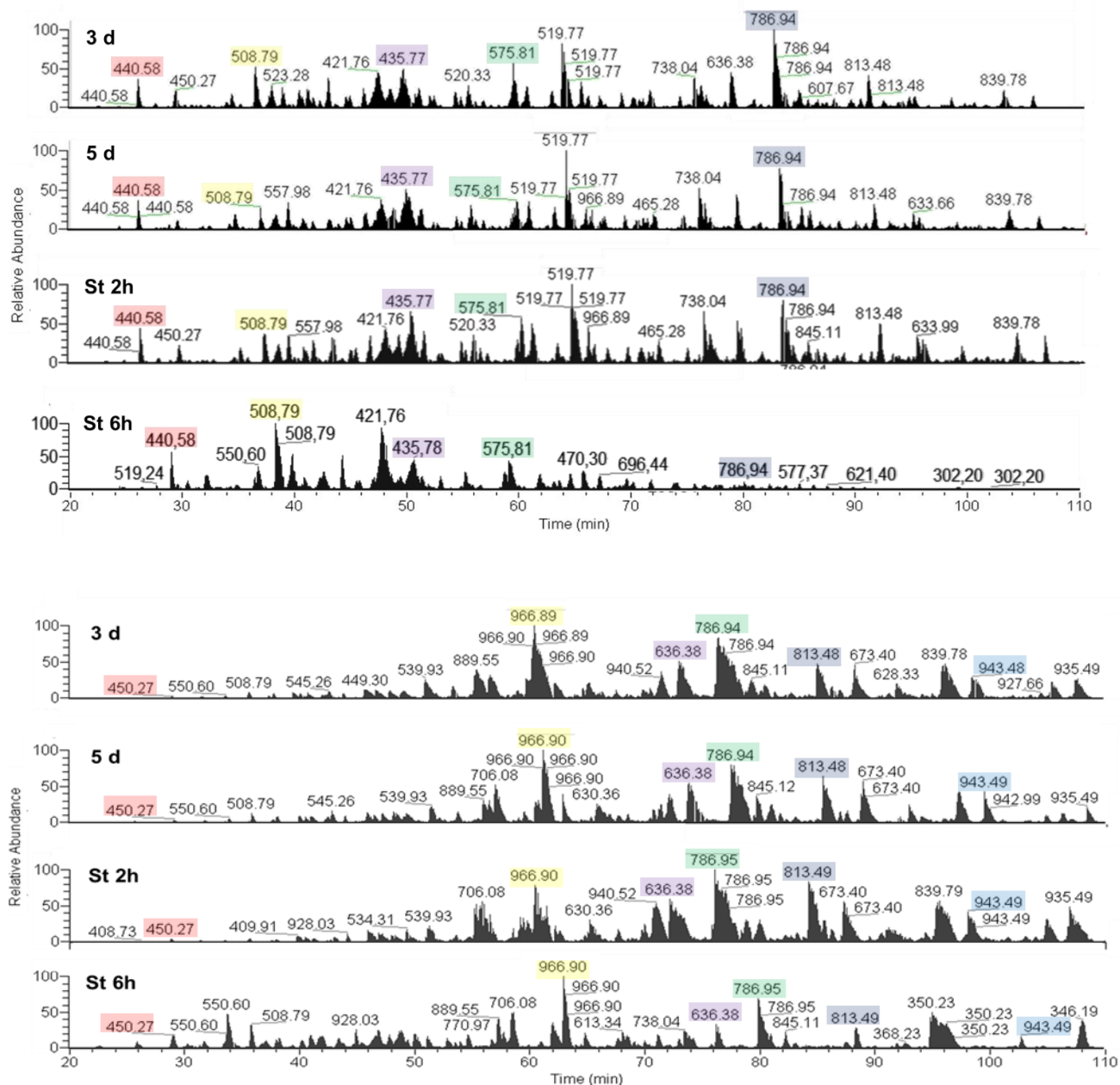
FIGURA A2 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS HISTONAS H3 E H3.V DE *T. cruzi*

<i>TcDm 28c_BCY84_02640_H3</i>	1SRSKETARSKRTITSKKSKKAP...KAPGAAT	29
<i>TcDm 28c_BCY84_18558_H3.V</i>	1	GSLKKVASVEKHSAFSSASQLPKPRKNLASRKIHTEGRIVAKKESVS	47
<i>TcDm 28c_BCY84_02640_H3</i>	30	GVKHAQRRWRPQTVLREIRQFQRSTDLLQKAPFQRLVREVSQAQK	76
<i>TcDm 28c_BCY84_18558_H3.V</i>	48	AGTRKRHRWRPQTVLREVRRYQSSTGFLIAKAPFRRLVREIVSNLK	94
<i>TcDm 28c_BCY84_02640_H3</i>	77	EGLRFQSSAILAAQEATESYVVSLLADTNRACIHSGRVTIQPKDIHL	123
<i>TcDm 28c_BCY84_18558_H3.V</i>	95	DSFRMSATCVEALQESTELYVTSVLADANLCTLHANRVTVYPKDIQL	141
<i>TcDm 28c_BCY84_02640_H3</i>	124	ALCLRGERA	132
<i>TcDm 28c_BCY84_18558_H3.V</i>	142	ALKLRGERL	150

Fonte: o autor (2021). Alinhamento Clustal Omega (1.2.4) das sequências da H3 e H3.V de *T. cruzi* Dm28c, os sítios H3K76 e H3.VK94 são alinhados entre as sequências.

CAPÍTULO 2

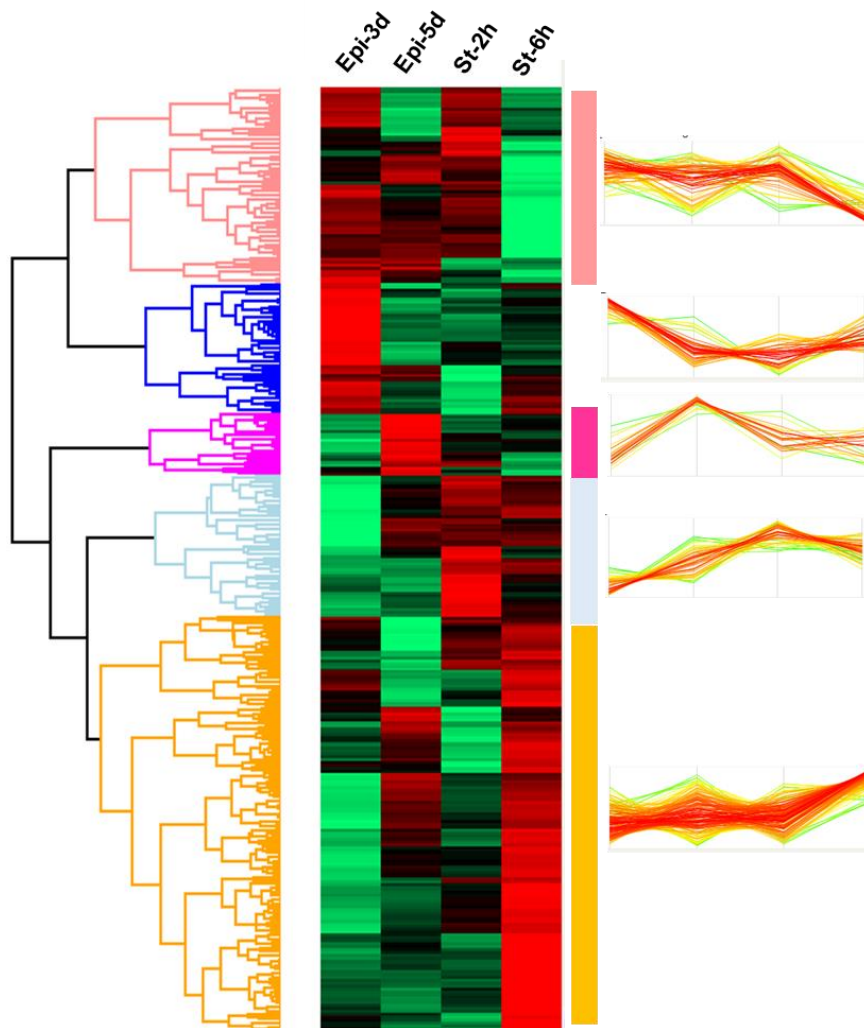
FIGURA A3 - PERFIL CROMATOGRÁFICO REPRESENTATIVO DOS PEPTÍDEOS DE EPIMASTIGOTA EM FASE EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E SOB ESTRESSE NUTRICIONAL EM GeLC-MS/MS e LC/MS/MS



FONTE: o autor (2020). Para cada condição é apresentado o perfil cromatográfico da eluição dos peptídeos de uma réplica representativa de epimastigota em fase exponencial (3d), fase estacionária (5d) e sob estresse nutricional por 2 horas (St 2h) e 6 horas (St 6h). Em destaque (caixas coloridas) estão exemplos de picos mostrando a reprodutibilidade da eluição dos peptídeos nas diferentes condições do experimento GeLC-MS/MS (superior) e LC-MS/MS (inferior).

CAPÍTULO 2

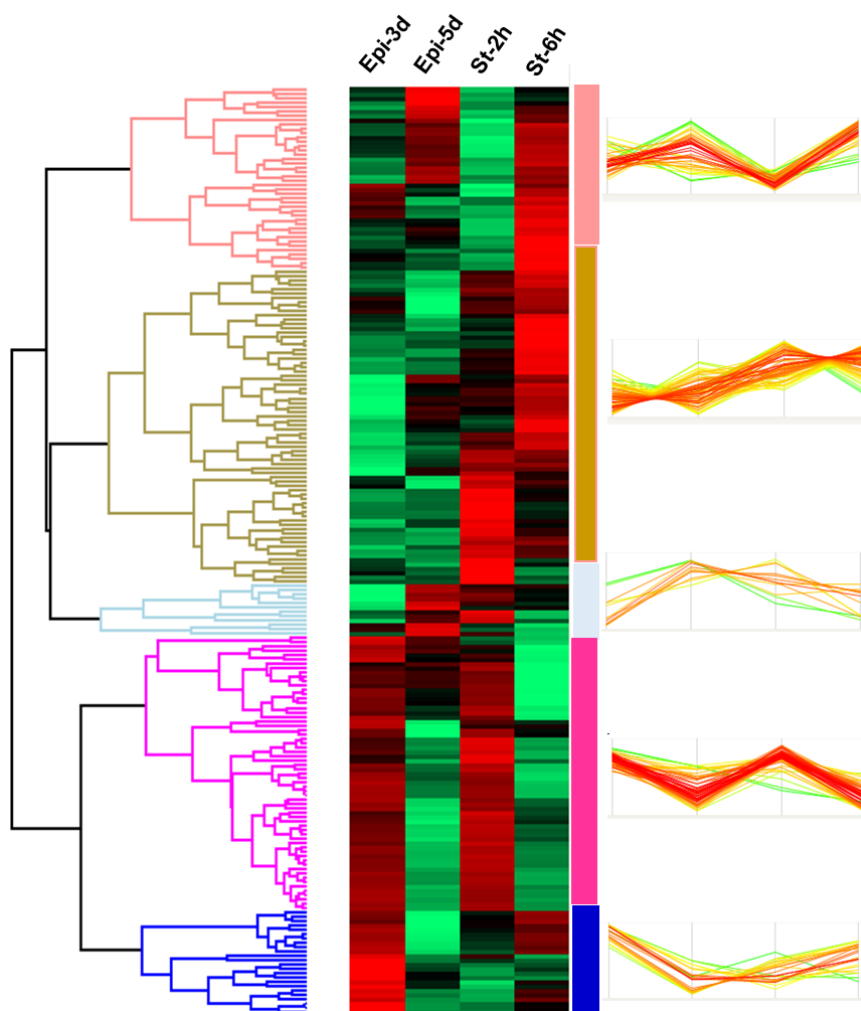
FIGURA A4 – GRUPOS DE PEPTÍDEOS MODULADOS NA ABORDAGEM LC-MS/MS



Fonte: o autor (2021). Heat map mostrando a clusterização hierárquica dos 334 peptídeos da estratégia LC-MS/MS. Intensidade (\log_2) (z-score).

CAPÍTULO 2

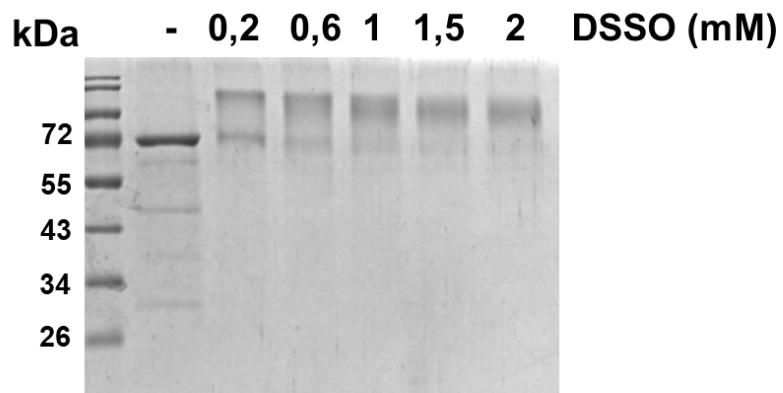
FIGURA A5 - GRUPOS DE PEPTÍDEOS MODULADOS NA ABORDAGEM GeLC-MS/MS



Fonte: o autor (2021). Heat map mostrando a clusterização hierárquica dos 213 peptídeos da estratégia GeLC-MS/MS. Intensidade (log₂) (z-score).

CAPÍTULO 3

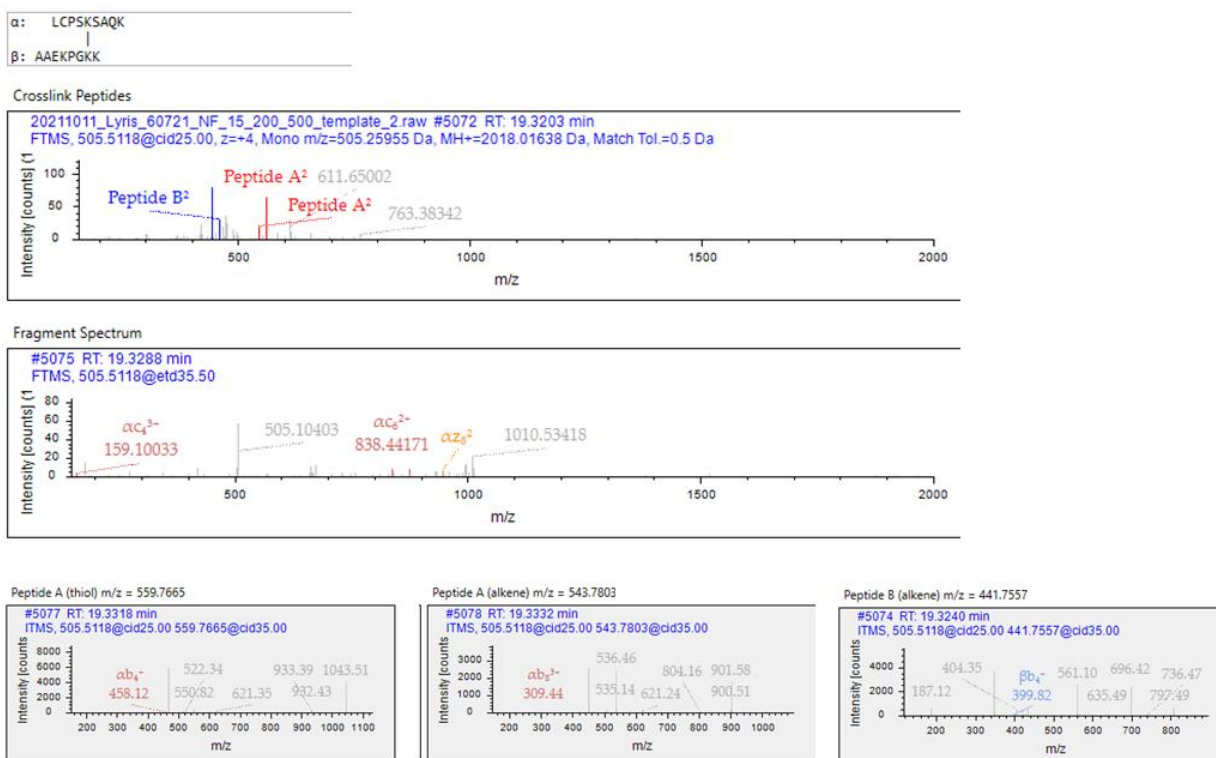
FIGURA A6 - *CROSSLINKING* DE BSA COM CONCENTRAÇÃO CRESCENTE DE DSSO



Fonte: o autor (2019).

CAPÍTULO 3

FIGURA A7 – EXEMPLO DE ESPECTRO DE *CROSSLINK* IDENTIFICADO EM AMOSTRA DE NÚCLEO DE *T. cruzi*



Fonte: o autor (2021). Exemplo de espectro de *crosslink* identificado mostrando os fragmentos MS2 e MS3. Espectros extraídos do XlinkX v2.5 a partir dos resultados de XL-MS.