

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA GALVÃO FERRARINI

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO DE GRÂNULOS DE *TcDHH1* NA
REGULAÇÃO DA ESTABILIDADE E TRADUÇÃO DE mRNAs ALVOS EM
*TRYPANOSOMA CRUZI***

CURITIBA

2012

MARIANA GALVÃO FERRARINI

**INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO DE GRÂNULOS DE *TcDHH1* NA
REGULAÇÃO DA ESTABILIDADE E TRADUÇÃO DE mRNAs ALVOS EM
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e realizada no Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná.

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila

Coorientadora: Dra. Fabíola Barbieri Holetz

**CURITIBA
FEVEREIRO 2012**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

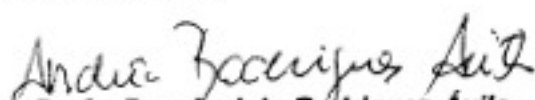
Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

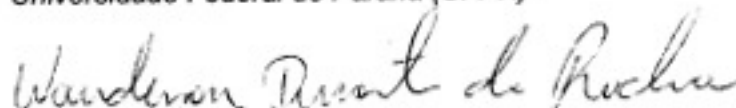
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dra. Andréa Rodrigues Ávila
Orientadora e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas (ICC)



Prof. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

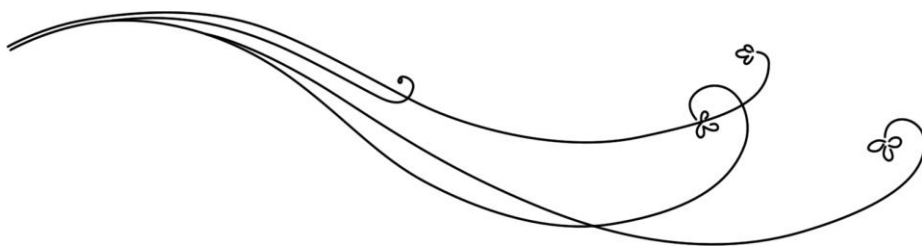
Após arguir a mestrand **Mariana Galvão Ferrarini**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Investigação da Função de Grânulos de TcDHH1 na Regulação da Estabilidade e Tradução de mRNAs Alvos em Trypanosoma cruzi"**, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2012



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Mat. 185795

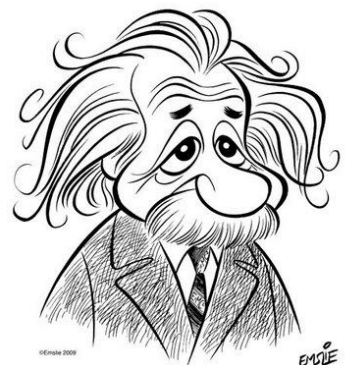
**Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais e
ao meu amor, para quem dedico todas as minhas conquistas.**



“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

“O importante é nunca parar de questionar.”

(Albert Einstein)



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer com muito carinho minhas orientadoras, **Dra. Andréa Rodrigues Ávila** e **Dra. Fabíola Barbieri Holetz**, pela postura científica inspiradora, por sempre acreditarem em mim e em meu trabalho e terem me dado o maior ensinamento de todos, o de questionar.

Ao **Dr. Samuel Goldenberg**, por ter participado ativamente de minha formação como orientador e ter me recebido de braços abertos no ICC.

A **Dra. Gisele Picchi** pelas correções criteriosas e sugestões que enriqueceram e tornaram o trabalho mais completo.

Ao **Dr. Christian Macagnan Probst**, à **Dra. Daniela Parada Pavoni**, ao **Dr. Stênio Perdigão Fragoso**, ao **Dr. Fabrício Marchini** e ao **Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz** por terem com muita paciência ajudado a sanar minhas inúmeras dúvidas e pelas sugestões e ideias durante o período deste trabalho. Ainda ao **Dr. Fabrício Marchini**, pelo auxílio envolvendo os experimentos de manuseio de animais e ao **Dr. Maurílio Soares** pela paciência, auxílio e ensino das técnicas de microscopia.

A todos os colegas e amigos que fiz durante esses anos no instituto, pelo excelente convívio, deliciosas risadas e sábias palavras de apoio quando mais precisei.

Aos amigos do **Laboratório de Regulação da Expressão Gênica** e de outros laboratórios, em especial: **Mari Serpeloni, Mila, Bia, Andréa, Pri Hira, Sharon, Mayara, Bruno, Elô, Salôê, Eliza, Gustavo, Lys, Haruo, Augusto, Pá, Liandra, Axel, Daisy, Stéph, Flá, Felipe, Newton, Gi e Luana**, por terem me mostrado que o cotidiano não precisa ser chato, desde que você tenha as pessoas certas ao seu lado.

Um agradecimento especial a meus dois grandes amigos **Fer** e **Háli**, pelo companheirismo incondicional, e pela colaboração nesse trabalho nos momentos em que eu não conseguiria fazer tudo sozinha.

À equipe técnica do ICC, **Nilson, Tânia, Sílvio** e **Vane** que, sempre dispostos a ajudar, tornaram meu trabalho muito mais fácil inúmeras vezes. À equipe administrativa, em especial à **Cris**, pela organização e bom convívio.

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro.

E acima de tudo, a todos os meus familiares e amigos pelo amor, amizade sincera, apoio e paciência.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre principalmente em nível pós-transcricional. Assim, a abundância do mRNA depende de fatores que alterem a estabilidade, localização e acesso destes mRNAs aos polissomos. Diversos estudos têm demonstrado que grânulos de mRNA, presentes em eucariotos têm papel fundamental na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional. Tais grânulos participam ativamente nos processos de estocagem, tradução e degradação do mRNA. Grânulos de estresse e *P-bodies* são tipos diferentes de grânulos de RNA, e algumas proteínas que constituem o cerne dessas estruturas, em leveduras e mamíferos, já foram identificadas em *T. cruzi*. Dentre elas, podemos citar a proteína DHH1, uma DEAD-box RNA helicase que estimula a degradação de mRNAs. Em *T. cruzi* esta proteína tem expressão constitutiva e faz parte de grânulos de RNA que estão presentes no parasita tanto em fase logarítmica de crescimento quanto nas formas submetidas a estresse nutricional, uma característica de formação semelhante aos *P-bodies*. Contudo, o conteúdo protéico dos grânulos que contém a proteína TcDHH1 em *T. cruzi*, é formado por componentes específicos de grânulos de estresse. Por isso, o foco desse estudo foi desvendar as funções de grânulos que contém DHH1 em *T. cruzi* e avaliar se teriam papel majoritário na estocagem, como grânulos de estresse ou no processamento e degradação de mRNAs, como *P-bodies*. Para isso, várias ferramentas se fizeram necessárias, desde a produção de anticorpos até a padronização de técnicas mais elaboradas. Estudos prévios em epimastigotas utilizando microarranjo de DNA identificaram mRNAs alvos da proteína TcDHH1, os quais em sua maioria representam genes estágio-específicos expressos em outros estágios do ciclo de vida do parasita. Dessa forma, para tentar desvendar se os grânulos de TcDHH1 participam da estocagem ou degradação de mRNAs, os parasitas foram tratados com drogas que inibem os processos de transcrição (actinomicina D) e de *trans-splicing* (sinefungina) e a estabilidade dos mRNAs alvos da TcDHH1 foi avaliada pela técnica de PCR quantitativa. Os dados obtidos em epimastigotas demonstram que a proteína TcDHH1 interage tanto com alvos estáveis (geralmente mais expressos em epimastigotas) quanto com alvos instáveis (em sua maior parte, mais expressos em outros estágios do ciclo de vida). Paralelamente, demonstramos a colocalização dos grânulos que contém a proteína TcDHH1 e os seus mRNAs alvo pela técnica de FISH, em epimastigotas. Além disso, a fim de elucidar melhor a composição dos grânulos de *T. cruzi*, escolhemos duas proteínas específicas de degradação de mRNAs para estudo: a exonuclease 5'-3' TcXRNA, que é regulada durante o ciclo de vida e a desadenilase TcPOP2, componente do complexo CCR4-NOT. Ambas as proteínas colocalizam parcialmente com TcDHH1 em grânulos citoplasmáticos nas formas epimastigotas, sugerindo que o destino dos mRNAs alvos desta proteína seja dependente da combinação protéica dos grânulos, corroborando a complexidade do processo de regulação da expressão gênica neste parasita.

ABSTRACT

In trypanosomatids, gene expression is regulated mainly post-transcriptionally by mechanisms involving changes in mRNA stability or access to polysomes. Recent studies have demonstrated that cytoplasmic RNA granules, present in several eukaryotes, have key role in regulation of gene expression. These granules are involved in mRNA sorting, storage and degradation and can be divided in different classes, including P-bodies and stress granules and some of the proteins that are included in the core of these structures, in yeast and mammals, have been identified in *T. cruzi*. The highly conserved DEAD-box helicase Dhh1p stimulates mRNA degradation. In *T. cruzi*, expression of DHH1 is not regulated throughout the parasite's life cycle or under stress conditions. This protein is present in polysome-independent complexes and is located to discrete cytoplasmic foci, resembling P-bodies. However, the protein content of these granules shows greater similarity to stress granules. Thus, the main focus of this study is to unravel if *TcDHH1* granules have a major role on storage (similar to stress granule) or on degradation of transcripts (similar to P-bodies). In order to perform this study, several tools were necessary, from the production of antibodies to standardization of sophisticated techniques. Previous studies in epimastigotes revealed that several mRNA targets of *TcDHH1*, identified by ribonomic microarray and confirmed by RT-PCR, codify mainly proteins that are regulated in a stage-specific manner and expressed in other stages of life cycle. In order to determine if these *TcDHH1* granules participate in storage/stabilization or degradation of mRNAs, the parasites were treated with drugs that inhibit transcription (actinomycin D) and trans-splicing (sinefungin) and the stability of target mRNAs were evaluated by quantitative PCR. The data obtained demonstrate that *TcDHH1* interacts with both stable (usually upregulated in epimastigotes) and unstable (upregulated in other stages of life cycle) transcripts. In parallel, we demonstrated the colocalization between *TcDHH1* granules and its target mRNAs in epimastigotes, by FISH. Furthermore, in order to better elucidate the granules' content in *T. cruzi*, we chose two degradation specific proteins: the 5' -3' exonuclease *TcXRNA*, which is regulated throughout the life cycle, and the deadenylase *TcPOP2*, a component of the CCR4-NOT complex. Both proteins partially colocalize with *TcDHH1* in cytoplasmic granules in epimastigotes, suggesting that the destiny of these proteins' targets is dependent on the combination with other proteins in these granules and corroborating the complexity of the regulation of gene expression in these parasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Desenho esquemático do ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 02.	O ciclo do mRNA.	24
Figura 03.	Localização da proteína TcDHH1 durante o ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	30
Figura 04.	Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway®.....	46
Figura 05.	Desenho esquemático dos vetores de destino da plataforma Gateway® disponíveis no Instituto Carlos Chagas.	47
Figura 06.	Mapa do vetor pGEM® – TEasy utilizado nas clonagens.	59
Figura 07.	Perfil eletroforético de PCR de colônias de <i>TcDHH1</i> no vetor pDEST®15 e pTcTAP.....	73
Figura 08.	Western blot de TcDHH1-GST recombinante	73
Figura 09.	Perfil eletroforético da purificação em larga escala de TcDHH1-GST recombinante.....	74
Figura 10.	Perfil eletroforético de TcDHH1-His recombinante.....	75
Figura 11.	Perfil eletroforético de TcDHH1-His recombinante purificada para estimativa de pureza e concentração.	75
Figura 12.	Western blot com antissoros não purificados contra a proteína TcDHH1.....	75
Figura 13.	Western blot com antissoros contra a proteína TcDHH1.	76
Figura 14.	Ensaio de imunofluorescência contra a proteína TcDHH1.....	76
Figura 15.	Representação esquemática do alinhamento entre TbXRNA e suas duas ortólogas correspondentes em <i>T. cruzi</i>	77
Figura 16.	Perfil eletroforético de produtos de PCR de TcXRNA	78
Figura 17.	Perfil eletroforético de PCR da minipreparação de plasmídeos de TcXRNA no vetor pDEST®17.	78
Figura 18.	Perfil eletroforético da porção 1 purificada da proteína TcXRNA recombinante..	79
Figura 19.	Western blot com antissoros contra a proteína TcXRNA e seus respectivos pré- imunes.....	80
Figura 20.	Representação esquemática do alinhamento entre proteínas ortólogas de <i>T. cruzi</i> a TbCAF1	81
Figura 21.	Perfil eletroforético de produtos de PCR do complexo CCR4-NOT.....	82
Figura 22.	Perfil eletroforético de PCR de colônias do complexo CCR4-NOT no vetor pDONR®221... ..	82
Figura 23.	Perfil eletroforético de PCR da minipreparação de plasmídeos do complexo CCR4-NOT no vetor pDEST®17.	83
Figura 24.	Western blot das populações mistas transfectantes TcDHH1-GFP e TcDHH1-TAP comparadas à linhagem selvagem (WT).....	84
Figura 25.	Imunofluorescência com populações transfectantes de TcDHH1-TAP e TcDHH1- GFP.....	84
Figura 26.	Western blot das populações mistas transfectantes TcPOP2-GFP e TcPOP2-TAP comparadas à linhagem selvagem (WT) e às linhagens transfectantes previamente confirmadas de DHH1	85
Figura 27.	Western blot do ciclo de vida da proteínas TcXRNA.....	87

Figura 28.	Imunofluorescência com população transfectante de <i>TcPOP2-GFP</i>	88
Figura 29.	Imunofluorescência com população transfectante de <i>TcPOP2-TAP</i>	88
Figura 30.	Ensaio de imunofluorescência contra a proteína <i>TcXRNA</i> em <i>T. cruzi</i>	88
Figura 31.	Imunofluorescência de população selvagem com anticorpos primários anti-Proteína A e anti-GFP.	89
Figura 32.	Ensaio de colocalização entre as proteínas <i>TcDHH1</i> e <i>TcXRNA</i> em <i>T. cruzi</i>	90
Figura 33.	Ensaio de colocalização entre as proteínas <i>TcDHH1</i> e <i>TcPOP2</i> em <i>T. cruzi</i>	90
Figura 34.	Imunoprecipitação da proteína <i>TcDHH1</i> de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento.....	91
Figura 35.	As proteínas <i>TcDHH1</i> e <i>TcALBA3</i> fazem parte de um mesmo imunocomplexo.	92
Figura 36.	Interação entre <i>TcDHH1</i> com a proteína <i>TcPOP2-TAP</i>	93
Figura 37.	Rede protéica de interações em <i>S. cerevisiae</i>	96
Figura 38.	Rede protéica de interação da proteína <i>DHH1</i> proposta para tripanossomatídeos.	101
Figura 39.	Perfil de sedimentação da proteína <i>TcDHH1</i> de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com cicloheximida.....	103
Figura 40.	Perfil de sedimentação da proteína <i>TcDHH1</i> de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com puromicina.....	104
Figura 41.	Western blot das frações obtidas por sedimentação em gradiente de sacarose (15-55%).....	105
Figura 42.	RT-PCR <i>Touchdown</i> do alvo <i>TcMASP</i> de <i>TcDHH1</i> nas frações provenientes de gradiente de sacarose	106
Figura 43.	Ensaio de FISH com sondas poli d(T) marcadas com Cy3 e FITC	109
Figura 44.	Ensaio de FISH com sondas marcadas com DIG para α -tubulina.	111
Figura 45.	Ensaio de FISH com sonda poli d(T) marcada com DIG.....	112
Figura 46.	Perfil eletroforético de produtos de PCR dos alvos de <i>TcDHH1</i>	113
Figura 47.	Perfil eletroforético de PCR de colônias dos alvos de <i>TcDHH1</i> no vetor pGEM®-TEasy.	114
Figura 48.	Colocalização da proteína <i>TcDHH1</i> com a sonda sense do mRNA alvo <i>TcAMA</i> em epimastigotas.	115
Figura 49.	Colocalização da proteína <i>TcDHH1</i> com o mRNA alvo <i>TcAMA</i> em epimastigotas.	115
Figura 50.	Colocalização entre <i>TcDHH1</i> e sonda α -sense do alvo <i>TcCYC</i> em epimastigotas.	116
Figura 51.	Colocalização da proteína <i>TcDHH1</i> com o mRNA alvo <i>TcMASP</i> em epimastigotas..	116
Figura 52.	Colocalização da proteína <i>TcDHH1</i> com o mRNA do controle negativo 1 em epimastigotas.	117
Figura 53.	Intensidade de colocalização em uma região escolhida (ROI1) para o alvo α -sense de <i>TcMASP</i>	118
Figura 54.	Ensaio de imunofluorescência contra a proteína <i>TcDHH1</i> em diferentes tempos de tratamento com a droga Actinomicina D em <i>T. cruzi</i>	120
Figura 55.	Curva padrão de PCR quantitativa do alvo <i>TcL9</i>	121
Figura 56.	Curva padrão de PCR quantitativa do alvo <i>TcCYC</i>	121

Figura 57.	Curva padrão de PCR quantitativa do alvo <i>TcAMA</i>	121
Figura 58.	Curva padrão de PCR quantitativa do alvo <i>TcMASP</i>	121
Figura 59.	Curva de decaimento do alvo <i>TcL9</i> , em epimastigotos.....	122
Figura 60.	Curva de decaimento do alvo ciclina, em epimastigotos.....	122
Figura 61.	Curva de decaimento do alvo <i>TcAMA</i> , em epimastigotos.	123
Figura 62.	Curva de decaimento do alvo <i>TcMASP</i> , em epimastigotos.....	123
Figura 63.	Histograma representando as classes de alvos de <i>TcDHH1</i> de acordo com as taxas de decaimento.....	128
Figura 64.	Quantidade de supergenes referentes aos alvos de <i>TcDHH1</i> com decaimentos rápido, médio e lento..	129
Figura 65.	Quantidade de supergenes de <i>T. cruzi</i> com decaimentos rápido, médio e lento.....	129
Figura 66.	Perfil de expressão de dois alvos estáveis de <i>TcDHH1</i> durante o ciclo de vida.....	130
Figura 67.	Perfil de expressão de dois alvos instáveis de <i>TcDHH1</i> durante o ciclo de vida.....	130
Figura 68.	Desenho esquemático demonstrando o ciclo do mRNA proposto para tripanossomatídeos com os dados até hoje obtidos.....	148

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado	42
Quadro 02.	Concentrações utilizadas para as reações de PCR.	43
Quadro 03.	Temperaturas de anelamento para PCR e amplificação de genes	43
Quadro 04.	Etiquetas de fusão disponíveis no Instituto Carlos Chagas e suas utilidades em estudos funcionais de proteínas.	47
Quadro 05.	Programa de PCR <i>Touchdown</i>	57
Quadro 06.	Iniciadores utilizados para a clonagem de alvos selecionados de <i>TcDHH1</i> no vetor pGEM-TEasy.	60
Quadro 07.	Tipos de sondas utilizadas, marcação e concentração final em solução de pré-hibridação.....	65
Quadro 08.	Iniciadores utilizados para PCR quantitativa dos alvos de <i>TcDHH1</i>	68
Quadro 09.	Iniciadores utilizados para normalização da PCR quantitativa.	69
Quadro 10.	Genes ortólogos de <i>T. cruzi</i> a <i>TbCAF1</i>	81
Quadro 11.	Proteínas selecionadas para compor a rede de interação de Dhh1p em <i>S. cerevisiae</i>	94
Quadro 12.	Lista de interações proteína-proteína utilizadas para a montagem da rede de leveduras.....	94
Quadro 13.	Proteínas selecionadas para composição da rede de tripanossomatídeos e a evidência pela qual cada interação foi descoberta.....	97
Quadro 14.	Condições testadas em cada etapa da padronização do protocolo de FISH para a linhagem Dm28c.....	107
Quadro 15.	Orientação de entrada dos insertos no vetor pGEM-TEasy®.....	114
Tabela 01.	Porcentagem de colocalização entre as sondas e a proteína <i>TcDHH1</i>	117
Tabela 02.	Parâmetros das curvas-padrão dos alvos escolhidos	122
Tabela 03.	Tabela com parâmetros de decaimento de mRNA de alguns alvos de <i>TcDHH1</i> e do controle negativo <i>TcL9</i>	127
Tabela 04.	Comparação do tempo de meia-vida calculado por qPCR e por sequenciamento massivo.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE: *AU-rich Element* (Elemento rico em AU)

ATP: adenosina tri-fosfato

BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BLAST: ferramenta de comparação de sequências em bancos de dados (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA: Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

bp: pares de base (*base pairs*)

CaCl₂: cloreto de cálcio

cDNA: DNA complementar

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Cy3: cianina 3

DAPI: *4,6-diamidino-2-phenylindole*

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitidina trifosfato

DEPC: dietil pirocarbonato

dGTP: desoxiguanosina trifosfato

DIC: contraste interferencial (*Differential Interference Contrast*)

Dm: *Didelphis marsupialis*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxiribonucleosídeo trifosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato

E-64: L-transepoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)butano

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

FC: *fold change*

FITC: *fluorescein isothiocyanate*

FISH: Hibridação *in situ* por fluorescência (*fluorescence in situ hybridization*)

FDR: *false discovery rate*

g: aceleração de gravidade

HCl: ácido clorídrico

IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná

ICC: Instituto Carlos Chagas

IFI: Imunofluorescência indireta

IgG - Imunoglobulina G

IPTG: isopropil 1 tio-β-D galactosídeo

kb: quilobase; RNA – 1000b; DNA 1000bp

KCl: cloreto de potássio

kDa: quiloDalton
kDNA: DNA do cinetoplasto
 KH_2PO_4 : dihidrogeno fosfato de potássio
LB: meio Luria-Bertani
LIT: meio infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)
M: molar
mA: miliamperagem
mg: miligrama
 MgCl_2 : cloreto de magnésio
mL: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
mRNP: ribonucleoproteína mensageira
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: fosfato dibásico de sódio heptahidratado
NaCl: cloreto de sódio
NBT: *nitro blue tetrazolium chloride*
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
ng: nanograma
nm: nanômetro
OD: densidade ótica
ORF: região de leitura aberta (*open reading frame*)
P-bodies: grânulos de processamento (*Processing bodies*)
PBS: solução salina tamponada (*phosphate buffered saline*)
PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial hidrogeniônico
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
RBP: *RNA binding protein* (Proteína de ligação ao RNA)
RNA: ácido ribonucléico
RNAi: RNA de interferencia
RNase: ribonuclease
RNP: Ribonucleoproteína
rpm: rotações por minuto
rRNA: RNA ribossomal
SDS: dodocil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS
SFB: soro fetal bovino
SSC: *standard saline-citrate*
TAU: meio urina artificial de triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)
Tris: hidroximetil aminometano

TRITC: *Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate*

Tween 20: monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

µM: micromolar

UTR: região não traduzida (*untranslated region*)

V: Volts

Grupos R	Aminoácido	Nomes Abreviados	
Grupos R alifáticos não - polares	Glicina	Gly	G
	Alanina	Ala	A
	Prolina	Pro	P
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
Grupos R aromáticos	Fenilalanina	Phe	F
	Tirosina	Tyr	Y
	Triptofano	Trp	W
Grupos R não-carregados, mas polares	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteína	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
Grupos R carregados positivamente	Lisina	Lys	K
	Histidina	His	H
	Arginina	Arg	R
Grupos R carregados negativamente	Aspartato	Asp	D
	Glutamato	Glu	E

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.2 Expressão Gênica em Tripanossomatídeos	19
1.2.1 Organização Genômica.....	19
1.2.2 Transcrição Policistrônica	19
1.2.3 Regulação da Expressão Gênica	20
1.2.4 Regulação Pós-Transcricional e Teoria dos <i>Regulons</i>	21
1.2.5 Grânulos de RNA e o Ciclo do mRNA.....	22
1.2.6 Proteína XRN1	26
1.2.7 Complexo CCR4-NOT.....	26
1.2.8 Proteína Dhh1p	28
4.2.6 Proteína TcDHH1.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
2.2.1 Análise da associação de proteínas com TcDHH1	32
2.2.2 Análise dos mRNAs alvos de TcDHH1	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Soluções e Tampões	35
3.2 Meios de cultura.....	36
3.3 Organismos modelo.....	37
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	37
3.3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
3.4 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	37
3.4.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento	37
3.4.2 Epimastigotas sob estresse nutricional	38
3.4.3 Diferenciação em tripomastigotos metacíclicos.....	38
3.4.4 Obtenção de extrato protéico de <i>T. cruzi</i> Dm28c	38
3.4.5 Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	39
3.4.6 Obtenção de RNA total de <i>T. cruzi</i>	39
3.4.7 Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção de parasitas	39
3.5 Preparo, manuseio e análise de bactérias.....	40
3.5.1 Preparação de <i>E. coli</i> DH5α e BL21(DE3) pLysS cálcio-competentes....	40

3.5.2	Transformação de bactérias cálcio-competentes	41
3.5.3	PCR de colônias.....	41
3.6	Clonagem e expressão de proteínas recombinantes em sistema heterólogo.....	42
3.6.1	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores	42
3.6.2	Reação em Cadeia Polimerase (PCR).....	42
3.6.3	Eletroforese de DNA	44
3.6.4	Purificação dos produtos de PCR	44
3.6.5	Plataforma Gateway® de clonagem.....	44
3.6.6	Obtenção de clones em vetor de entrada	48
3.6.7	Obtenção dos clones em vetor de destino	48
3.6.8	Eletroforese de proteínas	49
3.6.9	Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	49
3.6.10	Expressão e purificação de proteínas recombinantes solúveis.....	50
3.7	Ensaio Imunológicos	52
3.7.1	Produção de antissoros policlonais	52
3.7.2	Purificação dos antissoros policlonais.....	52
3.7.3	Ensaio de Western <i>blot</i>	53
3.7.4	Imunolocalização celular por microscopia de fluorescência.....	53
3.7.5	Imunoprecipitação da proteína <i>TcDHH1</i>	54
3.8	Ensaio de sedimentação em gradientes de sacarose.....	55
3.8.1	PCR <i>Touchdown</i>	56
3.9	Hibridação <i>In Situ</i> por Fluorescência	57
3.9.1	Clonagem TA de alvos de <i>TcDHH1</i>	58
3.9.2	Transcrição <i>in vitro</i> de sondas.....	60
3.9.3	Teoria da técnica de FISH.....	62
3.9.4	Protocolo de FISH padronizado	64
3.10	RT-PCR, PCR quantitativa e tempo de meia-vida	66
3.10.1	Inibição da transcrição	66
3.10.2	Transcrição reversa.....	67
3.10.3	PCR quantitativa (PCR em tempo real).....	67
3.10.4	Análise dos dados	69
3.11	Montagem da rede de interação de DHH1	70
4.	RESULTADOS.....	72
4.1	Análise do conteúdo protéico dos grânulos que contém a proteína <i>TcDHH1</i>	72
4.1.1	Clonagem e expressão de proteínas recombinante para produção de antissoros.....	72
4.1.2	Produção de linhagens de <i>T. cruzi</i> transfectantes.....	84

4.1.3	Localização celular de <i>TcXRNA</i> e <i>TcPOP2</i> em <i>T. cruzi</i>	86
4.1.4	Imunoprecipitação da proteína <i>TcDHH1</i>	90
4.1.5	As proteínas <i>ALBA3</i> e <i>TcPOP2</i> estão presentes em grânulos de <i>TcDHH1</i> em epimastigotos	91
4.1.6	Análise por bioinformática da rede de interação de <i>DHH1</i> em tripanossomatídeos.....	93
4.2	Análise dos mRNAs alvo de <i>TcDHH1</i>	102
4.2.1	O mRNA alvo <i>TcMASP</i> está presente em frações independentes de polissomos	102
4.2.2	Análise da localização celular dos mRNAs alvos por FISH.....	106
4.2.3	Análise do tempo de meia-vida dos alvos de <i>TcDHH1</i>	119
5.	DISCUSSÃO	132
6.	CONCLUSÕES	150
7.	PERSPECTIVAS	151
8.	REFERÊNCIAS	152
	APÊNDICE	165

1. INTRODUÇÃO

Os protozoários tripanossomatídeos têm sido amplamente estudados em diferentes áreas da biologia celular e molecular, imunologia, parasitologia e genética. Isso se deve ao fato de pertencerem a uma família com várias espécies patogênicas e possuírem características biológicas peculiares.

Dentre esses parasitas, os mais conhecidos pertencem aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

O gênero ***Trypanosoma*** pode ser dividido em dois grupos, com base no comportamento do parasita em seus hospedeiros (inseto vetor): **Salivaria**, na qual os parasitas se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor e migram para as glândulas salivares, sendo então transmitidos através da inoculação, como por exemplo, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rangeli*; **Stercoraria**, onde os parasitas se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro e são liberados pela excreção intestinal, como por exemplo, o *Trypanosoma cruzi* (HOARE, 1972).

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O grande interesse no estudo do *T. cruzi* se apóia na importância dos tripanossomatídeos como organismos patogênicos e biologicamente peculiares, associado ao fato de que pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação da expressão gênica destes parasitas. Além disso, não existe profilaxia, vacina ou tratamento quimioterápico eficiente contra a doença (WHO, 2006). Portanto, todo e qualquer estudo que vise melhor compreender os processos regulatórios fundamentais destes parasitas pode ajudar a identificar proteínas chave que podem, no futuro, servir de alvos para o desenho racional de novas drogas anti-tripanicidas.

Trypanosoma cruzi é o agente causador da doença de Chagas, uma tripanossomíase humana que acomete de 10 a 12 milhões de pessoas na América (Nature OUTLOOKS – Chagas Disease, 2010). Foi descrita em 1909 e amplamente estudada pelo cientista brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909). A doença apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, pode ser caracterizada por sintomas brandos (parasitemia alta e colonização de tecidos) ou graves (inflamações no coração e no cérebro). Durante a fase crônica, os sintomas podem ou não progredir para doenças cardíacas e gastrointestinais graves e, se não tratados, pode ser fatal.

O parasita apresenta um ciclo de vida complexo, com pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento, que envolve um hospedeiro intermediário inseto e um hospedeiro definitivo mamífero. Os vetores são insetos hematófagos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae.

No tubo digestivo do inseto, as formas evolutivas epimastigotas (não-infectivas e replicativas) se replicam por fissão binária e migram às porções do intestino do inseto pobres em nutrientes. Com o estresse nutricional, os parasitas se diferenciam em formas infectivas tripomastigotas metacíclicas (não-replicativas), que podem ser liberadas junto com as fezes durante o repasto alimentar do inseto. No mamífero, o parasita pode atingir a corrente sanguínea por meio de descontinuidades da pele ou mucosas. Dessa forma, eles estão livres para invadir diversos tipos celulares e se diferenciarem nas formas amastigotas (replicativas e infectivas), e posteriormente em formas tripomastigotas sanguíneos (não-replicativas e infectivas), que rompem as células e são liberadas na corrente sanguínea. Consequentemente infectam novas células ou podem ser ingeridas pelo inseto fechando o ciclo (DE SOUZA, 1984).

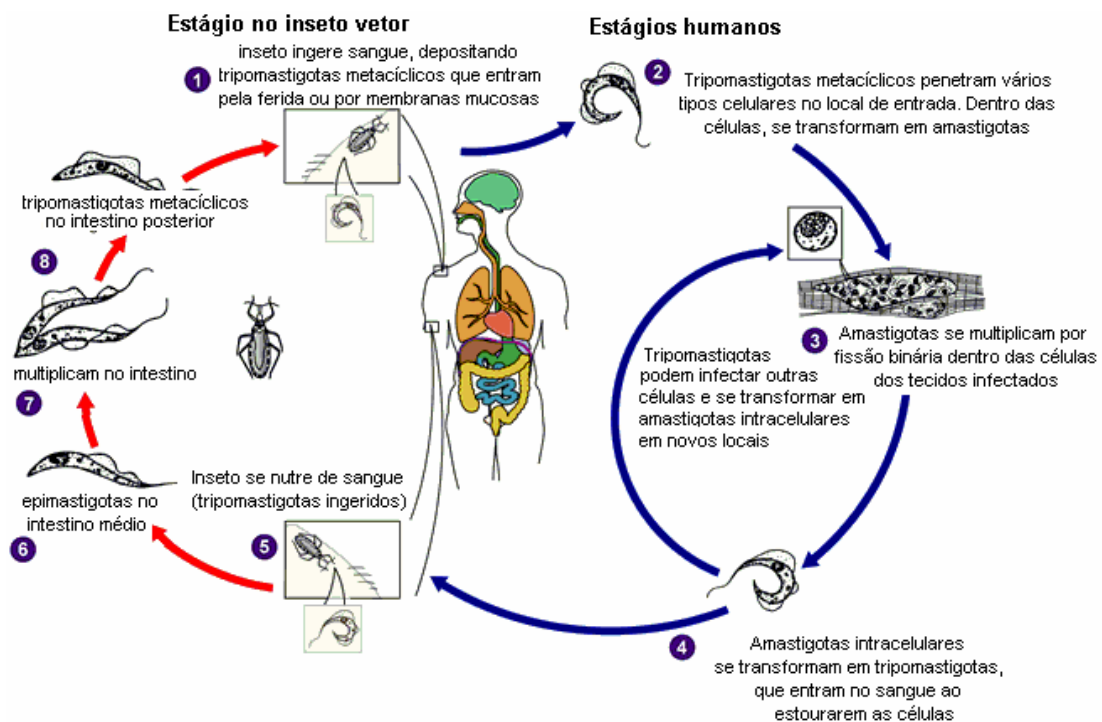


Figura 01. Desenho esquemático do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (adaptado de www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Como pode ser visto, o estudo de *T. cruzi* impõe um desafio extra para a busca de possíveis drogas para a cura da doença, se comparado a outros tripanossomatídeos: É um parasita intracelular. Isso significa que drogas contra o mesmo precisam cruzar a membrana plasmática para serem efetivas. Os parasitas do gênero *Leishmania* e *T. brucei*, permanecem no sangue e tornam-se potencialmente mais acessíveis à ação de drogas (CLAYTON, 2010).

1.2 Expressão Gênica em Tripanossomatídeos

1.2.1 Organização Genômica

A família Trypanosomatidae pertence à ordem Kinetoplastida, característica por apresentar uma organela que contém DNA e forma uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto. Tal estrutura apresenta uma condensação de DNA localizada no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (DE SOUZA, 2000). O cinetoplasto é composto por milhares de minicírculos de DNA e 50 maxicírculos de DNA concatenados entre si. Os maxicírculos codificam RNAs ribossomais (rRNA) e algumas proteínas mitocondriais enquanto que os minicírculos codificam RNAs guia para a edição do DNA dos maxicírculos (MORRIS, 2001).

Devido a diferentes padrões de histonas H1, a cromatina dos tripanossomas possui uma estrutura menos condensada do que outros eucariotos e, por este motivo, o número de cromossomos em *T. cruzi* é estimado em 30 a 40 cromossomos (CANO *et al.*, 1995).

1.2.2 Transcrição Policistrônica

Em contraste com a maior parte dos organismos eucarióticos, a maior parte dos genes de tripanossomatídeos não possuem sequências intrônicas e os genes estão organizados em *tandem*, semelhantemente a *operons*, chamados de unidades policistrônicas. No entanto, ao contrário de *operons* procarióticos, não existe nenhuma evidência de clusterização funcional nessas unidades de transcrição policistrônica. Esses pré-mRNAs policistrônicos são processados no núcleo por duas reações de clivagem a fim de gerarem unidades monocistrônicas estáveis e traduzíveis. Esse processo é feito

pelos mecanismos de *trans-splicing* seguido de poliadenilação 3' (VANHAMME & PAYS, 1995).

O *trans-splicing* se dá por meio da adição de uma sequência líder (SL) à extremidade 5' do mRNA nascente. Em *T. cruzi* a SL é derivada dos primeiros 39 nucleotídeos de um RNA de 110 nucleotídeos chamado SL RNA, o qual é transcrito a partir de um grande número de genes repetidos em *tandem* no genoma e recebe um *cap*-5' peculiar a tripanossomatídeos com estrutura *cap*-4, onde os quatro primeiros nucleotídeos após a 7-metil-guanosina são metilados (VANHAMME & PAYS, 1995). Não há evidências de que a reação de poliadenilação dependa de uma sequência consenso, mas ela parece ocorrer a uma distância conservada situada à montante do sítio de *splicing* (LEBOWITZ *et al.*, 1993).

Esse mecanismo não usual de gerar mRNAs maduros, impossibilita a regulação da transcrição gênica em nível individual de iniciação de transcrição. Promotores da RNA polimerase II são realmente elusivos nesses parasitas e análise de sequências revelou a falta de fatores de transcrição basais em seus genomas (IVENS *et al.*, 2005). Dessa forma, tais dados suportam a ideia de que a transcrição em kinetoplastídeos é constitutiva para a maior parte dos genes e que a estrutura da cromatina, em parte mediada pelas modificações de histonas, determina os pontos de iniciação e término de transcrição que parecem não ser sequência-específicos (OUELLETTE *et al.*, 2009).

1.2.3 Regulação da Expressão Gênica

A ocorrência de transcrição policistrônica, associada à ausência de *operons*, à presença de níveis distintos de mRNA originados de uma mesma unidade policistrônica mas não relacionados a uma mesma via metabólica e à ausência de promotores definidos para a RNA-polimerase II nesses organismos, indicam que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente, se não exclusivamente, por mecanismos pós-transcricionais, majoritariamente citoplasmáticos, que podem incluir processamento, degradação e eficiência de tradução dos mRNAs e processamento, modificação e estabilidade das proteínas (CLAYTON, 2002; HAILE & PAPADOPOULOU, 2007; HOLETZ 2008).

Em células de mamíferos a degradação rápida de mRNAs que codificam citocinas e reguladores do ciclo celular é crítica para a regulação da resposta imune e do

crescimento celular. Esses mRNAs contêm elementos ricos em AU (*AU-rich elements*, AREs) nas suas regiões 3'-UTR (3'UTR, 3'-*untranslated regions*). Os elementos ARE são reconhecidos por proteínas regulatórias que estabilizam ou desestabilizam os mRNAs pela inibição ou ativação da desadenilação. Subsequentemente, mRNAs que contêm AREs são degradados tanto pelas vias 3'-5' quanto 5'-3' (STOECKLIN *et al.*, 2006). Proteínas que ligam esses AREs e influenciam a taxa de degradação desses mRNAs possuem domínios de reconhecimento de RNA (RRM, *RNA recognition motif*) como dedos de zinco CCCH ou domínios KH (BARREAU *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstraram que as sequências 3'UTR têm papel fundamental no controle da estabilidade e eficiência de tradução dos mRNAs de tripanossomatídeos (HAILE & PAPADOPOULOU, 2007). Em alguns casos, regiões específicas dentro das 3'UTRs foram descobertas como elementos *cis* de regulação pela análise de sua deleção em sistemas de genes repórter, sendo que algumas delas incluem elementos ricos em U ou AU (CLAYTON & SHAPIRA, 2007).

1.2.4 Regulação Pós-Transcricional e Teoria dos *Regulons*

Em eucariotos, muitos mRNAs são corregulados por uma ou mais *RNA binding proteins* (RBPs) sequência-específicas que orquestram o *splicing*, exportação, estabilidade, localização e tradução de tais mRNAs. Estas observações deram origem a um modelo no qual mRNAs que codificam proteínas funcionalmente relacionadas são coordenadamente regulados durante o crescimento e diferenciação celulares. Essa aparente coordenação, especialmente em nível de estabilidade e tradução dos mRNAs deu base para a teoria dos ***Regulons*** ou ***operons*** pós-transcricionais de mRNAs (KEENE, 2007), segundo a qual fatores *trans-acting* (que podem ser proteínas, mRNAs ou metabólitos) regulam de forma combinatorial múltiplos mRNAs de maneira coordenada, permitindo à célula respostas ágeis a mudanças ambientais (KEENE & TENENBAUN, 2002; KEENE & LAGER, 2005). Dentro destas estruturas, os elementos *trans* interagem com elementos regulatórios presentes nos mRNAs, chamados USERS (*untranslated sequence elements for regulation*). Proteínas da família Pumilio são os exemplos mais estudados de *regulons* de mRNA. GERBER e colaboradores (2004) fizeram um estudo sobre 5 membros da família PUF (PUF1-PUF5) em leveduras e

descobriram que cada uma delas se liga a subpopulações distintas de mRNAs que codificam proteínas com funções relacionadas.

Uma vez que kinetoplastidas dependem de mecanismos pós-transcricionais de regulação, *regulons* de mRNAs parecem ser bons candidatos para regulação gênica nestes organismos. ARCHER e colaboradores (2009) fizeram um estudo sobre a proteína *TbPUF9* (que estabiliza mRNAs alvos durante a intérfase no ciclo celular) onde, em ensaios de *knockdown*, transcritos alvos foram desestabilizados e tornaram as células incapazes de sair da fase G2/M. Além disso, em um estudo de transcrito em *T. brucei*, QUEIROZ e colaboradores (2009) demonstraram que os genes de tripanossomatídeos formam regulons nos quais mRNAs com funções em vias específicas ou que codificam componentes de um mesmo complexo protéico possuem padrões de regulação quase idênticos.

Dessa forma, tais dados demonstram que os mRNAs não são regulados ao acaso, por eventos aleatórios no núcleo e citoplasma, mas são membros de estruturas altamente organizadas, que possuem função desde o momento da transcrição do mRNA até a estabilidade da proteína.

1.2.5 Grânulos de RNA e o Ciclo do mRNA

O mRNA pode existir em diversos estágios no citoplasma: Podem estar em processo de tradução nos polissomos, podem estar sendo degradados ou estocados em grânulos de RNA, ou podem estar presentes em estágios intermediários entre esses processos. Os grânulos de RNA, amplamente descritos em células de mamíferos e leveduras, participam ativamente no metabolismo do RNA - estocagem e degradação (que se dá por diferentes maneiras, incluindo a retirada do *cap-5'* e a desadenilação da cauda poli-A 3' do mRNA).

Em geral, a degradação dos mRNAs em leveduras e outros eucariotos tem início com uma desadenilação que encurta a cauda poli-A 3' pela ação de enzimas como CCR4/POP2 e PAN2/PAN3. Após essa etapa, o mRNA pode ser degradado por duas vias: A primeira delas envolve a retirada do *cap-5'* pela ação das enzimas Dcp1/Dcp2 e subsequente degradação 5'-3' pela exonuclease Xrn1; e na segunda via, o transcrito pode ser degradado na direção 3'-5' pelo exossomo, um complexo de onze proteínas com diversas funções na degradação de mRNA.

Dentre as classes de grânulos de RNA podemos citar os grânulos de estresse e de processamento (*P-bodies*). Os grânulos de estresse, como o nome já denota, são formados em momentos de estresse celular e funcionam como centros de triagem dentro dos quais RNAs específicos são selecionados para estoque, podendo retornar aos polissomos ou serem eventualmente liberados para degradação. Tais grânulos contém mRNAs, proteínas da subunidade menor ribossômica e diversos iniciadores de tradução, como eIF3 e o complexo eIF4F, bem como repressores de tradução, como TIA1, TIAR, pumilio e argonauta (KEDERSHA & ANDERSON, 2002). Já os *P-bodies* podem ser vistos com alta oscilação em número durante todo o ciclo de vida da célula; são agregados citoplasmáticos de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) associados à captura e degradação de mRNAs, sendo formados em decorrência da inibição do processo de transcrição e da dissociação de polissomos. Desde mamíferos a leveduras, proteínas que fazem parte da maquinaria de degradação de mRNA estão presentes em tais grânulos. Em leveduras, os *P-bodies* são compostos primariamente por proteínas relacionadas ao complexo de desadenilação (Ccr4/Pop2/Not1) e à maquinaria de clivagem do *cap*-5' (decapping), formada pelas proteínas Dcp1/Dcp2 e seus ativadores como Dhh1p (Rck/p54 em mamíferos), Pat1p, Edc3p (Dcp3p), o complexo heptamérico Lms1p-Lsm7p e a exonuclease 5'-3' Xrn1p (COUGOT *et al.*, 2004; EULALIO *et al.*, 2007a; PARKER & SHETH, 2007). Além disso, diversas proteínas envolvidas em processos pós-transcricionais distintos têm sido descritas como componentes de *P-bodies*; componentes do exossomo não foram detectados em tais estruturas, indicando compartimentalização da degradação do mRNA no citoplasma (BRENGUES *et al.*, 2005; SHETH & PARKER, 2003).

Os grânulos de estresse e *P-bodies* compartilham algumas proteínas e interagem fisicamente entre si, eventualmente podendo até se sobreporem parcialmente (BRENGUES & PARKER, 2005; BUCHAN *et al.*, 2008; HOYLE *et al.*, 2007; revisados por BALAGOPAL & PARKER, 2009). É relevante ressaltar que drogas que estabilizam polissomos (cicloheximida) tendem a diminuir o número de grânulos, assim como drogas que desestabilizam polissomos (puromicina) tendem a aumentar o número dos mesmos.

Todos esses processos de tradução, estocagem e degradação compõem o chamado ciclo do mRNA (Figura 02). O recrutamento de repressores de tradução (como Dhh1p e Pat1p) facilita a transição do mRNA para um estado não-traducional. Segue-se então uma competição cinética entre a liberação dos mRNAs dos ribossomos, a captura

dos mRNAs pela maquinaria do decapeamento/desadenilação e a agregação em *P-bodies* ou grânulos de estresse. mRNAs complexados com a maquinaria de decapeamento podem ser degradados, agregados em grânulos de processamento ou podem retornar à maquinaria de tradução. Condições limitantes de iniciadores de tradução podem resultar na agregação dos mRNAs em grânulos de estresse, nos quais a concentração local de componentes da maquinaria de iniciação de tradução é alta. Especula-se ainda, que a propriedade de sequestro de mRNAs nestas estruturas pode servir como um sistema de “tamponamento” dinâmico que mantém constante a taxa de tradução e garante uma concentração ótima de mRNAs traduzíveis no citoplasma, uma vez que diminui a competição por fatores de tradução limitantes (BALAGOPAL & PARKER, 2009). Além disso, visto a importância dos eventos pós-transcricionais como promotores da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, é possível dizer que tais mecanismos são, muito provavelmente, necessários às rápidas mudanças de morfologia e metabolismo durante seu complexo ciclo de vida.

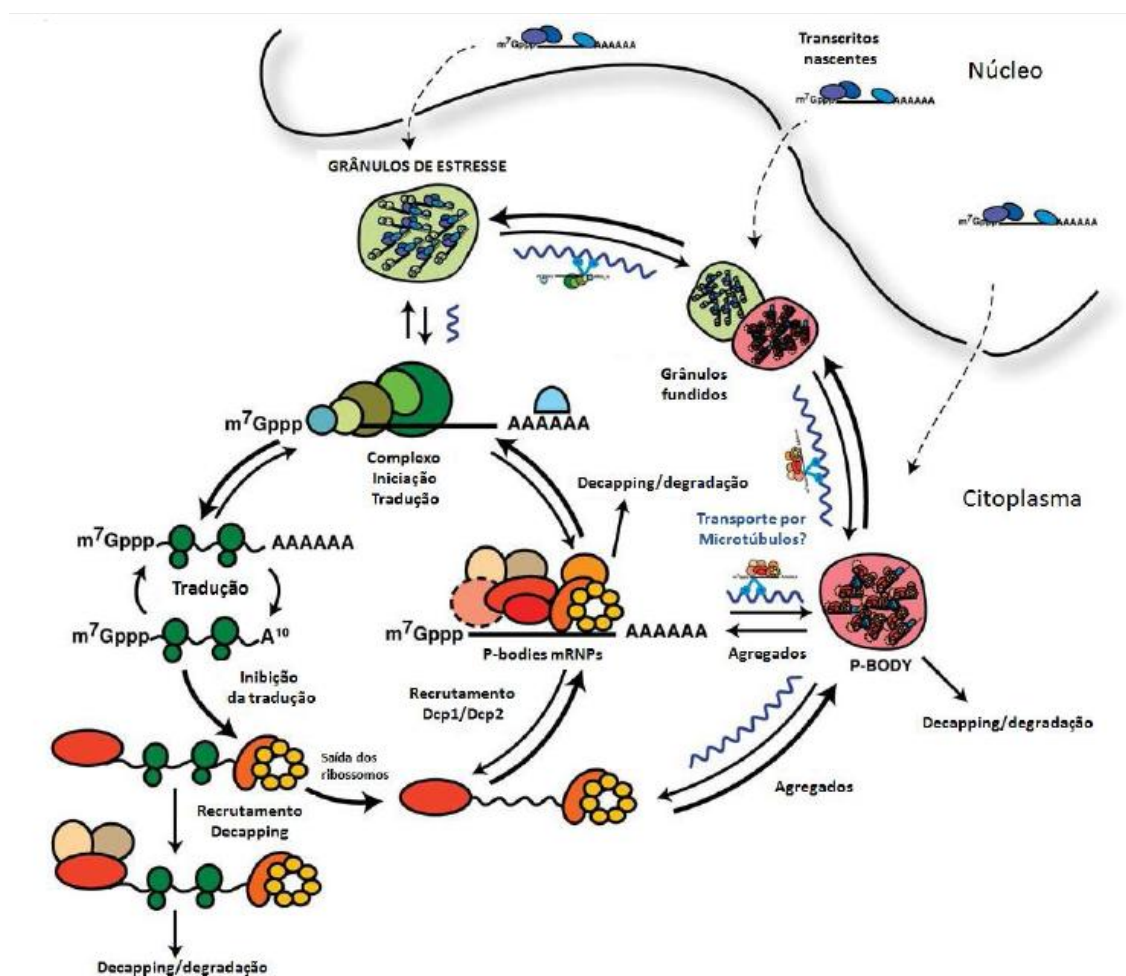


Figura 02. O ciclo do mRNA (Adaptado de: BUCHAN & PARKER, 2009).

Recentemente, grânulos de mRNAs foram identificados em tripanossomatídeos e, mais especificamente por nosso grupo, em *Trypanosoma cruzi*. Algumas proteínas constituintes de *P-bodies* de mamíferos e leveduras foram identificados em tripanossomatídeos e incluem: *TcDHH1* (HOLETZ *et al.*, 2007), *TbSCD6* (KRAMER *et al.*, 2008), *TcXRNA* (CASSOLA *et al.*, 2007), *TcPUF6* (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2005 e 2008), *TbCAF1* e *TbNOT1* (SCHWEDE *et al.*, 2007) e RNA *binding protein* *TbRBP3* (ROBLES, dados não publicados, FONTE: KRAMER *et al.*, 2008). *TcDHH1* está presente em grânulos que contém tanto RNAs quanto proteínas (HOLETZ *et al.*, 2010) e as proteínas *TcPUF6*, *TcPABP1* e *TcPABP2*, contém domínios de ligação à RNA e foram identificadas em *T. cruzi*. Elas podem estar envolvidas com a regulação da expressão gênica no parasita (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008) e associam-se a *TcDHH1* em *T. cruzi* (HOLETZ *et al.*, 2010; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008).

O número e o tamanho dos grânulos que contém *TcDHH1*, variam de acordo com o estado de tradução da célula: a montagem destes grânulos depende da disponibilidade dos mRNAs que, por sua vez, é alterada em decorrência da desmontagem ou não dos polissomos (HOLETZ *et al.*, 2007). Este comportamento é semelhante ao de *P-bodies* descritos em outros organismos (COLLER *et al.*, 2001; TUCKER *et al.*, 2001; LADOMERY *et al.*, 1997; NAKAMURA *et al.*, 2001). Apesar dessa similaridade, foi possível identificar através de experimentos de imunoprecipitação seguido por espectrometria de massa, que os grânulos de *TcDHH1* também contém proteínas características de grânulos de estresse (como proteínas de choque térmico e da subunidade ribossomal 40S), e algumas proteínas que constituem o cerne de *P-bodies* de leveduras e mamíferos, tais como proteínas do complexo *Lsm1-7*, proteínas de decapeamento (*Dcp1/Dcp2*) e a exonuclease 5'-3' *Xrn1*, não foram identificados neste experimento, evidenciando uma característica peculiar destes grânulos em *T. cruzi*. Além disso, os resultados de HOLETZ (2008) indicam que a proteína *TcDHH1* colocaliza parcialmente com diferentes proteínas, incluindo algumas envolvidas com a maquinaria da tradução (*TcL26* e *TcS7*), proteínas que possuem domínios de ligação a RNA (*TcPUF6*, *TcALBA3*, *TcZFP2*) e proteínas presentes em grânulos de estresse (*TcHSP70* e *TcPABP1* e 2). Isso pode demonstrar uma interação dinâmica com diferentes parceiros e denotar funções distintas para cada tipo de grânulo específico (HOLETZ *et al.*, 2010).

Além das proteínas já estudadas por pesquisadores do instituto, nosso trabalho visa buscar novas proteínas que possam ajudar na caracterização de grânulos distintos

de degradação, como proteínas do complexo de desadenilação Ccr4/Pop2/Not1 e a proteína ortóloga à exonuclease 5'-3' Xrn1 em tripanossomatídeos: *TcXRNA*. Dessa forma, analisaremos a possível interação de tais proteínas com *TcDHH1*, visando checar se existe diferenciação de grânulos de estocagem/degradação em tripanossomatídeos.

1.2.6 Proteína XRN1

Em leveduras, plantas e células de mamíferos, a enzima Xrn1, uma exonuclease citoplasmática 5'-3' com cerca de 175 kDa (leveduras) a 194 kDa (mamíferos), catalisa uma das vias de degradação de mRNA, após a retirada do *cap* pelas proteínas Dcp1/Dcp2 (HE *et al.*, 2003; SOURET *et al.*, 2004; STOECKLIN *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, os nocautes gênicos desta proteína são viáveis, embora tenham crescimento extremamente lento (LARIMER & STEVENS, 1990; SZANKASI & SMITH, 1996) e o mutante de *S. cerevisiae* acumula mRNAs desadenilados, que são gradualmente degradados pelo complexo do exossomo 3'-5' (HSU & STEVENS, 1993). Além disso, mutações em Xrn1p são sinteticamente letais quando combinadas com mutações do complexo do exossomo (JOHNSON & KOLODNER, 1995; ANDERSON & PARKER, 1998). Quatro homólogos de Xrn1 em *T. brucei* foram descritos: *TbXRNA*, *TbXRNB*, *TbXRNC* e *TbXRND* (LI *et al.*, 2006). *TbXRND* encontra-se no núcleo, *TbXRNB*, *TbXRNC* encontram-se no citoplasma enquanto que *TbXRNA* encontra-se nos dois compartimentos. As funções de, *TbXRNB* e *TbXRNC* não estão estabelecidas, no entanto, *TbXRNA*, *TbXRND* são essenciais para o crescimento do parasita e a depleção de *TbXRNA* aumenta a estabilidade de mRNAs altamente instáveis regulados durante o desenvolvimento (LI *et al.*, 2006; MANFUL *et al.*, 2011). Além disso, KRAMER e colaboradores (2008) demonstraram a colocalização parcial entre *TbDHH1* e *TbXRNA* em *T. brucei*, indicando que os grânulos que contém a proteína *TcDHH1* podem estar envolvidos com degradação direta de mRNAs.

1.2.7 Complexo CCR4-NOT

O complexo CCR4-NOT é uma maquinaria multifuncional e altamente conservada que controla o metabolismo de mRNA. Seus componentes foram descritos em diversos aspectos do controle do metabolismo de mRNA e da expressão de proteínas, incluindo

iniciação de transcrição, alongação de tradução, degradação de mRNA, ubiquitinação e modificação protéica (BARTLAM & YAMAMOTO, 2010). O complexo contém as mais importantes desadenilases de leveduras (TUCKER *et al.*, 2001), *Drosophila* (TEMME *et al.*, 2004), humanos (YAMASHITA *et al.*, 2005) e tripanossomatídeos (SCHWEDE *et al.*, 2008): as desadenilases CCR4 e POP2. Além disso, Parker e colaboradores (2001) mostraram que a atividade enzimática referente às proteínas Ccr4p e Pop2p (Caf1p) não ocorre no núcleo e sim em grânulos especializados no citoplasma.

O complexo existe em diversos tamanhos e consiste de pelo menos nove subunidades essenciais em leveduras: Ccr4p (*Carbon catabolite repressor 4*), Caf1p (*Ccr4-Associated factor 1*, também conhecida por Pop2, *PGK promoter directed over production*), Caf40p, Caf130p, Not1p (*General negative regulator of transcription subunit 1*), Not2p, Not3p, Not4p e Not5p. A proteína Not1p é a maior subunidade e serve como um *scaffold* para o complexo: tem como função principal ancorar todas as outras proteínas. Com tantas proteínas distintas ancoradas a diferentes porções da Not1p, o que se sugere até o presente é que o complexo não possua apenas uma função molecular. De fato, cada uma das subunidades parece possuir funções distintas, mas não essenciais. Somente a proteína Not1p é essencial em todos os organismos estudados até hoje e, uma vez que não possui atividade enzimática aparente, sugere-se que a integração das funções do complexo seja mais importante do que as atividades que cada subunidade desempenha em si (COLLART & TIMMERS, 2004).

Em *T. brucei*, o complexo foi descrito contendo TbCAF1 (TbPOP2), TbNOT1, TbNOT2 e TbNOT5. TbDHH1 interage com o complexo e nenhum ortólogo de Ccr4p foi encontrado (SCHWEDE *et al.*, 2008).

A partir de tais dados, e a partir de resultados prévios que confirmam a existência de um possível ortólogo de Not1p em *T. cruzi* (ALVES *et al.*, 2010), a investigação desse complexo será feita por meio da clonagem, expressão e produção de anticorpos de três genes selecionados, possíveis ortólogos de: Ccr4 (*TcCCR4*), Pop2 (*TcPOP2*) e Not1 (*TcNOT1*). Tais ferramentas poderão ajudar a elucidar a função dos grânulos da proteína TcDHH1, foco deste estudo.

1.2.8 Proteína Dhh1p

A Dhh1p é uma DEAD-box RNA helicase putativa que estimula a degradação do mRNA interagindo com complexos de desadenilação e decapeamento na presença de ATP (COLLER *et al.*, 2001). É uma proteína marcadora de *P-bodies* em leveduras e aumenta a eficiência das enzimas de decapeamento Dcp1/Dcp2 (COLLER *et al.*, 2001; TUCKER *et al.*, 2001). Dhh1p foi descrita por estimular a repressão da tradução pela inibição do complexo de pré-iniciação (COLLER & PARKER, 2005). Os ortólogos de Dhh1p em *Xenopus* (Xp54), em *Caenorhabditis elegans* (cgh-1) e *Drosophila* (Me31b) estão envolvidos na estocagem de mRNAs maternos traducionalmente reprimidos (LADOMERY *et al.*, 1997; NAKAMURA *et al.*, 2001). Em células de mamíferos a proteína ortóloga a Dhh1p, Rck/p54, interage com o fator de iniciação de tradução eIF4E em *P-bodies* e pode ter um papel fundamental na transição entre a tradução e a degradação de mRNAs bem como modular a interação de eIF4E com componentes da maquinaria de tradução (ANDREI *et al.*, 2005). O homólogo de Dhh1p em *Xenopus*, Xp54, que também interage com o fator eIF4E, reprime a tradução de mRNAs em ovócitos e zigotos (MINSHALL & STANDART, 2004).

Dhh1p é uma proteína de cerca de 58 kDa que contém nove motivos conservados observados em outras proteínas DEAD-box (CHENG *et al.*, 2005). Estudos estruturais e funcionais de diferentes DNA e RNA helicases sugeriram papéis gerais para cada um desses motivos na literatura (TANNER & LINDER, 2001; CARUTHERS & McKAY, 2002). De modo geral, o motivo I forma uma estrutura em *loop* (*P loop*) que acomoda os grupamentos fosfato do ATP. O motivo DEAD, por sua vez, é necessário à hidrólise do ATP (CARUTHERS & McKAY, 2002). Propõem-se que outros dois motivos, chamados de III e IV, sejam responsáveis pela ligação das funções de hidrólise do ATP e mudanças na conformação responsáveis pela atividade helicase (CARUTHERS & McKAY, 2002).

A proteína Dhh1p também foi descrita como associada à Not1p por meio da ligação com a proteína Pop2p (COLLER *et al.*, 2001) e sua função é aparentemente controlada pelo complexo CCR4-NOT em leveduras (COLLART & TIMMERS, 2004). Tal complexo, via região N-terminal de Not1p, é essencial para a manutenção de níveis celulares estáveis de Dhh1p em leveduras. (MAILLET & COLLART, 2002).

4.2.6 Proteína TcDHH1

A proteína TcDHH1, ortóloga a Dhh1p (com cerca de, é uma proteína de 47 kDa identificada em *T. cruzi* e sua expressão não é regulada durante o ciclo de vida do parasita (HOLETZ *et al.*, 2007). A proteína TcDHH1 apresenta similaridade significativa com as proteínas de seus homólogos eucarióticos *T. brucei*, *L. major*, *P. berghei*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* e *C. elegans*, com 94, 93, 83, 83 e 81%, respectivamente (HOLETZ *et al.*, 2007). O alinhamento mostrado pelos autores revela a presença dos nove motivos conservados que caracterizam os membros da família DEAD-box e que estão envolvidos nas atividades de ATPase, helicase e RNA *binding*. Embora os motivos I, II e V sejam cruciais para tais atividades, os demais parecem ser essenciais para promover a interação entre eles participando ativamente do posicionamento destes motivos com seus respectivos substratos.

Estudos preliminares feitos a partir de gradientes de sedimentação de polissomos e ensaios de dissociação de polissomos foram capazes de demonstrar que a proteína TcDHH1 está presente em complexos independentes de polissomos que variam em número em resposta ao estresse nutricional e ao tratamento com drogas que afetam o processo de tradução (cicloheximida e puomicina) (HOLETZ *et al.*, 2007). No entanto, a quantidade de grânulos de TcDHH1 é regulada de maneira estágio-específico durante o ciclo de vida do parasita. O número de *foci* e a intensidade da fluorescência são drasticamente reduzidos nas formas infectivas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas, como pode ser visto na Figura 03 (HOLETZ *et al.*, 2010).

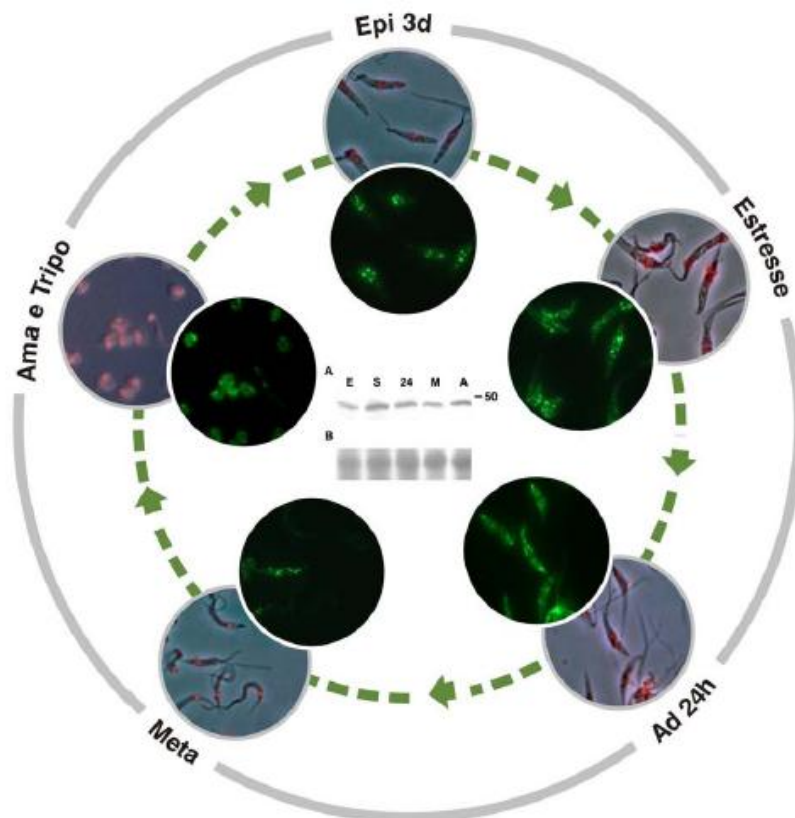


Figura 03. Localização da proteína *TcDHH1* durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. Ao centro, ensaio de Western *blot* com anticorpo anti-*TcDHH1* mostrando a expressão durante o ciclo de vida do parasita. Epi 3d: Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento; Estresse: Epimastigotos sob estresse nutricional; Ad24h: Epimastigotas em diferenciação aderidos ao substrato; Meta: Metacíclicas; Ama: Amastigotas; Tripo: Tripomastigotas (HOLETZ, 2008).

O conteúdo protéico dos grânulos de *TcDHH1* das formas epimastigotas foi elucidado a partir de análises de espectrometria de massa e apresenta semelhança em sua composição com os grânulos de estresse (HOLETZ, 2010). Nesse trabalho, também foi possível identificar diversos mRNAs que se associam a esses grânulos em epimastigotas. A maior parte desses mRNAs representam genes das famílias protéicas MASP (*Mucin Associated Surface Protein*) e mucinas, bem como de várias proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas.

A superfície do parasita durante todo seu ciclo de vida é repleta de diferentes tipos de mucinas (DI NOIA *et al.*, 1998). As MASPs, no entanto, são preferencialmente expressas nas formas tripomastigotas (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Ambas as famílias protéicas contribuem para a proteção do parasita e para o sucesso de uma infecção duradoura. Sua importância é acentuada pelo fato de que existem mais de 1400 genes

codificadores para MASPs e no mínimo 484 genes para mucinas (o que caracteriza aproximadamente 6% e 1% do genoma total de *T. cruzi*, respectivamente). A coordenação e o controle da expressão desse repertório de proteínas de superfície são essenciais para a sobrevivência do parasita em ambientes tão distintos (DI NOIA *et al.*, 1998; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009).

A partir dos estudos realizados até o momento, ainda não foi possível concluir se os grânulos de *TcDHH1* são grânulos especificamente de estocagem ou degradação de mRNAs ou ambos. Os resultados obtidos por HOLETZ e colaboradores (2010) mostraram que os mRNAs presentes nos grânulos de *TcDHH1* em epimastigotos representam, em sua maioria, proteínas cuja expressão é regulada durante o ciclo de vida, com níveis reduzidos em polissomos de epimastigotos e aumentados nas demais formas do ciclo de vida do *T. cruzi* (PAVONI *et al.*, 2005; COUGHLIN *et al.*, 2000; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; DI NOIA *et al.*, 1998), o que indica fortemente a participação da *TcDHH1* na regulação da expressão gênica neste parasita. Além disso, alguns alvos foram escolhidos e tiveram suas interações com *TcDHH1* comprovadas, por meio de RT-PCR a partir de RNAs extraídos das amostras imunoprecipitadas e do sobrenadante (contendo RNAs que não interagem com *TcDHH1*) (HOLETZ *et al.*, 2010): *amastin*, putative (*TcAMA*); *cyclin*, putative (*TcCYC*); *hypothetical protein, conserved* (*TcHYP*); *RNA binding protein 5*, putative (*TcRBP5*); *MASP*, putative (*TcMASP*) e *mucin TcMUCII*, putative (*TcMUC*). Esses foram os alvos escolhidos para estudo de tempo de meia-vida e colocalização por FISH com *TcDHH1* no presente trabalho. Como controles de alvos que não interagem com *TcDHH1* foram escolhidos dois genes presentes apenas no sobrenadante e não nas amostras imunoprecipitadas: Glucose-regulated protein 78, putative (controle negativo 1, *TcCTL1*) e (H⁺)-ATPase G subunit, putative (controle negativo 2, *TcCTL2*).

No entanto, é essencial destacar que, muito embora existam alguns grânulos exclusivos de estocagem e de degradação em leveduras e mamíferos, existem grânulos intermediários que garantem a intercomunicação e sequestro de mRNAs de um grânulo para outro (BALAGOPAL & PARKER, 2009). Dessa forma, o estudo da composição ribonucleoprotéica e da estabilidade dos mRNAs presentes nos grânulos de *TcDHH1* poderá evidenciar novos mecanismos de modulação da expressão gênica em *T. cruzi* ajudando a melhor compreender o funcionamento de tal organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a função de grânulos de RNA que contém a proteína TcDHH1 em *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Análise da associação de proteínas com TcDHH1

Caracterizar o conteúdo protéico dos grânulos de TcDHH1 em *T. cruzi* e propor uma rede de interações protéicas a partir de resultados obtidos e dados encontrados na literatura.

2.2.1.1 Imunoprecipitar a proteína TcDHH1 utilizando extrato total de proteínas e avaliar a composição protéica em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita

Meta 1: Clonagem e expressão de TcDHH1 recombinante para produção de anticorpos;

Meta 2: Produção de linhagens de *T. cruzi* transfectantes que produzam a proteína TcDHH1 fusionada a etiquetas que auxiliem no estudo da proteína e de seus grânulos;

Meta 3: Imunoprecipitação da proteína TcDHH1;

Meta 4: Avaliação da composição dos grânulos de TcDHH1 em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita por espectrometria de massas.

2.2.1.2 Avaliar a presença de proteínas específicas (Complexo CCR4-NOT, TcALBA3, TcXRNA) por western blot:

Meta 1: Produção de linhagens de *T. cruzi* transfectantes que produzam a proteína TcPOP2 fusionada às etiquetas que auxiliem no estudo da proteína e avaliem a presença da mesma em grânulos de TcDHH1;

Meta 2: Clonagem, expressão e produção de anticorpos contra a proteína TcXRNA e contra proteínas do complexo CCR4-NOT e avaliar a presença das mesmas em grânulos de TcDHH1.

Meta 3: Teste com anticorpos disponíveis no instituto referentes de outras proteínas que possam estar presentes em grânulos de TcDHH1, tais como: TcALBA3, TcZFP2.

Meta 4: Proposição de uma rede de interação da proteína TcDHH1 a partir de resultados obtidos nesta dissertação, resultados prévios e dados da literatura.

2.2.2 Análise dos mRNAs alvos de TcDHH1

Caracterizar a localização, meia-vida e perfil de tradução dos mRNAs alvos da proteína TcDHH1, visando avaliar se os grânulos possuem o papel de majoritário em estabilização/estocagem ou degradação de mRNA.

2.2.2.1 Analisar o perfil de sedimentação dos mRNAs alvo em diferentes estágios do ciclo de vida

Meta 1: Obtenção de frações (leve, não polissomal, polissomal leve e polissomal pesada) por gradiente de sacarose na presença de drogas que estabilizem ou dissociem polissomos;

Meta 2: Análise da presença dos alvos nas frações obtidas através de RT-PCR.

2.2.2.2 Analisar a localização in situ dos mRNAs alvo, por ensaios de FISH seguidos de imunofluorescência com anti-TcDHH1

Meta 1: Padronização da técnica de FISH para a linhagem de *T. cruzi* Dm28c;

Meta 2: Teste e comparação de resultados de sondas transcritas e sondas comerciais;

Meta 3: Produção de sondas transcritas, específicas de cada alvo de TcDHH1 escolhido;

Meta 4: Determinar a localização celular de cada alvo escolhido e realizar ensaios de colocalização com a proteína TcDHH1

2.2.2.3 Analisar a meia-vida dos mRNAs nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos

Meta 1: Padronização das RT-PCRs em tempo real para cada alvo escolhido;

Meta 2: Análise da dinâmica de formação dos grânulos de TcDHH1 dos parasitas tratados com as drogas por imunofluorescência indireta;

Meta 3: Análise da estabilidade (meia vida) dos mRNAs alvo de TcDHH1 por PCR em tempo real após o tratamento dos parasitas com actinomicina e sinefungina.

Meta 4: Validação dos resultados obtidos por PCR em tempo real a partir de dados de decaimento globais, disponíveis no instituto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções e Tampões

AP Buffer (tampão reação para fosfatase alcalina): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM.

Brometo de Etídio: solução 5,0 µg/ml.

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

Solução de bloqueio para Western Blot: PBS (0,27 mM; KH_2PO_4 0,15 mM; $NaHPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,43 mM; NaCl 0,137 mM), Tween 20 0,05%; leite em pó desnatado 5%.

Solução de cloreto de cálcio para bactérias cálcio competentes: $CaCl_2$ 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0;

Solução de descoloração para SDS-PAGE: Metanol 30%, ácido acético 10%, H_2O 60%.

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

Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Azul de comassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); H_2O 45%.

Solução PBS - TWEEN 20: PBS contendo Tween 20 na concentração de 0,05%.

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

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

SSC 20x: Citrato de sódio 0,3 M pH 7,0 e NaCl 3 M.

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

Tampão de crosslink: Dimetil Pielimidato (DMP) 0,02 M em tampão de lavagem.

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na_2HPO_4 0,74 mM, pH 7,5.

TF (Tampão de amostra para DNA – Ficoll 10x): Ficoll 25%, Azul de bromofenol 0,25%, Xileno Cianol 0,25%.

TG (Tampão de amostra para DNA – Glicerol 6x): Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

Tampão IMP1: KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, HEPES 10 mM pH 7,0 mM, 0,5% NP-40.

Tampão de lavagem: Trietanolamina 0,2 M pH 8,0 em PBS 1x.

Tampão de parada: Etanolamina 0,05 M pH 8,0 em PBS 1x.

Tampão de Pré-Hibridação: 35% Formamida, 2xSSC, 0,02% BSA, 40U/ml RNase OUT, 25 µg/ml tRNA de levedura, 100 µg/ml DNA de esperma de salmão.

Tampão de purificação de proteínas: TRITON 2%, NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 0,5 M, Tris – HCl pH 8,0 10 mM Uréia 2 M.

Tampão de sonicação de proteínas: NaCl 500 mM, Triton X-100 2%, Tris-Hcl pH 8,0 20 mM.

Tampão de sonicação para proteína solúvel: NaCl 500 mM, Glicerol 10%, Tris-Hcl pH 8,0 20 mM.

Tampão de solubilização de proteínas: NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Uréia pH 8,0 8 M.

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

Tampão PBS estoque (10x *Phosphate-buffered saline*): KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaHPO₄·7H₂O 4,3 mM, NaCl 137 mM

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

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

Tampão TKM: Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ 10 mM e KCl 300 mM.

Tampão TKM-P: Tris-HCl 10 mM pH 7,4; MgCl₂ mM e M KCl 500 mM.

3.2 Meios de cultura

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

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

Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): NaCl 190 mM, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2mM Tampão fosfato pH 6,0 8 mM.

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

3.3 Organismos modelo

3.3.1 *Escherichia coli*

Genótipo BL21(DE3): {pLysSTM {F⁻ *ompT hsdSB* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)}.

Genótipo DH5αTM: {F⁻ *recA1 endA1 hsdR17* (*rk⁻, mk⁺*) *supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*}.

3.3.2 *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foram utilizadas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicos do clone *Dm28c* (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1988; GOLDENBERG *et al.*, 1984). A diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos foi feita por meio da metaciclogênese *in vitro*, descrita por CONTRERAS e colaboradores (1985) com algumas modificações, a serem descritas no item 3.4.3.

3.4 Cultivo de *T. cruzi*

3.4.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento

Cultura axênica de *T. cruzi* é mantida em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino a 28°C e repicada de três em três dias com inóculo de 1×10^6 parasitas/ml. A cultura é considerada em fase logarítmica quando atinge cerca de 3×10^7 células/ml, segundo CAMARGO e colaboradores (1964).

3.4.2 Epimastigotas sob estresse nutricional

Formas epimastigotas provenientes de uma cultura ao final da fase logarítmica de crescimento, com densidade celular de aproximadamente 5×10^7 células/ml, foram submetidos à centrifugação a uma velocidade de $7000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . As células são suspensas em uma concentração final de 5×10^8 células/ml em meio TAU e incubadas a 28°C por duas horas (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.4.3 Diferenciação em tripomastigotos metacíclicos

O processo de diferenciação de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor e pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988).

Essa diferenciação pode ser obtida a partir de parasitas submetidos a estresse nutricional, mantidos a 28°C durante 96 horas em meio TAU3AAG. Durante este período, os parasitas aderem às paredes das garrafas de cultivo e ao final de três dias, pode-se perceber formas diferenciadas no sobrenadante do meio de cultura, com uma eficiência de 80 a 90% (BONALDO *et al.*, 1988). As formas diferenciadas podem ser purificadas por cromatografia de troca iônica com coluna de resina DEAE celulose (DEAE-52 Whatman), equilibrada com PBS (DE SOUZA, 1984). Isso pode ser feito uma vez que a carga líquida da membrana dos parasitas metacíclicos é mais negativa do que a de formas epimastigotas.

3.4.4 Obtenção de extrato protéico de *T. cruzi* Dm28c

Epimastigotas, epimastigotas submetidos a estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicos (2×10^8 células) foram centrifugados a $7000 \times g$ por 5 minutos a 4°C , lavados três vezes em PBS (com igual centrifugação) e homogeneizados em 150 μl de PBS e 50 μl de tampão de amostra de proteínas 4x. As amostras foram fervidas por 5 minutos e submetidas a dois pulsos de sonicação - potência 9 por 15 segundos (Homogeneizador 4710 - Cole Parmer). As amostras foram centrifugadas a $14000 \times g$ por 10 minutos e o

sobrenadante contendo extrato protéico com concentração aproximada de 10^6 parasitas/ μ l foi coletado e guardado a -20°C para posterior uso.

3.4.5 Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi*

O protocolo segue a descrição de MEDINA e colaboradores (1993), onde um total de 2×10^9 parasitas foram coletados do meio LIT por centrifugação a $7.000 \times g$ por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS e suspensas em 10 ml de tampão TELT, sem vortexar. Após 5 minutos de incubação, 10 ml de fenol - clorofórmio - álcool isoamílico foi adicionado e a suspensão foi centrifugada a $13.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo, no qual dois volumes de etanol absoluto foram adicionados. Após 5 minutos, a solução foi centrifugada a $13.000 \times g$ durante 10 minutos e o DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70%. O DNA foi deixado a 50°C para secar e foi suspenso em 50 μ l de TE. A solução foi tratada com uma concentração final de 10000 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A a 37°C por 30 minutos e foi mantida a 4°C para posterior uso.

3.4.6 Obtenção de RNA total de *T. cruzi*

Dois protocolos foram utilizados para a extração de RNA descritos a seguir: 1×10^9 parasitas foram centrifugados a $5.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e lavados em PBS. As células foram lisadas e o RNA total extraído ou com o RNeasy Mini/Midi Prep kit (QIAGEN) ou por extração com Trizol® e clorofórmio, segundo o protocolo dos fabricantes. O kit RNeasy (QIAGEN), foi utilizado de acordo com o protocolo "Animal Cells I", do manual, com o passo adicional de tratamento com DNase I na própria coluna, e eluídos com 60 μL de água.

As amostras de RNA foram quantificadas a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e estocadas a -70°C para posterior uso.

3.4.7 Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção de parasitas

A inserção de DNA exógeno pode servir para vários tipos de estudos. Os parasitas podem ser transfectados quer seja com intuito de nocautear o gene em estudo e,

portanto, estudar sua função pela ausência do gene, quer seja pelo estudo de superexpressão do produto gênico ou de proteínas fusionadas para conferir alguma característica única. Os vetores utilizados nesse trabalho serão mais bem abordados no item 3.6.5 de Material e métodos, que explica os princípios da plataforma Gateway® de clonagem.

Em cada transfecção foi utilizado um total de 5×10^8 parasitas da fase epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram coletados e centrifugados a 7.000 x g por 5 minutos, lavados 3 vezes com PBS estéril e suspensos em 1 ml de tampão de eletroporação para *T. cruzi*. Em seguida, 400 µl dessa solução foram coletados e transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm. Cerca de 50 µg de DNA exógeno foi misturado a essas células, que permaneceram em gelo por 10 minutos. A mistura foi submetida a 2 pulsos de eletroporação de 450 V e 500 µF, no eletroporador GenePulser® Apparatus (Bio-Rad). Como controle de transfecção, uma alíquota de parasitas foi eletroporada na ausência de DNA exógeno. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 ml de meio LIT e incubadas a 28 °C por 24 horas. A seleção dos parasitas ocorreu a partir da adição de 500 µg/ml do antibiótico G418. O gene que confere resistência ao antibiótico utilizado está presente nos vetores inseridos no parasita. Após cerca de 3 a 4 dias, a cultura foi diluída na proporção 1:4 de meio LIT contendo 500 µg/ml de G418. Essas culturas foram cultivadas com passagens regulares até que a cultura controle não fosse mais viável (inibição total do crescimento), o que levou cerca de 20 a 30 dias.

3.5 Preparo, manuseio e análise de bactérias

3.5.1 Preparação de *E. coli* DH5α e BL21(DE3) pLysS cálcio-competentes

Para o preparo de células competentes, foi utilizado o método utilizando cloreto de cálcio descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001). Uma colônia isolada foi inoculada em 5 ml de meio LB com antibiótico referente à sua resistência. Esse pré-inóculo foi incubado por 16 horas sob agitação de 220 rpm a 37°C. Um inóculo foi preparado em uma diluição 1:100 do pré-inóculo e incubado sob agitação constante até que atingisse a fase exponencial de crescimento (na qual a densidade óptica a 600 nm está entre 0,4 e 0,6). A

cultura foi centrifugada a $4000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e o sedimento bacteriano foi suspenso em 50 ml de solução gelada de cloreto de cálcio e mantido em gelo por 30 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada e em seguida o sedimento bacteriano foi suspenso em 2 ml da solução de cloreto de cálcio com adição de 10% de glicerol. As células foram alíquotadas em tubos de centrífuga de 1,5 ml e mantidas no gelo seco por aproximadamente duas horas. Em seguida, puderam ser colocadas a -70°C para posterior uso.

3.5.2 Transformação de bactérias cálcio-competentes

DNA exógeno contendo genes específicos a serem estudados foram inseridos em bactérias tanto para amplificação dos plasmídeos contendo os genes como para expressão heteróloga de proteínas recombinantes. Os plasmídeos selecionados foram incubados com 50 μl da suspensão de *E. coli* cálcio-competente por 30 minutos no gelo. Após, as células foram submetidas a choque térmico: 42°C por 2 minutos, seguido de 2 minutos em gelo. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio LB e a suspensão foi incubada a 37°C sob agitação constante por uma hora. Alíquotas de 100 μl e 900 μl foram semeadas em meio LB sólido contendo antibiótico de acordo com a resistência conferida pelo vetor utilizado na transformação. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas e, após esse período, quando apareceram colônias isoladas, foi possível analisar a clonagem através de PCR de colônias.

3.5.3 PCR de colônias

Colônias selecionadas das placas foram coletadas e misturadas em 10 μl de água ultra pura, sendo utilizado 1 μL dessa suspensão para a reação. Foram acrescentados aos tubos de 0,2 ml os reagentes para uma reação de PCR juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores para cada gene escolhido, em um volume total de 20 μl . A temperatura e tempo de anelamento e extensão foram padronizados e otimizados para cada par de oligonucleotídeos iniciadores devido às características intrínsecas dos mesmos e ao tamanho do fragmento que foi amplificado.

3.6 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes em sistema heterólogo

3.6.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

As sequências dos genes previamente descritos (IDs encontram-se no Quadro 01) foram analisados e oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um foram desenhados com auxílio do programa Primer-Select (Lasergene, DNA Star) e da plataforma primer-blast online (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>) e estão listados no Quadro 01:

Gene	ID (TryTrip)	Iniciador	Sequência	Amplicon (bp)	Proteína (kDa)
TcDHH1	Tc00.1047053506959.30	F R	5'CACCATGTCTTTGGAAGACGACTG3' 5'TGCGGCGTAGAGTTCAG3'	1221	47
TcPOP2	Tc00.1047053511827.60	F R	5'ATGTCAAACACATGGGATTTTATGGAC3' 5'GCCCTTCACCGAGTTGTTGAGC3'	1239	47
TcCCR4	Tc00.1047053504073.10	F R	5'ATGTATTATAGAGAAATGGCTAAGTCTTC3' 5'TGAGCTGCGTGGGAGAAT3'	1626	62
TcNOT1	Tc00.1047053509247.30	F1 R1	5'GGAAGCGATGAAACAAGTGGAA3' 5'CAAGGGTGAGGCTGAATGATG3'	2400	89
		F2 R2	5'GAGAAACCGCCAAGTAAAGAG3' 5'ACCCGTAATCATATTGGAAATGT3'	2028	78
		F3 R3	5'GATGCGATGAAACAAGTGGAA3' 5'CAAGGGTGAGGCTGAATGATG3'	2322	88
TcXRNA	Tc00.1047053505939.89	F1 R1	5'GGAGTTCCAAAGTTTTTCGGTG3' 5'TACAAATTCATCGGCTTTACGGT3'	792	30
	Tc00.1047053507817.80	F2 R2	5'GTGCGCCGGCAGGTATTT3' 5'AATTTCCCGCGGGACAGTA3'	2409	93

Quadro 01. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene selecionado bem como tamanho do amplicon (bp) e tamanho aproximado do produto protéico em kDa.

3.6.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

Os genes foram amplificados através da técnica de PCR, utilizando diversas enzimas disponíveis. As concentrações dos reagentes e condições de amplificação foram estabelecidas de acordo com as recomendações do fabricante da enzima, sujeitas a

alterações na temperatura de anelamento para obtenção de melhores resultados. O Quadro 02 mostra a concentração ótima de cada reagente para cada enzima utilizada.

	Concentração Estoque	Concentração Final		
		Taq IBMP	Taq Platinum® Pfx	Platinum® Taq High Fidelity
Tampão	10x	1x	1x	1x
MgCl₂	50 mM	1,5 mM		
MgSO₄	50 mM		10 mM	2 mM
dNTP	10 mM	0,3 mM	0,3 mM	0,2 mM
Primers	10 pmol/μl	0,5 pmol/μl	0,5 pmol/μl	0,5 pmol/μl
Taq		0,05 U/μl	0,25 U/μl	0,1 U/μl
DNA	Quantidade e fontes variáveis			

Quadro 02. Concentrações utilizadas para as reações de PCR.

3.6.2.1 Amplificação dos genes por PCR a partir de DNA genômico

100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 50 μl com a enzima Platinum® Taq High Fidelity DNA Polimerase. A ciclagem consistiu de um passo inicial de três minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C (ver Quadro 03 para temperaturas de anelamento de cada gene) e dois minutos a 68 °C.

Gene	Iniciador	Temperatura de anelamento (°C)
<i>TcDHH1</i>	F R	55
<i>TcPOP2</i>	F R	57
<i>TcCCR4</i>	F R	51
<i>TcNOT1</i>	F1 R1	55
	F2 R2	51
	F3 R3	52
<i>TcXRNA</i>	F1 R1	55
	F2 R2	55

Quadro 03. Temperaturas de anelamento para PCR e amplificação de genes

3.6.3 Eletroforese de DNA

As amostras de DNA dos diversos experimentos realizados foram diluídas em TF ou TG e aplicadas em gel de agarose 1% ou 2% ou em gel de poliacrilamida para DNA 6% ou 7%, de acordo com o tamanho do DNA amplificado.

Cubas de eletroforese horizontal de diversos tamanhos foram utilizadas para a corrida de géis de agarose, e cubas verticais para géis de poliacrilamida. As corridas foram feitas imersas em tampão TBE, a 100V por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em câmera *Kodak Digital Science*, com o *software* KDS 1.D.

3.6.4 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com PEG (30% PEG 8000, 30 mM MgCl₂, Gateway/Invitrogen). Ao volume de reação de PCR foram adicionados 4 volumes de tampão TE e 2 volumes de PEG. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 14000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento obtido contendo o DNA purificado foi incubado a 70 °C durante 15 minutos. O DNA seco foi reidratado em 10 µl de água ultra-pura, quantificado por meio do equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e estocado a -20°C para posterior uso.

3.6.5 Plataforma Gateway® de clonagem

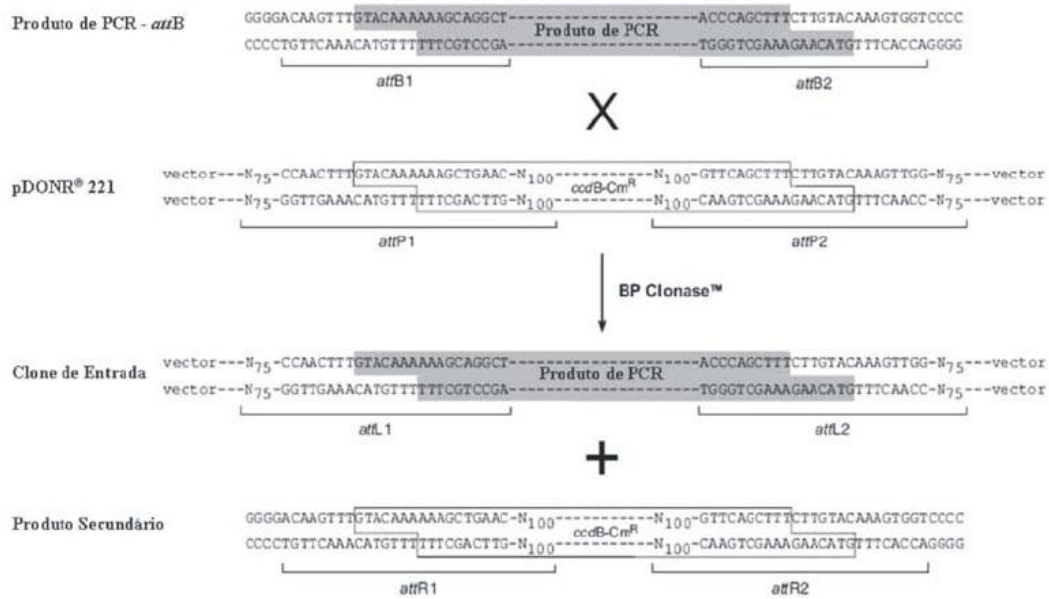
O sistema comercial de clonagem Gateway® (Invitrogen) baseia-se sítios lambda de recombinação sítio específica, que permitem uma grande versatilidade e rapidez de clonagem, uma vez que não utilizam enzimas de restrição, ligases, passos de subclonagem ou de triagem de colônias. O produto de PCR pode ser diretamente introduzido no vetor de entrada (pDONR™221) a partir de sítios *attB* (*attachment*) presentes no início do oligonucleotídeo iniciador que não hibridizam com o gene a ser clonado. Tais sítios são recombinados a sítios *attP* (presentes no vetor de entrada) por meio da enzima BP Clonase II™, gerando sítios *attL*, no vetor contendo o inserto clonado, e *attR* no subproduto da reação que contém o gene *ccdB*. Tal gene previne o crescimento de bactérias que possam ter recebido o vetor sem o inserto. O sítio *attL* do vetor de

entrada pode ser utilizado para recombinação com o sítio *attR* em diversos vetores de destino (pDEST™17, pDEST™15, entre outros) pela ação da enzima LR Clonase II™. O vetor de destino pode ser utilizado para expressão heteróloga em bactérias, por exemplo, como é o caso do pDEST™17, que fusiona uma cauda de seis histidinas à proteína. Essa plataforma e suas reações direcionais podem ser melhor visualizadas na Figura 04.

Vetores de destino específicos para utilização em *T. cruzi* da plataforma Gateway® foram confeccionados em nosso instituto (BATISTA *et al.*, 2010). Tais vetores possuem características específicas que tornam possível a inserção correta de DNA exógeno tanto episomal como integrado ao genoma do parasita. Além de possuírem promotores ribossomais de tripanossomatídeos (promotores de polimerase I), tais vetores devem ser flanqueados por regiões intergênicas que permitam tanto a adição do mini-exon quanto à cauda de poliadenilação. Geralmente essas regiões intergênicas provém de genes constitutivamente expressos como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina ou α -tubulina. As etiquetas de fusão disponíveis que permitem diversos tipos de estudos funcionais em nosso instituto podem ser visualizadas no Quadro 04 e o desenho esquemático de um desses vetores de destino pode ser visualizado na Figura 05.

Neste trabalho os vetores pTcTAP (etiqueta TAP para auxiliar na imunoprecipitação de complexos) e pTcGFP (proteína verde fluorescente, para localização celular) foram utilizados para clonagem dos genes *TcDHH1* e *TcPOP2*.

A



B

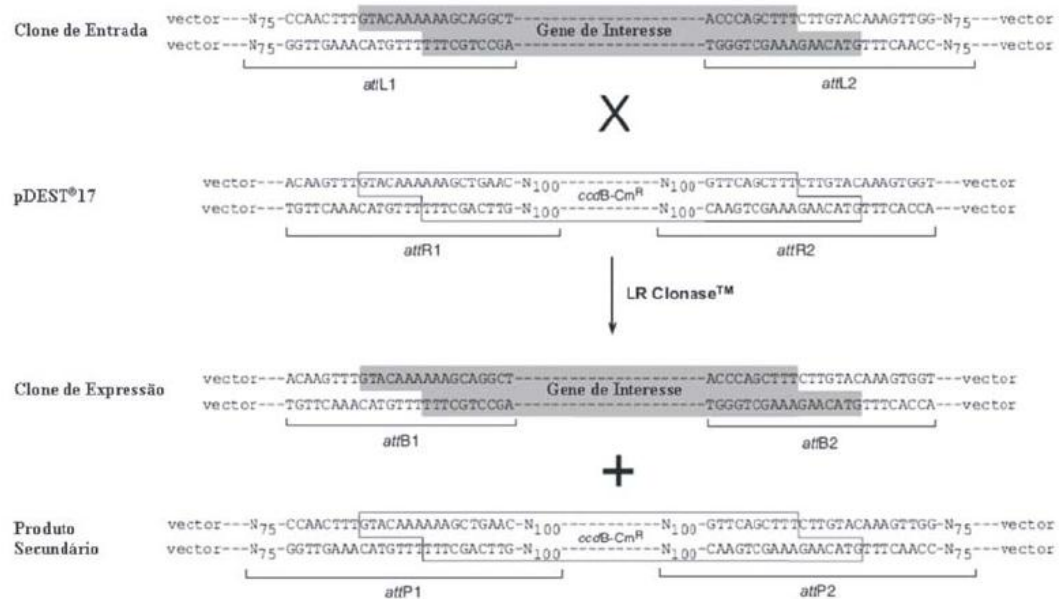


Figura 04. Recombinações entre os vetores da plataforma Gateway®. A) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attB* e *attP*, para a inserção do produto de PCR no vetor de entrada. B) Diagrama esquemático mostrando a recombinação entre os sítios *attL* e *attR*, para a obtenção do clone de expressão. (Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen).

Etiquetas		Estudo Funcional
Cauda de Histidinas	6xhis	Purificação de proteína por cromatografia
Green Fluorescent Protein	GFP	Localização celular
Yellow Fluorescent Protein	YFP	
Cyan Fluorescent Protein	CFP	
Tandem-Affinity-Purification	TAP	Purificação de complexos protéicos e superexpressão de proteína <i>in vivo</i>
Epítopo <i>c-myc</i> Proto-oncogene humano	<i>C-myc</i>	Localização celular com α - <i>c-myc</i>

Quadro 04. Etiquetas de fusão disponíveis no Instituto Carlos Chagas e suas utilidades em estudos funcionais de proteínas.

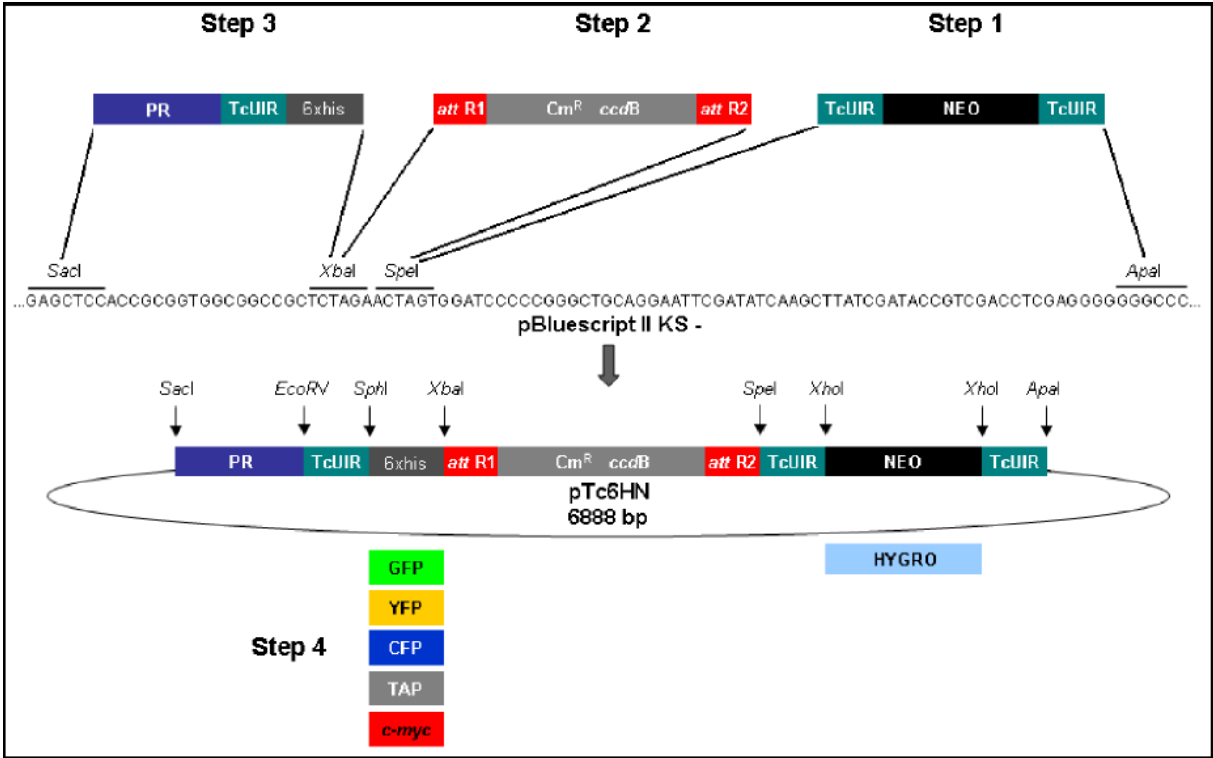


Figura 05. Desenho esquemático dos vetores de destino da plataforma Gateway® disponíveis no Instituto Carlos Chagas. Os elementos mostrados são: Resistência à Neomicina (NEO) ou à Higromicina (HYGRO), região intergênica de ubiquitina de *T. cruzi* (TcUIR), sítios att para a recombinação do sistema Gateway® (attR1 e attR2), gene de resistência ao Cloranfenicol (Cm^R), gene para seleção negativa durante a clonagem (ccdB), etiquetas de fusão (6xhis, GFP, YFP, CFP, TAP e *c-myc*) e promotor ribossomal (PR); FONTE: BATISTA *et al*, 2010).

3.6.6 Obtenção de clones em vetor de entrada

A inserção dos produtos de PCR amplificados em vetor de entrada foi feita de acordo com o manual do fabricante (o vetor escolhido foi o pDONR™ 221, que possui resistência a kanamicina): 150 ng de pDONR™ 221 foram misturados a 50 fmol de produto de PCR contendo os sítios *attB* em uma solução com volume final de 10 µl em Tampão TE e 1 µl de enzima BP Clonase™ II foi adicionada. A reação foi incubada a 16°C durante 16 horas e em seguida, a enzima da reação foi desnaturada pela ação de 2 µg de Proteinase K (37°C por 10 minutos).

As reações de recombinação foram utilizadas para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α, como previamente descrito, com intuito de amplificar o vetor de entrada contendo o inserto. A presença do inserto foi confirmada a partir de PCR de colônias, como descrito no item 3.5.3.

Após a confirmação, as colônias específicas para cada gene foram escolhidas para serem inoculadas em 2 ml de meio líquido, incubadas a 37 °C sob agitação constante durante 16 horas, para purificação do vetor.

A purificação do plasmídeo foi feita a partir do método de lise alcalina, com auxílio do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), conforme orientação do fabricante.

3.6.7 Obtenção dos clones em vetor de destino

Os vetores de destino escolhidos possuem resistência à ampicilina e estão listados a seguir de acordo com cada gene clonado: Para *TcDHH1*, pDEST™17 (Cauda de histidinas fusionada à proteína, visando inoculação e produção de anticorpos), pDEST™15 (Cauda de GST fusionada à proteína, visando aumentar a solubilidade da proteína) pTcTAP e pTcGFP. Para *TcPOP2*, pDEST™17, pTcTAP e pTcGFP. Para *TcCCR4* e *TcNOT1*, pDEST™17.

A reação LR de recombinação foi feita de acordo com o manual do fabricante: 150 ng de vetor de destino foram misturados a 150 ng de vetor de entrada (pDONR™221) em 10 µl de volume final de tampão TE e 1 µl de enzima LR Clonase™ II foi adicionada. A reação foi incubada a 16°C durante 16 horas e em seguida, a enzima foi desnaturada pela ação de 2 µg de Proteinase K (37°C por 10 minutos).

As reações de recombinação foram utilizadas para a transformação de bactérias *E. coli* DH5α, como previamente descrito, e a presença do inserto foi confirmada a partir de

PCR de colônias. As colônias específicas para cada gene foram escolhidas para serem inoculadas em meio líquido, para purificação do vetor. A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito anteriormente.

3.6.8 Eletroforese de proteínas

3.6.8.1 SDS-PAGE

O protocolo de eletroforese desnaturante em géis de poliacrilamida foi feito conforme descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com azul de coomassie ou por coloração de prata, dependendo da sensibilidade de detecção necessária.

3.6.8.2 Coloração por prata

A coloração por prata seguiu quatro passos principais: (1) fixação do gel com uma solução de fixação (etanol 50%; ácido acético glacial 12% e 50µl de formaldeído 37% em 100 ml) por 30 minutos; (2) sensibilização do gel com solução de sensibilização (0,02% de tiosulfato de sódio em água) por 2 minutos, seguido de (3) coloração do gel com solução de prata (0,2% de nitrato de prata acrescido de 50µl de formaldeído 37 % em 100ml) por 30 minutos; o gel foi então lavado 3 vezes de 15 minutos em água milli-Q para tirar o excesso de prata e (4) revelado em solução de revelação (3% de carbonato de sódio em solução de sensibilização, acrescido de 75µl de formaldeído 37% em 100 ml) por tempo indeterminado, até que as bandas aparecessem. A solução de parada utilizada foi a mesma solução de fixação porém sem adição de formaldeído.

3.6.9 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLys foram transformadas com 2 µl do plasmídeo de destino (pDEST™17) purificado. Após o crescimento em meio seletivo e confirmação por PCR de colônias, as bactérias que apresentavam o inserto em questão foram inoculadas em 50 ml de meio LB, a ser incubado por 16 horas a 37 °C e sob agitação constante. A partir desse pré-inóculo um inóculo na diluição 1:10 foi feito e incubado nas mesmas condições e monitorado até atingir densidade óptica a 600 nm entre 0,6 e 0,8. IPTG a uma concentração final de 1 mM foi então adicionado, para induzir a expressão de proteína. A cultura foi mantida sob agitação (200 RPM) a 37 °C por 3

horas. Após esse período, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação (5000 x g por 5 minutos a 4 °C). O sedimento bacteriano foi suspenso em tampão de sonicação e sonicado em banho de gelo por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto em potência 9 (Homogeneizador 4710, Cole-Parmer). O lisado foi centrifugado a 10000 x g por 15 minutos a 4 °C para a separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). O sedimento obtido foi suspenso e lavado duas vezes em tampão de purificação de proteínas e submetido à centrifugação conforme descrito acima. O sedimento final foi suspenso em tampão de solubilização, sonicado e submetido à centrifugação conforme descrito acima. O sobrenadante desta centrifugação foi denominado fração insolúvel. Alíquotas das frações (solúvel, insolúvel e controle não induzido) foram analisadas em gel SDS-PAGE.

Após análise em tampão de solubilização, a fração insolúvel, rica em proteína recombinante foi submetida a um gel SDS-PAGE preparativo

Após a corrida, o gel foi corado com KCl 100 mM gelado, e a banda referente à proteína de interesse foi removida. A banda referente à proteína foi colocada dentro de uma membrana de diálise (Sigma-Aldrich) com as extremidades seladas contendo 500 µl de tampão de SDS-PAGE. A membrana contendo o gel, foi colocada em uma cuba eletroforética contendo tampão SDS-PAGE e submetida a uma corrente de 50 mA por 16 horas. Após este período, o líquido presente dentro da membrana foi coletado, e a concentração de proteína eletroeluída foi quantificada por comparação a uma curva de concentrações crescentes de BSA.

3.6.10 Expressão e purificação de proteínas recombinantes solúveis

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLys foram transformadas com 2 µl do plasmídeo de destino (pDEST™15) purificado. Após o crescimento em meio seletivo e confirmação por PCR de colônias, as bactérias que apresentavam o inserto em questão foram inoculadas em 50 ml de meio LB, a ser incubado por 16 horas a 37 °C e sob agitação constante. A partir desse pré-inóculo um inóculo na diluição 1:10 foi feito e incubado nas mesmas condições e monitorado até atingir densidade óptica a 600 nm entre 0,4 e 0,6. Antes da indução, as bactérias sofreram choque térmico (em gelo) e adição de etanol a uma concentração final 3% para aumentar a produção de chaperonas capazes de dobrar com mais eficiência as proteínas. Após uma recuperação de 30

minutos a 37 °C e sob agitação constante, foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,5 mM para induzir a expressão da proteína. A cultura foi mantida sob agitação (200 RPM) a 25 °C por 16 horas. Após esse período, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação (5000 x *g* por 5 minutos a 4 °C). O sedimento bacteriano foi suspenso em tampão de sonicação para proteína solúvel e sonicado em banho de gelo por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto em potência 9 (Homogeneizador 4710, Cole-Parmer). O lisado foi centrifugado a 10000 x *g* por 15 minutos a 4 °C para a separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). O insolúvel foi suspenso e lavado duas vezes em tampão de purificação de proteínas e submetido à centrifugação conforme descrito acima. O sedimento final foi suspenso em tampão de solubilização, sonicado e submetido à centrifugação conforme descrito acima. O sobrenadante desta centrifugação foi denominado fração insolúvel. Alíquotas das frações (solúvel, insolúvel e controle não induzido) foram analisadas em gel SDS-PAGE. A concentração de proteína foi quantificada por comparação a uma curva de concentrações crescentes de BSA.

A fração solúvel (adicionada de 1 mM de PMSF) foi purificada a partir da resina de Glutathione Sepharose® 4B (Amersham-Biosciences), que liga especificamente à proteína GST fusionada à proteína de interesse. 400 µl de resina foram empacotados em uma coluna de cromatografia, lavados 3x com PBS e incubados com a fração solúvel de TcDHH1 por 1 hora a temperatura ambiente. Após essa incubação, a coluna foi aberta e o líquido (fração não ligada) foi recolhido para posterior análise. A resina foi então lavada com 3 volumes de PBS (30 ml), colhendo as 3 frações iniciais de 1 ml (Lavado 1, 2 e 3). O restante do volume de lavagem foi descartado. Em seguida, a proteína solúvel foi eluída (Eluído 1) com 500 µl solução de Glutathione reduzida em pH 7,5 (30 mg de Glutathione reduzida em 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0). Esse passo de eluição pode ser repetido quantas vezes forem necessárias para recuperar o máximo de proteína fusionada à GST; nesse caso foram feitas 2 eluições. A coluna foi lavada com 3 volumes de PBS e o eluído foi colocado em nitrogênio líquido e posteriormente mantido a -70 °C para uso futuro.

3.7 Ensaios Imunológicos

3.7.1 Produção de Antissoros Policlonais

As proteínas recombinantes foram inoculadas em três camundongos da linhagem Swiss. O soro pré-imune foi coletado uma semana antes do início das imunizações. A primeira imunização foi feita intra-peritonealmente com 50 µg de proteína diluída em 1 volume de adjuvante completo de Freund. Foram realizadas no total 4 imunizações em intervalos regulares de 10 dias cada, sendo que a partir da segunda imunização foi utilizado 1 volume do adjuvante incompleto de Freund misturado às doses de antígeno. A coleta do soro foi feita 10 dias após a quarta imunização. Os animais foram sedados com 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina e o sangue foi coletado por punção cardíaca. 3 ml de PBS foram utilizados para coleta do lavado peritoneal, após o sacrifício do animal. O sangue foi incubado por 15 minutos a 37 °C, para coagulação das células vermelhas, e em seguida, centrifugado por 5 minutos a 5.000 x g para coleta do soro que foi aliquotado e armazenado a -20 °C.

Os animais, provenientes do biotério do ICC, foram manipulados segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999). O Instituto Carlos Chagas possui autorização do CTNBio para a realização desse projeto.

3.7.2 Purificação dos Antissoros Policlonais

Os antissoros foram purificados por meio da incubação simultânea de proteína recombinante previamente transferida para membrana de nitrocelulose e extrato de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE com o antissoro a ser purificado. Após 16 horas de incubação a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 0,1%. Os anticorpos purificados foram eluídos com 750 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 e o pH da solução foi ajustado para 7 com tampão 50 mM Tris-HCl pH 9,5 (~125 µl). Os anticorpos purificados foram aliquotados e guardados a -20 °C para posterior uso.

3.7.3 Ensaio de Western Blot

Para verificação da especificidade dos antissoros que reconhecem a proteína TcDHH1 recombinante e em extratos protéicos de *T. cruzi*, foi utilizado o ensaio de Western blot (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). O método utilizado para este trabalho baseou-se na revelação por fosfatase alcalina descrito a seguir.

Proteínas separadas por eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por meio de uma corrente elétrica de 100 V durante 2 horas a 4 °C em tampão de transferência para Western blot. A membrana foi corada com solução de Ponceau S para verificar a qualidade da transferência e em seguida descorada em água deionizada e incubada em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. antissoro primário (a ser testado ou a ser utilizado) foi incubado em solução de bloqueio em diversas diluições e incubado a 37 °C por uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos com PBS-Tween 20 0,1% e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugados à fosfatase alcalina) a 37 °C durante 1 hora. A membrana foi novamente lavada como descrito acima e revelada com 66 µl de NBT (cromógeno, 50 mg/ml) e 33 µl de BCIP (substrato, 50 mg/ml) diluídos em 10 ml de AP Buffer. A reação foi parada com a imersão da membrana em solução de EDTA 0,5 M.

3.7.4 Imunolocalização Celular por Microscopia de Fluorescência

A localização celular foi verificada a partir do protocolo de imunofluorescência descrito por HOLETZ e colaboradores (2007), com algumas modificações descritas a seguir. Parasitas em estágios distintos de diferenciação foram centrifugados a 7.000 x g por 3 minutos, lavados duas vezes e suspensos em PBS a uma concentração de 10⁷ células/ml. As células foram adicionadas em lâminas, com campos delimitados por teflon. Em cada campo foram adicionados 10⁶ parasitas e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, o excesso de solução foi retirado com pipeta e os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS durante 20 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com HCl 0,2 M por 10 minutos ou 0,1% de Triton X-100 em PBS por 2 minutos. Os parasitas fixados foram lavados duas vezes com PBS e bloqueados com PBS-BSA 1% por 16 horas a 4 °C ou com PBS-BSA 4% por 1 hora a temperatura ambiente. Estas soluções foram utilizadas para diluição dos anticorpos. Em

seguida os parasitas foram incubados com o anticorpo primário durante 1 hora a 37 °C, lavados 3 vezes com PBS incubados com o anticorpo secundário durante 1 hora a 37 °C. Os anticorpos secundários utilizados foram conjugados aos fluoróforos Alexa 488, Alexa 546 ou Alexa 594. As etapas de lavagem foram repetidas e o núcleo e o cinetoplasto foram corados com 1 µg/µl de DAPI. As lâminas foram lavadas, secas e 5 µl de n-propil-galacto foi adicionado a cada campo, antes de serem seladas com lamínulas. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Nikon E600 com a objetiva de 100x. As imagens foram capturadas usando a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.7.5 Imunoprecipitação da Proteína TcDHH1

Os ensaios foram realizados com o anticorpo α -TcDHH1 em extratos citoplasmáticos de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas submetidos a estresse nutricional e de tripomastigotas metacíclicos.

O anticorpo purificado contra TcDHH1 (50 µl) foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente com 25 µl de proteína G Sepharose (previamente lavada e bloqueada com PBS-BSA 1 mg/ml por 10 minutos), sob leve agitação. Após essa incubação, a resina foi coletada por centrifugação a 600 x g por um minuto, o sobrenadante foi descartado. A resina foi lavada uma vez com PBS-BSA 1 mg/ml, 2 vezes com PBS e incubada com tampão de crosslink por 30 minutos, sob leve agitação. Após essa incubação, a resina foi centrifugada a 600 x g por um minuto e lavada com tampão de lavagem por 5 minutos sob leve agitação. A resina foi incubada com mais dois passos de crosslink e lavagem iguais aos descritos acima. Após a terceira lavagem, a reação de crosslink foi interrompida com tampão de parada, de 2 vezes de 5 minutos, sob leve agitação. O excesso de anticorpo não ligado covalentemente foi tirado com 200 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 por 1 minuto. O pH foi imediatamente ajustado com três lavagens com Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Esta resina pode ser guardada a 4 °C ou usada em seguida para imunoprecipitação.

Os extratos citoplasmáticos de *T. cruzi* foram obtidos durante a etapa de incubação do anticorpo com a resina. Para isso, 10⁹ parasitas foram centrifugados a 7.000 x g por 3 minutos, lavados 3 vezes com PBS e incubados em 1 ml de tampão IMP1, acrescido de 10 µM de E-64 e 1 mM de PMSF, por duas horas em gelo, sob moderada agitação. O

extrato citoplasmático foi obtido após centrifugação a $7.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C e 0,5 ml desse extrato, referente à lise de 5×10^8 parasitas foi incubado com a resina, por 16 horas a 4°C em agitador orbital. Os complexos foram coletados por centrifugação a $600 \times g$ por 1 minuto e lavados 3 vezes com o tampão IMP1, seguidos por centrifugação. O conteúdo complexado à resina foi eluído com 50 μL de glicina 0,2 M pH 2,5 e o pH do eluído foi ajustado para 7,0 com a adição de 5 μL de 50mM Tris-HCl pH 9,5. A resina teve seu pH ajustado com 3 lavagens de Tris-HCl pH 8,0.

As frações foram analisadas por Western blot e por coloração de prata em gel de SDS-PAGE (itens 3.6.8 e 3.7.3 desta seção).

3.8 Ensaios de Sedimentação em Gradientes de Sacarose

Os ensaios de sedimentação foram feitos a partir de centrifugação de extratos citoplasmáticos em gradientes de densidade de sacarose segundo o protocolo de BRECHT & PARSONS (1998), com algumas modificações. O extrato citoplasmático de 2×10^9 parasitas epimastigotos em fase logarítmica de crescimento foi obtido tanto em condições de estabilização de polissomos (com incubação prévia das células com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida por 10 minutos em temperatura ambiente) quanto em condições de dissociação de polissomos (com incubação das células com 2 mM de puomicina por uma hora a 28°C). As células foram centrifugadas a $7.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e lavadas 2 vezes com tampão TKM (para cicloheximida, suplementado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida) ou TKM-P (para puomicina). Após descartar o sobrenadante, as células foram suspensas em 900 μL de TKM (suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida) ou TKM-P, 10 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, 10 μM de E-64 e 1 mM de PMSF. A suspensão foi transferida para novo tubo contendo 100 μL de tampão de lise (tampão TKM acrescido de 10% de NP-40 e 2M de sacarose ou TKM-P acrescido de 10% de NP-40 e 2M de sacarose e 2mM de puomicina) e homogeneizada por pipetagem. O lisado foi então centrifugado a $16.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante (500 μL , equivalentes a 10^9 células) foi adicionado no topo do gradiente de sacarose linear (15 - 55%) preparado em tampão TKM ou TKM-P acrescidos dos inibidores já mencionados. O gradiente foi centrifugado a 39.000 rpm por 2 horas a 4°C em ultra centrífuga Beckman com rotor

SW40. Após a centrifugação 500 μ L de cada fração foram coletados utilizando o equipamento ISCO. Este equipamento destina-se à coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorbância contínuo (filtro 256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento é obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 60%) que é injetada perfurando-se a base do tudo que contém o gradiente previamente centrifugado. As frações foram divididas em 4 grupos principais: Fração **L**eve (**L**), Fração **N**ão **P**olissomal (**NP**), Fração **P**olissomal **L**eve (**PL**) e Fração **P**olissomal **P**esada (**PP**) e aplicadas em gel SDS-PAGE (30 μ L de cada fração), submetidas à eletroforese e analisadas por Western *blot* com antissoro para a proteína TcDHH1 diluído na proporção 1:1500 e para a proteína ribossomal S7 na diluição 1:500. O RNA total das 4 frações foi extraído pelo método do Trizol® como descrito no item 3.4.6. O cDNA foi confeccionado como descrito no item 3.10.2 e utilizado para os experimentos de PCR utilizando iniciadores específicos para os mRNAs alvos de TcDHH1.

3.8.1 PCR *Touchdown*

Para a reação, 0,02 ng/ μ l de cDNA foram submetidos a uma reação de PCR nas mesmas concentrações anteriormente descritas para a enzima Taq IBMP (Quadro 02). E para amplificação de vários alvos simultaneamente, um programa de PCR *Touchdown* foi utilizado a fim de aumentar a eficiência de amplificação dos fragmentos (Quadro 05).

Temperatura	Tempo (s)	Ciclos
94 °C	02:00	1
94 °C	00:30	3
62 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
61 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
60 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
59 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
58 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
56 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	3
55 °C	00:30	
72 °C	00:30	
94 °C	00:30	11
54 °C	00:30	
72 °C	00:30	
72 °C	10:00	1
4 °C	∞	

Quadro 05. Programa de PCR *Touchdown*.

3.9 Hibridação *In Situ* por Fluorescência

A técnica consiste na hibridação de uma sonda de ácido nucléico (DNA ou RNA) marcada com uma sequência complementar na amostra a ser estudada. O alvo de estudo pode ser tanto DNA quanto RNA endógeno. Por isso, as sondas podem ser de diferentes tipos: DNA fita simples ou fita dupla, RNA transcrito *in vitro*, oligonucleotídeos comerciais marcados. O tipo de marcação, por sua vez, pode ser radiativa (^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S) ou não

radiativa (fluoróforos, biotina, fosfatase alcalina, digoxigenina). Neste projeto, o foco de estudo são os alvos de mRNA da proteína TcDHH1 e, portanto, sondas específicas para mRNA foram utilizadas (DNA fita simples comercial marcado ou RNA fita simples marcado, transcrito *in vitro*).

Esta técnica foi padronizada para a linhagem Dm28c de *T. cruzi* durante esse trabalho e será melhor explicada nos itens 3.9.3 (protocolo padronizado), em Material e Métodos e 4.2.2.1 (parâmetros que foram modificados a fim de padronizar o protocolo final), em Resultados.

3.9.1 Clonagem TA de alvos de TcDHH1

A clonagem TA utiliza-se da atividade terminal transferase de algumas DNA polimerases como a Taq DNA polimerase que adiciona uma adenosina a cada extremidade 3' de um produto de PCR. Essa abordagem permite a clonagem de tal produto em um vetor de clonagem linearizado que possua extremidades complementares 3'-T não pareadas, como é o caso do vetor pGEM®-TEasy (Promega).

Dessa forma, com um passo extra de extensão ao final da ciclagem (10 minutos a 72 ou 68 °C) de uma PCR comum é possível obter produtos de PCR contendo tais extremidades que permitem uma rápida clonagem para o vetor pGEM®-TEasy.

Na clonagem em pGEM®-TEasy, o meio LB sólido em que a bactéria transformada é cultivada deve conter antibiótico apropriado (ampicilina), X-gal e IPTG. Isto porque a seleção dos clones positivos é feita por meio da avaliação da expressão da enzima β -galactosidase, que, quando induzida por IPTG, degrada o substrato X-gal produzindo um subproduto azul. Como o sítio de clonagem múltipla está presente dentro do gene da enzima, caso o inserto seja incorporado com sucesso ao vetor, a enzima β -galactosidase não é mais expressa funcionalmente e as colônias permanecem brancas. Isso facilita a identificação dos clones recombinantes, que posteriormente devem ser confirmados por PCR de colônia.

O mapa do vetor fornecido pelo fabricante pode ser visualizado na Figura 06:

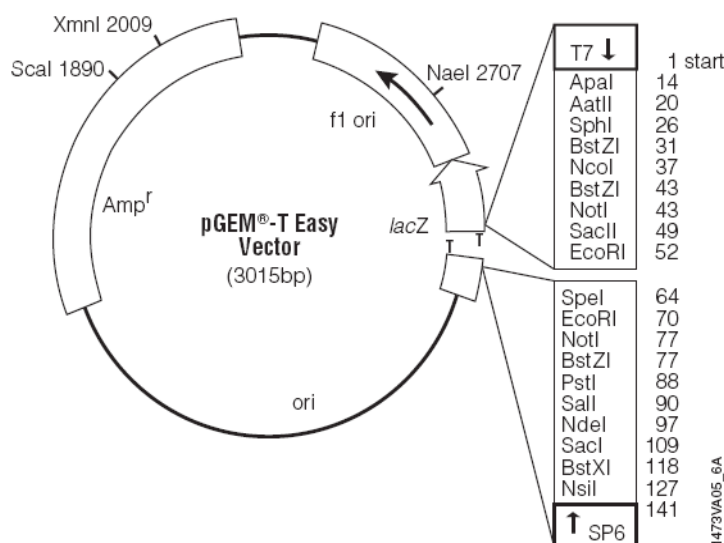


Figura 06. Mapa do vetor pGEM® – TEasy utilizado nas clonagens (Promega).

A partir de dados publicados por HOLETZ e colaboradores (2010), vários alvos de TcDHH1 foram identificados por meio de uma imunoprecipitação seguida de microarranjo e oito deles foram confirmados por RT-PCR (IDs de cada gene encontram-se no Quadro 05): Amastina, putativa (*TcAMA*), Ciclina, putativa (*TcCYC*), Proteína hipotética, conservada (*TcHYP*), RNA binding protein 5 (*TcRBP5*), Mucin-associated surface protein (*TcMASP*), Mucina, *TcMUCII* putativa (*TcMUC*) e dois controles negativos (mRNAs não associados a TcDHH1) *glucose-regulated protein 78*, putativa (*TcCTL1*) e (H⁺)-ATPase G subunit, putativa (*TcCTL2*). Com os oligonucleotídeos já desenhados (Quadro 06) em regiões específicas para cada um dos oito alvos selecionados, foi possível amplificar regiões de cada inserto e subcloná-las no vetor pGEM®-TEasy (Promega), conforme manual do fabricante: 50 ng de vetor foram misturados a uma quantidade 10 vezes maior de inserto (500 ng) em presença de 3 unidades da enzima T4 ligase (Promega) em um volume total de 10 µl. A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C. Um volume de 2 µl das reações destas ligações foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α, como descrito previamente. As células transformadas foram cultivadas em LB-ampicilina sólido contendo IPTG X-gal e, após o período de incubação, foi observada a formação de colônias brancas isoladas. A confirmação da clonagem foi analisada através de PCR de colônias conforme descrito. Os vetores contendo os amplicons foram purificados utilizando o sistema Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) e enviados para sequenciamento para confirmação e averiguação da orientação em que foram inseridos no vetor.

Gene	ID	Iniciador	Sequência	Amplicon (bp)
TcAMA	Tc00.1047053506437.10	F1 R1	5' GACTGCCACAGCACGAAGTA 3' 5' CCACCACCGTATTTCAAACC 3'	308
TcCYC	Tc00.1047053506945.270	F1 R1	5' TGGGGAGGATTATAGCGATG 3' 5' ACTTCGGCAGAGCACTTCAT 3'	202
TcHYP	Tc00.1047053509891.40	F1 R1	5' GCCGTCATGCAAAAATATCC 3' 5' CCTTTTCAGCCAAAAAGCTG 3'	370
TcRBP5	Tc00.1047053511481.70	F1 R1	5' AAGGAAGGGAGGAAGGAACA 3' 5'CCGAGGCGACATTCTTGTAT 3'	302
TcMASP	Tc00.1047053504239.110	F1 R1	5' GCTCCTTTGCAGCCTGTATC 3' 5' TCCCCGGAGTATCTTCTGTG 3'	268
TcMUC	Tc00.1047053506131.20	F1 R1	5' GCGGAGAACAAGATGAGGA 3' 5' TCGCTTTTGAAATAGGCACC 3'	204
TcCTL1	Tc00.1047053506585.40	F1 R1	5' TGGCGGTAAGAAGAAGCAGT 3' 5' CCGAGGTCAAACACAAGGAT 3'	276
TcCTL2	Tc00.1047053510993.10	F1 R1	5'ACAACGTGCAAAGGCTTCTT 3' 5' CTCGTGCCAACTCCAAGTTT 3'	210

Quadro 06. Iniciadores utilizados para a clonagem de alvos selecionados de TcDHH1 no vetor pGEM-TEasy.

3.9.2 Transcrição *in vitro* de sondas

A transcrição do RNA foi efetuada a partir de cada vetor contendo os insertos, com auxílio de DIG-RNA *Labeling Kit* (SP6/T7) (Roche), o qual incorpora UTP marcado com digoxigenina ao transcrito. O vetor pGEM®-TEasy possui dois promotores distintos em cada extremidade em que o inserto será introduzido (SP6 ou T7). Dessa forma, após o sequenciamento com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada promotor é possível descobrir o sentido em que o inserto foi inserido no plasmídeo. Isso é importante uma vez que se deve saber em qual sentido de transcrição teremos a sonda sense e a anti-sense.

Uma vez que a transcrição *in vitro* deve ser feita a partir de um plasmídeo linearizado, foi feita a digestão de cada plasmídeo com duas enzimas de restrição distintas separadamente. Isso deve ser feito uma vez que a transcrição deve ser interrompida ao final do inserto, para evitar que sequências inespecíficas do plasmídeo sejam transcritas adjacentes à sonda específica. Para isso, quando fazemos a transcrição iniciando no promotor SP6, o plasmídeo utilizado como molde deve ser digerido na extremidade T7 e vice-versa.

Todos os alvos clonados foram analisados de forma que a enzima de restrição utilizada não tivesse nenhum sítio de clivagem interno. Dessa maneira, a enzima escolhida para clivagem no promotor T7 foi a *SphI* (Biolabs) e no promotor SP6 foi utilizada a enzima *NsiI* (Biolabs). As reações de digestão foram feitas nas seguintes condições: 1 µg de DNA plasmidial foi digerido com 8 U de enzima (tanto para *SphI* quanto para *NsiI*) em solução com 3 µl de tampão (NEB2 para *SphI* e NEB3 para *NsiI*) em uma reação de 30 µl; A reação foi incubada a 37 °C por 16 horas e o plasmídeo linearizado foi purificado por precipitação com fenol – cloforórmio – álcool isoamílico, como descrito a seguir. 30 µl da fração fenólica do fenol – clorofórmio foram adicionados à reação de digestão, em seguida a solução foi submetida à centrifugação a uma velocidade de 13000 x g durante 5 minutos e coletou-se a fração aquosa da mistura. Essa fração aquosa foi completada com água para 100 µl final e precipitou-se o DNA plasmidial com a adição de 3 volumes de etanol absoluto e 10% de acetato de sódio 3 M a -20 °C durante 16 horas. A solução foi submetida a uma centrifugação por 15 minutos a 14000 x g e lavada duas vezes com etanol 70%. O DNA precipitado foi deixado secar, suspenso em 10 µl de TE e quantificado por meio do equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). As amostras foram estocadas a -20°C para posterior uso.

Antes da transcrição, os plasmídeos digeridos com a enzima *SphI* ainda tiveram que ser tratados, uma vez que essa enzima deixa extremidades 3' coesivas durante a digestão e isso pode gerar transcritos inespecíficos. Essas extremidades devem ser convertidas a extremidades cegas pela atividade 3' → 5' exonuclease da subunidade Klenow da Polimerase I. Essa reação foi feita da seguinte maneira: uma reação padrão de transcrição *in vitro* contendo 33 µM de cada dNTP foi utilizada (as concentrações da reação completa são descritas a seguir) e a subunidade Klenow da enzima Polimerase I foi adicionada a uma concentração de 5 U/µg de DNA. Essa reação foi incubada por 15 minutos a 22 °C. A reação de transcrição foi feita a seguir adicionando-se o restante do mix de dNTP e a RNA polimerase.

A reação de transcrição foi feita a partir dos plasmídeos digeridos de acordo com o manual do fabricante: 1 µg de vetor purificado contendo o inserto diluído em 13 µl de água são misturados com 2 µl de mistura de dNTPs 10x contendo dUTP-DIG, 2 µl de tampão de transcrição 10x, 1 µl de inibidor de RNase e 2 µl de T7 ou SP6 polimerase (as amostras digeridas com *NsiI* foram transcritas com T7 e as digeridas com *SphI* foram transcritas com SP6). Essa mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por duas

horas. Após esse período, 2 µl de DNase I foram adicionados para degradar o plasmídeo e as amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 15 minutos. Foram adicionados 2 µl de EDTA 0,2 M para interromper a reação e as amostras foram purificadas por coluna SEPHADEX G50 (GE Healthcare), de acordo com o manual do fabricante. As amostras foram quantificadas por meio do equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e estocadas a -20°C para posterior uso.

3.9.3 Teoria da técnica de FISH

A maioria dos mRNAs existem nas células em pequenas quantidades e, portanto, os objetivos de um protocolo de FISH visam otimizar: a retenção da morfologia da célula/tecido, a permeabilização do tecido à sonda, a retenção do mRNA dentro do tecido e a redução de interações inespecíficas. Portanto, a técnica antes de ser utilizada com sondas específicas deve ser padronizada para o conjunto de mRNAs presente no organismo a ser estudado. Dessa maneira, alguns parâmetros podem ser modificados para alterar o resultado final da técnica: tipo de fixador e tempo de fixação, agentes permeabilizantes e tempo de tratamento, pré-tratamentos, condições de hibridação (reagentes, pH, temperatura e tempo) e pós-tratamentos e lavagens.

É importante ressaltar que o manuseio de amostras visando o estudo de RNAs deve ser efetuado em um ambiente livre de RNases, incluindo reagentes e soluções, tubos de centrifugação, ponteiros de pipetas e a água utilizada deve ser tratada com DEPC, para conferir a ausência de RNases.

Fixação. Esta etapa visa preservar a morfologia e prevenir a perda do mRNA. Existem dois tipos de agentes fixadores: os precipitantes (etanol, ácido acético), que precipitam proteínas aprisionando o RNA dentro da célula, e os que fixam por ligação cruzada ou *crosslink* (glutaraldeído, formalina e paraformaldeído), que formam ligações covalentes cruzadas com grupos reativos de proteínas.

Permeabilização. Esta etapa serve para facilitar a difusão da sonda para dentro da célula. Existem três principais reagentes que podem ser utilizados:

Ácido clorídrico diluído: Melhora a entrada da sonda e a qualidade do sinal devido à desnaturação de proteínas e ribossomos (que podem estar conjugados ao mRNA, dificultando a exposição do mesmo).

Proteinase K: Desnatura proteínas, incluindo aquelas que possuem domínios de ligação a RNAs (aumentando a exposição dos RNAs e facilitando a hibridação). Deve-se utilizar com cuidado, uma vez que, dependendo da concentração e tempo de incubação pode degradar muito as proteínas. Se o intuito do experimento for o de colocalização com proteínas (como é o caso neste trabalho), esta abordagem não deve ser utilizada.

Detergentes: São eles saponina, Tween-20, Triton X-100, entre outros, que tornam a bicamada lipídica mais fluida, facilitando a entrada das sondas.

Pré-tratamentos. Uma série de pré-tratamentos podem ser feitos em um experimento de FISH, desde a incubação com DNases (para garantir um sinal específico de RNA e não de DNA), inibidores de RNase, e com a própria RNase (como controle negativo, para conferir especificidade ao sinal).

Pré-hibridação. Uma maneira de reduzir ligações inespecíficas da sonda é saturar os locais de ligação (na amostra – célula, tecido) por meio de uma incubação com a solução de pré-hibridação (não contendo a sonda). Os locais de ligação podem ser saturados com diversos compostos: ficoll, BSA, polivinil pirrolidona, ácidos nucleicos, entre outros. A solução de pré-hibridação pode conter:

Formamida ou DTT: São solventes orgânicos que reduzem a estabilidade térmica das ligações, permitindo uma hibridação a temperaturas mais baixas;

Dextran sulfato de sódio: Esse composto é altamente higroscópico levando à redução da quantidade de água de solvatação para solubilizar os nucleotídeos. Em consequência disso, a concentração efetiva da sonda é aumentada, tornando a velocidade de hibridação maior.

BSA: Bloqueia possíveis sítios de ligação inespecíficos (tanto das sondas, quanto de anticorpos que serão utilizados em etapas posteriores).

SSC: Cátions monovalentes interagem normalmente com os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos, diminuindo as interações eletrostáticas entre as duas fitas.

EDTA: É um composto quelante que remove cátions divalentes livres responsáveis por estabilizar a dúplex de DNA (o que não é necessário no caso de FISH de RNA).

tRNA de levedura e DNA de esperma de salmão: São “concorrentes” da sonda de RNA endógena do alvo e, portanto, reduzem interações inespecíficas;

Solução de Denhardt's: É uma solução composta por polímeros de alto peso molecular capazes de saturar os locais de ligação inespecíficos ao mesmo tempo em que aumentam a concentração efetiva da sonda.

Hibridação. A sonda é adicionada à solução de pré-hibridação e a temperatura e o tempo de hibridação podem variar de acordo com a composição nucléica, tamanho da sonda, tipo de sonda e tipo de alvo. Dependendo do tipo da sonda existe uma pequena diferença no protocolo: Sondas transcritas *in vitro* (geralmente mais longas) podem possuir estruturas secundárias (como grampos e duplexes) que devem ser desnaturadas (geralmente por incubação de 5 minutos a 60 °C). Além disso é importante ressaltar que, quando falamos de FISH de mRNA existem duas sondas que podem ser testadas: a sonda sense (que possui a mesma sequência do mRNA e, conseqüentemente não hibridará com ele) e a sonda anti-sense (com sequência complementar, pareando com o RNA). Dessa forma, três controles negativos podem ser utilizados: **RNase** para cortar o sinal da hibridação, **sonda sense**, que não pode hibridar com nenhum mRNA presente na amostra, uma vez é equivalente à fita que está sendo transcrita, e o controle negativo **sem adição de sonda**, que também não pode mostrar nenhum tipo de sinal.

Lavagens e pós-tratamentos. SSC (2X, 1X, 0,5X): Deve-se ter em mente que a estringência da solução de lavagem aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura e com a diminuição da concentração de sal. Portanto, sempre se faz uma série de lavagens com concentrações decrescentes de sal.

Imunofluorescência: Alguns tipos de sonda não requerem esse passo, uma vez que já estão diretamente marcadas com fluoróforos. No caso de sondas marcadas com digoxigenina, por exemplo, exige-se a incubação com um anticorpo primário que reconheça essa marcação e um anticorpo secundário marcado com um fluoróforo para que possamos ver o sinal. Por causa disso, essa técnica é interessante uma vez que o resultado é uma amplificação no sinal do RNA. Algumas sondas utilizadas nesse trabalho foram conjugadas à digoxigenina (comercialmente ou por transcrição *in vitro*) e o anticorpo que utilizamos para reconhecer tal modificação foi um monoclonal de camundongo (Sigma, Clone DI-22, fluído ascítico). Foram utilizados anticorpos secundários conjugados a Alexa 488, 546 ou 594 (Invitrogen).

3.9.4 Protocolo de FISH padronizado

Parasitas em estágios distintos de diferenciação foram centrifugados a 5000 x *g* por 2 minutos, lavados três vezes em PBS e suspensos na mesma solução de lavagem numa densidade de 10⁷ células/ml. As células foram adicionadas em lâminas, com campos

delimitados por teflon. Em cada campo foram adicionados 10^6 parasitas e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente para que os parasitas pudessem aderir. Após esta etapa, o excesso de solução foi retirado com pipeta e os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS durante 20 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com HCl 0,2 M ou 0,2% de Triton X-100 em PBS durante 10 minutos. Os parasitas fixados foram lavados duas vezes com PBS e incubados com solução de pré-hibridação com adição de RNase OUT 0,4 U/ μ l (temperatura ambiente, 1 hora, nos testes) ou RNase A 100 μ g/ml (37 °C, 1 hora, nos controles negativos). Em seguida, as sondas foram diluídas em solução de pré-hibridação de acordo com o Quadro 07.

Sonda	Tipo	Marcação	Concentração Final
poli d(T) mRNA total	Oligonucleotídeo	DIG	6 ng/ μ l
		TRITC	1 ng/ μ l
		FITC	1 ng/ μ l
		Cy3	1:1000 *
ALVOS sense e α -sense	Transcrição <i>in vitro</i>	DIG	1 ng/ μ l

Quadro 07. Tipos de sondas utilizadas, marcação e concentração final em solução de pré-hibridação.

Antes da adição da solução de hibridação aos campos da lâmina, as sondas diluídas foram desnaturadas a 65 °C por 5 minutos e mantidas em gelo até o momento da adição. 50 μ l de solução de hibridação foi adicionado a cada campo e as lâminas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As lâminas foram lavadas duas vezes de cinco minutos em solução SSC2x, 35% formamida e em seguida mais duas vezes de cinco minutos em solução SSC2x. Sondas marcadas diretamente com fluoróforos são apenas lavadas uma vez com PBS 1,5X e seguem para marcação nuclear como descrito em breve. Caso a sonda seja marcada com digoxigenina, as lâminas foram então bloqueadas com solução de 4% BSA em PBS1X por 1 hora, a temperatura ambiente. Esta solução também foi utilizada para diluir os anticorpos. Os parasitas foram incubados com o anticorpo primário (anti-digoxigenina, Sigma, na diluição 1:300) durante uma hora a 37 °C e lavados três vezes com PBS 1,5X por 5 minutos. O anticorpo secundário, conjugado aos fluoróforos

Alexa 488 ou Alexa 546 (diluição 1:400), foi adicionado e as etapas de incubação e lavagem repetidas. O núcleo e o cinetoplasto das células foram corados durante 10 minutos com 1 µg/ml de DAPI diluído em SSC2x. Após esta etapa as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1,5X e sobre cada campo foram adicionados 5 µL de n-propil-galato na concentração de 200 µg/ml. As lâminas foram seladas com lamínulas e observadas ao microscópio de fluorescência Nikon E600 com a objetiva de 100x. As imagens foram capturadas usando a câmera CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.10 RT-PCR, PCR Quantitativa e Tempo de Meia Vida

Para a avaliação do tempo de meia-vida dos alvos escolhidos para estudo, o processo de transcrição dos parasitas foi interrompido e a quantidade de cada alvo foi avaliada em intervalos de tempo pré-definidos. A interrupção da transcrição foi feita como descrito por CLAYTON e colaboradores (2007), com a adição de sinefungina (interrompendo trans-splicing) e actinomicina D (interrompendo transcrição). Em cada etapa desse experimento grânulos de *TcDHH1* foram monitorados por IFI.

3.10.1 Inibição da transcrição

Parasitas em estágios distintos de diferenciação foram contados e diluídos para uma concentração de $2,5 \times 10^7$ células/ml de meio. Os experimentos foram feitos em duplicata experimental. Adicionou-se sinefungina (Sigma) a uma concentração final de 2,5 µg/ml e a cultura foi incubada a 28°C por 5 minutos. Antes de adicionar a actinomicina D (Sigma), uma alíquota de 2 ml foi retirada (t_0) e centrifugada a $7000 \times g$ por 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado. Após a adição de actinomicina D a uma concentração final de 10 µg/ml, alíquotas de 2 ml foram retiradas em tempos de 10 (t_1), 20 (t_2), 30 (t_3) minutos e 1 hora (t_4), foram centrifugadas como descrito acima e o sobrenadante foi desprezado. A partir dos sedimentos dos parasitas tratados, prosseguiu-se para a extração de RNA com auxílio do kit RNeasy (QIAGEN), de acordo com o item 3.4.6. Os RNAs foram dosados por meio do equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) e estocados a -20°C para posterior uso.

3.10.2 Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa é feita com o auxílio do kit Improm II™ (Promega) segundo o manual do fabricante. Cerca de 1 µg de RNA purificado em um volume total de 8,6 µl foi misturado com 1 µl de oligo-dT 10 µM e incubado sequencialmente a: 70 °C por 10 minutos, 4 °C por 5 minutos, 25 °C por 5 minutos e 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados: 4 µl de tampão 5X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 40 unidades de RNase OUT® e 1 µl da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42 °C por duas horas. Após esta etapa, o cDNA pode ser purificado por meio do filtro Microcon® (Millipore), como descrito no manual do fabricante. As amostras de cDNA purificado foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.10.3 PCR Quantitativa (PCR em Tempo Real)

PCR em tempo real é um método capaz de quantificar o cDNA presente na amostra original. Isso significa que, ao amplificarmos um inserto, ou um cDNA (que provém de uma população de mRNAs com taxas diferentes de transcrição) é possível quantificarmos a abundância de cada RNA presente na amostra extraída e compará-la com outros estágios do ciclo de vida. Além disso, podemos comparar esse RNA com outros RNAs que possuem diferentes taxas de transcrição. Isso ocorre uma vez que a detecção da quantidade de DNA amplificado é medida ciclo a ciclo, em tempo real, por meio da medição de fluorescência (de um reagente específico adicionado) que aumenta de acordo com o número de moléculas amplificadas.

Antes da utilização dos pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada alvo escolhido nos testes de tempo de meia vida, foi necessário padronizar as condições para cada PCR. Dessa forma, foram testados os mesmos oligonucleotídeos já mencionados no Quadro 05 e ainda foram confeccionados outros pares de nucleotídeos para cada alvo selecionado, específicos para a PCR quantitativa e podem ser visualizados no Quadro 08.

Gene	ID	Iniciador	Sequência	Amplicon (bp)
<i>TcAMA</i>	Tc00.1047053506437.10	F2 R2	5' CGTTGTGGGGAATTAAGGAGGACTG 3' 5' CCTCAAGACTGAGGGGCAAGCA 3'	89
<i>TcCYC</i>	Tc00.1047053506945.270	F2 R2	5' CGAACCAGGGCTGAGATCGCC 3' 5' CAAACTCGGCCCTGGTGCA 3'	118
<i>TcHYP</i>	Tc00.1047053509891.40	F2 R2	5' GCTGGGAATTGGCGGCAGGT 3' 5' TTTGCATGACGGCATCCGAAAAAGT 3'	135
<i>TcRBP5</i>	Tc00.1047053511481.70	F2 R2	5' TGCAGCGTCAAGGAAGGAAGGG 3' 5' AGTCCAGGGGAAGGCTGGCA 3'	186
<i>TcMASP</i>	Tc00.1047053504239.110	F2 R2	5' AGCTACCTGATGTCGGCCCA 3' 5' TCCATCAGGCACCGTATGATCGACA 3'	86
<i>TcMUC</i>	Tc00.1047053506131.20	F2 R2	5' TTCATCACCTTCTCAGCCACCGGA 3' 5' TTGGGTTCCCGGTAACGTGACAG 3'	103
<i>TcCTL1</i>	Tc00.1047053506585.40	F2 R2	5' CTCGGACGGCACCAGGGAAG 3' 5' TCGCACCGTCGCCAATGAGAC 3'	183
<i>TcCTL2</i>	Tc00.1047053510993.10	F2 R2	5' ACAACGTGCAAAGGCTTCTT 3' 5' CTCGTGCCAACTCCAAGTTT 3'	210

Quadro 08. Iniciadores utilizados para PCR quantitativa dos alvos de *TcDHH1*.

A reação foi feita a partir de 1 ng de cDNA, 4 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 10µl de *SYBR® Green* (Applied Biosystems) em um volume total de 20 µL. O programa utilizado conteve desnaturação inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com um passo final de dissociação. A leitura da emissão fluorescente foi realizada a cada etapa de extensão. Uma diluição seriada de 4 concentrações conhecidas de cDNA, com razão de 1:5 para cada ponto serviu como curva padrão. Para a comparação dos dados com genes abundantes foram utilizados iniciadores para amplificação dos genes da proteína *TcL9* da subunidade ribossomal 60S (Tc00.1047053506835.30), da proteína *Tcα-tubulina* (Tc00.1047053411235.9) e da proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*TcGAPDH*, Tc00.1047053510105.230) que podem ser visualizados no Quadro 09.

Gene	ID	Iniciador	Sequência	Amplicon (bp)
<i>TcL9</i>	Tc00.1047053506835.30	F1	5' CGAACCTTCACTGCCGTTCTGTTG 3'	214
		R1	5' GCCGGCGAACACGCTTCTCG 3'	
		F2	5' CCTTCACTGCCGTTCTGTTGTTTG 3'	68
		R2	5' ATGCGAGAGTGCCGTGTTGATGGT 3'	
<i>Tcα-Tubulina</i>	Tc00.1047053411235.9	F1	5' GGTGTTTGAGCCGGCGTCGA 3'	208
		R1	5' CACCACCGTAGGGGGCTGGT 3'	
		F2	5' TCGGCGGAGAAGGCATACCAC 3'	79
		R2	5' TCATCATCGACGCCGGCTCAAACA 3'	
<i>TcGAPDH</i>	Tc00.1047053510105.230	F1	5' CTCACCGCGCGTCTGGAGAG 3'	205
		R1	5' ACGAGATGAGCTTCACGAGGCGA 3'	
		F2	5' AGGTCGGCGCGGTGGTCGTGGTC 3'	87
		R2	5' TCTTTGCGCCGGCCTGAATGTGCT 3'	

Quadro 09. Iniciadores utilizados para normalização da PCR quantitativa.

3.10.4 Análise dos Dados

Em uma PCR quantitativa, é ideal que a eficiência da PCR seja de 100%, ou seja, que a cada ciclo, o produto de PCR deva dobrar em quantidade. Essa eficiência é calculada através do coeficiente angular da curva padrão e para uma eficiência de 100%, o coeficiente angular ideal é de -3,32. Reações de PCR com eficiência entre 90 e 110% são ótimas, portanto, o coeficiente angular deve variar de -3,58 a -3,10, com algumas exceções.

Além disso, para avaliar o desempenho de um par de oligonucleotídeos iniciadores, as diluições em série da curva padrão devem retornar amplificações que se aproximem à reta da curva padrão. Portanto, esse parâmetro pode ser avaliado pelo coeficiente de correlação (R^2), que estima o quanto cada ponto se afasta da reta proposta. O coeficiente de correlação deve ser maior do que 0,99 para que a reta seja confiável.

Cada curva padrão foi construída em triplicatas técnicas e biológicas e a partir disso, foi possível calcular as quantidades de produto de PCR em cada ponto de parada de transcrição (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 e T_4 , como descrito no item 3.10.1, Material e Métodos) e construir a curva de decaimento para cada alvo.

Uma vez que o decaimento de mRNA pode ser considerado uma reação cinética de primeira ordem (onde apenas a quantidade inicial de material afeta a equação),

quando plotamos um gráfico de decaimento semilogarítmico (Ln da quantidade restante de material em cada tempo) *versus* tempo (em minutos), podemos utilizar o coeficiente angular da reta resultante como sendo menos a constante de equilíbrio de decaimento(-k) (MAQUAT & KILEDJIAN, 2008).

A partir disso, seguindo a equação geral de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para reações de primeira ordem, temos que:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

onde, k é a constante de equilíbrio de decaimento e o tempo de meia-vida é calculado em minutos. A partir de todas essas informações acima, foi possível calcular o tempo de meia-vida para cada alvo escolhido.

3.11 Montagem da Rede de Interação de DHH1

Existem diversas maneiras de montarmos uma rede biológica, a mais simples delas baseia-se na busca de dados de interação já existentes na literatura sobre proteínas e moléculas escolhidas de diversos organismos conhecidos. A partir dessa lista de interações, verdadeiras ou não (cabe aqui mencionar que simplesmente é a proposta de uma rede, um modelo que pode conter erros) podemos montar um modelo gráfico de visualização onde os vértices representam moléculas (proteínas, DNA, RNA, metabólitos) e as arestas representam as interações. Cada aresta ainda pode ser representada de maneira a mostrar informações das interações, onde interações comprovadas com maior confiabilidade são representadas por arestas mais espessas, por exemplo.

Diversos tipos de evidências podem ser utilizados para montagem de redes biológicas, e muitas delas foram encontradas na literatura e utilizadas neste trabalho, dentre os quais podemos citar:

- a. Evidência de interação direta: ocorre quando a interação direta entre duas proteínas é evidenciada pela purificação direcional de apenas uma delas, mas há recuperação de ambas ao final do experimento (ex.: imunoprecipitação, *pulldown*). Tais experimentos podem ter caráter pontual, visando buscar uma ou poucas proteínas (por exemplo, submetendo a

amostra a um Western *blot*), ou caráter *highthrouput*, ao submeter as amostras à espectrometria de massas.

- b. Evidência de colocalização: Quando apenas a localização celular de ambas as proteínas é coincidente em um mesmo estágio do ciclo de vida.
- c. *Datamining*: É a busca por similaridade de proteínas conhecidas em outros organismos, funcionalmente descritas, a partir de sequências genômicas e dados complementares, como por exemplo, sintenia entre genes. Neste trabalho, não nos baseamos apenas em *datamining*, pois levamos em consideração outros trabalhos, que já haviam usado essa abordagem e comprovaram a existência, a função e/ou localização das proteínas estudadas.
- d. Comprovação de existência: A partir do *datamining*, devem ser feitos experimentos posteriores que demonstrem que a proteína encontrada existe e é funcional. Tais dados podem ser conseguidos a partir de métodos convencionais de clonagem e expressão da proteína selecionada e análises por anticorpos ou métodos *high-throughput*, como proteômica.

A partir da junção de dados obtidos neste trabalho, com dados de diversos tipos de evidências, acima citados (e especificados em Resultados, Quadro 13), pudemos propor uma rede para leveduras que serviu como molde para uma rede de interação da proteína DHH1 para tripanossomatídeos (mais especificamente *T. cruzi* e *T. brucei*).

4. RESULTADOS

Esse projeto visa elucidar qual a função de grânulos de *TcDHH1* na estabilidade de mRNAs em *Trypanosoma cruzi*. Para tanto, várias abordagens foram utilizadas de maneira que os resultados pudessem ser validados por mais de uma técnica a fim de responder a pergunta chave.

4.1 Análise do conteúdo protéico dos grânulos que contém a proteína *TcDHH1*

4.1.1 Clonagem e expressão de proteínas recombinante para produção de antissoros

4.1.1.1 *TcDHH1*

Uma vez que não havia uma quantidade significativa de anticorpos disponíveis para a proteína *TcDHH1*, as clonagens, expressões e purificação de proteína recombinante foram refeitos para produção de anticorpos policlonais. O gene *TcDHH1* já havia sido clonado em vetor de entrada pENTRTM/D-TOPO® (HOLETZ 2008), e transformado em bactérias *E. coli* DH5α. Seguindo a metodologia descrita no item 3.6.7, foi possível fazer a recombinação do inserto contido no vetor de entrada em três vetores de destino: pDESTTM15 e pTcTAP e pTcGFP. A partir desses vetores duas abordagens principais foram possíveis: A primeira, foi a produção de proteína solúvel fusionada à cauda GST em pDESTTM15. E a segunda, a transfecção de *T. cruzi* tanto com a proteína recombinante fusionada à proteína A (ocasionando uma leve superexpressão da proteína no parasita e possibilitando a utilização da etiqueta (“Tag”) de proteína A como alvo para imunoprecipitação) e fusionada à GFP para ensaios de localização celular. A Figura 07 mostra que a recombinação nos vetores pTcTAP (TapTag) e pDESTTM15 foi feita com êxito, uma vez que no perfil eletroforético da PCR de colônias (item 3.5.3) foi observada a banda de 1221 pares de bases, coerente com o tamanho esperado do gene de *TcDHH1* clonado.

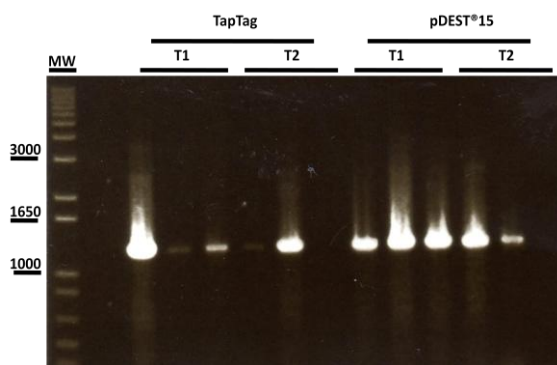


Figura 07. Perfil eletroforético de PCR de colônias de *TcDHH1* nos vetores pDEST®15 e pTcTAP em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. Cada transformação teve três colônias selecionadas para a confirmação da entrada do inserto no vetor pDEST®15 e no pTcTAP. T1: Transformação 1 e T2: Transformação 2;

A expressão solúvel da proteína fusionada à GST foi analisada utilizando o protocolo descrito no item 3.6.10 da seção Material e Métodos e os resultados podem ser vistos (Figura 08) pelos ensaios de Western *blot* com o anticorpo α -GST (diluição 1:300). A fusão com GST aumentou a porcentagem de proteína na fração solúvel, se comparado com a fração solúvel da proteína previamente expressa fusionada à cauda de histidinas (dados não mostrado) (pDEST™17). A partir da fração solúvel, fizemos uma purificação da proteína fusionada à GST segundo o protocolo descrito no item 3.6.10, com resina Glutathione Sepharose® 4B (Amersham-Biosciences). A purificação foi feita de maneira satisfatória, uma vez que a proteína ligou fortemente à resina e só foi detectada nas frações eluídas com glutathione reduzida, não sendo observada nas frações obtidas durante as etapas de lavagem (Figura 09).

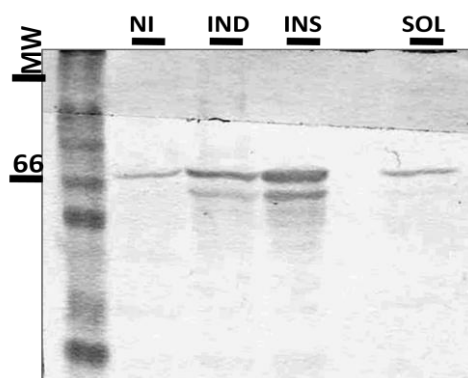


Figura 08. Western *blot* de *TcDHH1*-GST recombinante com anticorpo α -GST (Diluição 1:300) para verificar a expressão da proteína após ensaio de indução com IPTG. MW- padrão de massa molecular representado em kDa – SDS-6H (Sigma). NI: Não induzido; IND: Fração total induzida; INS: Fração insolúvel; SOL: Fração solúvel.

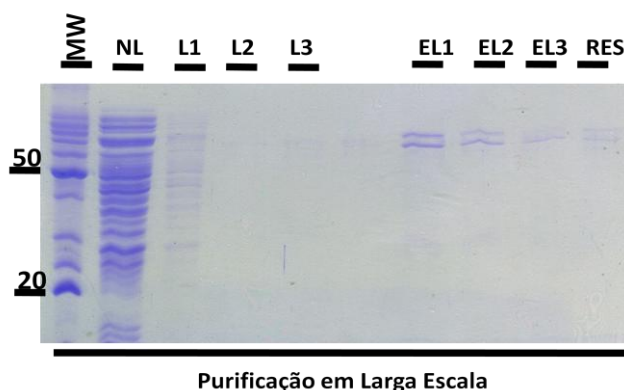


Figura 09. Perfil eletroforético da purificação em larga escala de *TcDHH1-GST* recombinante em coluna de Glutathione Sepharose® 4B em gel de poliacrilamida 13% MW-padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). NL: Fração não ligada; L1, L2 e L3: Lavagens 1, 2 e 3; EL1, EL2 e EL3: Eluídos 1, 2 e 3; RES: Resina.

Como o gene *TcDHH1* também já havia sido recombinado em pDEST™17 (proteína fusionada à uma cauda de histidinas) anteriormente em nosso laboratório, o vetor encontrava-se disponível para uso (HOLETZ, 2008) e foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* DH5α. As bactérias contendo o plasmídeo pDEST™17 e o inserto *TcDHH1* foram semeadas em placas de LB-ampicilina sólido e foram utilizadas para a expressão da proteína e produção de anticorpos policlonais.

A proteína fusionada à cauda de histidinas foi expressa eficientemente, a partir do que foi descrito no item 3.6.9 e o resultado pode ser visualizado na Figura 10. A fração do eluído (EL) foi submetida a um gel preparativo e a banda correspondente à *TcDHH1* foi cortada e eletroeluída. Para quantificação, foi utilizado o método de comparação a uma curva de BSA (Figura 11). Dessa maneira pode-se observar que as duas frações eluídas de *TcDHH1* (EL1 e EL2) estão com alto grau de pureza (apenas uma banda do tamanho esperado de ~55 kDa no gel) e com concentração aproximada de 1,0 mg/ml. Dessa maneira prosseguimos para a inoculação da proteína recombinante em camundongos para a produção de anticorpos policlonais segundo descrito no item 3.7.1.

A proteína fusionada à cauda de GST será usada futuramente para ensaios de *pulldown*, a fim de detectar a interação da proteína solúvel com outras proteínas contidas em extratos de parasitas.

Os antissoros de três camundongos foram testados com relação à especificidade de reconhecimento da proteína *TcDHH1* (Figura 12). Uma vez que os soros e os lavados peritoneais não reconheceram de maneira específica a proteína *TcDHH1* em extrato

protéico de *T. cruzi*, seguimos para a purificação dos mesmos como descrito no item 3.7.2, o que tornou o antissoro altamente específico, como pode ser visualizado na Figura 13.

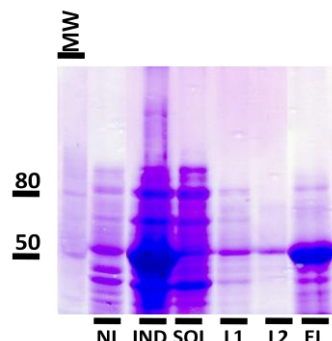


Figura 10. Perfil eletroforético de *TcdDHH1-His* recombinante em gel de poliacrilamida 13% MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). NI: Fração não induzida, IND: Fração total induzida; SOL: Fração solúvel, L1 e L2: Lavagens; EL: Fração eluída.

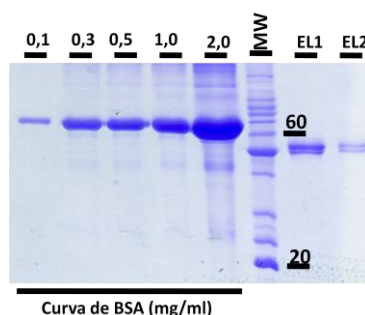


Figura 11. Perfil eletroforético de *TcdDHH1-His* recombinante purificada para estimativa de pureza e concentração em gel de poliacrilamida 13%. MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen). NI: Fração não induzida, IND: Fração total induzida; SOL: Fração solúvel, L1 e L2: Lavagens; EL1 e 2: Frações eluídas 1 e 2.

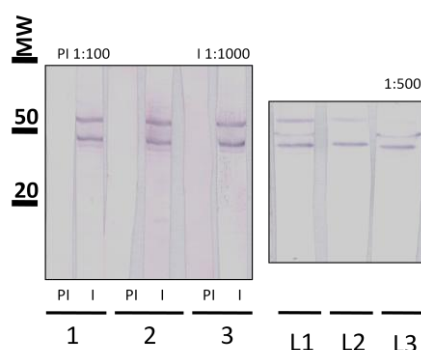


Figura 12. Western *blot* com antissoros não purificados contra a proteína *TcdDHH1*. A. Antissoros não purificados de três camundongos (1, 2 e 3) PI: Soro Pré-Imune (Diluição 1:100); I: Soro Imune (Diluição 1:1000); B. Lavado peritoneal dos camundongos 1, 2 e 3 respectivamente (Diluição 1:500).

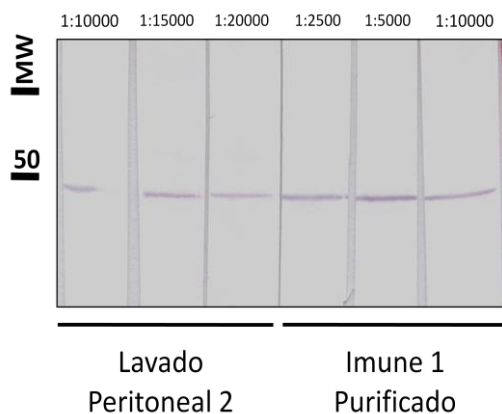


Figura 13. Western blot com antissoros contra a proteína *TcDHH1*. As diluições testadas estão indicadas na porção superior da Figura.

Com os anticorpos específicos, seguimos para testes de imunofluorescência, para verificar se a localização da proteína *TcDHH1* condizia com as imunolocalizações prévias de HOLETZ e colaboradores (2007). O padrão granular típico de *TcDHH1* pode ser visualizado na Figura 14 e assim pudemos utilizar os anticorpos nos ensaios de colocalização por imunofluorescência indireta com outras proteínas e por FISH com os alvos selecionados.

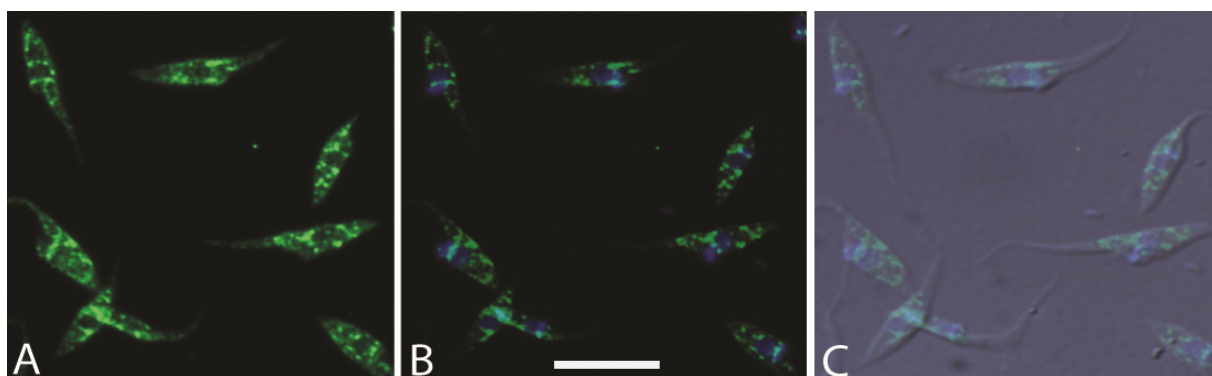


Figura 14. Ensaios de imunofluorescência contra a proteína *TcDHH1* em *T. cruzi*. Anticorpo primário (anti-*TcDHH1*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200. Em verde, marcação de grânulos de *TcDHH1*; A. Marcação de *TcDHH1*; B. Sobreposição da marcação de *TcDHH1* com marcação de cromatina e cinetoplasto (DAPI, em azul); C. Sobreposição de B com DIC; Barra = 10µm.

4.1.1.2 TcXRNA

A proteína *TbXRNA* descrita por LI e colaboradores (2006), de *T. brucei*, não possui apenas um gene correspondente em *T. cruzi*. No próprio trabalho os autores citam que duas possíveis proteínas correspondam à proteína de *T. brucei*: Uma que comporta a porção inicial da proteína (266 aminoácidos), juntamente com o domínio XRN-N (mostrado em vermelho, na Figura 15), e a segunda porção que equivale aos 816 aminoácidos finais. A representação do alinhamento entre *TbXRNA* e ambas as *TcXRNA* podem ser encontrados na Figura 15, e o alinhamento completo pode ser visualizado no Apêndice A. É possível que ambas as proteínas descritas em *T. cruzi* sejam uma só que equivalem à *TbXRNA*, isto porque a porção inicial do gene de *TcXRNA* não possui códon de parada, a porção final não possui ATG inicial e ambas encontram-se nas bordas de um *contig*. Mesmo assim, em uma tentativa inicial de PCR com o oligonucleotídeo iniciador F da porção 1 com R da porção 2 (item 3.6.1, Material e Métodos), não obtivemos com sucesso nenhum produto de PCR amplificado.

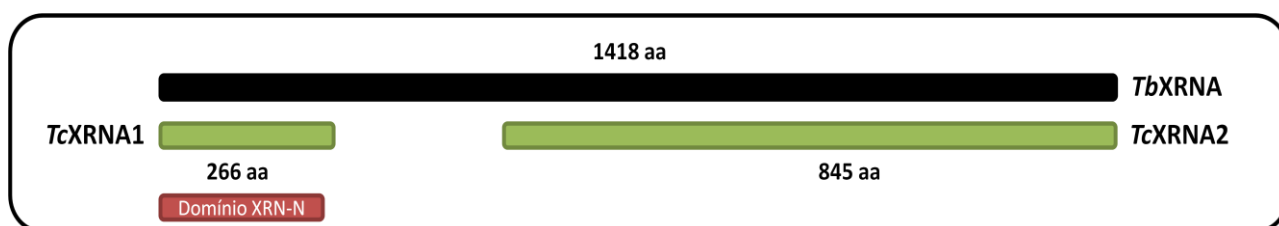


Figura 15. Representação esquemática do alinhamento entre *TbXRNA* e suas duas ortólogas correspondentes em *T. cruzi*.

As duas frações do gene da proteína *TcXRNA* foram amplificados com os iniciadores descritos na seção Material e Métodos (item 3.6.1). Abaixo, o perfil de migração eletroforético no qual as bandas são condizentes com os tamanhos esperados em pares de base:

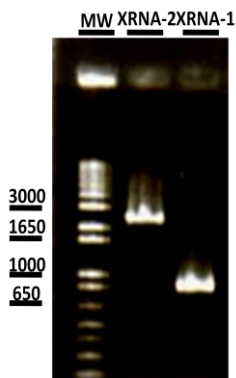


Figura 16. Perfil eletroforético de produtos de PCR da *TcXRNA* em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases; XRNA-1 e XRNA-2: Porções 1 e 2 do gene XRNA, respectivamente.

Os insertos foram purificados para recombinação com o vetor de entrada como descrito no item 3.6.6. Após inserção do produto de PCR no vetor de entrada pDONR™221, bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas e plaqueadas em meio LB-kanamicina conforme descrito no item 3.5.2. Algumas colônias foram selecionadas para a PCR de colônias (item 3.5.3) como método de confirmação da presença do vetor com o inserto em questão (imagens não mostradas).

As duas regiões do gene foram clonadas e seguiu-se para purificação dos plasmídeos e recombinação com o vetor de destino (como descrito nos itens 3.6.4 e 3.6.7). Bactérias competentes foram transformadas e selecionadas para confirmação por PCR dos plasmídeos purificados. Os dois insertos encontram-se no vetor de destino e as bandas correspondem aos tamanhos esperados para cada gene selecionado (Figura 17). A partir do vetor de destino purificado, bactérias da linhagem BL21(DE3)pLys foram utilizadas para expressão das proteínas em questão.

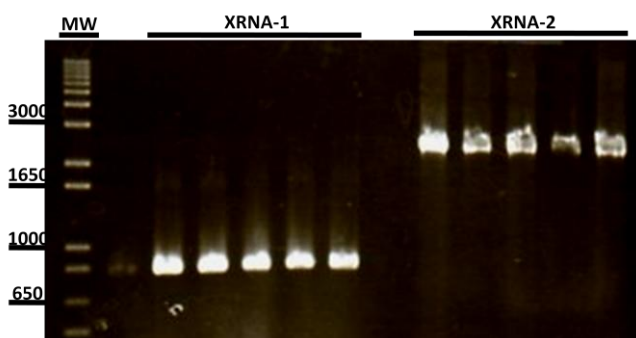


Figura 17. Perfil eletroforético de PCR da minipreparação de *TcXRNA1* e 2 no vetor pDEST@17 em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases.

A porção 1 da proteína *TcXRNA* foi expressa e purificada com êxito, o perfil eletroforético da proteína eletroeluída pode ser visualizado na Figura 18 e a concentração da proteína foi estimada em 1,5 mg/ml, em comparação à curva de BSA. A porção 2 da proteína foi expressa em menor quantidade e ainda pretende-se otimizar o protocolo de expressão com testes futuros de indução.

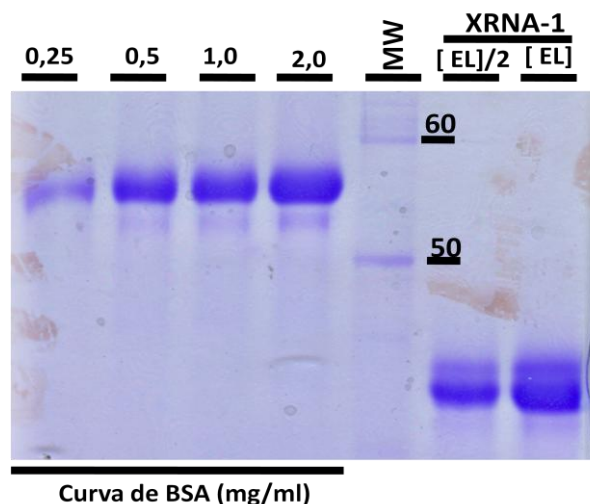


Figura 18. Perfil eletroforético da porção 1 purificada da proteína *TcXRNA* recombinante em gel de poliacrilamida 13% MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen).

A fração eluída da porção 1 foi submetida a um gel preparativo e a banda correspondente à *TcXRNA* foi cortada e eletroeluída. A partir disso, seguimos para inoculação em camundongos e para produção de anticorpos policlonais segundo descrito no item 3.7.1.

Os antissoros de dois camundongos foram testados com relação à especificidade para a proteína *TcXRNA* (Figura 19). Um dos antissoros (camundongo 1) reconheceu especificamente a proteína *TcXRNA* (aproximadamente 160kDa), e, portanto, foi utilizado para os outros experimentos. O antissoro do camundongo 2 será utilizado para purificação e será testado futuramente. Os antissoros pré-ímmes foram testados e nenhuma banda foi detectada.

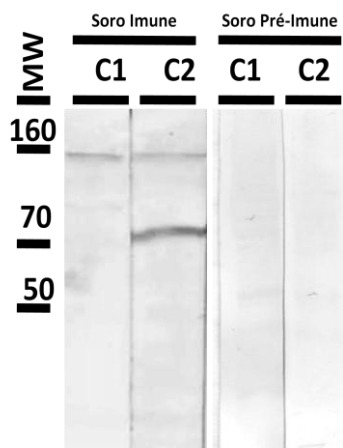


Figura 19. *Western blot* com antissoros contra a proteína *TcXRNA* e seus respectivos pré-ímenes. Camundongos 1 e 2: C1 e C2; A diluição testada para ambos os antissoros foi 1:50. MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen).

4.1.1.3 Complexo CCR4-NOT

A partir dos genes descritos em *T. brucei* (SCHWEDE, 2008) e em leveduras (TUCKER *et al.*, 2001), buscamos ortólogos para os três principais componentes do complexo CCR4-NOT: CCR4, NOT1, POP2 (ou CAF1). Uma vez que a proteína *TcNOT1* já havia sido identificada em trabalhos prévios de nosso grupo (ALVES *et al.*, 2010), as proteínas POP2 e CCR4 tiveram que ser analisadas por homologia aos genes descritos em outros organismos (genes selecionados em *T. cruzi* podem ser vistos no Quadro 01, em Material e Métodos).

A proteína *TcCCR4*, que foi descrita como não funcional em *T. brucei*, foi escolhida por sua similaridade à proteína CCR4 de *Saccharomyces cerevisiae* (ID encontra-se no Quadro 01 e os alinhamentos com Ccr4p de leveduras, no Apêndice B). As proteínas CCR4 tanto em *T. cruzi* quanto em *T. brucei* parecem não ser funcionais por não apresentar os domínios ricos em leucina (referentes aos resíduos 336-467 em *S. cerevisiae*), que são responsáveis pela interação entre as proteínas CCR4 e POP2, essencial para a efetividade da desadenilase CCR4 (CLARK *et al.*, 2004). Uma vez que a proteína POP2 é também chamada de CAF1 (*CCR4 associated factor*) e visto que não temos certeza se existe uma CCR4 funcional em *T. cruzi*, resolvemos manter o nome POP2 no lugar de CAF1 (como é chamada em *T. brucei*).

Em *T. cruzi*, existem dois possíveis candidatos a ortólogos da proteína *TbCAF1* que foram utilizados em nossos experimentos e se encontram no Quadro 10 com informações específicas de cada um; O alinhamento esquemático entre eles pode ser

visualizado na Figura 20. A proteína *TbCAF1*, identificada em *T. brucei*, possui todos os domínios catalíticos conservados: O primeiro começando no resíduo 78, possui uma sequência consenso DTEF em quase todos os organismos analisados (em *S. cerevisiae* a sequência STEF); O resíduo Asp na posição 232 é universalmente conservado e a sequência HQAGSD a partir da posição 264 também foi consenso em quase todos os organismos analisados (exceto *S. cerevisiae*) (SCHWEDE *et al.*, 2007). Após alinhamento entre as sequências protéicas de *TbCAF1* e as duas candidatas de *T. cruzi* (Apêndice C), foi possível perceber que os três domínios catalíticos estão presentes em todas elas.

Nome	ID	Descrição	Tamanho	Peso Molecular
<i>TbCAF1 (TbPOP2)</i>				
<i>TbCAF1</i>	Tb927.6.600	CCR4 associated factor, putative (CAF1)	351 aa	38863 Da
<i>TcPOP2</i>				
<i>TcPOP2A</i>	Tc00.1047053511827.60	CCR4 associated factor, putative	415 aa	46390 Da
<i>TcPOP2B</i>	Tc00.1047053510535.60	CCR4 associated factor, putative	336 aa	37561 Da

Quadro 10. Genes ortólogos de *T. cruzi* a *TbCAF1*.



Figura 20. Representação esquemática do alinhamento entre proteínas ortólogas de *T. cruzi* a *TbCAF1*.

Em alinhamentos com leveduras, os genes de *T. cruzi* possuem cerca de 33% de similaridade, sendo que o domínio CAF1 é altamente conservado (Apêndice B). Além disso, é interessante mencionar que *TcPOP2A* é cerca de 10 kDa maior do que *TcPOP2B*, uma vez que a sequência gênica referente à segunda inicia-se no segundo códon de início (ATG) da fase aberta de leitura (ORF, *open reading frame*). O gene *TcPOP2A* foi utilizado para clonagem, expressão, produção de anticorpos e obtenção de linhagens transfectantes, enquanto que o *TcPOP2B* foi utilizado somente para obtenção de linhagens transfectantes.

Os genes do complexo CCR4-NOT foram amplificados com os iniciadores descritos na seção Material e Métodos (item 3.6.1). Abaixo, o perfil de migração eletroforético no qual as bandas são condizentes com os tamanhos esperados em pares de base:

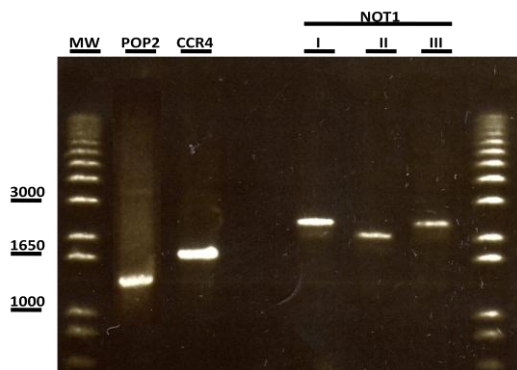


Figura 21. Perfil eletroforético de produtos de PCR do complexo CCR4-NOT em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases.

Os insertos foram purificados para recombinação com o vetor de entrada como descrito no item 3.6.4. Após inserção do produto de PCR no vetor de entrada, bactérias competentes foram transformadas e plaqueadas em meio LB-kanamicina conforme descrito no item 3.5.2. Algumas colônias foram selecionadas para a PCR de colônias (item 3.5.3) como método de confirmação da presença do vetor com o inserto em questão (Figura 22).

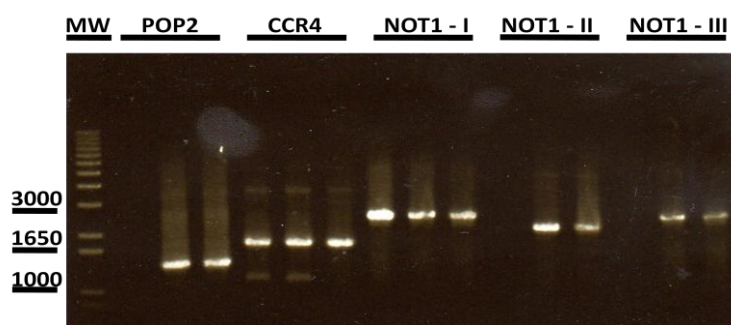


Figura 22. Perfil eletroforético de PCR de colônias do complexo CCR4-NOT em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. Cada transformação teve três colônias selecionadas para a confirmação da entrada do inserto no vetor pDONR®221.

Todos os genes foram clonados e confirmados por sequenciamento e seguiram para purificação dos plasmídeos e recombinação com o vetor de destino (como descrito

no item 3.6.7). Após recombinação com o vetor de destino, bactérias competentes foram transformadas e selecionadas para confirmação por PCR de plasmídeo purificado. Todos os insertos encontravam-se no vetor de destino e as bandas corresponderam aos tamanhos esperados para cada gene selecionado (Figura 23). A partir do vetor de destino purificado, bactérias da linhagem BL21(DE3)pLys foram utilizadas para expressão das proteínas em questão.

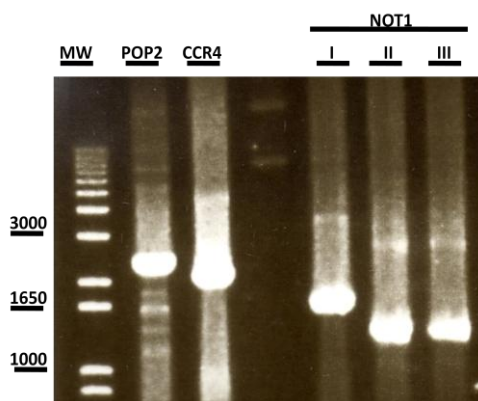


Figura 23. Perfil eletroforético de PCR da minipreparação do complexo CCR4-NOT.

Plasmídeos contendo cada inserto em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. Cada transformação teve três colônias selecionadas para a confirmação da entrada do inserto no vetor pDEST®17.

Os genes clonados em vetor de destino foram utilizados para testes de expressão (item 3.6.9) e as proteínas *TcPOP2* e *TcCCR4* foram induzidas com êxito (imagens não mostradas). Nenhuma das porções da proteína *TcNOT1* foi expressa e outros oligonucleotídeos iniciadores foram feitos para novas clonagens e testes futuros.

A proteína *TcPOP2* fusionada à cauda de histidinas foi expressa com alta eficiência enquanto que a proteína *TcCCR4* foi expressa em menor quantidade. A fração eluída de *TcPOP2* foi submetida a um gel preparativo e a banda correspondente à proteína foi cortada e eletroeluída (imagem não mostrada). A partir disso, seguimos para inoculação em camundongos e obtenção de anticorpos policlonais. O processo de inoculação encontra-se em andamento e, dessa forma, os antissoros ainda não foram coletados para testes.

4.1.2 Produção de linhagens de *T. cruzi* transfectantes

4.1.2.1 Expressão de *TcDHH1* fusionada a GFP e TAP

Os parasitas foram transfectados com dois vetores contendo a proteína *TcDHH1*: pTcGFP e pTcTAP (item 3.4.7). Após a seleção, foram feitos extratos protéicos dos transfectantes e testados por Western *blot* com anticorpos anti-etiquetas (anti-GFP na diluição 1:100 e anti-Proteína A na diluição 1:40000) e anti-*TcDHH1* (diluição 1:1500) para confirmar o tamanho esperado da proteína fusionada à etiqueta em questão (Figura 24). Uma vez que para ambas as construções o anticorpo α -*TcDHH1* reconheceu tanto a banda de 47 kDa (proteína endógena) quanto as bandas de proteína fusionada (~80 kDa, tanto para pTcGFP quanto para pTcTAP), as fusões ocorreram de maneira a não modificar o epítipo reconhecido pelo anticorpo, o que provavelmente denota alta similaridade com a proteína nativa e podem ser usadas para estudos funcionais. Dessa maneira, seguimos para a localização celular utilizando os dois transfectantes e as imagens podem ser vistas a seguir (Figura 25).

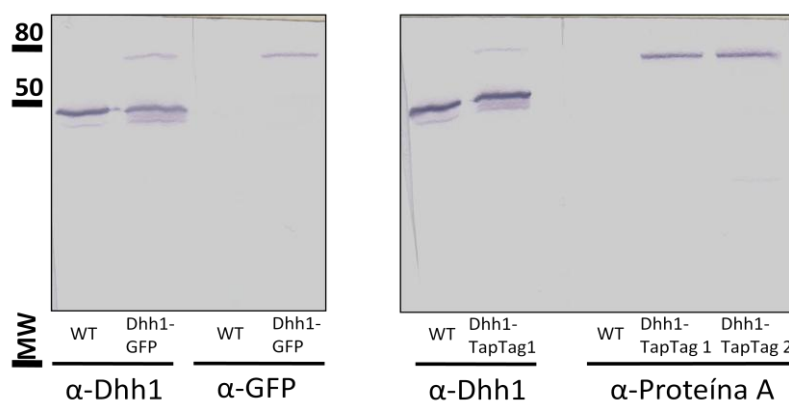


Figura 24. Western *blot* das populações mistas transfectantes *TcDHH1*-GFP e *TcDHH1*-TAP1 e 2 comparadas à linhagem selvagem (WT). MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen)

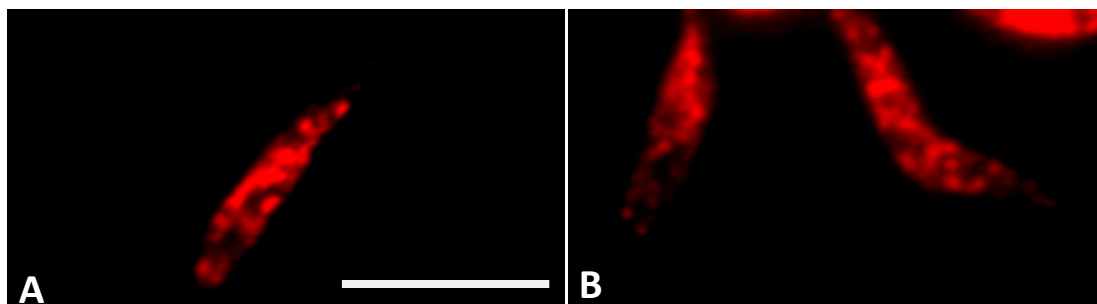


Figura 25. Imunofluorescência com populações transfectantes de *TcDHH1*-TAP. (A) e pTcGFP-DHH1 (B) com anticorpo primário anti-proteína A (Diluição 1:40000) e secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 546 (Diluição 1:400), Barra = 10 μ m.

O padrão granular da proteína *TcDHH1* pode ser visualizado com evidência nas duas populações. Este resultado, juntamente com o resultado de Western *blot*, no qual pode ser observado pequena quantidade da proteína exógena nos transfectantes, demonstram uma leve superexpressão da proteína.

4.1.2.2 Expressão de *TcPOP2* fusionada a GFP e TAP

Os parasitas foram transfectados com dois vetores contendo a proteína *TcPOP2*: pTcGFP e pTcTAP (item 3.4.7). Após a seleção, foram feitos extratos protéicos dos transfectantes e testados por Western *blot* com anticorpos anti-etiquetas (anti-GFP na diluição 1:100 e anti-Proteína A na diluição 1:40000) para confirmar o tamanho esperado da proteína fusionada à etiqueta em questão (Figura 26). Para ambas as construções, o anticorpo reconhece as bandas da proteína *TcPOP2* (~37kDa) adicionado às caudas de proteína A e GFP (adicionando cerca de 30 kDa à proteína). Dessa maneira, seguimos para verificar a localização da proteína *TcPOP2* a partir das linhagens transfectantes.

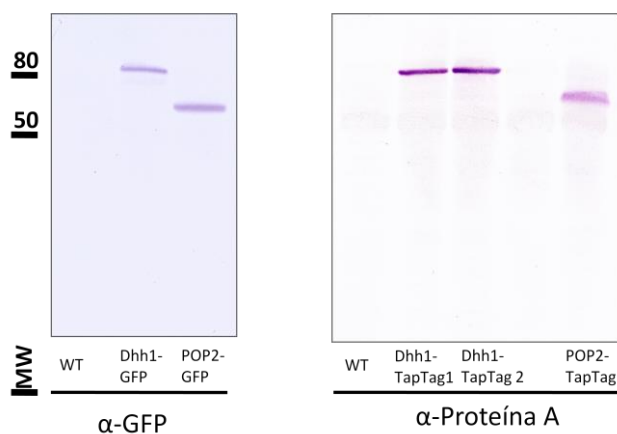


Figura 26. Western *blot* das populações mistas transfectantes *TcPOP2*-GFP e *TcPOP2*-TAP comparadas à linhagem selvagem (WT) e às linhagens transfectantes previamente confirmadas de *DHH1* (*TcDHH1*-GFP e *TcDHH1*-TAP1 e 2). MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen)

4.1.3 Localização celular de *TcXRNA* e *TcPOP2* em *T. cruzi*

4.1.3.1 *TcXRNA* durante o ciclo de vida de *T. cruzi*

A expressão da proteína *TcXRNA* foi avaliada durante o ciclo de vida do parasita nos seguintes estágios: epimastigotas 3 dias (Epi3d) e 5 dias (Epi5d), epimastigotas submetidos à estresse nutricional (Stress) e epimastigotas aderidas ao substrato após 24h (Ad24), tripomastigotas metacíclicos (Meta), tripomastigotas sanguíneos (Tripo), amastigotas (Ama) e controle negativo de amastigotas, células Vero (Vero); os extratos de tripomastigotas sanguíneos, amastigotas e células Vero foram gentilmente cedidos pela doutoranda Lígia Kalb, do laboratório do Dr. Maurílio Soares. Utilizamos o extrato de células Vero como controle negativo para garantir que o resultado observado correspondesse a proteína de formas amastigotas e não de células Vero.

A partir do Western *blot* dos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (Figura 27), é perceptível que a proteína *TcXRNA* (seta azul) está presente em maior quantidade nos estágios epimastigotas 3 e 5 dias, parasitas submetidos à estresse nutricional e após 24 horas de adesão ao substrato, enquanto em tripomastigotas (tanto metacíclicos quanto sanguíneos) existe uma diminuição no nível de expressão. Em amastigotas e células Vero não foi possível verificar a presença da proteína. Existe uma proteína de aproximadamente 200 kDa que é detectada em alguns estágios com certa abundância (Meta, Tripo e Ad24, seta vermelha).

Como normalizador da quantidade de proteína total aplicada, utilizamos o antissoro que reconhece a proteína “*TcActina*” (cedido pela doutoranda Lígia Kalb) que não é regulada durante o ciclo de vida (Figura 27).

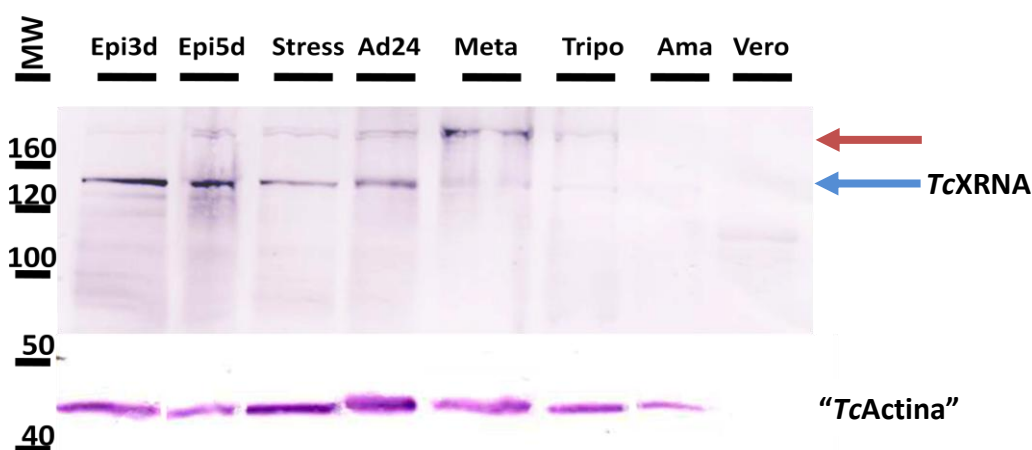


Figura 27. Western blot do ciclo de vida da proteínas *TcXRNA*. O anticorpo anti-*TcXRNA* referente ao camundongo 1 foi utilizado na diluição 1:100 e a proteína “*TcActina*” foi utilizada como controle para a quantidade de proteína colocada de cada extrato. Epi3d e Epi5d (epimastigotas 3 e 5 dias); Stress (epimastigotas submetidas à estresse nutricional); Ad24 (epimastigotas aderidas ao substrato após 24h); Meta (tripomastigotas metacíclicos); Tripo (tripomastigotas sanguíneos); Ama (amastigotas); Vero (controle negativo de amastigotas, células Vero). MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen)

4.1.3.2 As proteínas POP2 e XRNA estão localizadas em foci citoplasmáticos

A partir dos anticorpos produzidos contra a proteína *TcXRNA* (item 3.7.1) e das linhagens transfectantes da proteína *TcPOP2* (descrito em 3.4.7), pudemos analisar a localização celular de ambas as proteínas (Figuras 28, 29 e 30).

O padrão granular de *TcPOP2* pode ser visualizado tanto no transfectante *TcPOP2*-GFP (Figura 28) quanto no transfectante *TcPOP2*-TAP (Figura 29) por todo o parasita, enquanto que o padrão granular da *TcXRNA* pode ser visualizado com maior intensidade no citoplasma (Figura 30). Os antissoros pré-ímmes dos camundongos 1 e 2 para a proteína *TcXRNA* foram testados e não houve fluorescência expressiva, como pode ser visto na Figura 30. Como controle negativo para a imunofluorescência da proteína *TcPOP2*, populações selvagens (WT) foram submetidas à imunofluorescência com os anticorpos α -GFP e α -Proteína A e não obtivemos sinais de fluorescência significativos (Figura 31).

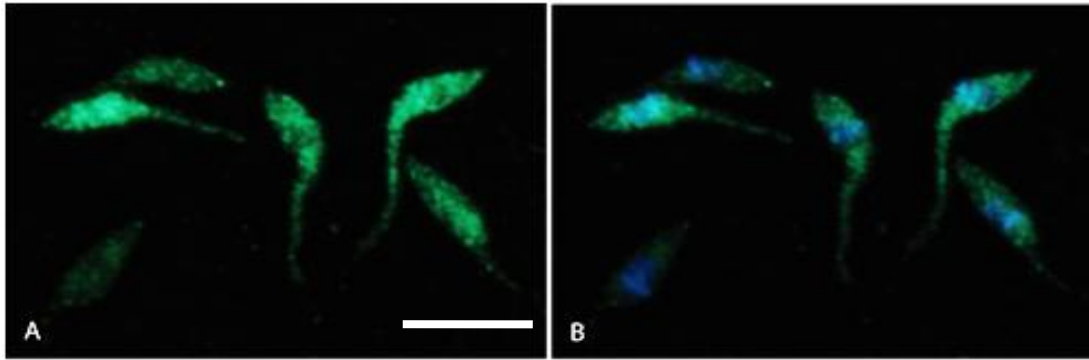


Figura 28. Imunofluorescência com população transfectante de *TcPOP2-GFP* com anticorpo primário anti-GFP (Diluição 1:50) e secundário anti-IgG de camundongo conjugados a Alexa 488 (Diluição 1:200). O padrão granular da proteína *TcPOP2* pode ser visualizado em (A), e em sobreposição com núcleo e cinetoplasto corados com DAPI em (B). Barra = 10µm.

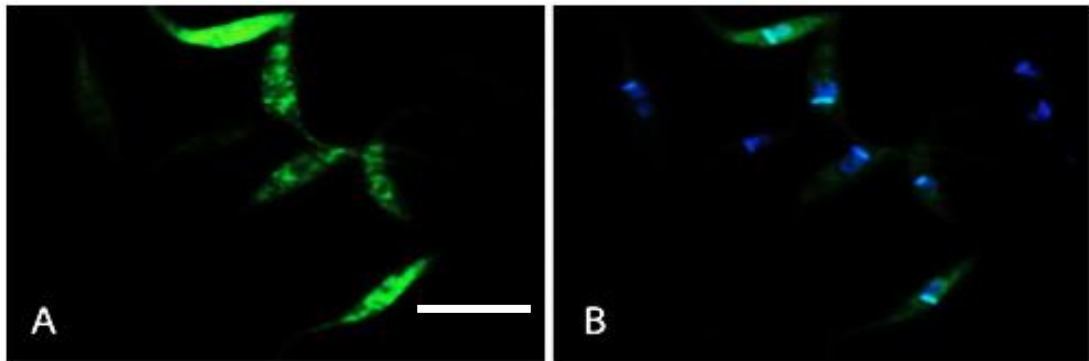


Figura 29. Imunofluorescência com população transfectante de *TcPOP2-TAP* com anticorpo primário anti-Proteína A (Diluição 1:20000) e secundário anti-IgG de camundongo conjugados a Alexa 488 (Diluição 1:200). O padrão granular da proteína *TcPOP2* pode ser visualizado em (A), e em sobreposição com núcleo e cinetoplasto corados com DAPI em (B). Barra = 10µm.

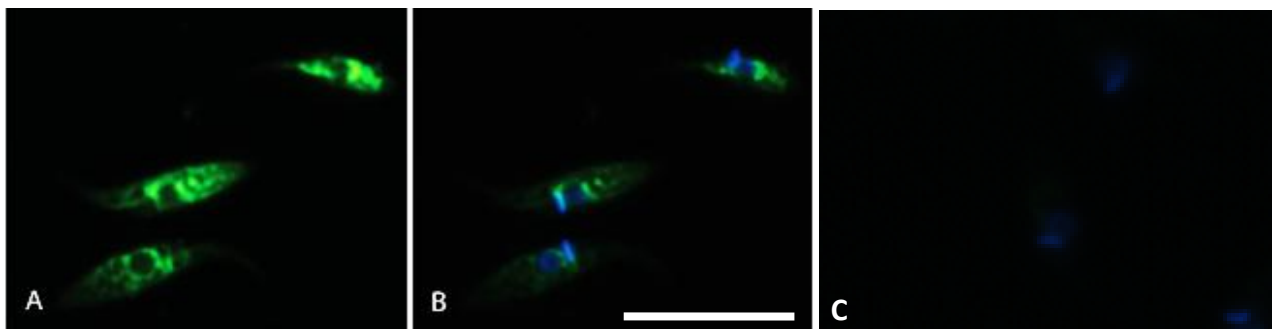


Figura 30. Ensaios de imunofluorescência contra a proteína *TcXRNA* em *T. cruzi*. **A.** Anticorpo primário (α -*TcXRNA*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200. **B.** Sobreposição em verde, marcação de grânulos de *TcXRNA* e em azul, marcação de cromatina e cinetoplasto (DAPI). **C.** Antissoro pré-imune utilizado na diluição 1:50 e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200.

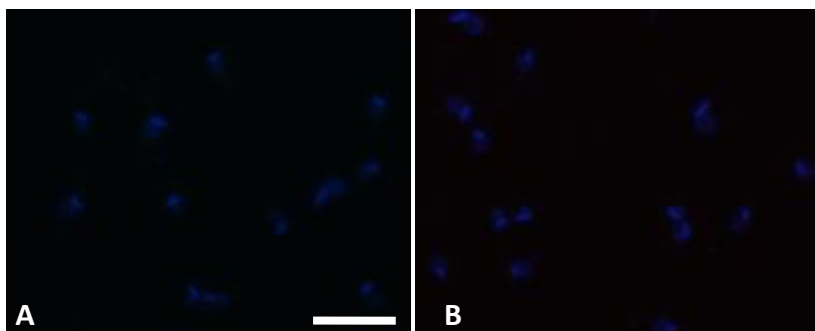


Figura 31. Imunofluorescência com população selvagem com anticorpos primários anti-Proteína A e anti-GFP **A.** anticorpo primário anti-Proteína A (Diluição 1:20000) e secundário anti-IgG de camundongo conjugados a Alexa 488 (Diluição 1:200) e **B.** anticorpo primário anti-GFP (Diluição 1:50) e secundário anti-IgG de camundongo conjugados a Alexa 488 (Diluição 1:200). Em azul, marcação de cromatina e cinetoplasto (DAPI). Barra = 10µm.

4.1.3.1 As proteínas TcXRNA e TcPOP2 colocalizam parcialmente com a proteína TcDHH1

Para verificar se as proteínas TcXRNA e TcPOP2 estão presentes em grânulos que contém a proteína TcDHH1, realizamos ensaios de colocalização. Para essas análises, foram utilizadas as formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Foi possível perceber através das Figuras 32 e 33 que existe colocalização parcial entre a proteína TcDHH1 e as proteínas TcPOP2 e TcXRNA.

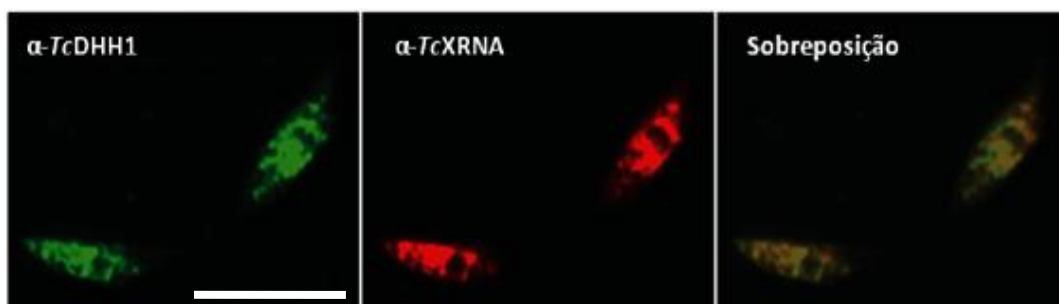


Figura 32. Ensaios de colocalização entre as proteínas *TcDHH1* e *TcXRNA* em *T. cruzi*. **A.** Anticorpo primário (anti-*TcDHH1*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG coelho conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200. **B.** Anticorpo primário (α -*TcXRNA*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 546) utilizado na diluição 1:200. **C.** Sobreposição das imagens **A.** e **B.** Barra = 10 μ m.



Figura 33. Ensaios de colocalização entre as proteínas *TcDHH1* e *TcPOP2* em *T. cruzi*. **A.** Anticorpo primário (anti-*TcDHH1*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG camundongo conjugado a Alexa 546) utilizado na diluição 1:200. **B.** Anticorpo primário (anti-Proteína A) utilizado na diluição 1:40000 e anticorpo secundário (anti-IgG coelho conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200. **C.** Sobreposição das imagens **A.** e **B.** Barra = 10 μ m.

4.1.4 Imunoprecipitação da proteína *TcDHH1*

A imunoprecipitação é uma técnica utilizada para purificar complexos ribonucleoprotéicos citoplasmáticos por meio de um anticorpo específico para determinada proteína. Os anticorpos ficam imobilizados em uma resina e capturam a proteína em questão juntamente com outras moléculas (RNAs, proteínas, por exemplo) que estiverem conjugadas a ela.

Extratos de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento e tripomastigotas metacíclicos foram obtidos e submetidos à imunoprecipitação, conforme descrito no item 3.7.5 de Material e Métodos.

A imunoprecipitação de epimastigotas foi realizada com sucesso uma vez que a proteína *TcDHH1* foi capturada especificamente pelo anticorpo ligado à resina e não foi

perdida durante as lavagens, como pode ser visto no resultado de Western *blot* (Figura 34). Além disso, a fração eluída contém outras proteínas que interagem com a proteína TcDHH1 e serão identificadas por espectrometria de massa. O mesmo protocolo foi utilizado para epimastigotas submetidos à estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicos (imagens não mostradas), que serão analisados tanto com relação ao conteúdo protéico quanto para análise de mRNAs alvos desta proteína.

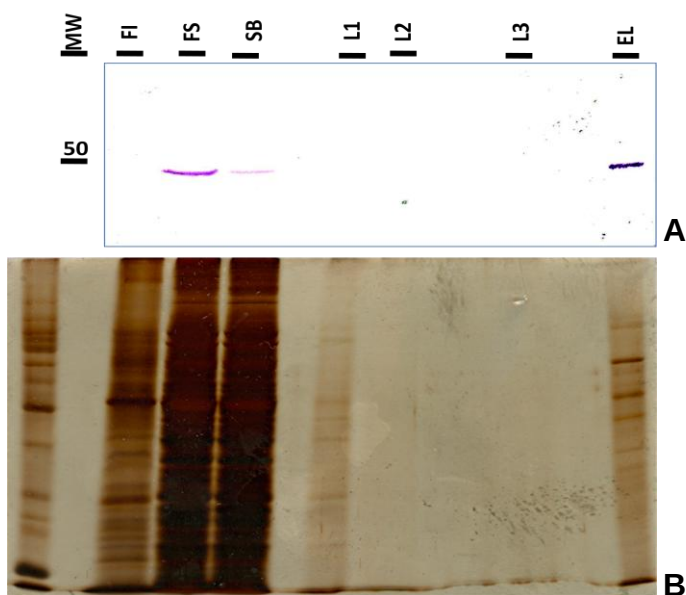


Figura 34. Imunoprecipitação da proteína TcDHH1 de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. (A). Western blot com antissoro contra a proteína TcDHH1 das frações analisadas. (B). Perfil eletroforético da imunoprecipitação em gel de poliacrilamida 13% corado com prata. FI: Fração insolúvel do lisado; FS, fração solúvel do lisado; SB: sobrenadante (fração não ligada à resina); L1, L2 e L3: Lavagens 1, 2 e 3; EL: Eluído. MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen).

4.1.5 As proteínas TcALBA3 e TcPOP2 estão presentes em grânulos de TcDHH1 em epimastigotos

Um estudo desenvolvido em nosso instituto por Preti (2007), identificou uma proteína hipotética conservada que contém o domínio Alba (e ortóloga à *TbALBA3*, em *T. brucei*) e é diferencialmente expressa durante o processo de metaciclogênese do *T. cruzi*. A proteína em questão tem sua expressão reduzida nas formas metacíclicas em relação às formas epimastigotas e alguns autores sugerem que proteínas que contém o domínio Alba (*Acetylation lowers binding affinity*) tenham a capacidade de ligarem-se à RNA podendo interferir com o metabolismo e a estabilidade destas moléculas (ARAVIND *et al.*,

2003; MARSH *et al.*, 2005). Por este motivo, paralelamente à preparação de amostras que serão submetidas às análises proteômicas, realizamos ensaios de imunoprecipitação para investigar a interação da proteína *TcDHH1* com as proteínas *TcPOP2* e *TcALBA3*, por *Western blot*. Verificamos que a proteína *TcALBA3* está presente nas frações precipitadas com o anticorpo anti-*TcDHH1*, sugerindo a interação entre estas proteínas (Figura 35). A mesma membrana foi submetida à revelação por fosfatase alcalina (α -*TcDHH1* de coelho, diluição 1:100) e quimioluminescência (α -*TcALBA3* de camundongo, diluição 1:500).

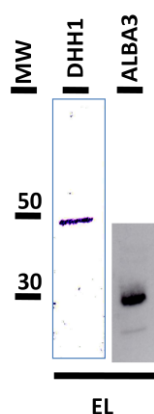


Figura 35. As proteínas *TcDHH1* e *TcALBA3* fazem parte de um mesmo imunocomplexo.

A fração eluída (EL) da imunoprecipitação de *TcDHH1* foi submetida a um *Western blot* com o anticorpo anti-*TcALBA3*, demonstrando a coimunoprecipitação de ambas as proteínas. MW-padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen)

Para testar a coimunoprecipitação das proteínas *TcPOP2* e *TcDHH1*, extratos protéicos das linhagens transfectantes da proteína *TcPOP2* foram submetidos à imunoprecipitação com o anticorpo contra a proteína *TcDHH1*. Devido ao fato de ainda não termos obtido o antissoro contra a proteína *TcPOP2*, realizamos os ensaios de *Western blot* com o anticorpo anti-etiqueta (Proteína A). Dessa forma, a fração eluída poderia ser analisada quanto à presença ou não da proteína *TcPOP2* a partir do anticorpo contra as etiquetas em questão. Uma vez que tanto o anticorpo contra *TcDHH1* quanto o anticorpo anti-GFP foram produzidos em camundongos, apenas a linhagem *TcPOP2* com cauda de proteína A (anticorpo anti-proteína A foi produzido em coelho) foi utilizada para essa análise, para evitar reações cruzadas e bandas inespecíficas no eluído. Dessa forma, a proteína *TcPOP2*-TAP foi verificada no eluído da imunoprecipitação, sugerindo sua interação com *TcDHH1* (Figura 36). Como controle positivo foi utilizada a população

transfectante de *TcDHH1*-TAP, que deveria ser imunoprecipitada pelo anticorpo contra *TcDHH1*.

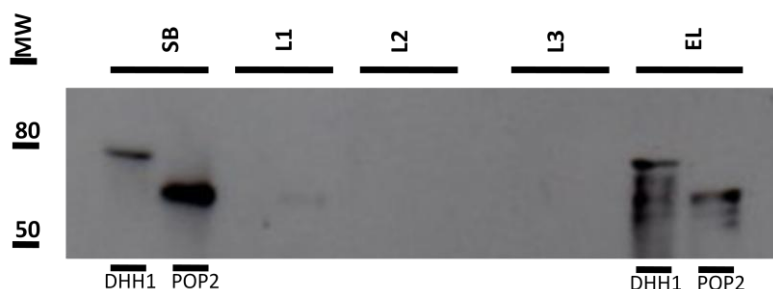


Figura 36. Interação entre a proteína *TcDHH1* e a proteína *TcPOP2*-TAP. Ensaio de Western *Blot* com anticorpo anti-Proteína A revelado por quimiluminescência mostrando a interação da proteína *TcDHH1* com a proteína *TcPOP2*-TAP. SB: *sobrenadante*, fração não ligada à resina; L1, L2 e L3: Lavagens 1, 2 e 3; EL: Eluído. MW- padrão de massa molecular representado em kDa - *Benchmark* (Invitrogen)

Os ensaios de coimunoprecipitação entre as proteínas *TcDHH1* e *TcXRNA* ainda não foram efetuados, e portanto, ainda não temos a certeza de que ambas as proteínas fazem parte do mesmo imunocomplexo.

4.1.6 Análise por bioinformática da rede de interação de DHH1 em tripanossomatídeos

Até o momento, nenhum trabalho se preocupou em analisar a rede de interação da proteína DHH1 em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Por isso, resolvemos incluir nesse trabalho uma análise de bioinformática buscando identificar alvos de interação com DHH1 nestes tripanossomatídeos. Primeiramente foi feita uma busca extensiva de dados de interação conhecidos em *S. cerevisiae*, que serviu como base para a rede de interações em tripanossomatídeos. A partir dessa “rede esqueleto” montada em leveduras, pudemos extrapolar os dados para tripanossomatídeos, buscando, além dos nossos dados de interação obtidos nos ensaios de coimunoprecipitação já mostrados, dados na literatura que indicassem interações proteína-proteína e a existência proteínas que fazem parte da rede proposta para *T. cruzi* e *T. brucei*.

4.1.6.1 Elaboração da rede com proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*

A rede de interação de decaimento de RNA já é há muito tempo estudada em *Saccharomyces cerevisiae* por diversos autores. Para conseguir uma lista completa de interações comprovadas, foi feita uma busca extensiva em bancos de dados de redes protéicas como BioGRID (<http://thebiogrid.org/>), STRING (<http://string-db.org/>) e IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), buscando cada uma das proteínas escolhidas individualmente e comparando mais de um banco de dados para aumentar a confiabilidade das interações. A lista completa curada incluiu 30 proteínas de *S. cerevisiae* e 168 interações PPI (*Protein-Protein Interaction*), que para o melhor entendimento das funções e regulações, foram agrupadas baseadas nas suas funções conhecidas (Quadro 11). As proteínas foram classificadas entre o complexo CCR4-NOT, o complexo heptamérico das Lsm, os complexos de deccaping e degradação 5'-3' e entre o complexo de desadenilação PAN2/PAN3. A descrição completa dos genes de *S. cerevisiae* pode ser visualizada no Apêndice D. A partir desses dados, foi possível montar um quadro (Quadro 12) contendo todas as interações conhecidas em *S. cerevisiae* bem como uma rede protéica simplificada que pode ser visualizada na Figura 37.

Quadro 11. Proteínas selecionadas para compor a rede de interação de Dhh1p em *S. cerevisiae*.

Complexo	Proteína	Complexo	Proteína	Complexo	Proteína
CCR4-NOT	BTT1	Complexo Heptamérico de ligação a RNA Lsm	LSM1	Deccaping e Degradação 5'-3'	DCP1
	CAF130		LSM2		DCP2
	CAF40		LSM3		DCP3
	CCR4		LSM4		DHH1
	NOT1		LSM5		PAT1
	NOT2		LSM6		XRN1
	NOT3		LSM7		SCD6
	NOT4		LSM8	Proteínas com domínio de ligação a RNA	NST1
	NOT5	Desadenilação PAN	PAN2		PABP1
	POP2		PAN3		PUF5

Quadro 12. (PRÓXIMA PÁGINA) Lista de interações proteína-proteína utilizadas para a montagem da rede de leveduras. Quadrado preto denota interação e quadrado branco denota não interação entre duas proteínas, quadrados cinza não contém nenhuma informação.

Evidência	Gene ID	Nome	Nome Abreviado	Proteína de Interação	Fonte
Trypanosoma cruzi					
Imunoprecipitação (DHH1) / espectrometria de massas	Tc00.1047053510127.79	actin, putative	TcActina	TcDHH1	2010, Holetz
	Tc00.1047053510573.10	actin, putative	TcActina		
	Tc00.1047053507641.280	HSP60; Cnp60 chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	TcHSP60		
	Tc00.1047053508665.14	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative	TcHSP100		
	Tc00.1047053508169.20	elongation factor 2, putative	TcEF2		
	Tc00.1047053508949.4	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha), putative	TcEF1		
	Tc00.1047053507713.30	heat shock protein 85, putative	TcHSP85		
	Tc00.1047053507875.20	glutamate dehydrogenase, putative	TcGDH		
	Tc00.1047053508111.30	glutamate dehydrogenase, putative	TcGDH		
	Tc00.1047053509139.10	glycerate kinase, putative	TcGLYK		
	Tc00.1047053511139.20	40S ribosomal protein S11, putative	TcS11		
	Tc00.1047053511211.160	heat shock protein 70 (hsp70), putative	TcHSP70		
	Tc00.1047053506983.39	calpain-like cysteine peptidase, putative	TcCalpain-Like		
	Tc00.1047053504191.10	sterol 24-c-methyltransferase, putative	TcSterol 24-CMT		
	Tc00.1047053506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcDHH1		
Imunoprecipitação (DHH1) / Western blotting	Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1, putative	TcPABP1	TcDHH1	2010, Holetz
	Tc00.1047053508461.140	polyadenylate-binding protein, putative	TcPABP2		
	Tc00.1047053510125.10	pumilio/PUF RNA binding protein 6, putative (PUF6)	TcPUF6	TcDHH1	2008, Dallagiovanna
	Tc00.1047053510535.60	CCR4 associated factor, putative	TcPOP2	TcDHH1	Presente trabalho
	Tc00.1047053510877.30	hypothetical protein, conserved	TcALBA3		
* N/A: Não Aplicável					

Quadro 13. Proteínas selecionadas para composição da rede de tripanossomatídeos e a evidência pela qual cada interação foi descoberta.

Evidência	Gene ID	Nome	Nome Abreviado	Proteína de Interação	Fonte
Trypanosoma cruzi					
Colocalização com DHH1	Tc00.1047053401469.10	zinc finger protein 2, putative	TcZFP2	TcDHH1	2007, Holetz
	Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1, putative	TcPABP1		
	Tc00.1047053508461.140	polyadenylate-binding protein, putative	TcPABP2		
	Tc00.1047053510125.10	pumilio/PUF RNA binding protein 6, putative (PUF6)	TcPUF6		
	Tc00.1047053510877.30	hypothetical protein, conserved	TcALBA3		
	Tc00.1047053511211.160	heat shock protein 70 (hsp70), putative	TcHSP70		
	Tc00.1047053506829.39	ribosomal protein S7, putative	TcS7		
	Tc00.1047053505939.89	5'-3' exonuclease XRNA, putative	TcXRNA	TcDHH1	Presente trabalho
	Tc00.1047053510535.60	CCR4 associated factor, putative	TcPOP2		
Colocalização em mRNPs	Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1, putative	TcPABP1	N/A	2007, Cassola
	Tc00.1047053508461.140	polyadenylate-binding protein, putative	TcPABP2		
	Tc00.1047053506127.170	eukaryotic translation initiation factor eIF-4E, putative	TceIF4E		
	Tc00.1047053505939.89	5'-3' exonuclease XRNA, putative	TcXRNA		
	Tc00.1047053506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcDHH1		
	Tc00.1047053507093.220	RNA binding protein, putative	TcUBP1		
	Tc00.1047053507093.229	U-rich RNA-binding protein UBP-2	TcUBP2		
	Tc00.1047053507093.250	RNA-binding protein, putative	TcRBP3		
	Tc00.1047053508901.20	RNA-binding protein 4, putative	TcRBP4		
	Tc00.1047053511481.55	RNA-binding protein, putative	TcRBP5a		
	Tc00.1047053508153.680	RNA-binding protein 6, putative	TcRBP6b		
* N/A: Não Aplicável					

Quadro 13. (CONT.) Proteínas selecionadas para composição da rede de tripanossomatídeos e a evidência pela qual cada interação foi descoberta.

Método	Gene ID	Nome	Nome Abreviado	Proteína de Interação	Fonte
Trypanosoma brucei					
Imunoprecipitação (TbPOP2) / espectrometria de massas	Tc00.1047053509247.30	hypothetical protein, conserved	TbNOT1	TbPOP2	Schwede, 2007
	Tc00.1047053504035.130	hypothetical protein, conserved	TbNOT2		
	Tc00.1047053504043.10	hypothetical protein, conserved	TbNOT5		
	Tc00.1047053506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TbDHH1		
Colocalização	Tc00.1047053505939.89	5'-3' exonuclease XRNA, putative	TbXRNA	TbDHH1	Kramer, 2008
	Tc00.1047053507093.300	hypothetical protein SCD6.10	TbSCD6	TbPABP1	
				TbXRNA	
	Tc00.1047053506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TbDHH1	TbSCD6	
Pulldown (TbALBA3)	Tc00.1047053506885.70	polyadenylate-binding protein 1, putative	TbPABP1	TbALBA3	Mani, 2011
	Tc00.1047053508461.140	polyadenylate-binding protein, putative	TbPABP2	TbALBA3	
Comprovação de Existência	Tc00.1047053507017.120	ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	TbPAN2	N/A	Schwede, 2009
	Tc00.1047053504643.49	hypothetical protein, conserved	TbPAN3		
	Tc00.1047053511217.80	hypothetical protein, conserved	TbLSM2	N/A	Tkacz, 2008
	Tc00.1047053510609.65	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3p	TbLSM3		
	Tc00.1047053457339.10	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4, putative	TbLSM4		
	Tc00.1047053508823.60	hypothetical protein, conserved	TbLSM5		
	Tc00.1047053506893.25	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6p	TbLSM6		
	Tc00.1047053503479.49	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7p	TbLSM7		
	Tc00.1047053510421.314	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm8p	TbLSM8		
* N/A: Não Aplicável					

Interações que são evidenciadas por mais de uma abordagem se tornam muito mais confiáveis na construção de uma rede. É o caso da interação entre as proteínas TcPABP1 e 2 com a proteína TcDHH1, que são mostrados a partir de imunoprecipitação seguida de Western *blot* e por colocalização celular (HOLETZ *et al.*, 2010); Neste mesmo trabalho, os autores caracterizaram a composição protéica de grânulos de TcDHH1 a partir de uma abordagem *high-throughput*, que identificou com um alto grau de confiabilidade 15 proteínas. CASSOLA e colaboradores (2007) só efetuaram experimentos de colocalização com mRNA em grânulos de mRNPs e não entre as proteínas, e portanto, tais dados não foram utilizados para a construção da rede.

A rede de *S. cerevisiae* foi usada como um *scaffold* para a rede de *T. cruzi*. Algumas proteínas não foram encontradas ou se mostraram não funcionais em tripanossomatídeos, como é o caso das proteínas do complexo de decapeamento PAT1, DCP1 e 2 e EDC3, a proteína LSM1 que compõe o complexo heptamérico citoplasmático, e alguns componentes do complexo CCR4-NOT (CCR4, BTT1, NOT3 e NOT4). Além disso, TKACZ e colaboradores (2008), descreveram em *T. brucei* outros componentes do complexo LSM como sendo nucleares, ou seja, provavelmente não exista interação entre DHH1 e tal complexo em tripanossomatídeos. A própria TbDHH1 foi identificada na proteômica de TbPOP2, juntamente com TbNOT2 e TbNOT5, aumentando o conhecimento sobre o complexo CCR4-NOT e sua interação com a proteína TbDHH1 (SCHWEDE *et al.*, 2007). Nesse mesmo trabalho, foi feita uma busca extensiva para um ortólogo de CCR4, porém o melhor candidato que possuía o domínio exonuclease conservado, não tinha o domínio rico em repetições de leucina, essencial para a ligação à proteína POP2 e à atividade desadenilase (CLARK *et al.*, 2004; DUPRESSOIR *et al.*, 2001; SCHWEDE *et al.*, 2007). Em 2009, SCHWEDE e colaboradores conseguiram evidenciar a existência do complexo PAN em *T. brucei*, e, baseando-se no fato de que o complexo PAN possui atividade exorribonuclease PABP dependente, que consiste em duas subunidades, PAN2 e PAN3 (BROWN *et al.*, 1996), propusemos sua interação com a proteína PABP1, ortóloga à PAB1 em *S. cerevisiae*. A lista completa dos genes de *S. cerevisiae* utilizados para a busca de ortólogos em tripanossomatídeos e os respectivos genes identificados em *T. cruzi* e *brucei* podem ser visualizados no Apêndice E.

Dessa forma, parte da rede protéica de interação de TcDHH1 e TbDHH1 foi proposta e pode ser visualizada na Figura 38. As proteínas foram agrupadas da mesma maneira que na rede proposta em leveduras, para facilitar a sobreposição dos dados.

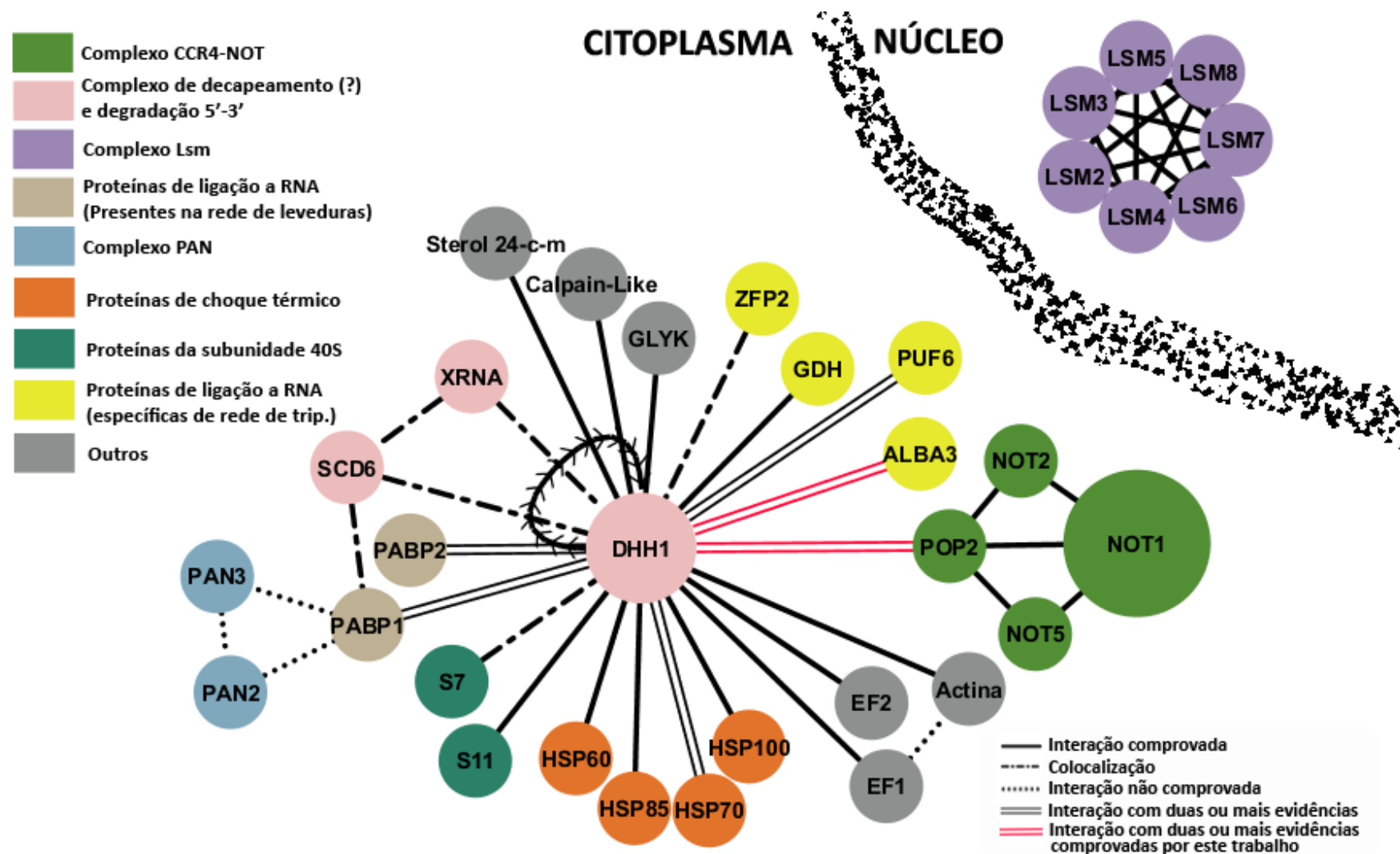


Figura 38. Rede protéica de interação da proteína DHH1 proposta para tripanossomatídeos.

4.2 Análise dos mRNAs alvo de *TcDHH1*

Além de analisar a composição protéica dos grânulos de *TcDHH1*, é imprescindível estudar e caracterizar a localização e tempo de meia-vida dos mRNAs alvos da proteína *TcDHH1*. Isso porque visamos avaliar se os grânulos possuem o papel de estocagem ou degradação de mRNA. Dessa forma, algumas abordagens se fazem necessárias: a primeira delas é analisar o perfil de sedimentação dos mRNAs alvos em gradientes de sacarose a fim de verificar se os mesmos estão presentes em complexos que sedimentam em frações de alta densidade e se tais complexos são independentes ou dependentes de polissomos. Em paralelo, é necessário confirmar a interação de mRNAs alvos com a proteína *TcDHH1* por colocalização pelas técnicas de FISH e imunofluorescência indireta. Além disso analisamos o tempo de meia-vida destes mRNAs através de ensaios de qPCR em epimastigotas. Essas abordagens poderão nos indicar se os grânulos que contém a proteína *TcDHH1* estão envolvidos com a degradação ou com a estocagem dos mRNAs alvos desta proteína.

4.2.1 O mRNA alvo *TcMASP* está presente em frações independentes de polissomos

Antes de investigar o perfil de sedimentação de alguns mRNAs alvos de *TcDHH1*, analisamos a distribuição da proteína *TcDHH1* em gradientes de sacarose (15-55%). Extratos de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram tratados com cicloheximida e puromicina e adicionados nos gradientes, conforme descrito no item 3.8. As frações coletadas foram analisadas por Western *blot* utilizando o antissoro contra a proteína *TcDHH1*.

Um perfil de sedimentação típico de polissomos (tradução ativa) foi obtido com o tratamento por cicloheximida, droga que inibe a atividade peptidil transferase da subunidade 60S, bloqueando a tradução pela estabilização do complexo mRNA-ribossomo. Neste gradiente foi possível perceber que a proteína *TcDHH1* está presente em todas as frações do gradiente (Figura 39).

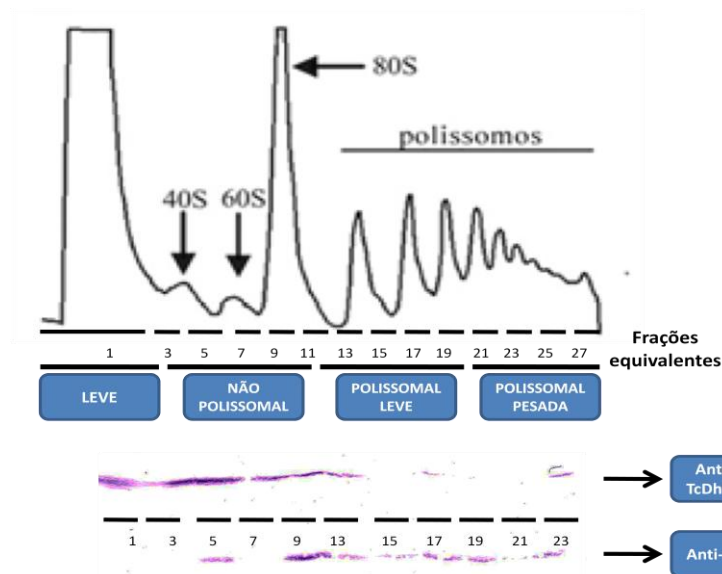


Figura 39. Perfil de sedimentação da proteína *TcDHH1* de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com cicloheximida, como descrito em Material e Métodos. As posições das subunidades 40S e 60S, bem como o monômero 80S e polissomos estão indicados. As frações ímpares do gradiente foram analisadas por *Western blot* com o soro contra as proteínas *TcDHH1* e proteína ribossomal S7. Leve = frações 1 e 2. Não polissomal = agrupamento das frações 3-11, correspondente a subunidade 40S e 60S livres e monossomos 80S. Polissomal leve = agrupamento das frações 12-20, Polissomal pesada = agrupamento das frações 21-27.

Nos ensaios de dissociação de polissomos, o extrato foi tratado com puromicina, um análogo de tRNA que aborta a síntese protéica, desestabilizando o complexo mRNA-ribossomo. O perfil de dissociação foi obtido com êxito (Figura 40) e a proteína *TcDHH1* foi detectada desde as frações com baixa densidade (1-7) até frações relativamente de alta densidade (9-17), mas não foi detectada nas frações mais densas, como o observado nos ensaios com o gradiente de extrato tratado com cicloheximida.

Como principal controle para esses dois ensaios, foi utilizado o padrão de sedimentação conhecido da proteína ribossomal S7 (parte da subunidade menor, 40S).

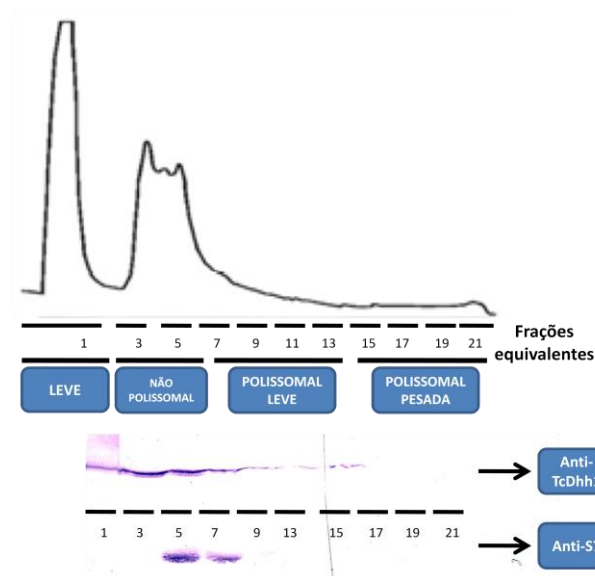


Figura 40. Perfil de sedimentação da proteína TcDHH1 de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, tratadas com puomicina, como descrito em Material e Métodos. As frações ímpares do gradiente foram analisadas por *Western blot* com o soro contra a proteína TcDHH1 e contra a proteína ribossomal S7. Leve = fração 1 e 2 correspondente ao que foi dissociado dos polissomos. Não polissomal = agrupamento das frações 3-6, correspondente a subunidades 40S e 60S livres. Polissomal leve = agrupamento das frações 8-14, Polissomal pesada = agrupamento das frações 15-21.

Os resultados aqui obtidos corroboram os dados de HOLETZ e colaboradores (2007), uma vez que demonstram que TcDHH1 faz parte de complexos pesados independentes de polissomos ativos, uma vez que são pouco afetados pela dissociação dos polissomos. A partir das frações do gradiente de sacarose obtidas (protocolo descrito no item 3.8 e explicadas acima), analisadas e agrupadas nas Figuras 39 e 40, realizamos um ensaio de *Western blot* para comprovar a presença da proteína TcDHH1 em todas as frações resultantes (Leve, Pesada, Não Polissomal e Polissomal Pesada), tanto tratadas com puomicina como com cicloheximida (Figura 41).

Cabe aqui mencionarmos que as frações tratadas com puomicina não possuem polissomos, ou seja, as frações denominadas polissomal leve e polissomal pesada possuem esse nome apenas por fins comparativos com as frações equivalentes de cicloheximida. Dessa maneira, corroborando os dados de HOLETZ e colaboradores (2007), a proteína TcDHH1 está presente em complexos pesados independentes de polissomos, como observado pela presença constante da proteína nas frações pesadas, mesmo após o tratamento com puomicina. A leve diminuição na quantidade de proteína

TcDHH1 na fração polissomal pesada é evidenciada tanto pela revelação do *Western blot* por fosfatase alcalina (Figura 41, A) quanto por quimioluminescência (Figura 41, B)

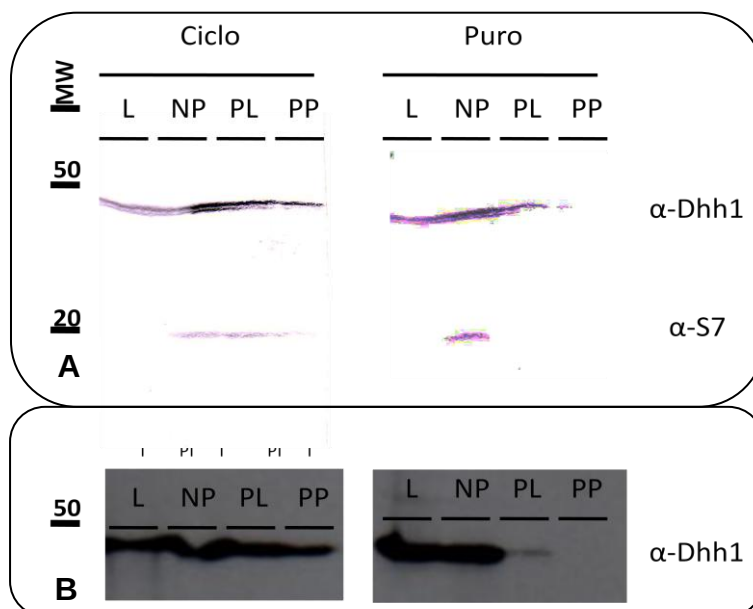


Figura 41. Western blot das frações obtidas por sedimentação em gradiente de sacarose (15-55%). As células foram tratadas com cicloheximida e puromicina, como descrito em Material e Métodos. As frações foram analisadas por *Western blot* com o soro contra a proteína *TcDHH1* e contra a proteína ribossomal S7 e reveladas por fosfatase alcalina e por quimioluminescência.

A partir das frações agrupadas, o RNA foi extraído e convertido a cDNA como descrito nos itens 3.4.6 e 3.10.2. A partir desse cDNA, uma PCR *touchdown* (item 3.8.1) foi feita para analisar a presença dos mRNAs em cada uma das frações resultantes. O mRNA de *TcMASP*, um dos alvos de *TcDHH1*, foi amplificado apenas nas frações Polissomal Leve e Polissomal Pesada de puromicina (Figura 42), enquanto que o controle positivo (*TcL9*, proteína ribossomal abundante de *T. cruzi*) foi amplificado em todas as frações tratadas com puromicina. A extração de RNA das frações Não Polissomal e Polissomal Leve de cicloheximida pode não ter sido feita com sucesso uma vez que o controle positivo não foi amplificado em tais frações. Mesmo assim, apenas com os dados de puromicina, já fica evidenciado que o alvo *TcMASP* está presente em complexos pesados independentes de polissomos em epimastigotas. As análises do perfil de sedimentação dos outros alvos de *TcDHH1* estão sendo analisadas.

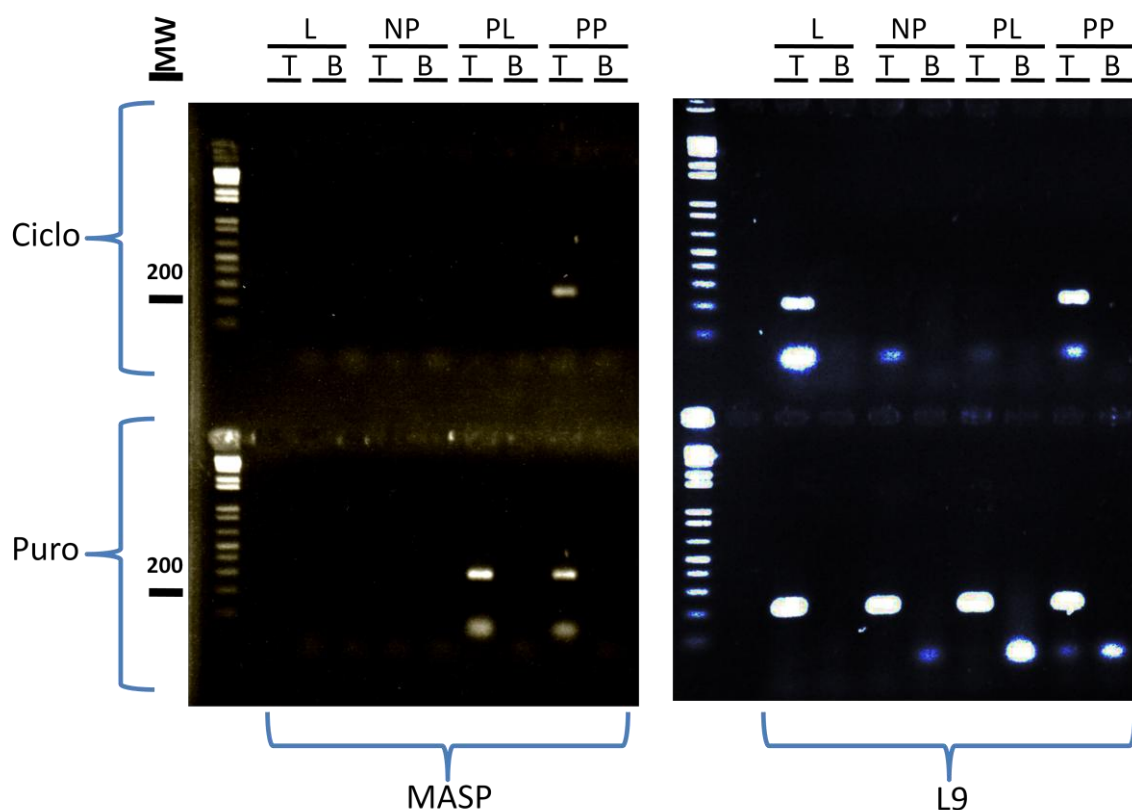


Figura 42. RT-PCR *Touchdown* do alvo *TcMASP* de *TcDHH1* nas frações provenientes de gradiente de sacarose tratadas com puromicina (puro) e com cicloheximida (ciclo) e do controle da proteína ribossomal *TcL9*. Marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. L: Fração Leve; NP: Fração Não Polissomal; PL: Fração Polissomal Leve; PP: Fração Polissomal Pesada. B: Branco da RT-PCR (na ausência da transcriptase reversa e presença de cada RNA convertido a cDNA) ; T: Teste da RT-PCR;

Uma vez que a proteína *TcDHH1* também está presente nas frações em que houve amplificação do alvo *TcMASP* (mesmo que em pequena quantidade, a proteína está presente em frações PP tratadas com puromicina, Figura 41A), é necessário verificarmos a colocalização de tal mRNA com a proteína *TcDHH1* por ensaios de FISH.

4.2.2 Análise da localização celular dos mRNAs alvos por FISH

4.2.2.1 Padronização da técnica de FISH para a linhagem de *T. cruzi* Dm28c;

A fim de verificar quais parâmetros da técnica de FISH melhorariam o sinal de fluorescência final, foram feitos inúmeros testes em todas as etapas: desde fixação, permeabilização, pré-tratamentos, pré-hibridação, hibridação, lavagens e pós tratamentos.

A partir do Quadro 14, é possível verificar todas essas mudanças de parâmetros e o quanto cada mudança alterou no resultado final. Para fins comparativos, a qualidade

dos resultados será indicada por – (resultado ruim) a +++ (resultado ótimo). As condições finais escolhidas para cada etapa no protocolo padronizado estão destacadas em quadro colorido e em negrito.

Etapa	Tipo de Modificação	Tempo	Temperatura (°C)	Qualidade	Resultado obtido
Fixação	Etanol 70%	16 h	-20	-	Alto background
	Metanol 100%	20 min	4	+	Danificou a morfologia dos parasitas
	Paraformaldeído 4%	20 min	T _{amb}	+++	Morfologia mantida e baixo background
Permeabilização	Triton X-100 0,2%	30 min	T _{amb}	++	Background médio
	Proteinase K 1µg/ml	10 min	T _{amb}	+	Danificou a morfologia dos parasitas
	Saponina 0,5%	10 min	T _{amb}	+	Background médio
	HCl 0,1 M	10 min	T _{amb}	+++	Morfologia mantida e baixo background
Pré-tratamentos	RNase OUT 40 U/ml	1 h	T _{amb}	+++	Não cortou o sinal de RNA
	Dnase 350 U/ml	1 h	T _{amb}	+++	Não cortou o sinal de RNA
	RNase 100 µg/ml	1 h	T _{amb}	+	Baixa eficiência da enzima
			37	+++	Cortou o sinal de RNA
Hibridação	Tampão ZEINER (2003)	1 h	N/A	++	Background médio
	Tampão PATRICK (2009)	1 h	N/A	+	Background alto
	Tampão CASSOLA (2007)	1 h	N/A	+	Tampão muito viscoso, background alto
	Solução de Hibridação Adaptada	1 h	N/A	+++	Baixo background
	Temperatura de Hibridação	N/A	T _{amb}	+	Sinal médio
		N/A	37	+++	Sinal forte
		N/A	50	-	Alta estringência, não permitiu hibridação (sinal fraco)
Tipo de Sonda	DNA - Marcado com Cy3/FITC/TRITC	16 h	N/A	+	Fluorescência fraca a média (para sondas abundantes)
	DNA - Marcado com DIG	16 h	N/A	++	Fluorescência forte (para mRNAs abundantes)
	RNA - Transcrito marcado com DIG	16 h	N/A	+++	Fluorescência forte
Lavagens	Temperatura das Lavagens	N/A	T _{amb}	+++	Fluorescência mantida
		N/A	37	++	Perda de parte da fluorescência
		N/A	50	-	Alta estringência, diminuição drástica da fluorescência
* N/A: Não aplicável	* min = minutos h = horas	*T _{amb} =	Temperatura ambiente		

Quadro 14. Condições testadas em cada etapa da padronização do protocolo de FISH para a linhagem Dm28c.

Os tampões testados e descritos no Quadro 14 podem ser encontrados na literatura (ZEINER *et al.*, 2003; PATRICK *et al.*, 2009; CASSOLA *et al.*, 2007), juntamente

com uma vasta gama de outras soluções de hibridação disponíveis. A solução testada que demonstrou ser mais adequada ao *T. cruzi* e às sondas utilizadas está descrita a seguir, adaptada de ZEINER e colaboradores (2003):

Solução de Hibridação:

Formamida.....	35%
SSC.....	2X
BSA.....	0,02%
RNase OUT.....	40 U/ml
tRNA de levedura.....	25 µg/ml
DNA de espermatozoides de salmão.....	100 µg/ml

4.2.2.2 Testes de sondas de mRNA total e mRNA abundante em *T. cruzi*
Dm28c

Sonda de oligo-d(T) para detecção de mRNA total conjugada a Cy3 e TRITC

Os testes iniciais foram feitos com sondas conjugadas a fluoróforos do tipo TRITC e FITC. Os resultados não foram satisfatórios, pois tais compostos possuem uma fluorescência fraca, se comparados à Cy3 e Alexa®, por exemplo.

Dessa forma, seguiu-se para testes com oligonucleotídeos conjugados com Cy3, o que nos rendeu um resultado melhor, como pode ser visto na Figura 43. Ao analisarmos as imagens tratadas com modificação de brilho e contraste (Figura 43 – D, E, H, I), o controle negativo (C, imagem não tratada e D, imagem tratada) assemelha-se mais a um ruído de fundo e o teste com sonda marcada com Cy3 (G, imagem não tratada e H, imagem tratada) possui uma fluorescência específica de RNA mensageiro (predominância citoplasmática: note a sobreposição com a marcação nuclear no canto superior direito). Além disso, na mesma Figura é possível visualizar que nos testes com sonda conjugada a TRITC (E, imagem tratada) o resultado é mais próximo ao controle negativo, assemelhando-se mais a um *background* do que ao teste com sonda Cy3. O teste com permeabilização com Triton X-100 (I, imagem tratada) não forneceu bons resultados, se comparado com a permeabilização com HCl 0,2 M (H, imagem tratada).

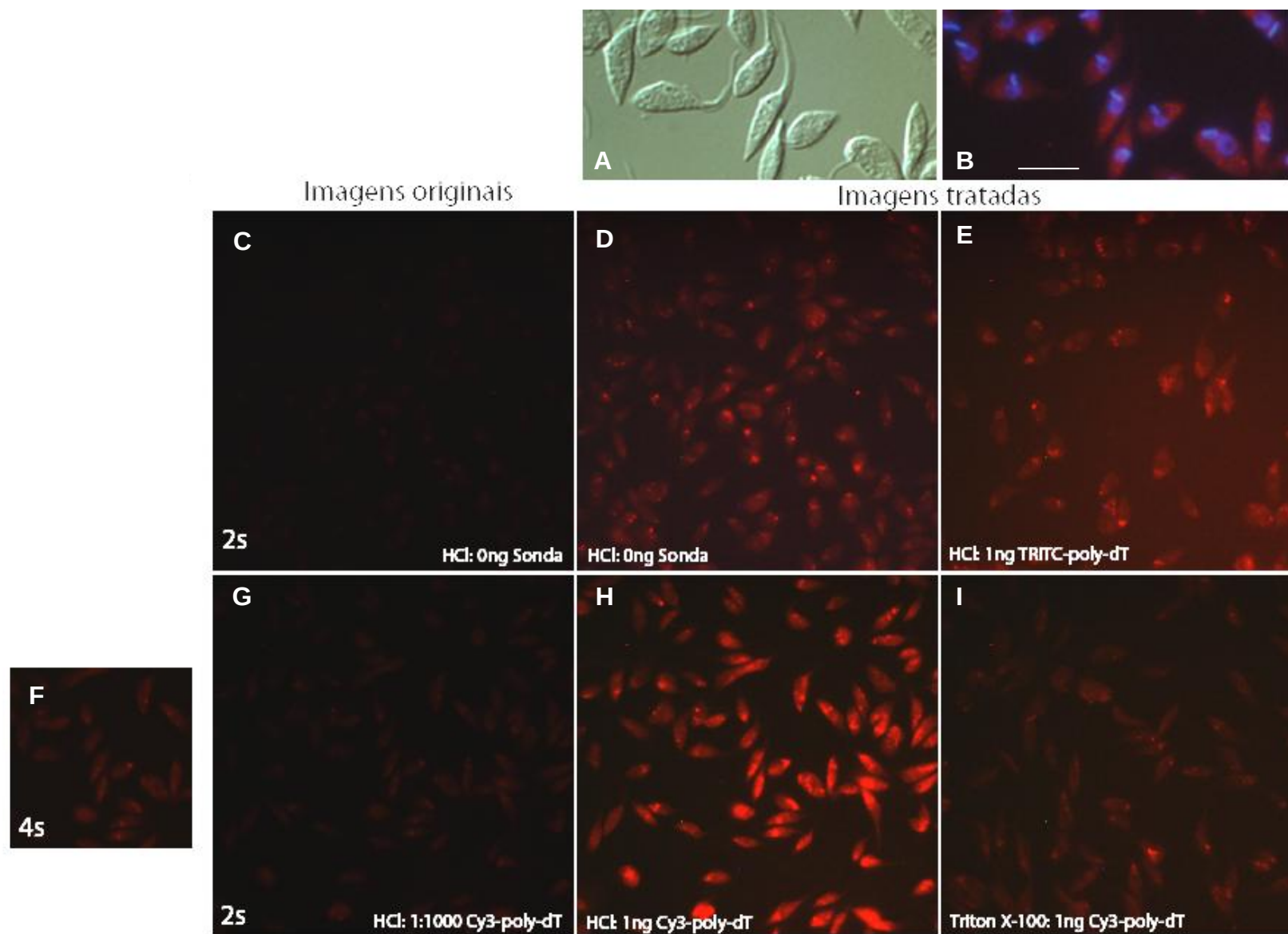


Figura 43.

Ensaio de FISH com sondas poli d(T) marcadas com Cy3 e FITC. Barra = 10 μ M.

Testes com sonda conjugada a DIG para detecção de α -tubulina

Com a sonda transcrita e conjugada *in vitro* com DIG (digoxigenina), as imagens não precisaram ser tratadas para notarmos a diferença entre os controles negativos e o teste (Figura 44). Três tipos de controles negativos podem ser visualizados com o mesmo padrão de fluorescência fraca nesta figura: O controle negativo sem sonda (Figura 44, letra C), o controle negativo sem o anticorpo primário (α -DIG, Figura 44, letra H) e o controle com sonda sense, que possui sequência igual ao mRNA e, portanto, não hibridou com o mesmo (Figura 44, letras E e F). É visível que os controles negativos não possuem o mesmo padrão de fluorescência dos testes. Nesse experimento foram testadas tanto a permeabilização com HCl 0,2 M quanto a permeabilização com Triton X-100, ambas com resultados satisfatórios. No canto superior direito da imagem (Figura 44, letra B) pode-se ver a sobreposição com a marcação nuclear, o que torna evidente o padrão de fluorescência citoplasmático, característico do RNA mensageiro de α -tubulina.

Testes com sonda de oligo (DT) conjugada a DIG para detecção de mRNA total

Não apenas sondas transcritas *in vitro* nos deram resultados satisfatórios quando marcadas com DIG. Na Figura 45, um oligonucleotídeo poli-d(T) comercial marcado foi utilizado e é evidente a diferença entre o controle negativo (Figura 45, letra D, pré-tratamento com RNase) e o teste (Figura 45, C). Além disso, a imagem direita (Figura 45, B), com sobreposição da marcação nuclear nos fornece um padrão típico de RNA mensageiro: fluorescência citoplasmática.

A partir desses três testes, a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência foi padronizada e validada para a linhagem Dm28c de *T. cruzi* e os testes com as sondas específicas dos alvos de TcDHH1 puderam ser feitos.

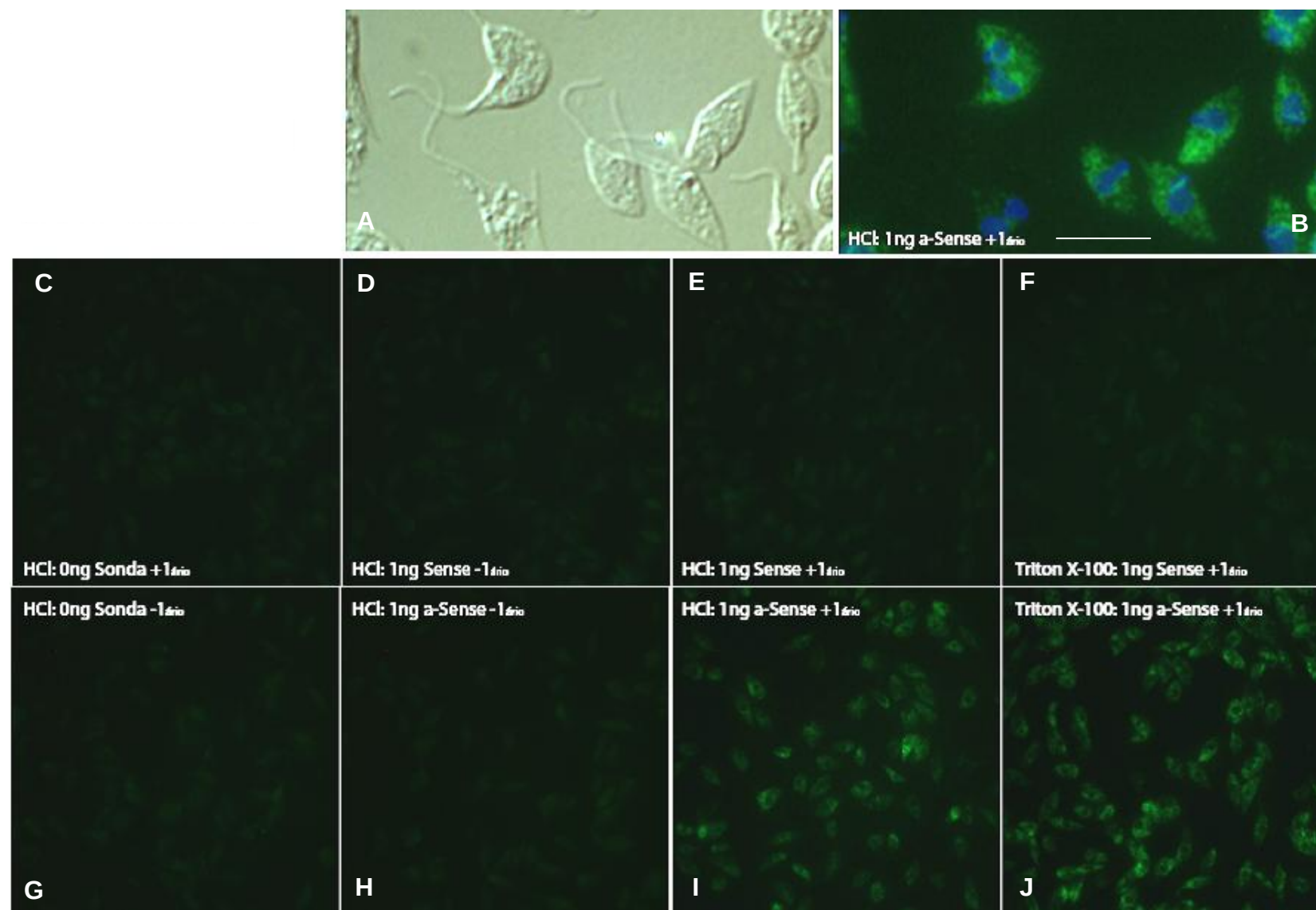


Figura 44. Ensaio de FISH com sondas marcadas com DIG para α -tubulina. Barra = 10 μ M.

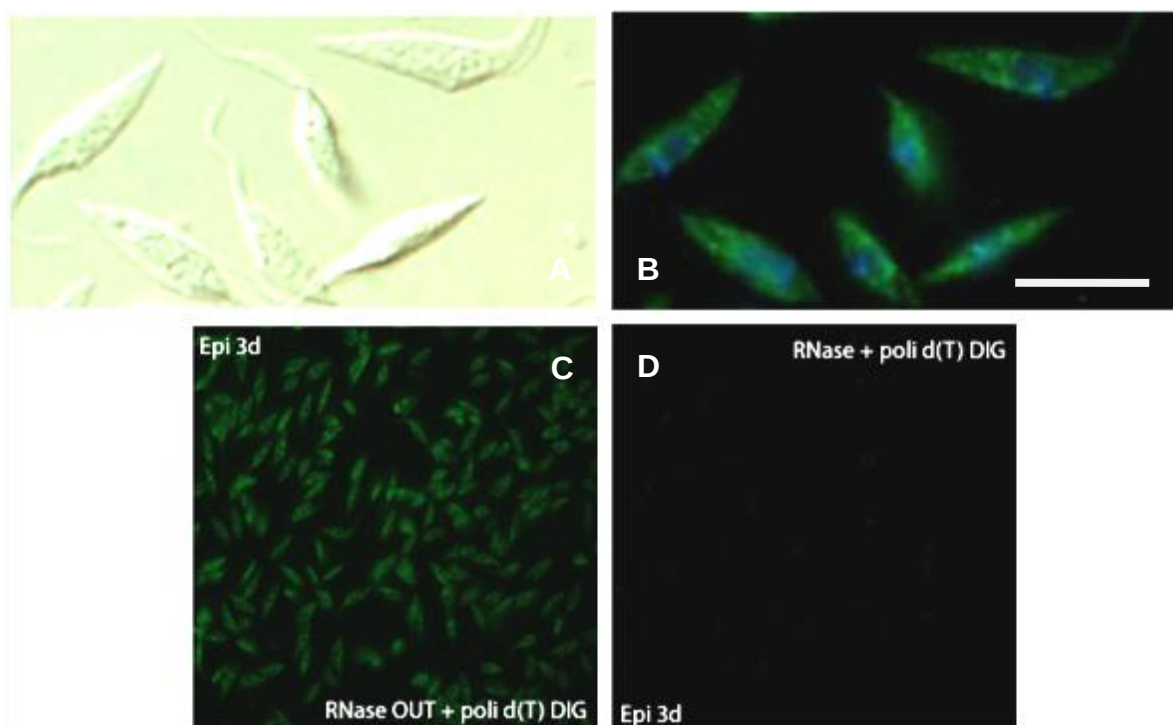


Figura 45. Ensaio de FISH com sonda poli d(T) marcada com DIG. Barra = 10 μ M.

4.2.2.3 Produção de sondas transcritas, específicas de cada alvo de *TcDHH1* escolhido

Os oito alvos escolhidos foram amplificados por PCR, como descrito no item 3.6.2. Obtivemos sucesso em sete dos alvos escolhidos, pois o gene referente à mucina não foi amplificado com sucesso (Figura 26). A amplificação do gene relativo à *TcMASP* foi ineficaz na temperatura escolhida. Mesmo assim, continuou-se a clonagem em pGEM®TEasy, como descrito no item 3.9.1, para os sete alvos restantes.

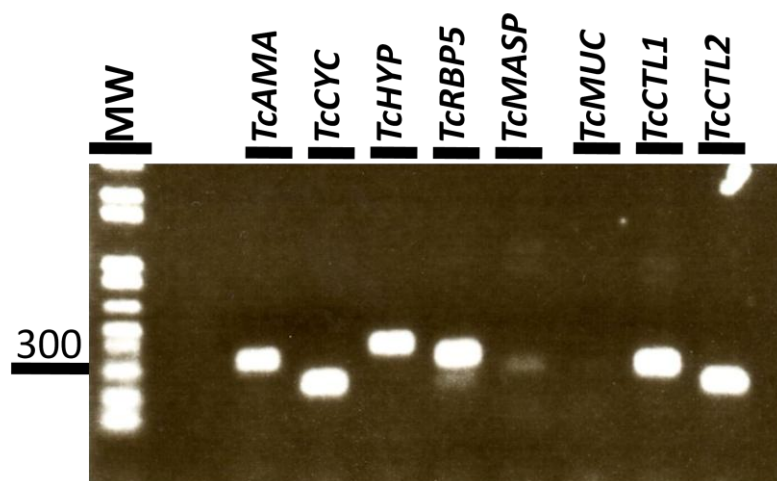


Figura 46. Perfil eletroforético de produtos de PCR dos alvos de *TcDHH1* em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. Ama: Amastina, Cyc: Ciclina, Hip: Proteína Hipotética, Rbp5: RNA *binding protein* 5, Muc: Mucina, CTL1 e 2: Controles negativos 1 e 2.

A reação de ligação dos insertos ao vetor pGEM®TEasy foi utilizada para a transformação de bactérias da linhagem DH5α competentes e a seleção foi feita através de PCR de colônias (item 3.5.3). Todos os insertos foram clonados com êxito, como pode ser visto na Figura 47. Algumas colônias foram selecionadas para purificação dos plasmídeos e posterior sequenciamento dos insertos.

Após o sequenciamento, foi possível analisar a presença de cada inserto e a orientação dos mesmos dentro do vetor (Quadro 15) e a partir disso, foi feita a transcrição *in vitro* com marcação DIG para utilização em ensaios de FISH específicos para cada alvo. Para os alvos *TcHYP*, *TcRBP5*, *TcMUC* e *TcCTL2*, pudemos checar que não havia inserto nos vetores correspondentes a cada gene e, portanto, não pudemos seguir com a análise de FISH para tais alvos.

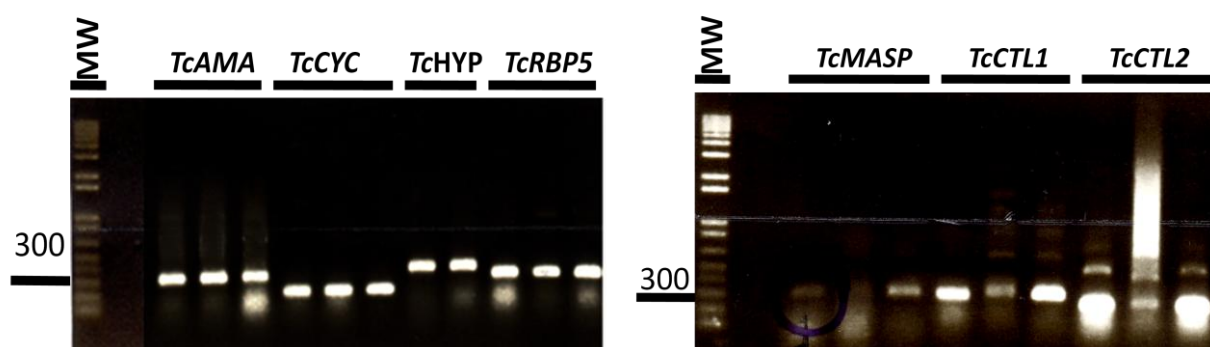


Figura 47. Perfil eletroforético de PCR de colônias dos alvos de *TcDHH1* em gel de agarose a 1% após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. Cada transformação teve três (ou duas) colônias selecionadas para a confirmação da entrada do inserto no vetor pGEM®-TEasy.

Quadro 15. Orientação de entrada dos insertos no vetor pGEM-TEasy®.

Gene	ID	SONDA (bases)	T7	SP6
<i>TcAMA</i>	Tc00.1047053506437.10	308	α-SENSE	SENSE
<i>TcCYC</i>	Tc00.1047053506945.270	202	SENSE	α-SENSE
<i>TcHYP</i>	Tc00.1047053509891.40	370	N/A	N/A
<i>TcRBP5</i>	Tc00.1047053511481.70	302	N/A	N/A
<i>TcMASP</i>	Tc00.1047053504239.110	268	α-SENSE	SENSE
<i>TcMUC</i>	Tc00.1047053506131.20	204	N/A	N/A
<i>TcCTL1</i>	Tc00.1047053506585.40	276	α-SENSE	SENSE
<i>TcCTL2</i>	Tc00.1047053510993.10	210	N/A	N/A
N/A: Não Aplicável				

4.2.2.4 Os transcritos alvos de *TcDHH1* co-localizam com a proteína

A partir de ensaios de FISH seguidos por imunofluorescência indireta da proteína *TcDHH1*, foi possível avaliar a porcentagem de colocalização entre *TcDHH1* e os mRNAs de *TcAMA*, *TcCYC*, *TcMASP* e *TcCTL1*. As imagens para cada sonda utilizada em FISH podem ser visualizadas nas Figuras 48 a 52.

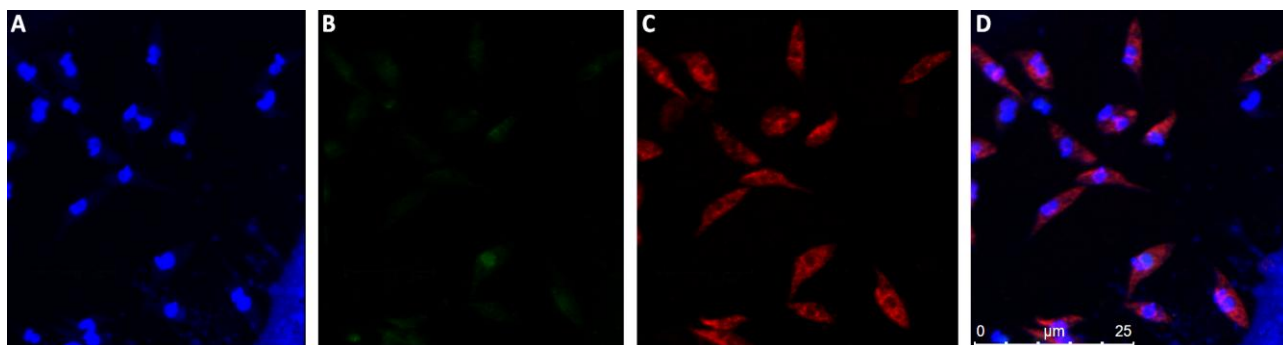


Figura 48. Colocalização da proteína *TcDHH1* com a sonda sense do mRNA alvo *TcAMA* em epimastigotas. (A) marcação de cromatina e cinetoplasto com DAPI. (B) FISH com sonda sense contra o alvo *TcAMA*. (C) imunofluorescência com o anticorpo anti-*TcDHH1*. (D) Sobreposição das imagens A, B e C.

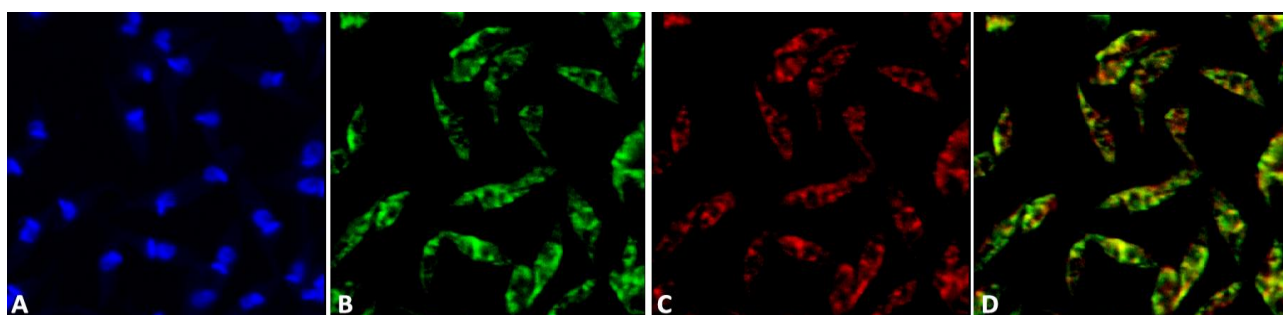


Figura 49. Colocalização da proteína *TcDHH1* com o mRNA alvo *TcAMA* em epimastigotas. (A) marcação de cromatina e cinetoplasto com DAPI. (B) FISH com sonda α -sense contra o alvo *TcAMA*. (C) imunofluorescência com o anticorpo anti-*TcDHH1*. (D) Sobreposição das imagens B e C.

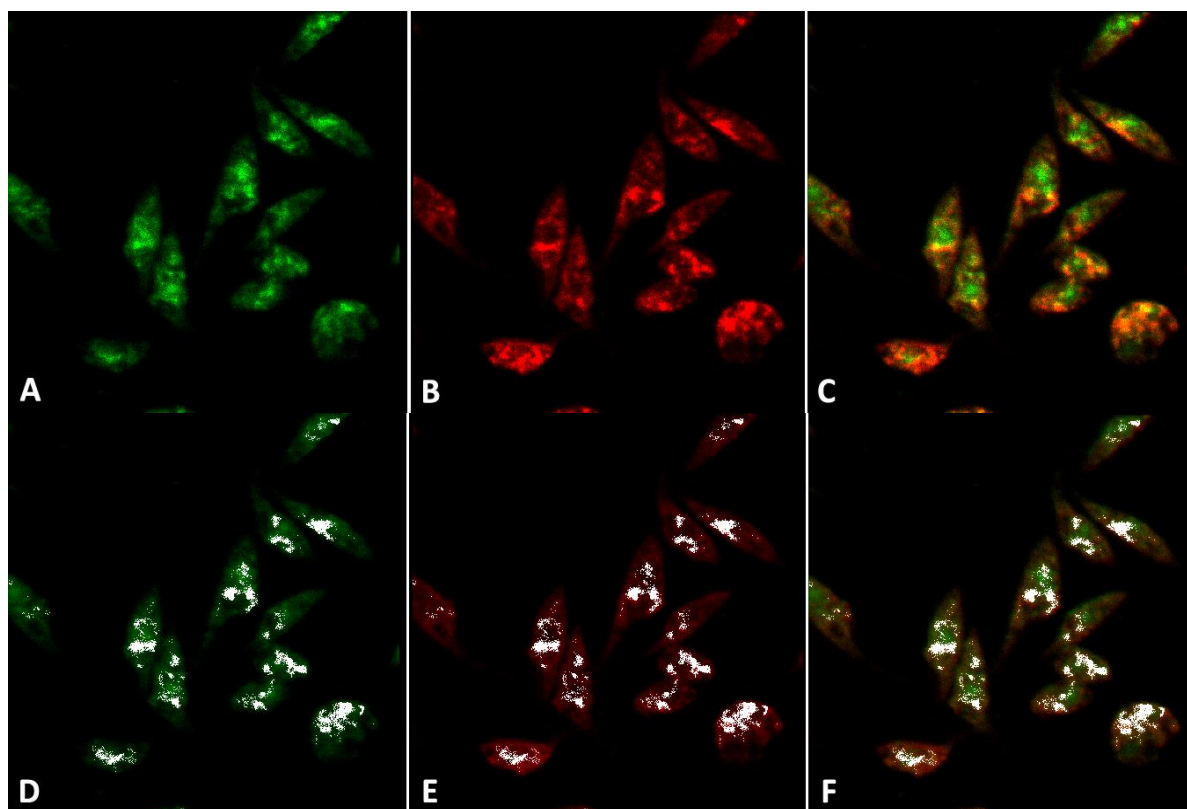


Figura 50. (PÁG. ANTERIOR) **Colocalização entre *TcDHH1* e sonda α -sense do alvo *TcCYC* em epimastigotas.** (A) FISH com sonda α -sense contra o alvo *TcCYC*. (B) imunofluorescência com o anticorpo anti-*TcDHH1*. (C) Sobreposição das imagens A e B. O sinal da sonda sobrepõe-se ao sinal da proteína *TcDHH1*, como esperado, com alguns pontos de não colocalização principalmente na região do núcleo (onde existe fluorescência verde e não vermelha). Em D, E e F, os pixels referentes à colocalização foram extraídos das Figuras. A partir dos pixels extraídos da Figuras F, a porcentagem de colocalização pode ser calculada.

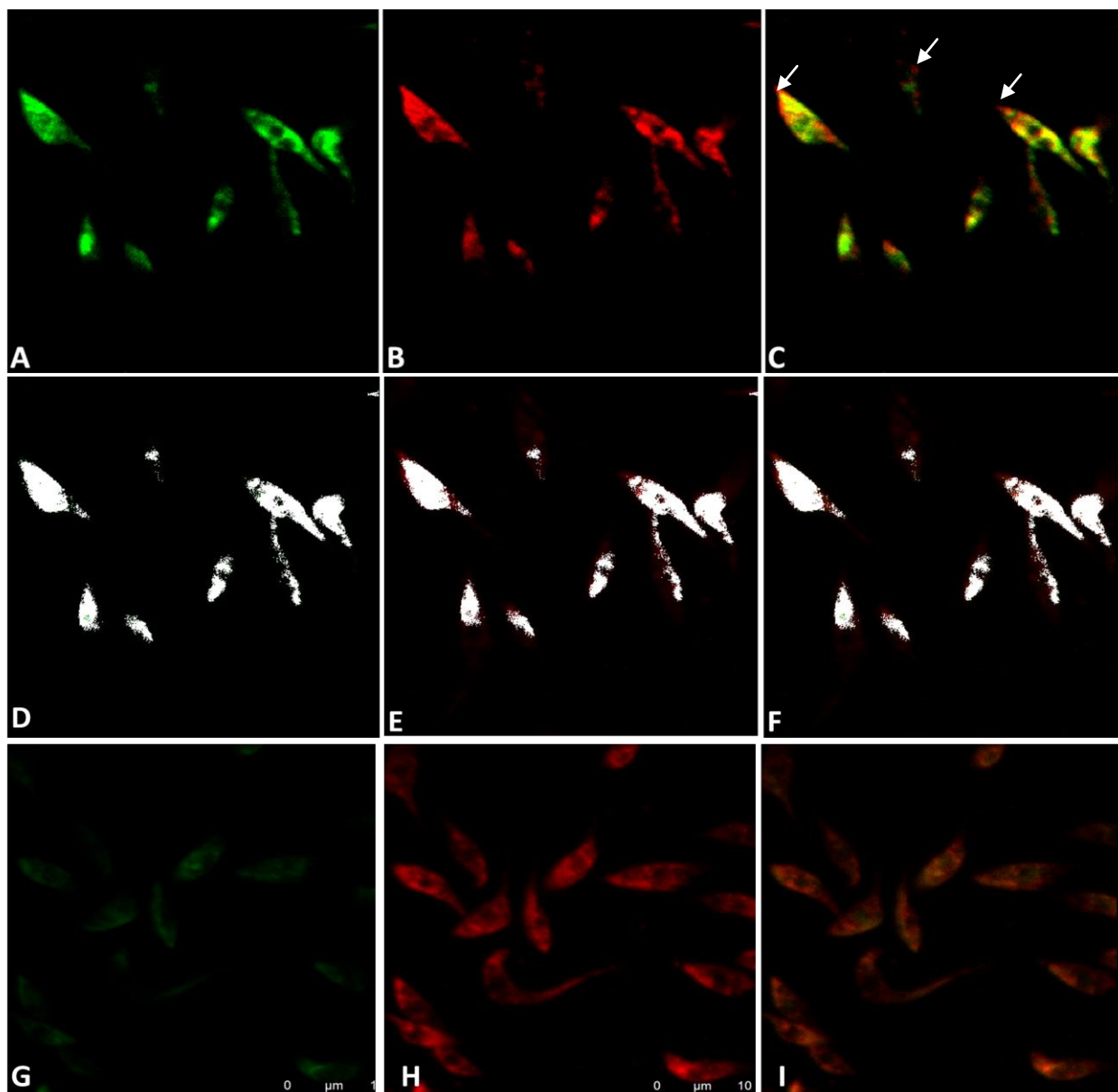


Figura 51. **Colocalização da proteína *TcDHH1* com o mRNA alvo *TcMASP* em epimastigotas.** (A) FISH com sonda α -sense contra o alvo *TcMASP*. (B) imunofluorescência com o anticorpo anti-*TcDHH1*. (C) Sobreposição das imagens A e B. Em D, E e F, os pixels referentes à colocalização foram extraídos das Figuras. Em G o gráfico de distribuição de todos os pixels da Figura F. Em H, I, J, encontram-se os ensaios de FISH com a sonda sense: H, padrão de mRNA, I, *TcDHH1*. Barra = 10 μ m.

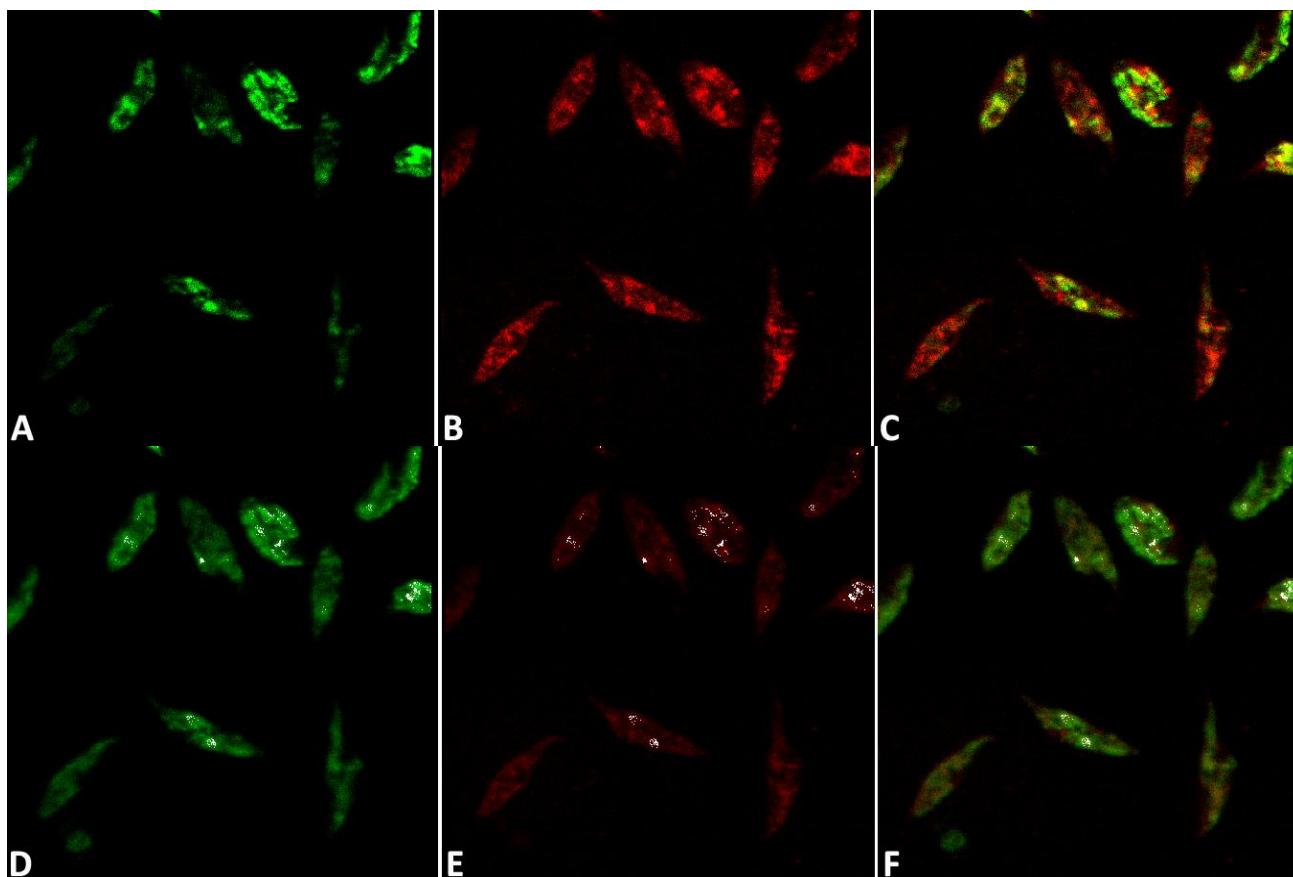


Figura 52. Colocalização da proteína *TcDHH1* com o mRNA do controle negativo 1 em epimastigotas. (A) FISH com sonda α -sense contra o *TcCTL1*. (B) Imunofluorescência com o anticorpo anti-*TcDHH1*. (C) Sobreposição das imagens A e B. O sinal da sonda não se sobrepõe ao sinal da proteína *TcDHH1*, como esperado, exceto alguns poucos pontos de colocalização, evidenciados em D, E e F, onde os pixels referentes à colocalização foram extraídos das Figuras.

As porcentagens de colocalização foram calculadas diretamente pelo *software* LAS AF (Leica *application suite*) e foram reportadas na Tabela 01.

Tabela 01. Porcentagem de colocalização entre as sondas e a proteína *TcDHH1*.

	% Colocalização	
	Sense	α -Sense
<i>TcAMA</i>	0%	93,15%
<i>TcCYC</i>	0%	87,66%
<i>TcMASP</i>	6,21%	69,90%
<i>TcCTL1</i>	0%	31,69%

É interessante ressaltar que os padrões de colocalização dos mRNAs alvos com a proteína *TcDHH1* diferem entre si. Embora para nenhum dos alvos analisados tenha sido observada colocalização total com a proteína *TcDHH1*, alguns alvos apresentam padrões distintos em alguns locais da célula, o que é evidenciado pelo alvo *TcCYC*, onde existe a fluorescência de ambos, juntos (88%) e separadamente, ou seja, existe somente verde, somente vermelho e a junção das duas, o amarelo. Na colocalização do alvo *TcAMA*, ocorre praticamente colocalização completa (93%), pois quase não são perceptíveis pontos onde exista somente uma ou somente outra fluorescência.

Porém, com o alvo *TcMASP*, existem pontos de fluorescência apenas da proteína (sem colocalização com o mRNA, mostrado nas setas brancas, Figura 51C), mas quase não vemos pontos de fluorescência somente do mRNA. Poderia ser o motivo pelo qual não há uma colocalização tão forte entre ambos. Dessa forma, apenas o valor de colocalização, eventualmente, nos dá uma ideia incompleta da sobreposição de duas fluorescências.

Portanto, outro método de verificar colocalização pode ser a partir da intensidade de fluorescência em um ponto escolhido na figura. No caso da sonda α -sense do alvo *TcMASP*, temos a linha verde (ROI1) e as respectivas fluorescências nos três canais verificados: Verde (mRNA), vermelho (*TcDHH1*) e azul (cromatina e cinetoplasto). É perceptível o aumento da fluorescência e consequente sobreposição dos canais verde e vermelho enquanto que o núcleo e o cinetoplasto têm sua intensidade diminuída.

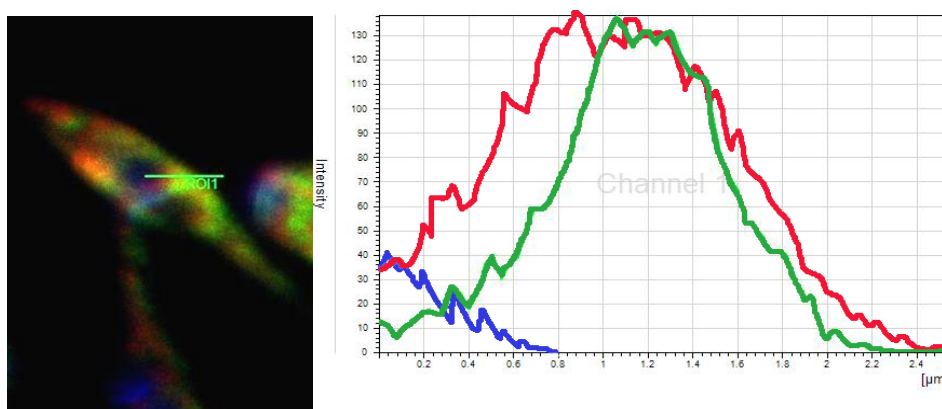


Figura 53. Intensidade de colocalização em uma região escolhida (ROI1) para o alvo α -sense de *TcMASP*. Em verde intensidade de fluorescência da mRNA de *TcMASP*, em vermelho intensidade de fluorescência de *TcDHH1* e em azul, intensidade de fluorescência do DAPI, núcleo e cinetoplasto.

A partir de tais resultados fica evidente que os alvos de TcDHH1 colocalizam em sua grande maioria com TcDHH1, enquanto que o controle negativo testado não apresenta colocalização com a proteína.

4.2.3 Análise do tempo de meia-vida dos alvos de TcDHH1

4.2.3.1 Os grânulos de TcDHH1 não são desestabilizados pelo tratamento com Actinomicina D

Em ensaios de imunofluorescência com antissoro contra a proteína TcDHH1 com parasitas tratados com actinomicina D (em tempos de 5, 10, 20, 30 minutos, 1 hora), não houve mudança no padrão de localização da proteína (padrão granular, Figura 54). Caso houvesse mudança no padrão granular da proteína TcDHH1, os resultados de experimentos que visam estimar o tempo de meia-vida de alvos de TcDHH1, não poderiam ser considerados, uma vez que não saberíamos dizer se os tempos de meia vida estão sendo afetados devido à ação da TcDHH1 ou devido ao efeito secundário da dissociação de seus grânulos. Como controle de que as drogas tiveram efeito foi utilizada uma proteína que possui seu padrão modificado pela parada da transcrição em *T. cruzi* (anticorpo cedido pela mestre Sharon Toledo, contra a proteína TcRRM2, dados não mostrados). A proteína TcRRM2 possui localização nuclear e o tratamento com actinomicina D induz a relocação parcial da proteína para o citoplasma do parasita.

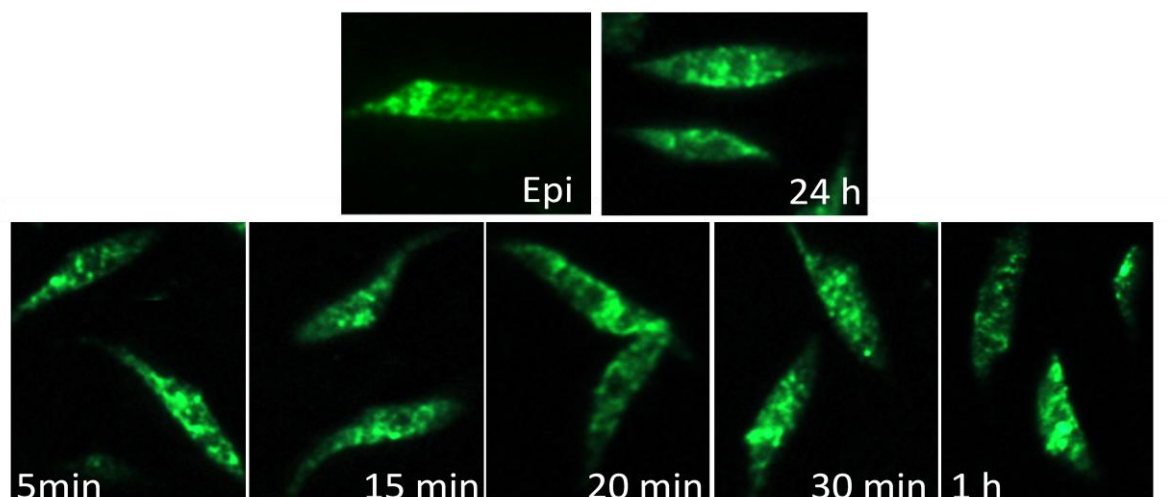


Figura 54. Ensaios de imunofluorescência contra a proteína *TcDHH1* em diferentes tempos de tratamento com a droga Actinomycin D em *T. cruzi*. Anticorpo primário (anti-*TcDHH1*) utilizado na diluição 1:100 e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488) utilizado na diluição 1:200. Epi (epimastigota sem tratamento); Os tempos de tratamento da droga variam de acordo com o indicado em cada Figura (5, 15, 20 e 30 minutos, 1 e 24 horas). Barra 10µm.

4.2.3.2 Os alvos de *TcDHH1* possuem tempos de meia-vida variáveis

Para padronizar as PCRs quantitativas foram testadas diversas temperaturas de anelamento de acordo com o protocolo do item 3.10.3. A partir disso, alguns alvos foram amplificados com êxito e especificidade e quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores foram escolhidos: os alvos que tiveram seu padrão de FISH confirmados pela colocalização com *TcDHH1*, *TcCYC* (F1/R1), *TcAMA* (F2/R2) e *TcMASP* (F2/R2) e o gene *TcL9* (F2/R2) foi utilizado como controle negativo, uma vez que se mostrou mais específico e teve curvas de amplificações melhores do que os controles negativos *TcCTL1* (escolhido para os ensaios de FISH) e *TcCTL2*. O gene abundante *TcL9*, que é um mRNA não afetado pela proteína *TcDHH1* e por ser uma proteína extremamente abundante, possui um tempo de meia-vida relativamente alto, se comparado com a maior parte dos mRNAs de *T. cruzi* (dados não publicados, comunicação pessoal).

No Apêndice F podem ser encontradas as curvas de amplificação e dissociação tanto dos alvos quanto dos normalizadores e controles, bem como o perfil eletroforético de algumas amostras em gel de poliacrilamida 6% para DNA. A partir de tais dados (Apêndice F), as curvas padrão para cada par de oligonucleotídeos iniciadores foram construídas.

A curva padrão construída para cada um dos quatro genes podem ser visualizadas nas Figuras 55 a 58 e seus parâmetros podem ser vistos na Tabela 02.

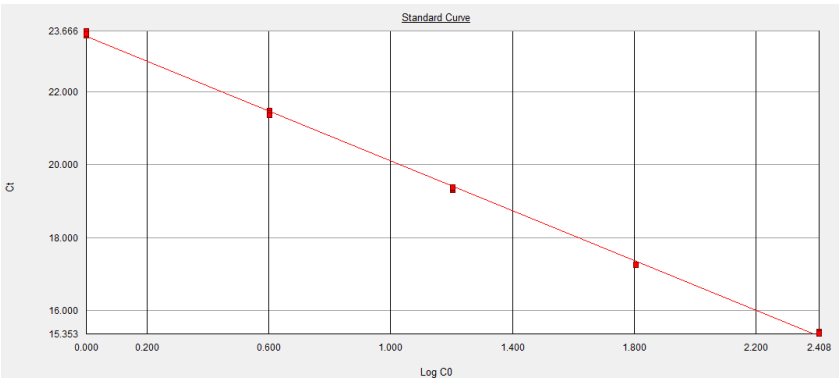


Figura 55. Curva padrão de PCR quantitativa do alvo *TcL9*.

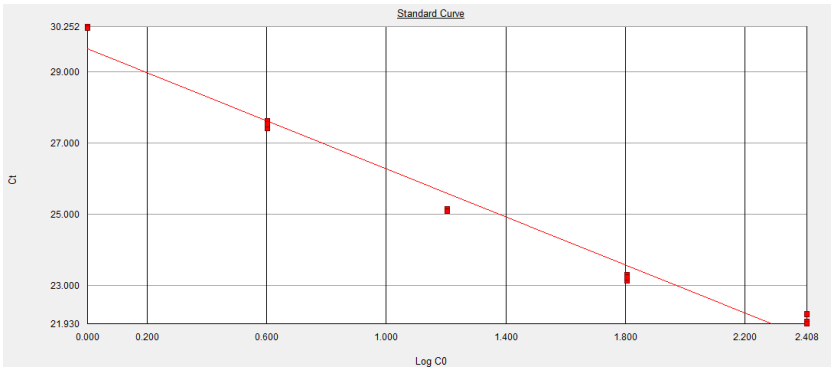


Figura 56. Curva padrão de PCR quantitativa do alvo *TcCYC*.

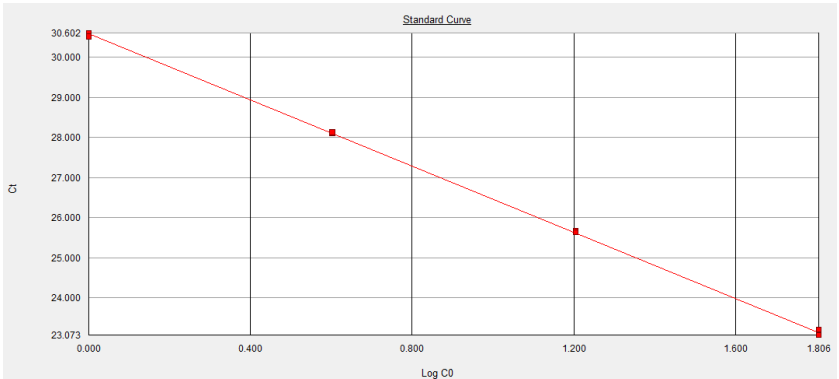


Figura 57. Curva padrão de PCR quantitativa do alvo *TcAMA*.

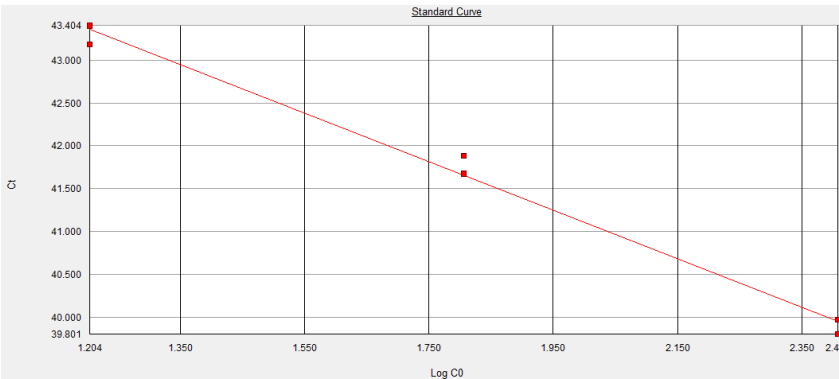
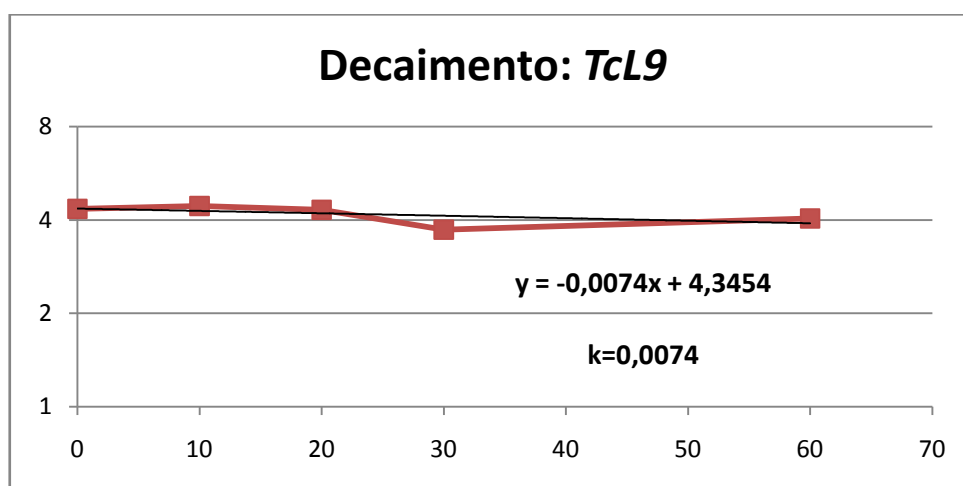
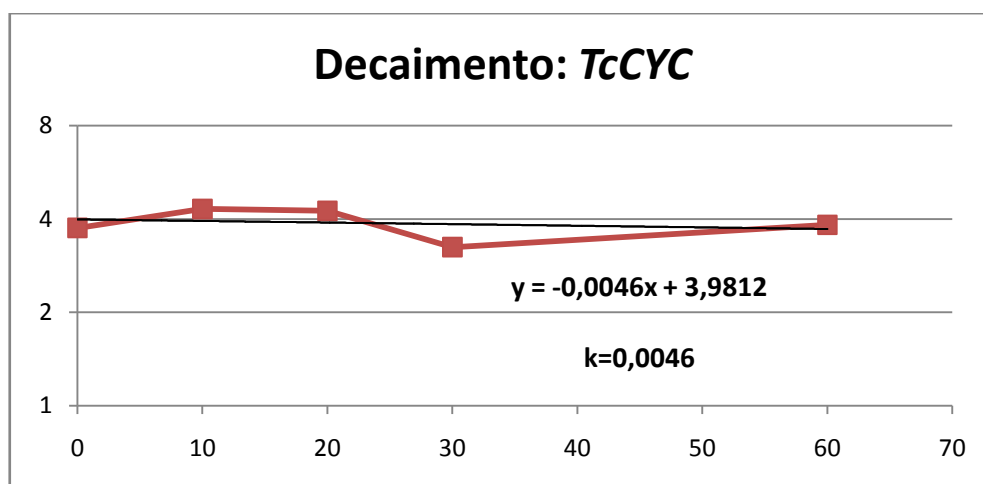


Figura 58. Curva padrão de PCR quantitativa do alvo *TcMASP*.

Tabela 02. Parâmetros das curvas-padrão dos alvos escolhidos

	Coefficiente Angular	R ²
<i>TcL9</i>	-3,418799	0,999182
<i>TcCYC</i>	-3,369259	0,990467
<i>TcAMA</i>	-4,124401	0,999745
<i>TcMASP</i>	-2,832585	0,990839

Após a construção da curva padrão, a quantidade de mRNA presente nas amostras experimentais puderam ser calculadas, como descrito em Material e Métodos (item 3.10.4) e o padrão de decaimento dos mRNA escolhidos pode ser visto nas Figuras 59 a 62.

**Figura 59.** Curva de decaimento do alvo *TcL9*, em epimastigotos; No eixo y temos ln [mRNA residual] e em x temos os pontos observados em minutos.**Figura 60.** Curva de decaimento do alvo *TcCYC*, em epimastigotos.

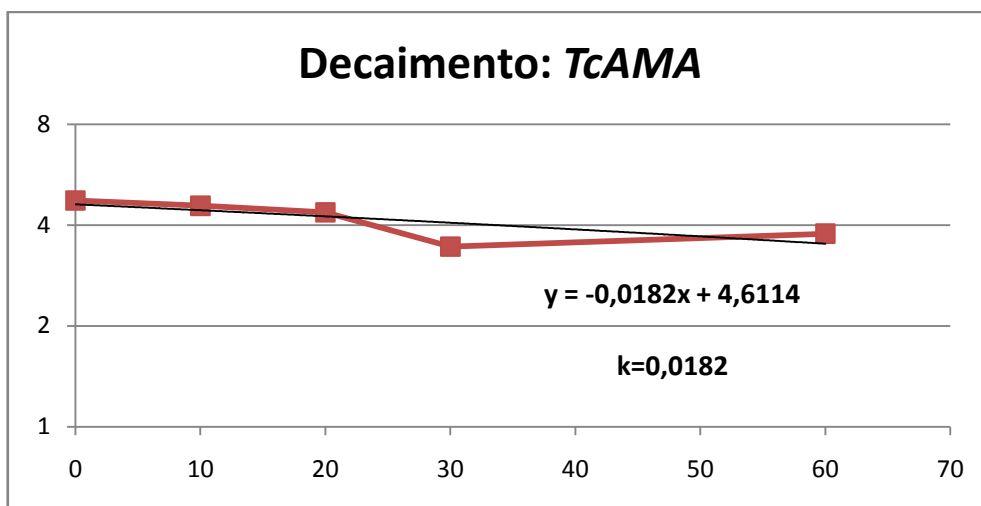


Figura 61. Curva de decaimento do alvo *TcAMA*, em epimastigotos.

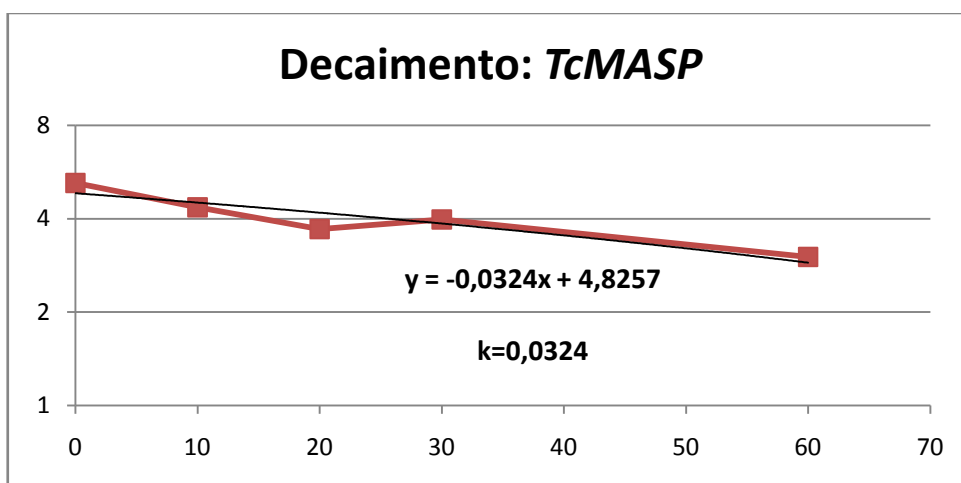


Figura 62. Curva de decaimento do alvo *TcMASP*, em epimastigotos.

O tempo de meia-vida de *TcL9* foi calculado (como descrito em Material e Métodos, item 3.10.4) em 93 minutos (1,5h), enquanto que o do alvo *TcCYC* foi calculado em aproximadamente 150 minutos (2,5h). A partir disso, podemos supor que o mRNA da *TcCYC* seja mais estável do que o mRNA de *TcL9* em epimastigotos. Em contrapartida, os mRNAs alvos *TcAMA* e *TcMASP* tiveram tempos de meia-vida mais baixos (38 minutos para *TcAMA* e 21 minutos para *TcMASP*), mostrando uma degradação mais rápida e, portanto diferindo do resultado para o alvo *TcCYC*.

Em três dos alvos analisados, observamos que dois possuem decaimento rápido e um deles (*TcCYC*) parece ser mais estável do que o controle negativo. Apenas com a análise de poucos mRNAs, não existe uma percepção clara se existe uma tendência maior do complexo com *TcDHH1* estar estabilizando ou desestabilizando seus alvos. Uma análise com uma maior quantidade de alvos de *TcDHH1* seria mais apropriada para

perceber esta tendência. Logo, aproveitando dados de outro grupo do ICC que vem trabalhando em análise de larga escala da meia-vida de diversos mRNAs de *T. cruzi*, decidimos verificar a meia-vida de cada um dos alvos de *TcDHH1* e como esta se encontra dentro da distribuição global de decaimento. Os dados são descritos no próximo item.

4.2.3.3 Análise do tempo de meia-vida a partir do decaimento global em *T. cruzi*

Uma análise global de decaimento de mRNAs em epimastigotos foi feita recentemente pelo grupo de bioinformática do instituto (PROBST, dados ainda não publicados, comunicação pessoal). Essa análise foi feita a partir de culturas de epimastigotas tratados com actinomicina D (em tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos) e o RNA total foi extraído de cada amostra e sequenciado na plataforma de *deep sequencing* SOLiD. O número de leituras (*reads*) foi o parâmetro analisado para determinar a abundância de cada alvo nas amostras analisadas.

A partir dos dados cedidos, foi possível fazer uma análise global de decaimento em *T. cruzi* e compará-la com o padrão de decaimento de todos os alvos de *TcDHH1* identificados previamente por microarranjo (HOLETZ et al, 2007). A lista de mRNAs identificados por microarranjo podem ser visualizados no Apêndice G. Como já mencionado, grande parte dos alvos de *TcDHH1* em epimastigotas são genes estágio-específicos, que não são expressos nesse estágio do ciclo de vida, muitos dos quais pertencentes a duas famílias gênicas, Mucinas e MASPs.

Uma das dificuldades que temos em organismos (como *T. cruzi*) que possuem famílias gênicas muito grandes com genes muito parecidos entre si, é que, quando sequenciados, alvos muito parecidos podem ser erroneamente considerados como sendo um mesmo alvo. Ao agrupar genes em supergenes, esse tipo de erro é minimizado, uma vez que, genes muito parecidos estarão em um mesmo grupo e serão computados de maneira conjunta, e com menor erro.

O primeiro passo necessário para essa análise foi converter os genes identificados em supergenes, o que resultou na conversão de 190 genes em 120 supergenes. Vinte e nove genes não puderam ser analisados, pois não foram agrupados em supergenes ou porque seus supergenes não foram computados nos dados de decaimento global (Apêndice G).

Uma parte dos genes analisados pode ser visualizada na Tabela 03. A Tabela completa com todos os genes analisados encontra-se no Apêndice G.

Como parâmetros provenientes do microarranjo, em verde (2007, HOLETZ) temos: **FC** (*fold change*) que é equivalente ao número de vezes em que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação (amostra imunoprecipitada e sobrenadante); **FDR** (*false discovery rate*) que revela a proporção esperada de falsos positivos entre os genes designados diferencialmente expressos.

Para os dados provenientes do sequenciamento e decaimento global (grupo do Dr. Christian Probst), temos os seguintes parâmetros: **Nível de expressão** que é equivalente ao número de *reads* da amostra no ponto zero, ou seja, a abundância do mRNA em questão no ponto zero (sem adição de actinomicina D); **RSE Global** (*residual squared error*), ou o erro residual ao quadrado, que leva em consideração todos os pontos de 0 a 60 minutos e o quanto tais pontos se afastam da reta do decaimento, proposta por regressão linear; **Decaim. Global** (decaimento global) que é equivalente a quanto o **nível de expressão** diminuiu em 1 hora em relação ao tempo zero, em logaritmo de base 2; **Pontos Considerados (minutos)**: Uma vez que em muitos casos o decaimento nos primeiros pontos é muito mais linear do que se considerarmos todos os pontos dos experimentos, esse parâmetro demonstra quais são os pontos da reta que se encaixam melhor e retornam um menor erro residual. Em alguns casos, apenas os 3 primeiros pontos (0-30 minutos) são considerados. Em outros, a reta resultante com todos os pontos é equivalente ao menor erro residual (0-60 minutos). **RSE Parcial** é equivalente ao erro residual ao quadrado apenas para os pontos considerados no parâmetro anterior e, juntamente com o **Decaim. Parcial** (decaimento parcial), muitas vezes representam melhor o decaimento do alvo do que o decaimento global.

O cálculo do tempo de meia vida a partir do decaimento (seja ele global ou parcial) pode ser feito a partir da seguinte fórmula:

$$t_{1/2} = \frac{0,5}{1 - 2^{\text{decaimento}}}$$

Isto porque o valor de decaimento é igual ao logaritmo na base dois de quanto o mRNA de cada supergene diminuiu em uma hora.

A fins ilustrativos temos na tabela abaixo cinco supergenes retratados com características distintas: O **SG0315** é um supergene que engloba dois genes identificados pelo microarranjo. Ele possui um decaimento global rápido (-2,605) com um erro relativamente alto (0,099) que decai cerca de 88% (0,012) quando consideramos apenas

os três primeiros pontos de decaimento. É um supergene que possui um nível de expressão baixo a médio (56,6) e um tempo de meia-vida baixo (38 minutos). Na tabela ainda temos dois casos peculiares: O primeiro refere-se ao supergene **SG3860**, que possui um coeficiente de decaimento positivo, ou seja, dentro do tempo de avaliação (1h) não houve decaimento e sim aumento da quantidade de material. Isso pode ocorrer devido a flutuações no nível de mRNAs estáveis e na contagem dos *reads* do mesmo. Dessa forma, o cálculo do tempo de meia-vida com esse valor positivo, nos retorna um valor negativo. Isso não quer dizer que houve degradação rápida, mas sim que eles são tão estáveis (pelo menos dentro do período de 1 hora), que não convergem para um número positivo de meia vida. Para tais alvos o correto seria dizer que o tempo de meia vida converge para o infinito. Ou, ainda mais correto, seria dizer que são necessários mais pontos na curva de decaimento (tempos maiores, por exemplo) para prever um tempo de meia vida para eles. O segundo caso peculiar é o do **SG1202**, que tem os dois parâmetros de decaimento (global e parcial) iguais. Isso quer dizer que a reta a partir de todos os pontos é a reta que retorna o menor erro residual e que melhor representa o conjunto.

Para fins comparativos, os resultados para os alvos que foram utilizados com PCR quantitativa estão anexados à Tabela 04. O mais correto nesse caso não seria analisar somente o tempo de meia vida em si de cada alvo, mas sim a diferença dos tempos de meia-vida entre os alvos.

Dessa forma, a partir da comparação entre as duas técnicas temos a corroboração que a *TcCYC* é um alvo mais estável do que o controle *TcL9* e que tanto o alvo *TcAMA* quanto o alvo *TcMASP* possuem decaimento rápido. Dessa maneira, uma vez que para os 4 alvos tivemos padrões parecidos de decaimento entre ambas as técnicas, extrapolamos os dados de modo a analisar todos os alvos identificados de *TcDHH1*.

Tabela 03. Tabela com parâmetros de decaimento de mRNA de alguns alvos de *TcDHH1* e do controle negativo *TcL9*.

Supergene	Nome do Supergene	GeneID	Descrição no Microarranjo	FC	FDR	Nível de Expressão	RSE Global	Decaim. Global	Pontos Considerados (minutos)	RSE parcial	Decaim. Parcial	t _½ (horas)	t _½ (min)
SG0315	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053453767.50	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.086	2.494	56,6	0,099	-2,605	0-30	0,012	-2,319	0,63	38
		Tc00.1047053511255.280	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.218	1.543								
SG0519	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506781.10	mucin TcMUCII, putative	2.686	0.000	31,6	0,095	-2,258	0-30	0,016	-1,97	0,67	40
SG1202	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053430895.10	hypothetical protein, conserved	2.106	2.071	286,6	0,007	-1,272	0-60	0,007	-1,272	0,85	51
SG2930	RNA-binding protein 5	Tc00.1047053511481.70	RNA-binding protein 5, putative	2.066	3.032	23,2	0,044	-1,524	0-30	0,008	-0,312	2,57	154
SG3860	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053507993.270	hypothetical protein, conserved	2.439	2.494	31,6	0,061	-0,513	0-45	0,043	0,132	-5,22	-313
SG7000	Cyclin	Tc00.1047053506945.270	cyclin, putative	2.198	2.242	102,3	0,039	-0,73	0-45	0,031	-0,21	3,69	221
SG0387	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053504239.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	3.511	0.000	14,6	0,252	-2,366	0-45	0,161	-2,985	0,57	34
SG0189	Amastin	Tc00.1047053506437.10	amastin, putative	2.213	3.032	188,8	0,024	-1,977	0-30	0,012	-1,329	0,83	50
SG0398	60S ribosomal protein L9	Tc00.1047053506835.30	N/A	N/A	N/A	6140,5	0,01	-0,341	0-30	0,005	-0,386	2,13	128

Tabela 04. Comparação do tempo de meia-vida calculado por qPCR e por sequenciamento massivo.

Genes analisados por qPCR				t _½ (min)	
Supergene	Nome do Supergene	GeneID	Descrição no Microarranjo	qPCR	Sequenciamento (Parcial)
SG7000	cyclin	Tc00.1047053506945.270	cyclin, putative	150	221
SG0387	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053504239.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	21	34
SG0189	amastin	Tc00.1047053506437.10	amastin, putative	38	50
SG0398	60S ribosomal protein L9	Tc00.1047053506835.30	N/A	93	128

A análise dos mRNAs alvos de *TcDHH1* a partir dos dados completos de decaimento, pode ser representada por uma distribuição em forma de histograma que pode ser vista na Figura 63. Foram escolhidos arbitrariamente alvos com **decaimento maior de 70%** no período de 1 hora como **decaimento rápido** (ou seja, se no tempo zero, a quantidade de mRNA era 1, em tempo de 60 minutos a quantidade de mRNA seria de até 0,3), como **decaimento médio** foram escolhidos alvos com decaimento **de 35% a 70%** em 1 hora e como **decaimento lento**, alvos com **diminuição de até 35%** em 1 hora. A representação percentual de tais dados pode ser vista a partir do gráfico na Figura 64, no qual cerca de 50% dos alvos de *TcDHH1* possuem decaimento rápido, 35% possuem decaimento médio e 15% possuem decaimento lento.

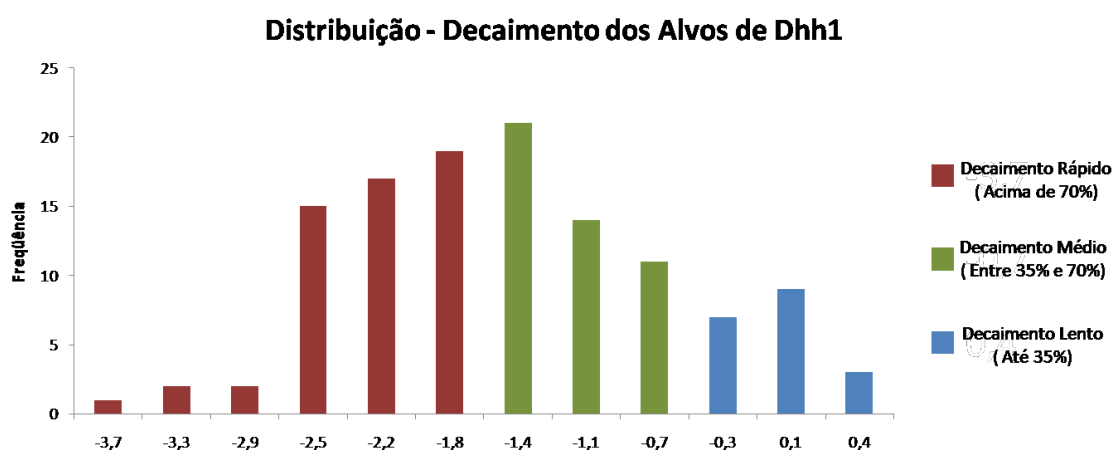


Figura 63. Histograma representando as classes de alvos de *TcDHH1* de acordo com as taxas de decaimento. As porcentagens indicadas são referentes a quantidade de decaimento em um período de uma hora. Ex.: alvos com decaimento rápido, decaem mais do que 70% da sua quantidade inicial de mRNA no período de uma hora.

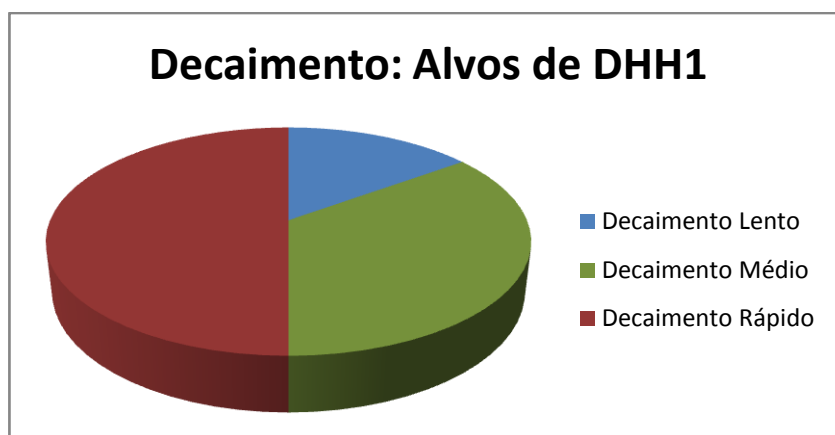


Figura 64. Quantidade de supergenes referentes aos alvos de *TcDHH1* com decaimentos rápido, médio e lento. 50% deles possuem decaimento rápido, enquanto que 35% têm decaimento médio e 15%, decaimento lento.

Ao compararmos tais resultados com o decaimento global em *T. cruzi* encontramos duas diferenças significativas: As distribuições de decaimento global e dos alvos de *TcDHH1* possuem curvas distintas (comparação de histograma global com o de *TcDHH1*, dados não mostrados) e as porcentagens de mRNAs em cada categoria são diferentes. A partir do decaimento global temos cerca de 35% dos mRNAs com decaimento lento, 32% com decaimento médio e 33% com decaimento rápido (Figura 65).

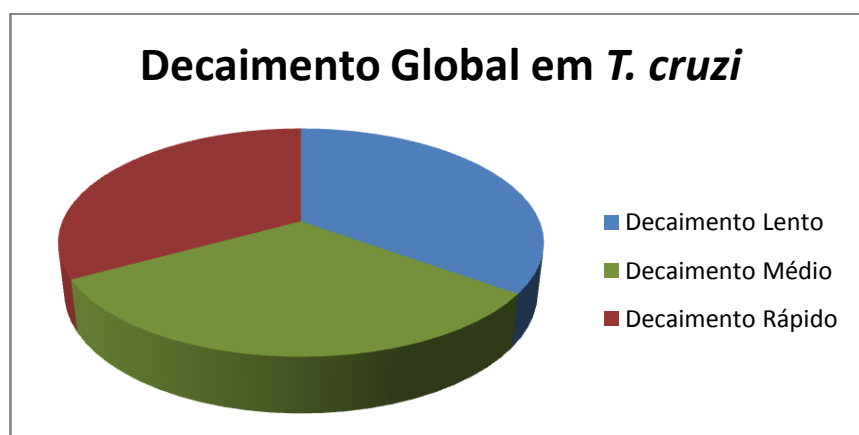


Figura 65. Quantidade de supergenes de *T. cruzi* com decaimentos rápido, médio e lento. A distribuição é homogênea: 33% deles possuem decaimento rápido, enquanto que 32% têm decaimento médio e 35%, decaimento lento.

Além disso, utilizando dados disponíveis banco de dados de tripanossomatídeos TritrypDB (www.tritrypdb.org), pudemos analisar o padrão de expressão de alguns mRNAs no ciclo de vida do parasita e temos que de

um modo geral, mRNAs alvos estáveis são mais expressos durante o estágio de epimastigotas enquanto que alvos instáveis são mais expressos em outros estágios do ciclo de vida. Podemos ver a partir da Figuras 66 e 67 uma comparação de dois mRNAs alvos estáveis (Figura 66) com dois instáveis (Figura 67) e suas expressões durante o ciclo de vida. Uma análise mais completa pode ser vista no Apêndice H, com o padrão de expressão de 12 mRNAs mais estáveis contra 12 mais instáveis (sempre que os dados estavam disponíveis). A lista completa dos 15 genes mais estáveis e dos 15 mais instáveis encontra-se no Apêndice H.

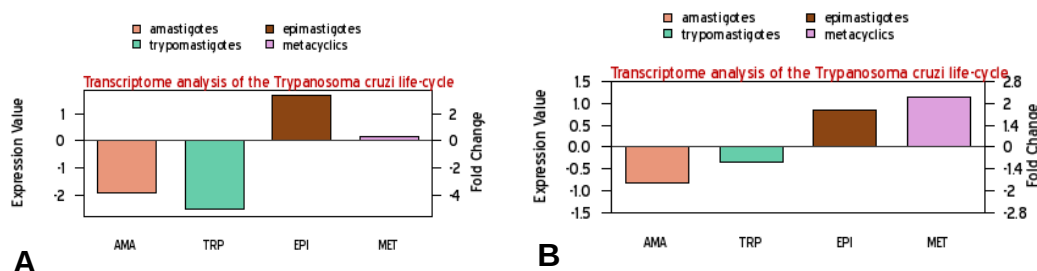


Figura 66. Perfil de expressão de dois alvos estáveis de *TcDHH1* durante o ciclo de vida: (A) Proteína hipotética conservada (Tc00.1047053509997.10) e (B) Mucina, TCMUCII putativa (Tc00.1047053506321.10). AMA (amastigotas); TRP (tripomastigotas sanguíneos); EPI (epimastigotas) e MET (tripomastigotas metacíclicos). Fold change equivale ao número de vezes que o mRNA está aumentado em relação ao outro e Expression value é uma medida de abundância do mRNA em cada estágio do ciclo de vida (FONTE: www.tritrypdb.org).

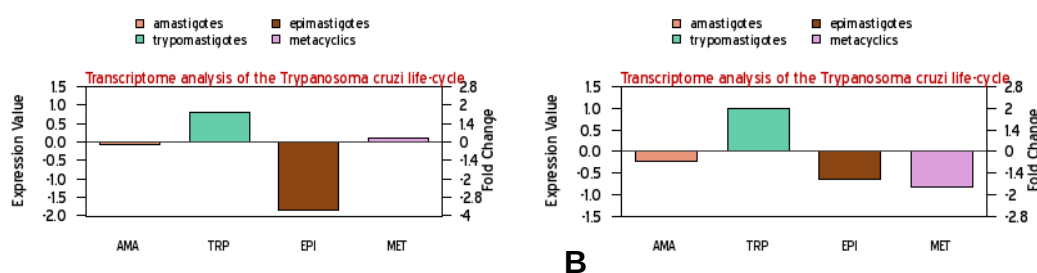


Figura 67. Perfil de expressão de dois alvos instáveis de *TcDHH1* durante o ciclo de vida: (A) phosphatidic acid phosphatase, putative (Tc00.1047053511277.370) e (B) Mucina, TCMUCII putativa (Tc00.1047053511255.299). AMA (amastigotas); TRP (tripomastigotas sanguíneos); EPI (epimastigotas) e MET (tripomastigotas metacíclicos). Fold change equivale ao número de vezes que o mRNA está aumentado em relação ao outro e Expression value é uma medida de abundância do mRNA em cada estágio do ciclo de vida (FONTE: www.tritrypdb.org).

A partir desses dados, podemos supor que *TcDHH1* está envolvida com degradação de mRNAs expressos em outros estágios do ciclo de vida (como por exemplo *TcAMA*, *TcMASP*, *TcHYP*, *TcMUC* entre outros) e com a estocagem ou estabilização de mRNAs expressos em epimastigotas (como por exemplo *TcCYC* e *TcRBP5*, por exemplo). Com a análise futura de outras proteínas que fazem parte dessas estruturas, ficará mais evidente se existem ou não grânulos de processamento e estresse com comportamentos parecidos aos de outros eucariotos ou se tais estruturas diferem em função e conteúdo em tripanossomatídeos.

5. DISCUSSÃO

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre principalmente em nível pós-transcricional. Assim, a abundância e tradução do RNA mensageiro (mRNA) depende de fatores como alteração na estabilidade, localização e acesso dos mRNAs aos polissomos. Em eucariotos, grânulos de RNA participam ativamente nos processos de estocagem, tradução e degradação do mRNA (THOMAS *et al.*, 2011). Grânulos de RNA também já foram descritos em tripanossomatídeos (HOLETZ *et al.*, 2007; CASSOLA *et al.*, 2007; KRAMER *et al.*, 2008) e em estudos prévios de nosso laboratório (HOLETZ *et al.*, 2007; HOLETZ *et al.*, 2010), onde os autores caracterizaram a proteína TcDHH1: uma DEAD-box RNA helicase altamente conservada entre os eucariotos e considerada marcadora de *P-bodies* (mas não exclusiva de *P-bodies*) em mamíferos e leveduras (OLSZEWSKA *et al.*, 2012; TEIXEIRA & PARKER, 2007). Resultados de nosso grupo revelaram que esta proteína é constitutivamente expressa durante todo o ciclo de vida do parasita, está presente em complexos independentes de polissomos e está localizada em *foci* citoplasmáticos que variam em número quando as células são submetidas a condições de estresse ou ao tratamento com as drogas cicloheximida e puromicina (HOLETZ *et al.*, 2007). O conteúdo protéico dos grânulos de TcDHH1 em epimastigotas foi analisado por espectrometria de massa e demonstrou maior similaridade com os grânulos de estresse (HOLETZ *et al.*, 2010). Simultaneamente, uma abordagem ribonômica foi usada para identificar os RNAs associados com as proteínas dentro destes complexos. Os resultados de HOLETZ e colaboradores (2010) demonstraram a associação de mRNAs cuja expressão é regulada de maneira estágio-específica, sendo reduzida nas formas epimastigotas e aumentada em outras formas do ciclo de vida do *T. cruzi*. Estes dados indicam que os grânulos de TcDHH1 são estruturas citoplasmáticas especializadas envolvidas no metabolismo de mRNAs com papel importante na regulação da expressão gênica deste parasita. Assim como *P-bodies* de outros eucariotos, os grânulos contendo DHH1 em *T. cruzi* estão presentes de forma constitutiva. No entanto, sua composição protéica e a alteração no número e tamanho após submissão do parasita a estresse nutricional são características semelhantes a grânulos de estresse, que atuam

estocando mRNAs. Sendo assim, ainda é necessário esclarecer como os grânulos de *TcDHH1* regulam a expressão de genes e se isso se dá de maneira a estocar ou degradar os mRNAs alvos.

Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi ajudar a desvendar as funções desses grânulos de RNA que contém DHH1 em *T. cruzi* e avaliar se teriam papel majoritário na estabilização/estocagem, como grânulos de estresse ou no processamento e degradação de mRNAs, como *P-bodies*.

Como primeira etapa, buscamos aprofundar o estudo sobre a composição e função dos grânulos que contém *TcDHH1* e foram escolhidas para análise, neste trabalho, duas proteínas que não haviam sido identificadas em ensaios prévios de imunoprecipitação (HOLETZ *et al.*, 2010), mas que são descritas em outros organismos como proteínas de degradação que interagem com DHH1: *TcXRNA* (uma exonuclease 5'-3') e *TcPOP2* - a mais importante desadenilase em *C. elegans* (MAEDA *et al.*, 2001; MOLIN & PUISIEUX, 2005), *Drosophila* (TEMME *et al.*, 2004) e em *T. brucei* (SCHWEDE *et al.*, 2008). A proteína *TcXRNA* já havia sido identificada em *T. cruzi* por CASSOLA e colaboradores em 2007 e tanto *TbXRNA* quanto *TcPOP2* foram caracterizadas em *T. brucei* (SCHWEDE *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006). Neste trabalho, buscamos primeiramente caracterizar ambas as proteínas quanto à sua localização celular em epimastigotas e quanto a expressão no ciclo de vida em *T. cruzi* (apenas para *TcXRNA*).

A proteína POP2 (também conhecida como CAF1), foi caracterizada em *T. brucei* por SCHWEDE e colaboradores (2008; 2009). Em *T. brucei*, a degradação de diversos mRNA constitutivamente expressos ou de mRNAs estáveis não é afetada pela depleção da proteína *TbXRNA*, mas é quase completamente inibida pela ausência da desadenilase *TbPOP2*. Segundo esse mesmo trabalho, todos os domínios catalíticos da proteína estão conservados em *T. brucei*, e pela análise apresentada no item 4.1.1.3 de Resultados e no Apêndice C, também pudemos perceber que a proteína *TcPOP2* possui os três domínios conservados. A partir da clonagem e transfecção de *T. cruzi* com a proteína fusionada às etiquetas TAP e GFP pudemos verificar que a localização da proteína *TcPOP2* (pelo parasita como um todo, Figuras 28 e 29) condiz com a localização da proteína *TbPOP2* em *T. brucei* (SCHWEDE *et al.*, 2008). Uma vez que a busca por homólogos da proteína Ccr4, a desadenilase

com maior atividade em leveduras (OHN *et al.*, 2007), não resultou em nenhuma proteína aparentemente funcional em *T. brucei* (SCHWEDE, 2008) ou em *T. cruzi*, e os domínios da proteína TcPOP2 são aparentemente funcionais nesses dois organismos, é possível supor que a proteína TcPOP2 seja a principal desadenilase de tripanossomatídeos. A produção de anticorpos contra TcPOP2 e TcCCR4 está sendo realizada para melhor caracterização funcional das proteínas em questão e verificação das hipóteses acima sugeridas.

Assim, acreditamos que a proteína identificada em *T. cruzi* seja homóloga à desadenilase e um bom marcador para grânulos de degradação. No presente trabalho conseguimos detectar a presença de TcDHH1 e a desadenilase TcPOP2 em um mesmo imunocomplexo e por imunolocalização parcial (Figuras 33 e 36), demonstrando que parte dos grânulos de TcDHH1 podem estar envolvidos com degradação de mRNAs alvos. Este dado corrobora os estudos anteriores em leveduras e *T. brucei* (HATA *et al.*, 1997; SCHWEDE *et al.*, 2008), nos quais a proteína DHH1 parece interagir com vários componentes do complexo CCR4-NOT, incluindo a proteína POP2.

Com relação à proteína XRNA, LI e colaboradores (2006) demonstraram que a proteína TbXRNA é essencial para crescimento normal de *T. brucei* e possui função na degradação de mRNAs. Nesse mesmo trabalho, os autores admitem que não foi possível determinar a localização celular da proteína por imunofluorescência e uma vez que o anticorpo específico reconhecia diversas bandas, a localização subcelular foi problemática. Além disso, o tamanho predito para a proteína TbXRNA é aproximadamente 158kDa, e nos extratos de *T. brucei* submetidos à RNA de interferência para tal proteína tiveram uma banda de aproximadamente 180kDa alterada. Mesmo assim, eles sugerem que a proteína TbXRNA seja parcialmente nuclear e parcialmente citoplasmática. Isso condiz com estudos de leveduras que mostram que mutações na proteína homóloga Xrn1 não afetam apenas mRNAs citoplasmáticos, mas também nucleares, como no processamento de rRNA e snoRNA (PETFALSKI *et al.* 1998). No entanto, CASSOLA e colaboradores (2007) determinaram o padrão de localização de TcXRNA como sendo quase completamente citoplasmático, com pouca fluorescência observada no núcleo. Os resultados obtidos em nosso trabalho, por meio do anticorpo que reconhece uma banda de

aproximadamente 160kDa de forma específica (Figura 19) referente à *TcXRNA*, também mostram um padrão fortemente citoplasmático para tal proteína (Figura 30). A proteína *TcXRNA* é regulada durante o ciclo de vida do parasita, (Figura 27), com maior expressão nas formas epimastigotas, epimastigotas submetidas a estresse nutricional e epimastigotas em diferenciação aderidas ao substrato. Em formas tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos há uma abrupta diminuição na expressão da proteína enquanto que em amastigotas, é quase imperceptível a presença da mesma. A partir disso, podemos supor que, devido à diminuição da tradução nos estágios tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos (GOLDENBERG *et al.*, 1985), exista uma diminuição de grânulos envolvidos especificamente com degradação (*TcXRNA*, por exemplo).

Pudemos demonstrar por imunofluorescência indireta a colocalização parcial entre *TcDHH1* a exonuclease 5'-3' *TcXRNA* (Figura 32). Contudo ainda não foi possível verificar se *TcDHH1* e *TcXRNA* fazem parte de um mesmo imunocomplexo, mas esses experimentos serão feitos futuramente para corroborar a colocalização entre as duas proteínas. Esta análise parece ser muito importante para o estudo pois acreditamos que *TcXRNA* seja um marcador de grânulos de degradação com papel importante na regulação de mRNAs durante o ciclo de vida e por isso, devemos insistir em comprovar se *TcXRNA* e *TcDHH1* fazem parte de um mesmo imunocomplexo.

Além dessas proteínas marcadoras de grânulos de degradação, incluímos nas análises a proteína *TcALBA3*, visto que algumas proteínas ALBA já foram descritas capazes de regular mRNAs especificamente (MANI *et al.*, 2011). Em tripanossomatídeos, existem quatro proteínas identificadas com o domínio Alba: ALBA1, ALBA2, ALBA3 e ALBA4 (MANI *et al.*, 2011). A proteína *TbALBA3* parece ocupar um papel central em formas procíclicas e é o único homólogo em *T. brucei* cuja depleção causa um fenótipo diferenciado. O interessante é que em tripanossomas, as proteínas ALBA são recrutadas para grânulos formados em resposta a estresse nutricional, assim como DHH1 e PABP (MANI *et al.*, 2011; CASSOLA *et al.*, 2007; HOLETZ *et al.*, 2010). Além disso, ensaios anteriores já haviam detectado a colocalização parcial desta proteína com *TcDHH1* (HOLETZ, 2008). Dessa forma, gostaríamos de confirmar se essas duas proteínas poderiam fazer parte de um mesmo

imunocomplexo e pelos ensaios de imunoprecipitação foi possível confirmar esta interação (Figura 35). Logo, os ensaios de interação mostrados aqui corroboram a idéia de que *TcDHH1* interage tanto com componentes presentes em grânulos de degradação e grânulos com dinâmica similar a grânulos de estresse.

Ainda assim resolvemos ampliar esta análise de interação aproveitando dados disponíveis na literatura e em trabalhos prévios (HOLETZ, 2008), pesquisando uma série de interações (algumas comprovadas em *T. cruzi* e/ou *T. brucei* e outras apenas com base em *datamining*) para propor uma rede de interações proteína-proteína da proteína DHH1 em tripanossomatídeos. Por meio dessa pesquisa, foi possível identificar possíveis interações com proteínas ainda não caracterizadas em *T. cruzi*, como é o caso das duas proteínas homólogas às desadenilases PAN2 e PAN3 em *T. brucei*, visto que é improvável que *TcPOP2* seja a única desadenilase funcional em *T. cruzi*. Mesmo com a remoção das desadenilases Ccr4 e Pop2 de leveduras, existe ação residual de desadenilação *in vivo*, em sua maior parte devido ao complexo PAN (PAN2/PAN3) (MORGAN & TUCKER, 2001). Em *T. brucei*, SCHWEDE e colaboradores (2009) descreveram possíveis homólogos de PAN2 e PAN3, que se mostraram funcionais, uma vez que sua depleção resultava em menores taxas de desadenilação no parasita. Em *T. cruzi*, esses dois homólogos foram reportados em nosso trabalho (Quadro13 e Apêndice E) e, devido à alta similaridade com *T. brucei* (72% para PAN2 e 68% para PAN3), podemos supor que eles possuam função similar. Estudos mais aprofundados devem ser feitos de modo a comprovar tal hipótese, desde a construção de ferramentas como anticorpos e linhagens transfectantes até a análise de sua expressão durante o ciclo de vida.

Além das proteínas *TcPAN2* e *TcPAN3*, identificamos *in silico*, interações da proteína *TcDHH1* com outras proteínas ainda não caracterizadas em *T. cruzi* (Quadro 13), como: *TcSCD6*, ortólogo do silenciador de tradução RAP55, também conhecido como Lsm14 (KRAMER *et al.*, 2008), e *TcNOT2* e *TcNOT5*, identificadas em *T. brucei* e com ortólogos aparentemente funcionais em *T. cruzi*. A proteína SCD6 em leveduras e seu ortólogo RAP55 em mamíferos ativam o complexo de decapeamento e são encontradas tanto em *P-bodies* quanto em grânulos de estresse (YANG *et al.*, 2006; RAJYAGURU *et*

al., submetido, revisado por SWISHER & PARKER, 2010). Em mamíferos, a proteína possui dois domínios de ligação a RNA RGG, no qual o primeiro deles é essencial para sua localização em *P-bodies* enquanto que o segundo é o responsável por sua localização em grânulos de estresse (YANG *et al.*, 2006). Em *T. brucei*, foi demonstrado que *TbDHH1* e *TbSCD6* colocalizam em grânulos distintos de grânulos de estresse, que por sua vez são compostos por diversos fatores de iniciação de tradução (KRAMER *et al.*, 2008).

Outras proteínas identificadas *in silico* e mostradas na rede de interação de DHH1 incluem: PABP1 (típica de grânulos de estresse) e PABP2 (ainda sem função caracterizada em *T. cruzi*), PUF6 (relacionada à degradação de mRNAs específicos) e HSPs (detectadas principalmente em grânulos de estresse em resposta ao choque térmico). A PABP1 é considerada marcadora de grânulos de estresse e está ausente em *P-bodies* de mamíferos, porém, BRENGUES e PARKER (2007) mostraram que a proteína Pab1p está presente nos *P-bodies* de *S. cerevisiae*, mesmo na ausência de estresse celular, e que mRNPs contendo mRNA poli(A), Pab1p, eIF4E e eIF4G podem intermediar o processo de troca dos mRNAs entre os *P-bodies* e a maquinaria de tradução. Outro trabalho demonstrou que estes grânulos que contêm Pab1p e os fatores de iniciação eIF4E e eIF4G em *S. cerevisiae* são estruturas distintas de *P-bodies*, formados apenas em condições de estresse nutricional pela ausência de glicose. Estes EGP-*bodies* (eIF4E, eIF4G e Pab1p) colocalizam parcialmente com os *P-bodies* e funcionam como grânulos de estocagem de mRNA que são aptos a retornar à tradução quando restabelecidas as condições de crescimento celular (HOYLE *et al.*, 2007). Estudos em *L. major* demonstraram que existem três genes *PABP* homólogos nesse organismo, *LmPABP1*, *LmPABP2* e *LmPABP3* com funções distintas (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). Enquanto a proteína *LmPABP1* é a melhor candidata para funções já definidas na tradução das proteínas PABP em eucariotos, supõem-se que a *LmPABP2* esteja envolvida no controle pós-transcricional de mRNAs específicos, por meio da interação com diferentes parceiros que tenham domínios de ligação à RNA. Os autores ainda sugerem que *LmPABP2* e *LmPABP3* poderiam estar associadas com processamento e exportação de mRNA, visto sua migração para o núcleo sob o efeito da inibição da

transcrição. Além disso, foram observadas diferenças significativas nos mRNAs que se associam a estas proteínas. A proteína *LmPABP1* está associada a RNAs que codificam, em sua maioria, proteínas ribossomais, enquanto as proteínas *LmPABP2* e *LmPABP3* associam-se preferencialmente a RNAs que codificam proteínas ligadoras de DNA, entre elas histonas e proteínas de ligação a minicírculos, indicando claramente funções distintas para os homólogos e provável papel das *LmPABP2* e *LmPABP3* na regulação destes mRNAs (dados não publicados, comunicação pessoal).

Logo, a interação de *TcDHH1* com *TcPABP1* (*in silico* neste trabalho e *in vivo* no trabalho de HOLETZ *et al.*, 2010) e *TcPABP2* (HOLETZ *et al.*, 2010) pode indicar tanto o papel de *TcDHH1* como um repressor traducional, quando em associação com *TcPABP1*, promovendo a retirada de determinados mRNAs dos polissomos para um estado traducional inerte, com o acúmulo em grânulos de RNA, quanto a função de *TcDHH1* na regulação pós-transcricional de mRNAs específicos, quando presente em grânulos que também contém a proteína *TcPABP2*. Isso fica mais evidente ao analisarmos os resultados obtidos do perfil de sedimentação da proteína *TcDHH1* em gradientes de sacarose tratados com cicloheximida e puomicina (Figuras 39, 40 e 41), nos quais é perceptível que, apesar da proteína *TcDHH1* estar presente em frações de alta densidade independentes de polissomos, a dissociação de polissomos leva a uma pequena diminuição da proteína em frações mais densas. Podemos supor então que, apesar da proteína *TcDHH1* não fazer parte e nem ter função direta no processo de tradução de mRNAs, ela pode “dialogar” com polissomos a fim de recrutar mRNAs específicos a seus grânulos. De fato, COLLIER e PARKER (2005) mostram algumas evidências que em leveduras a proteína Dhh1p pode funcionar mediando a saída dos mRNAs dos polissomos com a posterior entrada nos *P-bodies*. Em um trabalho mais recente, DRUMMOND e colaboradores (2011) demonstraram que apesar das proteínas Dhh1p ou Pat1p de levedura não colocalizarem com polissomos ativos em crescimento exponencial, elas podem ter um acesso aumentado a polissomos ativos na fase de crescimento diáuxico (momento em que a fonte de carbono muda de glicose para etanol). Além disso, estudos em *T. brucei* demonstraram que a superexpressão da proteína DHH1 mutante (com domínio ATPase não funcional) resulta na movimentação de mRNAs constitutivos para fora dos

polissomos, sugerindo que exista um remodelamento dependente da proteína *TbDHH1* selvagem necessário para manter o equilíbrio da célula (KRAMER *et al.*, 2010). No entanto, uma vez que a maior parte da proteína não está associada com polissomos em *T. cruzi* ou *T. brucei*, essa interação entre DHH1 e polissomos deve ocorrer de maneira transiente.

Além das proteínas citadas acima, nosso grupo mostrou anteriormente que as proteínas *TcDHH1* e *TcPUF6* coimunoprecipitam, indicando que ambas interagem em epimastigotas (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008). As proteínas da família Puf (Pumilio/FBF1) regulam a estabilidade de mRNAs específicos e o processo de tradução, reprimindo o início da tradução ou aumentando a desadenilação do mRNA (WHARTON & AGGARWAL, 2006; WICKENS *et al.*, 2002). Os mRNAs associados com a proteína *TcPUF6* são regulados negativamente nas populações de parasitas transfectados que superexpressam esta proteína (DALLAGIOVANNA *et al.*, 2008). Além disso, as proteínas PUF geralmente interagem com diferentes proteínas e sua função é determinada por um mecanismo de regulação combinatorial (JARUZELSKA *et al.*, 2003; SONODA & WHARTON, 1999). Da mesma maneira, a proteína Puf5 em *S. cerevisiae* interage com a proteína Pop2 e recruta proteínas de degradação como Dhh1p, Dcp1p e Ccr4p (GOLDSTROHM *et al.*, 2006).

Além de interações confirmadas, a partir dos dados da literatura e pelas nossas análises *in silico* foi possível mostrar interações ou proteínas existentes em outros organismos mas que não foram identificadas até o presente momento em tripanossomatídeos, como é o caso do complexo Lsm. As proteínas Lsm formam dois principais complexos Lsm heptaméricos: Lsm1-Lsm7 e Lsm2-Lsm8. O complexo Lsm1-Lsm7 está presente em *P-bodies* em leveduras e auxilia o processo de degradação de mRNAs nesses grânulos. A purificação de Lsm1p, leva à obtenção de um complexo que contém a ativadora de decapeamento Pat1p e a exonuclease Xrn1p em leveduras (BOUVERET *et al.*, 2000). Já o complexo Lsm2-Lsm8 está presente no núcleo e nucléolo e auxilia no *splicing* do pré-mRNA, ligando-se ao U6 snRNA em *S. cerevisiae* *T. brucei* (MAYES *et al.*, 1999; TCKACZ *et al.*, 2008). As proteínas Lsm2-Lsm8 foram identificadas em *T. brucei* (TCKACZ *et al.*, 2008), mas as buscas pelo gene *LSM1* em *T. cruzi* e *T. brucei* não retornaram nenhum ortólogo aparente. Uma vez que a localização celular das proteínas *TbLSM2-*

TbLSM7 é exclusivamente nuclear (TCKACZ *et al.*, 2008), podemos supor que não exista interação entre *TcDHH1* (que é uma proteína citoplasmática) e as proteínas do complexo Lsm em *T. cruzi* e *brucei* ou que a proteína LSM1 não seja conservada o suficiente para ser identificada a partir de comparações de sequências entre seus ortólogos eucarióticos.

As interações protéicas aqui revisadas e reportadas sugerem que os mRNPs contendo DHH1 em *T. cruzi* são estruturas heterogêneas, formadas por diferentes subconjuntos de proteínas e que a dinâmica de tradução, estocagem e degradação dos mRNAs é complexa, levantando a ideia da existência de *regulons* pós-transcricionais nesses parasitas. Isso é evidenciado principalmente pelo fato de que a proteína *TcDHH1* interage com uma gama muito ampla de outras proteínas que possuem funções distintas e “antagônicas”, como é o caso de proteínas relacionadas à estocagem como HSPs e PABP1 *versus* proteínas relacionadas à degradação como XRNA, SCD6, POP2. Além dessas proteínas, a DHH1 interage com diversas outras ligadoras de RNAs, que, em grande parte, atuam recrutando e regulando a estabilidade de mRNAs alvos específicos nesses grânulos.

A comprovação experimental das interações protéicas em diversos estágios do ciclo de vida de *TcDHH1*, incluindo aquelas identificadas por análises bioinformáticas baseadas em dados de literatura, está sendo realizada por ensaios de imunoprecipitação dos complexos que contém a proteína *TcDHH1* seguida por espectrometria de massa (análise proteômica). Entretanto, é importante ressaltar que embora a proteína Dhh1p tenha sido inicialmente caracterizada como um marcador de *P-bodies* em leveduras e mamíferos, vários trabalhos indicam que esta proteína também está presente em grânulos de estresse (revisto por PARKER & BUCHAN, 2009). Dessa forma, a partir dos dados de interação temos duas principais hipóteses a serem analisadas: a primeira delas envolve a ideia de que tanto *P-bodies* quanto grânulos de estresse existam em tripanossomatídeos e, uma vez que a proteína *TcDHH1* não seja um bom diferenciador entre tais tipos de grânulos (como em outros eucariotos), ela possa estar presente nos dois tipos de grânulos em *T. cruzi*. A segunda hipótese sugere que grânulos de mRNA em *T. cruzi* não se comportam da mesma maneira que em leveduras e mamíferos, podendo compartilhar composição e funções tanto de *P-bodies* como de

grânulos de estresse e, dessa forma, representam um modelo de grânulo “ancestral” e que, durante a evolução, ocorreu uma especialização e divergência entre os outros tipos usuais de grânulos de RNA de eucariotos. De uma forma ou de outra, mesmo não podendo distinguir claramente a função direta de *TcDHH1* na estocagem ou degradação de mRNA, é interessante notar que algumas evidências apontam para *DHH1* como um gene essencial em tripanossomatídeos (diferentemente de outros eucariotos que suportam sua deleção, COLLIER & PARKER, 2005; BOAG *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2001). Ensaios de *knockdown* em *T. brucei* resultaram na parada da proliferação entre 24 e 48 horas após indução (KRAMER *et al.*, 2010) e apesar da obtenção com sucesso de linhagens heterozigóticas *DHH1*^{-/+}, várias tentativas de obtenção de um nocaute duplo (*DHH1*^{-/-}) viável falharam (SCHWEDE *et al.*, 2008). Em *T. cruzi*, não alcançamos sucesso em nossas tentativas de obtenção de uma linhagem heterozigótica de nocaute simples (*DHH1*^{-/+}), muito embora obtivemos uma linhagem onde ocorreu a recombinação das regiões intergênicas do gene *TcDHH1* juntamente com o gene de resistência em dois locais do genoma, onde não se encontrava o gene *TcDHH1*, como um artefato à tentativa de retirar o gene em questão. Novos testes serão feitos com outros oligonucleotídeos iniciadores para comprovarmos tal hipótese (dados não mostrados). Uma vez que essa proteína parece ser essencial nesses parasitas e não em outros eucariotos, este seria mais um indício da divergência evolutiva da proteína *TcDHH1* e de grânulos de mRNA em tripanossomatídeos.

De qualquer forma, a caracterização funcional dos grânulos de *TcDHH1*, não responderá se em *T. cruzi* coexistem *P-bodies* e grânulos de estresse, com funções de degradação e estocagem, respectivamente. Porém, é factível supor que a partir dos dados de proteômica, juntamente com a caracterização dos tempos de meia vida dos mRNAs alvos de *TcDHH1*, será possível inferir o papel desta proteína e seus grânulos no metabolismo de RNAs em *T. cruzi*.

Assim, a próxima etapa do trabalho foi o estudo dos mRNAs alvos de complexos contendo *TcDHH1*. A partir de dados prévios de microarranjo com amostras imunoprecipitadas de *TcDHH1* (HOLETZ *et al.*, 2010), seis mRNAs alvos de *TcDHH1* foram selecionados para clonagem e subsequentes ensaios de FISH para colocalização com a proteína *TcDHH1* e para análise do tempo

de meia vida em epimastigotas: *amastin, putative (TcAMA)*; *cyclin, putative (TcCYC)*; *hypothetical protein, conserved (TcHYP)*; *RNA binding protein 5, putative (TcRBP5)*; *MASP, putative (TcMASP)* e *mucin TcMUCII, putative (TcMUC)*. Os resultados obtidos nesse trabalho reportam apenas três alvos que foram corretamente clonados: *TcAMA*, *TcCYC* e *TcMASP*. No mesmo experimento de microarranjo, foram selecionados como controles negativos de interação dois transcritos presentes no sobrenadante da imunoprecipitação: Glucose-regulated protein 78, putative (controle negativo 1, *TcCTL1*) e (H⁺)-ATPase G subunit, putative (controle negativo 2, *TcCTL2*); um deles foi utilizado para os ensaios de FISH: *TcCTL1*. Além desses controles, utilizamos três genes abundantes para análises de tempo de meia-vida, que não são regulados pela proteína *TcDHH1*: *TcL9*, *Tc α -tubulina* e *TcGAPDH*.

Através de ensaios de FISH, conseguimos demonstrar que as sondas α -sense dos três transcritos alvos de *TcDHH1* colocalizaram com a proteína (90% para *TcAMA* e *TcCYC* e 70% para *TcMASP*) enquanto que as sondas sense dos transcritos alvos e as sondas sense e α -sense do controle negativo *TcCTL1* não tiveram colocalização significativa, sugerindo a interação *in vivo* destes RNAs com grânulos de *TcDHH1*.

Além da colocalização por FISH, foi verificado em quais frações do gradiente de sacarose (com e sem dissociação de polissomos) o mRNA *TcMASP* estava presente (Figura 42). No gradiente de cicloheximida, duas hipóteses podem ser analisadas: Ou a extração de RNA total das frações NP e PL não foi eficiente ou então o mRNA de *TcL9* realmente não está presente em tais frações *in vivo*. Ou seja, com o tratamento com cicloheximida *TcL9* está presente nas frações PP (podendo estar presente em grânulos dependentes ou independentes de polissomos) e L (onde mRNAs que ainda não estão sendo traduzidos e/ou degradados aguardam para entrar em tais processos). Quando analisamos o gradiente de puomicina foi possível verificar a presença de *TcMASP* em frações de alta densidade independentes de polissomos, mais um indício de que este mRNA esteja complexado com a proteína *TcDHH1* em corpúsculos pesados, visto que ambos, mRNA e proteína colocalizam nos ensaios de FISH (Figura 51) e que a proteína está presente em frações de alta densidade independentes de polissomos (Figura 41).

Esses resultados, juntamente com os resultados de FISH, comprovam a interação de *TcDHH1* com transcritos alvos em grânulos especializados independentes de polissomos. A partir disso, o tempo de meia-vida desses três alvos foi analisado para tentarmos avaliar qual função de tais grânulos na estabilidade dos transcritos estudados.

Os resultados mostraram que o tempo de meia-vida do alvo *TcMASP*, de cerca de 21 minutos, se mostrou muito menor do que o tempo de meia-vida do normalizador *TcL9*, de 93 minutos. O alvo *TcAMA* se aproximou mais do comportamento do alvo *TcMASP*, com um tempo de meia-vida de 38 minutos, enquanto o alvo *TcCYC* se mostrou mais estável do que o gene *TcL9*, com cerca de 150 minutos. Tais resultados nos mostram que a proteína *TcDHH1* interage tanto com alvos de meia-vida longa, que poderíamos especular serem alvos estáveis, quanto com alvos de meia-vida curta, que poderiam ser alvos instáveis. Isso reforça a ideia vista com as análises de interação com proteína de que os grânulos de *TcDHH1* podem ter funções tanto de estabilização quanto de degradação de mRNAs alvos, e que provavelmente a proteína *TcDHH1* não seja responsável por definir um grânulo como sendo de degradação ou de estocagem, mas sim as interações com outros fatores.

Para corroborar os resultados (de tempo de meia vida) obtidos com os alvos selecionados, foi realizado um estudo global a partir de dados de decaimento por sequenciamento de RNA pela plataforma SOLiD (dados fornecidos pelo grupo do Dr. Probst) (Resultados, item 4.2.2.3). Existe uma diferença estatística entre a distribuição de todos os mRNAs de *T. cruzi* e a distribuição dos mRNAs alvos de *TcDHH1* (Figuras 64 e 65), onde é perceptível um enriquecimento de alvos instáveis que interagem com *TcDHH1*. Dessa forma, poderíamos sugerir que os grânulos de *TcDHH1* estão mais envolvidos com degradação e desestabilização de alvos do que com estocagem.

No entanto, ainda existe uma parcela significativa de alvos com decaimento médio e lento (cerca de 50%), que não nos permite afirmar que os grânulos de *TcDHH1* tenham apenas a função de degradação. KRAMER e colaboradores (2010) efetuaram ensaios de *knockdown* de *TbDHH1* (por RNA de interferência), que foram responsáveis pela estabilização do mRNA altamente instável GPI-PLC em formas procíclicas. Nesse mesmo estudo, eles

mostraram que a superexpressão da proteína DHH1 com o domínio ATPase deficiente em *T. brucei* causava mudanças em mRNAs regulados durante o ciclo de vida: estabilizava mRNAs “*downregulated*” de formas procíclicas ao mesmo tempo em que desestabilizava muitos mRNAs “*upregulated*”. A maior dúvida levantada em tal trabalho é se a desestabilização dos mRNAs estáveis está relacionada diretamente com a ação pontual e seletiva da proteína *TbDHH1* ou se essa seria uma consequência da interrupção da proliferação, causada pela superexpressão de tal forma mutante da proteína.

Mesmo assim, tendo em vista que o tempo de meia-vida do transcrito *TcCYC*, de 150 minutos (e de cerca de outros 15% dos alvos de *TcDHH1*) é discrepante da maioria dos alvos e que parte de mRNA do alvo *TcCYC* não colocaliza com a proteína *TcDHH1* (item 4.2.2.4, Figura 50), podemos supor que parte do mRNA está protegido contra a degradação, ou que tenha sido identificado erroneamente como alvo de *TcDHH1*. E, por outro lado, podemos supor que os alvos *TcMASP* e *TcAMA*, que possuem grande parte de seu mRNA colocalizando com a proteína *TcDHH1* (Figuras 49 e 51), tenham tempos de decaimento tão curtos devido a essa interação.

Além disso, e tendo em vista o trabalho feito em *T. brucei* (KRAMER, 2010), a avaliação do tempo de meia-vida deve ser feita em comparação com outros estágios do ciclo de vida do parasita para podermos confirmar se a interação com grânulos de *TcDHH1* estaria realmente alterando o tempo de meia-vida dos mRNAs alvo. Isso porque alvos que estão associados à *TcDHH1* em epimastigotas provavelmente estão sendo traduzidos em outros estágios do ciclo de vida (HOLETZ *et al.*, 2010). Em decorrência disso, é factível que um mesmo alvo tenha tempos de meia-vida distintos em diferentes momentos. Resultados preliminares (não mostrados por falta de evidência estatística) mostram que para o alvo *TcCYC* e para o controle negativo *TcL9* existe uma diminuição drástica no tempo de meia vida no estágio de tripomastigotas metacíclicos (cerca de 50% de diminuição para *TcL9* e 75% de diminuição para *TcCYC*). É interessante ressaltar que neste estágio, embora a proteína *TcDHH1* seja expressa, a presença de grânulos de *TcDHH1* não é verificada. Estes experimentos estão sendo repetidos, e se confirmados, teremos mais um indício de que em metacíclicos o mRNA de *TcCYC* é desestabilizado em decorrência da não associação com *TcDHH1*, ao contrário do que ocorre em

epimastigotas. Assim, saber se o tempo de meia-vida de outros alvos também é alterado em outras formas do parasita ajudará a nos certificarmos se os grânulos de *TcDHH1* funcionam na degradação e/ou estabilização de seus alvos.

Apesar da maioria dos alvos de *TcDHH1* terem tempos de meia-vida curtos e serem supostamente mRNAs instáveis, não podemos descartar o fato de que dados de expressão gênica de alguns deles (identificados por microarranjo mas não analisados por PCR em tempo real nem por ensaios de FISH) mostraram que existem alvos estáveis que tendem a ser mais expressos em epimastigotas do que alvos instáveis (Figuras 66 e 67 e Apêndice H), reforçando a ideia de que a proteína *TcDHH1* possa estar estabilizando transcritos que estão sendo (ou serão) traduzidos em epimastigotas e desestabilizando transcritos que serão traduzidos em outros estágios do ciclo de vida. Uma vez que é sabido que a transcrição em tripanossomatídeos é constitutiva, ou seja, não existe controle gene específico durante a transcrição, é evidente que muitos transcritos maduros, específicos de outros estágios do ciclo de vida, devam ser degradados após a transcrição. E é provável que essa degradação esteja sendo feita de maneira mRNP-dependente dentro de *regulons* de mRNAs que contém a proteína *TcDHH1*.

De qualquer forma, a interação de *TcDHH1* com alvos estáveis e com alvos instáveis, reportados neste trabalho, pode ser um indicativo de que exista uma ação tanto de estabilização quanto de desestabilização por parte da proteína *TcDHH1*, ou que tal proteína não seja o fator determinante para que um alvo seja degradado ou estabilizado. O que pode existir em alguns casos, como citamos anteriormente, é que a composição de cada tipo de grânulo no qual a *TcDHH1* está presente seja o determinante para que o grânulo funcione na estabilização/estocagem ou degradação, como um mecanismo de regulação combinatorial. Uma evidência disso é o fato de que a proteína *TcPOP2*, marcadora de grânulos de degradação (TEIXEIRA & PARKER, 2007), e a proteína *TcXRNA* colocalizam parcial e não totalmente com *TcDHH1* (Figuras 32 e 33).

Em células de mamíferos, tratamentos com actinomicina D (ActD) resultam em redução gradual de *P-bodies* (COUGOT *et al.*, 2004; ANDREI *et al.* 2005) mas não alteram o número de grânulos de estresse (MOLLET *et al.*,

2008). Uma vez que os grânulos de *TcDHH1* não são dissociados com o tratamento com actinomicina D (Figura 54), temos mais evidências de que tais grânulos apresentam características funcionais não canônicas, se comparados aos *P-bodies* e grânulos de estresse em outros eucariotos. Em *T. cruzi*, estes grânulos não se formam somente durante o estresse, pois estão presentes em parasitas em fase logarítmica de crescimento, e nem se dissociam quando o processo de transcrição é inibido. Certamente estes grânulos estão envolvidos no processamento de mRNAs e parecem ser estruturas mistas, podendo envolver tanto a estocagem quanto a degradação de transcritos em função de seu conteúdo protéico. Além disso, essa dinâmica entre *P-bodies* e grânulos de estresse ainda não é totalmente compreendida em outros eucariotos. BUCHAN e colaboradores (2008) reportam que a organização em grânulos de estresse de proteínas e mRNAs é promovida a partir de *P-bodies* pré-existentes, denotando a sobreposição de proteínas e funções desses tipos de grânulos.

Dessa maneira, o que gostaríamos de propor pelos dados aqui apresentados é a existência, em tripanossomatídeos, de grânulos que compartilham composição e comportamento dos grânulos especializados em outros eucariotos, nos quais a presença da proteína *TcDHH1* se faz necessária tanto para a estabilização quanto para a desestabilização de transcritos alvos específicos. São grânulos que, em princípio, não possuem função primária nem de degradação ou estocagem, mas sim de regulação; e que, devido à dinâmica de formação e consequente entrada de proteínas que ajudem a estabilizar ou degradar transcritos alvos, tornam-se grânulos especializados, que teriam seu comportamento modificado em decorrência do estágio no ciclo de vida do parasita e a mudanças ambientais. Logo, a partir das interações propostas na rede de tripanossomatídeos, podemos resumir algumas informações do que se sabe até hoje (Figura 39) sobre formação de mRNPs em tripanossomatídeos na Figura 68, incluindo a hipótese de que existam grânulos de estabilização e desestabilização que contém a proteína DHH1.

Nesse sentido, estudos mais profundos de tempo de meia-vida dos transcritos alvos e de interação entre *TcDHH1* em outros estágios do ciclo de vida poderão nos fornecer mais dados sobre os tipos de grânulos que a proteína *TcDHH1* compõe e se cada um deles possui funções distintas (a partir da colocalização por FISH com sondas para alvos instáveis e estáveis). Outra

perspectiva interessante e importante seria a colocalização de tais alvos com outras proteínas, específicas de degradação ou estabilização, por exemplo, a serem determinadas pelos experimentos de proteômica. Com a junção de todos esses dados, poderemos definir com maior clareza a dinâmica de formação de grânulos de RNA em tripanossomatídeos.

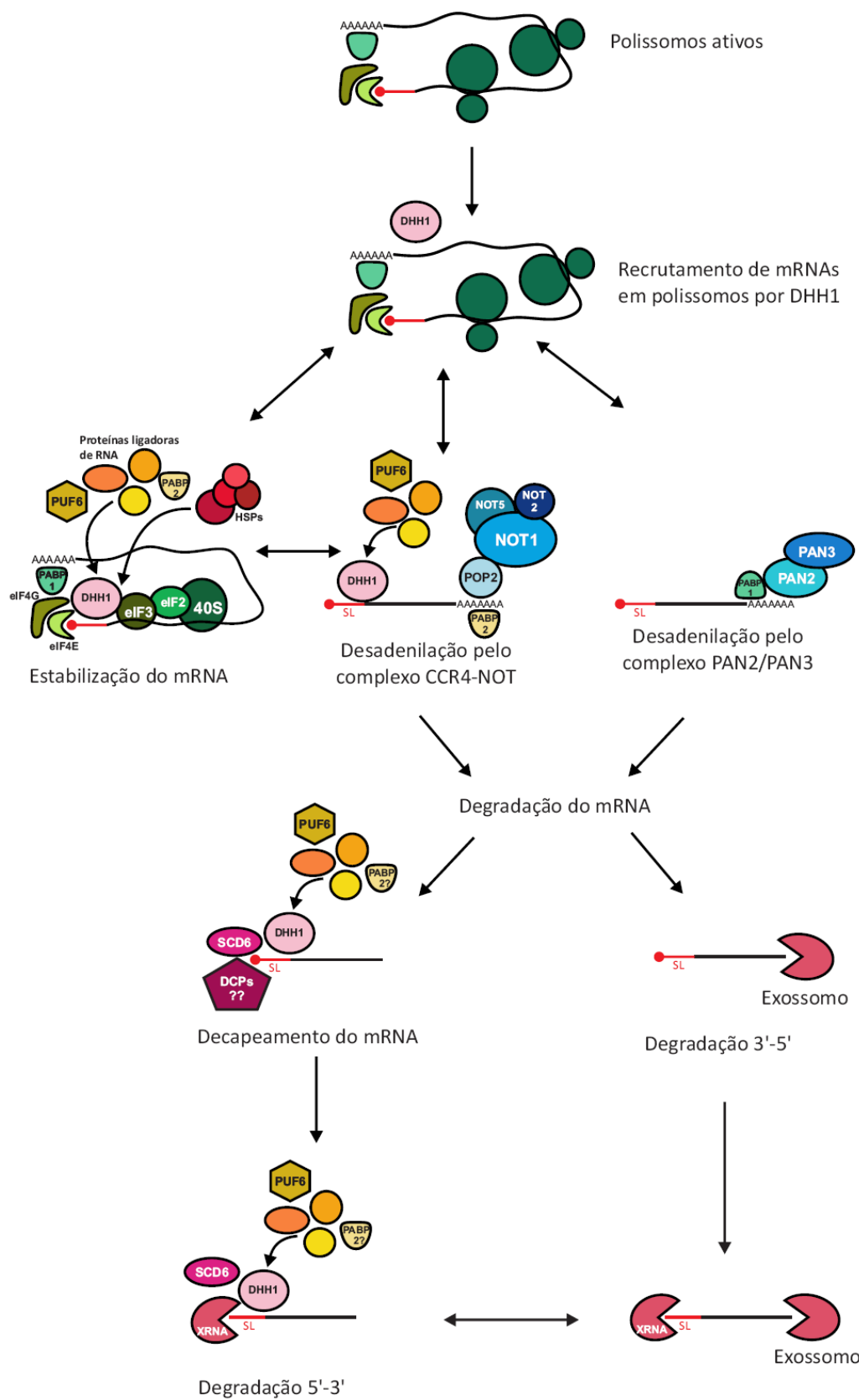


Figura 68. Desenho esquemático demonstrando o ciclo do mRNA proposto para tripanossomatídeos com os dados até hoje obtidos. Os mRNAs em processo de tradução são recrutados de polissomos ativos pela interação

transiente com a proteína DHH1. Esses mRNPs podem ser estocados para futuramente retornarem a polissomos ativos ou podem perder seus fatores de iniciação de tradução e começarem a ser degradados pelas desadenilases POP2, presente no complexo CCR4-NOT ou pelo complexo PAN (PAN2/PAN3). A partir daí, ele pode seguir para degradação 3'-5' por meio do exossomo ou, por algum mecanismo ainda desconhecido, pode perder o cap-5' e ser degradado pela exonuclease 5'-3' XRNA. Proteínas de ligação a RNA podem ajudar a recrutar mRNAs especificamente para tais grânulos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A proteína *TcXRNA* foi identificada neste parasita, é regulada durante o ciclo de vida de *T. cruzi* e está presente em *foci* citoplasmáticos.
- ✓ A proteína *TcPOP2* foi localizada em grânulos por todo o parasita (inclusive no núcleo) através de fusão com etiquetas de proteína A e GFP.
- ✓ *TcPOP2* e *TcXRNA* colocalizam parcialmente com *TcDHH1* em grânulos citoplasmáticos.
- ✓ Ensaios de coimunoprecipitação evidenciaram a presença de *TcPOP2/TcDHH1* e *TcALBA3/TcDHH1* em imunocomplexos.
- ✓ O alvo *TcMASP* está presente em frações de alta densidade independentes de polissomos.
- ✓ Os transcritos alvos *TcMASP* e *TcAMA* possuem tempos de meia-vida curtos, enquanto que o alvo *TcCYC* é estável em epimastigotas; tais alvos colocalizam com a proteína *TcDHH1* no estágio de epimastigotas, nos quais as análises de tempo de meia-vida foram feitas.
- ✓ Em uma análise de decaimento global de epimastigotas, existe um enriquecimento de mRNAs que interagem com *TcDHH1* que possuem tempo de meia-vida curto (~50% do total de alvos). Tais transcritos são geralmente expressos em outros estágios do ciclo de vida.
- ✓ No entanto, cerca de 15% de transcritos possuem tempos de meia-vida longos. Destes, grande parte são mais expressos em epimastigotas do que em outros estágios do ciclo de vida.
- ✓ Por meio dos dados tanto de interações protéicas quanto de análise de mRNAs alvos, percebemos que grânulos de *TcDHH1* parecem ser estruturas mistas, que envolvem tanto estabilização/estocagem quanto degradação de transcritos, que possuem conteúdo protéico mais semelhante a grânulos de estresse do que a *P-bodies*, mas que não se formam somente durante o estresse e nem se dissociam na ausência de RNAs. Dessa forma, apresentam características não canônicas de grânulos de RNA de outros eucariotos.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui obtidos abrem várias perspectivas para o estudo de grânulos citoplasmáticos em *T. cruzi*, uma vez que gera perguntas como: será que existem estruturas como *P-bodies* e grânulos de estresse em *T. cruzi* como em outros eucariotos? Ou será que os grânulos presentes em *T. cruzi* são distintos, uma vez que esses parasitas divergiram muito cedo de outros eucariotos durante o curso da evolução.

Dessa maneira, algumas perspectivas parecem interessantes na busca de tais respostas, tais como:

- ✓ Análise dos tempos de meia-vida dos alvos de *TcDHH1* em outros estágios do ciclo de vida do parasita, juntamente com ensaios de colocalização evidenciando interação (ou não interação) entre a proteína e seus alvos.
- ✓ Análises de proteômica (espectrometria de massas) com amostras imunoprecipitadas de epimastigotas, epimastigotas submetidos a estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicos, para determinar a composição protéica dos grânulos de *TcDHH1* em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita.
- ✓ Seleção de proteínas a partir de proteômica para clonagem, expressão e análise funcional.
- ✓ Ensaios de imunoprecipitação com os antissoros purificados de α -*TcXRNA* e α -*TcPOP2*, para checar se a composição dos grânulos dessas proteínas é a mesma ou similar aos grânulos de *TcDHH1*.
- ✓ Colocalização de alvos estáveis e instáveis com as proteínas já identificadas nesse trabalho (*TcXRNA* e *TcPOP2*) e de outras proteínas que serão identificadas pela proteômica, para averiguar se existem grânulos com funções e composições distintas.
- ✓ Ensaios que utilizem os mRNAs alvos (estáveis e instáveis) como iscas para purificação de complexos e avaliação da composição protéica dos mesmos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.R., ÁVILA, A.R., CORREA, A., HOLETZ, F.B., MANSUR, F.C.B., MANQUE, P.A., MENEZES, J.P.B, BUCK, G.A., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. (2010). Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene** 452, 72-78.
- ANDERSON, J.S. & PARKER, R.P. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. **EMBO J**, 17, 1497–1506.
- ANDREI, M.A., INGELFINGER, D., HEINTZMANN, R., ACHSEL, T., RIVERA-POMAR, R. (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. **RNA**, 11, 717–727.
- ARAVIND, L., IYER, L.M., ANANTHARAMAN, V. (2003) The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biol**, 4, R64.
- ARCHER, S.K., LUU, V.D., DE QUEIROZ, R.A., BREMS, S., CLAYTON, C. (2009) *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. **PLoS Pathog**, 5 (8), e1000565.
- BAGALOPAL, V., PARKER, R. (2009) Polysomes, P bodies and Stress granules: States and Fates of Eukaryotic mRNAs. **Curr Opin Cell Biol**, 21 (3), 403–408.
- BARREAU, C., PAILLARD, L., OSBORNE, H. (2006) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? **Nucl Acids Res**, 33, 7138–50.

- BARTHOLOMEU, D.C., CERQUEIRA, G.C., LEO, A.C.A., DA ROCHA, W.D., PAIS, F.S., MACEDO, C., DJIKENG, A., TEIXEIRA, S.M.R., EL-SAYED, N.M. (2009) Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (MASP) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucl Acids Res**, 37 (10), 3407–3417.
- BATISTA, M., MARCHINI, F.K., CELEDON, P.A.F., FRAGOSO, S.P., PROBST, C.M., PRETI, H., OZAKI, L.S., BUCK, G.A., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A. (2010). A high-throughput cloning system for reverse genetics in trypanosomatids. **BMC Microbiology** 10:259.
- BELL, S.D., BOTTING, C.H., WARDLEWORTH, B.N., JACKSON, S.P., WHITE, M.F. (2002) The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. **Science**, 296, 148–151.
- BOAG, P.R., NAKAMURA, A., BLACKWELL, T.K. (2005) Conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. **Development**, 132, 4975–4986.
- BOHRMANN, B., KELLENBERGER, E., ARNOLD-SCHULZ-GAHMEN, B., SREENIVAS, K., SURYANARAYANA, T., STROUP, D., REEVE, J.N. (1994) Localization of histone-like proteins in thermophilic archaea by immunogold electron microscopy. **JStru Biol**, 112, 70–78.
- BONALDO, M.C., SOUTO-PADRON, T., DESOUZA, W., & GONDELBERG, S. (1988) Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **JCell Biol**, 106, 1349-1358.
- BOUVERET, E., RIGAUT, G., SHEVCHENKO, A., WILM, M., SÉRAPHIN, B. A (2000) Smlike protein complex that participates in mRNA degradation. **EMBO J**, 19, 1661–71.
- BRECHT, M. & PARSONS, M. (1998) Changes in polysomes profiles accompany trypanosome development. **Mol Biochem Parasitol**, 97, 189-198.

- BRENGUES, M. & PARKER, R. (2007) Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, 18, 2592 - 2602.
- BRENGUES, M., PARKER, R. (2007) Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, 18, 2592–2602.
- BRENGUES, M., TEIXEIRA, D., & PARKER, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. **Science**, 310, 486 - 489.
- BUCHAN, J.R., MUHLRAD, D., PARKER, R. (2008) P-bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **JCell Biol**, 183, 441–455.
- CAMARGO, E.P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop**, 6, 93 - 100.
- CANO, M.I., GRUBER, A., VAZQUEZ, M., CORTÉS, A., LEVIN, M.J., GONZALEZ, A., DEGRAVE, W., RONDINELLI, E., RAMIREZ, J.L., ALONSO, C., REQUENA, J.M., FRANCO DA SILVEIRA, J. (1995) Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol Biochem Parasitol**, 71, 273-278.
- CARUTHERS, J.M. & MCKAY, D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 123–133.
- CASSOLA, A., De GAUDENZI, J. G. and FRASCH, A. C. (2007), Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol Microbiol**, 65, 655–670.
- CASSOLA, A., DE GAUDENZI, J.G., FRASCH, A.C. (2007) Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Mol Microbiol** 65, 655–670.
- CHAGAS, C. (1909) Nova Tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1 (2), 159–218.

- CHENG, Z., COLLER, J., PARKER, R., SONG, H. (2005). Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. *RNA* 11, 1258-1270.
- CLARK, L.B., Viswanathan, P., QUIGLEY, G., CHIANG, Y-C., MCMAHON, J.S., YAO, G., CHEN, J., NELSBACH, A., DENIS, c. (2004) Systematic Mutagenesis of the Leucine-rich Repeat (LRR) Domain of CCR4 Reveals Specific Sites for Binding to CAF1 and a Separate Critical Role for the LRR in CCR4 Deadenylase Activity. **JBiol Chem**, 279, 13616-13623.
- CLARK, L.B., VISWANATHAN, P., QUIGLEY, G., CHIANG, Y. C., MCMAHON, J.S., YAO, G., CHEN, J., NELSBACH, A., DENIS, C.L. (2004) Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity. **JBiol Chem**, 279, 13616–13623.
- CLARK, L.B., VISWANATHAN, P., QUIGLEY, G., CHIANG, Y.C., MCMAHON, J.S., YAO, G., CHEN, J., NELSBACH, A., DENIS, C.L. (2004) Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity. **JBiol Chem**, 279, 13616–13623.
- CLAYTON, C., SHAPIRA, M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, 156, 93-101.
- CLAYTON, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, 21, 1881 - 1888.
- CLAYTON, J., (2010) Chagas disease 101. **Nature** 465, S4—S5.
- COLASANTE, C., ROBLES, A., LI, C., SCWHEDE, A., BENZ, C., VONCKEN, F., GUILBRIDE, D.L., CLAYTON, C.; Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. (2007) **Mol Biochem Parasitol**, 151 (2), pp. 193-204.

- COLLART M.A., TIMMERS H.T.; (2004) The eukaryotic Ccr4–Not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 77: 289–322.
- COLLER, J., PARKER, R. (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. **Cell**, 122, 875–886.
- COLLER, J.M., TUCKER, M., SHETH U., VALENCIA-SANCHEZ, M.A., PARKER, R. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. **RNA** 7: 1717-1727.
- CONTRERAS, V.T., SALLES, J.M., THOMAS, N., MOREL, C.M., & GOLDENBERG, S. (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, 16, 315 - 327.
- COUGHLIN, B.C., TEIXEIRA, S.M.R., KIRCHHOFF, L.V., DONELSON, J.E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'untranslated region position-dependent *cis*-element and an untranslated region-binding protein. **JBiol Chem**, 275, 12051-12060.
- COUGOT, N., BABAJKO, S., & SÉRAPHIN, B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. **JCell Biol**, 165, 31 - 40.
- COUGOT, N., BABAJKO, S., SÉRAPHIN, B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. **JCell Biol**, 165, 31–40.
- DALLAGIOVANNA, B., CORREA, A., PROBST, C.M., HOLETZ, F.B., SMIRCICH, P., DE AGUIAR, A.M., MANSUR, F., DA SILVA, C.V., MORTARA, R.A., GARAT, B., BUCK, G.A., GOLDENBERG, S., & KRIEGER, M.A. (2008) Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. **JBiol Chem**, 283, 8266 - 8273.
- DALLAGIOVANNA, B., PEREZ, L., SOTELO-SILVEIRA, J., DUHAGON, M., GARAT, B. (2005). *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a pumilio protein. **Exp Parasitol**, 109, 260-264.

- DE SOUZA, W. (1984) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Cyt**, 86, 197-283.
- DE SOUZA, W. (2000). O parasita e sua interação com os hospedeiros. In ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*** (Eds Z. Brener, Z.A. Andrade e M. Barral-Neto) p. 88-126. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- DI NOIA, J.M., D'ORSO I., ASLUNDI, L., SANCHEZ, D.O., FRASCH, A.C.C. (1998) The *Trypanosoma cruzi* Mucin Family Is Transcribed from Hundreds of Genes Having Hypervariable Regions. **JBiol Chem**, Vol. 273, No. 18, Issue of May 1, pp. 10843–10850, 1998.
- DRUMMOND, S.P, HILDYARD, J., FIRSZUK, H., REAMTONG, O., LI, N., KANNAMBATH, S., CLAYDON, A.J., BEYNON, R.J., EYERS, C.E., MCCARTHY, J.E.G. (2011) Diauxic shift-dependent relocalization of decapping activators Dhh1 and Pat1 to polysomal complexes. **Nucl Acids Res**, 39 (17), 7764-7774.
- DUPRESSOIR, A., MOREL, A.-P., BARBOT, W., LOIREAU, M.-P., CORBO, L., HEIDMANN, T. (2001) Identification of four families of yCCR4 and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. **BMC Genomics**, 2, 9.
- EULALIO, A., BEHM-ANSMANT, I., & IZAURRALDE, E. (2007) P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. **Mol Cell Biol**, 8, 9 - 22.
- GERBER, A.P., HERSCHLAG, D., BROWN, P.O. (2004) Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. **PLoS Biol**, 2 (3), e79.
- GUO, R., XUE, H., HUANG, L. (2003) Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo. **Mol Microbiol**, 50 (5), 1605–1615.

- HAILE, S. & PAPADOPOULOU, B. (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, 10, 569-577.
- HATA, H., MITSUI, H., LIU, H., BAI, Y. DENIS, C., SHIMIZU, Y., SAKAI, A. (1998) Dhh1p, a Putative RNA Helicase, Associates with the General Transcription Factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 148 (2), 571-579.
- HE, F., LI, X., SPATRICK, P., CASILLO, R., DONG, S., JACOBSON, A. (2003) Genome wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. **Mol Cell**, 12, 1439–1452.
- HOARE, C.A. (1972) The Trypanosomes of Mammals — a Zoological Monograph. **Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications**, p. 749
- HOLETZ, F.B. (2008) Grânulos de Processamento de mRNAs em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado – **Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz**, Rio de Janeiro.
- HOLETZ, F.B., CORREA, A., AVILA, A.R., NAKAMURA, C.V., KRIEGER, M.A., & GOLDENBERG, S. (2007) Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, 356, 1062 – 1067.
- HOLETZ, F.B., CORREA, A., PROBST, C.M., DALLAGIOVANNA, B., ALVES, L.R., MARCHINI, F.K., MANQUE, P., BUCK, G., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. (2010) Protein and mRNA Content of TcDHH1 Containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Journal**, 277: 3415–3426.
- HOYLE, N.P., CASTELLI, L.M., CAMPBELL, S.G., HOLMES, L.E., ASHE, M.P. (2007) Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. **JCell Biol**, 179, 65–74.

- HSU, C.L. & STEVENS, A. (1993) Yeast cells lacking 59 / 39 exonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 59 cap structure. **Mol Cell Biol**, 13, 4826–4835.
- IVENS, A.C., PEACOCK, C.S., WORTHEY, E.A., MURPHY, L., AGGARWAL, G., BERRIMAN, M., SISK, E., RAJANDREAM, M.A., ADLEM, E., AERT, R., ANUPAMA, A., APOSTOLOU, Z., ATTIPOE, P., BASON, N., BAUSER, C., BECK, A., BEVERLEY, S.M., BIANCHETTIN, G., BORZYM, K., BOTHE, G., BRUSCHI, C.V., COLLINS, M., CADAG, E., CIARLONI, L., CLAYTON, C., COULSON, R.M., CRONIN, A., CRUZ, A.K., DAVIES, R.M., DE GAUDENZI, J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, 309, 436-442.
- JARUZELSKA, J., KOTECKI, M., KUSZ, K., SPIK, A., FIRPO, M., REJO PERA, R.A. (2003) Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. **Dev Genes Evol**, 213, 120–126.
- JOHNSON, A.W. & KOLODNER, R.D. (1995) Synthetic lethality of *sep1* (*xrn1*) *ski2* and *sep1* (*xrn1*) *ski3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control. **Mol Cell Biol**, 15, 2719–2727.
- KEENE, J. D. & LAGER, P. J. Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression (2005). **Chromosome Res**, 13, 327–337.
- KEENE, J. D. & TENENBAUM, S. A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. **Mol Cell**, 9, 1161–1167.
- KEENE, J.D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat Rev Genet**, 8, 533-543.
- KRAMER, S., QUEIROZ, R., ELLIS, L., WEBB, H., HOHEISEL, J.D., CLAYTON, C. (2008) Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(α) phosphorylation at Thr169. **JCell Sci**, 121, 3002–3014.

- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680 - 685.
- LARIMER, F.W. & STEVENS, A. (1990) Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'→ 3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. **Gene**, 95, 85–90
- LEBOWITZ, J.H., SMITH, H.Q., RUSCHE, L., & BEVERLEY, S.M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Gene Dev**, 7, 996 - 1007.
- LIU, Q., LIANG, X-H., ULIEL, S., BELAHCEN, M., UNGER, R., MICHAELI, S. (2004) Identification and Functional Characterization of Lsm Proteins in *Trypanosoma brucei*. **JBiol Chem**, 279, 18210-18219.
- MAEDA, I., KOHARA, Y., YAMAMOTO, M., SUGIMOTO, A. (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. **Curr Biol**, 11 (3), 171-176.
- MAQUAT, L.E. & KILEDJIAN, M. (2008) RNA turnover in eukaryotes: analysis of specialized and quality control RNA decay pathways - Preface. **Methods Enzymol**, 449, xvii-xviii.
- MARSH, V.L., PEAK-CHEW, S.Y., BELL, S.D. (2005) Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, Alba. **J Biol Chem**, 280, 21122–21128.
- MEDINA, E.A.C., CROSS, G. (1993). Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol** 59:327-530.
- MINSHALL, N., STANDART, N. (2004) The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. **Nucleic Acids Res**, 32, 1325–1334.
- MOLIN, L. & PUISIEUX, A. (2005) *C. elegans* homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4-NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. **Gene**, 358, 73-81.

- MOLLET, S., COUGOT, N., WILCZYNSKA, A., DAUTRY, F., KRESS, M., BERTRAND, E. AND WEIL, D. (2008). Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. **Mol Biol Cell**, 19, 4469-4479.
- MÖRKING, P.A., DALLAGIOVANNA, B.M., FOTI, L., GARAT, B., PICCHI, G.F., UMAKI, A.C., PROBST, C.M., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S., FRAGOSO, S.P. (2004) TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, 319, 169-177.
- MORRIS, J.C.; DREW, M.E.; KLINGBEIL, M.M.; MOTYKA, S.A.; SAXOWSKY, T.T.; WANG, Z.; ENGLUND, P.T. (2001) Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **Intl J Parasitol**, 31(5): 453-458.
- NAKAMURA, A., AMIKURA, R., HANYU, K., KOBAYASHI, S. (2001) Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complexes during *Drosophila* oogenesis. **Development**, 128, 3233–3242.
- OHN, T., CHIANG, Y.C., LEE, D.J., YAO, G., ZHANG, C., DENIS, C.L. (2007) CAF1 plays an important role in mRNA deadenylation separate from its contact to CCR4. **Nucleic Acids Res**, 35(9), 3002-3015.
- OLSZEWSKA, M., BUJARSKI, J.J., KURPISZ, M. (2007) P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: Mini-review. **Mol Biol Cell**, 18 (6), 2274-2287.
- PARKER, R. & SHETH, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol Cell**, 25, 635 - 646.
- PATRICK, K.L., SHI, H., KOLEV, N. G., ERSFELD, K., TSCHUDI, C., ULLU, E.; (2009) Distinct overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *T. brucei*. **PNAS** vol. 106 no. 42 17933-17938.

- PAVONI, D.P. (2005) Caracterização Genômica Funcional das Formas Infectivas do *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado - **Instituto Oswaldo Cruz** - Fiocruz, Rio de Janeiro.
- PETFALSKI, E., DANDEKAR, T., HENRY, Y., TOLLERVEY, D. (1998) Processing of precursors to small nucleolar RNAs and ribosomal RNAs requires common components. **Mol Cell Biol**, 18, 1181–1189.
- PRETI, H. (2007) Caracterização funcional de genes codificadores de proteínas hipotéticas diferencialmente expressos durante a metaciclogênese de *Trypanosoma cruzi*. **UFPR**, Dissertação de Mestrado – UFPR/ICC, Curitiba.
- QUEIROZ, R., BENZ, C., FELLEBERG, K., HOHEISEL, J.D., CLAYTON, C. (2009) Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC Genomics**, 10, 495.
- SANDMAN, K., LOUVEL, H., SAMSON, R.Y., PEREIRA, S.L., REEVE, J.N. (2008) Archaeal chromatin proteins histone HMtB and Alba have lost DNA-binding ability in laboratory strains of *Methanothermobacter thermautotrophicus*. **EXTREMOPHILES**, 12 (6), 811-817.
- SHETH, U. & PARKER, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. **Science**, 300, 805 - 808.
- SONODA, J. & WHARTON, R.P. (1999). Recruitment of nanos to hunchback mRNA by pumilio. **Genes Dev**, 13 (20), 2704-2712.
- SOURET, F.F., KASTENMAYER, J.P., GREEN, P.J. (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. **Mol Cell** 15: 173–183.
- STOECKLIN, G., MAYO, T., ANDERSON, P. (2006) ARE-mRNA degradation requires the 5'–3' decay pathway. **EMBO**, 7, 72–7.

- SUBOTA, I., ROTUREAU, B., BLISNICK, T., NGWABYT, S., DURAND-DUBIEF, M., ENGSTLER, M., BASTIN, P. (2011) ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. **Mol Biol Cell**, 22, 4205-4219.
- SWISHER, K.D. & PARKER, R. (2010) Localization to, and Effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on Stress Granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, 5 (4), e10006.
- SZANKASI, P. & SMITH, G.R. (1996) Requirement of *S. pombe* exonuclease II, a homologue of *S. cerevisiae* Sep1, for normal mitotic growth and viability. **Curr Genet**, 30, 284–293.
- TANNER, N.K & LINDER, P. (2001). DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. **Mol. Cell** 8, 251–262.
- TEIXEIRA, D. & PARKER, R. (2007) Analysis of P-Body Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 18 (6), 2274-2287.
- TEMME, C., ZAEßINGER, S., MEYER, S., SIMONELIG, M., WAHLE, E. (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. **EMBO J**, 23 (14), 2862-2871.
- THOMAS, M.G., LOSCHI, M., DESBATS, M.A., BOCCACCIO, G.L. (2011) RNA granules: The good, the bad and the ugly – Review. **Cell Sign**, 23, 324–334
- TKACZ, I.D., COHEN, S., SALMON-DIVON, M., MICHAELI, S. (2008) Identification of the heptameric Lsm complex that binds U6 snRNA in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, 160, 22-31.
- WHARTON, R.P., AGGARWAL, A.K. (2006) mRNA regulation by Puf domain proteins. **Sci STKE**, pe37.
- WHO (2006) The World Health Report;

- WICKENS, M., BERNSTEIN, D. S., KIMBLE, J. AND PARKER, R. (2002).
A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. **Trends Genet**, 18, 150-157.
- YANG, W-H., YU, J-H., GULICK, T., BLOCH, K.D., BLOCH, D.B. (2006)
RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing
bodies and stress granules. **RNA**, 12, 547-554.
- ZEINER, G.M., STURM N. R., CAMPBELL D. A. (2003). Exportin 1
mediates nuclear export of the kinetoplastid spliced leader RNA.
Eukaryot Cell 2, 222–230.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Alinhamento entre as sequências das proteínas XRNA1 e XRNA2 em *T. cruzi* e XRNA em *T. brucei*.

> TcXRNA1
Tamanho=266 aa

Score = 496 bits (1276), Expect = 1e-144, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 226/266 (85%), Positives = 251/266 (94%), Gaps = 0/266 (0%)

TbXRNA 1	MGVPKFFRWVAERYPSVITPFRDFPPPVDNLYLDMNGIIHNCTHPNDADATHKAPTEKAM	60
	MGVPKFFRWVAER P+VITPFRD PPPVDNLYLDMNGIIHNCTH ND DAT K+PTEKAM	
TcXRNA 1	MGVPKFFRWVAERCPTVITPFRDSPPPVDNLYLDMNGIIHNCTHTNDVDATQKSPTEKAM	60
TbXRNA 61	VEAMFSYLEKLFNAIQPRKCFFLAVDGVAPRAKMNQQRRYRSGYEMMVAREEALSRGE	120
	+EAMF+YLEKLFN IQPRK FFLAVDGVAPRAKMNQQRRYRSGYE+MVAR+EA+++GE	
TcXRNA 61	MEAMFAYLEKLFNVIQPRKYFFLAVDGVAPRAKMNQQRRYRSGYELMVARQEAI AQGE	120
TbXRNA 121	ELPEEADVFDNSCITPGTDFMVRRISEHFQYFIMMKMSTDPAWQNC SVIYSGHDHPGEGEH	180
	E+P+E DVFDNSCITPGT+FMVR+SE FQYFI MK++TDPAWQNC V+YSGHD+PGEGEH	
TcXRNA 121	EVPDEKDVFDNSCITPGTNFMVRVSEQFYFITMKIATDPAWQNCQVVYSGHDNPGEGEH	180
TbXRNA 181	KIVEFIRRRKMQPDYGNETHCMYGLDADLVMLALATHEPHFVLLREVVTFGFGQESRRA	240
	KIV+FIRRRKMQP Y PNETHCMYGLDADLVML+LATHEPHF+LLREVVTFG GQESRRA	
TcXRNA 181	KIVDFIRRRKMQPGYSPNETHCMYGLDADLVMLSLATHEPHFLLLREVVTFGPGQESRRA	240
TbXRNA 241	REQREQDES DGIVADKSYQKPDEFVL	266
	REQRE+DE++GI+ADKSY+K DEFVL	
TcXRNA 241	REQREDEANGIIADKSYRKADDEFVL	266

> TcXRNA2
Length=845

Score = 790 bits (2041), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 420/851 (49%), Positives = 557/851 (65%), Gaps = 50/851 (6%)

TbXRNA 597	GPLRRTTVRRDAFDFPPLTKFIPRLCTGVCTGEQQFEGFTTLRSKWRYITPQRESGVVTI	656
	GPLR VRR F+PPP+ F+PRLC GV GE+Q EGF TLR S W I +RE+GVVTI	
TcXRNA 1	GPLNRVRRRQVFEPPIKTFVPRLC PGVAIGEKQLEGFATLR SNWDCIDLRRETGVVTI	60
TbXRNA 657	FGMPARGESLLLGLKDSFNIAIAAEVATLVGQEVLVGFPHYRRARVAVSDKRVHISANI	716
	FGMP R ES++L L++S N ++A E +LVGQEVLVGFPHYRRARV ++SDKR+ + A +	
TcXRNA 61	FGMPTRKESIILALRNSINYSATEAVSLVGQEVLVGFPHYRRARVTSISDKRISVRVAM	120
TbXRNA 717	NLEGVSCGANVRELNRDASMNIAKELETHRQCMREKLGMSVSNLTVLVYNLFTGMRMTR	776
	+G CG +ELNRD S+N KE +TH Q M+EKL G++V + +LVVYNLF+ MR+TR	
TcXRNA 121	TQDGAFCGTETKELNRDESLNFTKECDTHIQYMKEKLGIAVDGIQLLVYNLFTMRLTR	180
TbXRNA 777	KGRVVRNFSKDQTCYALPLVARLQDVKLTEDSRVVERDRVEWDNRFGSRVILVGAEPKSM	836
	KGR+VR+FSKD+ CYA+ LVARLQDV++ ED RYVERDRVE + G++V+ +G EPK+	
TcXRNA 181	KGRIVRSFSKDEV CYAMQLVARLQDVEMIEDLRYVERDRVEGEMSLGNKVVF IGPEPKNK	240
TbXRNA 837	KGKDQQLYGSSGVVVRSSPD AEGTFTVAARVFQKPVSI PHVLLDYASSRNWVSM PDVSNE	896
	K + Q+YGS+G+V S+ + VA R++Q+P+ IP LL +A+ RNW+++ +V+ E	
TcXRNA 241	KSQ-MQVYGSAGLVFESASSNSDIYAVAVRLYQEPLVIPSSLLSFAAPRNWMA LHEVATE	299
TbXRNA 897	VRVGPLALKHLVGSVRTSPQYGC REIGLGLIYTRNNLV RIGYAKQTVRGGKAWGAPGGRL	956
	+ VG LAL+ LVGS+RT+PQYG RE+GLGLIY RN+L RIGYAK R AW	
TcXRNA 300	LSVGS LALRLLVGSLRTTPQYGSRELGLIYARNHLARIGYAKLVPRQTNAWTP-----	354
TbXRNA 957	GAGLVNSDDAFGRPVQDAAPAGHYLES LQKGESRPRSSRPMQYMTWFSRKAVVLIKTYVE	1016
	++D F R Q+A PA HYL+S +G+ SSR QY TWFSR+AV LI+ YVE	

TcXRNA 355 -----YNEDVFARLAQNAEPAAHYLDSAGRGDFLGCSSTPQYTTWFSREAVAILIRRYVE 409

TbXRNA 1017 RFKPLVDRLESIASSPQALDPPQFMTGEWADNDVDDVLRSEEFIESCGIQSVPLVAAQD 1076

F+PLV RLES ++PQAL+PPQFMTG+W + +VDDVL +E FI++ GI+ V L+AA D

TcXRNA 410 EFQPLVKRLESGTAAPQALEPPQFMTGKWQEMEVDVLTMEAFIDASGIRDVALIAASD 469

TbXRNA 1077 DAFPREHVRMLEEELDRQGPRPLEDRILSSVARRCLYFPVTRCAGGHISQLPLPQEQTVH 1136

DAF R+H+R LE+ELDRQ PRP ++ IL+ V +R LYFP+T +GGHI+QLPLPQ+Q

TcXRNA 470 DAFTRDHLRELEDELDRQQPRPTKELIILNPVVKRHLYFPLTHSSGGHITQLPLPQDQIFR 529

TbXRNA 1137 LGSRVVNCRCGAAPFGATGTVVRLSTGHDAEVVYDDPFVGGSYFDGRLRQPRGSISKL 1196

LG+RVVNCRA G+ PFGA GT+VRLT+T HDAEVVYD+PF GGS+FDGRLRQPRG +SKL

TcXRNA 530 LGARVVNCRAVGSVPFGAVGTIVRLLATSHDAEVVYDEPFTGGSHFDGRLRQPRGGLSKL 589

TbXRNA 1197 STLLVLNKPSEGDESESPQGNGSVVQNLKSICKKLQQKEVDHDQQRQHGRGMGIPSTEGT 1256

S+LLVLN+P D+ G + SI + L QK QQ+Q RG +P E

TcXRNA 590 SSSLVLNRPGLDDG---GGAATESERTTVSILRALMQKSQQQQQQQQKRG-SVPMAESV 645

TbXRNA 1257 PSIPKPRSAMGETSASGIAAGRNVSPPSLTVSGSGGIQVAELMGKLASSKATSPDAGL 1316

IPKPRSA + S S G V + +++T+SGG+GGI++++L+GKL +S S A +

TcXRNA 646 SVIPKPRSATEDASVSKTVTGM-VPASAAVTISGGAGGIRLSDLVGKLKASPEHSDAASI 704

TbXRNA 1317 N-----ICGATSAATVASNKLPVAPRSVTTTAAPGSGTFSVP 1353

I TS+ SN ++ P

TcXRNA 705 TPPTVPPEEQKDARPSPVSLKPQVAITTTNTSSVAAGSNDKKGNNGNLGVNNTPPQVETRTL 764

TbXRNA 1354 LPRTSGNANRT-----NSGDGEGDKGCRKPGFSFTVPSEVLNGEFQIRPGEAL 1402

+P SG N + G E + ++ +FTVP E+ +GEF IR GE

TcXRNA 765 IPVQSGIENNAVVENRLQMHLSRSGGSPEENNSGKRLKMTFTVPREIASGEFTIRRGEAVP 824

TbXRNA 1403 LLKRMISQHL 1413

+R++ LS

TcXRNA 825 FFRRLLKLRL 835

Ccr4p	172	GQPNIYARQNAMKKYLATQQAAQQAAQQAAQQAVPGPFGGPQAAPPALQPTDFQ	228
		G+P Y R KK ++ +Q++ + P P+ P + ++ +	
TcCCR4	216	GRPR-YERDEPPKKKCDVHVFKETDVSSORRGGEHASWVTSPPETDGPLOKRSEME	271

Pop2p vs TcPOP2

>POP2 Tc00.104705311827.60
Length=434

Score = 176 bits (447), Expect = 9e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 89/273 (33%), Positives = 148/273 (54%), Gaps = 19/273 (7%)

TcPOP2	118	IRDVWEENLEEEFNIRSLIKDYPYVSMDETFPGVVAKPVGNFKATHEFYQTLRCNVNL	177
		+RDVW+ NL EF +IR L+ Y +VS+ TEF G +A+P+G F++ +++YQT+R NV+	
Pop2p	160	VRDVWKSPLYSEFAVIRQLVSQYNHVSISTEFVGTLARPIGTFRSKVDYHYQTMRAVDF	219
TcPOP2	178	LKMIQLGITLLNEKGEVPEN-CCTWQFNFRFCLTEDVYAQDSIQLLRHGGIDFDYFAQYG	236
		L IQLG++L + G P+N TWQFNF F +++ + +S++LLR GI+F+ G	
Pop2p	220	LNPIQLGLSLSDANGNKPDPNGPSTWQFNFEFDPKKEIMSTESLELLRKSGINFEEKHENLG	279
TcPOP2	237	VEVTHFAELLISSGLVLNSDIRWLAFAHAGYDFGYLMKVVCCKDLPEKEDDFLQIFHSLFP	296
		++V F++LL+ SGL+++ + W+ +HA YD G+L+ ++ +P ++DF H P	
Pop2p	280	IDVFEFSQLLMDSGLMDDSVTWITYHAAYDLGFLINILMND SMPNNKEDFEWWVHQYMP	339
TcPOP2	297	CVYDIKYLLRATD-----LSHSLGLDHLSESLRVRFRFGMAHQAGSDSLLTG	342
		YD+ + + L L++ L + RF + G SLL	
Pop2p	340	NFYDLNLVYKIIQEFKNPQLQQSSQQQQQQYSLTTLADELGLPRFSIFTTGGQSLML	399
TcPOP2	343	HCYFKLLRDCFGSNPP----VASNGVLYGLCED	371
		+ +L + P GV+YG+ D	
Pop2p	400	LSFCQLSKLSMHKFPNGTDFAKYQGVYIGIDGD	432

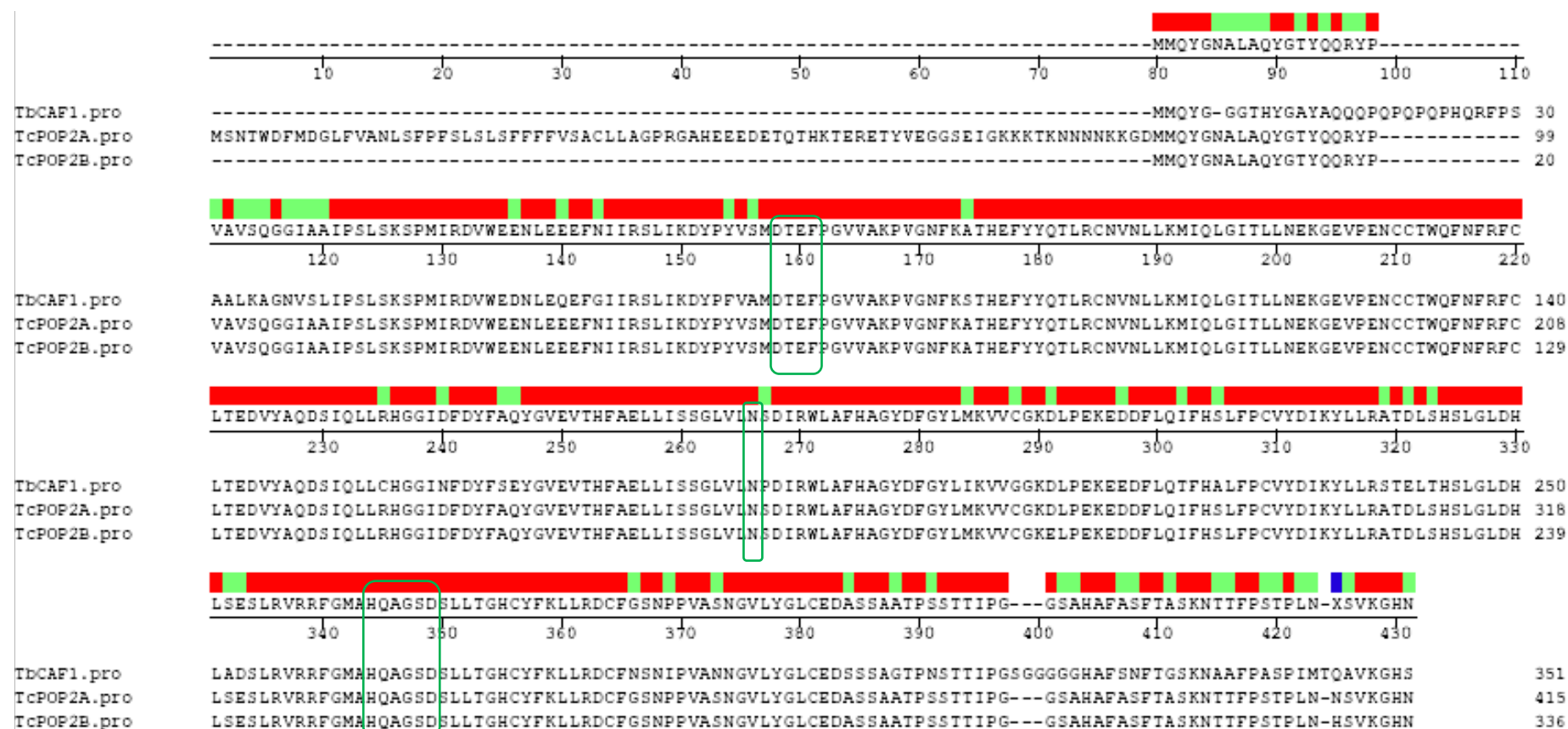
> POP2 Tc00.104705310535.60
Length=434

Score = 177 bits (449), Expect = 4e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 89/273 (33%), Positives = 148/273 (54%), Gaps = 19/273 (7%)

TcPOP2	39	IRDVWEENLEEEFNIRSLIKDYPYVSMDETFPGVVAKPVGNFKATHEFYQTLRCNVNL	98
		+RDVW+ NL EF +IR L+ Y +VS+ TEF G +A+P+G F++ +++YQT+R NV+	
Pop2p	160	VRDVWKSPLYSEFAVIRQLVSQYNHVSISTEFVGTLARPIGTFRSKVDYHYQTMRAVDF	219
TcPOP2	99	LKMIQLGITLLNEKGEVPEN-CCTWQFNFRFCLTEDVYAQDSIQLLRHGGIDFDYFAQYG	157
		L IQLG++L + G P+N TWQFNF F +++ + +S++LLR GI+F+ G	
Pop2p	220	LNPIQLGLSLSDANGNKPDPNGPSTWQFNFEFDPKKEIMSTESLELLRKSGINFEEKHENLG	279
TcPOP2	158	VEVTHFAELLISSGLVLNSDIRWLAFAHAGYDFGYLMKVVCCKELPEKEDDFLQIFHSLFP	217
		++V F++LL+ SGL+++ + W+ +HA YD G+L+ ++ +P ++DF H P	
Pop2p	280	IDVFEFSQLLMDSGLMDDSVTWITYHAAYDLGFLINILMND SMPNNKEDFEWWVHQYMP	339
TcPOP2	218	CVYDIKYLLRATD-----LSHSLGLDHLSESLRVRFRFGMAHQAGSDSLLTG	263
		YD+ + + L L++ L + RF + G SLL	
Pop2p	340	NFYDLNLVYKIIQEFKNPQLQQSSQQQQQQYSLTTLADELGLPRFSIFTTGGQSLML	399
TcPOP2	264	HCYFKLLRDCFGSNPP----VASNGVLYGLCED	292
		+ +L + P GV+YG+ D	
Pop2p	400	LSFCQLSKLSMHKFPNGTDFAKYQGVYIGIDGD	432

APÊNDICE C

Alinhamento entre as sequências das proteínas POP2 em *T. cruzi* e *T. brucei*. Os três domínios universalmente conservados são mostrados nas caixas verdes.



APÊNDICE D

Descrição de todos os genes utilizados na montagem da rede de *S. cerevisiae*.

Nome	Nome Sistemático	Nome Original	Descrição
BTT1	YDR252W	BTT1	Beta3 subunit of the heterotrimeric nascent polypeptide-associated complex which binds ribosomes via its beta-subunits in close proximity to nascent polypeptides; interacts with Caf130p of the CCR4-NOT complex; similar to human BTF3
CAF130	YGR134W	CAF130	Part of the evolutionarily-conserved CCR4-NOT transcriptional regulatory complex involved in controlling mRNA initiation, elongation, and degradation
CAF40	YNL288W	CAF40	Evolutionarily conserved subunit of the CCR4-NOT complex involved in controlling mRNA initiation, elongation and degradation; binds Cdc39p
CCR4	YAL021C	CCR4	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex, which is involved in regulation of gene expression; component of the major cytoplasmic deadenylase, which is involved in mRNA poly(A) tail shortening
DCP1	YOL149W	DCP1	Subunit of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex, which removes the 5' cap structure from mRNAs prior to their degradation; enhances the activity of catalytic subunit Dcp2p; regulated by DEAD box protein Dhh1p
DCP2	YNL118C	DCP2	Catalytic subunit of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex, which removes the 5' cap structure from mRNAs prior to their degradation; member of the Nudix hydrolase family
DCP3*	YEL015W	EDC3	Non-essential conserved protein of unknown function, plays a role in mRNA decapping by specifically affecting the function of the decapping enzyme Dcp1p; localizes to cytoplasmic mRNA processing bodies
DHH1	YDL160C	DHH1	Cytoplasmic DExD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay, interacts with both the decapping and deadenylase complexes, may have a role in mRNA export and translation
LSM1	YJL124C	LSM1	Lsm (Like Sm) protein; forms heteroheptameric complex (with Lsm2p, Lsm3p, Lsm4p, Lsm5p, Lsm6p, and Lsm7p) involved in degradation of cytoplasmic mRNAs
LSM2	YBL026W	LSM2	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
LSM3	YLR438C-A	LSM3	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
LSM4	YER112W	LSM4	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
LSM5	YER146W	LSM5	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
LSM6	YDR378C	LSM6	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA

LSM7	YNL147W	LSM7	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p): cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay; nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA
LSM8	YJR022W	LSM8	Lsm (Like Sm) protein; forms heteroheptameric complex (with Lsm2p, Lsm3p, Lsm4p, Lsm5p, Lsm6p, and Lsm7p) that is part of spliceosomal U6 snRNP and is also implicated in processing of pre-tRNA, pre-snoRNA, and pre-rRNA
NOT1*	YCR093W	CDC39	Component of the CCR4-NOT complex, which has multiple roles in regulating mRNA levels including regulation of transcription and destabilizing mRNAs by deadenylation; basal transcription factor
NOT2*	YDL165W	CDC36	Component of the CCR4-NOT complex, which has multiple roles in regulating mRNA levels including regulation of transcription and destabilizing mRNAs by deadenylation; basal transcription factor
NOT3	YIL038C	NOT3	Subunit of the CCR4-NOT complex, which is a global transcriptional regulator with roles in transcription initiation and elongation and in mRNA degradation
NOT4*	YER068W	MOT2	Subunit of the CCR4-NOT complex, which has roles in transcription regulation, mRNA degradation, and post-transcriptional modifications; with Ubc4p, ubiquitinates nascent polypeptide-associated complex subunits and histone demethylase Jhd2p
NOT5	YPR072W	NOT5	Subunit of the CCR4-NOT complex, which is a global transcriptional regulator with roles in transcription initiation and elongation and in mRNA degradation
NST1	YNL091W	NST1	Protein of unknown function, mediates sensitivity to salt stress; interacts physically with the splicing factor Msl1p and also displays genetic interaction with MSL1
PABP1*	YER165W	PAB1	Poly(A) binding protein, part of the 3'-end RNA-processing complex, mediates interactions between the 5' cap structure and the 3' mRNA poly(A) tail, involved in control of poly(A) tail length, interacts with translation factor eIF-4G
PAN2	YGL094C	PAN2	Essential subunit of the Pan2p-Pan3p poly(A)-ribonuclease complex, which acts to control poly(A) tail length and regulate the stoichiometry and activity of postreplication repair complexes
PAN3	YKL025C	PAN3	Essential subunit of the Pan2p-Pan3p poly(A)-ribonuclease complex, which acts to control poly(A) tail length and regulate the stoichiometry and activity of postreplication repair complexes
PAT1	YCR077C	PAT1	Topoisomerase II-associated deadenylation-dependent mRNA-decapping factor; also required for faithful chromosome transmission, maintenance of rDNA locus stability, and protection of mRNA 3'-UTRs from trimming; functionally linked to Pab1p
POP2	YNR052C	POP2	RNase of the DEDD superfamily, subunit of the Ccr4-Not complex that mediates 3' to 5' mRNA deadenylation
PUF5*	YGL178W	MPT5	Member of the Puf family of RNA-binding proteins; binds to mRNAs encoding chromatin modifiers and spindle pole body components; involved in longevity, maintenance of cell wall integrity, and sensitivity to and recovery from pheromone arrest
SCD6	YPR129W	SCD6	Protein containing an Lsm domain; negatively regulates translation initiation via 48S preinitiation complex assembly; may bind RNA and have a role in RNA processing; overproduction suppresses null mutation in clathrin heavy chain gene CHC1
XRN1	YGL173C	XRN1	Evolutionarily-conserved 5'-3' exonuclease component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay; plays a role in microtubule-mediated processes, filamentous growth, ribosomal RNA maturation, and telomere maintenance
Genes os quais não utilizamos o nome original estão marcados com *			

APÊNDICE E

Genes identificados da rede de *S. cerevisiae* em *T. cruzi* e *T. brucei*.

Proteínas de <i>S. cerevisiae</i>		Proteínas de <i>T. cruzi</i>	Proteínas <i>T. brucei</i>
Nome	Número de Acesso	Número de Acesso	Número de Acesso
BTT1	YDR252W	NI	NI
CAF130	YGR134W	Tc00.1047053508725.10	Tb927.10.8720
CAF40	YNL288W	Tc00.1047053507873.20	Tb927.4.410
CCR4	YAL021C	Tc00.1047053504073.10	Tb11.02.5700
DCP1	YOL149W	NI	NI
DCP2	YNL118C	NI	NI
DCP3	YEL015W	NI	NI
DHH1	YDL160C	Tc00.1047053506959.30	Tb10.70.3290
LSM1	YJL124C	NI	NI
LSM2	YBL026W	Tc00.1047053511217.80	Tb927.8.5180
LSM3	YLR438C-A	Tc00.1047053510609.65	Tb927.7.7380
LSM4	YER112W	Tc00.1047053457339.10	Tb11.01.5535
LSM5	YER146W	Tc00.1047053508823.60	tryp_XI-1036e06.p1k 2797-3120, 30141-30464, + strand
LSM6	YDR378C	Tc00.1047053506893.25	Tb09.160.2150
LSM7	YNL147W	Tc00.1047053503479.49	Tb927.5.4030
LSM8	YJR022W	Tc00.1047053510421.314	Tb927.3.1780
NOT1	YCR093W	Tc00.1047053509247.30	Tb10.70.6450
NOT2	YDL165W	Tc00.1047053510073.70	Tb927.6.850
NOT3	YIL038C	NI	NI
NOT4	YER068W	NI	NI
NOT5	YPR072W	Tc00.1047053504043.10	Tb927.3.1920
NST1	YNL091W	NI	NI
PABP1	YER165W	Tc00.1047053506885.70	Tb09.211.0930
PAN2	YGL094C	Tc00.1047053507017.120	Tb927.6.1670
PAN3	YKL025C	Tc00.1047053504643.49	Tb11.01.5540
PAT1	YCR077C	NI	NI
POP2	YNR052C	Tc00.1047053511827.60	Tb927.6.600
PUF5	YGL178W	Tc00.1047053508787.30	Tb927.10.310
SCD6	YPR129W	Tc00.1047053507093.300	Tb11.03.0530
XRN1	YGL173C	Tc00.1047053505939.89	Tb927.7.4900
NI = Não Identificado			

APÊNDICE F

Curvas de amplificação e dissociação de PCR em tempo real e perfil eletroforético dos amplicons de alguns genes testados em *T. cruzi*.

Alvo *TcAMA*

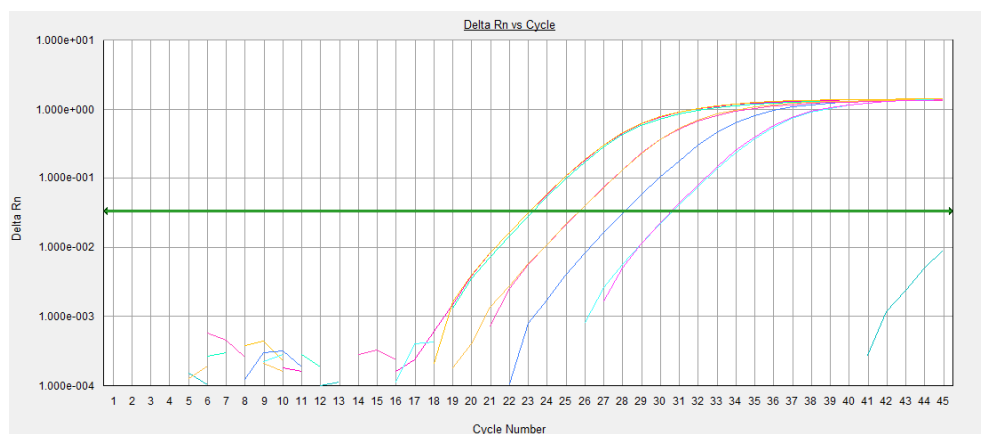


Figura F01. Curva de amplificação de PCR quantitativa do alvo *TcAMA*, com temperatura de anelamento de 63°C.

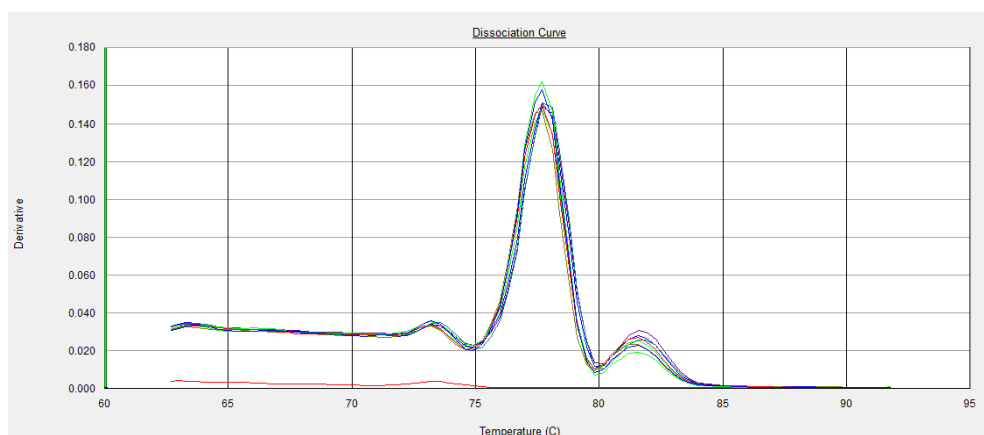


Figura F02. Curva de dissociação de PCR quantitativo do alvo *TcAMA*.

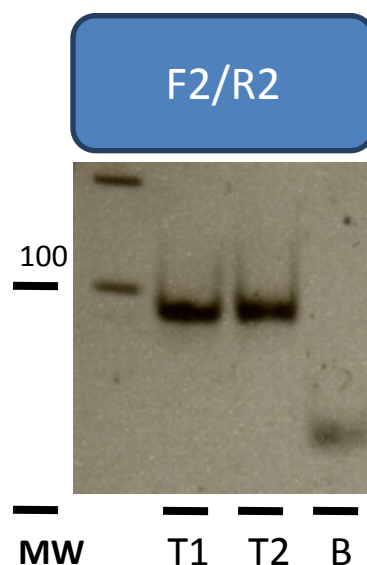


Figura F03. Perfil eletroforético de PCR quantitativa do alvo *TcAMA*. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. T1: Teste 1 e T2: Teste 2; B: Branco.

Alvo *TcCYC*

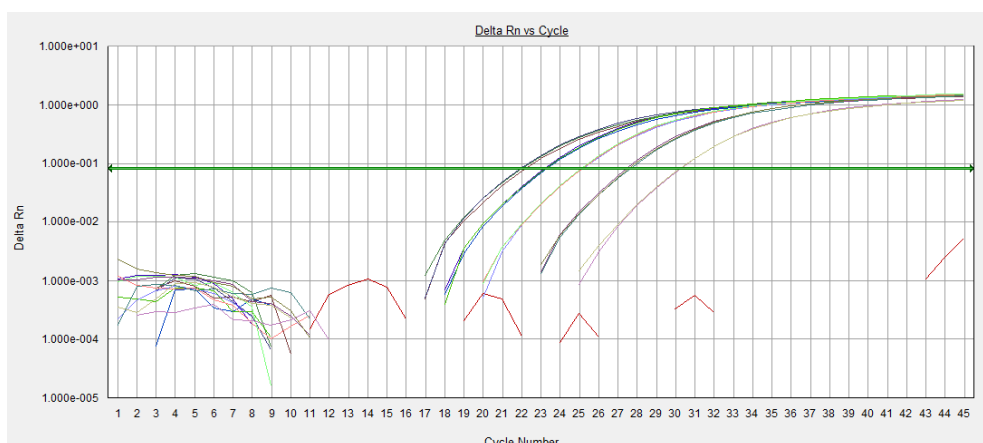


Figura F04. Curva de amplificação de PCR quantitativa do alvo *TcCYC*, com temperatura de anelamento de 60 °C. Em verde e vermelho, duplicatas técnicas; em azul, branco.

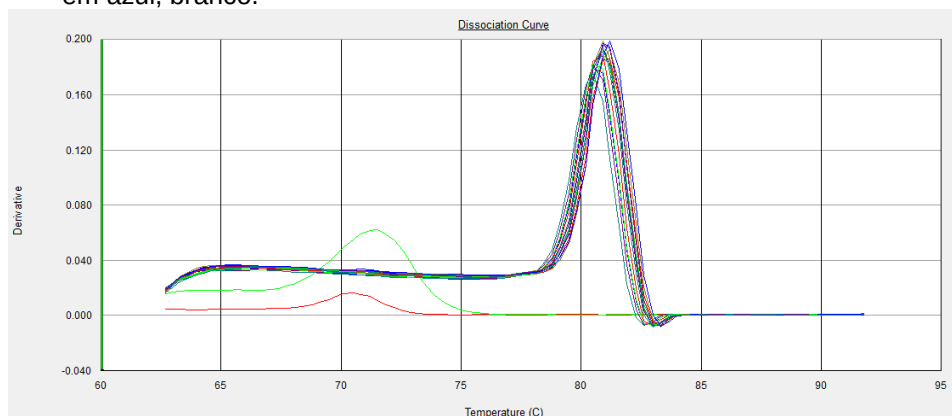


Figura F05. Curva de dissociação de PCR quantitativo do alvo *TcCYC*. Em verde e vermelho, duplicatas técnicas; em azul, branco.

Alvos *TcHYP* e *TcRBP5*

Nenhum dos pares de oligonucleotídeos iniciadores nos forneceu boas amplificações. Além de curvas de dissociação com mais de um pico (imagens não mostradas), o que denota a presença de amplicons de diversos tamanhos, o perfil eletroforético confirmou a presença dessas amplificações inespecíficas (Figura F06, para *TcRBP5*).

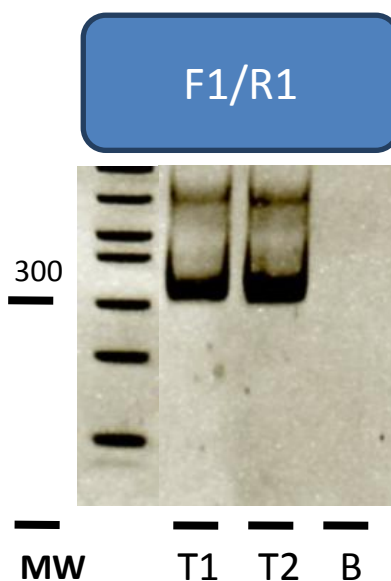


Figura F06. Perfil eletroforético de PCR quantitativa do alvo *TcRBP5*. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. T1: Teste 1 e T2: Teste 2; B: Branco.

Alvo *TcMASP*

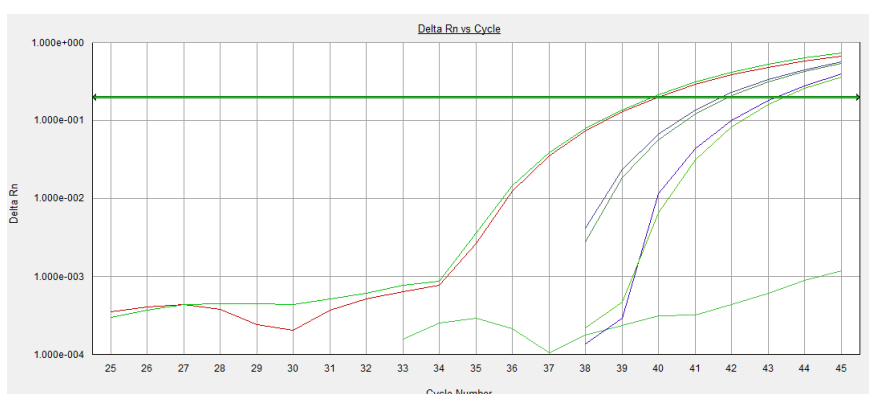


Figura F07. Curva de amplificação de PCR quantitativa do alvo *TcMASP*, com temperatura de anelamento de 60 °C. Em verde e vermelho, duplicatas técnicas; em azul, branco.

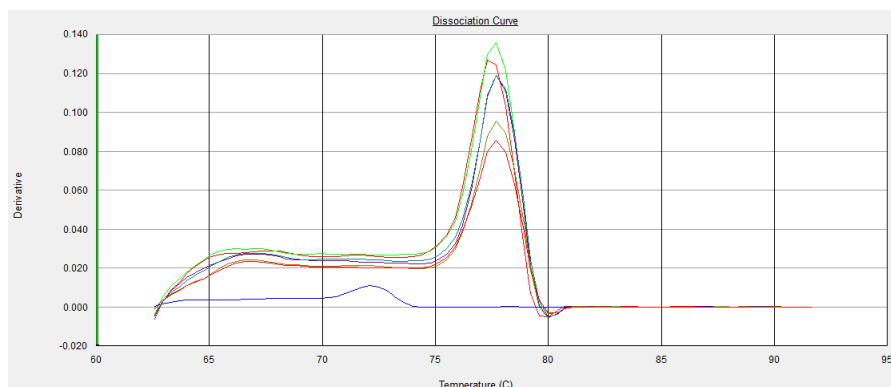


Figura F08. Curva de dissociação de PCR quantitativo alvo *TcMASP*. Em colorido (várias linhas sobrepostas), replicatas técnicas; em azul, branco.

Uma vez que a amplificação do gene *TcMASP* ocorre tardiamente, a reta pode ser distorcida por uma série de fatores. Dessa forma, temos um coeficiente angular característico de PCRs com baixa eficiência. Isso pode ser explicado pelo fato do gene *TcMASP* escolhido ser um gene não abundante, extremamente pouco expresso. Mesmo assim, uma vez que esses dados foram comparados com outros dados de decaimento, não levaremos em conta somente esses aqui apresentados.

Alvo *TcMUC*

Não foi obtida nenhuma amplificação satisfatória para tal alvo.

Controle negativo *TcCTL1*

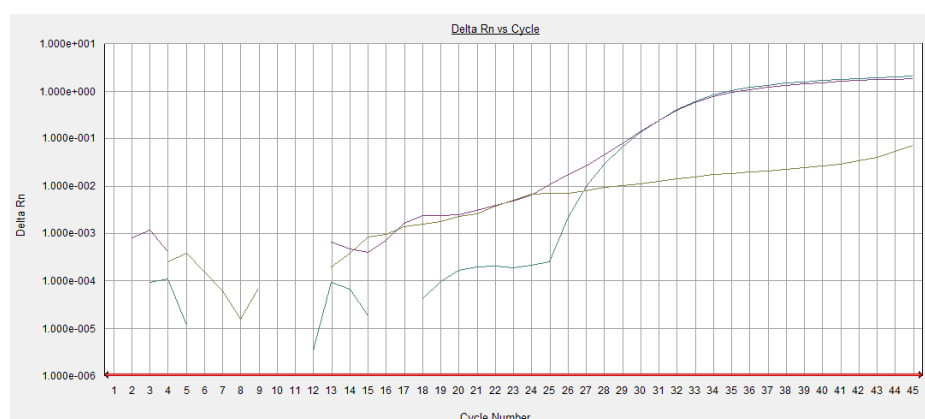


Figura F09. Curva de amplificação de PCR quantitativa do *TcCTL1*, com temperatura de anelamento de 60 °C. Em azul e vermelho, duplicatas técnicas; em amarelo, branco.

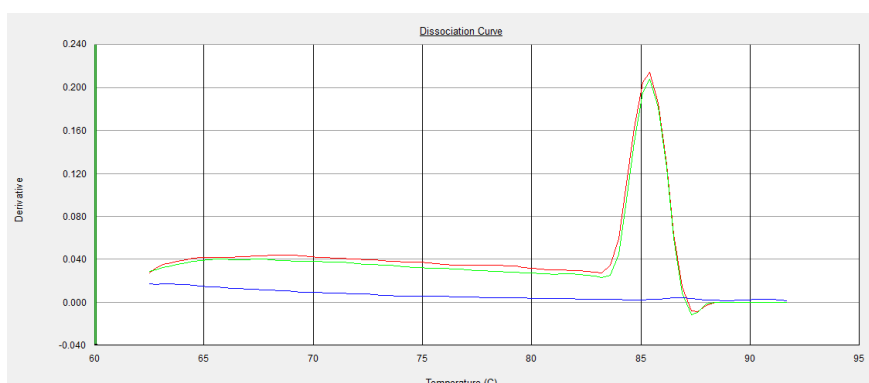


Figura F10. Curva de dissociação de PCR quantitativa do *TcCTL1*. Em verde e vermelho, duplicatas técnicas; em azul, branco.

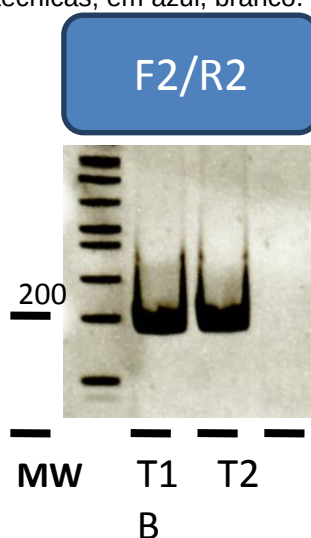


Figura F11. Perfil eletroforético de PCR quantitativa do *TcCTL1*. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. T1: Teste 1 e T2: Teste 2; B: Branco.

Controle negativo *TcCTL2*

Com o *TcCTL2* (H⁺ ATPase, subunidade G), tivemos curvas específicas de amplificação e dissociação (imagens não mostradas) com o par de oligonucleotídeos F1/R1 (Quadro 08), porém o perfil eletroforético mostrou duas bandas inespecíficas de 350 e 400 bp (Figura F12).

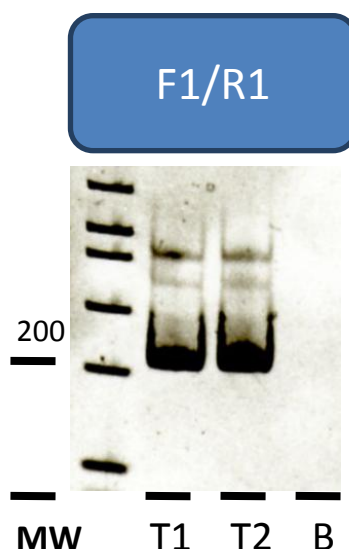


Figura F12. Perfil eletroforético de PCR quantitativa do *TcCTL2*. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. T1: Teste 1 e T2: Teste 2; B: Branco.

Genes normalizadores *TcL9*, *TcGAPDH* e *Tcα-tubulina*

Para os genes normalizadores, ambos os pares de oligonucleotídeos iniciadores testados puderam ser utilizados com êxito (Quadro 09).

Para o gene *TcL9* tivemos curvas específicas de amplificação e dissociação (Imagens não mostradas) e o perfil eletroforético mostrou-se específico (Figura F13). O par F2/R2 foi escolhido para padronização;

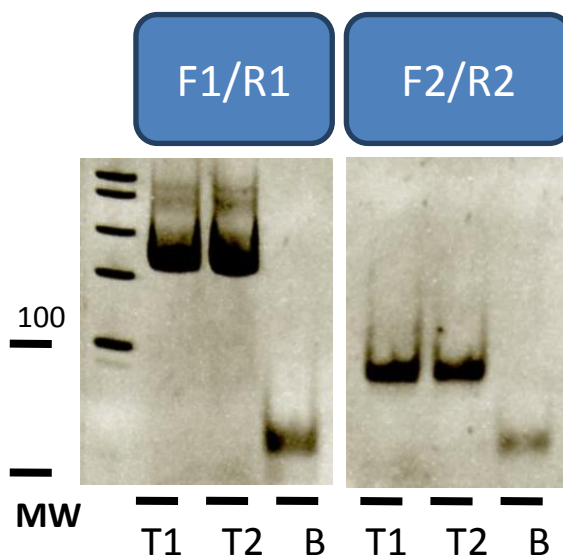


Figura F13. Perfil eletroforético de PCR quantitativa do gene normalizador *TcL9*. MW: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) representado em pares de bases. T1: Teste 1 e T2: Teste 2; B: Branco.

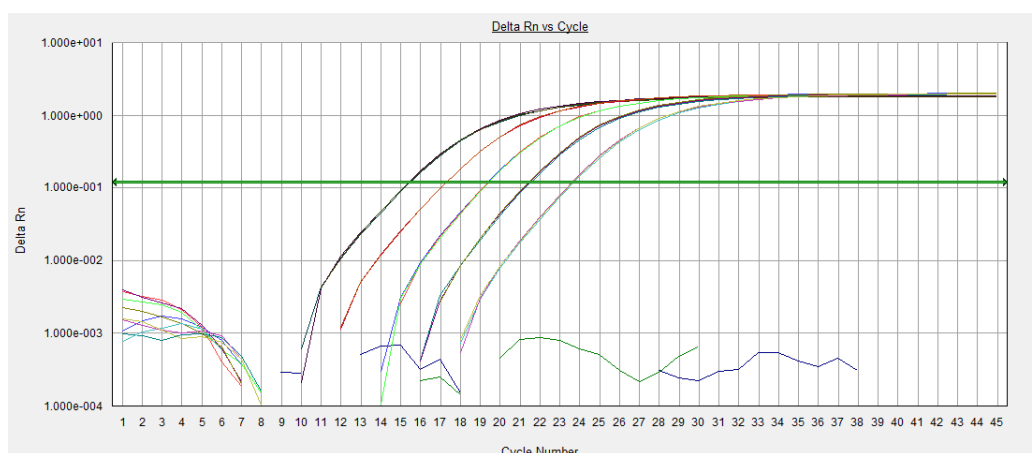


Figura F14. Curva de amplificação de PCR quantitativa do gene normalizador *TcL9*, com temperatura de anelamento de 60 °C.

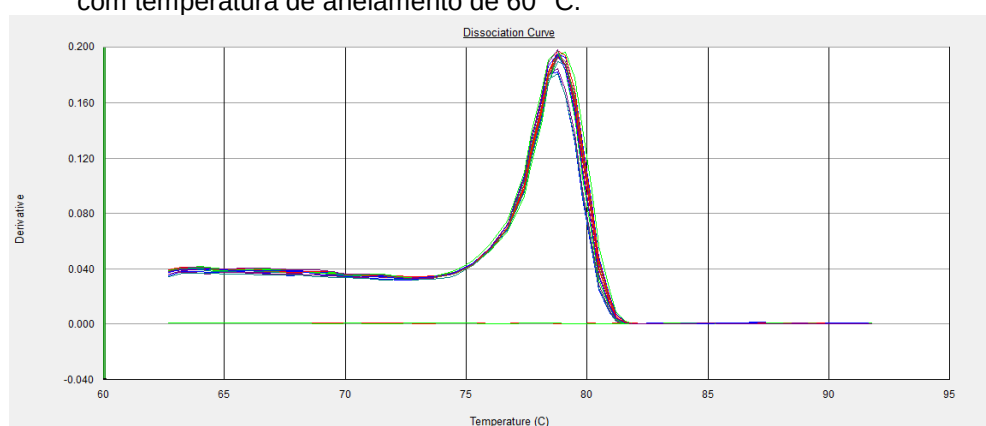


Figura F15. Curva de dissociação de PCR quantitativo do gene normalizador *TcL9*. Em colorido (várias linhas sobrepostas), replicatas técnicas; em verde, branco.

Para *TcGAPDH* e *Tca-tubulina*, dos dois pares de oligonucleotídeos testados para cada gene, a melhor amplificação (mais específica) ocorreu com o par F2/R2 (Quadro 09). A amplificação do par F1/R1 resultou em bandas inespecíficas de ~300 e 400 bp para *TcGAPDH* e de uma banda inespecífica de ~300 bp para *Tca-tubulina* (imagens não mostradas).

APÊNDICE G

Lista de mRNAs identificados por microarranjo por HOLETZ e colaboradores (2010) e respectivos dados referentes ao decaimento global, cedidos por PROBST e colaboradores (dados não publicados).

Supergene	Nome do Supergene	GeneID	Descrição no Microarranjo	FC	FDR	Nível de Expressão	RSE Global	Decaim. Global	Pontos Considerados (minutos)	RSE parcial	Decaim. Parcial	t½								
SG0003	mucin TcMUCII	Tc00.1047053510561.20	mucin TcMUCII, putative	2.577	0.000	1088,9	0,018	-1,368	0-30	0,005	-1,042	0,972								
		Tc00.1047053509753.150	mucin TcMUCII, putative	3.676	0.000															
		Tc00.1047053511259.130	mucin TcMUCII, putative	2.617	0.000															
		Tc00.1047053509081.100	mucin TcMUCII, putative	2.315	1.655															
		Tc00.1047053510557.50	mucin TcMUCII, putative	2.516	1.007															
		Tc00.1047053507637.130	mucin TcMUCII, putative	2.261	2.071															
		Tc00.1047053507085.140	mucin TcMUCII, putative	2.995	0.000															
		Tc00.1047053506939.40	mucin TcMUCII, putative	2.207	2.071															
		Tc00.1047053510503.130	mucin TcMUCII, putative	2.366	0.768															
		Tc00.1047053506897.10	mucin TcMUCII, putative	2.770	0.000															
		Tc00.1047053508243.60	mucin TcMUCII, putative	2.787	0.000															
		Tc00.1047053504039.240	mucin TcMUCII, putative	2.409	2.242															
		Tc00.1047053505949.10	mucin TcMUCII, putative	2.093	2.242															
		Tc00.1047053481211.30	mucin TcMUCII, putative	2.499	0.000															
		Tc00.1047053506309.80	mucin TcMUCII, putative	2.647	0.000															
		Tc00.1047053506995.40	mucin TcMUCII, putative	2.136	2.745															
		Tc00.1047053506321.210	mucin TcMUCII, putative	2.621	0.000															
		Tc00.1047053509525.120	mucin TcMUCII, putative	2.150	3.839															
		Tc00.1047053463955.10	mucin TcMUCII, putative	2.453	1.007															
		Tc00.1047053504081.470	mucin TcMUCII, putative	2.874	0.000															
		Tc00.1047053511081.30	mucin TcMUCII, putative	2.913	0.000															
		Tc00.1047053508119.70	mucin TcMUCII, putative	3.019	0.000															
Tc00.1047053511259.80	mucin TcMUCII, putative	2.365	1.655																	

	Tc00.1047053511603.260	mucin TcMUCII, putative	2.595	0.000							
	Tc00.1047053505949.120	mucin TcMUCII, putative	2.167	1.655							
	Tc00.1047053507163.50	mucin TcMUCII, putative	2.441	0.768							
	Tc00.1047053509869.30	mucin TcMUCII, putative	2.441	0.502							
	Tc00.1047053508245.60	mucin TcMUCII, putative	2.337	1.543							
	Tc00.1047053507957.229	mucin TcMUCII, putative	2.312	1.655							
	Tc00.1047053510483.190	mucin TcMUCII, putative	2.382	0.768							
	Tc00.1047053510583.100	mucin TcMUCII, putative	2.235	2.494							
	Tc00.1047053511613.50	mucin TcMUCII, putative	2.627	0.000							
SG0004	Tc00.1047053506955.99	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.107	2.745	1565,1 0,03 -1,861 0-30 0,007 -1,476						0,781
	Tc00.1047053509419.150	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.086	2.745							
	Tc00.1047053506245.270	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.087	3.538							
	Tc00.1047053510583.130	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.002	6.745							
	Tc00.1047053506703.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.064	4.399							
	Tc00.1047053511077.60	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.097	2.242							
	Tc00.1047053510697.40	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.173	1.543							
	Tc00.1047053507071.140	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.077	2.494							
	Tc00.1047053507069.150	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.005	3.839							
	Tc00.1047053507523.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.045	3.839							

		Tc00.1047053510623.39	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	2.113	3.032							
		Tc00.1047053506245.200	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.069	2.494							
SG0010	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506813.170	hypothetical protein, conserved (pseudogene) similar to Tb06.30P15.240 and LmjF24.0260.	2.295	1.007	293,3	0,052	-2,479	0-30	0,013	-2,221	
SG0015	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510625.54	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.383	2.071							
		Tc00.1047053506423.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.454	0.502							
		Tc00.1047053510463.150	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.184	2.071							
		Tc00.1047053510361.260	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.179	3.839							
		Tc00.1047053506781.39	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.072	2.745	369,6	0,035	-2,087	0-45	0,017	-2,014	
		Tc00.1047053508261.130	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.519	0.768							
		Tc00.1047053510627.128	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.342	1.007							
		Tc00.1047053506781.19	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.289	1.543							
		Tc00.1047053510391.50	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.734	0.000							
SG0031	90 kDa surface protein, serine-alanine- and proline-rich protein	Tc00.1047053503973.70	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.184	2.494	85,4	0,038	-1,716	0-45	0,012	-1,709	0,720
SG0048	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510831.10	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	2.193	1.543	138,3	0,046	-2,554	0-45	0,007	-2,452	0,612
		Tc00.1047053508165.410	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.175	1.655							

SG0054	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053507959.300	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.049	2.242	90,3	0,034	-1,951	0-45	0,012	-1,813	0,699
SG0055	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053506767.230	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.418	1.007	272,8	0,049	-2,269	0-30	0,01	-1,694	0,724
		Tc00.1047053506459.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.322	1.543							
SG0063	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506971.70	mucin TcMUCII, putative	2.102	1.655	25	0,068	-1,848	0-30	0,053	-1,361	0,819
SG0069	hypothetical protein	Tc00.1047053433237.20	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	2.611	0.502	89	0,099	-2,328	0-45	0,052	-2,605	0,598
SG0071	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053511595.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.473	0.502	41,6	0,072	-2,442	0-30	0,042	-1,961	0,673
SG0090	hypothetical protein	Tc00.1047053504587.40	mucin TcMUCII, putative	3.034	0.000	60,7	0,062	-2,054	0-30	0,049	-1,683	0,726
SG0110	mucin TcMUCII	Tc00.1047053509631.30	mucin TcMUCII (pseudogene), putative	2.531	0.502	66,5	0,077	-2,055	0-45	0,01	-2,162	0,644
SG0114	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506741.110	mucin TcMUCII, putative	2.057	2.745	96,8	0,057	-1,585	0-30	0,021	-1,55	0,759
SG0130	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508119.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.905	0.000	79,5	0,136	-2,491	0-30	0,021	-2,773	0,586
SG0136	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053507237.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.133	2.071	62,1	0,091	-2,786	0-30	0,012	-1,763	0,709
SG0147	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510025.160	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.361	0.768	21,2	0,1	-2,143	0-30	0,013	-1,752	0,711
SG0163	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053507063.340	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.089	2.494	124,1	0,083	-2,324	0-45	0,017	-2,679	0,593
SG0166	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053511599.90	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.895	0.000	46,4	0,084	-2,907	0-30	0,052	-2,223	0,636

SG0182	expression site-associated gene (ESAG-like) protein, expression site-associated gene 3 (ESAG3-like) protein	Tc00.1047053503471.19	expression site-associated gene (ESAG-like) protein, putative	2.138	2.242	49	0,051	-0,464	0-30	0,004	0,049	-14,473
SG0189	amastin	Tc00.1047053506437.10	amastin, putative	2.213	3.032	188,8	0,024	-1,977	0-30	0,012	-1,329	0,831
SG0196	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506569.40	hypothetical protein, conserved	2.050	2.745	144,5	0,084	-2,285	0-45	0,032	-2,562	0,602
SG0202	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508735.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.258	1.655	61	0,11	-2,087	0-45	0,051	-2,562	0,602
SG0230	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506789.334	hypothetical protein, conserved	2.112	2.242	2016,5	0,012	-0,198	0-45	0,012	-0,009	80,400
SG0288	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508247.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.252	1.655	17,6	0,175	-1,706	0-30	0,002	-1,472	0,782
SG0301	mucin TcMUCII	Tc00.1047053416605.20	mucin TcMUCII (pseudogene), putative	2.063	3.538	17	0,09	-2,542	0-60	0,09	-2,542	0,604
SG0315	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053453767.50	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.086	2.494	56,6	0,099	-2,605	0-30	0,012	-2,319	0,625
		Tc00.1047053511255.280	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.218	1.543							
SG0387	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053504239.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	3.511	0.000	14,6	0,252	-2,366	0-45	0,161	-2,985	0,572
SG0442	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053504039.130	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.384	0.768	27,7	0,07	-2,266	0-45	0,045	-2,184	0,641
SG0449	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508313.140	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.827	0.000	27,7	0,24	-2,93	0-45	0,08	-3,674	0,543
SG0479	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053511607.40	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.516	0.502	62	0,132	-2,31	0-45	0,044	-2,908	0,577
SG0511	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506067.100	mucin TcMUCII, putative	2.929	0.000	75,5	0,044	-0,653	0-60	0,044	-0,653	1,373

SG0517	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053506173.60	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.001	2.745	69,7	0,051	-2,449	0-60	0,051	-2,449	0,612
SG0519	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506781.10	mucin TcMUCII, putative	2.686	0.000	31,6	0,095	-2,258	0-30	0,016	-1,97	0,671
SG0561	mucin TcMUCII	Tc00.1047053507847.10	mucin TcMUCII (pseudogene), putative	2.283	2.745	39,1	0,175	-1,407	0-30	0,02	-1,876	0,687
SG0577	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053506667.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.063	3.032	122	0,051	-2,133	0-30	0,032	-1,703	0,722
SG0625	hypothetical protein	Tc00.1047053438923.10	hypothetical protein	2.388	1.655	78,3	0,106	-2,157	0-30	0,038	-2,29	0,629
		Tc00.1047053506495.40	hypothetical protein	2.152	1.655							
SG0734	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053511843.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.372	1.007	9,5	0,243	-1,911	0-45	0,18	-2,511	0,606
SG1038	nucleoside transporter 1	Tc00.1047053506203.10	nucleoside transporter 1, putative	2.585	0.502	299,3	0,02	-1,07	0-45	0,007	-0,523	1,644
SG1202	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053430895.10	hypothetical protein, conserved	2.106	2.071	286,6	0,007	-1,272	0-60	0,007	-1,272	0,853
SG1240	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053511839.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.031	2.745	14,8	0,095	-2,324	0-45	0,036	-2,329	0,624
SG1419	hypothetical protein	Tc00.1047053508503.30	hypothetical protein	2.121	2.494	143	0,026	0,097	0-45	0,022	0,316	-2,042
SG1675	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053509601.80	hypothetical protein, conserved	2.399	0.502	54,8	0,015	-0,709	0-60	0,015	-0,709	1,288
SG1880	surface antigen TASV-B2	Tc00.1047053511877.10	hypothetical protein	2.172	2.071	29,9	0,129	-2,164	0-30	0,107	-2,028	0,662
SG2087	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506297.60	hypothetical protein, conserved	3.029	0.000	174,9	0,025	-2,104	0-60	0,025	-2,104	0,652
SG2180	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053507959.210	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.708	0.000	18,8	0,108	-2,368	0-30	0,066	-1,884	0,686
SG2202	mucin TcMUCII	Tc00.1047053511603.200	mucin TcMUCII, putative	2.481	0.768	7,9	0,312	-1,012	0-30	0,276	-1,898	0,683
SG2300	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053505073.14	hypothetical protein, conserved	2.275	1.655	104,9	0,022	-1,65	0-60	0,022	-1,65	0,734
SG2402	hypothetical protein	Tc00.1047053506835.50	hypothetical protein	2.144	2.242	259,1	0,026	-1,61	0-30	0,011	-1,201	0,885
SG2454	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506829.30	hypothetical protein, conserved	2.612	0.502	105	0,034	-2,115	0-30	0,029	-1,415	0,800

SG2580	hypothetical protein	Tc00.1047053511071.90	hypothetical protein	2.608	0.000	87,8	0,13	-2,403	0-45	0,042	-2,819	0,583
SG2614	hypothetical protein	Tc00.1047053508209.94	hypothetical protein	2.558	0.502	34,9	0,163	-1,215	0-30	0,036	-2,152	0,645
SG2930	RNA-binding protein 5	Tc00.1047053511481.70	RNA-binding protein 5, putative	2.066	3.032	23,2	0,044	-1,524	0-30	0,008	-0,312	2,571
SG3182	serine acetyltransferase	Tc00.1047053510879.80	serine acetyltransferase, putative	2.530	1.007	62,2	0,025	-0,786	0-45	0,019	-0,384	2,140
SG3201	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053507547.59	hypothetical protein, conserved	2.164	1.543	169,1	0,033	-1,352	0-45	0,022	-1,329	0,831
SG3470	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506435.424	hypothetical protein, conserved	2.000	4.399	52,1	0,033	-1,874	0-60	0,033	-1,874	0,688
SG3484	hypothetical protein	Tc00.1047053506871.190	hypothetical protein	2.657	0.502	26,6	0,085	-1,305	0-45	0,043	-1,536	0,763
SG3620	meiotic recombination protein spo11	Tc00.1047053503619.10	meiotic recombination protein SPO11, putative	2.214	1.543	93,1	0,035	-1,09	0-30	0,006	-0,83	1,143
SG3659	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506833.20	hypothetical protein, conserved	2.006	4.399	259,8	0,035	-1,803	0-60	0,035	-1,803	0,701
SG3735	SNARE domain-containing protein	Tc00.1047053506469.130	hypothetical protein	2.341	0.768	89,9	0,173	-2,373	0-30	0,002	-2,122	0,649
SG3778	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506693.40	hypothetical protein, conserved	2.526	0.502	41,6	0,1	-1,926	0-30	0,024	-1,937	0,677
SG3811	hypothetical protein	Tc00.1047053509153.110	hypothetical protein	2.029	10.460	114,1	0,025	-1,427	0-60	0,025	-1,427	0,796
SG3860	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053507993.270	hypothetical protein, conserved	2.439	2.494	31,6	0,061	-0,513	0-45	0,043	0,132	-5,219
SG3918	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053507073.20	hypothetical protein, conserved	3.004	0.000	65,9	0,063	-1,532	0-30	0,054	-1,468	0,783
SG4015	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506479.20	hypothetical protein, conserved	2.273	2.745	33,9	0,008	-0,678	0-45	0,001	-0,438	1,910
SG4064	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053509891.40	hypothetical protein, conserved	3.342	0.000	171,5	0,029	-1,84	0-45	0,012	-1,672	0,729
SG4071	hypothetical protein	Tc00.1047053510773.40	hypothetical protein	3.618	0.000	4,2	0,135	-0,598	0-45	0,077	-1,055	0,964
SG4448	serine/threonine protein phosphatase	Tc00.1047053508891.60	serine/threonine protein phosphatase, putative	2.268	1.655	36,3	0,082	-0,965	0-30	0,064	0,449	-1,370

SG4807	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053511507.24	hypothetical protein, conserved	2.731	0.502	106,1	0,133	-2,913	0-30	0,027	-2,841	0,581
SG4947	hypothetical protein	Tc00.1047053506425.150	hypothetical protein	2.704	0.000	216,4	0,017	-1,556	0-60	0,017	-1,556	0,758
SG5223	kinase	Tc00.1047053510971.60	protein kinase, putative	2.203	1.543	110,8	0,071	-0,363	0-30	0,037	-1,171	0,899
SG5272	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053508239.40	hypothetical protein, conserved	2.534	0.768	46,8	0,15	-2,918	0-30	0,044	-2,533	0,604
SG5335	NUDIX hydrolase dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase/ hydrolase	Tc00.1047053507601.40	hypothetical protein, conserved	2.232	1.543	50,5	0,04	-1,272	0-45	0,03	-0,683	1,326
SG5367	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506773.104	hypothetical protein, conserved	2.005	4.861	246,4	0,021	-1,021	0-60	0,021	-1,021	0,986
SG5368	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053503893.100	hypothetical protein, conserved	2.071	3.032	74,3	0,028	0,004	0-60	0,028	0,004	#####
SG5399	hypothetical protein	Tc00.1047053511385.40	hypothetical protein	2.084	2.494	36,8	0,117	-2,263	0-45	0,069	-2,553	0,603
SG5524	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053503525.30	hypothetical protein, conserved	2.351	0.768	432,6	0,009	-0,409	0-30	0,006	-0,27	2,929
SG5690	RNA-binding protein	Tc00.1047053504005.6	RNA-binding protein, putative	2.516	0.768	146,1	0,059	-1,191	0-45	0,011	-1,556	0,758
SG5776	trypanothione synthetase	Tc00.1047053504427.10	trypanothione synthetase, putative	2.170	2.494	34,4	0,155	-1,977	0-45	0,062	-2,444	0,613
SG5978	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506605.130	hypothetical protein, conserved	2.005	4.399	23,7	0,066	-1,247	0-60	0,066	-1,247	0,864
SG6476	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053508863.20	hypothetical protein, conserved	2.537	0.502	41,6	0,027	-0,455	0-30	0,005	0,032	-22,293
SG6630	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053504249.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.016	5.832	98,4	0,048	-2,28	0-45	0,015	-2,212	0,638
SG6631	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053506309.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.165	2.242	4,4	0,246	-1,983	0-60	0,246	-1,983	0,669
SG6645	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510483.70	mucin-associated surface protein (MASP), putative	3.143	0.000	48,8	0,1	-1,929	0-30	0,04	-2,081	0,655
SG6697	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506321.10	mucin TcMUCII, putative	2.211	2.071	8,6	0,312	-1,609	0-30	0,22	-0,289	2,754

SG6773	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510105.310	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.278	1.543	5,1	0,203	-1,98	0-30	0,008	-1,195	0,888
SG7000	cyclin	Tc00.1047053506945.270	cyclin, putative	2.198	2.242	102,3	0,039	-0,73	0-45	0,031	-0,21	3,691
SG7085	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506625.130	hypothetical protein, conserved	2.726	0.502	26,6	0,207	-2,728	0-30	0,091	-2,611	0,598
SG7333	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510279.60	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.131	2.242	3,8	0,661	-1,627	0-45	0,256	-2,771	0,586
SG7408	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506933.43	hypothetical protein, conserved	2.141	1.655	69,4	0,03	-1,501	0-30	0,005	-1,079	0,949
SG7596	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053504153.110	hypothetical protein, conserved	2.076	2.071	256,5	0,017	-0,182	0-30	0,01	-0,075	9,870
SG7771	hypothetical protein	Tc00.1047053508139.120	hypothetical protein	3.088	0.000	58,1	0,109	-2,583	0-45	0,061	-2,739	0,588
SG7772	surface antigen TASV, hypothetical protein	Tc00.1047053511861.120	hypothetical protein	3.921	0.000	14,7	0,336	-3,551	0-30	0,03	-3,372	0,553
SG7787	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053511727.220	hypothetical protein, conserved	2.085	4.861	105	0,022	-0,836	0-45	0,016	-0,419	1,984
SG7861	mucin TcSMUGS	Tc00.1047053508233.30	mucin TcSMUGS, putative	2.328	1.543	262,2	0,022	-0,924	0-30	0,004	-0,844	1,129
SG7903	mucin TcMUCII	Tc00.1047053508247.70	mucin TcMUCII, putative	2.716	0.000	9,7	0,388	-0,686	0-60	0,388	-0,686	1,321
SG7963	mucin TcMUCII	Tc00.1047053506139.100	mucin TcMUCII, putative	2.177	1.655	12,1	0,296	-2,543	0-30	0,03	-0,82	1,153
SG7981	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053503519.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.139	1.655	5,6	0,14	-1,5	0-60	0,14	-1,5	0,773
SG7994	mitochondrial carrier protein	Tc00.1047053506247.260	mitochondrial carrier protein, putative	2.340	0.768	61,8	0,086	-1,891	0-30	0,045	-1,655	0,733
SG8078	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053507951.290	hypothetical protein, conserved	2.090	3.032	75,7	0,111	-2,86	0-45	0,042	-2,991	0,572
SG8141	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510483.154	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.464	0.768	4,5	0,379	-2,293	0-45	0,247	-2,575	0,601
SG8158	mucin TcMUCII	Tc00.1047053510237.60	mucin TcMUCII, putative	2.487	0.502	14,6	0,247	-1,622	0-30	0,037	-1,427	0,796
SG8184	hypothetical protein	Tc00.1047053508677.60	hypothetical protein	2.315	1.007	89,4	0,146	-3,235	0-45	0,057	-3,505	0,548
SG8208	ras-related GTP-binding protein	Tc00.1047053511277.190	ras-related GTP-binding protein, putative	2.002	2.494	79	0,012	-1,768	0-45	0,007	-1,229	0,872

SG8252	hypothetical protein	Tc00.1047053508577.50	hypothetical protein	2.813	0.000	38,6	0,026	-1,493	0-30	0,021	-0,986	1,010
SG8263	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053510699.89	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.530	0.768	3,1	0,276	-1,049	0-30	0,201	-1,728	0,716
SG8374	mucin TcMUCII	Tc00.1047053511255.299	mucin TcMUCII, putative	2.018	3.538	26,8	0,279	-2,09	0-30	0,002	-2,818	0,583
SG8396	mucin TcMUCII	Tc00.1047053509753.240	mucin TcMUCII, putative	2.428	0.502	23,5	0,083	-0,982	0-60	0,083	-0,982	1,013
SG8604	hypothetical protein	Tc00.1047053507085.120	hypothetical protein	2.460	0.768	14,1	0,371	-2,137	0-30	0,251	-2,429	0,614
SG8632	phosphatidic acid phosphatase	Tc00.1047053511277.370	phosphatidic acid phosphatase, putative	4.093	0.000	27,9	0,324	-1,981	0-30	0,085	-2,749	0,587
SG8647	mucin TcMUCII	Tc00.1047053510699.50	mucin TcMUCII, putative	2.200	1.543	75,7	0,035	-0,999	0-45	0,012	-1,077	0,951
SG8651	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508873.510	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.959	0.000	19,2	0,107	-0,894	0-30	0,057	-0,602	1,466
SG8733	mucin TcMUCII	Tc00.1047053509755.70	mucin TcMUCII, putative	2.197	2.242	11,9	0,126	-1,917	0-30	0,072	-1,626	0,740
SG8734	ADP-ribosylation factor family	Tc00.1047053508897.70	ADP-ribosylation factor family, putative	2.153	3.032	88,8	0,033	-2,187	0-45	0,01	-1,944	0,676
SG8751	hypothetical protein	Tc00.1047053508173.140	hypothetical protein	2.550	0.768	45,2	0,127	-1,967	0-30	0,03	-2,387	0,618
SG8784	mucin-associated surface protein (MASP)	Tc00.1047053508435.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.020	2.745	8,5	0,362	-1,309	0-60	0,362	-1,309	0,838
SG8839	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053509997.10	hypothetical protein, conserved	6.255	0.000	26,6	0,027	-0,28	0-60	0,027	-0,28	2,834
SG8882	surface antigen TASV, hypothetical protein	Tc00.1047053507491.20	hypothetical protein	2.141	3.839	108,5	0,116	-2,423	0-30	0,028	-2,301	0,627
SG8890	mucin TcMUCII	Tc00.1047053508871.140	mucin TcMUCII, putative	2.455	0.502	31,2	0,076	-0,68	0-30	0,069	-0,957	1,031
SG8918	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053511509.10	hypothetical protein, conserved	2.212	2.745	7,3	0,267	-1,472	0-45	0,232	-2,023	0,663

Genes identificados por microarranjo sem dados de decaimento

Supergene	Gene ID	Descrição	FC	FDR
SG0324	Tc00.1047053504669.40	mucin-associated surface protein(MASP, pseudogene), putative	2.117	2.242
SG0658	Tc00.1047053510879.10	serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit, putative	2.087	2.745
SG1245	Tc00.1047053508939.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.425	1.007
SG1531	Tc00.1047053510933.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.853	0.000
SG6766	Tc00.1047053511173.24	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.214	2.494
SG7414	Tc00.1047053510377.100	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.567	0.502
SG8494	Tc00.1047053510715.120	mucin TcMUCII, putative	2.577	0.000
SG8621	Tc00.1047053510487.79	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.193	1.655
SG8648	Tc00.1047053507071.310	mucin-associated surface protein (MASP), putative	3.088	0.000
SG8975	Tc00.1047053506309.34	mucin TcMUCII, putative	2.957	0.000
SG9040	Tc00.1047053416605.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.484	0.768
SG9043	Tc00.1047053508475.40	hypothetical protein	2.036	6.745
SG9046	Tc00.1047053506131.20	mucin TcMUCII, putative	3.594	0.000
SG9062	Tc00.1047053507295.30	mucin TcMUCII, putative	3.192	0.000
SG9066	Tc00.1047053504031.30	mucin-associated surface protein (MASP), putative	2.251	1.655
SG9071	Tc00.1047053509615.50	hypothetical protein	2.861	0.000
N/A	Tc00.1047053506995.30	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [4359 - 3997]	2.371	1.007
N/A	Tc00.1047053508159.20	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [3395 - 3931]	2.204	2.071
N/A	Tc00.1047053506955.230	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [39957 - 40265]	2.278	1.316
N/A	Tc00.1047053508097.70	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [10653 - 11855]	2.273	1.007
N/A	Tc00.1047053505919.50	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [14399 - 14728]	2.074	2.745

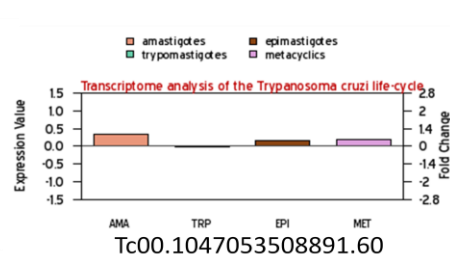
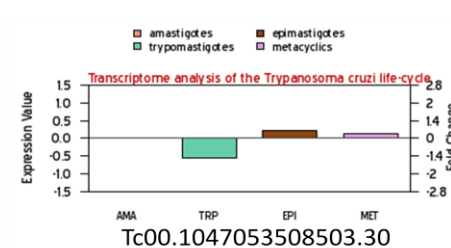
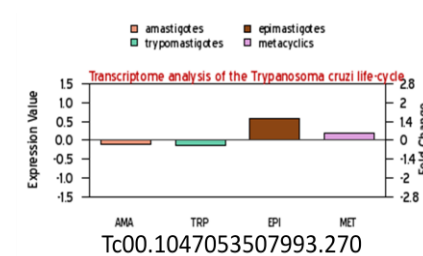
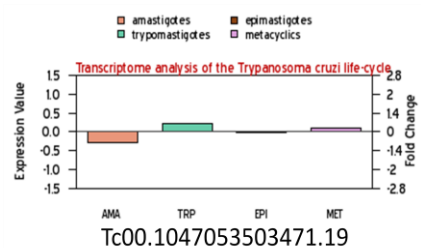
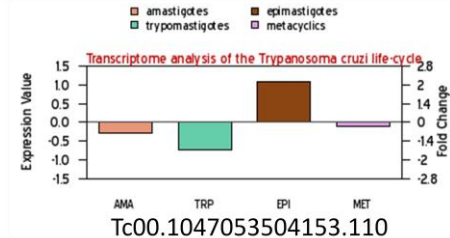
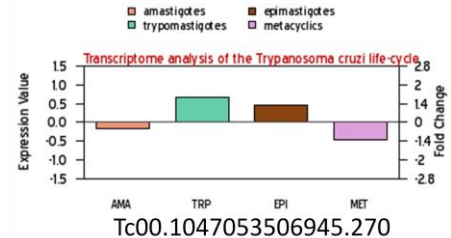
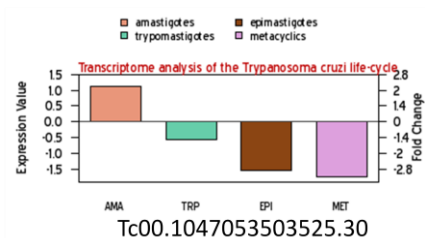
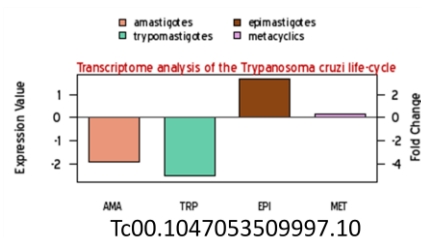
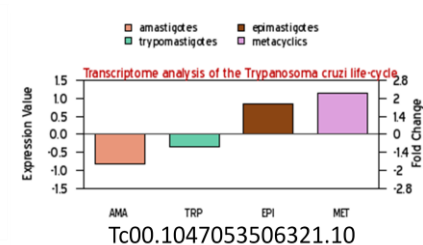
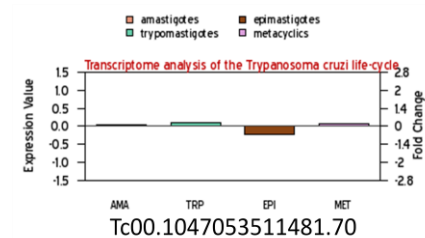
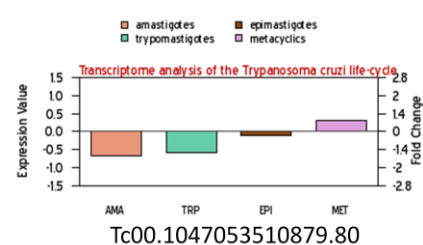
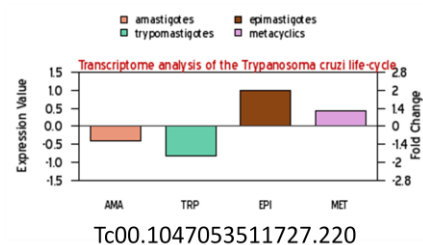
N/A	Tc00.1047053506703.130	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [21021 - 21392]	2.024	3.032
N/A	Tc00.1047053509979.370	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [89178 - 88801]	2.030	3.538
N/A	Tc00.1047053504081.60	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [18430 - 19026]	2.764	0.000
N/A	Tc00.1047053510979.20	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [3528 - 3133]	3.190	0.000
N/A	Tc00.1047053503783.30	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [2091 - 1789]	2.338	1.007
N/A	Tc00.1047053509369.59	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein, to be annotated (newly added gene) [19687 - 19217]	2.245	2.071
N/A	Tc00.1047053509549.80	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein [20906 - 21826]	2.071	2.745
N/A	Tc00.1047053511645.20	in v.3, removed from v.4 of genome; hypothetical protein, conserved [2642 - 3394]	2.049	2.494

APÊNDICE H

Quadro mostrando em ênfase os 15 genes mais instáveis e os 15 mais estáveis.

SG	ID (De um gene correspondente a cada SG)	Descrição do Supergene	t½
Mais Estáveis			
SG7787	Tc00.1047053511727.220	hypothetical protein, conserved	119,0
SG3182	Tc00.1047053510879.80	serine acetyltransferase, putative	128,4
SG2930	Tc00.1047053511481.70	RNA-binding protein 5, putative	154,3
SG6697	Tc00.1047053506321.10	mucin TcMUCII, putative	165,3
SG8839	Tc00.1047053509997.10	hypothetical protein, conserved	170,1
SG5524	Tc00.1047053503525.30	hypothetical protein, conserved	175,8
SG7000	Tc00.1047053506945.270	cyclin, putative	221,5
SG7596	Tc00.1047053504153.110	hypothetical protein, conserved	592,2
SG0230	Tc00.1047053506789.334	hypothetical protein, conserved	4824,0
SG5368	Tc00.1047053503893.100	hypothetical protein, conserved	∞*
SG6476	Tc00.1047053508863.20	hypothetical protein, conserved	∞*
SG0182	Tc00.1047053503471.19	expression site-associated gene(ESAG-like) protein, putative	∞*
SG3860	Tc00.1047053507993.270	hypothetical protein, conserved	∞*
SG1419	Tc00.1047053508503.30	hypothetical protein	∞*
SG4448	Tc00.1047053508891.60	serine/threonine protein phosphatase, putative	∞*
Mais instáveis			
SG0449	Tc00.1047053508313.140	mucin-associated surface protein (MASP), putative	32,6
SG8184	Tc00.1047053508677.60	hypothetical protein	32,9
SG7772	Tc00.1047053511861.120	hypothetical protein	33,2
SG8078	Tc00.1047053507951.290	hypothetical protein, conserved	34,3
SG0387	Tc00.1047053504239.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	34,3
SG0479	Tc00.1047053511607.40	mucin-associated surface protein (MASP), putative	34,6
SG4807	Tc00.1047053511507.24	hypothetical protein, conserved	34,9
SG2580	Tc00.1047053511071.90	hypothetical protein	35,0
SG8374	Tc00.1047053511255.299	mucin TcMUCII, putative	35,0
SG0130	Tc00.1047053508119.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	35,1
SG7333	Tc00.1047053510279.60	mucin-associated surface protein (MASP), putative	35,1
SG8632	Tc00.1047053511277.370	phosphatidic acid phosphatase, putative	35,2
SG7771	Tc00.1047053508139.120	hypothetical protein	35,3
SG0163	Tc00.1047053507063.340	mucin-associated surface protein (MASP), putative	35,6
SG7085	Tc00.1047053506625.130	hypothetical protein, conserved	35,9
* Tempos de meia vida negativos estão substituídos pelo valor ∞, por serem muito grandes; As listas estão organizadas em ordem crescente de valores de tempo de meia-vida; Em negrito estão os genes que tiveram seu padrão de expressão mostrados nas figuras a seguir.			

Padrão de expressão de alguns genes **ESTÁVEIS** que interagem com *TcDHH1* e os padrões de expressão estão especificados como de epimastigotes (epi), tripomastigotas metacíclicos (met), amastigotas (ama) e tripomastigotas sanguíneos (trp). FONTE: Plataforma de dados do Tritrydb (www.tritrypdb.org).



Padrão de expressão de alguns genes **INSTÁVEIS** que interagem com *TcDHH1*, os padrões de expressão de tripomastigotas metacíclicos (met), amastigotas (ama) e tripomastigotas sanguíneos (trp) estão com valores relativos à expressão de epimastigotas. FONTE: Plataforma de dados do ICC (www.omics.icc.fiocruz.br).

