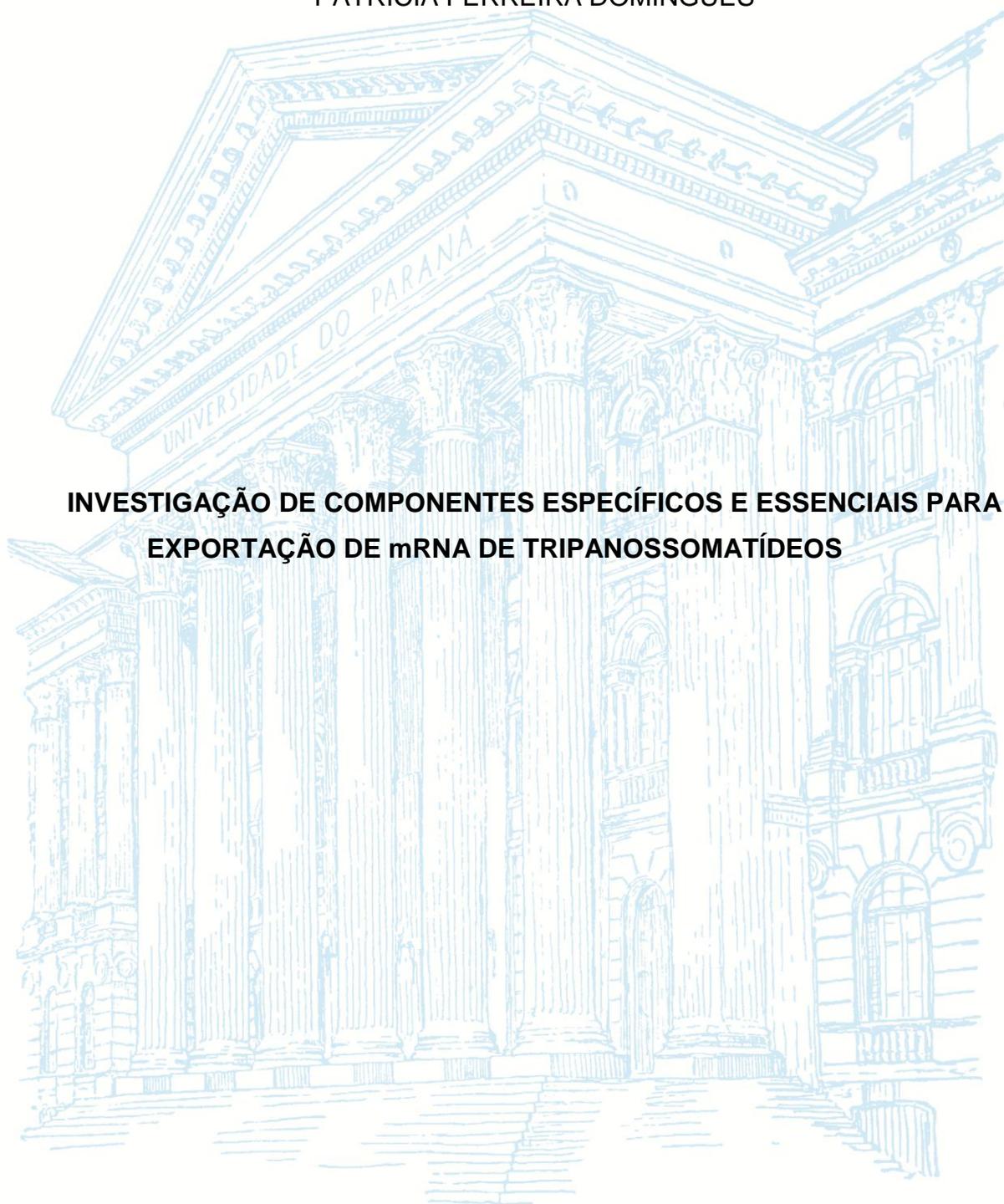


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

PATRICIA FERREIRA DOMINGUES



**INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES ESPECÍFICOS E ESSENCIAIS PARA
EXPORTAÇÃO DE mRNA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS**

CURITIBA

2017

PATRICIA FERREIRA DOMINGUES

**INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES ESPECÍFICOS E ESSENCIAIS PARA
EXPORTAÇÃO DE mRNA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Área Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Dr. Alexandre Haruo Inoue

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Domingues, Patricia Ferreira
Investigação de componentes específicos e essenciais para exportação
de mRNA de tripanossomatídeos. / Patricia Ferreira Domingues. –
Curitiba, 2017.
165 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Andréa Rodrigues Ávila
Coorientador: Alexandre Haruo Inoue

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Tripanossoma cruzi 2. RNA mensageiro 3. Transporte ativo do
núcleo celular I. Título II. Ávila, Andréa Rodrigues III. Inoue, Alexandre
Haruo IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.873283

TERMO DE APROVAÇÃO

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



ATA DA 411ª SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos vinte e três dias do mês de Fevereiro de dois mil e dezessete, às 14h00min, no Anfiteatro C3 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Drs. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza (Instituto Carlos Chagas), Sheila Cristina Nardelli (Instituto Carlos Chagas), e Andréa Rodrigues Ávila (Instituto Carlos Chagas, como orientadora e presidente da Banca Examinadora), com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Patricia Ferreira Domingues**, intitulada: "Investigação de componentes específicos e essenciais para exportação de mRNA de tripanossomatídeos", para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro da sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela orientadora, Dra. Andrea Rodrigues Ávila. Após analisar a dissertação e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "Aprovação", habilitando-a ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A emissão 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.

Examinador/Afiliação

Parecer

Assinatura

Profa. Dra. Andréa Rodrigues Ávila
Orientadora e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas

Aprovada Andréa R. Ávila

Profa. Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza
Instituto Carlos Chagas

Aprovada Tatiana de Arruda Campos

Profa. Dra. Sheila Cristina Nardelli
Instituto Carlos Chagas - ICC

APROVADA Sheila Nardelli

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

A todos que vibram com sentimento verdadeiro pela conquista deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu a oportunidade da vida e me sustentou em todos os momentos.

Nossas vidas se tornam melhores quando encontramos pessoas que são capazes de nos inspirar e capazes principalmente de compartilhar conosco o conhecimento de forma simples e humano, sempre tive a honra e o privilégio de encontrar pessoas que foram capazes de conquistar meu respeito e inspirar a minha admiração, pessoas que fazem parte da minha história e as quais aqui, deixo meu agradecimento

À Dra. Andréa Rodrigues Ávila pela orientação e amizade, pelos ensinamentos e confiança, pelo apoio e motivação e até mesmo as sessões de autoajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Alexandre Haruo Inoue pela orientação e amizade, pelos ensinamentos, e paciência (e quanta paciência!), pelas discussões científicas, pela motivação, por compartilhar comigo sua paixão pela ciência, por sua abnegação, por ouvir durante dois longos anos: MAS HARUO! E por aceitar continuar ouvindo por mais quatro.

Ao Dr. Edvaldo Trindade pelo incentivo, apoio, confiança e indicação para trabalhar juntamente com a Dra. Andréa Ávila no Instituto Carlos Chagas.

À Juliana Aggio pela amizade e companheirismo durante esses anos, pelas palavras de incentivo e apoio e por compartilhar comigo todas as emoções experimentadas ao se ingressar na vida acadêmica, fazendo com que mesmo os dias difíceis fossem fáceis, com certeza uma amizade que quero levar para o resto de minha vida.

À Larissa Lalli pela amizade e alegria contagiante que sem sombra de dúvidas tornou os meus dias mais leves.

À Priscila Mazzochi Hiraiwa pela amizade e todo auxílio nas análises de Citometria de Fluxo.

Ao Dr. Newton Vidal pela disponibilidade e auxílio nas análises de bioinformática e filogenia.

À Dra. Rosiane Valeriano pela amizade e auxílio na arte da manipulação animal.

À Jimena Ferreira pela amizade, pelas discussões científicas e por me acompanhar nas jornadas ICC-UFPR.

Aos amigos e colegas do “Lab Reg”, Sayuri, Camaila, Vanessa, Mari, Carol, Ize, Bruno, Bruno H, Helisa, Hálisson, Ana, Beatriz, pelo apoio e colaboração e por tornarem meus dias mais felizes.

Aos pesquisadores do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica do Instituto Carlos Chagas pela disponibilidade e acessibilidade.

A todos do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Chagas, principalmente à Beatriz Borges e a Yohana Friedrich pela disponibilidade, bom humor e competência com qual processaram todo material para microscopia eletrônica de transmissão

À Bruna Marcon pelo auxílio com a microscopia confocal.

A todos do preparo de materiais por proporcionar a organização ideal, facilitando a realização deste trabalho.

A todos dos programas de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná e do Instituto Carlos Chagas pelo apoio e por tornarem minha jornada mais fácil.

Aos meus pais, Oscar e Tereza, aos irmãos Luciano e Daniele, e aos meus sobrinhos Oscar Luiz e Camila, pelo amor, carinho e pelas palavras de incentivo, por se sentirem orgulhosos e por serem minha estrutura. Para mim é uma honra fazer parte dessa família!

Ao meu amado esposo Roger, pelo amor e compreensão, pelo incentivo e cuidado, por sempre acreditar que eu conseguiria mesmo quando eu mesma não acreditava, e principalmente por tentar entender a via de exportação de RNA mensageiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Sir Isaac Newton

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o protozoário causador da doença de Chagas, uma endemia da América Latina que afeta milhões de pessoas. Este parasita tem um ciclo de vida alternado entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, e necessita se adaptar a mudanças em diferentes ambientes que encontra ao longo do ciclo de transmissão. O *T. cruzi* controla a expressão de genes a partir de eventos majoritariamente pós-transcricionais. Vias que controlam a estabilidade do mRNA ou a tradução de proteínas são bem conhecidas, enquanto que mecanismos moleculares de exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma ainda não são bem compreendidos nem em tripanossomatídeos, nem em outros patógenos. Sabe-se, até o momento, que a maioria das proteínas envolvidas com o transporte de mRNA em outros eucariotos não está conservada em diversas espécies de parasitas. Exceto pela proteína Sub2 de *T. cruzi* (TcSub2), homóloga das proteínas de mamífero e levedura (UAP56/Sub2) e essencial para exportação de mRNA em tripanossomatídeos. Logo, para investigar os componentes desta via, nosso grupo tem investido em identificar proteínas exclusivas e essenciais para a exportação de mRNA em *T. cruzi*. Abordagens de proteômica, usando como alvo TcSub2, vem permitindo a identificação de fatores com função ainda desconhecida e/ou que são conservados apenas entre espécies de tripanossomatídeos, tornando-os alvos de interesse. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação de proteínas alvo com TcSub2 e seu papel na exportação de mRNA em *T. cruzi*. Duas proteínas não caracterizadas apresentaram motivos conservados e foram denominadas como TcFOP-like e TcAPI5-like. Interessantemente, estes motivos estão presentes em proteínas de outros organismos que estão envolvidas com a via de exportação de mRNA. Aqui, nós confirmamos que TcFOP-like e TcAPI5-like são proteínas nucleares e parecem interagir com TcSub2. Além disso, silenciamento e supereexpressão de TcFOP-like afeta o crescimento do parasita, e nós confirmamos sua interação com outros componentes da via de exportação de mRNA, tais como TcMex67 e TcHel45. Estas evidências suportam presença de componentes divergentes na via de exportação de mRNA em Tripanossomatídeos.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Exportação de mRNA. TcSub2.TcHel45.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the protozoan causative of Chagas disease, an endemic disease in Latin America that affects millions of people. This parasite alternates between vertebrate and invertebrate hosts during his life cycle, and needs to adapt to the changes in different environments along the transmission cycle. *T. cruzi* controls the gene expression mostly by post-transcriptional events. Pathways that control mRNA stability or protein translation are well known, while the molecular mechanisms for mRNA export from nucleus to cytoplasm are still not well understood neither in trypanosomatids or other pathogens. So far, it's known that the most of the proteins that are involved in mRNA transport of other eukaryotes are not conserved in many species of parasites. One exception is *T. cruzi* Sub2 (TcSub2), a homologue of the proteins in mammalian and yeast (UAP56 / Sub2) and essential for mRNA export in tripanossomatids. Therefore, to investigate the components of this pathway, our group has invested in identifying unique and essential proteins for the export of mRNA in *T. cruzi*. Proteomic approaches, using TcSub2 as target, have allowed identification of factors with the unknown function and/or that are conserved only in species of trypanosomatids, turning into interesting targets. Then, the aim of this work was to evaluate the interaction of target proteins with TcSub2 and their role in the mRNA export pathway in *T. cruzi*. Two uncharacterized proteins presented conserved motifs and were named here as TcFOP-Like and TcAPI5-like. Interestingly, those motifs are present in proteins of other organisms which are involved in mRNA export pathway. Here, we confirmed that TcFOP-like and TcAPI5-like are nuclear proteins and seems to interact with TcSub2. Furthermore, knockdown and overexpression of TcFOP-like affect the growth of parasites and we confirmed its interaction with other components of the mRNA export pathway, such as TcMex67 and TcHel45. Those evidences supporte the presence of divergent components in the mRNA export pathway of Tripanossomatids.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Export of mRNA. TcSub2. TcHel45.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO EVOLUTIVO DO TRYPANOSOMA CRUZI.	22
FIGURA 2. MECANISMO DE CIS-SPLICING E TRANS-SPLICING.	23
FIGURA 3. ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANS DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS.....	25
FIGURA 4. ESTRUTURA BÁSICA DO COMPLEXO DE PORO NUCLEAR.....	26
FIGURA 5. TRANSPORTE VIA COMPLEXO DE PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP.	28
FIGURA 6. DIFERENTES VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs EM LEVEDURAS	29
FIGURA 7. VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS E METAZOÁRIOS.	31
FIGURA 8. MODELO REPRESENTATIVO DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DE NXF1/MEX67, INDUZIDA POR TREX PARA A EXPORTAÇÃO DE mRNA.	34
FIGURA 9. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like	49
FIGURA 10. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like Δ FOP	50
FIGURA 11. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like Δ UBM.....	51
FIGURA 12. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcAPI5-like.	54
FIGURA 13. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A RECOMBINAÇÃO ENTRE OS SÍTIOS ATTB E ATTP PARA OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA.....	57
FIGURA 14. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A RECOMBINAÇÃO ENTRE OS SÍTIOS ATTL E ATTR, PARA A OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO.	57
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PLATAFORMA GATEWAY® DEMONSTRANDO AS DUAS DIVERSAS APLICABILIDADES A PARTIR DE UM CLONE DE ENTRADA.....	58
FIGURA 16. MAPA DO VETOR DE ENTRADA PDONR™221 (INVITROGEN).	59
FIGURA 17. MAPA DO VETOR pDEST™17 (INVITROGEN) DE EXPRESSÃO DE GENES EM BACTÉRIAS T7.	63
FIGURA 18. DESENHO ESQUEMÁTICO QUE MOSTRA OS PASSOS DA CONSTRUÇÃO DO VETOR PTcGWGFPN.....	69
FIGURA 19. MAPA DO VETOR PTcPTPN.	69
FIGURA 20. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbFOP-like.	74

FIGURA 21. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbAPI5-like.....	75
FIGURA 22. MAPA DO VETOR PGEM® – TEASY.....	78
FIGURA 23. MAPA DO VETOR p2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi.....	82
FIGURA 24. MAPA DO VETOR p2T7-177/LacZ UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi.....	88
FIGURA 25. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS UTILIZANDO A PROTEÍNA Tc00.1047053509033.80 COMO SEMENTE DE BUSCA.....	88
FIGURA 26. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS UTILIZANDO A PROTEÍNA TC00.1047053511807.280 COMO SEMENTE DE BUSCA.....	89
FIGURA 27. DOMÍNIO FUNCIONAL DA PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO FOP DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
FIGURA 28. CONSTITUIÇÃO DO DOMÍNIO FOP EM HUMANOS.....	90
FIGURA 29. ALINHAMENTO DA REGIÃO C-TERMINAL ENTRE PROTEÍNAS QUE CONTEM DOMÍNIO FOP.....	91
FIGURA 30. ESQUEMA DE COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS Tc00.1047053509033.80 E FOP DE HUMANOS (HsCHTOP).....	92
FIGURA 31. ALINHAMENTO ENTRE TcAPI5-like E API5 DE HUMANOS.....	93
FIGURA 32. DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE TcAPI5-LIKE DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	94
FIGURA 33. MODELO 3D DE TcAPI5-like.....	96
FIGURA 34. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE TcFOP-like E TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like.....	97
FIGURA 35. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE INSERTOS TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like CLONADOS EM VETOR pDONR™221 (INVITROGEN).....	98
FIGURA 36. CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DO DOMÍNIO FOP DE TcFOP-LIKE.....	99
FIGURA 37. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA SELEÇÃO DE CLONES DE TcFOP-like E TcAPI5-like EM VETOR pDEST™17.....	100
FIGURA 38. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15 % (A) E ANÁLISE POR WESTERN BLOT (B) DA INDUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcAPI5-like.....	101
FIGURA 39. ANÁLISE POR WESTERN BLOT PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO PRÉ-IMUNE DE CAMUNDONGOS, USADOS PARA PRODUÇÃO DE ANTI-FOP-like, EM EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>T. cruzi</i>	102
FIGURA 40. ANÁLISE POR WESTERN BLOT PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO DE CAMUNDONGO ANTI-API5-like EM EXTRATOS PROTEICOS DE <i>T. cruzi</i>	103
FIGURA 41. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15 % (A) E ANÁLISE POR WESTERN BLOT (B) DE INDUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcFOP-like.....	104

FIGURA 42. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 13% DE ENRIQUECIMENTO PROTEICO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcFOP-like.....	105
FIGURA 43. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO PRÉ-IMUNE DE CAMUNDONGOS, USADOS PARA PRODUÇÃO DE ANTI-FOP-like, EM EXTRATOS PROTEICOS DE <i>T. cruzi</i>	106
FIGURA 44. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO DE CAMUNDONGO ANTI-FOP-like EM EXTRATOS PROTEICOS DE <i>T. cruzi</i>	107
FIGURA 45. LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DAS PROTEÍNAS TcFOP-like (A) E TcAPI5-like (B) EM <i>T. cruzi</i> POR IMUNOFLUORESCÊNCIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA.....	109
FIGURA 46. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE GERADOS PELAS ANÁLISES DE PCR COLÔNIA.....	110
FIGURA 47. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like FUSIONADA À GFP E PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL.....	111
FIGURA 48. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like Δ FOP FUSIONADA À GFP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL.....	111
FIGURA 49. ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> DOS TRANSFECTANTES TcAPI5-LIKE FUSIONADOS À GFP E PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL.....	113
FIGURA 50. ANÁLISE NUCLEAR DE COLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcAPI5-like E TcFOP-like COM TcSUB2 ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL EM <i>T. cruzi</i>	115
FIGURA 51. IMUNOCITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DE TcFOP-like EM <i>T. cruzi</i>	116
FIGURA 52. IMUNOCITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DE TcAPI5-like EM <i>T. cruzi</i>	117
FIGURA 53. ENSAIO DE CICLO CELULAR.....	120
FIGURA 54. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcSUB2.....	123
FIGURA 55. IMUNOPRECIPITAÇÕES DE TcMex67 E TcHel45.....	124
FIGURA 56. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 1 E 2.....	126
FIGURA 57. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5 like COM OS TAMPÕES 2 E 3.....	127
FIGURA 58. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like , TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM OS TAMPÕES 3.....	127
FIGURA 59. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 4 UTILIZADO PARA LISE POR DETERGENTE.....	129

FIGURA 60. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 5 UTILIZADO PARA LISE POR DETERGENTE.....	130
FIGURA 61. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcAPI5-like	132
FIGURA 62. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcFOP-like E TcFOP-like Δ FOP	132
FIGURA 63. ALINHAMENTO ENTRE TcFOP-like E TbFOP-like.....	134
FIGURA 64. TOOTHPICK E DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM P2T7-177/LACZ-FOP	135
FIGURA 65. ALINHAMENTO ENTRE TcAPI5-like E TbAPI5-like.....	138
FIGURA 66. <i>TOOTHPICK</i> E PCR DA MINIPREP PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE p2T7-177/LacZ-API5	139
FIGURA 67. CONSTRUÇÃO DA DELEÇÃO DE TcFOP-like Δ UBM.....	159
FIGURA 68. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR E PCR DE COLÔNIA DE TcFOP-like Δ UBM PARA CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM EM VETOR pDONR 221	160
FIGURA 69. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA DE TcFOP-like Δ UBM PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM EM VETOR pTcGWGFPN E pTcPTPN	161
FIGURA 70. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP COM O TAMPÃO 1	163
FIGURA 71. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP COM O TAMPÃO 2 E 3.....	164
FIGURA 72. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP COM O TAMPÃO 4 E 5.....	165

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CURVA DE CRESCIMENTO DO TRANSFECTANTE DE <i>T. cruzi</i> pTcGWGFP-FOP-like.	118
GRÁFICO 2. CURVA DE CRESCIMENTO DE TRANSFECTANTES DE <i>T. brucei</i> p2T7-177/LacZ-TbFOP-like #6 p2T7-177/LacZ- TbFOP-like #7 APÓS A INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO DO GENE TbFOP-like POR TETRACICLINA.....	136
GRÁFICO 3. CURVA DE CRESCIMENTO TIPO “SERROTE” DO TRANSFECTANTE DE <i>T. brucei</i> p2T7-177/LacZ-TbFOP-like #6 APÓS A INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO DO GENE TbFOP-like POR TETRACICLINA.....	137

LISTA TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO COMPLEXO TREX	32
TABELA 2. SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE	47
TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR TM 221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcFOP-like, TcFOP-like ΔFOP E TcFOP-likeΔUBM	52
TABELA 4. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR TM 221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcAPI5-like	56
TABELA 5. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES DE TbFOP-like, TbAPI5 -like	77
TABELA 6. PORCENTAGEM DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR	121
TABELA 7. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 1, 2 E 3 UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like E TcAPI5-like FUSIONADOS À GFP.....	125
TABELA 8. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 4 E 5 UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like E TcAPI5-like POR LISE POR DETERGENTE	129
TABELA 9. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO 6 UTILIZADO PARA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like POR LISE POR DETERGENTE	131
TABELA 10 COMPOSIÇÃO DOS DIFERENTES TAMPÕES UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PROTEICOS DE TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP PARA SUSPENSÃO DO “PÓ DE CÉLULAS”	162

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato

BLASTP- *Basic Local Alignment Search Tool Program*

BSA - Albumina sérica bovina

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol

Dm - *Didelphis marsupialis*

dNTP - Desoxirribonucleotídeo

G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina

GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico

ICC - Instituto Carlos Chagas

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa - kilo-Dalton

LB - Meio Luria-Bertani

LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)

mRNA - RNA mensageiro

mRNP – Complexo ribonucleoprotéico

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PMSF - Fluoreto de fenil metil sulfonil

RBP – Proteínas de ligação a RNA (*RNA binding proteins*)

RNA - Ácido ribonucléico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SL-RNA – RNA *Spliced-Leader*

TAU - Meio Urina artificial de Triatomíneo (*Triatomine Artificial Urine*)

TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA

TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UTR - Região não traduzida (*Untranslated region*)

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius

% - Porcentagem

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa)

g - Aceleração de gravidade

kDa - QuiloDalton

L - litro

M - Molar

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

bp - Pares de bases

pH - Potencial hidrogeniônico

U - Unidade

V-Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	21
1.2	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	22
1.3	COMPLEXO DE PORO NUCLEAR E O TRANSPORTE NUCLEOCITOPLASMÁTICO	25
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.2.1	ANÁLISAR <i>IN SILICO</i> A CONSERVAÇÃO DAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE	39
3.2.2	AVALIAR A LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE	39
3.2.3	ANALISAR O FENÓTIPO CAUSADO PELO SILENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS EM <i>T. BRUCEI</i> POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)	39
3.2.4	ANALISAR A INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM OUTROS COMPONENTES DA VIA DE EXPORTAÇÃO DE MRNA	40
4	MATERIAS E MÉTODOS	41
4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	41
4.2	TAMPÕES E SOLUÇÕES	41
4.3	CULTIVO DE CÉLULAS	42
4.3.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	42
4.3.2	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	43
4.3.3	<i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	43
4.4	MEIOS DE CULTURA	44
4.4.1	MEIO LB (LURIA – BERTANI)	44
4.4.2	MEIO LIT (<i>LIVER INFUSION TRYPTOSE</i>)	44
4.4.3	MEIO SDM-79	45
4.5	ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E PROTEÍNAS	46
4.5.1	ELETROFORESE DE DNA	46
4.5.2	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)	46
4.6	CLONAGEM MOLECULAR DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	48
4.6.1	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	48
4.6.2	AMPLIFICAÇÃO GÊNICA POR PCR	48
4.6.3	CLONAGEM ENTRE INSERTO E PLASMÍDEO	57
4.6.4	TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES	59

4.7	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	62
4.7.1	RECOMBINAÇÃO EM VETOR DE EXPRESSÃO PDEST TM 17 DA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN).....	62
4.7.2	TESTE DE INDUÇÃO COM IPTG DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i>	64
4.7.3	ENRIQUECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE LAVAGENS COM URÉIA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE COLUNA DE NI-NTA E GEL PREPARATIVO	65
4.8	OBTENÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CAMUNDONGOS BALB/c	66
4.8.1	TESTE DO SORO PRÉ-IMUNE.....	66
4.8.2	INOCULAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM ANIMAIS PARA A OBTENÇÃO DE ANTISSORO.....	66
4.9	ENSAIO DE WESTERN BLOT (TOWBIN, STAEHELIN E GORDON, 1992)	67
4.10	OBTENÇÃO DE TRANSFECTANTES	68
4.10.1	TRANSFECCÃO E SELEÇÃO DE PARASITAS	70
4.11	ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO	71
4.11.1	SINGLE CELL SORTING PARA SELEÇÃO DE CLONES.....	71
4.11.2	CICLO CELULAR	71
4.12	MICROSCOPIA ÓTICA	71
4.12.1	IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA	71
4.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	72
4.13.1	PROCESSAMENTO PARA LOWICRYL MONOSTEP/UNICRYL.....	72
4.14	SILENCIAMENTO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi) DE GENES DE <i>T. BRUCEI</i> ORTÓLOGOS AOS GENES IDENTIFICADOS EM <i>T. CRUZI</i>	74
4.14.1	ESCOLHA DOS ALVOS PARA OS ENSAIOS DE RNAI	74
4.14.2	AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS SEQUÊNCIAS ALVO PARA RNAi DE TbFOP-LIKE E TbAPI5-LIKE	76
4.14.3	CLONAGEM EM VETOR PGEM-TEASY (PROMEGA)	78
4.14.4	CLONAGEM EM VETOR P2T7-177 (WICKSTEAD ET AL., 2002).....	79
4.14.5	CLONAGEM EM VETOR P2T7-111/LACZ	81
4.14.6	TRANSFECCÃO DE <i>T. BRUCEI</i> POR ELETROPORAÇÃO E SELEÇÃO DE TRANSFECTANTES.....	82
4.15	IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcfOP-LIKE E TcAPI5-LIKE	84
4.15.1	CONJUGAÇÃO DO NANOBODY ANTI-GFP AS ESFERAS MAGNÉTICAS (CRISTEA ET AL, 2005)	84
4.15.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO POR CRYOGRINDING (OEFFINGER ET AL, 2007; OBADO ET AL 2016 B)	85
4.15.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO POR LISE POR DETERGENTE	85
4.15.4	ISOLAMENTO DOS COMPLEXOS PROTEICOS.....	85

5	RESULTADOS	87
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE	87
5.1.1	ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO.....	87
5.2	TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE SÃO PROTEÍNAS NUCLEARES EM <i>T. CRUZI</i>	94
5.2.1	CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA DA PLATAFORMA GATEWAY	95
5.2.2	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE	98
5.2.3	LOCALIZAÇÃO DE TcAPI5-LIKE E TcFOP-LIKE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	106
5.2.4	EXPRESSÃO DE TcFOP-LIKE, TcFOP-LIKE Δ FOP TcFOP-LIKE Δ UBM E TcAPI5-LIKE FUSIONADAS À GFP E PTP	108
5.3	TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE COLOCALIZAM COM TcSUB2	112
5.4	EFEITOS DA EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcFOP-LIKE FUSIONADA A GFP EM <i>T. CRUZI</i>	117
5.5	ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS DE INTERAÇÃO DE TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE COM COMPONENTES DA VIA DE EXPORTAÇÃO DE MRNA	121
5.5.1	ENSAIOS <i>WESTERN BLOT</i> CONFIRMAM A IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE COM O COMPLEXO DE TcSUB2	122
5.5.2	TcFOP-LIKE INTERAGE COM OUTROS COMPONENTES DA VIA DE EXPORTAÇÃO DE MRNA, COMO O RECEPTOR MEX67 E HEL45	123
5.6	PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-LIKE, TcFOP-LIKEΔFOP E TcAPI5-LIKE	124
5.7	ANÁLISE DO FENÓTIPO CAUSADO PELO SILENCIAMENTO GÊNICO DOS ORTÓLOGOS DE TcFOP-LIKE (TbFOP-LIKE) E TcAPI5-LIKE (TbAPI5-LIKE) EM <i>T. BRUCEI</i>, POR RNA DE INTERFERÊNCIA	133
5.7.1	OBTENÇÃO DA LINHAGEM DE RNAi PARA TbFOP-LIKE (Tb927.6.1470)	133
5.7.2	OBTENÇÃO LINHAGEM DE RNAi PARA TbAPI5-LIKE (Tb927.7.2240)	138
6	DISCUSSÃO	140
7	CONCLUSÕES	149
8	PERSPECTIVAS	150
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
	ANEXO 1 - DELEÇÃO MOTIVO UBM DE TcFOP-LIKE	159
	ANEXO 2 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO COM EXTRATOS PROTEICOS DE PARASITAS EXPRESSANDO TcFOP-LIKE, TcFOP-LIKEΔFOP E TcAPI5-LIKE FUSIONADAS À PTP	162

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Parasitas do grupo dos tripanossomatídeos são de grande importância médica pelo fato de serem espécies causadoras de doenças com impacto na saúde pública de diversos países. Dentre estas espécies estão *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) e *Leishmania spp.*, que causam a doença de Chagas, a doença do sono e as leishmanioses, respectivamente (HUGHES & PIONTKISKA, 2003; MOTTA et al., 2013). A doença de Chagas é considerada uma enfermidade negligenciada e um grave problema de saúde pública. Atualmente, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo a doença endêmica principalmente na América Latina (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Existem diferentes formas de transmissão da doença, dentre as quais se destaca a via vetorial que consiste na transmissão do parasita por meio das excretas do inseto vetor hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LARANJA et al., 1956). *T. cruzi* é um microrganismo heteroxênico com ciclo biológico alternado entre hospedeiros vertebrado (mamíferos) e invertebrado (triatomíneos). De modo geral, seu ciclo de vida é caracterizado morfológica e bioquimicamente por quatro formas distinguíveis: epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos presentes no inseto vetor, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos presentes no hospedeiro mamífero (FIGURA 1). Logo, esta espécie necessita mudar seu repertório de proteínas necessárias ao processo de diferenciação, permitindo sua sobrevivência nos distintos hospedeiros. Para tanto, as vias de regulação da expressão gênica são essenciais, pois definem as alterações no repertório de proteínas e conseqüentemente as alterações necessárias para sua multiplicação no intestino do inseto, assim como para a invasão e o crescimento no interior das células de mamíferos que visam contornar os sistemas de defesa imunológica do hospedeiro (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011).

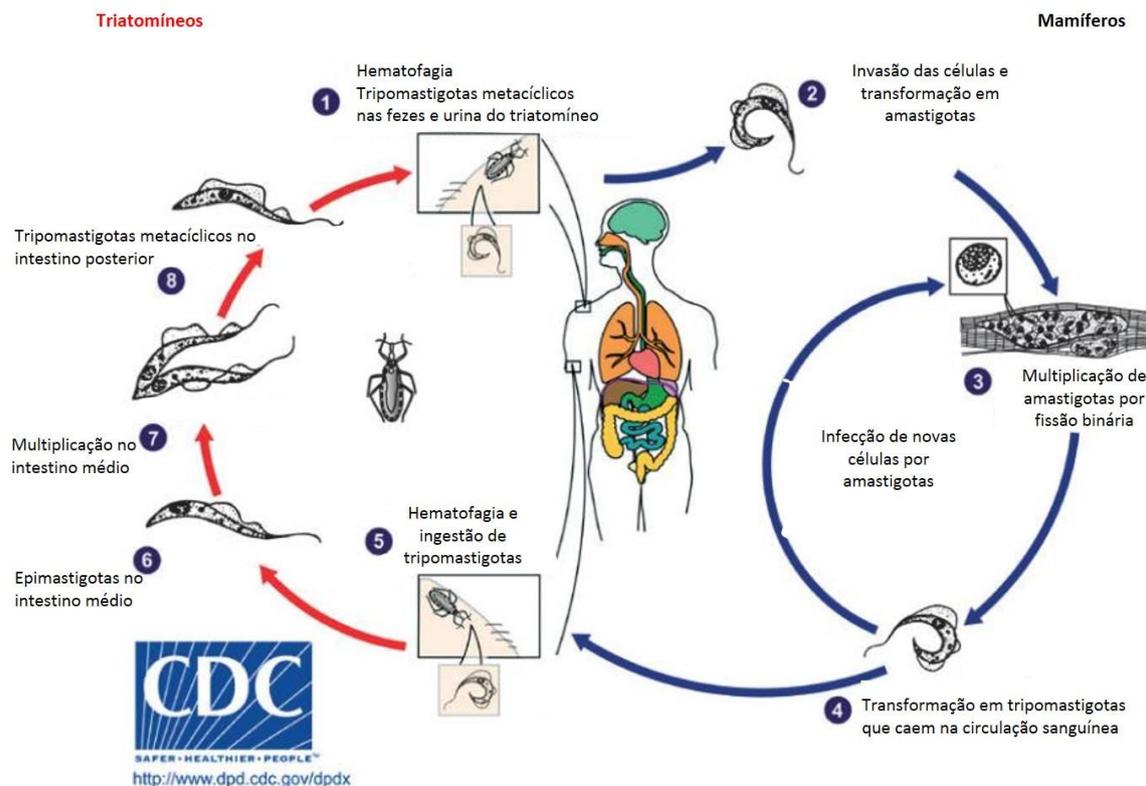


FIGURA 1. CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

1.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Além da relevância clínica, os tripanossomatídeos são caracterizados por seu conjunto único de características moleculares, as quais a maioria dos genes é transcrita pela RNA polimerase II (RNA pol II) gerando longos transcritos policistrônicos de forma recorrente. E embora a transcrição comece em locais definidos, não foram encontrados nesses locais sinais de sequências que definam um promotor eucariótico clássico (ARAÚJO E TEIXEIRA, 2011). Em contraste com o que ocorre em *operons* bacterianos, os genes presentes no mesmo *cistron* não estão funcionalmente relacionados e o RNA mensageiro (mRNA) é processado por *trans-splicing* e poliadenilação (SMIRCICH et al, 2015). Após processamento, o mRNA maduro é transportado através do complexo de poro nuclear (CPN) para tradução no citoplasma.

O *trans-splicing* é o processo que adiciona um mini-éxon ou *Spliced Leader* (SL), uma sequência de 39 nucleotídeos que contém um *cap* hipermetilado conhecido como “cap4” (ZAMUDIO et al., 2009) na extremidade 5’ dos mRNAs.

Como o *cis-splicing*, o *trans-splicing* ocorre via duas reações de transesterificação, mas com a formação de uma estrutura intermediária em “Y” ao invés de em laço (FIGURA 2) (MARTINEZ-CAVILLO et al., 2010).

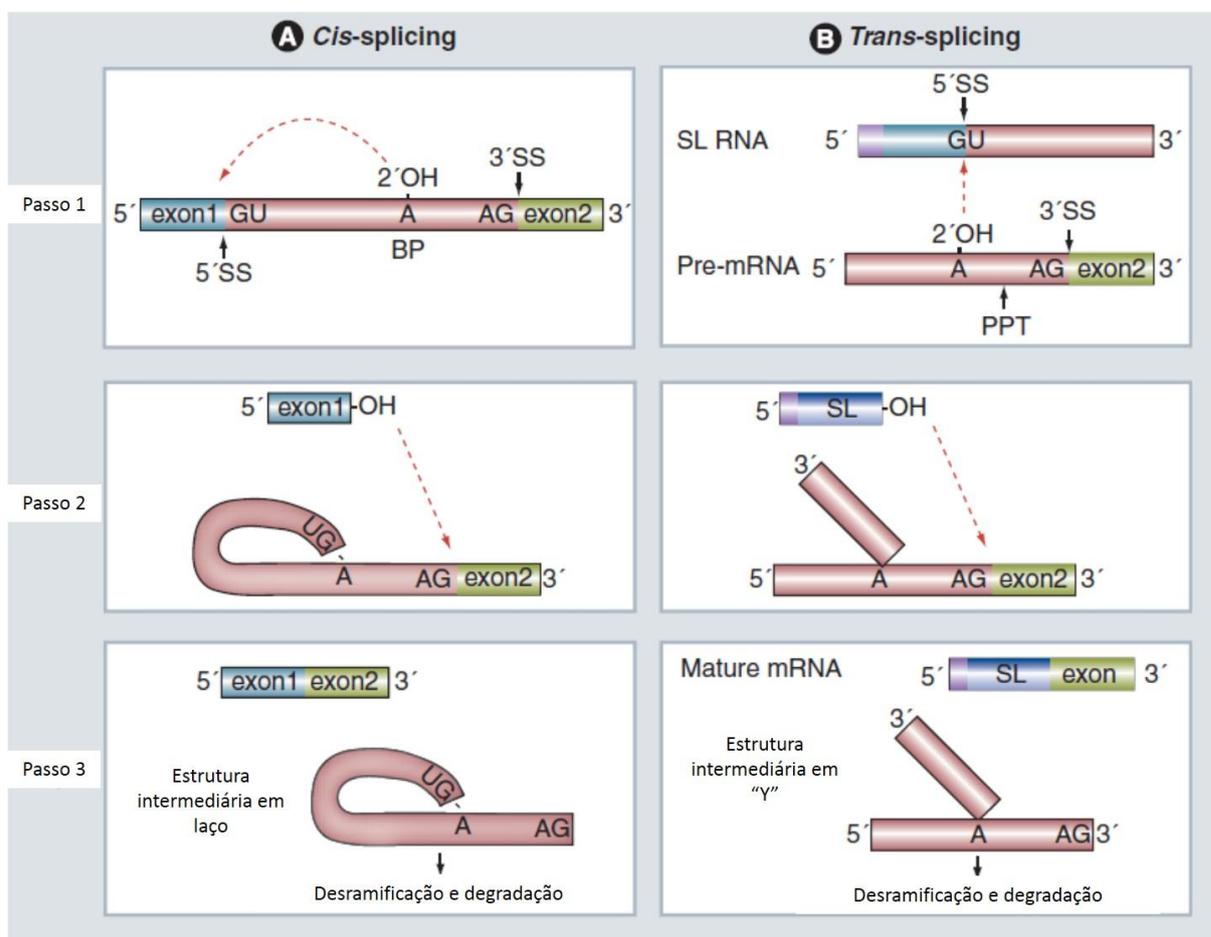


FIGURA 2. MECANISMO DE CIS-SPLICING E TRANS-SPLICING. (A) representa *cis-splicing* e (B) os mecanismos de *trans-splicing*. Os dois passos de transesterificação são apresentados. Locais de *splicing* 5' (GU) e 3' (AG) e as sequências BP são indicados. BP: ponto de ramificação; PPT: sequência de polipirimidina; SL: *Spliced Leader*; SS: Local de *splicing*. Adaptado de MICHAELI, 2011.

Em contrapartida, em outros eucariotos, a RNA polimerase II reconhece e se liga a sequências promotoras consenso dentro do genoma para transcrição individual de cada gene codificador de proteína (ALBERTS et al., 2002), resultando em um transcrito primário ou pré-mRNA, e que apresenta sequências de introns e éxons. Este pré-mRNA é processado pela adição do cap 7-metilguanossina (m7G cap) na extremidade 5' do RNA, remoção de introns por *cis-splicing* e adição da cauda de adenina (poli-A) na extremidade 3', gerando o mRNA maduro (ISKEN & MAQUAT, 2007).

Como conseqüência da transcrição policistrônica e da ausência de promotores típicos da RNA polimerase II, a expressão da maioria dos genes de tripanossomatídeos é regulada a nível pós-transcricional. As sequências reguladoras, conhecidas como elementos *cis-acting*, que estão presentes nas regiões não traduzidas (UTRs - *untranslated region*) de diferentes genes, são elementos chave na modulação dos níveis individuais de mRNA durante o ciclo de vida do parasita (De GAUDENZI et al., 2011). Em eucariotos, de modo geral, os elementos regulatórios pós-transcricionais atuam coordenando e direcionando os mRNAs durante eventos de processamento, exportação para o citoplasma, estabilidade, estocagem e tradução (FIGURA 3). Tanto em tripanossomatídeos quanto em outros eucariotos, estes processos são modulados por elementos *cis-acting* e fatores *trans-acting* (De GAUDENZI et al., 2011)

A maioria desses elementos *cis-acting* é reconhecida por fatores *trans-acting* (FIGURA 3). Dentre fatores *trans-acting*, estão distintas subclasses de RNAs não-codificantes (ncRNA), como microRNAs e siRNAs. ncRNAs foram caracterizadas em *Leishmania* (DUMAS et al., 2006) e análises de genômica comparativa demonstraram que muitos estão conservados entre os genomas de tripanossomatídeos (DONIGER et al., 2010). Entretanto, a maquinaria de RNA de interferência está ausente em *T. cruzi* (DaROCHA et al., 2004; EL-SAYED et al., 2005) indicando que estes elementos podem estar relacionados a outros sistemas de maior complexidade da expressão gênica nesses parasitas (ARAÚJO E TEIXEIRA, 2011). Outros elementos *trans-acting* são representados por proteínas de ligação a RNA (RBP – *RNA-binding proteins*). As RBPs também interagem com outras proteínas, mas associam-se principalmente aos elementos *cis-acting* de RNAs nascentes na transcrição através de específicos domínios (GLISOVIC et al., 2008).

Podemos destacar o papel das RBPs no transporte nucleocitoplasmático de mRNA, onde participam como proteínas adaptadoras para mediar a ligação entre receptor de exportação (NXF1/Mex67) e mRNA (KATAHIRA, 1999)

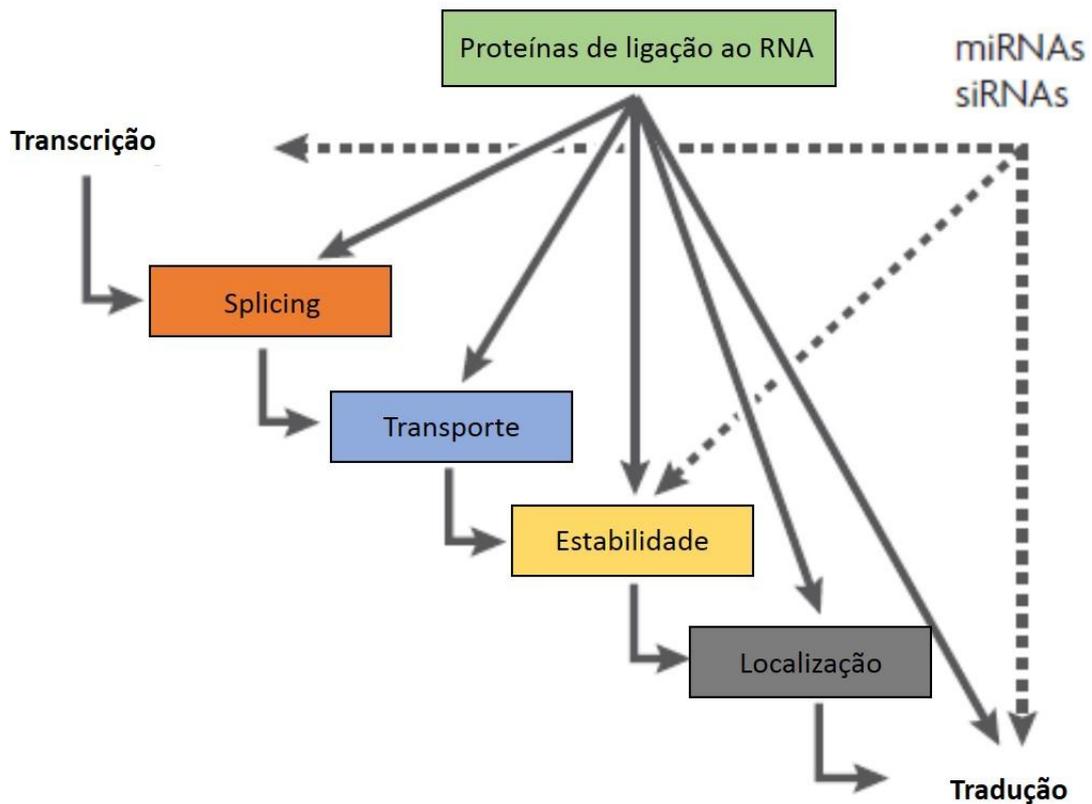


FIGURA 3. ELEMENTOS REGULATÓRIOS TRANS DA EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS. Estão representados os diferentes passos da regulação da expressão gênica (da transcrição à tradução), aos quais os fatores trans, como proteínas de ligação a mRNA (RBPs) e microRNA e siRNA, estão relacionados. Adaptado de KEENE, 2007.

Muitos trabalhos em tripanossomatídeos buscam entender os mecanismos que controlam as alterações na estabilidade do mRNA e a tradução, no entanto, as vias de transporte núcleocitoplasmático de RNA mensageiro ainda são pouco compreendidas em parasitas de modo geral.

1.3 COMPLEXO DE PORO NUCLEAR E O TRANSPORTE NUCLEOCITOPLASMÁTICO

Uma característica primária de células eucarióticas é a separação física da transcrição, que ocorre no núcleo, e da tradução, que ocorre no citoplasma (WICKRAMASINGHE E LASKEY, 2015). A compartimentalização do núcleo e do citoplasma fornecida pelo envoltório nuclear é uma transição evolutiva importante (SMITH, 1995), pois requer o transporte contínuo de moléculas através de estruturas

denominadas de complexo de poro nuclear (CPN) para manutenção da homeostasia celular (WICKRAMASINGHE E LASKEY, 2015).

A estrutura do CPN é altamente organizada e consiste em um canal transportador central composto por anéis internos, externos e *linkers*. Associado a esta estrutura central estão oito filamentos citoplasmáticos assimétricos e oito filamentos nucleares que se intersectam em um anel distal, denominado de cesta nuclear (FIGURA 4) (STRAMBIO-DE-CASTILLIA et al., 2010).

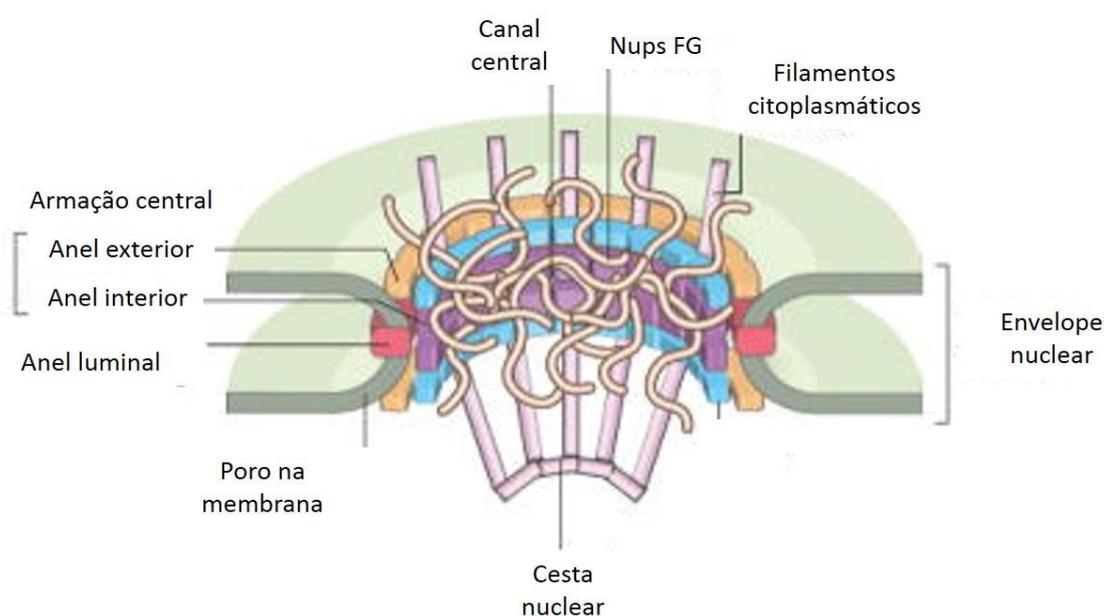


FIGURA 4. ESTRUTURA BÁSICA DO COMPLEXO DE PORO NUCLEAR. Uma representação esquemática do CPN. Principais elementos estruturais são indicados. Adaptado: GRUNWALD, SINGER E ROUT, 2011.

Cada CPN é uma estrutura cilíndrica, com peso molecular de aproximadamente 50 MDa, com simetria octogonal composta por cerca de 500 proteínas, sendo estas várias cópias de 30 diferentes nucleoporinas, também conhecidas como Nups (ROUT et al, 2000; CRONSHAW et al, 2002; ALBER et al, 2007; TAMURA et al, 2012).

Há três classes principais de Nups, sendo as proteínas de membrana de poros (Poms), Nups centrais, e Nups com repetições em tandem de fenilalanina-glicina, ou Nups FG. As Poms contêm domínios transmembrânicos, que servem para ancorar o CPN ao envelope nuclear, enquanto as Nups centrais são os principais componentes estruturais e também interagem com o envelope nuclear e as proteínas de membrana de poros (OBADO et al., 2016). Já as Nups FG emanam

para o interior do canal e formam uma malha hidrofóbica densa que funciona como uma barreira que limita a troca indevida de macromoléculas solúveis entre o núcleo e o citoplasma. Assim, o transporte nucleocitoplasmático de RNAs e proteínas requer receptores específicos de transporte para transpor essa barreira (KATAHIRA, 2015).

Os íons, metabólitos e as proteínas menores que 40 kDa podem se difundir livremente através do CPN entre o núcleo e o citoplasma (FELDHERR & AKIN, 1997; KEMINER, 1999). Cargos maiores requerem sinais de localização nuclear (NSL- *nuclear localisation sequences*) ou sequências de exportação nuclear (NES- *nuclear export signal*) para a interação com os fatores de transporte solúveis (conhecidos como carioferinas), que vão mediar o transporte através das Nups FG. A direcionalidade do transporte é fornecida por um gradiente RanGTP / RanGDP, com RanGTP a forma predominante no núcleo e no citoplasma RanGDP, como demonstrado na figura 5.

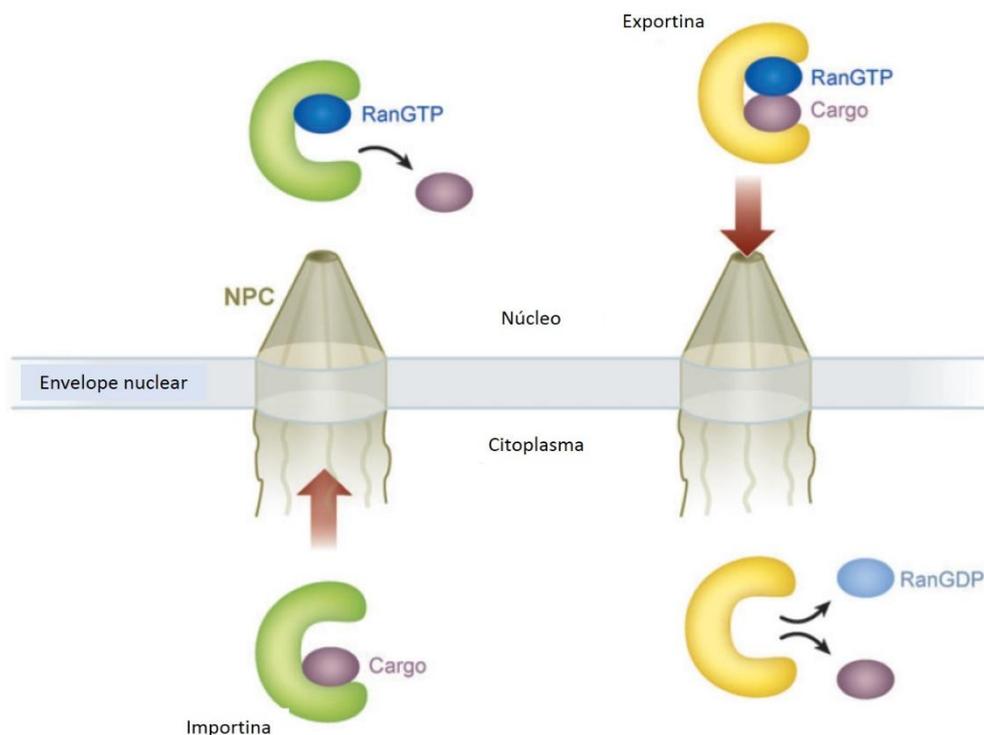


FIGURA 5. TRANSPORTE VIA COMPLEXO DE PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP. Para a importação, cargos contendo um NLS se associam a importinas e são liberados dentro do núcleo com a presença de RanGTP. Para a exportação, exportinas interagem com NES de cargos na presença de RanGTP e quando GTP é hidrolisado, o cargo é liberado no citoplasma. Adaptado: COOK et al, 2007.

O papel do CPN é bem definido na importação e exportação de proteínas e ademais eles também atuam na exportação de RNAs (ULLMAN et al, 1999; FORLER et al. 2004). Os mRNAs são canalizados para uma via de exportação específica e coordenadamente com a montagem do complexo ribonucleoproteico mensageiro (mRNP) (KÖHLER E HURT, 2007). No entanto, em eucariotos de forma geral, a exportação de mRNA é RanGTP-independente, e a direção do transporte é estabelecida por outros mecanismos. Como as carioferinas, os fatores exportadores de mRNA podem interagir fisicamente com Nups do CPN, promovendo o transporte de mRNA para o citoplasma, por superar a barreira de permeabilidade (REED E HURT, 2002; SLUTZ E IZAURRAIDE, 2003; COLE E SCARELLI, 2006). Recentemente, Obado e colaboradores (2016) mostraram, por microscopia eletrônica, que diferentemente de outros eucariotos a localização das Nups em um CPN de tripanossomatídeos é disposta simetricamente entre as faces nuclear e citoplasmática, e identificaram características que sugerem um sistema dependente de RanGTP para a exportação de mRNA em tripanossomas, similar ao transporte mediado por carioferinas, algo que pode pressagiar mecanismos distintos do

transporte de proteínas e mRNA em animais e fungos. De modo geral, a exportação dos outros tipos de RNA envolve exportinas como receptores de transporte, que atuam dependente de RanGTP (FIGURA 6) e o mecanismo de transporte de mRNA é altamente integrado com o processamento, e incluiu um amplo conjunto de adaptadores nucleares de transporte, além de outras proteínas de ligação ao RNA, RNA helicases e proteínas associadas ao CPN (SEGREF et al, 1997; CHAVEZ et al, 2000; STRÄSSER et al 2002).

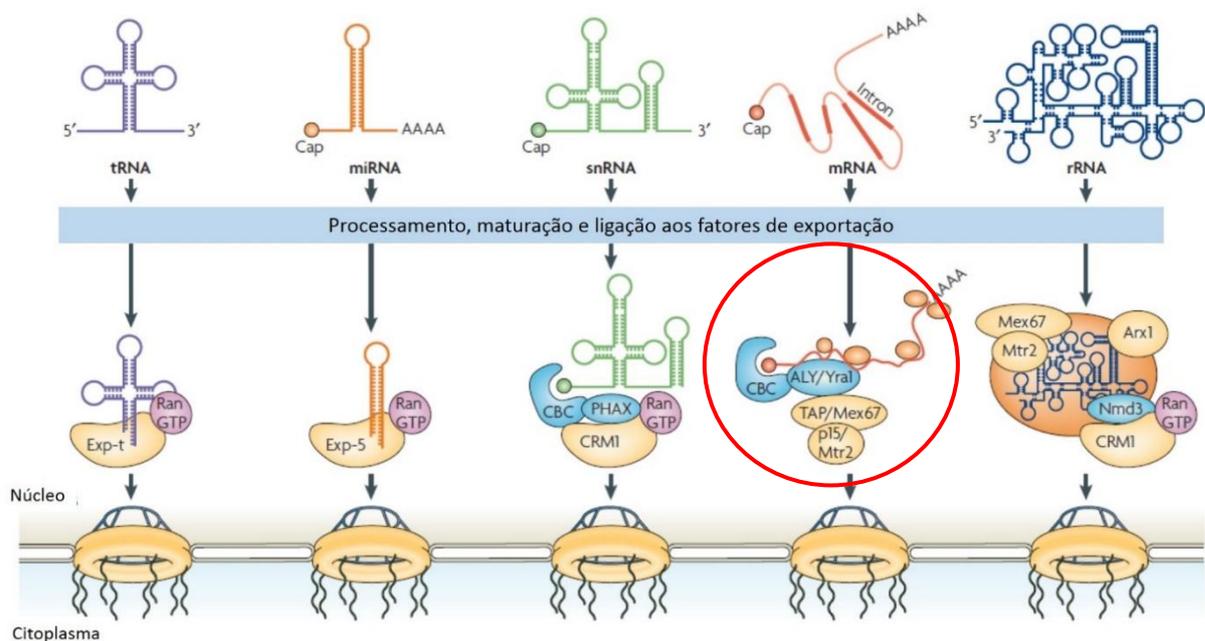


FIGURA 6. DIFERENTES VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs EM LEVEDURAS. As vias majoritárias de transporte estão ilustradas: RNA transportador (tRNA), microRNA (miRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA), RNA mensageiro (mRNA) e RNA Ribossomal (rRNA). Em cada caso, o transcrito primário está ilustrado, bem como a proteína transportadora correspondente após processamento dos respectivos RNAs. Os adaptadores de exportação estão ilustrados em azul e receptores de exportação, em amarelo. No caso de mRNA, os homólogos em humanos e fungos estão indicados, separados por "/". Em humanos são: ALY, TAP e p15. Em fungos: Yra1, Mex67 e Mtr2. CBC, fator de ligação ao CAP; Exp, exportina. A via de mRNA está destacada em vermelho (ADAPTADO DE KÖHLER; HURT, 2007).

Logo após o início da transcrição, um mRNA é revestido com uma variedade de proteínas, formando assim o mRNP. Ao longo da sua jornada nuclear, a composição do mRNP é modificada por vários eventos de remodelamento que acompanham cada estágio de maturação do mRNA (HEATH, VIPHAKONE & WILSON, 2016). Os componentes proteicos de um mRNP variam de fatores que participam do processamento, empacotamento e exportação nuclear. Alguns destes componentes são liberados no núcleo, enquanto outros acompanham o mRNP para

o citoplasma. Assim, a estrutura de um mRNP e a composição das proteínas associadas mudam continuamente (KATAHIRA, 2015).

Em outros eucariotos, como fungos e mamíferos, a via de exportação de mRNA é bem caracterizada (FIGURA 7). Ela envolve o complexo TREX (Complexo de **T**ranscrição/**E**xportação), o qual desempenha um importante papel na biogênese e maturação do mRNP e é conservado através de uma ampla gama de organismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Xenopus* e seres humanos (STRÄSSER et al, 2002, REHWINKEL et al, 2004, YELINA 2010, EL BOUNKARI et al, 2009, MASUDA et al, 2005), o que indica a sua importância fisiológica fundamental. Os componentes de TREX estão funcionalmente ligados a cada passo de processamento de mRNA, e isto é refletido pela sua associação física com complexos de proteínas tais como o complexo de ligação ao Cap 5' (CBC), o complexo de Junção Exon (EJC) e os fatores de processamento na extremidade 3'. Portanto, TREX provavelmente atua como uma interface para esses vários processos para ajudar a manter alta fidelidade do processo de expressão gênica (HEATH, VIPHAKONE & WILSON, 2016), uma vez que desempenha um importante papel na expressão de genes, integrando a informação a partir de eventos de transcrição e processamento do mRNA no núcleo para assegurar a exportação oportuna para o citoplasma (CHANG et al, 2013).

Em leveduras, TREX é recrutado co-transcricionalmente para o mRNP enquanto que em metazoários associa-se com a maquinaria de *splicing* (STRÄSSER E HURT, 2000; MASSUDA et al, 2005)

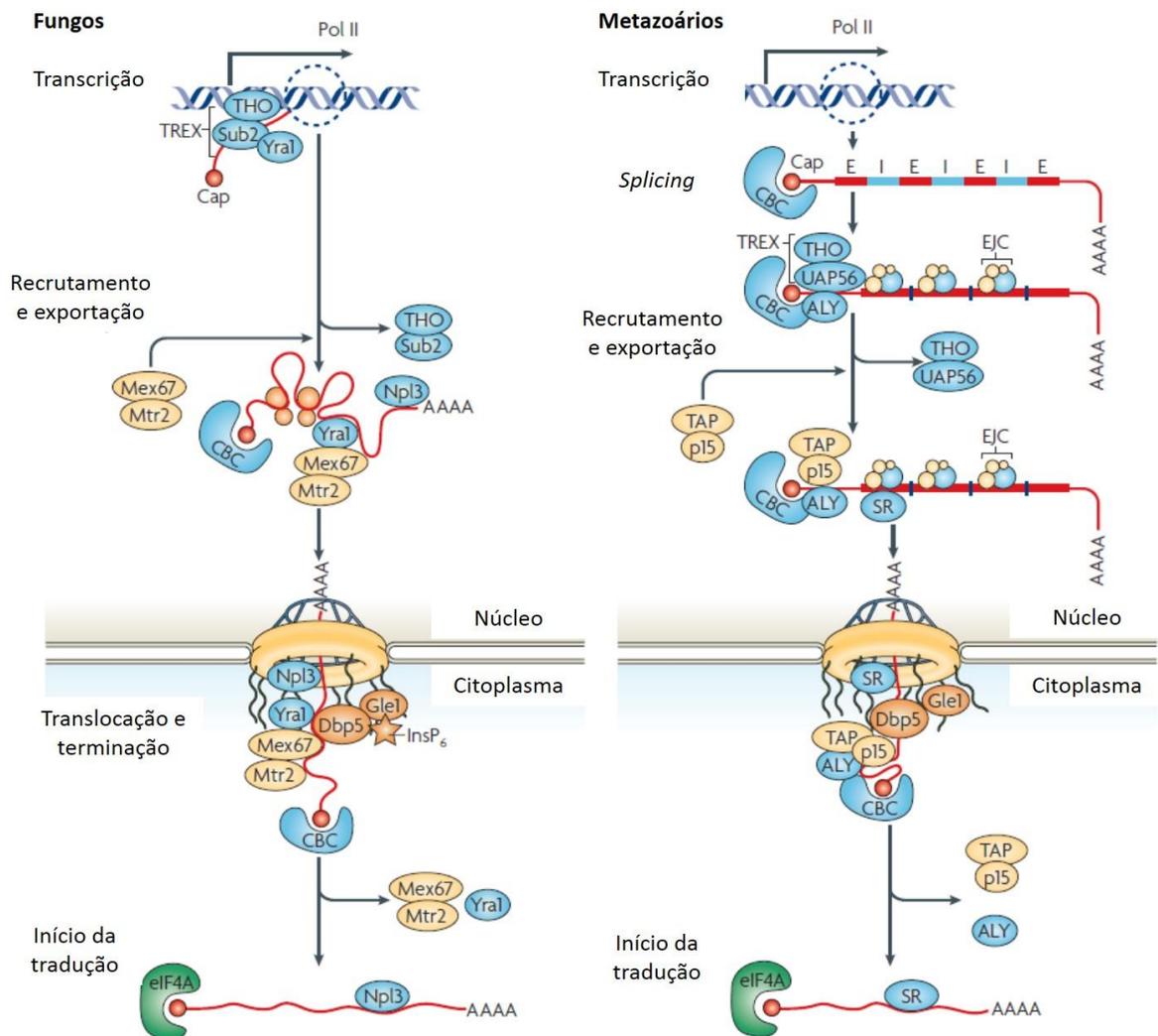


FIGURA 7. VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS E METAZOÁRIOS. Adaptado de KÖHLER E HURT, 2007

TREX consiste de um núcleo formado pelo subcomplexo THO (composto de THOC1, 2, 5-7 e TEX1), que interagem a um conjunto de proteínas adicionais, podendo variar suas combinações e fazer formas alternativas de TREX. A tabela 1 mostra a composição do complexo TREX

Em metazoários, TREX se associa ao complexo THO e a proteínas ALY e UAP56 (Yra1 e Sub2 em levedura) que são responsáveis pelo recrutamento de NXF1 ou TAP (Mex67 em levedura) (JIMENO et al., 2002, ABRUZZI et al., 2004, MASUDA et al., 2005). TAP/Mex67 é o receptor de exportação de mRNA e transloca partículas de mRNP do núcleo para o citoplasma via CPN.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO COMPLEXO TREX

	Nome humano	Nomes alternativos	Função celular	Ortólogo em levedura	kDa	Funcionalidades			
Subunidades de THO	THOC1	hHpr1, p84, p84N5, N5	Regulador de apoptose	Hpr1p	76	Domínio Death, fator de interação Rb			
	THOC2	hRlr1	Proteína <i>core</i> de THO	Tho2p	183	Domínios <i>coiled-coil</i> , regiões ricas em lisina			
	THOC3	Tex1, hTrex45		Rirp	39	Domínios WD40			
	THOC5	fSAP79, Fmip	Coadaptador de exportação	Texp	79	Zíper de leucina, domínio de ligação Fms			
	THOC6	fSAP35, Wdr58			38	Domínios WD40			
	THOC7	fSAP24, Nif3l1bp1			24	Domínios <i>coiled-coil</i> , zíper de leucina			
	Subunidades de TREX	DDX39B	Uap56, Bat1, P47	Fator <i>Splicing</i> , proteína associada ao EJC	Sub2p	49	RNA	helicase	ATP
DDX39A		Ddx39, Urh49	Parálogo Ddx39b, proteína putativa associada ao EJC		49	RNA	helicase	ATP	dependente
ALYREF		Aly, Ref, Bef, Thoc4	Adaptador de exportação, proteína associada ao EJC	Yrap	27	RRM,	ligação	Nxf1,	ligação Ddx39, sequência UBM
UIF		Fytd1	Adaptador de exportação, proteína associada ao EJC	She11p	37	Homologia funcional com Alyref			
LUZP4		Hom-Tes-85, CT-8	Adaptador de exportação, proteína associada ao EJC		36	Homologia	funcional	com	Alyref, dipeptídeos RS, zíper de leucina

Continua

	Nome humano	Nomes alternativos	Função celular	Ortólogo em levedura	kDa	Funcionalidades
Subunidades de TREX	CHTOP	SRAG, C1orf77, FOP	Adaptador de exportação, proteína associada ao EJC		26	Interação com domínio PRMT1, região RGG
	SARNP	Cip29, Tho1, Hcc-1		Tho1p	24	Domínio SAP
	POLDIP3	Skar, KIAA1649, PDIP46	Proteína associada ao EJC		46	Sequência UBM-like, RRM
	ZC3H11A	Zc11a, ZC3HDC11A			89	Proteína <i>Zinc Finger</i>
	ERH	dDroer			12	Não caracterizada
	NXF1	Tap	Receptor de exportação de RNA	Mex67p	70	RBD rica em arginina, pseudo RRM, domínio NTF2-like, UBA
	NXT1	P15	Requerido por Nxf1 para estabilização e exportação de mRNA	Mtr2p	15	Estabiliza e se liga ao domínio NTF2-like de NXF1
	ZC3H18	Nhn1	Componente do complexo NEXT		106	CCCH, proteína <i>Zinc Finger</i>
	SRRT	Ars2	Processamento pri-miRNAs, efetor no processamento 3' RNA CBC		100	Proteína de ligação ao Cap
	NCBP3	C17orf85, Elg	Envolvido na exportação de mRNA na infecção viral		71	Proteína de ligação ao Cap, formando uma alternativa CBC com Ncbp1
	NCBP1	Cbp80	Elongação da transcrição, exportação de RNA, estabilidade do RNA	Cbc1p	71	Proteína de ligação ao Cap, formando o CBC com Ncbp2

Fonte: Adaptado de HEATH, VIPHAKONE & WILSON, 2016

O receptor de exportação Mex67/TAP tem o papel biológico independente de GTP e forma um dímero com a proteína Mtr2 (também denominada de p15) (FIGURA 8). Uma vez montado no mRNP, TREX tem a capacidade de liberar o domínio de ligação ao RNA de NXF1/Mex67, permitindo a associação do receptor com o mRNA, que subsequentemente conduz o seu transporte pelo complexo do poro nuclear. Assim, TREX age sinalizado à célula quando o mRNA foi processado e está adequado para a exportação. TREX é um complexo de múltiplas subunidades cuja montagem requer ATP e, dessas, quatro proteínas são conhecidas por interagir com NXF1/Mex67: Aly, Thoc5, Hpr1 e FOP (VIPHAKONE et al, 2012).

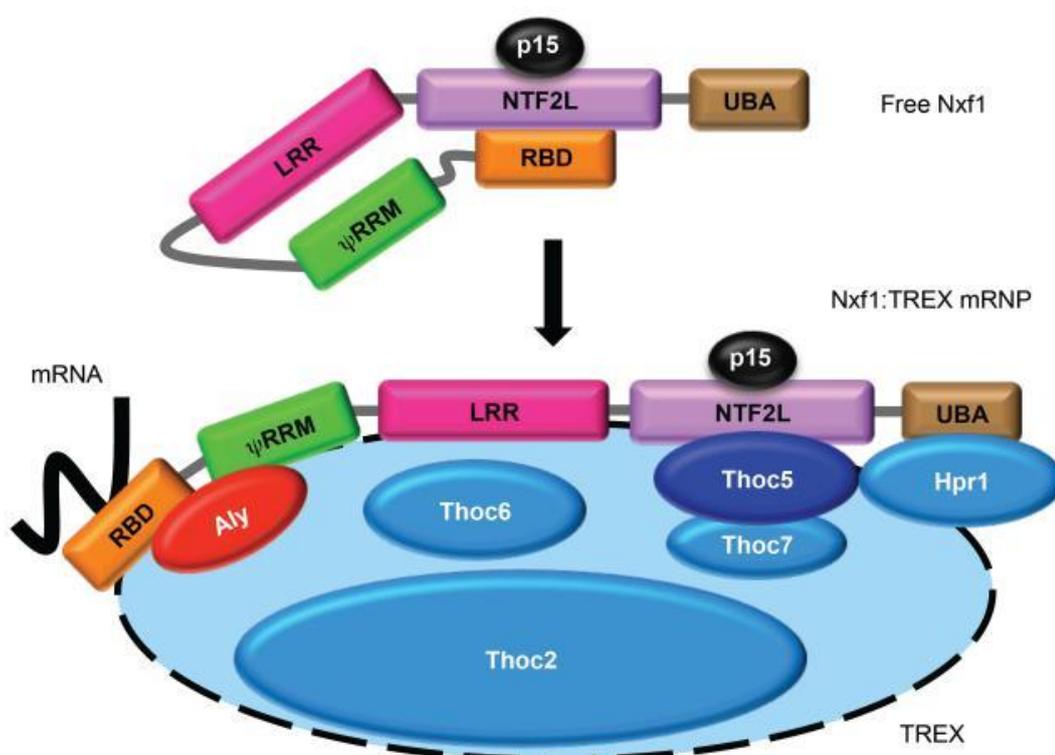


FIGURA 8. MODELO REPRESENTATIVO DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DE NXF1/MEX67, INDUZIDA POR TREX PARA A EXPORTAÇÃO DE mRNA. Interação com p15 promove um dobramento de NXF1 fazendo com que seu domínio RBD se ligue ao domínio NTF2-like. Durante a exportação de mRNA, TREX é montado e permite que as duas subunidades Alyref e Thoc5 remodelam NXF1/Mex67 para expor seu domínio de ligação ao RNA, permitindo a interação direta entre NXF1/Mex67 e mRNA durante a exportação. Por razões de clareza nem todas as subunidades de TREX estão ilustrados na figura (Adaptado de VIPHAKONE et al., 2012).

Recentemente, em humanos, a proteína FOP – Friend of PRMT1 - (em mamíferos denominada de CHTOP) foi atribuída como novo componente dinâmico do complexo TREX, desempenhando o papel como co-adaptadora da exportação de mRNA. FOP e Aly são reguladas por metilação de argininas e, no caso de FOP,

essa modificação pós-traducional é requerida para sua ligação à NXF1 e uma diminuição da atividade de ligação ao RNA (CHANG et al., 2013). Ademais, CHTOP/FOP também compete com Thoc5 para ligação ao domínio NTF2-like de NXF1/Mex67 e ambos cooperam com Aly/Yra1 para aumentar a atividade de ligação ao RNA de NXF1/Mex67 (TENG et al, 2013).

Chang e colaboradores (2013) demonstraram que, em humanos, FOP liga-se e ativa as atividades helicase e ATPase de UAP56/Sub2. Sendo que a metilação não tem efeito sobre a interação de FOP com a Sub2 (VIPHAKONE et al, 2012; TENG et al, 2013). A descoberta de FOP indica que provavelmente TREX sofra rearranjos substanciais durante a formação do mRNP. No modelo de exportação de mRNA em humanos proposto por Chang et al (2013), a atuação de FOP para montagem de TREX e recrutamento da Sub2 é importantíssimo.

Apesar dos fatores e mecanismos de exportação de mRNA serem bem descritos em mamíferos e leveduras, poucos dados foram publicados até o momento a respeito desse mecanismo em tripanossomatídeos. Serpeloni e colaboradores (2011 a) realizaram análises de genômica comparativa e demonstraram que algumas proteínas envolvidas na exportação de mRNA são filogeneticamente pouco conservadas em organismos divergentes, como por exemplo os tripanossomatídeos. Entretanto, foi demonstrado que a RNA helicase Sub2 (UAP56 em mamíferos) é uma exceção, sendo a mais conservada entre os fatores envolvidos na via de exportação de mRNA. Posteriormente, Serpeloni e colaboradores (2011b) demonstraram que sua ortóloga em *T. cruzi*, chamada de TcSub2, é uma proteína nuclear, essencial para sobrevivência do parasita e um componente da via de transcrição/exportação de mRNA. Outra proteína que também foi caracterizada é o receptor de exportação Mex67, que, embora sua estrutura mostre algumas peculiaridades em tripanossomatídeos, é essencial na exportação de mRNA (DOSTALOVA et al., 2013). A diminuição da expressão tanto de Sub2 (SERPELONI et al., 2011b) quanto de Mex67 (DOSTALOVA et al., 2013, INOUE et al., 2014) após indução do mecanismo de RNAi em *T. brucei* resultou em acúmulo nuclear de mRNAs poliadenilados e letalidade ao parasita. Além disso, buscando outros componentes da exportação de mRNA, Inoue e colaboradores (2014) caracterizaram uma RNA helicase, Hel45 (em *T. cruzi* chamada de TcHel45), que migra entre núcleo e citoplasma dependente da via de transporte de mRNA por Mex67.

Essas evidências indicam que as vias de transporte são essenciais para a sobrevivência dos tripanossomatídeos e que podem acontecer diferentemente de humanos e fungos, uma vez que novos componentes possam estar associados.

2 JUSTIFICATIVA

Muitas das modificações celulares durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos são decorrentes de um controle refinado na expressão gênica. Serpeloni e colaboradores (2011a) demonstraram que a via de exportação de mRNA, é a menos conservada dentre as vias de transporte dos vários tipos de RNA. Em comparação aos eucariotos do topo da filogenia, as proteínas envolvidas com exportação de mRNA são muito pouco conservadas em diversas espécies de parasitas.

A falta da conservação de sequência de proteínas envolvidas nessa via torna um desafio a identificação de proteínas homólogas em espécies divergentes, como o *T. cruzi*, apenas por abordagens de bioinformática. Partindo disso, duas questões podem ser levantadas: 1) Seria a via de exportação em tripanossomatídeos menos especializada do que a via de outros organismos, ou seja, sem a presença de componentes especializados como ocorre em fungos e metazoários? 2) Ou a via de exportação de mRNA é especializada com a presença de proteínas não conservadas que ainda não foram identificadas e caracterizadas?

Entretanto, somente uma proteína foi identificada como altamente conservada nesses parasitas divergentes, e se mostrou essencial para exportação de mRNA em tripanossomatídeos. Esta proteína denominada de TcSub2 é nuclear, está associada a sítios de transcrição e o silenciamento gênico do ortólogo em *T. brucei* causa um bloqueio na exportação de mRNA. Contudo, a falta da conservação de sequência de outras proteínas envolvidas nessa via torna um desafio a identificação de proteínas homólogas dos parceiros de TcSub2 por abordagens apenas de bioinformática. Logo, o nosso grupo vem investindo em abordagens de genética reversa e proteômica para identificar componentes essenciais em parasitas. Análises de proteômica permitiram a identificação de componentes exclusivos de tripanossomatídeos associados ao complexo de TcSub2 (INOUE, 2015). Estas proteínas exclusivas de tripanossomatídeos estão anotadas como proteínas hipotéticas no banco de dados. Ferramentas *on line* para busca de domínios funcionais conseguiram prever domínios em duas destas proteínas hipotéticas e conservadas apenas em tripanossomatídeos. Assim, uma delas possui o domínio FOP, presente na proteína FOP/CHTOP que é descrita como um fator que interage com Sub2/UAP56 em mamíferos (TENG et al, 2013), e a outra proteína possui um

domínio API5 (*Apoptosis Inhibitor 5*), que está presente em proteínas com função anti-apoptótica e superexpressa em células cancerígenas (HAN *et al.*, 2012). O papel de API5 na via de exportação de mRNA ainda é pouco compreendido, porém, em *Oriza sativa*, foi demonstrado que API5 interage com Sub2/UAP56 (LI *et al.*, 2011) e, em *Drosophila*, interage com Acinus (EJC) (RIGOU *et al.*, 2009). Por isso, estas proteínas foram denominadas em *T. cruzi* como TcFOP-like e TcAPI5-like, e são candidatas a fatores presentes no complexo de TcSub2.

Desse modo, as hipóteses deste trabalho são de que estas proteínas interageriam com TcSub2 e seriam componentes da via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos, mais especificamente em *T. cruzi*. Com base nisso, este trabalho buscou também a caracterização funcional de TcFOP-like e TcAPI5-like como candidatas a serem fatores da via de exportação de mRNA em *T. cruzi*, assim como, fornecer dados relevantes para entender as peculiaridades do controle da a regulação da expressão gênica nestes organismos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a localização das proteínas TcFOP-like e TcAPI5-like de *T. cruzi* e sua função no processo de exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar *in silico* a conservação das proteínas hipotéticas TcFOP-like e TcAPI5-like

3.2.1.1 Análise de similaridade

3.2.1.2 Busca por domínios conservados

3.2.2 Avaliar a localização celular de TcFOP-like e TcAPI5-like

3.2.2.1 Clonagem em vetor de entrada da plataforma Gateway® (INVITROGEN)

3.2.2.2 Clonagem em vetor de destino pDESTTM17 (INVITROGEN)

3.2.2.3 Obtenção de anticorpo policlonal anti-TcFOP-like e anti-TcAPI5-like para ensaios de imunolocalização

3.2.2.4 Obtenção de linhagens de parasitas expressando TcFOP-like e TcAPI5-like fusionadas à etiqueta GFP na extremidade N-terminal

3.2.2.5 Análises de localização por microscopia fluorescência, confocal e eletrônica

3.2.3 Analisar o fenótipo causado pelo silenciamento das proteínas em *T. brucei* por RNA de interferência (RNAi)

3.2.3.1 Obtenção de linhagem de *T. brucei* para silenciamento da expressão de TbFOP-like e de TbAPI5-like por RNAi

3.2.3.2 Analisar a viabilidade e a efetividade do silenciamento gênico

3.2.4 Analisar a interação das proteínas com outros componentes da via de exportação de mRNA

3.2.4.1 Imunoprecipitação e análise de interação por *Western blot* dos complexos proteicos contendo TcFOP-like e TcAPI5-like

3.2.4.2 Deleção do domínio FOP e do motivo UBM da proteína TcFOP-like para avaliar o papel dos mesmos na interação com TcSUB2

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

Para a busca de sequências foi utilizado o programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) implementado localmente. As buscas foram feitas contra o banco de dados *Reference Sequence - RefSeq* (O'Leary *et al.*, 2016) do *National Center of Biotechnology Information - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As proteínas ortólogas foram identificadas através do critério de *reciprocal best hit* (RBH).

Os domínios das proteínas foram identificados através do programa hmmscan do pacote HMMER (Eddy, 1998), usando modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models - HMM*) disponíveis no banco de dados do Pfam, versão 27.0 (Finn *et al.*, 2014).

O alinhamento das múltiplas sequências ortólogas foi realizado utilizando o programa MUSCLE (Edgar *et al.*, 2004).

4.2 TAMPÕES E SOLUÇÕES

AP Buffer (tampão de reação para fosfatase alcalina): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

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

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

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

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

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

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

Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x: Azul de bromofenol 0,25% xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

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

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

Tampão de purificação de proteínas: TRITON X-100 2%, Na_2HPO_4 100 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 20 mM pH 8,0.

Tampão de suspensão de proteínas: Na_2HPO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Uréia 8 M pH 8,0.

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

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

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

Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*): KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM; NaCl 137 mM.

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

4.3 CULTIVO DE CÉLULAS

4.3.1 *Escherichia coli*

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

Genótipo DH5 α TM: {F- *recA1 endA1 hsdR17* (rk^- , mk^+) *supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*}.

Genótipo *ccdB* resistente: (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG* *tonA::PtrcccdA*);

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (ver item 4.4.1) a 37 °C durante 16 horas. Para a estocagem, células em fase de crescimento exponencial foram mantidas em igual volume de glicerol 100% a -70 °C.

4.3.2 *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone *Dm28c* (CONTRERAS et al., 1988) foram mantidas em culturas axênicas em meio LIT (LIT - *liver infusion tryptose*) (ver item 4.4.2) a 28°C e passagens a cada três dias com inóculo de 10⁶ células/mL.

4.3.3 *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* cepa 427 (CROSS E MANNING, 1973) foram mantidas em cultura axênica em meio SDM-79 (ver item 4.4.3) suplementado com 10% de soro fetal bovino (BRUN E SCHONENBERGER, 1979), à 28°C e passagens a cada três dias com inóculo de 10⁶ células/ml. Para a linhagem de *T. brucei* 29-13 (WIRTZ et al., 1999), o meio foi suplementado também com antibióticos Higromicina 50 µg/ml e G418 15 µg/ml. Esta linhagem celular expressa o repressor da tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de RNA de interferência.

4.4 MEIOS DE CULTURA

4.4.1 Meio LB (Luria – Bertani)

Bacto-triptona.....	10,0 g/L
NaCl.....	5,0 g/L
Extrato de levedura.....	5,0 g/L

(LB-ágar): adição de 1,5% de agar-ágar.

4.4.2 Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

Infusão de fígado.....	5,0 g
NaCl.....	4,4 g
KCl.....	0,4 g
Glicose.....	2,2 g
Triptose.....	5,0 g
Fosfato básico de sódio.....	11,56 g
Extrato de levedura.....	15,0 g
Hemina.....	0,02 g
Soro fetal bovino.....	10%
Penicilina.....	10.000 U

pH 7,2

4.4.3 Meio SDM-79

MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	7,00 g/L
Meio 199	2,00 g/L
MOPS	5,00 g/L
Hepes	8,00 g/L
Glicose.....	1,00 g/L
NaHCO ₃	2,00 g/L
Piruvato de Sódio	0,10 g/L
L-Alanina	0,20 g/L
L-Arginina	0,10 g/L
L-Glutamina	0,30 g/L
L- Metionina	0,07 g/L
L-Fenilalanina	0,08 g/L
L-Prolina	0,60 g/L
L-Serina	0,60 g/L
Taurina	0,18 g/L
L-Treonina	0,35 g/L
Adenosina	0,10 g/L
Guanosina	0,01 g/L
Glucosamina	0,05 g/L
MEM <i>amino acids solution</i> , 50X	10 mL
MEM <i>non essential amino acids</i> 100X	6 mL
Penicilina	0,059 g/L
Streptomicina.....	0,133 g/L
Ácido Fólico	0,004 g/L
PABA (ácido Para-aminobenzóico)	0,002 g/L
Biotina	0,002 g/L

4.5 ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E PROTEÍNAS

4.5.1 Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose conforme descrito em Sambrook e Russel (2001). As amostras de DNA foram diluídas na proporção 1:5 em tampão de amostra para eletroforese de DNA (Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5X – Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol 0,25%; Glicerol 30%) e aplicadas em gel de agarose 0,8-1% submerso em tampão TBE (TBE 1X – Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0). Para cada gel, era aplicado 150 ng de marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

A corrida eletroforética foi realizada a 90 V e, em seguida, o DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (brometo de etídio 0,5 µg/ml em água destilada) e visualizado em transluminador acoplado ao sistema de fotodocumentação.

4.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por gel vertical desnaturante SDS-PAGE, conforme o descrito por Laemmli (1970). Os volumes das soluções utilizadas para montagem dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE

	Gel de empilhamento	Gel de corrida		
		10%	13%	15%
	5%	10%	13%	15%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	2,95 ml	3,8 ml	4,4 ml
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM)	-	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml
Tris-HCl 1M pH 6,8 (concentração final 120 mM)	0,6 ml	-	-	-
H ₂ O ultra pura	3,7 ml	5,5 ml	4,6 ml	4,0 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%)	35 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
	5 ml	10 ml	10 ml	10 ml

4.5.2.1 Coloração por Azul de Coomassie

Os géis SDS-PAGE, após corrida eletroforética das amostras, foram corados em solução para coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%) por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os géis foram lavados com água destilada fervida para a retirada do corante e análise das proteínas.

4.5.2.2 Coloração por Nitrato de Prata (OAKLEY, KIRSCH E MORRIS, 1980)

Para coloração de maior sensibilidade em géis SDS-PAGE, alternativamente, foi utilizada a marcação por nitrato de prata. Para isso, o gel foi incubado em solução de fixação de SDS-PAGE (Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%) por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, lavado 3 vezes com solução de Etanol 50%. Posteriormente, o gel foi incubado com solução de sensibilização para coloração por prata (Tiosulfato de Sódio 0,02% em água ultrapura) por 2 minutos, lavado com água ultrapura por 3 vezes e incubado com solução de coloração por prata (Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%) por 30 minutos. Após lavagem com água, a revelação foi realizada com solução de revelação de prata (para 100 ml: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização).

A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (Etanol 50%; Ácido Acético 12%).

4.6 CLONAGEM MOLECULAR DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

4.6.1 Extração de DNA genômico

4.6.1.1 *T. cruzi* Dm 28c e *T. brucei* 427

As extrações de DNA de *T. cruzi* clone Dm 28c e *T. brucei* 427 foram realizadas como descrito em Medina-Acosta & Cross (1993). Assim, o total de 1×10^{10} células cultivadas em meio LIT ou SDM-79 foram separadas por centrifugação a $7.000 \times g$ por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 350 μ L de tampão TELT (Solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e TRITON X-100 4%) e incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após lise, o mesmo volume de solução de fenol/clorofórmio foi adicionado e o material foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 10 min. A fração aquosa foi coletada para um novo tubo e o DNA foi precipitado com duas vezes o volume de etanol absoluto. O material foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 10 minutos e o DNA foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em tampão TE.

4.6.2 Amplificação gênica por PCR

4.6.2.1 TcFOP-like

A amplificação do gene de TcFOP-like (GenBank Gene ID: Tc00.1047053509033.80) foi obtido através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA genômico de *T. cruzi* e oligonucleotídeos iniciadores específicos, desenhados para a amplificação da sequência codificante que possui 633 pares de bases, como mostrado na Figura 9

```

5' ATGCGACGTGGCGATTTTGAGCGTCGGCGCCTTCGTGATTTGTACGAGCGGAATGTGCGCCGGG
TGCGGGCTTTGGCGGATGCGCGAGATGGGCGAAGGTCTGGCAGGGACGATGATATTGCGGCTCCCC
GCCGTTATGTCGTACGCGAGCGTCAACTCGCCTCGAAGGGTTTGGCCGTGGTGGCTACCAAGTGC
AGCGGTCACGCCGGTTTGGCCGCGATCCAAGGATCCGTCCGGTTCAGCGACAGGGGCGTTTACCGTC
GCGGTGCCCTGGACCGCTTTGAACGCGAGGAGGACTTTGAGCGGAAGCTGCGTTCGTGAACGTTTCC
GTGAACGCCGTCTTAATGAGGGCGGACTGCGGTTCCGGTTCGTCTGCGCCTTCGCCGCAGCGAACGAC
GGGAGCTGCGCCAACCTGCGAGAGCTCCGAGAACTCCGTGAACTTCGCGCCCTACGAAGCGCACAAAC
GAAACCAGGGCAATGGCGATCGGCGCGGCAAGCTAGACAAGGAATTGGATCGCTACAGAAAGGACC
AGCGCGGCGGACGCAGGGGTGGAGGTGGCCGTGGCCGTGGCGCACCAAATTCGGTGACGAAGGAAG
GACTCGACGCGGA ACTTGACCGCTTCCGCGGCGGCAATTAG 3'

```

FIGURA 9. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like. Sequência de nucleotídeos do gene TcFOP-like (GenBank Gene ID Tc00.1047053509033.80). As letras destacadas em amarelo delimitam a região utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R).

Além disso, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos que amplificam TcFOP-like sem a sequência do domínio FOP da proteína na extremidade C-terminal, Figura 10, com o intuito de analisar a importância deste domínio na possível interação entre TcFOP-like e TcSub2, chamamos este *amplicon* de TcFOP-like Δ FOP

5' ATGCGACGTGGCGATTTTGAGCGTCGGCGCCTTCGTGATTTGTACGAGCGGAATGTGCGCCGGGT
 GCGGGCTTTGGCGGATGCGCGAGATGGGCGAAGGTCTGGCAGGGACGATGATATTGCGGCTCCCCG
 CCGTTATGTCGTCAGCGAGCGTCTGAACTCGCCTCGAAGGGTTTGGCCGTGGTGGCTACCAAGTGCA
 GCGGTCACGCCGGTTTGGCCGCGATCCAAGGATCCGTTCGGTTCAGCGACAGGGGCGTTTACCGTGC
 CGGTGCCCTGGACCGCTTTGAACGCGAGGAGGACTTTGAGCGGAAGCTGCGTTCGTGAACGTTTCCG
 TGAACGCCGTCTTAATGAGGGCGGACTGCGGTTTCGGTTCGTCTGCGCCTTCGCCGCAGCGAACGACG
 GGAGCTGCGCCAACCTGCGAGAGCTCCGAGAACTCCGTGAACTTCGCGCCCTACGAAGCGCACAACG
 AAACCAGGGCAATGGCGATCGGCGCGGCAAGCTAGACAAGGAATTGGATCGCTACAGAAAGGACCA
 GCGCGGCGGACGCAGGGGTGGAGGTGGCCGTGGCCGTGGCGCACCAAAATTCGGTGACGAAGGAAGG
 ACTCGACGCGGAACTTGACCGCTTCCGCGGCGGCAATTAG 3'

FIGURA 10. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like Δ FOP. Sequência de nucleotídeos do gene TcFOP-like (GenBank Gene ID GenBank Gene ID Tc00.1047053509033.80). As letras em vermelho delimitam a região correspondente ao domínio FOP, e as letras destacadas em amarelo delimitam a região utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R).

Como o domínio FOP compreende uma região de metilação e motivos de ligação a UAP56/Sub2, denominado de UBM (UAP56 *binding-motif*), resolvemos desenhar outros oligonucleotídeos iniciadores que amplifiquem TcFOP-like, sem o motivo UBM, como demonstrado na Figura 11, para analisar se a interação entre essas proteínas ocorre por meio deste motivo, como relatado em outros organismos com seus respectivos ortólogos, a este *amplicon* chamamos de TcFOP-like Δ UBM (Resultados mostrados em ANEXOS).

```

5' ATGCGACGTGGCGATTTTGAGCGTCGGCGCCTTCGTGATTTGTACGAGCGGAATGTGC
GCCGGGTGCGGGCTTTGGCGGATGCGCGAGATGGGCGAAGGTCTGGCAGGGACGATGATA
TTGCGGCTCCCCGCCGTTATGTCGTCAGCGAGCGTCGAACTCGCCTCGAAGGGTTTGCC
GTGGTGGCTACCAAGTGCAGCGGTCACGCCGTTTGGCCGCGATCCAAGGATCCGTCGGT
TCAGCGACAGGGGCGTTTACCGTCGCGGTGCCCTGGACCGCTTTGAACGCGAGGAGGACT
TTGAGCGGAAGCTGCGTCGTGAACGTTTCCGTGAACGCCGTCTTAATGAGGGCGGACTGC
GGTTCGGTCGTCTGCGCCTTCGCCGACGGAACGACGGGAGCTGCGCCAACGCGAGAGC
TCCGAGAACTCCGTGAACTTCGCGCCCTACGAAGCGCACAAACGAAACCAGGGCAATGGCG
ATCGGCGCGGCAAGCTAGACAAGGAATTGGATCGCTACAGAAAGGACCAGCGCGGCGGAC
GCAGGGGTGGAGGTGGCCGTGGCCGTGGCGCACCAAATTCGGTGACGAAGGAAGGACTCG
ACGCGGAACTTGACCGCTTCCGCGGCGGCAATTAG 3'

```

FIGURA 11. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcFOP-like Δ UBM. Sequência de nucleotídeos do gene TcFOP-like (GenBank Gene ID GenBank Gene ID Tc00.1047053509033.80). As letras em negrito correspondem ao domínio FOP da proteína, em vermelho destaca-se a região correspondente ao motivo UBM (UAP56 *binding-motif*), e as letras destacadas em amarelo delimitam a região utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R).

A finalidade de cada amplificação e as sequências de cada iniciador estão apresentadas na Tabela 3, a sequência em negrito refere-se à sequência *attB* necessária para posterior reação de recombinação com o vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma *Gateway* (Invitrogen).

TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR™221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcFOP-like, TcFOP-like ΔFOP E TcFOP-like ΔUBM

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência Nucleotídica	Tamanho do fragmento	TM °C	Uso
TcFOP-like (Tc00.10470535 09033.80)	TcFOP-like <i>Forward</i> (F)	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG CGACGTGGCGATTTTGAG 3'	633 pb	61°C	Amplificação do gene de TcFOP-Like
	TcFOP-like <i>Reverse</i> (R).	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAA TTGCCGCCGCGGAAGCGGTCAAGT 3'		77°C	
	TcFOP-like ΔFOP <i>Forward</i> (F)	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG CGACGTGGCGATTTTGAG3'	516 pb	61°C	Amplificação do gene TcFOP-like com deleção do domínio FOP
	TcFOP-like ΔFOP <i>Reverse</i> (R)	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA GTAGCGATCCAATTCCTTGTCTAG 3'		55°C	
	TcFOP-like ΔUBM <i>Forward</i> (F)	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG CGACGTGGCGATTTTGAG 3'	615 pb	61°C	Amplificação do gene TcFOP-like com deleção do domínio UBM
	TcFOP-like ΔUBM <i>Reverse</i> (R)	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAA TTGCCGCCGCGGAAGCGTCCTTCCTTCGTCACCGA ATTTGGT3'		69°C	

Em negrito, está a sequência *attB* adicionada à extremidade 5' do *primer*

Para as reações de amplificação de TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP foram utilizados os seguintes padrões de ciclagem: *holding* de 94 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos de 52 °C (anelamento) e 45 segundos a 68 °C (extensão), já para TcFOP-like Δ UBM houve alteração apenas na temperatura de anelamento (60°C), os demais parâmetros permaneceram os mesmos.

As reações foram realizadas em volume final de 100 μ L contendo 61 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão para a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), água ultrapura, e oligonucleotídeos iniciadores, segundo o protocolo do fabricante da enzima. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8-1%, como descrito no item 4.5.1.

4.6.2.2 TcAPI5-like

Da mesma forma, a amplificação do gene TcAPI5-like (GenBank Gene ID:: Tc00.1047053511807.280) foi obtido através de PCR com DNA genômico de *T. cruzi* e oligonucleotídeos iniciadores específicos, desenhados para a amplificação do gene que possui 1689 pares de bases. A figura 12 ilustra as regiões utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores de TcAPI5-like.

```

5' ATGGCCCCAAAAGAAGAGCGCTTCTGCTGCTGCTGCGGCAAAAGAGGAGACAGAAGAATGCG
TCCCGGCTGAGGTGACAACAACAACACCCCCACATCTCCGCAGACTGAATCCTTGCCCTCCGCAT
GCAACGCTGTGGAGTTGTACGCAACCCTTCAGGCAGCTGTTTCGGAGGATCCTGCAAAGCTGAATG
ATTTTGTGCGGGAATTACTCCAGGCGCTGAGCGATGCGGAGTGCCCGGATGCACCGCTTCTGGTCC
GTGTGCGTACCCTTGAGTTTATTAGCAAATACGGACAGCATGTACGTGACGGCAATGCTCTTAAAA
AGATTGTTACATCTCTTGTAATAATATTGAGTGGCTCAGAGGACACGCCGCAGCTTCTTGTGGCTG
CTGTTTACGGGGCTTTCATCGCTAGGGCCTGTCTCTGTACTGGACAAGAAGTGGGAATATTTGTCCC
GCGAGGGGGCAGATGTTCTCATGCAGGTAATGTTGGACGAAGAGGGATTTGCGGAAAGTGTGCGTC
AAGCCGCTTCCAAGGCGTTGGAATCCCTCATTAGACCGCATTTTCGTCCCGTTGTGACGAAGCTGC
TACACTGGATAAGCGACAATCGTGAGACGGAGGACGAAGATCAACTGAAGAAGGAGCGGCGCATGG
CTCTGACGCGACTGAGGAAGCTGGCGCACACACCGTCCCTGCAGTGCCAGTGGACGGAGGAGGTTTC
AGGAACATGTCTTGAGCCTCATTGTTTCGTGTGCTTCCAACGGTCACTGTGCAGGAATTTGTGCAAC
TCACGAGCATTGCTGCATCATTGCCGATAGTACGAGCAGAGGCGGGAGTGCCTTTCCTCAAGGCGT
TTTTGGCGCAAATGCAATCAACACTGACCGTGTGTTGGAGTCCCTAAGTATTATTGGAGAGCATA
TTGGCGCCGACCGTACGACATTGTTCCCGTTCTTGAGGATGCAGGGCTTCTTACAACACCTGTTG
AGAAGAATACCGCACGGGGCATGTGGCACGCGAAGGTGTTGTTGCTGGCTGCTCGACTTGCCACTC
CTGATAACATTGATAAAATGTACAATGCGGTGTTGGAACAGCTGGCGCATGTCATGCATGATGGGA
GTGCGTTGCCGGAGAATATGACGACTCTCGAGGTGCTACTCTTTGCCGTTATGGCGGCAGGACAAA
AAAAACCAGTTGAGATGTTGAAGTATTTGAATGATGATGCGTTCGTTGCGAAGTGCATGGGTCTGG
AGGAGCTCGTCGCCCAGATGGAACCACTCCTGATTTACGCCGTTAAGAAACGGATGCAGAAGTCAT
CGGCGGGCCAAAAGGATGCGGAGGTAATTGGATGCTGCCATAACGTGCGAGTCACTTGGAGCGCCT
TCTCCGCCAAACACATGCCACTGGTACCCTCACGGAGAGTTGGCTCCACAAGAATAAGTTGCCAA
GTGTGAAACACGCCCGCGACCCAGCGACGACGGCAAAGGCAACAGAGACTACAGCGGGAATTGCTG
GGGCCGCCCGGACAGTTGGGTGTGCTGCCGCCTCCCCCTGGCACGGAGGAACATGCTAAGAAAA
GGTCTCGTGGTCAGGAGTCCGGTTACAACAAGAATGCTAACAGGAATAAGGGTGGTTGGAATGGCA
ACGGCCGTACAAGAGAGCACGTCGTGGCGGAGTCTACTAA3'

```

FIGURA 12. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TcAPI5-like. Sequência de nucleotídeos do gene TcAPI5 (GenBank Gene ID Tc00.1047053511807.280). As letras destacadas em amarelo delimitam a região utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R).

A finalidade da amplificação e as sequências de cada iniciador estão apresentadas na Tabela 4, a sequência em negrito refere-se à sequência *attB* necessária para posterior reação de recombinação com o vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma *Gateway* (Invitrogen).

Para as reações de amplificação de TcAPI5-like foram utilizados os seguintes padrões de ciclagem: *holding* de 94 °C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30

segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos de 57 °C (anelamento) e 2 minutos a 68 °C (extensão).

As reações foram realizadas em volume final de 100 µL contendo 61 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão para a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), água ultrapura, e oligonucleotídeos iniciadores segundo o protocolo do fabricante da enzima. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8-1%, conforme descrito no item 4.5.1.

TABELA 4. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR™221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcAPI5-like

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica	Tamanho do fragmento	TM °C	Uso
TcAPI5-like (Tc00.10470535 11807.280)	TcAPI5-like <i>Forward</i> (F)	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGCCCCCAAAAAGAAGAGCG 3'	1689 pb		Amplificação do gene TcAPI5-like
	TcAPI5-like <i>Reverse</i> (R)	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC TTAGTAGACTCCGCCACGACGTGCTCTC 3'		65 °C	

Em negrito, está a sequência *attB* adicionada à extremidade 5' do *primer*

4.6.3 Clonagem entre inserto e plasmídeo

4.6.3.1 Clonagem em vetor de entrada (pDONRTM221) na plataforma Gateway® (INVITROGEN)

No sistema Gateway®, a clonagem é realizada em duas reações. A primeira reação, chamada de reação BP, ocorre a recombinação entre os sítios attB1/attB2, inseridos por PCR no *amplicon* a ser clonado, e os sítios attP1/attP2, presentes no vetor de entrada (pDONRTM221), gerando um clone de entrada no sistema (FIGURA 13).

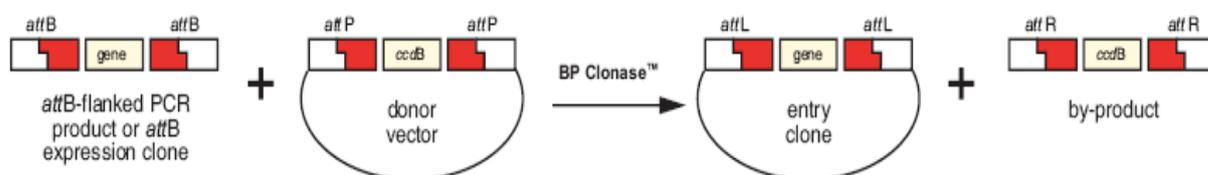


FIGURA 13. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A RECOMBINAÇÃO ENTRE OS SÍTIOS attB e attP PARA OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA. pDONRTM221 é um dos vetores disponíveis para a entrada no sistema (Adaptado do Manual Gateway® Technology).

Na segunda reação, chamada de reação LR, pode-se verificar como ocorre a recombinação entre os sítios attL1/attL2, presentes no clone de entrada, e os sítios attR1/attR2, presentes no vetor de destinação escolhido, gerando um clone de destinação (FIGURA 14).

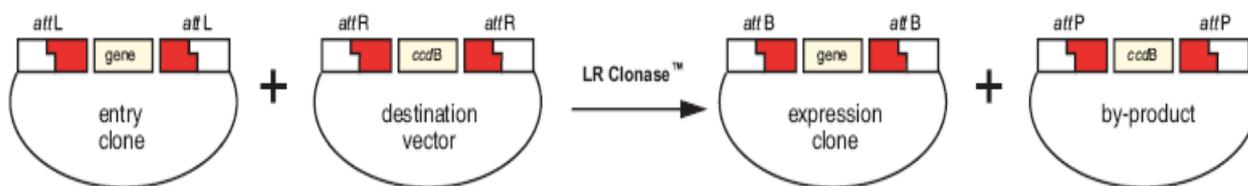


FIGURA 14. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A RECOMBINAÇÃO ENTRE OS SÍTIOS attL E attR, PARA A OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO. pDEST 17 foi usado como exemplo de vetor de destinação (Adaptado de Manual Gateway® Technology).

A plataforma Gateway possibilita realizar a transferência dos genes de interesse para diferentes vetores de destinação com distintas aplicações (FIGURA 15).

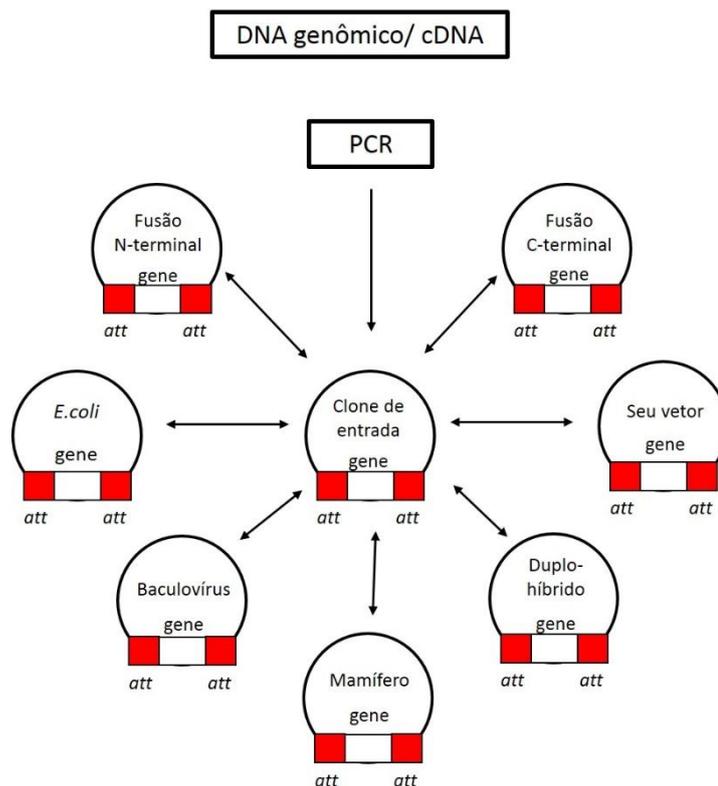


FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PLATAFORMA GATEWAY® DEMONSTRANDO AS DUAS DIVERSAS APLICABILIDADES A PARTIR DE UM CLONE DE ENTRADA. (Adaptado do Manual Gateway® Technology)

Desta forma, para a clonagem na plataforma Gateway, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para amplificação, por reação de PCR, dos genes de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP, TcFOP-like Δ UBM e TcAPI5-like, continham na extremidade 5' a sequência de reconhecimento *attB* (Tabelas 3 e 4) para a posterior reação de recombinação com o sítio *attP* do vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway (Invitrogen) (FIGURA 16).

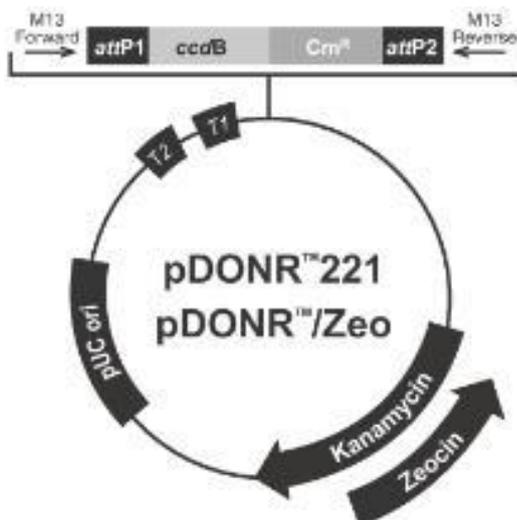


FIGURA 16. MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 (Invitrogen). pUC ori: origem de replicação de alta cópia. attP1/attP2: sequência de 200 bp presente no pDONR para recombinação com sítio attB presente no produto PCR. ccdB: gene que permite seleção negativa do pDONR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio attB do produto de PCR. Kanamycin: gene de resistência à canamicina. Cm^R: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 Forward e Reverse.

Após a amplificação foi realizada a reação de recombinação com o vetor pDONR™221 de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen- Catálogos 12535-019 e 12535-027). Estas reações de recombinação foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α eletrocompetente, conforme item a seguir. As bactérias foram selecionadas em meio LB-ágar adicionado de 50 µg/mL de canamicina, resistência conferida pelo vetor pDONR™221 (FIGURA 17).

4.6.4 Transformação e seleção de clones recombinantes

4.6.4.1 Preparo de células competentes

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl₂ descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.600 de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 5 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de CaCl₂ 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas no gelo durante 30 minutos.

A suspensão foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram suspensas em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução anterior acrescida de 10% de glicerol, mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliqüotadas e armazenadas a – 70 °C.

4.6.4.2 Transformação de células competentes

Após as reações de recombinação ou ligação, ou simplesmente para propagação de algum plasmídeo, realizou-se a transformação em *E. coli*, utilizando-se tanto bactérias quimiocompetentes, quanto eletrocompetentes.

Para a transformação de bactérias quimiocompetentes utilizou-se o seguinte protocolo: as reações foram incubadas com 50 µL da suspensão de *E. coli* quimiocompetentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 200 rpm a 37°C por uma hora.

Já para a transformação de bactérias eletrocompetentes, fez-se a eletroporação em cubetas de 0,2 cm, a 2,5 kV, 25 µF e 200 a 500 ohms. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio LB e incubou-se a 37 °C durante 1 hora com agitação de aproximadamente 200 rpm.

Após período de 1 hora de incubação, reduziu-se o volume por centrifugação durante 2 minutos a 6.000 rpm para o plaqueamento de toda a amostra. Foram utilizadas placas contendo meio LB e antibióticos específicos para as seleções, sendo eles ampicilina 100 µg/ml resistência conferida pelos vetores pDESTTM17, pTcGWGFPN, pTcGWPTPN utilizados em bactérias *E. coli* DH5α e/ou cloranfenicol 34 µg/ml, utilizado para expressar proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* pLysS ou canamicina 50 µg/ml, resistência conferida pelo vetor pDONRTM221. Após crescimento de 16 a 20 horas em estufa a 37 °C, fez-se a seleção dos clones, por PCR de colônia, conforme descrito no item 4.6.4.3.

4.6.4.3 Seleção de clones recombinantes por PCR de colônia

Após crescimento de colônias isoladas, para uma varredura inicial dos clones, algumas colônias foram coletadas e testadas por PCR. Para a seleção de clones recombinantes, as colônias crescidas em meio seletivo foram coletadas e diluídas em 100 µl de água ultrapura (proporção 1:100). Deste, 1 µl foi utilizado como molde para a reação de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabelas 3 e 4). Previamente, as amostras foram aquecidas a 94°C durante 10 minutos e, posteriormente, foram submetidas aos ciclos específicos de desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão de cada um dos fragmentos gênicos. As amostras foram analisadas em gel de agarose conforme item 4.5.1.

Os clones positivos selecionados foram inoculados em 2 mL de meio LB adicionado de antibiótico apropriado e as culturas incubadas a 37°C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram então utilizadas para minipreparação dos plasmídeos. A preparação de plasmídeo foi realizada com base no método da lise alcalina, adaptado de Birnboim e Doly (1979), utilizando o sistema *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Estes plasmídeos foram usados como molde em reações de PCR, neste caso, os insertos foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores da sequência de TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP, TcFOP-likeΔUBM e TcAPI5-like. Após a identificação dos clones positivos, estes foram enviados para plataforma de sequenciamento da *Macrogen Korea* (Coréia do Sul, informações disponíveis em <http://www.macrogen.com/>) e então usados nas etapas posteriores. Neste caso, os clones selecionados foram denominados de pDONR-TcFOP-like, pDONR-TcFOP-likeΔFOP, pDONR-TcFOP-likeΔUBM e pDONR-TcAPI5-like.

Estes foram utilizados para recombinação com outros vetores. O vetor pDONR™221 possui sequência que permite a recombinação do fragmento clonado com diferentes vetores de destino, entre eles o pDEST™17, para produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, e o vetor pTcGW-GFPN, utilizado para expressão de proteínas fusionadas a GFP N-terminal em *T. cruzi* (Batista et al, 2010) e também o pTcGWPTPN utilizado para a expressão de proteínas fusionadas a PTP N-terminal em *T. cruzi* (KUGERATSKI et al, 2015).

4.6.4.4 Verificação de clonagem pelo método de palitagem (*Toothpick*)

Após a seleção por antibiótico apropriado, alternativamente, a seleção dos clones foi realizada pelo método de palitagem (*Toothpick*). Assim, cada colônia foi removida com uma haste de madeira esterilizada e transferida para um tubo de 1,5 mL. Em cada tubo foi adicionado 15 µL de solução de lise (NaOH 50 mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, azul de bromofenol e água miliQ) e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 13.000 x *g* por 1 minuto e aplicado em gel de agarose 0,8 % não submerso em tampão TBE e submetido à diferença de potencial de 80 V. Uma vez que as amostras entraram na malha do gel de agarose, o volume de tampão TBE foi completado e a voltagem alterada para 100 V. O gel foi corado através da imersão em solução de brometo de etídeo e analisado em luz ultravioleta (UV).

4.6.4.5 Extração de DNA plasmidial

Colônias de clones selecionados são cultivadas em meio LB conforme descrito em 4.2.1. Estas culturas são utilizadas para extração e purificação dos plasmídeos recombinantes utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) ou kit de extração *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen) dependendo da quantidade necessária ao ensaio. Ambas as purificações foram realizadas conforme descrição em protocolo padrão do fabricante.

4.7 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.7.1 Recombinação em vetor de expressão pDESTTM17 da plataforma Gateway (Invitrogen)

O vetor pDESTTM17 é destinado à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, fornecendo altos níveis de proteína contendo uma etiqueta que consiste em seis resíduos consecutivos de histidina na extremidade amino-terminal. Esta etiqueta é importante para a purificação por cromatografia de afinidade da proteína

através de coluna Ni-NTA (Ni⁺⁺ *nitrilo-tri-acetic-acid* - QIAGEN) (AUSUBEL; BRENT; KINGSTON,1987). A alta afinidade de ligação entre as proteínas recombinantes que contêm esta etiqueta à resina permite a remoção de proteínas inespecíficas em condições estridentes, permitindo a purificação mesmo em condições fortemente desnaturantes (CROWE; MASONE; RIBBE, 1995). Esta etiqueta de histidinas também é utilizada para confirmar a indução da expressão da proteína recombinante através de anticorpos monoclonais anti-histidina por ensaio de *Western blot*. O mapa do vetor pDESTTM17 está ilustrado na Figura 17.

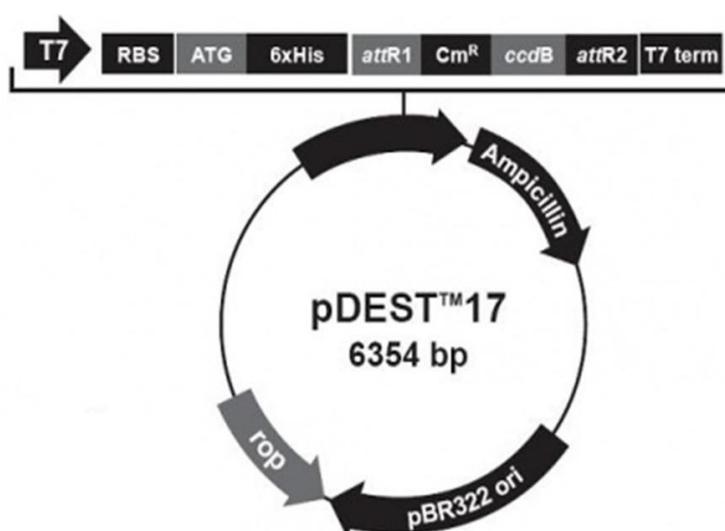


FIGURA 17 MAPA DO VETOR pDESTTM17 (INVITROGEN) DE EXPRESSÃO DE GENES EM BACTÉRIAS T7: Promotor de T7 RNA Polimerase. RBS: Região de ligação ao ribossomo. ATG: Códon de início. 6xHis: Etiqueta de histidinas N-terminal. sítios *attR* (*attR1* e *attR2*): região de recombinação LR com vetor de entrada pDONR. Cm^R: gene de resistência ao cloranfenicol. *Ampicillin*: gene de resistência à ampicilina. *ccdB*: gene que permite seleção negativa do pDESTTM17. T7 term: região de término da transcrição (FONTE: Catálogo *Gateway® Technology* Invitrogen).

Os genes de TcFOP-like e TcAPI5-like previamente clonados em pDONRTM221 (pDONR-TcFOP-like e pDONR-TcAPI5-like) foram transferidos para o vetor pDESTTM17, conforme instrução do manual do fabricante. Após a reação de recombinação, bactérias *E. coli* DH5- α cálcio-competente foram transformadas e plaqueadas em meio LB-ágar adicionado de 100 μ g/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor pDESTTM17, conforme descrito no item 4.6.4.2 e incubadas por 16 horas a 37 °C. Após a obtenção de colônias isoladas, estas foram selecionadas para análise por PCR de colônia, descrito no item 4.6.4.3, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de cada sequência para a verificação de cada clonagem em vetor pDESTTM17.

Após a confirmação da clonagem por PCR de colônia, as colônias correspondentes aos clones positivos selecionados foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e posteriormente incubadas a 37 °C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi submetida à centrifugação a 13.000 x *g* por 2 minutos à temperatura ambiente e a minipreparação do plasmídeo foi realizada através do sistema *Qiaprep*[®] *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos provenientes dos clones selecionados foram utilizados para transformação de *E. coli* da cepa de expressão BL21(DE3) pLysS. Esta bactéria contém um gene codificante para a RNA polimerase T7 sob controle do promotor *lacUV5*. O IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), um análogo sintético da lactose, liga-se ao repressor do operon *lacUV5* e permite que a RNA polimerase se ligue ao promotor *lac*, possibilitando a expressão da polimerase T7. Esta enzima se liga ao promotor T7 presente no vetor pDEST™17, possibilitando a expressão do inserto presente no vetor. O plasmídeo pLysS presente nesta cepa confere resistência ao antibiótico cloranfenicol e codifica para a produção da lisozima T7, que impede a expressão da RNA polimerase T7 na ausência do IPTG, o que inibe a expressão basal da proteína recombinante.

4.7.2 Teste de indução com IPTG da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Uma colônia de *E. coli* da cepa BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pDEST-TcFOP-like ou pDEST-TcAPI5 foi inoculada em 2 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de clorafenicol e incubada a 37°C sob agitação constante de 200 rpm durante 18 horas.

Após o período de incubação, 400 µL desta cultura foram transferidos para 4 mL de meio LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e 34 ng/mL de clorafenicol. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até atingir a D.O. 600 de 0,6 e então acrescido 1 mM de IPTG à cultura e a incubação prosseguiu por mais 3 horas nas mesmas condições.

Para o controle da indução da expressão das proteínas recombinantes, culturas sem a adição de IPTG foram mantidas nas mesmas condições. Células destas culturas foram sedimentadas a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de amostra para proteínas. As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), conforme item 4.5.2.

4.7.3 Enriquecimento das proteínas recombinantes através de lavagens com uréia e purificação de proteínas através de coluna de Ni-NTA e gel preparativo

Após o período de indução com IPTG da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, em volume de 200 mL de LB, as células foram submetidas à centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado com PBS e suspenso em 5 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 2%). A lise das células foi realizada por sonicação através de 5 ciclos de potência 4 por 15 segundos, seguido de centrifugação a 7.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado e o sedimento foi suspenso em tampão de ligação (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Uréia 8 M, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM), realizada novamente sonicação através de 5 ciclos de potência 9 por 15 segundos.

Um volume total de 5 mL da fração enriquecida foi incubado com 1 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) sob leve agitação por 45 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação o material não ligado à resina foi coletado por gravidade e a resina foi incubada com os diferentes tampões de lavagem utilizando o gradiente de imidazol nos tampões de lavagem (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Uréia 8 M, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, 50 mM, 100 mM ou 300 mM) e eluição de proteínas recombinantes (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Uréia 8 M, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM). Foram aplicadas amostras em gel SDS-PAGE, conforme item 4.5.2, para a verificação da purificação das proteínas recombinantes.

4.7.3.1 Purificação de proteína por gel preparativo

Devido à baixa eficiência de purificação por este tipo de cromatografia para a proteína TcFOP-like, uma alternativa utilizada foi a estratégia de misturar as frações eluídas da resina para aplicar em um gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE). Nessas frações eluídas foram adicionadas tampão de amostra de proteínas em volume final de 5 mL e aplicadas em uma única canaleta. Após corrida, o gel foi incubado em solução de KCl 100 mM gelada e a região correspondente à proteína recombinante foi retirada do gel, eluída em PBS 1x e dialisada.

4.8 OBTENÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL ATRAVÉS DE INOCULAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CAMUNDONGOS BALB/c

4.8.1 Teste do soro pré-imune

Antes de iniciar as imunizações com as proteínas purificadas, foi necessário avaliar se os soros dos animais apresentavam anticorpos que pudessem ter reações com proteínas presentes no extrato de *T. cruzi*. Para realizar este teste, foi retirada uma alíquota de 100 µl de sangue periférico pela cauda de cada camundongo. Este foi incubado a temperatura ambiente por 15 minutos e a 37°C por 15 minutos, e posteriormente centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (soro pré-imune) foi coletado e transferido para outro tubo, que foi armazenado a -20°C.

O antissoro foi testado por *Western blot*, conforme descrito no item 4.9, contra extrato protéico de *T. cruzi*.

4.8.2 Inoculação das proteínas recombinantes em animais para a obtenção de antissoro

Foram utilizados 6 camundongos isogênicos, com mais de 40 dias de vida, da linhagem Balb/c provenientes do biotério do ICC para produção dos anticorpos policlonais. Durante o experimento todos os animais foram alimentados com ração

comercial pelletizada e água *ad libitum*, e mantidos em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, e temperatura ambiente entre 23°C ± 2°C. Adicionalmente, os experimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz com licença de número LW-15/13.

Para produção dos antissoros cerca de 10 µg de proteína por camundongo foram emulsionados ao adjuvante de *Freund* (Sigma) completo, na primeira inoculação, para otimizar a imunogenicidade. Foram realizadas quatro inoculações intraperitoneais em condições semelhantes, intercaladas por um período de 10 dias entre elas. Uma semana após a 4ª inoculação, uma alíquota de 100 µl de sangue foi retirada através da cauda para teste de reatividade o soro contra extrato de *T. cruzi*.

Ao se verificar a produção de anticorpos, os animais foram anestesiados com solução de anestésico e sedativo cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina (Vetaset®) na concentração de 100 mg/kg de ketamina; 1 mg/kg de xilazina, administrado em um volume de 0,1 ml/10 g de peso animal por via intramuscular. Após sinais visíveis de anestesia constatados por reflexo óculo motor e reação ao pinçamento das patas posteriores, realizou-se o procedimento de punção cardíaca para a retirada do soro pós-imune (~de 1 ml /animal). Após esse procedimento, e ainda sob o efeito da solução anestésico-sedativa, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As amostras de sangue total obtidas foram centrifugadas por 5 min/3000 rpm para obtenção dos soros pós-ímenes utilizados para se avaliar a soroconversão dos animais. O soro foi alíquotado e armazenado a -20°C até sua utilização.

4.9 ENSAIO DE WESTERN BLOT (TOWBIN, STAEHELIN E GORDON, 1992)

As proteínas separadas em gel SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) através de voltagem de 20 V por 16 horas a 4 °C em tampão de transferência para *Western blot* (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi então corada com solução de Ponceau S para verificação da transferência, posteriormente descorada em água bidestilada e incubada em solução de bloqueio (PBS 1X; Tween 20 0,05%; leite em pó desnatado 5%) por uma hora com leve agitação a temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado anticorpo primário específico na diluição desejada, e a incubação foi mantida por uma hora a 37 °C com leve agitação. Para revelação por fosfatase alcalina, após a incubação do anticorpo primário, a membrana foi incubada por uma hora a 37 °C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou camundongo (Promega) conjugados com a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:10000 em PBS-Tween 0,05% e após o período de incubação, foi novamente lavada por três. A reação imunoenzimática foi revelada com os substratos NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) a 50 mg/ml (Promega) e BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*) a 50 mg/ml (Promega) em tampão da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Após a revelação, esta reação foi interrompida por solução de EDTA 100 mM.

Para revelação por fluorescência, a membrana de nitrocelulose incubada previamente com os anticorpos primários, foi incubada por uma hora a 37°C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de camundongo ou coelho conjugados com fluoróforo, que quando excitados em um comprimento de onda específico (700 ou 800 nm) produzem fluorescência. As imagens foram obtidas no aparelho Odyssey (*Li-cor*)

4.10 OBTENÇÃO DE TRANSFECTANTES

A metodologia de expressão de proteínas fusionadas à GFP e ou PTP em *T. cruzi* é uma abordagem paralela à utilização de anticorpos, que tem como objetivo a localização de proteínas através da detecção da etiqueta, seja por fluorescência direta, no caso de GFP, ou imunofluorescência indireta, com uso de anticorpos que reconhecem a etiqueta PTP. A obtenção dos transfectantes também possibilitará os ensaios de imunoprecipitação de complexos proteicos contendo TcFOP-like e TcAPI5-like.

Os genes de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP, TcFOP-like Δ UBM e TcAPI5-like clonados em pDONRTM221 da plataforma *Gateway* (Invitrogen) foram recombinados em vetores de destino pTcGWGFPN (BATISTA et al, 2010) e pTcGWPTPN (KUGERATSKI et al, 2015), que respectivamente contém as sequências de GFP e PTP para expressão destas etiquetas na extremidade N-terminal da proteína em *T. cruzi*, o mapa dos vetores estão ilustrados nas figuras 18 e 19.

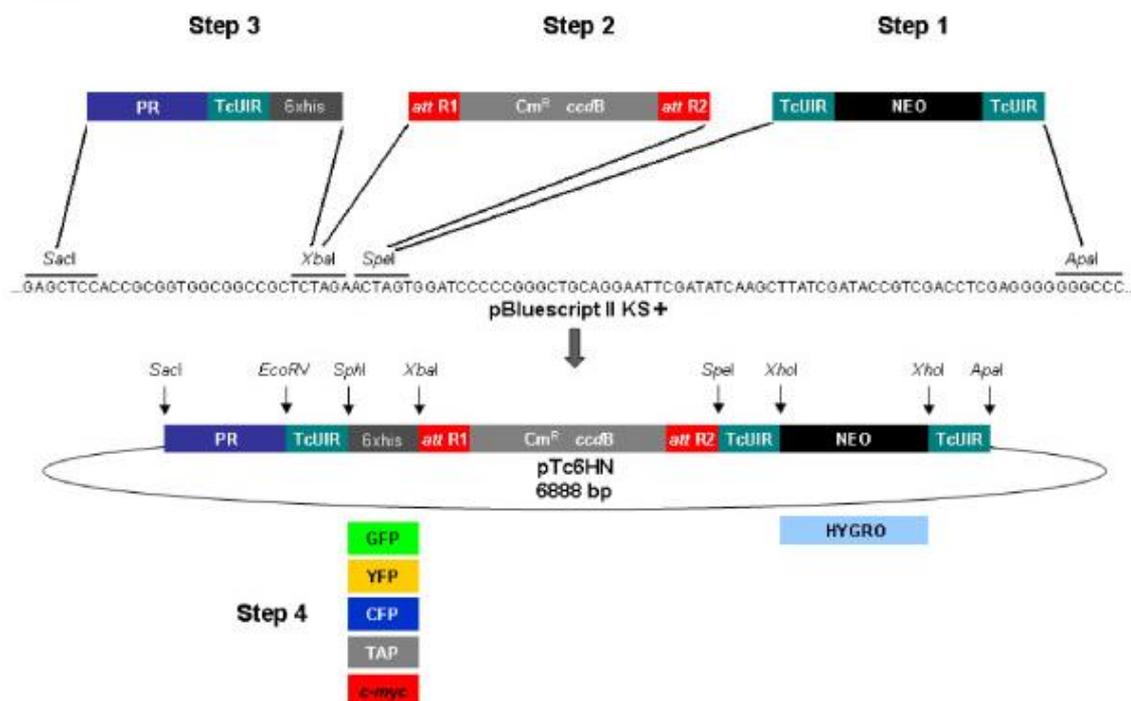


FIGURA 18. DESENHO ESQUEMÁTICO QUE MOSTRA OS PASSOS DA CONSTRUÇÃO DO VETOR pTcGWGFPN. Os elementos NEO e HYGR0: são respectivamente os genes de resistência a neomicina e a higromicina. TcUIR: lócus região intergênica ubiquitina do *T. cruzi*. attB1, attB2, attR1 e attR2: locais de ligação e recombinação para os Gateway. CMR: gene de resistência a cloranfenicol. ccdB: gene de selecção negativa durante a clonagem. 6xHis, GFP, YFP, PCP, TAP e c-myc: marcas de fusão. PR: promotor ribossomal. (BATISTA et al, 2010)

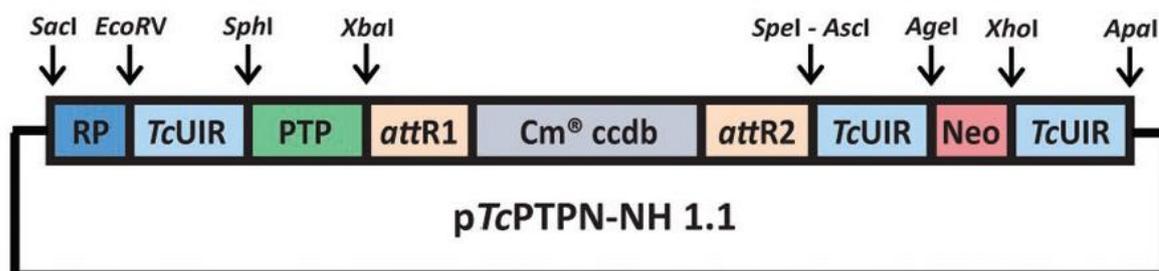


FIGURA 19. MAPA DO VETOR pTcPTPN. As setas indicam os locais de restrições que flanqueiam cada elemento dos vetores. attR1 e attR2: pontos de ligação necessária para recombinação Gateway®. ccdB: gene para a selecção negativa; Cm[®]: gene que confere resistência a cloranfenicol. NH: fusão amino terminal. RP: promotor ribossomal. PTP: etiqueta utilizada (ProtC -TEV – ProtA). Tc: *Trypanosoma cruzi*; TcUIR : região intergenica de *T. cruzi*. Adaptado de KUGERATSKI et al, 2015.

As reações de recombinação foram usadas para transformar bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes, como descrito em no item 4.6.4.2. As colônias crescidas em meio sólido, contendo o antibiótico apropriado, foram analisadas através de PCR de colônia, descrito no item 4.6.4.3, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de

específicos de cada reação. Após confirmação dos clones positivos, os plasmídeos recombinantes foram purificados através do sistema *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), e os clones denominados da seguinte forma: pTcGFP-FOP, pTcGFP- Δ FOP, pTcGFP- Δ UBM, pTcGFP-API5, pTcPTP-FOP, pTcPTP- Δ FOP, pTcPTP- Δ UBM e pTcPTP-API5. Estes plasmídeos foram purificados em maior escala através do *Hi-Speed Plasmid Mid Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, e 50 μ g dos plasmídeos foram utilizados para a transfecção por eletroporação de *T. cruzi*.

4.10.1 Transfecção e seleção de parasitas

4.10.1.1 Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção de transfectantes

Para cada transfecção, um total de 1×10^8 formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram coletadas por centrifugação por 10 minutos a $4.000 \times g$ a temperatura de 4°C , lavadas com PBS estéril e suspensas em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida, 4×10^7 células desta suspensão foram coletadas e transferidas para cubeta de eletroporação de 0,2 mm pré-resfriada em gelo. Foram adicionado 50 μ g do plasmídeo às células, e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo.

A mistura foi submetida à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500 μ F em eletroporador GenePulser[®] II Apparatus (Bio-Rad) e mantida por mais 10 minutos no gelo. Como controle, foi realizada a eletroporação de células sem adição de plasmídeo recombinante.

Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm^3 contendo 10 mL de meio LIT adicionado de 100 μ l de solução de penicilina + streptomomicina (10000 U de penicilina + 10000 μ g de streptomomicina / mL) e incubadas a 28°C durante 24 horas. Após este período, o processo de seleção dos parasitas foi feito pela adição de 500 μ g/mL de G418. Aproximadamente após 5 dias da adição da droga, foi feita uma diluição de 1:10 dos parasitas em meio LIT contendo 500 μ g/mL de G418.

As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que se observou a inibição total do crescimento celular na cultura controle.

4.11 ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Todos os experimentos foram realizados num citômetro de fluxo BD FACSAria™ II (plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz – PR). Um total de 20.000 eventos foi adquirido e análise de dados foi realizada usando o software FlowJo (*software* Treestar).

4.11.1 *Single Cell Sorting* para seleção de clones

Em uma placa de petri estéril, adicionou-se 10 mL de meio LIT acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, 10 µg/mL de gentamicina, penicilina/streptomicina 1x e 500 µg/mL de G418. Após homogeneização, com o auxílio de uma pipeta multicanal, transferiu-se o conteúdo para uma placa de 96 poços, onde cada poço recebeu o equivalente a 100 µl da solução. 10^6 parasitas na forma epimastigota em crescimento exponencial foram diluídos em 1 mL de PBS 1x e a separação em células individuais por poço foi realizada em citometro de fluxo.

4.11.2 Ciclo Celular

Um total de 10^6 células foram coletadas, lavadas em PBS 1x e ressuspensas em 500 µL de solução de coloração de DNA contendo Tris-HCl 0,425 mM, iodeto de propídio 9,375 µM, NP40 0,0125%, NaCl 1,25 mM e 8,75 U / L de RNase A. As células foram quantificadas imediatamente após seu preparo. O algoritmo Dean-Jett-Fox do software FlowJo foi usado para estimar a porcentagem de células nas fases G0 / G1, S e G2 / M do ciclo celular.

4.12 MICROSCOPIA ÓTICA

4.12.1 Imunofluorescencia indireta

As lâminas foram preparadas com 0.1% poli-L-lisina e os parasitas foram centrifugados a 2.000 x g, lavadas duas vezes e suspendidos em PBS 1x.

Posteriormente, foram fixados em para-formaldeído 4% e aderidas por 20 minutos nas lâminas previamente preparadas e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, e então foi adicionada uma solução de Triton X-100 0,1% durante 90 segundos para a permeabilização dos parasitas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e bloqueadas com PBS-BSA 1% por 16 horas a 4 °C em câmara úmida. Após o período de bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37 °C com anticorpo primário produzido em coelho ou camundongo, diluído 1:500 em PBS-BSA 4%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora a 37 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho e/ou de camundongo conjugado com Alexa 594 e/ou Alexa 488 diluído 1:600 em PBS-BSA 4%. Para a coloração do material genético nuclear e do cinetoplasto foi acrescentado DAPI (5 mg/ml) em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS. Foi então adicionado N-propil-galacto 0,1 M e as lâminas foram lacradas utilizando lamínula de microscopia e selador. As lâminas foram analisadas na plataforma de microscopia do ICC. As imagens bidimensionais foram obtidas no microscópio de fluorescência Nikon 80i com sistema de câmera CoolSnap PROcf (Media Cybernetics) e análise com Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics). As imagens com maior resolução foram obtidas a partir do microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

4.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

4.13.1 Processamento para Lowicryl Monostep/Unicryl

Os parasitas na forma epimastigotas em fase de crescimento exponencial foram coletados, lavados com PBS 1x e fixados por 1 hora em temperatura ambiente, em solução contendo 0,1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em tampão Cacodilato 0,1 M pH 7,2. Em seguida, foram lavados 2 vezes em tampão Cacodilato 0,1M (Glutaraldeído 25%, Paraformaldeído 10%, Cacodilato 0,1M e água destilada), centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos. Após lavagens nesse tampão, os parasitas foram desidratados a -20°C em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2X em 100%) por 1 hora em cada etapa.

Em seguida, o material foi infiltrado em resina Lowicryl a -20°C, nas condições: etanol 100% resina (1:1) por 16 horas. Posteriormente, o material foi

incluído em resina pura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a polimerização da resina foi realizada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, sob luz UV. Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrotomo Leica Reichert Ultracuts.

Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel e incubados durante 30 minutos com PBS 1x pH 7,4 para hidratação dos cortes. Após hidratação os cortes foram incubados por 45 minutos em solução de cloreto de amônio 50 mM diluído em PBS 1X para bloquear ligações inespecíficas a grupamentos aldeídicos livres.

Os cortes foram lavados por duas vezes durante quinze minutos cada lavagem, com solução de PBS 1x Tween 0,01% BSA 1,5%. Após lavagem, os cortes foram incubados à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com anticorpo primário (anti TcFOP-like ou anti TcAPI5-like), diluídos em PBS 1x Tween 0,01% BSA 1,5%, numa diluição de 1:50 por no mínimo 1 hora. Os cortes foram lavados por duas vezes durante quinze minutos cada lavagem, com solução de PBS 1x Tween 0,01% BSA 1,5%. Os cortes foram incubados à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com o anticorpo secundário marcado com partículas de ouro coloidal diluído em PBS 1x Tween 0,01% BSA 1,5%, numa diluição 1:50 por no mínimo 1 hora. Os cortes foram lavados por duas vezes durante quinze minutos cada lavagem, com solução de PBS 1x Tween 0,01% BSA 1,5% seguido de nova lavagem com água destilada por 10 minutos (2 vezes). A contrastação foi realizada durante 20 minutos com acetato de uranila (5% em água) e 1 minuto em citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM-1400Plus operado de 80 a 100 kV. O processamento das amostras e as fotos foram realizados na plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas (PDTIS/ Fiocruz).

4.14 SILENCIAMENTO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi) DE GENES DE *T. brucei* ORTÓLOGOS AOS GENES IDENTIFICADOS EM *T. cruzi*

4.14.1 Escolha dos alvos para os ensaios de RNAi

4.14.1.1 TbFOP-like (Tb927.6.1470)

Com o auxílio da ferramenta RNAit da base de dados do Trypanofan - Genômica funcional de *T. brucei* (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>) (REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003), foi escolhida uma região de 546 pb do mRNA para alvo nos ensaios de RNAi para TbFOP-like.

Na extremidade 5' dos iniciadores da região TbFOP-like foi inserido o sítio de restrição para a enzima *Xba*I (NEB) ambos os casos com estratégia de clonagem no vetor p2T7-177. As regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores e as respectivas sequências estão ilustradas na Figura 20.

```

5' ATGCGCCGAGACGACTTCGACCCGAGGCGTCTTCGCGACTTGTACGACCCGGAACGTGCGCCGCGTCC
GGGCACTTGCTGAAGCGCGGGATCAACGAAGAAGTGACAGGGAAGATGATCTCCAGCACCACGTCGCT
ACCTTGTCAGTGAGCGCCGGACACGGCTTGAGGGTTTCGGGTATGGTGACCCAGGTCCGCAGAAGCC
GCCGTTCCCGAGATGGGGAACGTAGCCGACGCTTCAGCGACCCGGCGCCTCTTCCGACGCAGTGCTGCGG
ACCGCTTTGCGCGGGATGAGGACATTGAGCGGCAGCTGCGTCGCGAGCGGAGGGAACGTTTGCTCCGCC
TGGAACGACTTGAACGACTCGAGCGCTTGGAGCGCCGTGATCGTCTGCGTGAGCGGTTGCCTCTGCGCG
GCGGAGTGCCATGGGCCGTCTTCGTCGGCGTCTGGTGGAAGGGAGGCGACGCAGACTTCAACGCGAGA
ACGACCGCCAGCGGCCCCAGCAGCAACCTCAGCGCAGGAAACTGGATGACGAACTGTTACAACGTACCA
ACCGCTCCTCCCGTGGAGGCAACAACCTCCGCACACAATAAAAAAGAAGGGGCTCGCAGAAGTGGGCCCA
TGACGCGCGAGGGTCTTGATGAGCAGTTGGATCGGTTCCGAGGGGCGGCTTGA 3'

```

FIGURA 20. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbFOP-like. Sequência de nucleotídeos do gene TbFOP-like (GenBank Gene ID Tb927.6.1470). As letras em vermelho delimitam a região escolhida através da ferramenta RNAit, utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R), destacados em verde.

4.14.1.2 TbAPI5-like (Tb927.7.2240)

Também com o auxílio da ferramenta RNAit (REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003), foi escolhida uma região 524 pb do mRNA como alvo para os ensaios de RNAi para TbAPI5-like. As regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores e as

```

5' ATGCCGGTTAAGAAGAAGGTTGCAACCGCAAAGAATGATGAAAAGGAGGATCTCACCACCTCCCCGG
TGATGGCAGCAGAAACGACGCCGACTGCGTCTTCGCCAACATGCAACATTTGGACACCCCTCAAGGCA
CAACTTCCGCCTCCGAATTGTACGCCGTGCTGCAGGCTGCCGTTGCGGAAGATCCCGCGAAGGTGAACG
ATTTTCGCTGAGGAAATCGCACAGACGTTTGTAGAGGCAGAGAAGGCGGAAACTCCACTGCTGCTGCGCG
TGAGGATGCTCGAGTTCTTTGCGAAATACGGACAGCATATGCGCGACGGTAATGCACTCAAAAAGGTGG
TTACCTCTCTCGTGAAAATACTCAGCGGACCCGATAATAACCAACAGTTGTTGGTTGCGGCAGTGCAGG
GCATTGCTGCGCTCGGTCCCGTTTCCATGCTCGATAAAAAATGGGAGTACCTGTCCCGTGAGGGGGCGG
ATGTGTTGATGCAGGTGATGATTGACGAAAACGGCTTTGCTGAACCTGTTTCGTTTCAGCAGCCTCAAAGG
CGCTGGATACACTCGTAAGCACGGCGTTTCGTCCGGTTGTCACAAAACACTGCTACATTGGTTAAGCGATG
ATCGTGAAGCCGAGGAAGAGGATCAATTACAGAAGGAACGCCGCACAGCTATGGCTCGTTTGAGGAAGG
TGGCGCAAACGGCATCGTTTCGTCCGCAATGGACAGAGGAAATTCAGGAGCACGTACTCGCTCTCATCA
TCCGTGTTCTCTCTGCTGTTACCATAACAGAGTTTGCCCAACTCGCACGGATAGCAGCGTCACTACCTT
CTGTTGAGGAGAAAAAGGGTTTGCCGCTCCTTACCGCTTTTTTTGGCCAGCACCAAACCTCAACACCGATC
GTGCACTTGAGTCACTCAGTCTGGTTGCACAGCACGTGGGCGCTGTTGCATATGATCTTACCCCTATGC
TAGATGAGGCCGGACTGCTTTCCGCACCGGTCGACGGTACGACAGTTAGGGGAATGTGGCATGCGAAGC
TACTCCTCCTCGCCGCGCTCAGCAACACCTGAAAACACGGACACGCTGTATAAAAACCTTCTTAGAAC
ATGT TATGAACCTTATAGCCGATGGAAC ACGTTGCCCGAGTATTTAACGACGCTTGAGGCATTCTTC
TTGCTCTCACTTCTGTTGGCCAGAAGAACTCTGGATTTTGTA AACAGCTTAAAGACAAACAATTCA
CAGCGAAGTGTCTAATATGCTGGCAGCTGTGGAGAAGGTGGAACCCCTCCTCATCTACGCTGTGAAGC
GACTGGTGCAGAAGTCATCAGCGGGAGCGAAGGAGGCTGAGATGTTGGGTTCTGCCACAACCTCCGCA
TCATTTTGTATCCTTTTCTCCAGTCACATTCCTATGGGCGCCATCACGGAAAGTTGGGCCACAAAC
ACAAGTTGCCGTCCTTCGGCAGGGTCGTGAGGGGCTGCTACCATCCGCTAAGGGAGGGCGTTCTGGCT
ACGACGCTCAGCTTCCAGCAGTTAACAAGAGACCCCGCACTGAATCGAATTACAGGCCGCAGAGCAATA
GAGGGTCCAGCAGAGACCTCCA AGGAAGAAGTCGTGCTTGGAAAGT ATTAA 3'

```

respectivas seqüências estão ilustradas na Figura 21.

FIGURA 21. REGIÃO UTILIZADA PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbAPI5-like. Sequência de nucleotídeos do gene TbAPI5-like (GenBank Gene ID Tb927.7.2240). As letras em vermelho delimitam a região escolhida através da ferramenta RNAit, utilizada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R), destacados em verde.

4.14.2 Amplificação por PCR das sequências alvo para RNAi de TbFOP-like e TbAPI5-like

Para as reações de amplificação por PCR dos fragmentos, foram utilizados 100 ng de DNA genômico de *T. brucei*, em um volume de reação de 20 µL contendo: tampão de reação, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador *F* e *R*, descritos na tabela 4, e *Taq* DNA polimerase 2,5 U (Invitrogen).

TABELA 5. OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES DE TbFOP-like, TbAPI5-like.

Na tabela estão presentes as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores forward e reverse, utilizados para a obtenção dos fragmentos utilizados para os ensaios de interferência por RNA. Em vermelho destaca-se o sítio de clivagem pela enzima *Xba*I (NEB), inserido na extremidade 5' de TbFOP-like e TbAPI5-like

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência Nucleotídica	Tamanho do fragmento	Tm °C
TbFOP-like (Tb927.6.1470)	TbFOP Forward	5' CGCTCTAGA AAGATGATCTCCCAGCACCCAC 3'	546 pb	58 °C
	TbFOP Reverse	5' CGCTCTAGA AACCGATCCAACCTGCTCATC 3'		58 °C
TbAPI5-like (Tb927.7.2240)	TbAPI5 <i>Forward</i>	5' CGCTCTAGA TATGAACCTTATAGGCGATGGAAAC 3'	524 pb	56 °C
	TbAPI5 <i>Reverse</i>	5' CGCTCTAGA ACTTCCAACCACGACTTCTTCCT 3'		61 °C

Para as ampliações dos fragmentos de TbFOP-like e TbAPI5-like foram utilizadas a ciclagem: *holding* de 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, foi adicionado *holding* de 72°C por 10 minutos, que permite a adição de adeninas à extremidade 3' do produto da amplificação necessário para subclonagem em vetor pGEM® – TEasy (Promega).

4.14.3 Clonagem em vetor pGEM-TEasy (Promega)

As reações de ligação entre inserto e vetor pGEM® – TEasy (Promega), foram feitas de acordo com as instruções do fabricante. O mapa do vetor está ilustrado na figura 22.

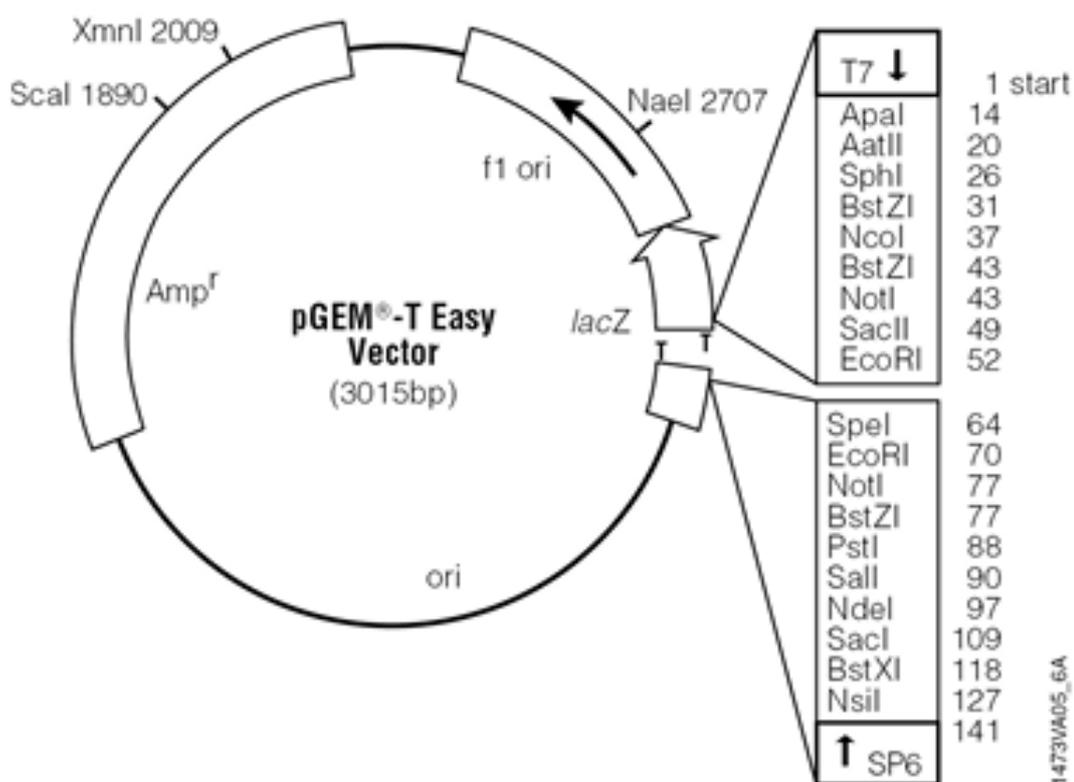


FIGURA 22. MAPA DO VETOR pGEM® – Teasy. T7: Região de iniciação da transcrição por T7 RNA Polimerase. 14-141: Múltiplo sítio de clonagem. SP6: Promotor da SP6 RNA Polimerase. LacZ: Códono inicial de LacZ. Amp^r: Gene de resistência à ampicilina. F1 ori: origem de replicação de bacteriófago filamentoso (FONTE: Manual Promega).

As reações de ligações foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes, como descrito no item 4.6.4. As células transformadas foram

cultivadas em placas de petri com meio LB-ágar acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, IPTG 0,4 mM e X-gal 0,04 mg/mL e incubadas a 37°C por 12 a 16 horas. Neste caso, a seleção dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias, devido à presença ou ausência da expressão da enzima β-galactosidase, cuja expressão é induzida por IPTG havendo degradação do substrato X-gal produzindo um substrato azul. Caso o fragmento seja incorporado ao vetor, a enzima β-galactosidase não é expressa e as colônias permanecem brancas, facilitando a identificação dos clones positivos, que posteriormente foram sequenciados. Algumas colônias brancas foram cultivadas em meio LB/Amp para purificação dos plasmídeos. Os plasmídeos foram purificados usando o kit Qiaprep® *Spin Miniprep Kit* (QIAGEN #27106), conforme o manual do fabricante. Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *Xba*I (NEB). Essa reação foi realizada conforme descrição do fabricante e a reação foi incubada a 37°C por 3 horas.

Após digestão, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.5.1. A região do gel correspondente ao inserto liberado foi excisada e o DNA foi purificado com o auxílio o sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

4.14.4 Clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD et al., 2002)

Os insertos obtidos por meio de clonagem em vetor pGEM® – Teasy (Promega), foram previamente digeridos com *Xba*I (NEB), purificados e então ligados ao vetor p2T7-177, cujo mapa está ilustrado na figura 23.

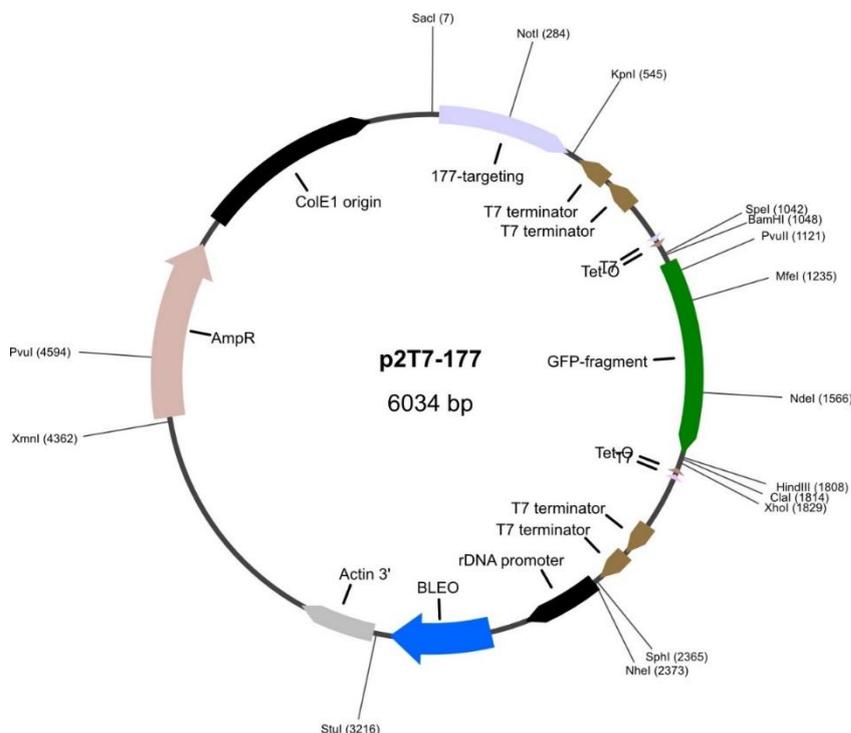


FIGURA 23. MAPA DO VETOR p2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi. T7 prom: Promotor de T7 RNA Polimerase induzido por tetraciclina. T7 term: Terminador de transcrição. 177: Sequência repetitiva de 177 pares de bases para alvo de inserção em minicromossomos. Phleo: gene de resistência à fleomicina. GFP: Proteína *Green Fluorescent Protein*, os sítios para as enzimas de restrição estão indicados. AmpR: gene de resistência à ampicilina (FONTE: WICKSTEAD; ERSFELD, K.; GULL, 2002).

Para as reações de ligação, foram utilizadas a relação de 1:10 pmol de vetor p2T7-177 e inserto. A reação ocorreu com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante. Esta reação foi incubada a 16 °C durante 18 horas e posteriormente utilizada para transformar *E. coli* DH5 α quimiocompetentes, como descrito no item 4.5.4.2. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177. Para a confirmação dos clones positivos, as colônias isoladas foram analisadas por PCR conforme citado no item 46.4.3 utilizando os iniciadores específicos dos respectivos fragmentos.

Os plasmídeos correspondentes aos clones positivos foram purificados através do sistema *HiSpeed® Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), conforme o fabricante.

4.14.5 Clonagem em vetor p2T7-111/LacZ

Alternativamente, foi utilizado um vetor p2T7-177 modificado com inserção do gene LacZ que expressa β -galactosidase e permite a seleção pela coloração de colônias azul ou branca, conforme anteriormente descrito. Assim para clonagem direta do produto de PCR em vetor p2T7-177/LacZ, foi feita uma reação de ligação utilizando a proporção de 50 ng do vetor p2T7-177/LacZ para 500 ng de inserto. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes conforme descrito no item 4.6.4.2, após a confirmação de clones positivos por PCR de colônia, item 4.6.4.3, o DNA plasmidial foi extraído e linearizado com o auxílio da enzima de restrição NotI e transfectado em *T. brucei* conforme descrito no item 4.9.1.2. O mapa do vetor está ilustrado na figura 24.

parasita (WICKSTEAD *et al.*, 2002). Após a digestão o DNA foi precipitado e suspenso em tampão de eletroporação ZPMF para transfecção de *T. brucei*.

Desse modo, o equivalente a 1×10^8 parasitas em fase logarítmica de crescimento foi centrifugado a $5.000 \times g$ por 3 minutos, lavados com 1 ml de tampão de eletroporação ZPMF (129 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM KCl, 8 mM NaH_2PO_4 , 1,5 mM MgCl_2 , 90 μM CaCl_2 , 2,4 mM CH_3COONa pH 7,0), centrifugados novamente nas mesmas condições e suspensos em 450 μL de ZPMF. Os parasitas foram transferidos para a cubeta de eletroporação de 0,4 mm e a quantidade de 10 μg de plasmídeo previamente linearizado foi adicionado. A suspensão celular foi incubada por 10 minutos no gelo, submetida a um pulso de 1,5 kV com 40 capacitância de 25 μF em eletroporador GenePulser II Apparatus (Bio-Rad) e, rapidamente, transferida para 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10% SBF e antibióticos, conforme descrito no item 4.3.2.

Em uma placa de petri, foi misturado 5,5 mL dos parasitas submetidos à transfecção, 5,5 mL dos parasitas não transfectados e 15,5 mL do meio SDM-79 suplementado com Fleomicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Desta mistura, o volume de 250 μL foi transferido para cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços. Os parasitas foram incubados em estufa de CO_2 5% a 28°C por 24 horas. Após este período, foi realizado o repique na proporção de 1:2 em outra placa de 96 poços, contendo a mesma concentração de antibiótico. Os parasitas foram mantidos na estufa de CO_2 durante aproximadamente 10 dias ou até a turbidez do meio, indicando a seleção e o crescimento dos parasitas. A população foi expandida para ensaios posteriores.

4.14.6.1 Indução de RNAi em *Trypanosoma brucei*

A indução do RNAi foi realizada com adição de tetraciclina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diretamente nas culturas de células. Como controle negativo, culturas de células sem tetraciclina foram cultivadas nas mesmas condições.

4.14.6.2 Curva de crescimento tipo “serrote” para *Trypanosoma brucei*

Com intuito de manter a cultura dos transfectantes sempre em fase logarítmica de crescimento, 5×10^6 parasitas/ml foram cultivados durante 24 horas e repicados para a mesma densidade celular inicial durante 5 dias, em meio SDM-79 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, acrescido de G41815 $\mu\text{g/ml}$, Higromicina 50 $\mu\text{g/ml}$, Fleomicina 5 $\mu\text{g/ml}$, em culturas induzidas com tetraciclina e não induzidas. As contagens foram feitas em triplicatas técnicas.

4.15 IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like E TcAPI5-like

4.15.1 Conjugação do *nanobody* anti-GFP as esferas magnéticas (CRISTEA et al, 2005)

Inicialmente, bactérias *Escherichia coli* linhagem Arctic Express (DE3) (Agilent) transformadas com o vetor pET21-peIB-VHH foram utilizadas para a indução, expressão e purificação de *nanobody* recombinante α -GFP, conforme descrito em Fridy *et al.* (2014). Assim, foram utilizados 20 mg de esferas magnéticas Dynabeads® M-270 epoxy (Life technologies) que foram lavados com 1 ml de tampão fosfato pH 8,0 100 mM e suspensas em 100 μl do mesmo tampão fosfato. Foi acrescido *nanobody* anti-GFP ou anticorpo anti-proteína A (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 μg de anticorpo ou *nanobody* para cada mg de esferas magnéticas num volume final de 200 μl . 100 μl de sulfato de amônio 3 M foi acrescido lentamente para evitar precipitação de proteínas. Essa mistura foi incubada, durante 72 horas a 30°C sob agitação constante de 200 rpm. Após isso, foram lavadas sequencialmente com 1 ml de cada solução: tampão fosfato pH 7,4 100 mM; Glicina pH 2,5 100 mM; Tris-HCl pH 8,8 10 mM; Trietilamina 100 mM; solução de PBS; Triton X-100 0,5% em PBS e, novamente, solução de PBS. As esferas foram suspensas em 100 μl de PBS e estocadas a 4°C até o momento do uso.

4.15.2 Preparação do extrato proteico por *Cryogrinding* (OEFFINGER et al, 2007; OBADO et al 2016 b)

O equivalente a 1 g de parasitas (*T. cruzi*) selvagem e expressando a proteína fusionada PTP ou eGFP foi centrifugado a 5.000 x g durante 5 minutos, lavadas em PBS contendo inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche), centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas na solução de PBS remanescente, rapidamente congeladas por gotejamento do *pellet* diretamente em nitrogênio líquido e o tubo foi mantido em gelo seco até total evaporação do nitrogênio. As células congeladas foram lisadas mecanicamente pela técnica de *Cryogrinding* utilizando o moedor vibratório MM 400 (Retsch). Assim, após moagem das amostras, foi obtido um “pó de células” de espessura aproximadamente de 5 µm. Assim, a quantidade de 50 µg do pó foi suspensa em 1 ml de tampão suplementado com inibidor de protease 10 µM E-64, sonicada uma vez em potência 1 por 2 segundos e a mistura foi centrifugada a 20.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo.

4.15.3 Preparação do extrato proteico por lise por detergente

Para a obtenção dos complexos proteicos de *T. cruzi*, 5×10^8 parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 5000 x g e lavados com PBS 1x. As células foram lisadas com 1 ml de tampão de lise seguido por sonicação em potência 20% por 1 segundos no sonicador Ultrasonic Processor (Cole-Parmer). A lise dos parasitas foi verificada em microscópio óptico e o extrato proteico foi obtido por centrifugação a 20.000 x g por 10 minutos a 4 °C.

4.15.4 Isolamento dos complexos proteicos

Diferentes tampões foram testados para otimizar a imunoprecipitação utilizando o extrato proteico em pó ou obtido da lise por detergente. Ao extrato proteico solubilizado nesses tampões, foram adicionados 2 µl da esfera magnética

conjugada, previamente preparado como descrito no item 4.15.1, a suspensão foi incubada sob agitação constante a 4°C durante duas horas. Em seguida, as esferas magnéticas foram lavadas três vezes com o mesmo tampão de suspensão e a eluição foi realizada com 15 µl de tampão de eluição (SDS 2% e 20 mM Tris-HCl pH 8,0) fervido a 72°C durante 20 minutos. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado durante 1 minuto a 10.000 x *g*, o sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma estante magnética, transferido para outro microtubo e analisado em gel SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.5.2, corado pela técnica de coloração por nitrato de prata, conforme o item 4.5.2.2., e por *western blot*.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS TcFOP-like e TcAPI5-like

5.1.1 Análise de conservação das proteínas alvo

Duas sequências de *T. cruzi* identificadas como Tc00.1047053509033.80 (anotada no banco de dados do Tritryp como *hypothetical protein*, e Tc00.1047053511807.280 (também anotada como *hypothetical protein*) estavam altamente representadas nas análises de proteômica como proteínas comuns entre os complexos de Hel45 quanto Sub2, proteínas envolvidas com a exportação de mRNA de *T. cruzi*. Sendo que nas análises de TcSub2 estas proteínas apresentaram os maiores valores de abundância proteica na amostra (emPAI) depois da própria proteína e estavam presentes em três réplicas (INOUE et al, 2017 em preparação). Então, com objetivo avaliar a conservação em outros organismos utilizamos a ferramenta BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997). Em ambos os casos, observamos que estas proteínas são similares somente com proteínas de tripanossomatídeos, conforme ilustrado nas figuras 25 e 26.

No caso de Tc00.1047053509033.80, existem proteínas altamente similares em outras espécies de tripanossomatídeos, com similaridade acima de 76%, sendo que apresentaram alta identidade principalmente na região N-terminal da sequência de aminoácidos. Para outros organismos não foram identificadas proteínas com identidade ou similaridade significativa.

O mesmo resultado vemos para Tc00.1047053511807.280. A análise também aponta para alta similaridade, acima de 62%, apenas com proteínas de espécies de tripanossomatídeos.



FIGURA 25. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS UTILIZANDO A PROTEÍNA Tc00.1047053509033.80 COMO SEMENTE DE BUSCA. Resultado representativo da busca de proteínas similares utilizando a ferramenta BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997), Foram identificadas proteínas similares em *T. cruzi* CL Brener (Segundo alelo), *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*; *Leishmania major*, *T. brucei brucei*; *T. brucei gambiense*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis*. Os valores de identidade e similaridade com TcFOP-like estão indicados na figura.



FIGURA 26. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS UTILIZANDO A PROTEÍNA Tc00.1047053511807.280 COMO SEMENTE DE BUSCA. Resultado representativo da busca de proteínas similares utilizando a ferramenta BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997), Foram identificadas proteínas similares em *T. cruzi* CL Brener, *T. grayi*, *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Leishmania major*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Os valores de identidade e similaridade com TcAPI5-like estão indicados na figura.

Visto que a análise por similaridade não foi suficiente para indicar a função das proteínas, partimos para uma abordagem de busca de domínios. Esta análise foi feita com auxílio da ferramenta hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998).

No caso de Tc00.1047053509033.80, a análise permitiu a predição de um domínio na extremidade C-terminal, denominado *FOP duplication* (VAN DJIK *et al.*, 2010) (FIGURA 27).



FIGURA 27. DOMÍNIO FUNCIONAL DE PROTEÍNA CONTENDO DOMÍNIO FOP DE *Trypanosoma cruzi*. Domínio identificado através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998): o domínio FOP (Friend of PRMT1) foi encontrado na extremidade C-terminal entre os aminoácidos 174 e 207, com e-valor de 7.7e-05.

Este domínio está presente em proteínas FOP (*Friend of PRMT1*) que são proteínas conservadas em fungos, plantas e vertebrados, e apresentam maior conservação na região C-terminal que contém o domínio. O domínio FOP de humanos (FIGURA 28) é constituído por uma região rica em arginina e glicina (RGG box, que são possíveis sítios de metilação para a Proteína Argina Metil Transferase 1 – PRMT1) e por dois motivos de ligação à Uap56/Sub2 (**Uap56/Sub2 Binding Motif**, composto pelos aminoácidos LDXXL, cujo L representa leucina; D, aspartato e X, qualquer aminoácido) (CHANG et al, 2013). Por estas razões denominamos a proteína Tc00.1047053509033.80 de TcFOP-like.



FIGURA 28. CONSTITUIÇÃO DO DOMÍNIO FOP EM HUMANOS O domínio FOP é constituído por uma região rica em arginina e glicina (RGG box, em preto) seguida por dois motivos de ligação à Uap56/Sub2 (em cinza) caracterizados pela sequência de aminoácidos LDXXL onde X é qualquer aminoácido. Adaptado Chang et al, 2013.

O alinhamento das múltiplas sequências ortólogas, utilizando o programa MUSCLE (Edgar et al., 2004), mostrou que domínio FOP de tripanossomatídeos possuiu uma peculiaridade quando comparado com os demais eucariotos (Figura 29). Enquanto em outros organismos o domínio está estruturado com RGG box antes dos motivos UBM, o domínio FOP de tripanossomatídeos é constituído por essa região RGG box flanqueada por dois motivos UBMs, ou seja, ocorre uma inversão da região RGG, conforme ilustrado nas figuras 29 e 30.

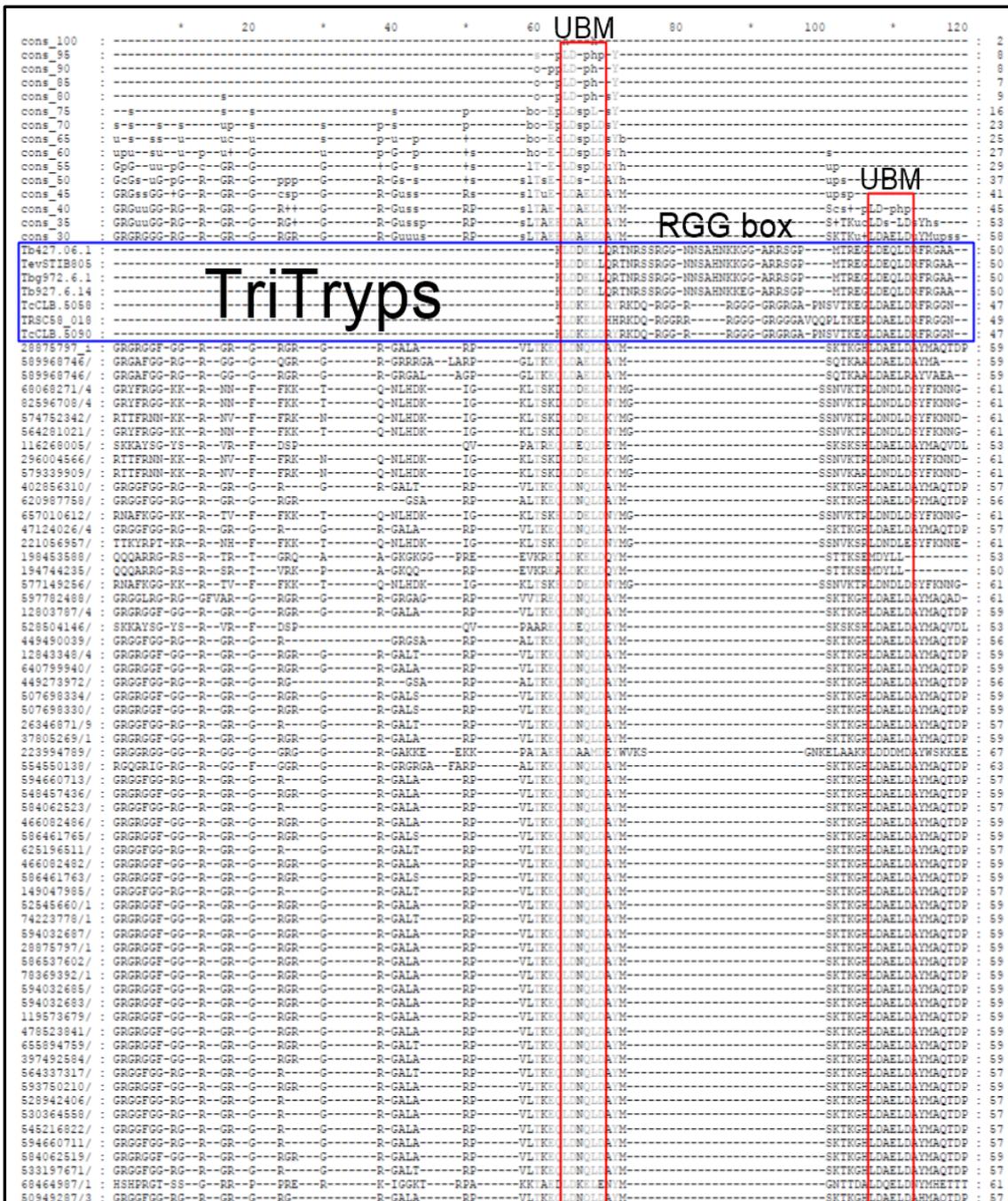


FIGURA 29. ALINHAMENTO DA REGIÃO C-TERMINAL ENTRE PROTEÍNAS QUE CONTEM DOMÍNIO FOP. Destacado em azul estão as sequências de tripanossomatídeos mostrando a peculiaridade da inversão da localização da região RGG. Destacados em vermelho os motivos de ligação a Uap56/Sub2 (UBMs).



FIGURA 30. ESQUEMA DA COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS Tc00.1047053509033.80 (TcFOP-like, DE *T. cruzi*) E HsCHTOP (DE HUMANOS). O domínio (em verde) FOP de tripanossomatídeos é constituído pela região RGG (rica em argina e glicina) flanqueado por dois motivos UBMs (de ligação à Uap56/Sub2), caracterizados pela sequência de aminoácidos LDXXLD onde X é qualquer aminoácido). Enquanto que HsCHTOP apresenta os motivos UBMs duplicados e localizados em sequência na extremidade carboxi-terminal.

No caso de Tc00.1047053511807.280, a análise em banco de dados Pfam (FINN et al, 2014) permitiu a predição de um domínio API5 (*Apoptosis Inhibitory 5*), conforme ilustrado na figura 32.

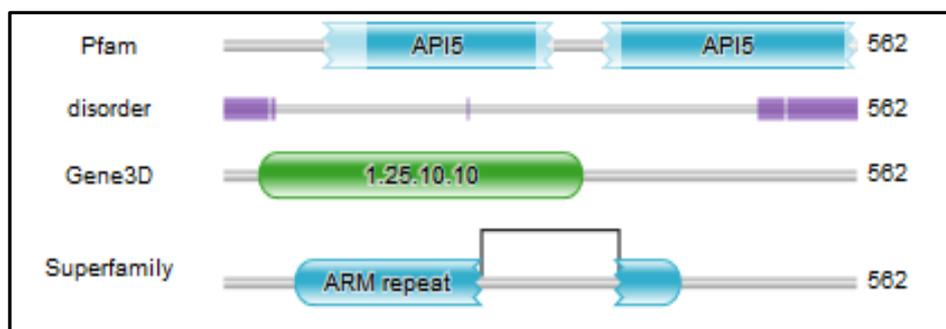
API5 de humanos é um gene que codifica uma proteína que atua como fator anti-apoptose. O gene está localizado no cromossomo 11 e a proteína é superexpressa em células cancerígenas, cuja expressão impede a morte celular programada que ocorre após a privação de fatores de crescimento (ESPOSITO et al, 1999; TEWARI et al, 1997, HAN et al, 2012). A proteína é rica em repetições HEAT e ARM (HAN et al., 2012). Essas repetições ARM também foram observadas em Tc00.1047053511807.280 (Figura 31) e são características de proteínas como β -cateninas e importinas (TEWARI et al., 2010).

Alinhando as sequências TcAPI5-like e API5 de humanos observamos baixos índices de similaridade e identidade (34,5% e 18,7% respectivamente) FIGURA 31). Entretanto, utilizando a ferramenta PHYRE2 (KELLEY & STERNBERG, 2009) foi possível realizar a modelagem molecular de Tc00.1047053511807.280, o que mostrou conservação estrutural com API5 de humanos (Figuras 32 e 33). A estrutura gerada revelou regiões helicoidais repetitiva do domínio TcAPI5-like, tipicamente relacionadas a módulos de interação proteína-proteína (Figura 33).

TcAPI5-like	MAPKRRNASAAAAAKETECAPAEVTTTTPPTSPQTSPSACNAVELLAILQAAVSDFVLNDFVRELLQALSDAEC	80
HsAPI5	MPTVELLYRNYGILALTEVG-----QHKDAYQVILGKGTKEKRLEAQFIPKFFHFPLEDSAINAQLDL-----C	71
TcAPI5-like	EDAPLRVTTFISYGQHVRDGNALKRVTSLVKLSGSDTPQLVAAVQGLSSLGPSVDRKWEYLSREGADL	160
HsAPI5	EDEDSRRAIEPEAT-----GENERADILLQLQTDSAEFNLVN-----NALLSFKDARKSTLG-----F	137
TcAPI5-like	MQVLLEGFAESVRAASKALDLIQIAFREVVILHWISNRETDEDLKKERRMLRLKLAHTPSLQCQWTEE	240
HsAPI5	SQLLQGEIVRERAIFLSTKLKLPDEVLTKEVELLTBSKVLEVTGEFVLFMKILGLSLQTVSGRQLVELV	217
TcAPI5-like	VQEHVSLIVRVLPTVTVQEFQETSIASLPIVRAEGVFFKAFLAQNAINDRLESSIGEHGATPYDIVPLE	320
HsAPI5	APCADLEQTFNFSDPDCVDRLQCTRCAMPLESKNVHS-TRFTMECEQVLENLGTTTPEGDIQ-----EVIKLIA	291
TcAPI5-like	EAGLLTTPEKNTARGWHAKVLLLARLATPNIKLYNAVIELAHVMHDGSALPENMTHEVLLFAVMAAGKKPVE	400
HsAPI5	MSSFCGDEKLETN-RKLFDRLLEYMPLEPEANGENAENEPK-----LQFYECLLYSFHQLGKIPDF	360
TcAPI5-like	LKYLNDAFVAKCGLAELVAQEPLLIYAVKRMQSAGQKDAEVGCCENVRVLLAFSAKHPTGLTESWHR	480
HsAPI5	TAKLNAKLKDFKREQYFARGLQ-----VYIRQLLLQGKIGEAKTERKIKVLKITNNVLIRDLFHPP	434
TcAPI5-like	KLFVKHRDPAATATTTAGIAGAAGQLGVLHPPPGEEHAKRREQEGYKNVRNKGENENGHYRRRGE	560
HsAPI5	YKSVILWFEVQKVIGKRASELTTG-----SPEKKSAGEKADRQIYPPGKYSNIGNN-----YIRLOGK	504
TcAPI5-like	VY	562
HsAPI5	--	504

FIGURA 31. ALINHAMENTO ENTRE TcAPI5-like E API5 de humanos (HsAPI5). Em preto destacam-se as regiões idênticas e em cinza as regiões similares. Sendo seu índice de similaridade 34,5% e identidade 18,7%

A



B

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c3v6aA	Alignment		100.0	17	PDB header: apoptosis inhibitor Chain: A; PDB Molecule: apoptosis inhibitor 5; PDBTitle: helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-2 protein interaction modules
2	c3u0rA	Alignment		100.0	18	PDB header: apoptosis inhibitor Chain: A; PDB Molecule: apoptosis inhibitor 5; PDBTitle: helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-2 protein interaction modules
3	c4imiA	Alignment		96.7	17	PDB header: hydrolase Chain: A; PDB Molecule: symplekin; PDBTitle: novel modifications on c-terminal domain of rna polymerase ii can2 fine- tune the phosphatase activity of ssu72.
4	c3odsA	Alignment		93.4	22	PDB header: protein binding Chain: A; PDB Molecule: symplekin; PDBTitle: crystal structure of the k185a mutant of the n-terminal domain of2 human symplekin
5	c3odrA	Alignment		86.6	22	PDB header: protein binding Chain: A; PDB Molecule: symplekin; PDBTitle: crystal structure of the n-terminal domain of human symplekin
6	c3o2qD	Alignment		84.4	22	PDB header: hydrolase Chain: D; PDB Molecule: symplekin; PDBTitle: crystal structure of the human symplekin-ssu72-ctd phosphopeptide2 complex
7	c2qnaA	Alignment		80.4	15	PDB header: transport protein Chain: A; PDB Molecule: importin subunit beta-1; PDBTitle: crystal structure of human importin-beta (127-876) in complex with the2 ibb-domain of snurportin1 (1-65)

FIGURA 32. DOMÍNIOS FUNCIONAIS E MODELAGEM MOLECULAR DE TcAPI5-like DE *Trypanosoma cruzi*. (A) Identificação de domínios funcionais de Tc00.1047053511807.280 através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998): o domínio API5, repetições ARM, o que inclui esta proteína na superfamília 1.25.10.10). (B) Identificação de proteínas estruturalmente semelhantes ao modelo molecular predito de TcAPI5-like.

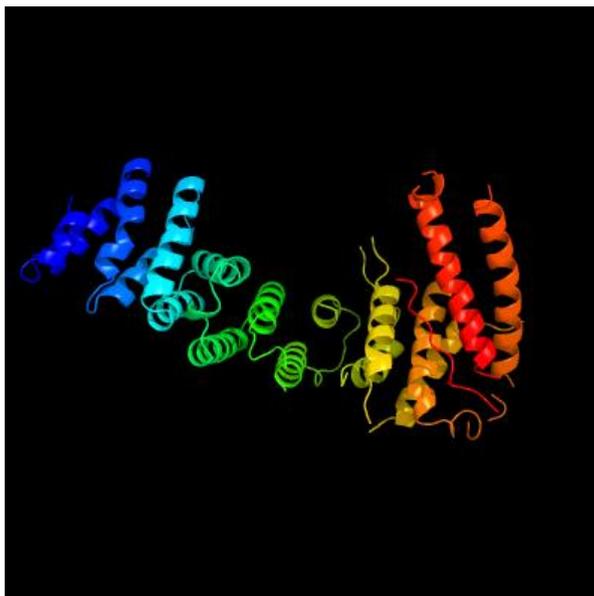


FIGURA 33. MODELO 3D DE TcAPI5-like. Predição estrutural 3D baseado na conservação de estrutura secundária feita através do programa Phyre2 (KELLEY & STERNBERG, 2009). A estrutura helicoidal repetitiva do domínio TcAPI5-like revelam os módulos de interação proteína-proteína.

Em resumo, como já explicado acima, em função da presença de domínios conservados, resolvemos por uma questão didática denominar as proteínas deste estudo como TcFOP-like (Tc00.1047053509033.80) e TcAPI5-like (Tc00.1047053511807.280).

5.2 TcFOP-like e TcAPI5-like SÃO PROTEÍNAS NUCLEARES EM *T. cruzi*.

Com o objetivo de avaliar a localização celular das proteínas alvo, duas abordagens foram utilizadas: a produção de anticorpos policlonais e a expressão de proteínas fusionadas a etiquetas em *T. cruzi*. As linhagens expressando as proteínas fusionadas também podem ser utilizadas para os testes de padronização de ensaios de isolamento dos complexos proteicos por cromatografia de afinidade. Logo, vetores foram construídos com a sequência dos genes TcFOP-like e TcAPI5-like tanto para produção de anticorpos quanto para expressão ectópica em *T. cruzi*.

Para entender o papel e a importância do domínio FOP para funcionalidade da proteína e sua interação com TcSub2, foi obtido um vetor contendo a sequência de TcFOP-like, com a deleção do domínio FOP (ver materiais e métodos para estratégia da mutação) para expressão em *T. cruzi*. Esta construção foi denominada

de TcFOP-like Δ FOP. Pretende-se usar esta proteína mutada para ensaios de imunoprecipitação e verificar se a interação com TcSub2 é perdida.

5.2.1 Clonagem em vetor de entrada da plataforma Gateway

Para todas as abordagens, produção de anticorpos e obtenção de linhagens expressando proteínas com etiquetas, a etapa inicial focou na clonagem das sequências em vetor de entrada da plataforma Gateway, pDONRTM221 (Invitrogen).

Os *amplicons* obtidos estão ilustrados na figura 34. Na figura 34A pode-se observar que foram amplificados o fragmento de 633 pares de bases, correspondente ao gene de TcFOP-like selvagem, e 516 pares de base, correspondente ao fragmento do gene com a deleção do domínio FOP (TcFOP-like Δ FOP), vale lembrar que os oligonucleotídeos iniciadores e a metodologia utilizada para deleção da referida sequência está descrita no item 4.6.2.1, e na figura 34B, observa-se que foi amplificado um fragmento de aproximadamente de 1689 pares de bases correspondente ao gene de TcAPI5-like.

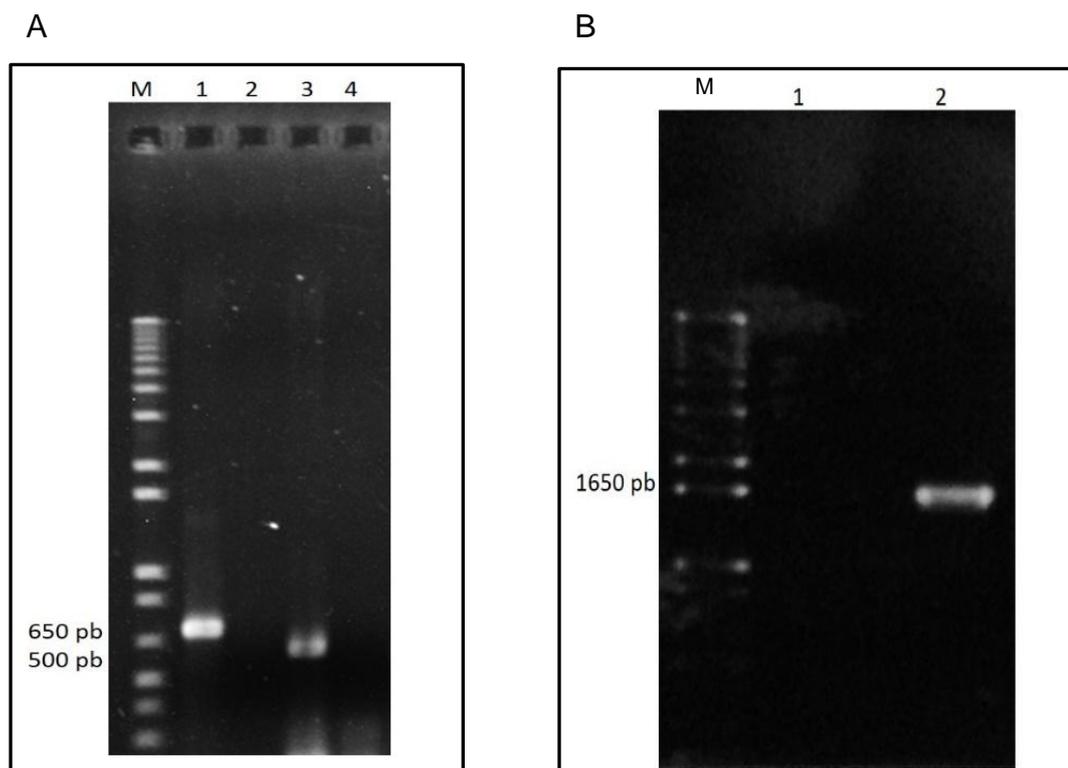


FIGURA 34. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (A) *Amplicons* TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP, 1: *amplicon* de 633 pares de bases correspondente a região codificante de TcFOP-likeTcFOP-like, 3: *amplicon* de 516 pares de bases correspondente a região codificante de TcFOP-like com deleção Δ FOP. 2 e 4: Controle negativo da reação de amplificação por PCR, sem DNA gênomico. B) ***Amplicon* TcAPI5-like**, 1: Controle negativo, reação de amplificação por PCR sem DNA gênomico de TcAPI5-like. 2: *amplicon* de 1689 pares de bases correspondente a região codificante de TcAPI5-like.

Os *amplicons* foram então recombinados em pDONRTM221 conforme manual do fabricante, e as reações dessa recombinação foram utilizadas para transformação em *E. coli* DH5- α eletrocompetente, conforme descrito em métodos (item 4.6.4.2). Os clones foram selecionados com análise por PCR de colônia, como descrito no item 4.6.4.3, para verificar a presença dos insertos (dados não mostrados). A figura 35 ilustra a confirmação da clonagem de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like em vetor de entrada pDONRTM221 através da análise da amplificação dos insertos por PCR. Para confirmar as sequências clonadas, as amostras foram enviadas para sequenciamento usando o serviço da *Macrogen* Korea (Coréia do Sul, informações disponíveis em <http://www.macrogen.com/>). A figura 36 mostra o alinhamento das sequências de TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP que foram obtidas de sequenciamento em vetor pDONRTM221, confirmando a deleção do fragmento gênico correspondente ao domínio FOP. Finalmente, as

construções corretas foram denominadas de pDONR-TcFOP-like, pDONR- TcFOP-like Δ FOP e pDONR-TcAPI5.

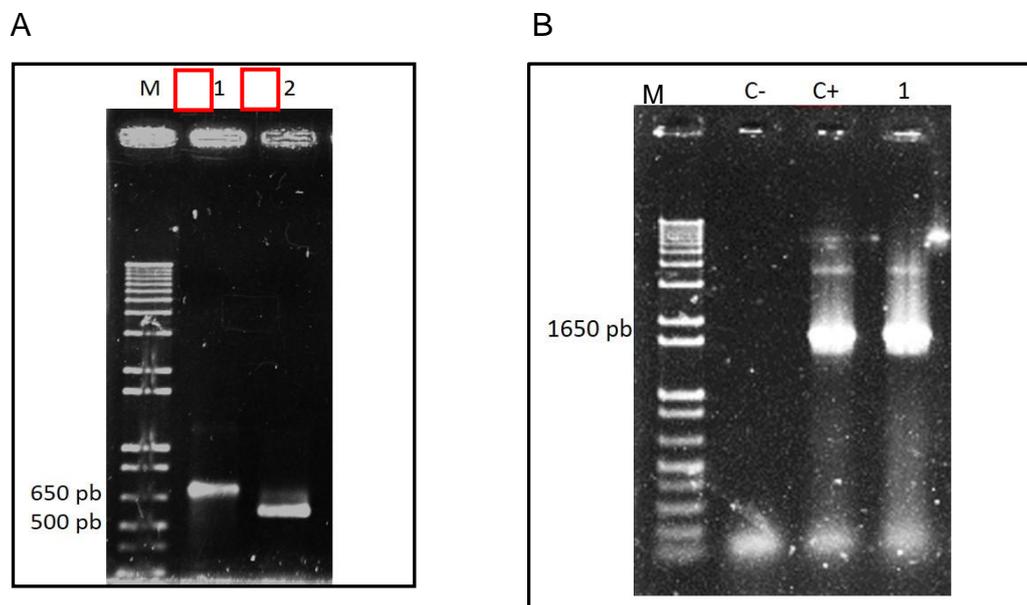


FIGURA 35. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE INSERTOS TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like CLONADOS EM VETOR pDONR™221 (Invitrogen). Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (invitrogen). (A) A 1: resultado da amplificação por PCR utilizando como molde os plasmídeos e para amplificações oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like (633 pb), 2: resultado da amplificação por PCR utilizando como molde os plasmídeos e para as amplificações os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ FOP (516 pb). Destacado em vermelho os clones utilizados. (B) 1: resultado da amplificação por PCR de colônia, utilizando como molde os plasmídeos e para amplificações os oligonucleotídeos iniciadores de TcAPI5-like. C-: Controle negativo da reação de amplificação por PCR de colônia de TcAPI5-like, C+: Controle positivo da reação de amplificação por PCR de colônia utilizando como molde DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* e os oligonucleotídeos iniciadores de TcAPI5-like resultando em *amplicon* de 1689 pb.

A

MRRGDFERRRLDLYERNVRRVRLADARDGRRSGRDDIIAPRRVYVSRRTRELGFRGGYQVQRSRFRDRPRIRRFSDRGVYRRGALDRFEEDFERKLRR
ERFRERRLNEGGLRFGLRLRRSERRELRLQLRELRELRLRALRSAQRNQNGDRRGKLDKELDRY **RKDQRGGRRGGGGRGRGAPNSVTKEGLDAELDRFRGGN**

B

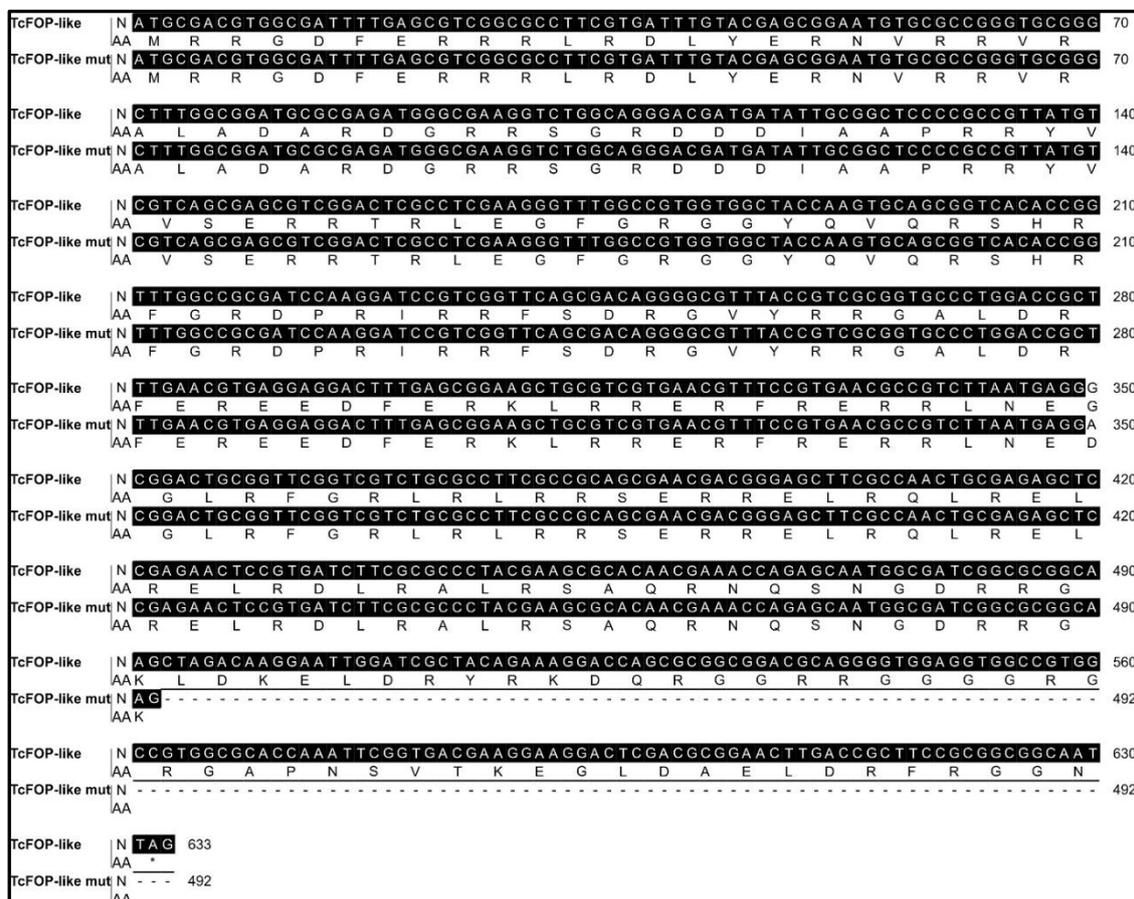


FIGURA 36. CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DO DOMÍNIO FOP DE TcFOP-like. A) Representação da sequência de aminoácidos de TcFOP-like. Em vermelho, destaca-se a região domínio a ser deletado para a construção de TcFOP-like Δ FOP. B) Alinhamento de aminoácidos entre TcFOP-like e a sequência predita de TcFOP-like Δ FOP a partir do sequenciamento do produto de PCR clonado no vetor pDONRTM221. Na posição 350 observa-se uma mutação e a substituição de um aminoácido neutro apolar - Glicina (G) por um aminoácido polar ácido – Ácido Aspártico (D). N – sequência nucleotídica, AA – sequência aminoácida.

5.2.2 Produção de anticorpos anti-TcFOP-like e TcAPI5-like

Com o objetivo de expressar e purificar as proteínas recombinantes, a região codificadora de TcFOP-like e TcAPI5-like clonados em pDONRTM221 (pDONR-TcFOP-like e pDONR-TcAPI5-like) foram então recombinados com o vetor pDESTTM17 (INVITROGEN), conforme o manual do fabricante. A seleção dos clones foi realizada por meio de PCR de colônia (figuras 37A, para TcFOP-like, e 37B, para

TcAPI5-like). Os clones selecionados foram denominados: pDEST17-TcFOP-like (clone 42) e pDEST17-TcAPI5-like (clones 29 e 30)

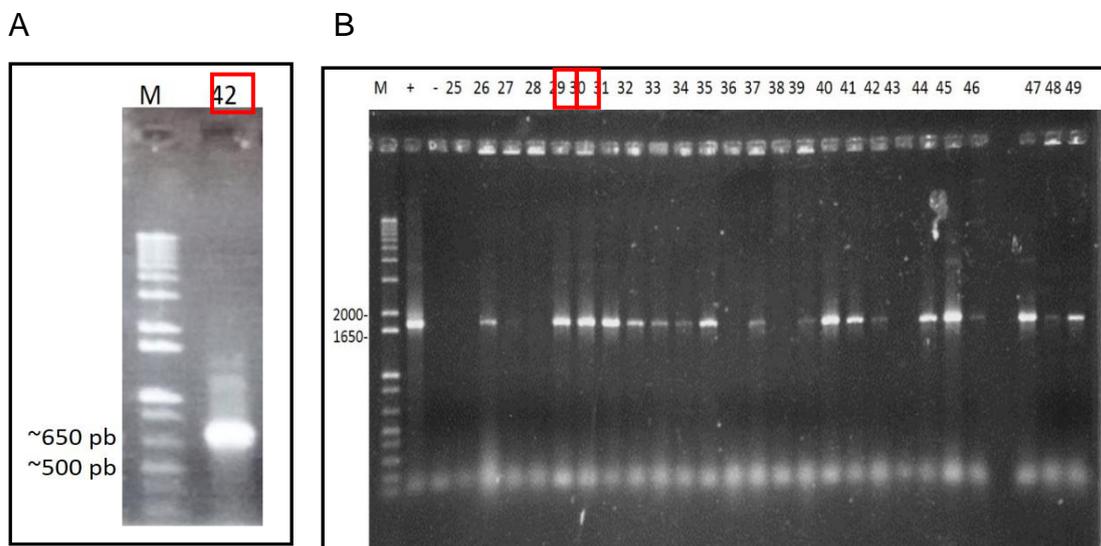


FIGURA 37. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA SELEÇÃO DE CLONES DE TcFOP-like E TcAPI5-like EM VETOR pDEST™17. A) Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. 42: resultado da amplificação por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like, *amplicon* com 633 pb. B) Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. (+): controle positivo. (-): controle negativo. 25-49: resultado da amplificação por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcAPI5-like, *amplicons* com 1689 pb. Destacado em vermelho os clones utilizados.

Os plasmídeos pDEST™17-TcFOP-like e pDEST™17-TcAPI5-like foram utilizados para transformar *E. coli* cepa BL21 pLysS cálcio-competente, conforme descrito no item 4.6.4.2. Após a transformação e seleção de bactérias resistentes à ampicilina, colônias isoladas foram escolhidas para o estabelecimento das condições para expressão e purificação das proteínas recombinantes, como descrito no item 4.7.2.

Inicialmente, foi realizado um teste de indução com IPTG da expressão da proteína recombinante TcAPI5-like, descrito no item 4.7.2, que foi analisada em SDS-PAGE e o resultado está ilustrado na figura 38 A. Fica evidente a indução de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 61 kDa, compatível com o tamanho estimado de TcAPI5-like. Para a confirmação da expressão da proteína recombinante TcAPI5-like, foi realizado também um ensaio de *Western blot*, conforme descrito no item 4.8, utilizando um anticorpo monoclonal anti-histidina, que reconhece a etiqueta fusionada à extremidade N-terminal da proteína recombinante. O resultado confirmou que a proteína induzida é correspondente a expressão de

TcAPI5-like recombinante, pois existe maior quantidade da proteínas após indução com IPTG,(FIGURA 38 B), apesar da proteína ser reconhecida também em amostras não induzidas em baixos níveis.

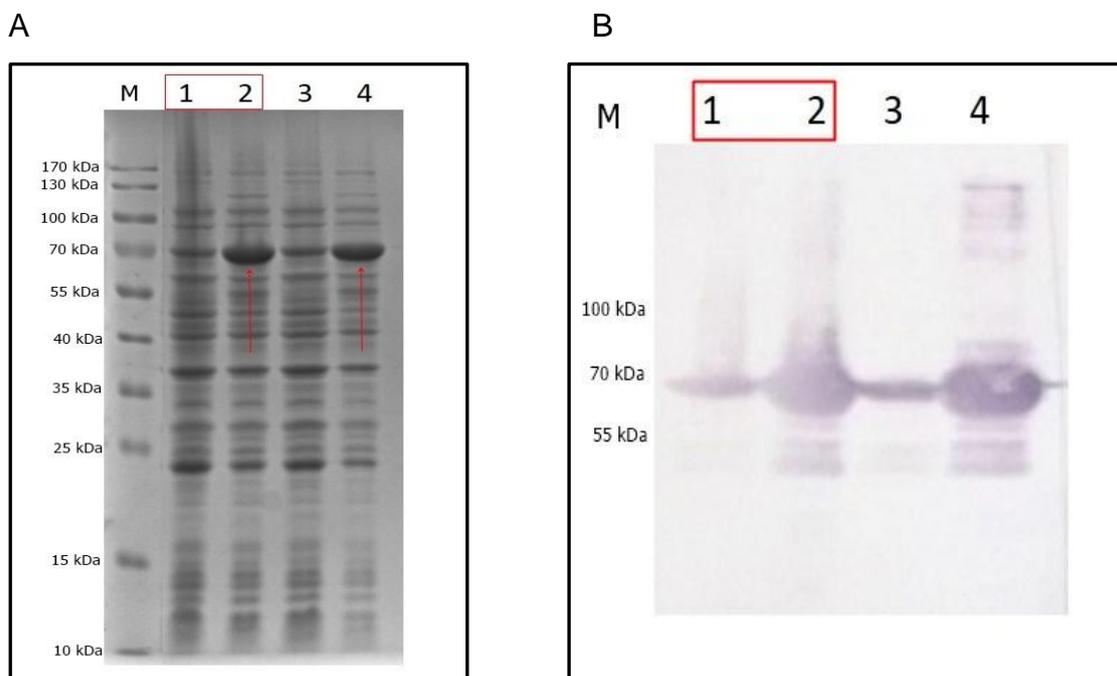


FIGURA 38. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15 % (A) E ANÁLISE POR WESTERN BLOT (B) DA INDUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcAPI5-like. M: Marcador de massa molecular representado em kDa –(*PageRuler Prestained Protein Ladder* - ThermoFischer). 1 e 3: Perfil eletroforético de extrato proteico bacteriano total não induzido de TcAPI5-like #29 e #30, respectivamente. 2 e 4: Perfil eletroforético de extrato proteico bacteriano total induzido de TcAPI5-like #29 e #30, respectivamente. Setas vermelhas apontam a expressão da proteína recombinante. B) *Western blot* utilizando anticorpos anti-histidina. Em 1 e 3, foram utilizados extratos proteicos bacterianos totais não induzido de TcAPI5-like #29 e #30, respectivamente. Em 2 e 4, foram utilizados extratos proteicos bacterianos totais induzidos de TcAPI5-like #29 e #30, respectivamente. Em A e B, foi destacado em vermelho o clone utilizado.

Em seguida, o ensaio foi realizado com 200 mL de cultura e as bactérias lisadas para extração de proteínas em tampão contendo uréia. Este extrato foi utilizado para purificação em cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA (ver item 4.7.3). Lavagens sucessivas com tampão de purificação ajudaram a minimizar a ligação de proteínas contaminantes no processo final. As amostras foram concentradas utilizando o *Centrifugal Filter Units – For Concentration and Purification of Biological Solutions* (Amicon Ultra® 0,5 mL 10k) (DADOS NÃO MOSTRADOS).

Antes de iniciar as imunizações com a proteína purificada, os soros dos animais foram avaliados quanto à presença de anticorpos que pudessem ter reações cruzadas com proteínas presentes no extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso, realizamos o teste do soro pré-imune por *Western blot*, conforme descrito no item 4.8.1 e ilustrado na figura 39. Usamos como controle positivo da reação, o antissoro previamente produzido em camundongo anti-TcHel45.

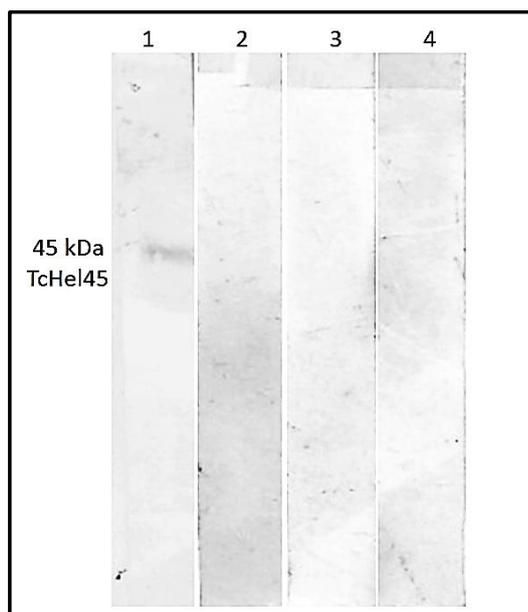


FIGURA 39. ANÁLISE POR WESTERN BLOT PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO PRÉ-IMUNE DE CAMUNDONGOS, USADOS PARA PRODUÇÃO DE anti-API5, EM EXTRATOS PROTÉICOS de *T. cruzi*. O extrato proteico proveniente de 5×10^6 células/canaleta foi analisado. 1: Controle positivo: foi utilizado o anticorpo anti-Hel45 (antissoro produzido previamente pelo nosso grupo) em diluição de 1:500. 2: foi utilizado o antissoro pré-imune do camundongo 1 na diluição 1:200. 3: foi utilizado o antissoro pré-imune do camundongo 2 na diluição 1:200. 4: foi utilizado o antissoro pré-imune do camundongo 3 na diluição 1:200.

Como o antissoro pré-imune não reconheceu proteínas do extrato proteico de *T. cruzi*, a proteína recombinante TcAPI5-like purificada foi utilizada como antígeno para produção de antissoro policlonal nos três camundongos, conforme item 4.8.2, sendo que o animal identificado como “1” veio à óbito. Após as imunizações, os antissoros dos camundongos foram testados quanto à especificidade de reconhecimento da proteína TcAPI5-like em extrato proteico de *T. cruzi* através de *Western blot* revelado por fosfatase alcalina (FIGURA 40) como descrito no item 4.8.1.

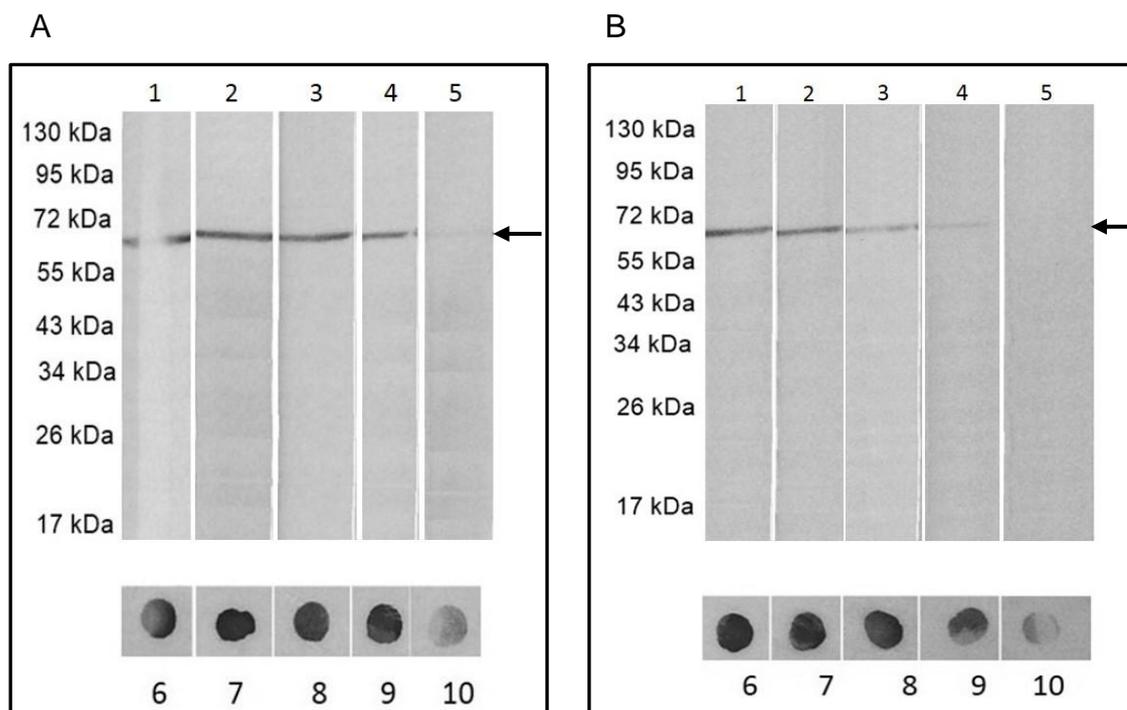


FIGURA 40. ANÁLISE POR WESTERN BLOT PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO DE CAMUNDONGO anti-TcAPI5-like EM EXTRATOS PROTEICOS DE *T. cruzi*. O extrato proteico proveniente de 5×10^6 células/canaleta foi analisado. Em A e B, foram testados os soros dos camundongos 2 e 3, respectivamente. 1, 2 e 3: foi utilizado o soro imune do na diluição 1:200, 1:500 e 1:1000, respectivamente. 4 e 5: foi utilizado o lavado peritoneal na diluição 1:200 e 1:1000, respectivamente. 6-10: Ensaio tipo Dot blot utilizando a quantidade de 500 ng de proteína recombinante purificada para confirmar a especificidade do antissoro em cada uma das diluições. Banda indicada pela seta.

Este resultado confirmou a especificidade do antissoro produzido pelos camundongos, visto que reconheceu apenas uma proteína de massa molecular esperada de aproximadamente 61 kDa no extrato proteico total de *T. cruzi* e também houve reatividade com bastante avidéz com a proteína recombinante purificada nas diferentes diluições do antissoro

Da mesma forma que para expressão de TcAPI5-like, diferentes testes foram feitos para TcFOP-like. Aqui, está mostrado apenas o resultado do ensaio usando 500 mL de cultura do clone pDESTTM17-TcFOP-like com induzidação por três horas com IPTG. Conforme ilustrado na figura 41, houve uma discreta alteração na quantidade de proteína na fração induzida, com massa de aproximadamente 25 kDa, compatível com o tamanho esperado para TcFOP-like. Logo, para a confirmação da expressão da proteína recombinante TcFOP-like, foi realizado também um ensaio de *Western blot*, conforme descrito no item 4.9, utilizando um anticorpo monoclonal anti-histidina. O resultado confirmou que a proteína induzida

corresponde a TcFOP-like, pois a reatividade foi específica na amostra induzida (FIGURA 41 B)

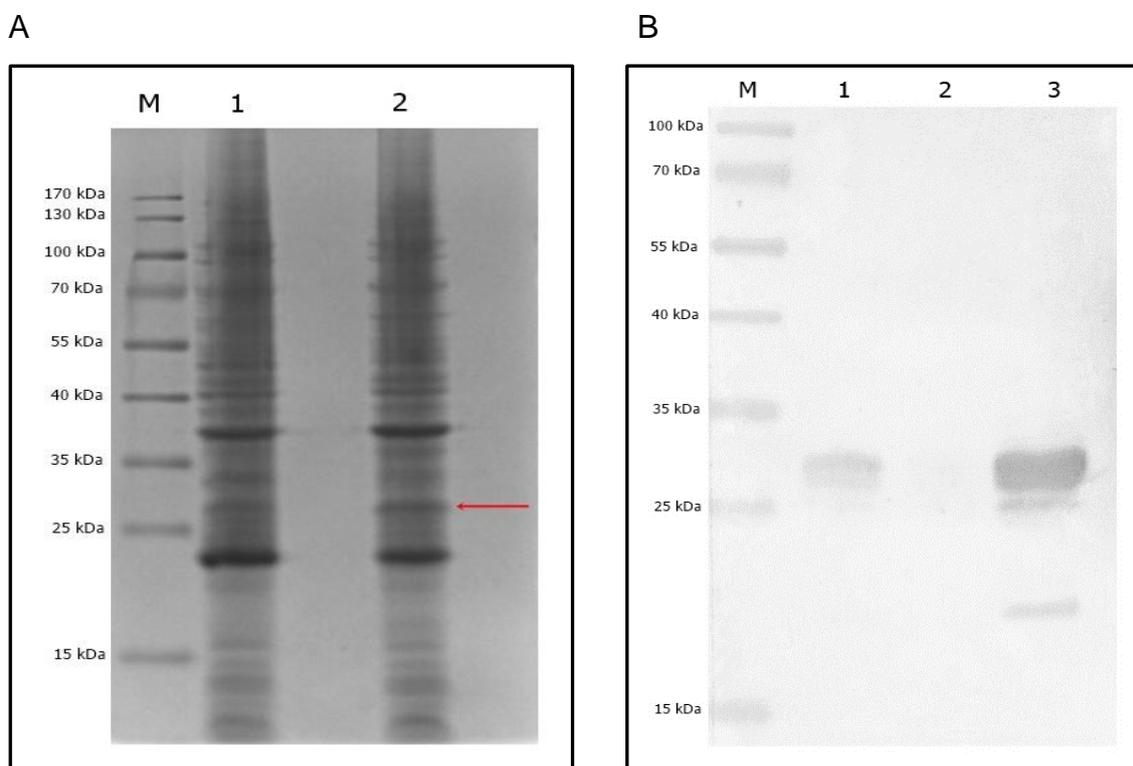


FIGURA 41. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 15 % (A) E ANÁLISE POR WESTERN BLOT (B) DE INDUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcFOP-like. M: Marcador de *PageRuler Prestained Protein Ladder* (ThermoFischer) A) 1: Perfil eletroforético de extrato proteico bacteriano total não induzido de TcFOP-like #42. 2: Perfil eletroforético de extrato proteico bacteriano total induzido de TcFOP-like #42. A seta em vermelho aponta para a banda referente a proteína recombinante de TcFOP-like. B) 1: *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina e extrato proteico bacteriano total induzido de TcFOP-like #42. 2: *Western blot* anti-histidina de extrato proteico total não induzido de TcFOP-like #42. 3: *Western blot* anti-histidina da proteína recombinante TcFOP-like purificada.

Devido à baixa expressão da proteína recombinante TcFOP-like, optamos pelo enriquecimento da proteína recombinante através de coluna de Ni-NTA com sucessivas lavagens com tampão uréia com aumento crescente de imidazol (de 10 a 500 mM), a proteína eluída após a coluna foi purificada em gel preparativo (FIGURA 42)

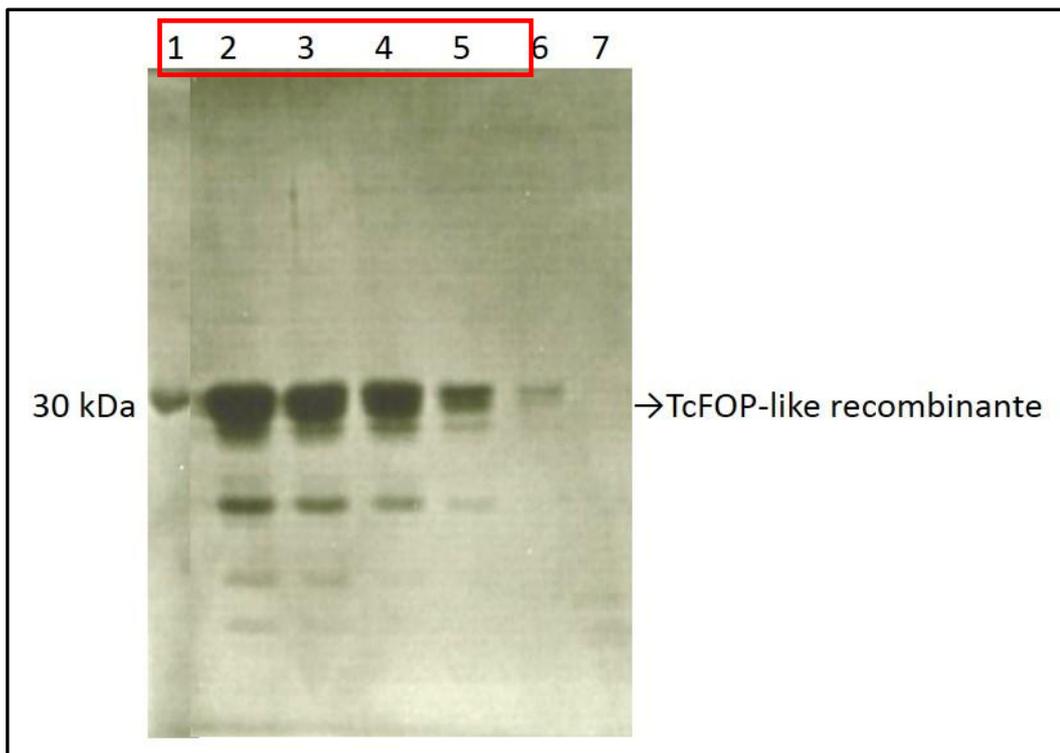


FIGURA 42. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 13% DE ENRIQUECIMENTO PROTEICO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TcFOP-like. 1: Uma alíquota de proteína GFP purificada foi utilizada como referência da massa molecular. Foram feitas lavagens com diferentes tampões contendo concentrações de Imidazol variando entre 10 mM a 500 mM. As lavagens de 10 mM e 50 mM de imidazol não estão ilustradas. 2: Primeira lavagem com tampão contendo 100 mM de Imidazol. 3: Segunda lavagem com tampão contendo 100 mM de Imidazol. 4: Primeira lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol. 5: Segunda lavagem com tampão contendo 300 mM de Imidazol. 6: Primeira lavagem com tampão contendo 500 mM de Imidazol. 7: Segunda lavagem com tampão contendo 500 mM de Imidazol. Destacados em vermelho as frações aplicadas em gel preparativo.

As frações referentes a primeira e segunda lavagem com 100 mM de imidazol, primeira e segunda lavagem com 300 mM de imidazol e a primeira lavagem com 500 mM de Imidazol, foram coletadas e aplicadas em gel preparativo. Após revelação por KCl, a banda foi excisada do gel e a amostra contendo a proteína recombinante foi eluída e dialisada em PBS.

Da mesma forma que nas inoculações com TcAPI5-like, antes de iniciar as imunizações com a proteína recombinante TcFOP-like purificada, os soros dos animais foram avaliados por *western blot* (FIGURA 43).

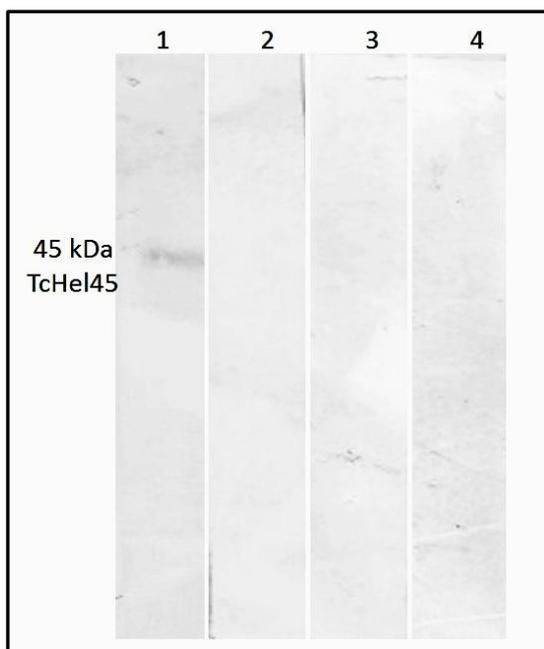


FIGURA 43. ANÁLISE POR *WESTERN BLOT* PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTÍSSORO PRÉ-IMUNE DE CAMUNDONGOS, USADOS PARA PRODUÇÃO DE anti-TcFOP-like, EM EXTRATOS PROTEICOS DE *T. cruzi*. 5×10^6 células/canal em gel SDS-PAGE 13%. 1: Controle positivo anti-Hel45 (antissoro produzido previamente pelo nosso grupo) numa diluição de 1:500. 2: diluição do antissoro pré-imune 1:200 do camundongo 1. 3: diluição do antissoro pré-imune 1:200 do camundongo 2. 4: diluição do antissoro pré-imune 1:200 do camundongo 3.

Como o antissoro pré-imune não foi reativo às proteínas do extrato proteico de *T. cruzi*, a proteína recombinante TcFOP-like purificada foi utilizada para produção de anticorpo policlonal nos três camundongos, conforme item 4.8.2. Os soros imunes produzidos foram testados quanto a especificidade e imunogenicidade gerada contra a proteína TcFOP-like através de *Western blot* revelado por fosfatase alcalina (FIGURA 44) como descrito no item 4.9.1.

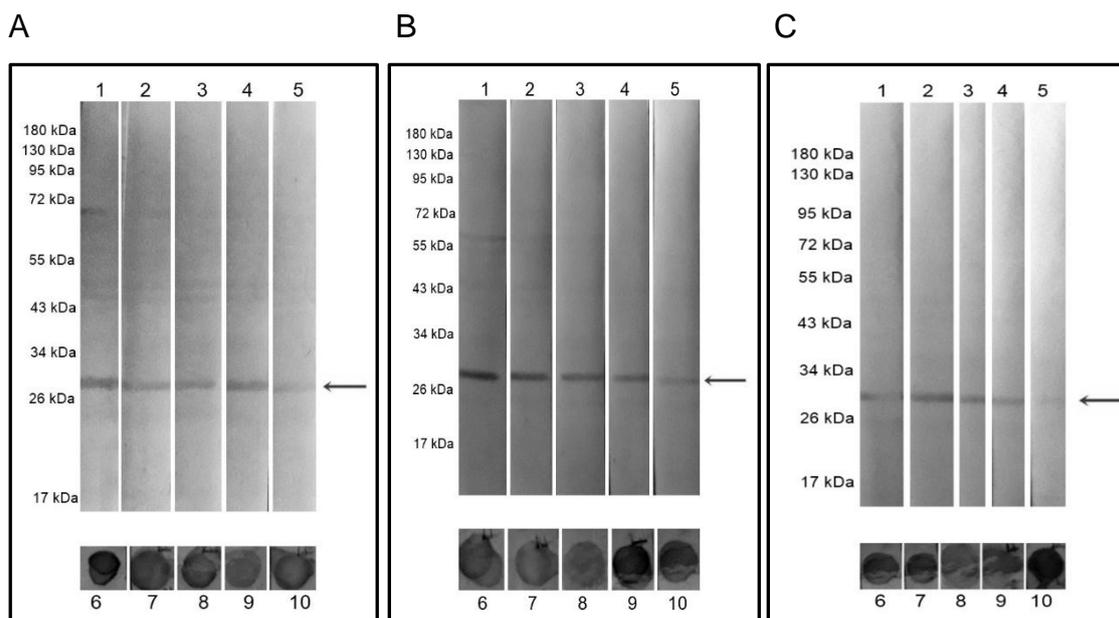


FIGURA 44. ANÁLISE POR WESTERN BLOT PARA TESTE DE ESPECIFICIDADE DO ANTISSORO DE CAMUNDONGO anti-TcFOP-like EM EXTRATOS PROTEICOS DE *T. cruzi*. O extrato proteico proveniente de 5×10^6 células/canaleta foi analisado. Em A, B e C, foram testados os soros dos camundongos 1, 2 e 3, respectivamente 1, 2 e 3: foi utilizado o soro imune do na diluição 1:200, 1:500 e 1:1000, respectivamente. 4 e 5: foi utilizado o lavado peritoneal na diluição 1:200 e 1:1000, respectivamente. 6-10: Ensaio tipo Dot blot utilizando a quantidade de 500 ng de proteína recombinante purificada para confirmar a especificidade do antissoro em cada uma das diluições. Banda correspondente a TcFOP-like indicada pela seta

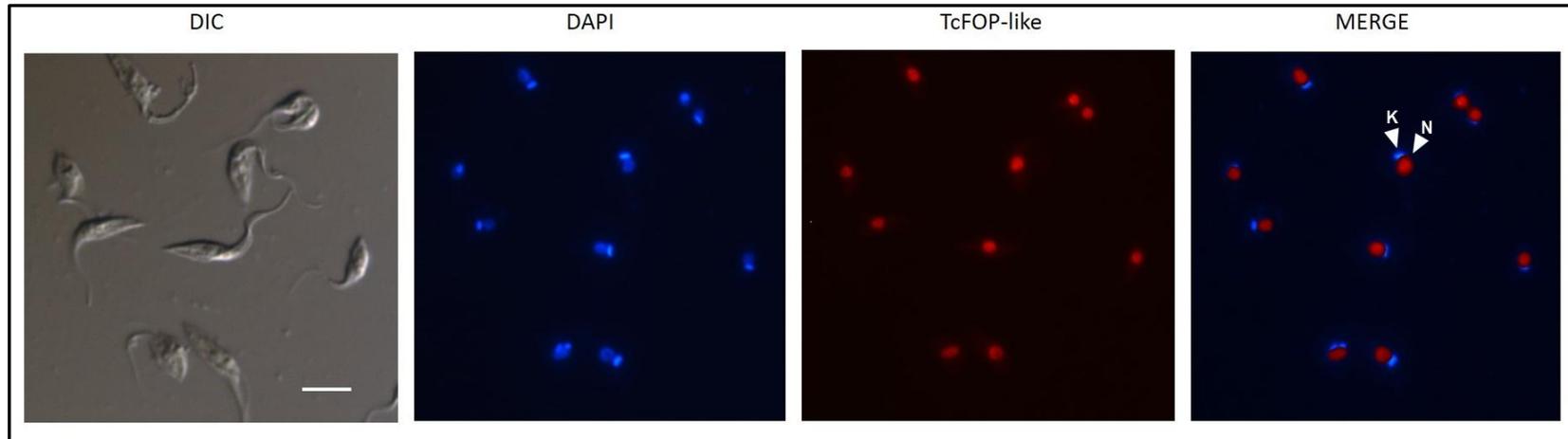
Este resultado confirmou a especificidade do reconhecimento do antissoro produzido pelos camundongos, visto que ele reconheceu apenas uma proteína de massa molecular predita de aproximadamente 25 kDa, correspondente ao tamanho predito para TcFOP-like nos extratos proteicos de *T. cruzi* e também reagiu com a proteína recombinante purificada nas diferentes diluições do antissoro.

5.2.3 Localização de TcAPI5-like e TcFOP-like por imunofluorescência indireta

Visto a especificidade dos antissoros produzidos, estes foram usados para ensaios de microscopia buscando avaliar a localização celular de TcFOP-like e TcAPI5-like, conforme descrito no item 4.12.1.

Os ensaios de imunofluorescência indireta demonstraram que tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like são proteínas nucleares (FIGURA 45). Conforme mostrado na figura, o sinal de fluorescência do antissoro sobrepõe com a marcação nuclear fornecida por DAPI.

A



B

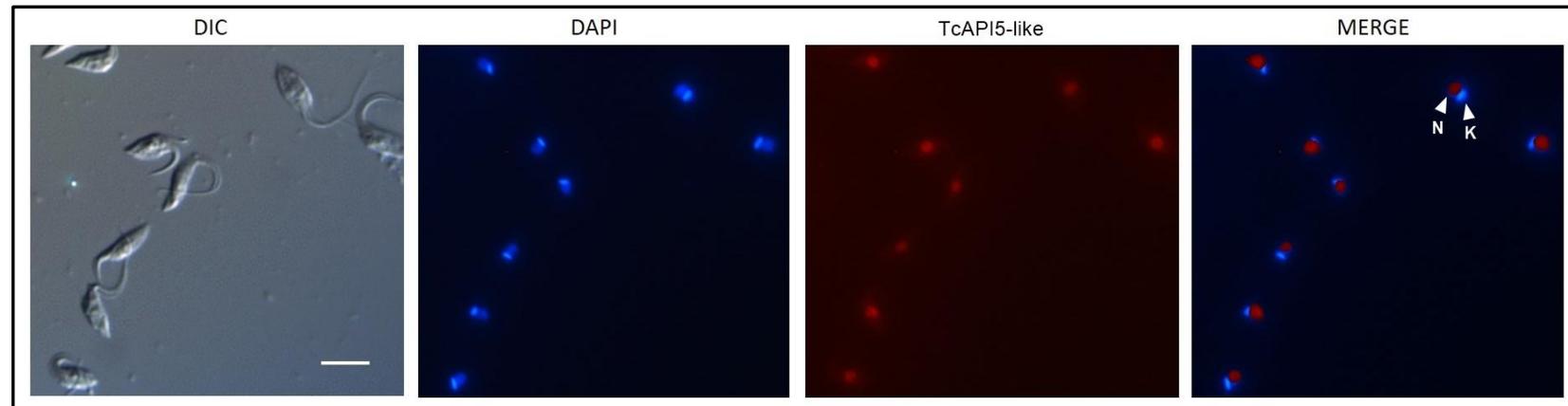


FIGURA 45. LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DAS PROTEÍNAS TcFOP-like (A) e TcAPI5-like (B) EM *T. cruzi* POR IMUNOFLORESCÊNCIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA. DIC: contraste por interferência diferencial. DAPI: DNA marcado com DAPI. TcFOP-like (A) Detecção de TcFOP-like (A) ou TcAPI5-like (B) localizada por imunofluorescência indireta com o anticorpo policlonal anti-TcFOP-like ou anti-TcAPI5-like (ambos na diluição de 1:200) e com anticorpo conjugado com Alexa 594 (Invitrogen, diluição de 1:600). MERGE: colocalização de imagens para DAPI e TcFOP-like ou TcAPI5-like. K: cinetoplasto. N: núcleo. Barra: 10 μ m.

5.2.4 Expressão de TcFOP-Like, TcFOP-like Δ FOP TcFOP-like Δ UBM e TcAPI5-like fusionadas à GFP e PTP

Linhagens celulares de *T. cruzi* expressando TcFOP-like e TcAPI5-like fusionadas às etiquetas GFP e/ou PTP na extremidade N-terminal foram geradas. Para tanto, os genes de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP, TcFOP-like Δ UBM e TcAPI5-like clonados em pDONR™221, foram recombinados nos vetores pTcGWGFPN (BATISTA, et al 2010), que permite a expressão da proteína alvo fusionada a GFP, e pTcGWPTPN (KUGERATSKI et al, 2015), que permite a expressão da proteína alvo fusionada à PTP. Ambos os vetores permitem fusão das etiquetas na extremidade N-terminal. As reações de recombinação foram usadas para transformar bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes conforme descrito no item 4.6.4.2, e as análises dos clones positivos foi feita através de PCR de colônia, item 4.6.4.3.(FIGURA 46). Para o isolamento dos plasmídeos, colônias positivas (destacados em vermelho nas figuras) foram inoculadas em 150 mL de meio LB, adicionado de 100 ng/mL de ampicilina. Essa purificação do plasmídeo foi realizada para posterior transfecção em *T. cruzi*.

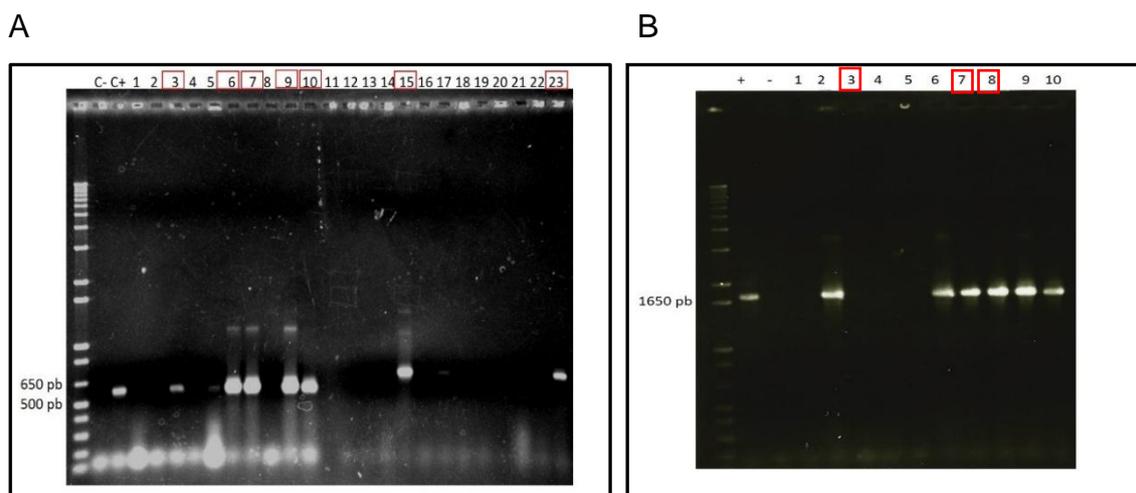


FIGURA 46. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE GERADOS PELAS ANÁLISES DE PCR COLÔNIA. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). **A)** Análise de clones de TcFOP-like E TcFOP-like Δ FOP em vetor pTcGWGFPN e pTcGWPTP. C-: Controle negativo. C+: Controle positivo. 1 – 6: amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ FOP para colônias transformadas com o vetor pTcGWGFP. 7-11: amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ FOP para colônias transformadas com vetor pTcGWPTP. 12-18: r amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like para colônias transformadas com vetor pTcGWGFP. 18-23: amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like para colônias transformadas com vetor pTcGWPTP. Destacados em vermelho os clones utilizados. **B)** Análise dos clones de TcAPI5-like em vetor pTcGWPTPN e pTcGWGFPN: (+): controle positivo. (-): controle negativo. 1 – 5: clones em vetor pTcGWPTPN; 6 – 10: clones em vetor pTcGWGFPN: . Ambos os casos a amplificação ocorreu utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcAPI5-like.

Após confirmação dos clones positivos, os plasmídeos foram purificados e transfectados em *T. cruzi*, conforme item 4.10.1.1. A confirmação dos transfectantes foi feita por *Western blot* conforme ilustrado na figura 47.

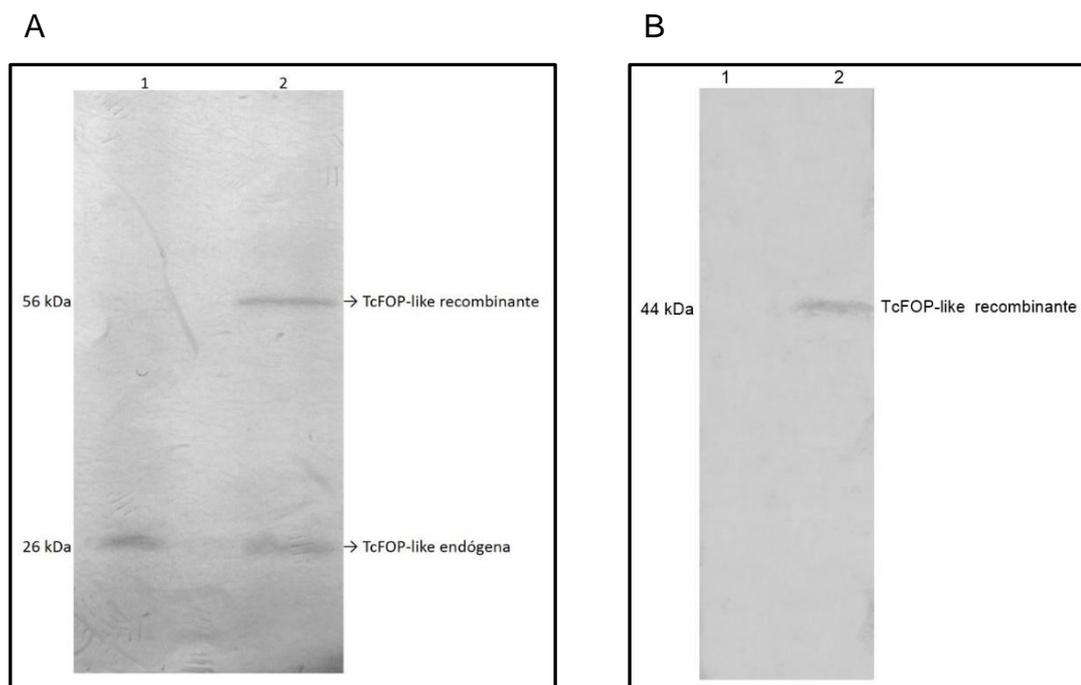


FIGURA 47. ANÁLISE POR WESTERN BLOT DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like FUSIONADA À GFP E PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. A) TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like FUSIONADA À GFP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL 5×10^6 células/canaleta. 1: *Western blot* anti-TcFOP-like (diluição 1:500) extrato proteico total do parasita selvagem. 2: *Western blot* anti-TcFOP-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcFOP-like fusionada à etiqueta GFP na extremidade N-terminal. B) TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like FUSIONADA À PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. 5×10^6 células/canaleta. 1: *Western blot* anti-Proteína A (diluição 1:5000) extrato proteico total do parasita selvagem. 2: *Western blot* anti-Proteína A (diluição 1:5000) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcFOP-like fusionada à etiqueta PTP na extremidade N-terminal.

Para expressão de TcFOP-like Δ FOP obtivemos uma linhagem expressando a proteína fusionada a GFP, como ilustrado na figura 48, mas não obtivemos linhagens para expressão da proteína fusionada a PTP (dados não mostrados)

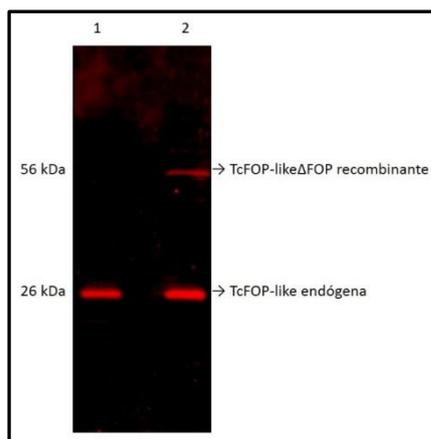


FIGURA 48. ANÁLISE POR WESTERN BLOT DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO TcFOP-like Δ FOP FUSIONADA À GFP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. 5×10^6 células/canaleta. 1: *Western blot* anti-TcFOP-like (diluição 1:500) extrato proteico total do parasita selvagem. 2: *Western blot* anti-TcFOP-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcFOP-like Δ FOP fusionada à etiqueta GFP na extremidade N-terminal.

No caso de TcAPI5-like foi possível obter linhagens expressando a proteínas fusionada à GFP e a PTP na extremidade N-terminal. A análise da expressão das proteínas recombinantes em *T. cruzi* está ilustrada na figura 49.

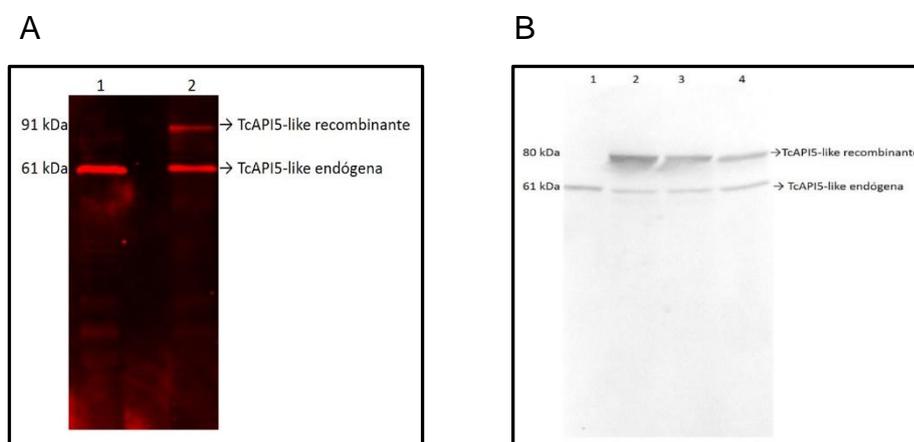


FIGURA 49. ANÁLISE POR WESTERN BLOT DOS TRANSFECTANTES TcAPI5-like FUSIONADOS À GFP E PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. A) TRANSFECTANTE TcAPI5-like FUSIONADO À GFP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL. 5×10^6 células/canaleta. 1: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500), extrato proteico total do parasita selvagem. 2: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcAPI5-like fusionada à etiqueta GFP na extremidade N-terminal. B) TRANSFECTANTES TcAPI5-like FUSIONADOS À PTP NA EXTREMIDADE N-TERMINAL 5×10^6 células/canaleta. 1: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500), extrato proteico total do parasita selvagem. 2: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcAPI5-like fusionada à etiqueta PTP na extremidade N-terminal clone 1. 3: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcAPI5-like fusionada à etiqueta PTP na extremidade N-terminal clone 2. 4: *Western blot* anti-TcAPI5-like (diluição 1:500) de extrato proteico total do transfectante expressando a proteína TcAPI5-like fusionada à etiqueta PTP na extremidade N-terminal clone 3.

5.3 TcFOP-LIKE E TcAPI5-LIKE COLOCALIZAM COM TcSUB2

Um dos objetivos desse trabalho seria avaliar a interação de TcFOP-like e TcAPI5-like com outros componentes da via de exportação de mRNA em *T. cruzi*, visto que estas proteínas foram identificadas por proteômica do complexo de TcSub2, um componente essencial para exportação de mRNA neste parasita. (SERPELONI et al, 2011b).

Como são proteínas nucleares, primeiramente optamos por realizar um ensaio de imunofluorescência e análise em microscopia confocal para observar o padrão de colocalização nuclear das proteínas TcFOP-like e TcAPI5-like com a própria TcSub2. Para tanto, utilizamos os anticorpos policlonais anti-TcFOP-like e anti-TcAPI5-like produzidos em camundongos, conforme descrito no item 4.8, e o anticorpo anti-TcSub2 produzido em coelho, previamente obtido pelo nosso grupo (SERPELONI et al, 2011b). Tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like possuem um padrão de distribuição nuclear muito semelhante ao de TcSub2, como mostrado na figura 50. De acordo com os gráficos que quantificam a intensidade de fluorescência, podemos inferir que as proteínas se colocalizam, indicando que ambas as proteínas (TcFOP-like e TcAPI5-like) podem interagir com TcSub2.

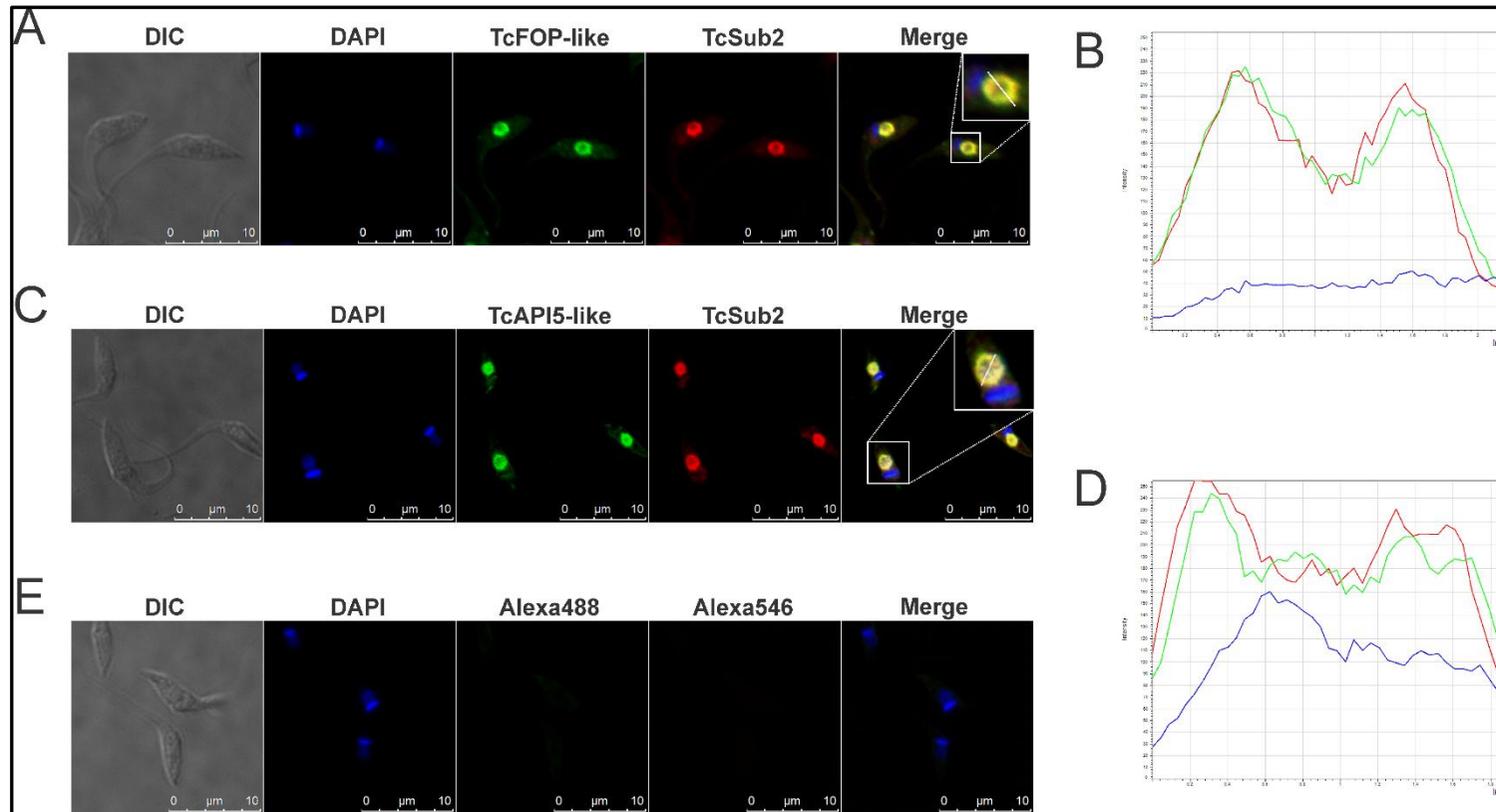


FIGURA 50. ANÁLISE NUCLEAR DE COLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcAPI5-like E TcFOP-like COM TcSUB2 ATRAVÉS DE IMUNOFLORESCÊNCIA CONFOCAL EM *T. cruzi*. Colocalização de TcFOP-like (A) e TcAPI5-like (C) com TcSub2 - DIC: contraste por interferência diferencial. DAPI: marcação do material genético. TcFOP-like / TcAPI5-like: detecção de TcFOP-like e TcAPI5-like localizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-FOP ou anti-API5 (mouse, diluição de 1:400) e anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição de 1:500). TcSub2: detecção de TcSub2 localizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-TcSub2 (rabbit, diluição 1:600) e anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Alexa 546 (Invitrogen, diluição 1:500). MERGE: colocalização das imagens para DAPI, TcAPI5-like e TcSub2. Barra: 10 μm. B) Gráfico mostrando a quantificação da intensidade de fluorescência de DAPI (azul), TcFOP-like (verde), TcSub2 (vermelho). D) Gráfico mostrando a quantificação da intensidade de fluorescência de DAPI (azul), TcFOP-like (verde em B), TcAPI5-like (verde em D), TcSub2 (vermelho). E) DIC: contraste por interferência diferencial. DAPI: marcação do material genético. Alexa488: Controle anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição de 1:500). Alexa546: controle anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Alexa 546 (Invitrogen, diluição 1:500). MERGE: colocalização das imagens para DAPI, Alexa488 e Alexa 546. Barra: 10 μm

Visto que tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like colocalizam com TcSub2, foram realizados ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural para avaliar a distribuição destas proteínas na cromatina de *T. cruzi* e verificar se teriam distribuição semelhante a TcSub2 na cromatina (SERPELONI et al, 2011b)

Os resultados confirmam a marcação nuclear tanto para TcFOP-like quanto TcAPI5-like, mas em termos de localização ultraestrutural ainda não podemos fazer afirmações a respeito dessas proteínas (FIGURAS 51e 52),

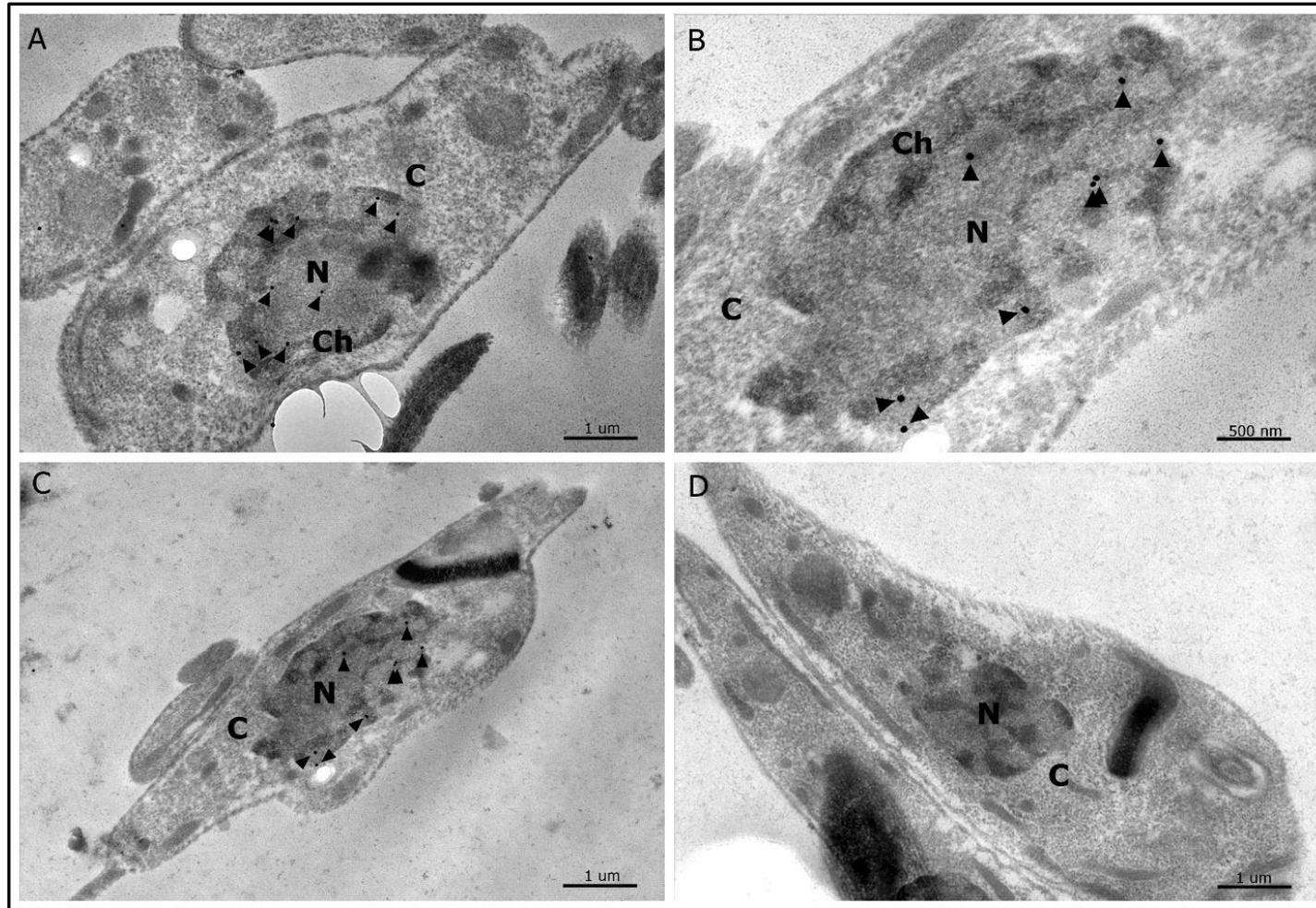


FIGURA 51. IMUNOCITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DE TcFOP-like EM *T. cruzi*. A-C: Microscopia ultra-estrutural por imunocitoquímica com anticorpo anti-TcFOP-like seguido por anticorpo secundário acoplado a partículas de 15 nm de ouro coloidal anti- mouse IgG. As pontas das setas indicam a marcação de TcFOP-like. C: citoplasma, N: Núcleo, Ch: cromatina eletrodensa. D: Controle negativo: apenas anticorpo secundário anti-mouse IgG acoplado à partículas de 15 nm de ouro coloidal. Barras: de 1,0 μm ou 500 nm, conforme indicação.

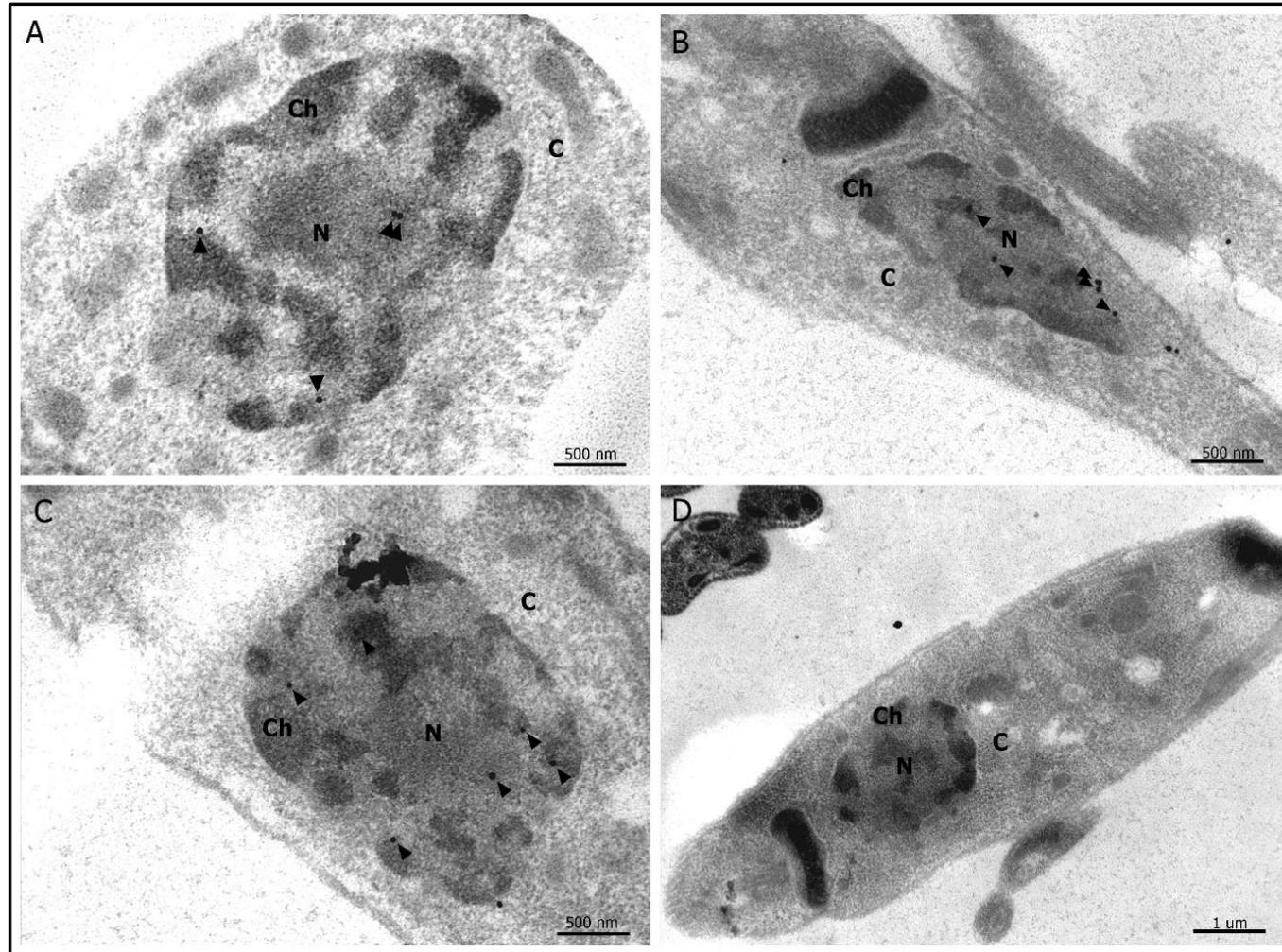


FIGURA 52. IMUNOCITOQUÍMICA ULTRA-ESTRUTURAL DE TcAPI5-like EM *T. cruzi*. A-C: Microscopia ultra-estrutural por imunocitoquímica com anticorpo anti-TcAPI5-like seguido por anticorpo secundário acoplado a partículas de 15 nm de ouro coloidal anti- mouse IgG. As pontas das setas indicam a marcação de TcAPI5-like. C: citoplasma, N: Núcleo, Ch: cromatina eletrodensa. D: Controle negativo: apenas anticorpo secundário anti-mouse IgG acoplado à partículas de 15 nm de ouro coloidal. Barras: de 1,0 μ m ou 500 nm, conforme indicação.

5.4 EFEITOS DA EXPRESSÃO ECTÓPICA DE TcFOP-like FUSIONADA A GFP EM *T. cruzi*

Após confirmação da expressão de FOP fusionada à etiqueta GFP, observamos que as culturas de parasitas expressando a proteína fusionada a GFP (TcFOP-like-GFP) alcançam a fase estacionária de crescimento em densidade muito menor quando comparada com a cultura selvagem ou até mesmo com o transfectante expressando a proteína com a deleção do domínio FOP fusionado à mesma etiqueta (TcFOP-like Δ like). Conforme ilustrado no gráfico 3, além de afetar o crescimento, observamos que a fluorescência era perdida à medida que mantínhamos os parasitas em cultivo. Contudo, a medida que observávamos a diminuição de parasitas com fluorescência, a cinética do crescimento dos transfectantes se tornava semelhante à de parasitas selvagens. Logo, isso pode ser um indicativo de que a fusão N-terminal de GFP pode alterar a função de FOP endógena, efeito tipo dominante negativo. É possível que o efeito negativo faça com que expressão ectópica seja letal e diminua número de parasitas expressando a proteína fusionada ao longo do tempo

Em virtude desta instabilidade da expressão da proteína fusionada, as análises de curva de crescimento foram realizadas logo após enriquecimento da cultura por *cell sorting* em citômetro de fluxo. Como ilustrado no gráfico 1, as culturas em fase exponencial de crescimento (3º dia de cultivo) apresentam densidades de: TcWT: $3,16 \times 10^7$ células/mL $\pm 2,30 \times 10^5$; TcFOP-like-GFP: $1,79 \times 10^7$ células/mL $\pm 5,78 \times 10^5$; TcFOP-like Δ FOP: $2,73 \times 10^7$ células/mL $\pm 2,05 \times 10^6$, sendo \pm o desvio padrão.

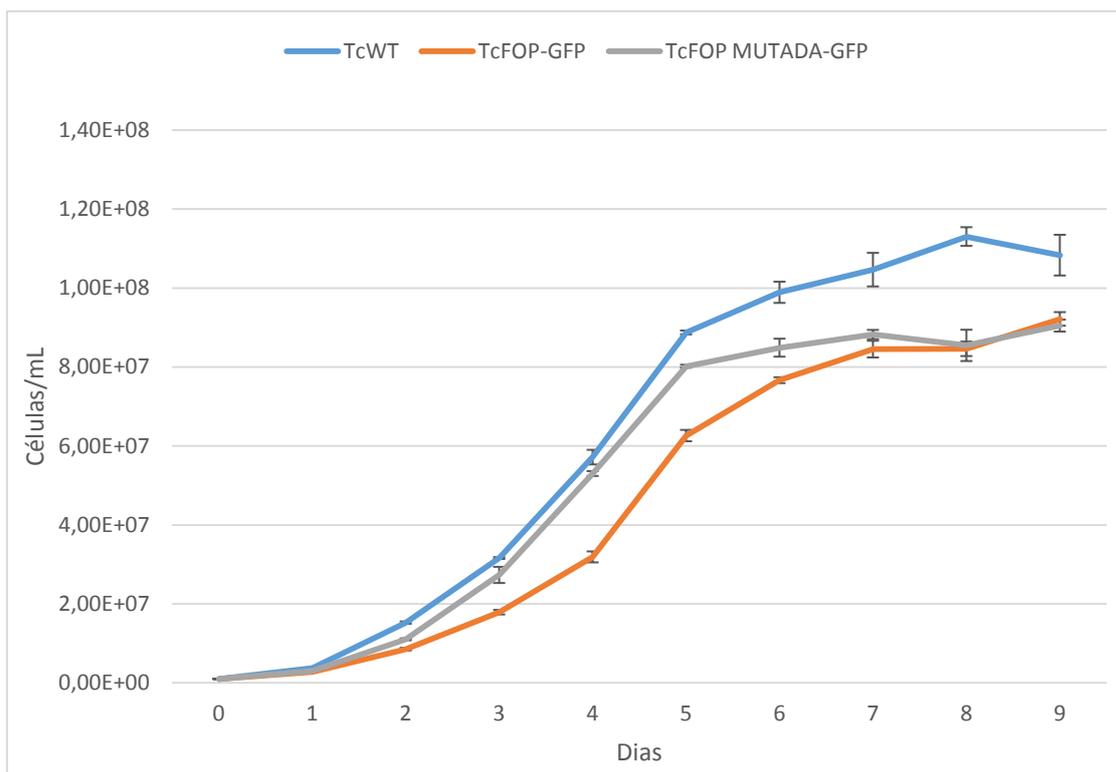


Gráfico 1. Curva de crescimento do transfectante de *T. cruzi* pTcGWGFP-FOP-like. Tc WT: Cultura *T. cruzi* Wild Type. TcFOP-GFP: Cultura *T. cruzi* pTcGWGFP-FOP-like. TcFOP MUTADA-GFP: Cultura *T. cruzi* pTcGWGFP-FOPMutada-GFP. Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x: Intervalos em dias para a realização da contagem. As análises estatísticas realizadas no Software GraphPad PRISM[®] 7, Inc, mostraram diferença extremamente significativa entre as culturas TcWT x TcFOPlike-GFP (***) $p = 0,005$; diferença extremamente significativa entre as culturas TcWT x TcFOPlike Δ like-GFP (***) $p = 0,004$; diferença significativa entre as culturas TcFOP-like-GFP x TcFOPlike Δ like-GFP (*) $p = 0,0218$, considerando que $p < 0,00001$ extremamente significativa (****), $p < 0,00001$ a $0,001$ extremamente significativo (****), $p < 0,001$ a $0,01$ muito significativo (**), $p < 0,01$ a $0,05$ significativo (*), $p \leq 0,05$ não significativo (ns).

Visto que a expressão de FOP-GFP parece causar um efeito dominante negativo, resolvemos avaliar as causas deste efeito. Zullo e colaboradores (2009) mostraram que células HeLa transfectadas com FOP-GFP de humanos (HsFOP-GFP) reduziam a percentagem de células em G2/M do ciclo celular e intensificava a morte celular, concluindo que o crescimento mais lento da cultura transfectada era o efeito combinado desses dois fatores. Por isso, optamos por realizar um ensaio de análise do ciclo celular com coloração do DNA por iodeto de propídeo para visualizar se a expressão de FOP-GFP estaria alterando o ciclo celular em *Trypanosoma cruzi*.

O ensaio de ciclo celular foi realizado conforme descrito no item 4.11.2. Os resultados obtidos, ilustrados na tabela 6, mostram um aumento significativo no percentual de células em G2 do ciclo celular, tanto em TcFOP-like quanto TcFOP-like Δ FOP, quando comparados ao controle (FIGURA 53), resultado inverso ao

encontrado por Zullo e colaboradores (2009) com células HeLa transfectadas com HsFOP-GFP, onde ocorre uma redução no percentual de células em G2.

Com base na literatura, a retenção em fase G2 seria uma resposta a danos no DNA (DIPAOLA, 2002). Por isso, estas análises apontam para o fato de que a superexpressão de FOP fusionada a GFP, pode estar causando algum estresse celular ou dano no DNA que poderia induzir a retenção na fase G2 e, conseqüentemente, alteração no tempo de replicação celular.

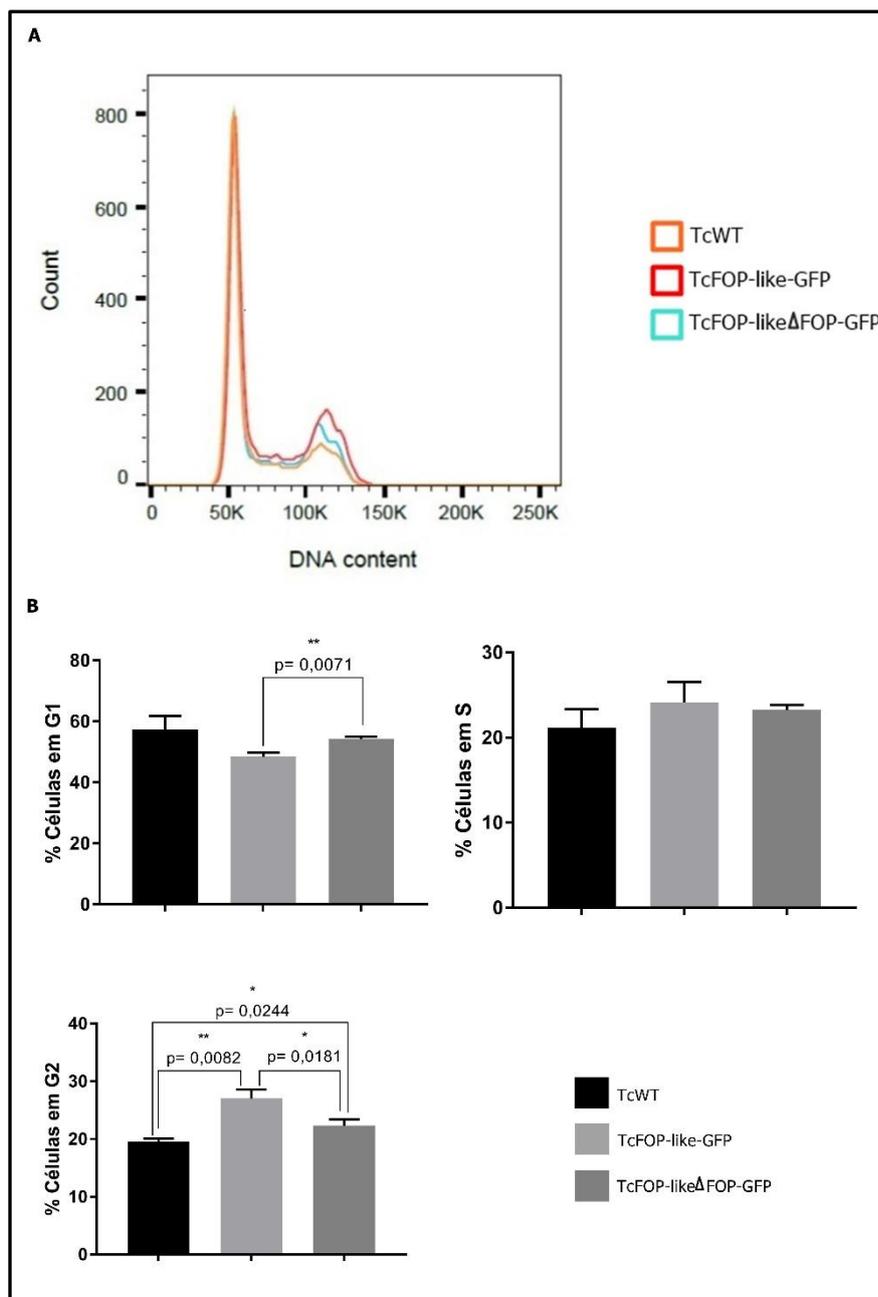


FIGURA 53. ENSAIO DE CICLO CELULAR. A) Histograma do ensaio de ciclo celular mostrando a média (dos três experimentos) da percentagem de células presentes em cada fase do ciclo celular. Todas as culturas foram marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo B) Gráficos das análises estatísticas realizadas no Software GraphPad PRISM[®] 7, Inc, mostraram diferença muito significativa entre as culturas TcFOPlike x TcFOPlikeΔlike (**) $p = 0,0071$ na percentagem de células em G1; diferença significativa entre as culturas TcWT x TcFOPlikeΔlike (*) $p = 0,00244$ na percentagem de células em fase G2; diferença muito significativa entre as culturas TcWT x TcFOP-like (**) $p = 0,0082$ na percentagem de células em G2, diferença significativa entre as culturas TcFOP-like x TcFOPlikeΔlike (*) $p = 0,0181$ na percentagem de células em fase G2; sendo que $p < 0,00001$ extremamente significativa (****), $p 0,00001$ a $0,001$ extremamente significativo (****), $p 0,001$ a $0,01$ muito significativo (**), $p 0,01$ a $0,05$ significativo (*), $p \leq 0,05$ não significativo (ns).

TABELA 6. PORCENTAGEM DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR

FASES DO CICLO CELULAR	CULTURAS		
	TcWT	TcFOP-like	TcFOP-like Δ FOP
G1	58,93 \pm 2,19	48,43 \pm 1,40	54,36 \pm 0,75
S	21,13 \pm 2,20	24,13 \pm 2,39	23,26 \pm 0,56
G2	19,53 \pm 0,58	27,03 \pm 1,59	22,36 \pm 1,05

Resultados indicativos das médias das replicatas técnicas \pm Desvio Padrão (DP)

5.5 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS DE INTERAÇÃO DE TcFOP-like e TcAPI5-like COM COMPONENTES DA VIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNA

Para ajudar a entender o papel biológico de TcFOP-like e TcAPI5-like em *T. cruzi*, foi investido também em abordagens de isolamento de complexos proteicos para confirmar a interação com componentes da via de exportação de mRNA. Para isto, foram produzidas as linhagens de *T. cruzi* expressando TcFOP-like e TcAPI5-like fusionadas às etiquetas GFP e/ou PTP na extremidade N-terminal.

No caso de TcFOP-like, o domínio FOP predito possui na extremidade C-terminal uma região rica em arginina e glicina, um possível sitio de metilação, e duas sequências LDXXLD, onde X é qualquer aminoácido, que são denominadas de UBM's (UAP56/Sub2-binding motif) em outros organismos. Por isso, incluímos a ideia de avaliar a função deste domínio para interação com TcSub2 em *T. cruzi*. Uma abordagem foi de deletar o domínio FOP da proteína, a essa construção chamamos de TcFOP-like Δ FOP.

5.5.1 Ensaio *Western blot* confirmam a imunoprecipitação de TcFOP-like e TcAPI5-like com o complexo de TcSub2

A abordagem utilizada foi purificar o complexo usando como isca a proteína TcSub2 fusionado à GFP. Esta linhagem já havia sido produzida anteriormente pelo nosso grupo (SERPELONI et al, 2011b) e os ensaios de imunoprecipitação já haviam sido padronizados (INOUE, 2015; INOUE et al, em preparação). Sendo assim, repetimos o mesmo ensaio, e por *Western blot* com os anticorpos anti-TcFOP-like e anti-TcAPI5-like foram utilizados para verificar a presença ou ausência destas proteínas nos complexos proteicos de TcSub2.

Na figura 54 A, observa-se que TcSub2-GFP está enriquecida nas amostras imunoprecipitadas, confirmando a eficiência do protocolo de purificação dos complexos proteicos contendo TcSub2. Na figura 54 B, utilizando anticorpo anti-TcSub2, comprovou-se a eficiência do protocolo adotado para a imunoprecipitação de complexos proteicos contendo TcSub2. Podemos observar a presença da proteína alvo (TcSub2) nas frações de *Flow-through* e sendo mais enriquecida no imunoprecipitado (*pullout*). Com a confirmação da eficiência do protocolo, os ensaios de *Western blot* utilizando os antissoros anti-TcFOP-like e anti-TcAPI5-like confirmam a presença de ambas as proteínas no complexo (FIGURA 54C), reforçando a hipótese de interação destas proteínas com TcSub2 e possível participação na via de exportação de mRNA.

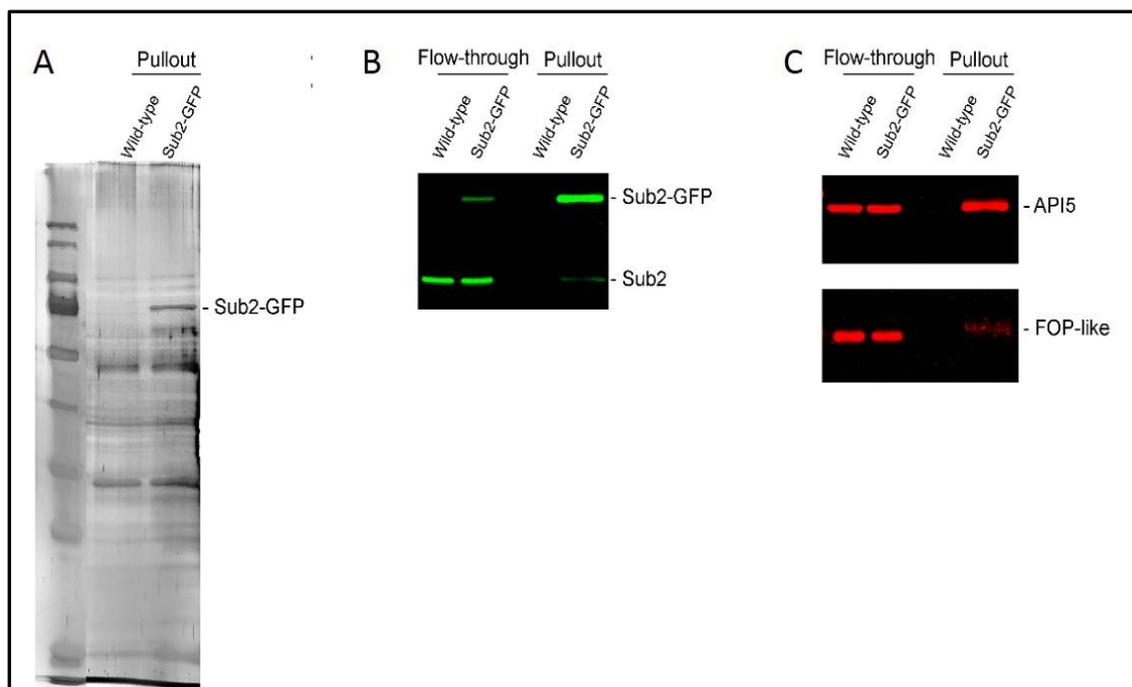


FIGURA 54. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcSub2. A) Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 13% das imunoprecipitações com extrato proteico do parasita selvagem e com o extrato proteico do transfectante expressando TcSub2 fusionado à GFP. B) Ensaio de *Western blot* utilizando anticorpo específico anti-TcSub2 (produzido em coelho, diluição 1:1000). C) Ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos específicos anti-TcFOP-like (camundongo, diluição 1:500) e anti-TcAPI5-like (camundongo, diluição 1:500). O tampão utilizado para as imunoprecipitações continha 10 mM de NaCitrato, 0,1% de CHAPS, 20 mM Hepes, 1 mM MgCl₂ e 10 μM CaCl₂.

5.5.2 TcFOP-like interage com outros componentes da via de exportação de mRNA, como o receptor Mex67 e Hel45

Levando em consideração os dados já descritos na literatura sobre o papel do receptor de exportação TcMex67 (DOSTALOVA et al, SCHEDE E KRAMER, 2009), e da RNA helicase TcHel45 (INOUE et al., 2014) na via de exportação de RNA mensageiro, realizamos as purificações destas proteínas alvo com intuito de verificar a presença ou ausência de TcFOP-like e TcAPI5-like nestes complexos proteicos. Nesta etapa, foram usadas linhagens de *T. cruzi* obtidas previamente e as mesmas condições dos ensaios de purificação dos complexos destas proteínas fusionadas as etiquetas de PTP estabelecidas previamente (INOUE, 2015; INOUE et al, em preparação)

Conforme o resultado mostrado na figura 55, podemos observar no gel corado com nitrato de prata o enriquecimento das proteínas alvo (TcMex67 e TcHel45) nas amostras purificadas, confirmando a eficiência do protocolo. Os ensaios de *western*

blot demonstram que TcFOP-like está presente tanto nos complexos proteicos de TcMex67 quanto de TcHel45, isso fortalece a hipótese de que essa proteína esteja de fato envolvida na via de exportação do mRNA.

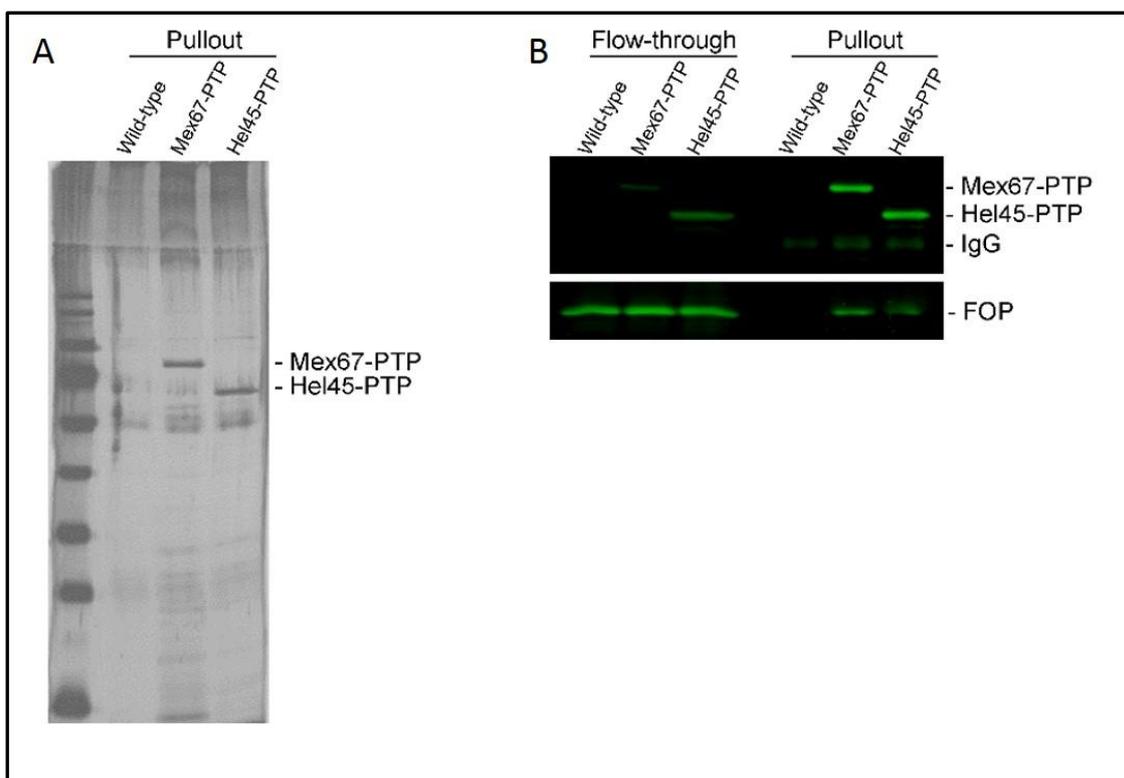


FIGURA 55. IMUNOPRECIPITAÇÕES DE TcMex67 E TcHel45. A) Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 13% das imunoprecipitações com extrato proteico do parasita selvagem e com os extratos proteicos dos transfectantes expressando TcMex67 fusionado à PTP, e TcHel45 fusionado à PTP. B) Ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos específicos, anti-TcMex67, anti-TcHel45 e anti-TcFOP-like. O tampão utilizado para as imunoprecipitações continha 10 mM de NaCitrato, 0,1% de CHAPS, 20mM HEPES, 1mM MgCl₂ e 10μM CaCl₂.

5.6 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like

Os extratos proteicos provenientes de parasitas expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à GFP ou PTP que utilizamos nesses ensaios, foram preparados, utilizando a técnica de criomoagem (descrita no item 4.15.2). Assim, obtivemos um “pó de células” na espessura de aproximadamente 5 μm, conforme descrição do fabricante. Foram testadas diferentes concentrações de detergentes e diferentes sais para solubilização desse “pó de células”, com o intuito

de obter, após o isolamento de complexos, as frações enriquecidas das referidas proteínas e de proteínas associadas a elas. Os primeiros testes utilizando os extratos proteicos provenientes de parasitas expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à PTP foram ineficientes, ou seja, não foi observado nos géis SDS-PAGE o enriquecimento da proteína-alvo nas imunoprecipitações com extratos dos parasitas transfectantes quando comparado com o controle (TcWT) (mostrado no ANEXO 2).

Desse modo, optamos por realizar essa abordagem utilizando os transfectantes expressando as proteínas fusionadas a eGFP, uma vez que a utilização de *nanobodies* anti-GFP poderia conferir maior efetividade do ensaio. Porém, devido a todos os problemas enfrentados na obtenção de transfectantes de TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP fusionados à eGFP (culturas com crescimento lento e perda do fenótipo da expressão de eGFP), optou-se pelo enriquecimento dessas culturas, através de *Cell Sorting* em citômetro de fluxo BD FACS Ariall. Assim, as culturas enriquecidas com células expressando as proteínas fusionadas a eGFP foram expandidas para a preparação e obtenção dos “pós de células”.

Novos testes, com intuito de obter os complexos proteicos contendo TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like, foram realizados utilizando os tampões descritos na tabela 7.

TABELA 7. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 1, 2 E 3 UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like E TcAPI5-like PARA SUSPENSÃO DO “PÓ DE CÉLULAS”.

TAMPÃO 1	TAMPÃO 2	TAMPÃO 3
Na Citrato 10 mM	Na Citrato 50 mM	Na Citrato 50 mM
Hepes 20 mM	Hepes 20 mM	Hepes 20 mM
MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM
CaCl ₂ 10 μ M	CaCl ₂ 10 μ M	CaCl ₂ 10 μ M
E64 10 μ M	E64 10 μ M	E64 10 μ M
CHAPS 0,1%	CHAPS 0,1%	TRITON X-100 0,1%

Porém, novamente não observamos o enriquecimento das proteínas-alvo nas imunoprecipitações com extratos dos parasitas transfectantes quando comparado com o controle (TcWT), conforme ilustrado na figura 56.

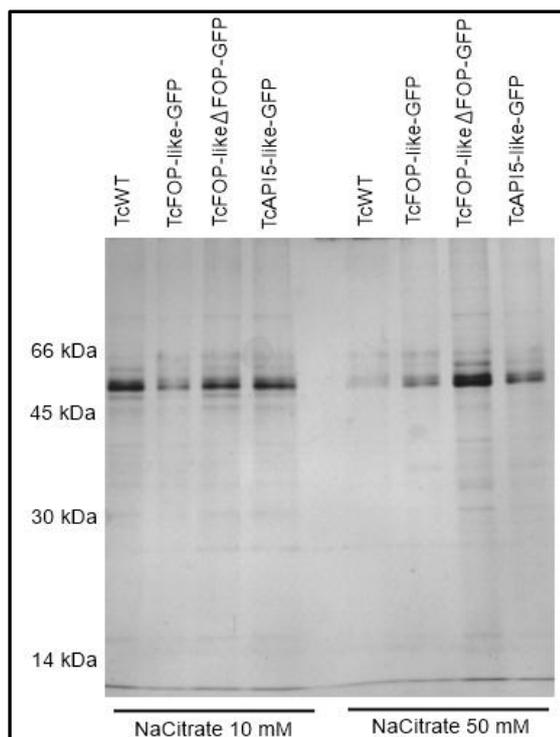


FIGURA 56. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 1 E 2. SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando frações eluídas de testes de copurificações com extrato de parasita selvagem e expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à GFP. O tampão 1 contém 10 mM de NaCitrato, 0,1% de CHAPS, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M 10 μ M e E64 10 μ M. O tampão 2 contém 50 mM de NaCitrato, 0,1% de CHAPS, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M 10 μ M e E64 10 μ M.

Refazendo os testes, utilizando os tampões 2 e 3 (TABELA 7) observamos no gel SDS-PAGE um padrão eletroforético diferente entre transfectante e controle (indicado pelas setas na figura 57A), porém sem o enriquecimento das proteínas fusionadas (aproximadamente de 56 kDa para TcFOP-like-GFP, 51 kDa para TcFOP-like Δ FOP-eFP e 91 kDa para TcAPI5-like-GFP (O mesmo resultado pode ser observado na figura 58). Ao analisarmos o *western blot* utilizando um anticorpo anti-GFP, observamos uma banda correspondente à GFP com tamanho aproximado de 30 kDa figura 57B).

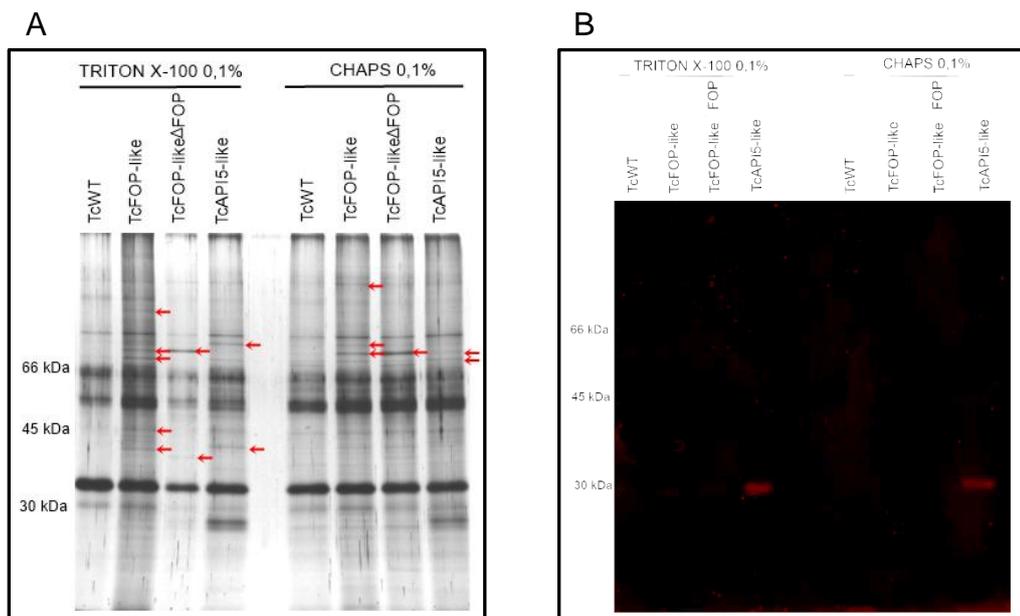


FIGURA 57. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 2 E 3. A) SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando frações eluídas de testes de copurificações com extrato de parasita selvagem e expressando TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP e TcAPI5-like fusionadas à GFP. O tampão 2 contém 50 mM de NaCitrato, 0,1% de CHAPS, Hesper 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μM 10 μM e E64 10 μM. O tampão 3 contém 50 mM de NaCitrato, 0,1% de TRITON X-100, Hesper 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μM e E64 10 μM. B) Western Blot anti-GFP (diluição 1:500) ensaio de imunoprecipitação dos complexos proteicos contendo TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP e TcAPI5-like com os tampões 2 e 3 (TABELA 7).

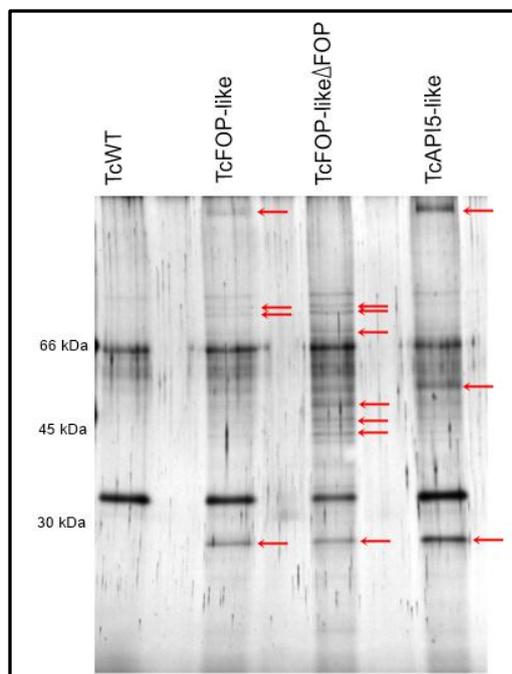


FIGURA 58. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like COM OS TAMPÃO 3. SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando 1: extrato de parasita selvagem. 2: extrato de parasita expressando TcFOP-like fusionado à GFP. 3: extrato de parasita expressando TcFOP-likeΔFOP fusionada à GFP. 4: extrato de parasita expressando TcAPI5-like fusionada à GFP. O tampão 3 contém 50 mM de NaCitrato, 0,1% de TRITON X-100, Hesper 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μM e E64 10 μM

Apesar da lise dos parasitas pela técnica de *Cryogrinding* ser capaz de produzir complexos extratos celulares com atividade bioquímica, deve-se notar que uma maior energia empregada para uma maior quebra pode nem sempre ser benéfica e devem ser otimizadas caso a caso (STALEY, 2005). Com base nisso optamos por obter os extratos proteicos diretamente por lise celular utilizando tampão de suspensão contendo detergente na concentração de 0,5%, conforme descrito no item 4.15.3. Uma vez que isso nos ajudaria a elucidar se realmente os tampões utilizados estavam propiciando o melhor ambiente para captura por afinidade ou se a técnica utilizada para obtenção do “pó de células” (criomoagem) descrito no item 4.15.2, não estaria sendo benéfica em extrair complexos proteicos de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like. A tabela 8 mostra a composição dos tampões utilizados para os testes de imunoprecipitação por lise por detergente

TABELA 8. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 4 E 5 UTILIZADOS PARA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like POR LISE POR DETERGENTE

TAMPÃO 4			TAMPÃO 5		
	Lise	Lavagens		Lise	Lavagens
Na Citrato	50mM	50mM	Hepes	20 mM	20 mM
Hepes	20 mM	20 mM	NaCl	50 mM	50 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	KCl	50 mM	50 mM
CaCl ₂	10 μ M	10 μ M	MgCl ₂	1 mM	1 mM
E64	1 μ M	1 μ M	CaCl ₂	10 μ M	10 μ M
Triton X-100	0,5%	0,1%	Triton X-100	0,5%	0,1%
			PMSF	100 μ M	100 μ M

O *Western blot* utilizando anticorpo anti-GFP em diluição de 1:500 (FIGURA 60) realizado para o teste de imunoprecipitação dos complexos proteicos utilizando-se o tampão 4 (TABELA 8), mostra a presença de bandas nos tamanhos correspondentes de TcFOP-like-eGFP TcFOP-like Δ FOP-eGFP e TcAPI5-like-eGFP nas frações de *Flow Through*, mostrando que as proteínas estão presentes no extrato proteico utilizado, porém ausentes nas frações eluídas dos imunocomplexos.

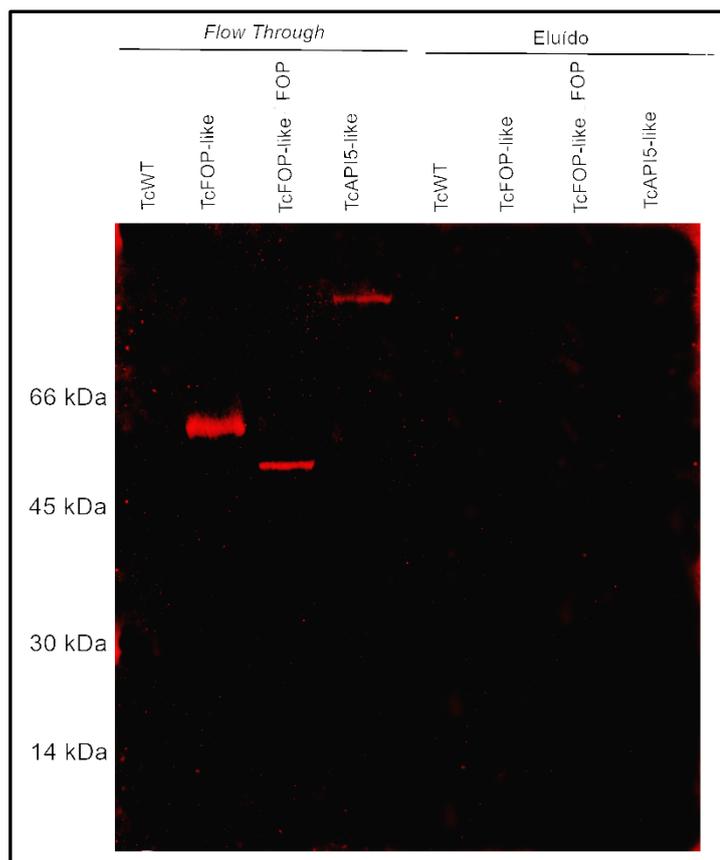


FIGURA 59. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 4 UTILIZADO PARA LISE POR DETERGENTE. *Western blot* anti-GFP (diluição 1:500) do ensaio de imunoprecipitação por lise por detergente utilizando tampão 1 (vide tabela 8). Mostrando as frações de *Flow Through* e *Eluído*

Já com o tampão 5 (TABELA 8) observamos um padrão de corrida eletroforética no gel corado com nitrato de prata de diferentes proteínas (indicadas pelas setas na figura 60 A) nas frações eluídas de extratos dos transfectantes que não foram encontradas nas corridas das frações eluídas realizadas com o controle. Porém quando examinamos o *Western blot* utilizando um anticorpo anti-GFP (FIGURA 61 B) observamos o reconhecimento de uma proteína com massa molecular de 30 kDa.

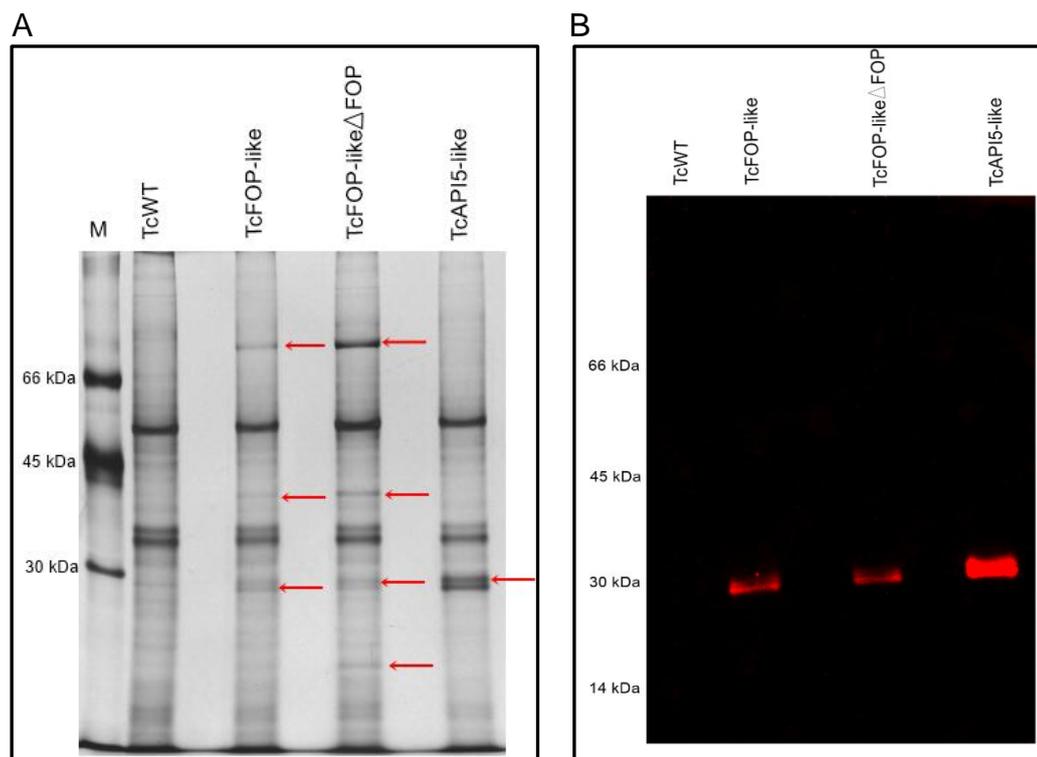


FIGURA 60. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5 COM O TAMPÃO 5 UTILIZADO PARA LISE POR DETERGENTE. A) Gel de acrilamida 13% corado com nitrato de prata mostrando os testes de imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like. As setas vermelhas destacam diferentes proteínas observadas nas frações eluídas de extratos de transfectantes que não foram observadas na fração eluída do controle. B) *Western blot* anti-GFP (diluição 1:500) dos testes imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like, mostrando banda com peso molecular de 30 kDa correspondente à GFP.

Entretanto, sabe-se que a estabilidade das proteínas em solução aquosa é rotineiramente aumentada por co-solventes tais como glicerol. O glicerol é um dos polióis mais amplamente utilizados para estabilizar proteínas, que quando adicionado a uma solução proteica, promove a compactação da proteína e reduz a flexibilidade da mesma (VAGENENDE, YAP, E TROUT, 2009). Fazendo uma busca na literatura, observamos que o glicerol havia sido utilizado com êxito para ensaios de *pull-down* da proteína FOP de humanos (HsCHTOP) (CHANG et al, 2013), então optamos por utilizar o tampão descrito na tabela 9 acrescido de glicerol na concentração final de 10%.

TABELA 9. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 6 UTILIZADOS PARA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like POR LISE POR DETERGENTE

TAMPÃO 6		
	Lise	Lavagens
Na Citrato	50mM	50mM
Hepes	20 mM	20 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
CaCl ₂	10 μ M	10 μ M
E64	1 μ M	-
Triton X-100	0,5%	0,1%
Glicerol	10%	10%
COMPLETE Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablete (Roche)	-	1x

Após ensaio de imunoprecipitação, conseguimos observar em SDS-PAGE um enriquecimento nas amostras eluídas correspondente ao tamanho deas TcAPI5-like (Figura 61 A, com aproximadamente 91 kDa), TcFOP-like (Figura 62 A, com aproximadamente 56 kDa) e TcFOP-like Δ FOP (Figura 62 A, com aproximadamente 51 kDa). O ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos específicos anti-TcAPI5 (Figura 61 B) e anti-TcFOP (Figura 62 B), vimos a presença das referidas proteínas, no tamanho esperado, nas frações eluídas (*Pullout*) mostrando que as mesmas foram especificamente imunoprecipitadas e, conseqüentemente mostrando a eficiência do protocolo.

Uma das grandes perguntas do nosso trabalho foi se TcSub2 estaria presente nos complexos proteicos de TcAPI5-like e TcFOP-like. Para responder essa questão, utilizamos o anticorpo anti-TcSub2 para visualizar a presença, ou ausência, de TcSub2 nos referidos imunocomplexos. Conforme ilustrado na figura 61 C e 62 C vemos a presença de TcSub2 nos complexos proteicos de TcAPI5-like e TcFOP-like. Interessantemente, TcSub2 não se faz presente nos complexos proteicos de TcFOP-like Δ FOP (Figura 62 C).

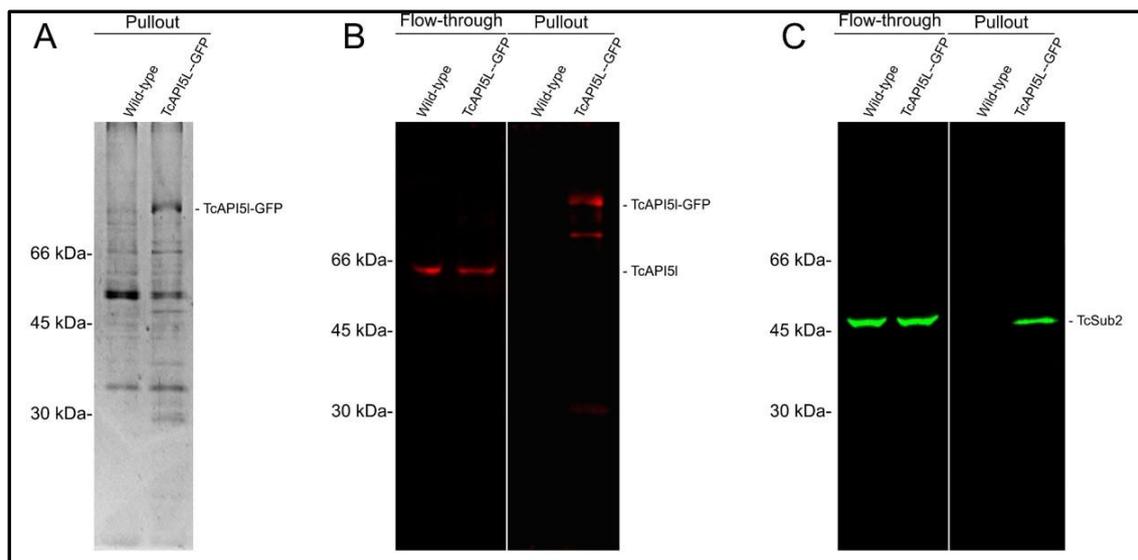


FIGURA 61. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcAPI5-like. (A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 13% de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e expressando a proteína fusionada à GFP (TcAPI5-like-GFP) e esferas magnéticas conjugadas com *nanobodies* anti-GFP. (B) *Western blot* usando anticorpo específico anti-API5 (camundongo, 1:500). (C) *Western blot* usando anticorpo específico anti-Sub2 (Coelho, 1:1000). Tampão: NaCitrato 50 mM, TRITON X-100 0,5%/0,1%, Hepes 20 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 10 μM, Glicerol 10%, E64 10 μM/COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche

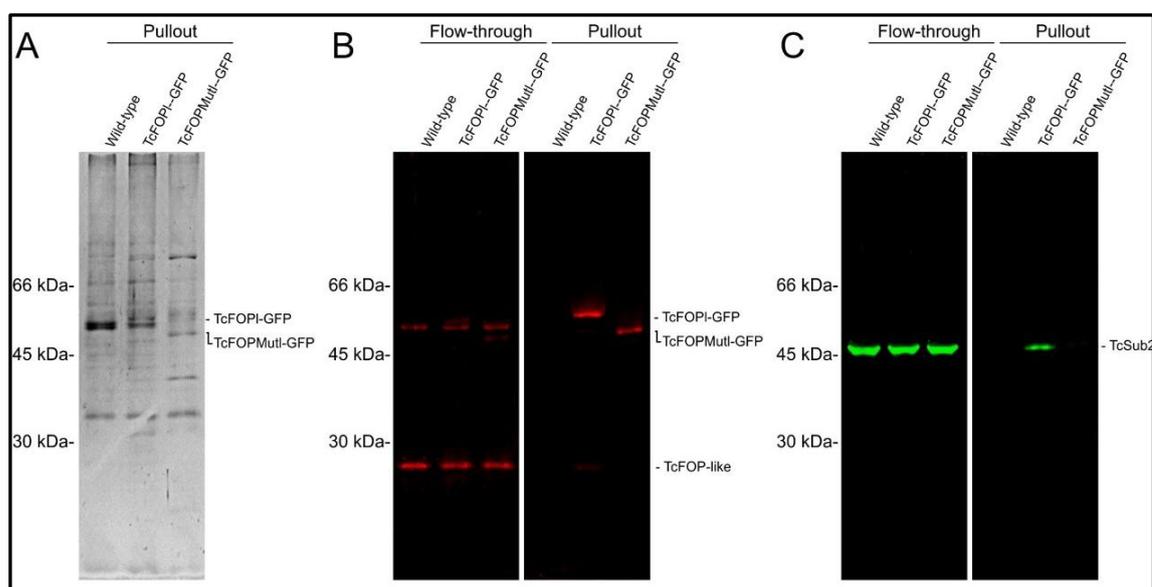


FIGURA 62. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcFOP-like. (A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 13% de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e expressando as proteínas fusionadas à GFP (TcFOP-like-GFP(56 kDa) e TcFOP-likeΔFOP (51 kDa)) e esferas magnéticas conjugadas com *nanobodies* anti-GFP. (B) *Western blot* usando anticorpo específico anti-FOP (camundongo, 1:500). (C) *Western blot* usando anticorpo específico anti-Sub2 (Coelho, 1:1000).

5.7 ANÁLISE DO FENÓTIPO CAUSADO PELO SILENCIAMENTO GÊNICO DOS ORTÓLOGOS DE TcFOP-like (TbFOP-like) E TcAPI5-like (TbAPI5-like) EM *T. brucei*, POR RNA DE INTERFERÊNCIA

Para as análises de genética reversa em estudos de função de genes, o nocaute pode ser inviável se o gene possuir função essencial, logo, métodos que induzem o silenciamento de expressão de proteínas também são úteis como uma estratégia para indicar a função do gene através do fenótipo causado. Em tripanossomatídeos, um método eficiente para indução do silenciamento de um gene seria baseado no mecanismo de RNA de interferência estabelecido em *T. brucei* (ULLU, TSCHUDI E CHAKRABORTY, 2004; KOLEV, TSCHUDI E ULLU, 2011). Em virtude da ausência de maquinaria de RNA de interferência (RNAi) em *T. cruzi* (daROCHA *et al.*, 2003), uma abordagem alternativa à análise da função gênica é o estudo do fenótipo causado pelo silenciamento de genes ortólogos de *T. brucei* por meio de RNAi. Os resultados podem gerar evidências que estejam relacionadas à funcionalidade do gene em *T. cruzi* (NARDELLI *et al.*, 2007, SERPELONI *et al.*, 2011b). Por isso, neste trabalho optamos por esta abordagem para auxiliar no estudo da função dos genes TcFOP-like e TcAPI5-like a partir dos ortólogos em *T. brucei*. Observamos que tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like, possuem ortólogos em *T. brucei* (denominadas de TbFOP-like e TbAPI5-like), conforme ilustrado nos alinhamentos a seguir.

5.7.1 Obtenção da linhagem de RNAi para TbFOP-like (Tb927.6.1470)

Uma análise de similaridade entre as proteínas de *T. cruzi* e *T. brucei* foi feita e a figura 61 mostra o alinhamento e o índice de similaridade de 79% entre TcFOP-like e sua ortóloga em *T. brucei*.

TcFOP-like	MRRDFRRRLRDLYRNVRVRALAFARDERRSERDDAPAPRYVSERRTRLEGFGGSGYQVRSRREGRDERRRF	80
TbFOP-like	MRRDFRRRLRDLYRNVRVRALAFARDERRSERDDAPAPRYVSERRTRLEGFGGSDRQVRSRRSRDGERSRRF	80
TcFOP-like	SDREYRRCAIDRFEREDDERLRRER---FRERLN--EGGIRFCRLRIRRSERR--E R LR-ELRELRALR-	150
TbFOP-like	SDRRRERSAIDRFEREDDERLRRERERRRLLRERLERLERLRDRDLRERLPIRGGVAGLRRLVEERRRRLQRE	160
TcFOP-like	-SAQRNQGNGDRRSKIDDLDRYRDCRGGRRGGGGGFGGAPNS--TEGLDAILDRFRGEN	210
TbFOP-like	NDRQREQQPCRRKLDLILCRINSSRGGNNSAHNKEGARSSPTREGLDEILDRFRGAA	223

FIGURA 63. ALINHAMENTO ENTRE TcFOP-like E TbFOP-like. Em preto destacam-se as regiões idênticas e em cinza as regiões similares. Sendo seu índice de similaridade 79%.

Para construção do vetor, o produto de PCR da sequência alvo do gene de TbFOP-like foi clonado diretamente em vetor p2T7-177/LacZ (figura 25), baseado na estratégia de clonagem por TA (MY, CLARK E GOMEZ-SANCHEZ, 1995). Vale ressaltar que a escolha da sequência alvo está descrita em materiais e métodos.

A seleção dos clones positivos foi feita através da técnica de *toothpick* como descrito no item 4.6.4.4. As colônias selecionadas (FIGURA 62A) foram inoculadas em meio LB e cultivadas para minipreparação dos plasmídeos, conforme descrito no item 4.6.4.5. Para confirmação de clones positivos, após extração do DNA plasmidial por minipreparação, o mesmo foi digerido com a enzima de restrição *Xba*I (New England BioLabs[®] Inc) para liberação do inserto de aproximadamente 546 pares de bases, uma vez que o mesmo é flanqueado por sítios para essa enzima (figura 62B). A enzima *Not*I (New England BioLabs[®] Inc) foi utilizada também para teste de linearização do vetor, conforme ilustrado na figura 62B.

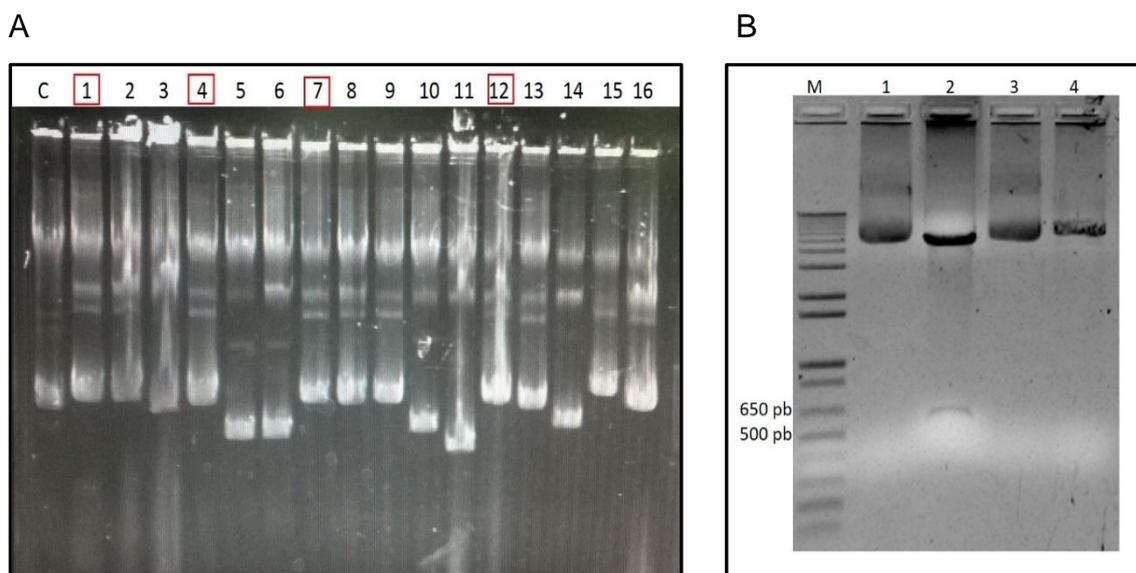


FIGURA 64. TOOTHPICK E DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM p2T7-177/LacZ-FOP. A) C: Controle vetor sem inserto. 1-16 colônias escolhidas para toothpick. Destacados em vermelho os clones selecionados. B) M) Marcador de pares de bases 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1 e 3) p2T7-177/LacZ-FOP #1 não digerido. 2) p2T7-177/LacZ-FOP #1 digerido com a enzima de restrição XbaI (New England BioLabs®Inc) liberando inserto de aproximadamente 546 pares de bases. 4) p2T7-177/LacZ-FOP #1 digerido com a enzima de restrição NotI (New England BioLabs®Inc) para linearização do vetor.

Após a confirmação do clone positivo, os parasitas foram transfectados com a construção linearizada, denominada de p2T7-177/LacZ-FOP #1, e a população resistente foi selecionada com fleomicina, resistência conferida pelo vetor.

Após transfecção, seleção por diluição seriada, obtivemos duas populações clonais, que denominamos de p2T7-177/LacZ-FOP #6 e p2T7-177/LacZ-FOP #7. Estas linhagens foram avaliadas quanto à eficiência do silenciamento do gene TbFOP-like após a indução do RNAi por tetraciclina. Assim, uma curva de crescimento foi realizada com os clones, a qual observou-se uma redução no número de parasitas nas culturas induzidas quando comparadas as culturas não induzidas do clone p2T7-177/LacZ-FOP #6, principalmente nos pontos de 72 e 96 horas após a indução, conforme ilustrado no gráfico 2. Para melhor ilustrar essa diferença, optamos por repetir a curva apenas com o clone p2T7-177/LacZ-FOP #6 no formato de curva “serrote”, conforme descrito no item 4.14.6.2 e ilustrado no gráfico 3

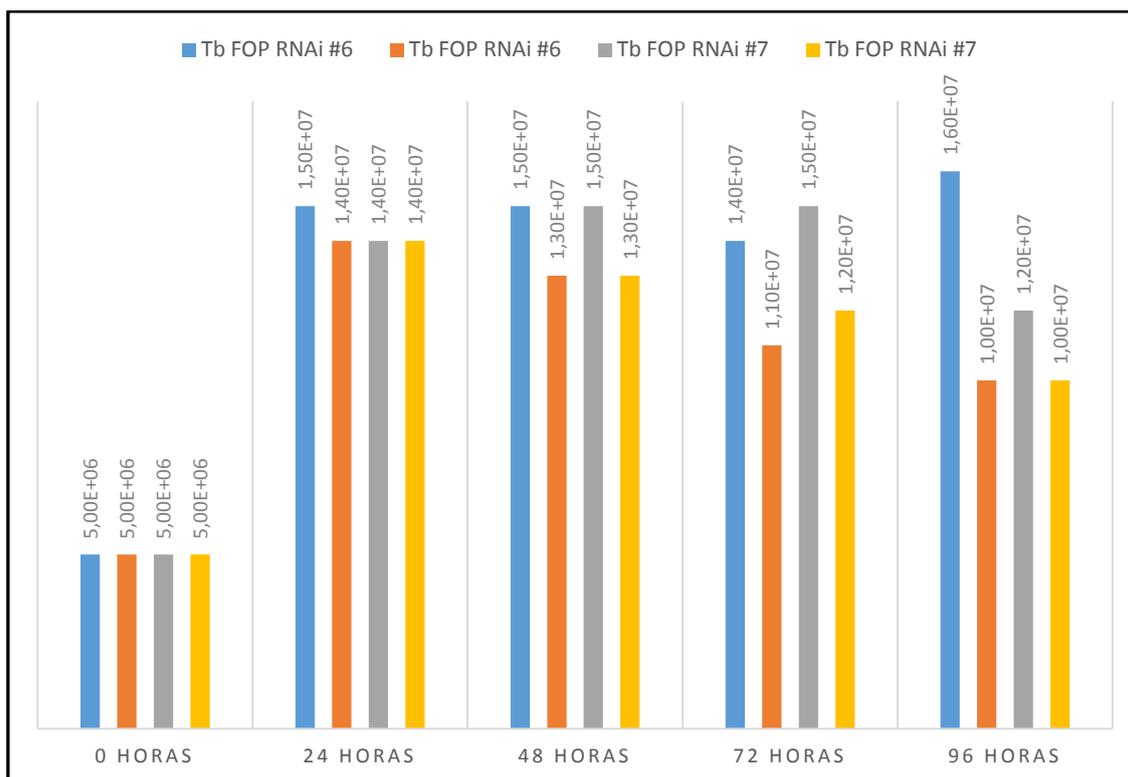


Grafico 2. Curva de crescimento de transfectantes de *T. brucei* p2T7-177/Lacz-TbFOP-like #6 p2T7-177/LacZ- TbFOP-like #7 após a indução de silenciamento do gene TbFOP-like por tetraciclina. TbFOP#6Tet -: Cultura de *Trypanosoma brucei* (#6) não induzida com tetraciclina. TbFOP#6Tet +: Cultura de *Trypanosoma brucei* (#6) induzida com tetraciclina. TbFOP#7Tet -: Cultura de *Trypanosoma brucei* (#7) não induzida com tetraciclina. TbFOP#7Tet +: Cultura de *Trypanosoma brucei* (#7) induzida com tetraciclina Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x. Intervalos em horas para a realização da contagem.

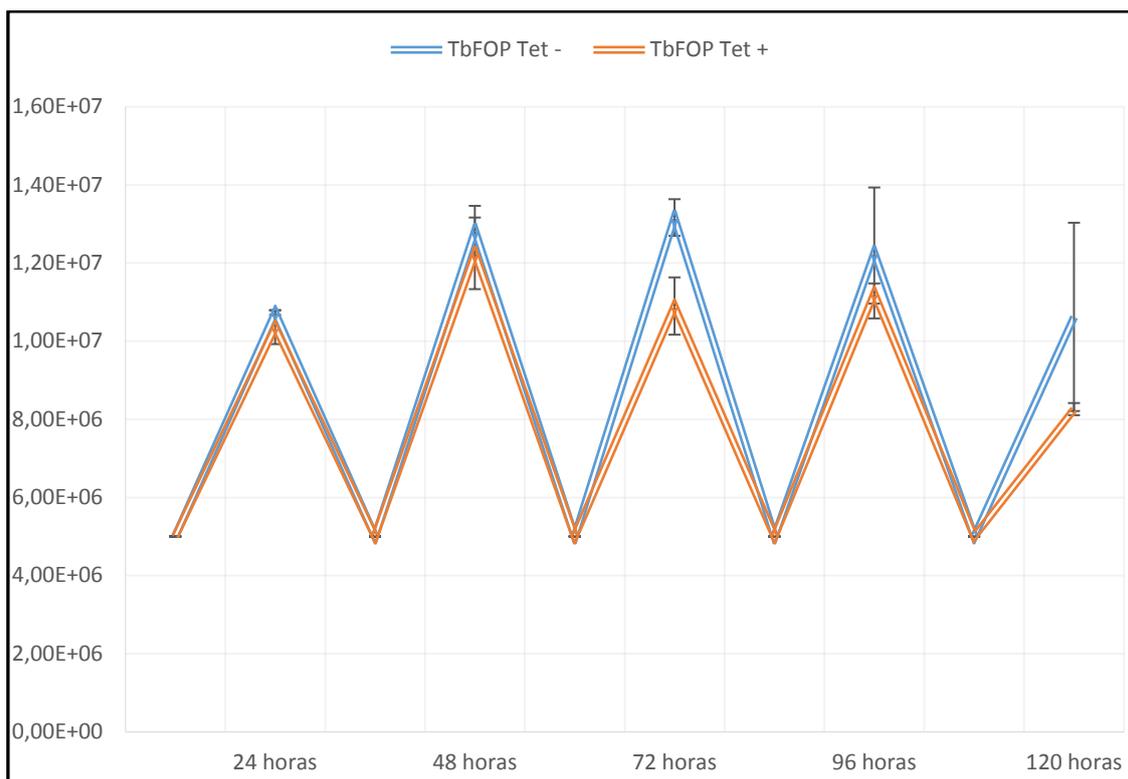


Gráfico 3. Curva de crescimento tipo “serrote” do transfectante de *T. brucei* p2T7-177/LacZ-TbFOP-like #6 após a indução de silenciamento do gene TbFOP-like por tetraciclina. TbFOP Tet -: Cultura não induzida com tetraciclina. TbFOP Tet +: Cultura induzida com tetraciclina. Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x. Intervalos em horas para a realização da contagem.

Para analisar a eficiência do silenciamento quanto a degradação do mRNA alvo, será realizado um PCR quantitativo (qPCR), e para isso foram coletadas amostras nos pontos de 24, 48 e 72 horas para extração de RNA utilizando o reagente TRIzol, conforme instruções do fabricante. Estamos em fase de padronização dos ensaios de qPCR.

Além disso, para ter certeza se o silenciamento de TcFOP-like está alterando o crescimento dos parasitas, pretendemos repetir o experimento e análise das culturas em um intervalo maior que 120 horas, já que não temos informação da meia-vida da proteína.

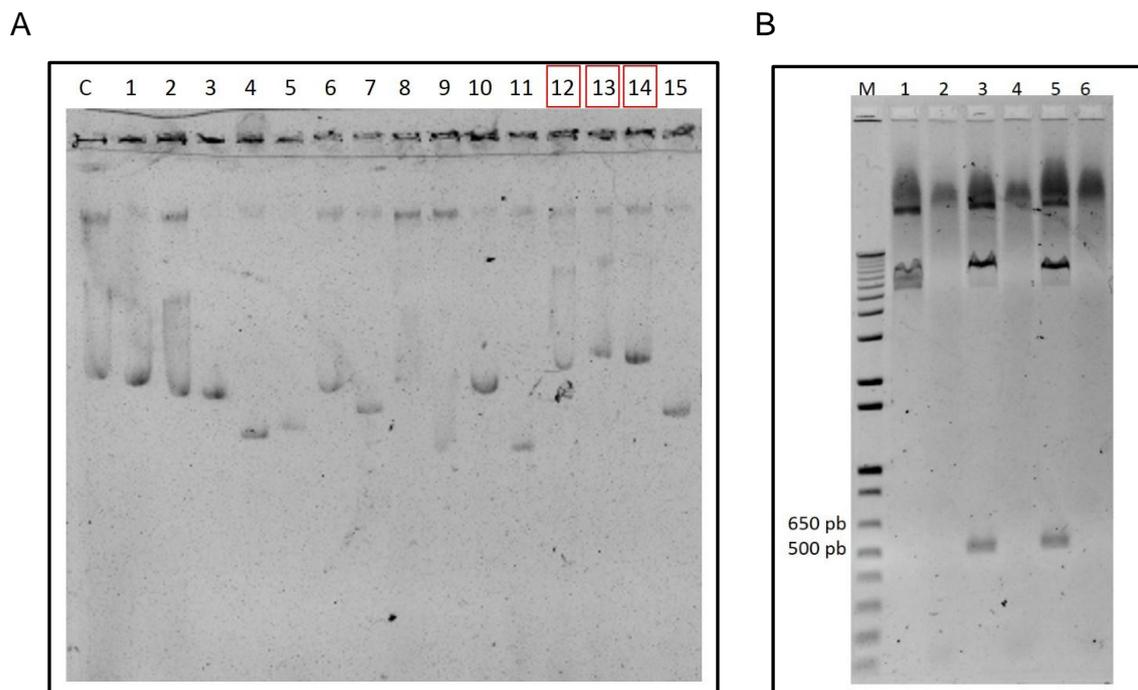


FIGURA 66. TOOTHPICK E PCR DA MINIPREP PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE p2T7-177/LacZ-API5. A) C Controle: vetor sem inserto. 1-15 colônias escolhidas para *toothpick*. Destacados em vermelho os clones selecionados. B) M) Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1) p2T7-177/LacZ-API5 #12.2) Controle negativo 3) p2T7-177/LacZ-API5 #13. 4) Controle negativo. 5) p2T7-177/LacZ-API5 #14 6) Controle negativo.

Após a extração de DNA plasmidial dos clones selecionados, foi feita uma PCR para confirmação dos clones positivos de p2T7-177/LacZ-API5, conforme ilustrado na figura 64B. Após a confirmação, os vetores contendo as sequências alvo (p2T7-177/LacZ-API5#13 e p2T7-177/LacZ-API5#14) foram então linearizados com a enzima *NotI* (New England BioLabs[®]_{INC}), e um total de 10 µg destes DNAs foram transfectados em *T. brucei*, conforme descrito no item 4.9.1.2, infelizmente ainda não obtivemos sucesso na obtenção de clones, pois os parasitas não cresceram com a seleção por fleomicina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177/LacZ. A transfecção foi realizada por três vezes e sem sucesso na seleção dos transfectantes. Logo, a obtenção desta linhagem fica como perspectiva futura, uma vez que o resultado é de grande interesse e relevância para o trabalho.

6 DISCUSSÃO

Os eventos pós-transcricionais são pontos majoritários para a regulação da expressão gênica em Tripanossomatídeos, dos quais os mecanismos que alteram a meia vida do RNA e a tradução são bastante estudados (MARTINEZ-CALVILLO et al, 2010; ARAÚJO E TEIXEIRA, 2011). Entretanto, o transporte nucleocitoplasmático do mRNA ainda não é bem compreendido nesses organismos e, assim, não é possível inferir se esta via poderia também controlar a expressão de genes. Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados evolutivamente distantes e divergentes de leveduras e humanos (MURINGI et al, 2014) e sabe-se que a via de transporte do mRNA, entre todas as vias de transporte de RNAs, é a menos conservada em eucariotos divergentes (SERPELONI et al, 2011 a). Com isso, estudos nesta via podem trazer informações relevantes sobre componentes peculiares e essenciais para a sobrevivência destes parasitas. Por isso, nosso grupo vem investindo em gerar dados sobre fatores que estão envolvidos com a exportação de mRNA usando como modelo o *Trypanosoma cruzi*.

Trabalhos anteriores do grupo, usando análises de genômica comparativa, mostraram que um componente do complexo TREX, Sub2/UAP56, é a proteína mais conservada entre os fatores envolvidos na via de exportação de mRNA (SERPELONI et al.2011 a). TcSub2 é uma proteína nuclear com padrão de distribuição associada com locais de transcrição e processamento de mRNA. Os ensaios com RNA de interferência do ortólogo em *T. brucei* confirmaram que a proteína é essencial para sobrevivência do parasita, e o *knockdown* provocou acúmulo de RNAs poliadenilados no núcleo, demonstrando que ela é também um componente essencial da via de transcrição/exportação de mRNA em tripanossomatídeos (SERPELONI et al, 2011 b). Outra proteína que se mostrou conservada em diferentes supergrupos eucarióticos examinados, incluindo várias espécies de Excavata e Chromalveolata (SERPELONI et al, 2011 a), é uma RNA helicase DEAD-box denominada de Hel45 que está envolvida com a exportação de mRNA, pois sua migração é dependente da via de transporte mediada pelo receptor de exportação Mex67 (INOUE et al, 2014).

Com isso, estas duas proteínas foram alvos para análises de proteômica que permitiram a identificação, com parâmetros estabelecidos de alta confiança, de componentes associados ao complexo proteico de TcSub2 e Hel45 (INOUE, 2015).

Dentre as proteínas identificadas com confiabilidade e mais abundantes, duas são anotadas como hipotéticas no banco de dados e seriam candidatas a parceiras de TcSub2 e Hel45. Além disso são proteínas cuja sequência de aminoácidos é pouco conservada em outros organismos, sendo a conservação exclusiva de espécies de tripanossomatídeos. Logo, a hipótese deste trabalho foi de que estas proteínas seriam fatores específicos de tripanossomatídeos e que atuariam na exportação de mRNA em *T. cruzi* através da interação com TcSub2 e/ou Hel45. Para testar esta hipótese, este projeto envolveu abordagens de bioinformática, genética reversa, biologia celular e molecular para confirmar estas interações e investigar o papel destas proteínas.

Como as proteínas alvo deste estudo estão anotadas como hipotéticas no banco de dados e não foram caracterizadas funcionalmente, nosso primeiro objetivo foi prever domínios existentes nessas proteínas com auxílio da ferramenta hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998) que pudessem dar indicativos sobre sua função e esta ferramenta foi eficiente em nossos estudos visto que para ambas as proteínas foi possível prever domínios conservados. Para a proteína com o número de identificação nos bancos de dados Tc00.1047053509033.80, foi predito um domínio denominado *FOP duplication* (VAN DJIK et al, 2010), e por isso, foi intitulada neste trabalho de TcFOP-like. Este dado é interessante, visto que a proteína FOP de mamíferos foi atribuída como componente dinâmico do complexo TREX, desempenhando o papel como co-adaptadora da exportação de mRNA, e como ativadora das atividades helicase e ATPase de Sub2/UAP56 (CHANG et al., 2013). Assim, caso o domínio predito na proteína de *T. cruzi* seja funcional, será um forte indicativo de sua interação com TcSub2 e, conseqüentemente, de seu papel como componente da exportação de mRNA.

Já para a proteína com número de identificação sendo Tc00.1047053511807.280, foi predito um domínio API5 (*Apoptosis Inhibitor 5*), por isso, foi intitulada neste trabalho como TcAPI5-like. API5 é uma proteína descrita como um fator anti-apoptótico e com superexpressão em células cancerígenas (HAN et al., 2012). O gene API5 tem sido encontrado em animais, protistas e plantas (LI et al, 2011) e codifica uma proteína também conhecida como AAC-11 (*fibroblast growth factor 2-interacting factor*), FIF (*fibroblast growth factor 2-interacting factor*) e MIG8 (*cell migration-inducing gene 8*) (HAN et al, 2012). Com a ferramenta EMBOSS needle fizemos o alinhamento das sequências de TcAPI5-like e API5 de humanos

que mostram baixos índices de similaridade e identidade (34,5% e 18,7% respectivamente). Entretanto, utilizando a ferramenta PHYRE2 (KELLEY & STERNBERG, 2009) para predição de modelo estrutural secundário, foi possível realizar a modelagem molecular de TcAPI5-like, que mostrou conservação e similaridade estrutural com API5 de humanos, onde 63% da sequência (354 aminoácidos) foram modelados com 100% de confiança (probabilidade de que sejam homólogos) com o modelo de pontuação mais alto. Vale ressaltar que os modelos são classificados de acordo com a pontuação de alinhamento bruto, isso leva em conta a seqüência e semelhança de estrutura secundária, inserções e deleções. Interessantemente, TcAPI5-like mostra outras semelhanças com API5 de humanos, como por exemplo as repetições HEAT e ARM (HAN *et al.*, 2012). As repetições ARM são características de proteínas como β -cateninas e importinas (TEWARI *et al.*, 2010). O papel de API5 na via de exportação ainda é pouco compreendido, porém, em *Oriza sativa*, foi demonstrado que API5 interage com Sub2/UAP56 (LI *et al.*, 2011) e em *Drosophila*, com Acinus, componente do Complexo Junção Éxon (EJC) (RIGOU *et al.*, 2009). Da mesma forma que TcFOP-like, existem evidências que possam indicar um possível papel de TcAPI5-like na via de exportação, apesar da baixa conservação em nível de sequência primária.

Estas análises *in silico* reforçaram a necessidade de investir em abordagens experimentais, que confirmassem não apenas sua interação com outros componentes da via, como também sua função direta com a exportação de mRNA. O primeiro passo foi então analisar a localização celular das proteínas. Aqui ensaios de imunofluorescência com os soros policlonais anti-TcFOP-like e anti-TcAPI5-like mostraram que são proteínas nucleares, confirmando o que vem sendo descrito na literatura para as proteínas FOP e API5 de outros eucariotos. Em vertebrados, por exemplo, a proteína FOP encontra-se associada à cromatina (VAN DIJIK *et al.*, 2010), e API5 é descrita como uma proteína nuclear (RIGOU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011) envolvida na inibição da apoptose (TEWARI *et al.*, 1997).

A partir disso, tentamos comparar o padrão de distribuição nuclear destas proteínas com a proteína TcSub2. Para tanto, imagens de microscopia confocal foram obtidas e através de correlação de fluorescência, foram feitas análises de colocalização entre as proteínas TcFOP-like e TcAPI5-like com TcSub2. Analisando os dados, foi possível observar que elas possuem um padrão de distribuição nuclear muito semelhante com TcSub2, ou seja, assim como TcSub2, elas se localizam em

focos dispersos por todo núcleo celular, exceto nucléolo (SERPELONI et al, 2011b). A comparação dos gráficos de intensidade de fluorescência sugere que tais proteínas colocalizam, reforçando nossa hipótese de que ambas proteínas interagem com TcSub2 e possam ser de algum modo participantes da via de exportação de mRNA.

Para analisar então a interação entre as proteínas, foram realizados ensaios de purificação de complexos com detecção de proteínas através de *Western blot* afim de confirmar os dados anteriores de proteômica e avaliar a presença de TcAPI5-like e TcFOP-like em amostras de outros componentes da via. Para isso, utilizamos amostras purificadas dos complexos de TcSub2, TcHel45 e TcMex67, provenientes de parasitas transfectantes expressando TcSub2 fusionada à GFP, TcHel45 e TcMex67 fusionadas à PTP, que foram previamente produzidos pelo nosso grupo. Os ensaios de *Western blot* foram realizados utilizando os soros policlonais de TcFOP-like e TcAPI5-like visando revelar ou não a presença dessas proteínas nos respectivos complexos proteicos.

Corroborando com os resultados de proteômica, os ensaios de imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcSub2 confirmaram a presença de TcFOP-like nesse complexo. Este resultado seria o mais esperado, visto que FOP contém um domínio na extremidade C-terminal, composto por uma região rica em arginina e glicina e uma duplicação da sequência LDXXLD (onde X é qualquer aminoácido) conhecido como UBM (Sub2/UAP56 Binding Motif) (VAN DIJK et al, 2010; CHANG et al, 2013). E no caso de TcFOP-like o motivo UBM está presente. Pertinentemente, TcFOP-like aparece nos complexos proteicos de TcHel45, que como já descrito anteriormente, é uma helicase que migra entre núcleo e citoplasma através de uma via de exportação de mRNA dependente de Mex67 (INOUE et al, 2014), dando maiores indícios de que esta proteína estaria associada a via de exportação de mRNA.

Além disso, os dados mostraram que TcFOP-like está presente em complexos de TcMex67, homólogo de Mex67 de *T. brucei*, cujo papel como receptor de exportação já foi estabelecido (DOSTALOVA et al, 2013). Existem evidências em humanos que estas proteínas interagem, pois FOP metilada se liga ao domínio NTF2 de NXF1(Mex67) e estimula a transferência do mRNA para o dímero NXF1:p15, o qual promove a exportação do mRNA para o citoplasma (CHANG et al, 2013). Sabe-se que NXF1 possui um domínio N-terminal de ligação ao RNA (RBD)

(HAUTBERGUE et al, 2008) que forma uma interação com o domínio intramolecular NTF2L suprimindo a atividade de ligação ao RNA do receptor de exportação (Figura 8 da introdução), e assim, TREX rompe essa interação liberando os domínios NTF2 e RBD (VIPHAKONE et al, 2012). Obado e colaboradores (2016) mostraram que Mex67 de *T. brucei* (TbMex67), possui o domínio NTF2L, e deve servir de plataforma de ligação à Ran, sugerindo que o mecanismo de exportação de mRNA em tripanossomatídeos seja dependente de Ran-GTP e conseqüentemente diferente do apresentado por outros eucariotos. Logo, o papel de FOP na transferência de RNA para Mex67 deve ser melhor investigado.

Os ensaios de imunoprecipitação dos complexos proteicos contendo TcSub2, também confirmaram os resultados de proteômica no que diz respeito a presença de TcAPI5-like. Inoue (2015) sempre observou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 60 kDa em SDS-PAGE específica das amostras de imunoprecipitação de TcSub2. Esta banda foi excisada do gel e submetida à análise por espectrometria de massas, confirmando se tratar de TcAPI5-like. Logo, é muito provável que TcAPI5-like seja um fator que interage com TcSub2, apesar de ainda serem necessárias análises genéticas para relacionar o papel de TcAPI5-like na via de exportação. Mesmo assim, tem sido demonstrado que em outros organismos API5 interage com componentes da via de exportação, como Sub2/UAP56 e EJC. (LI et al., 2011; RIGOU et al., 2009). Também é provável que o motivo API5 seja importante para função de TcAPI5-like e sua interação com fatores de exportação de mRNA também em tripanossomatídeos.

Com isso, os dados dos ensaios de imunoprecipitação fortalecem e corroboram nossa ideia de que TcFOP-like e TcAPI5-like estariam envolvidas na via de exportação de mRNA e que interagem com TcSub2. Para fazer tal afirmação ainda é necessário a realização dos ensaios de isolamento dos complexos proteicos de TcFOP-like e TcAPI5-like e verificar a presença das proteínas já caracterizadas, como por exemplo, TcSub2, TcMex67 e TcHel45. Para isso, geramos linhagens celulares com TcFOP-like e TcAPI5-like fusionadas à GFP na extremidade N-terminal. Em ambos os casos, as proteínas são nucleares como esperado. Além disso, foram geradas linhagens expressando a sequência da proteína sem o domínio FOP, e conseqüentemente sem o motivo de ligação a Sub2 (UBM) para os ensaios de imunoprecipitação, com intuito de verificar o papel do domínio FOP na interação entre TcFOP-like e TcSub2.

Um dos desafios mais importantes e mais antigos para os estudos de captura de afinidade é estabelecer um ambiente adequado para a retenção de alta fidelidade das interações fisiológicas de qualquer complexo macromolecular escolhido desde a extração até à análise (AEBERSOLD, E MANN, 2003). Após testes com diferentes tampões e diferentes técnicas, conseguimos realizar um ensaio de imunoprecipitação promissor. Os ensaios preliminares de imunoprecipitação mostram que TcSub2 está presente nos complexos proteicos tanto de TcFOP-like quanto de TcAPI5-like, confirmando a interação das respectivas proteínas e fortalecendo nossa hipótese de que sejam fatores associados a via de exportação de mRNA.

Estes ensaios também dão indícios de que o domínio FOP presente em TcFOP-like seja um domínio funcional, uma vez que em sua composição estejam presentes os motivos de ligação à Uap56/Sub2 (UBMs). A geração de uma linhagem transfectante com a ausência do domínio FOP (TcFOP-like Δ FOP), possibilitou analisar e sugerir que TcSub2 não se faz presente nos complexos proteicos de TcFOP-like Δ FOP, sugerindo que a interação entre TcSub2 e TcFOP-like seja via domínio FOP e talvez mais especificamente via motivo UBM, como já descrito na literatura para organismos como mamíferos por exemplo (CHANG, et al 2013). O aprimoramento das condições e a continuidade dos ensaios de proteômica (imunoprecipitação e espectrometria de massas) nos darão resultados ímpares no âmbito da exportação de mRNA e identificação e caracterização de proteínas em tripanossomatídeos.

Nos transfectantes de TcFOP-like expressando GFP, observamos um crescimento lento da cultura transfectada e a perda da expressão de GFP a medida que os parasitas eram mantidos em cultura. O que levantou questões quanto à interferência da etiqueta na estrutura e, conseqüentemente, na função da proteína. Que poderia ser um fenômeno tipo superexpressão dominante-negativo, ou seja, a expressão de uma proteína funcionalmente inativa competindo com a proteína endógena e assim, afetando algum processo biológico.

Por essa razão, para certificar que a superexpressão altera realmente o crescimento, foram realizadas contagens da concentração de parasitas durante dez dias, e observamos uma redução significativa da concentração de parasitas nas culturas dos transfectantes em comparação com a cultura de parasita selvagem. Assim, essa redução na densidade celular das culturas de transfectantes poderia ser

um indicativo de alteração no ciclo celular, ou morte celular. Para avaliar se existia alteração no ciclo celular, utilizamos o método de coloração de DNA com Iodeto de Protídeo e análise do conteúdo de DNA através citometria de fluxo (FRIED, PEREZ E CLARKSON, 1976). Comparadas ao controle, parasitas expressando TcFOP-like e TcFOP-like Δ FOP fusionadas a GFP apresentaram um aumento significativo de parasitas na fase G2 do ciclo celular, sendo o resultado indicativo das médias das réplicas técnicas \pm Desvio Padrão: parasita selvagem 19,53% \pm 0,58%, TcFOP-like 27,03% \pm 1,59% e TcFOP-like Δ FOP 22,36% \pm 1,05%.

Com base na literatura, tem-se demonstrado que em células eucarióticas, a detenção em fase G2/M seria uma resposta a danos no DNA. Neste caso, a retenção nesta fase impediria que o DNA danificado entre em mitose até que o dano seja reparado, pois as células que não conseguiram reparar antes de entrar em fase G2/M acabam entrando em morte celular (DIPAOLA, 2002). De modo geral, a retenção de células em qualquer fase do ciclo celular permite a reparação do DNA danificado, mantendo assim o conteúdo normal das células (ZAMANI et al 2016). Por isso, estas análises apontam para o fato de que a superexpressão de TcFOP-like fusionada a GFP pode estar causando algum estresse celular ou dano no DNA que poderia induzir a retenção na fase G2 e, conseqüentemente, alteração no tempo de replicação celular. Para confirmar isso, deveríamos primeiro verificar se a diminuição no crescimento não seria devido a morte celular dos parasitas e depois talvez usar marcadores de dano de DNA para confirmar esta hipótese.

Sem dúvida, FOP tem papel essencial em outros organismos e teria interação com cromatina e regiões típicas de regulação de expressão de genes, além de seu envolvimento com a exportação de mRNA (impulsionando a remodelação do complexo TREX durante a formação do mRNP para a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma (CHANG et al, 2013, TENG et al, 2013; SCHULMANN et al, 2016),). Por exemplo, FOP se localiza principalmente em *speckles* nucleares estreitamente associada com heterocromatina facultativa de células em interfase de vertebrados (VAN DIJK et al, 2010; TENG et al, 2013). Ela também está envolvida na ativação dos genes-alvo do receptor estrogênio em células de câncer de mama (VAN DIJK et al, 2010), e na regulação negativa de γ globulina fetal durante a transição do desenvolvimento da hemoglobina fetal para a hemoglobina adulta (VAN DIJK et al, 2010 b). Apesar de pouco se saber sobre o mecanismo molecular de controle da transcrição mediada por FOP, existem evidências de ela atuaria como

fator de regulação da expressão gênica (FANIS et al, 2012). Partindo disso, é possível que TcFOP-like também tenha função essencial em *T. cruzi* e certamente a fusão N-terminal a GFP altera a função da proteína superexpressa causando assim um efeito de dominante negativo, que teve como consequência retenção do ciclo celular em G2, causando uma diminuição na cinética de crescimento. Contudo, independente da causa, estas linhagens podem também ser utilizadas para ensaios de análise do fenótipo e assim ajudar a entender a função da proteína nestes parasitas.

Apesar da possibilidade de usar a linhagem superexpressora de TcFOP-like para análise genéticas, o melhor seria obter mutantes dos genes para ter certeza do fenótipo causado pela ausência da proteína. Visto que já temos indicativo de que TcFOP-like parece ter função essencial, e esse também poderia ser o caso de TcAPI5-like, ensaios de nocaute em *T. cruzi* além de laboriosos, poderiam não ser viáveis, pois a metodologia existente até o momento não permite nocaute condicionado para estudo de genes essenciais. Por isso, a abordagem escolhida para estudo de função de genes foi a metodologia de RNA de interferência estabelecida em *T. brucei* (ULLU, TSCHUDI E CHAKRABORTY, 2004; KOLEV, TSCHUDI E ULLU, 2011).

TcFOP-like e TcAPI5-like possuem alta índice de similaridade (79% e 72%, respectivamente) com suas ortólogas em *T. brucei*. Logo, tentamos obter linhagens para RNAi para ambas as proteínas. No caso de TbAPI5-like, as construções foram obtidas, mas mesmo depois de três tentativas, ainda não conseguimos selecionar os transfectantes. No caso de TcFOP-like, as linhagens foram geradas e os primeiros ensaios para avaliar a indução por tetraciclina foram feitos através de curva de crescimento do tipo “serrote”, que mantém a cultura sempre em fase exponencial de crescimento. Os dados obtidos com os transfectantes de p2T7-177/LacZ-TbFOP-like mostraram uma pequena diferença na densidade de cultura após a indução do sistema de RNA de interferência por tetraciclina, apenas no ponto de 72 horas em comparação ao controle não induzido, onde a cultura não induzida apresenta uma densidade de $1,32 \times 10^7$ células/mL, enquanto que a cultura induzida apresenta $1,09 \times 10^7$ células/mL. Esta diferença pode não ser significativa e é necessário confirmar que o mRNA de TbFOP-like está sendo realmente degradado antes de qualquer conclusão. No entanto, iremos analisar a eficiência do silenciamento através de ensaios de PCR quantitativo (qPCR) e, maiores estudos para entender a função

destas proteínas na exportação de mRNA precisam ser feitas através de análises genéticas cujas ferramentas ainda estão sendo obtidas ou padronizadas.

7 CONCLUSÕES

- O gene de Tc00.1047053509033.80 em *T. cruzi* possui 633 pares de bases e codifica uma proteína de 26 kDa, que foi intitulada de TcFOP-like por possuir o domínio FoP *duplication*.
- O gene de Tc00.1047053511807.280 em *T. cruzi* possui 1689 pares de bases e codifica uma proteína de 61 kDa que foi intitulada de TcAPI5-like por possuir o domínio API5.
- TcFOP-like e TcAPI5-like são proteínas nucleares cuja a conservação em nível de sequência de aminoácidos ocorre exclusivamente em espécies de tripanossomatídeos.
- Tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like colocalizam com TcSub2, uma proteína essencial de tripanossomatídeos e componente da via de exportação de mRNA.
- Os ensaios de imunoprecipitação mostram que tanto TcFOP-like quanto TcAPI5-like interagem com TcSub2
- A interação entre TcFOP-like e TcSub2 se dá via domínio FOP.
- TcFOP-like está presente em amostras de complexos de TcMex67 e TcHel45, sugerindo sua interação com outros componentes da via de exportação de mRNA.
- A fusão N-terminal de GFP à TcFOP-like altera significativamente a cinética de crescimento da cultura, alterando a progressão do ciclo celular visto o aumento na percentagem de células na fase G2/M.

8 PERSPECTIVAS

- Aprimorar os ensaios de imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP-like e TcAPI5-like. Estes experimentos confirmarão a interação dessas proteínas com componentes da via de exportação de mRNA como TcSub2, TcHel45 e TcMex67 e poderão ser usados para análises de proteômica que enriquecerão os dados sobre componentes da via de exportação de mRNA.
- Obter as linhagens de parasitas expressando FOP mutada no motivo de ligação a Sub2 para avaliar a funcionalidade deste motivo em tripanossomatídeos.
- Padronizar ensaios de qPCR para análise da eficiência do silenciamento do gene ortólogo de TcFOP-like em *T. brucei* e avaliar o fenótipo quanto ao efeito do silenciamento na exportação de mRNA, estrutura do DNA ou ciclo celular.
- Obtenção das linhagens de TbAPI5-like para ensaios de RNA de interferência que serão usadas em análises genéticas para investigar a função de API5 na exportação de mRNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUZZI K.C.; LACADIE, S.; ROSBASH, M. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. **EMBO J.** v. 23, p. 2620-2631. 2004.
- ALBER, F; DOKUDOVSKAYA, S; VEENHOFF, L. M; ZHANG, W; KIPPER, J. DEVOS, D. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* v. 450(7170). P. 695-701. 2007
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell.** 4th ed ed. New York: Garland Science, 2002.
- ARAÚJO, P. R., & TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post transcriptional control of stage-specific gene expression in trypanosoma cruzi - A review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 106(3), 257–266. 2011.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, T.R.; KINGSTON, R.E. Current Protocols in Molecular Biology. **New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons.** 1987.
- AEBERSOLD, R. AND M. MANN. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.** v.422. p. 198-207. 2003
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BATISTA, M. et al. A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 259, jan. 2010.
- BIRNBOIM, H. C; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** Nov. 1979.
- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Trop**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>>. Acesso em: 14 jan 2017.
- CHANG, C.-T., HAUTBERGUE, G. M., WALSH, M. J., VIPHAKONE, N., VAN DIJK, T. B., PHILIPSEN, S., & WILSON, S. A. Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. **The EMBO Journal**, 32(3), 473–86. 2013.
- CHAVEZ, S; BEILHARZ, T; RONDON, A. G; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2,

connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J.** v. 19. p. 5824–5834. 2000.

CONTRERAS, V. T. et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123-133, 1988.

COOK, A. et al. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 647-671, jan. 2007.

COLE, C. N; SCARCELLI, J. J. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Curr Opin Cell Biol.**v. 18. p 299-306. 2006

CROSS, G.; MANNING, J. Studies on ascaridoid nematodes of pythons: two new species from New Guinea. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, 6 abr. 1973.

CRONSHAW, J. M; KRUTCHINSKY, A. N; ZHANG, W; CHAIT, B. T; MATINUS, M. J. Proteomic analyses of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol.* V. 158(5). P. 915-927. 2002.

CROWE, J; MASONE, B. S; RIBBE, J. One-step purification of recombinant proteins with to 6xHis tag and Ni-NTA resin. **Mol Biotechnol.** Dec. 1995

DaROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 175-186, fev. 2004.

DOSTALOVA, A. et al. The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. **Mol Microbiol**, v. 88, n. 4, p. 728-739, maio 2013.

DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 18884-18894, 23 maio 2003.

DE GAUDENZI, J. G; NOÉ, G. CAMPO, V.A; FRASCH, A.C; CASSOLA, A. Gene expression. Regulation in trypanosomatids. **Essays in Biochemistry.** v.51. p; 31-46. 2011

DIPAOLA, To arrest or not to G2-M cell-cycle. **Clin. Cancer. Res.** v:8. p: 3512-3519, 2002.

DONIGER, T. et al. A comparative genome-wide study of ncRNAs in trypanosomatids. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 615, jan. 2010.

DUMAS, C. et al. A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 2033-2046, dez. 2006.

EDDY, S. R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 755-763, 1998.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** v.32. p. 1792-1797. 2004

EL-SAYED, N. M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

FANIS, P. GILLEMANS, N. AGHAJANIREFAH, A. POURFARZAD, F. DEMMERS, J. ESTEGHAMAT, F. VADLAMUDI, R. K. GROSVELD, F. PHILIPSEN, S. VAN DIJK, T. B. Five friends of methylated chromatin target of protein-arginine-methyltransferase (PRMT-1) (chttop), a complex linking arginine methylation to desumoylation. **Mol Cell Proteomics**. v. 11. p. 1263-1273. 2012

FELDHERR, C. M.; AKIN, D. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. **J Cell Sci.** 110(Pt24):3065-70. 1997

FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D222-30, jan. 2014.

FORLER, D; RABUT, G.; CICCARELLI, F. D.; HEROLD, A.; KÖCHER, T.; NIGGEWEG, R.; BORK, P.; ELLENBERG, J.; IZAURRALDE, E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. **Mol. Cell. Biol.** v. 24, p. 1155–1167. 2004.

FRIED, J.; PEREZ, A. G.; CLARKSON, B. D. Flow cytometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide: Properties of the Method and Mathematical Analysis of the Data. **The Journal Cell Biology**. v. 71. 1976

GLISOVIC, T. et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1977-1986, 2008.

GRÜNWARD, D; SINGER, R.H; ROUT, M. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. **Nature**. v. 475. p: 333-341. 2011.

HAN, B. G., KIM, K. H., LEE, S. J., JEONG, K. C., CHO, J. W., NOH, K. H., KIM, T. W., KIM, S. J., YOON, H. J., SUH, S.W., LEE, S., LEE, B.I. Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules. **J Biol Chem**.v. 287. P 10727-10737. 2012

HEATH, C. G., VIPHAKONE, N., WILSON, S. A. The role of TREX in gene expression and disease. **Biochemical Journal**. v. 473. p. 2911-2935. 2016

HOFMANN, I. et al. Symplekin, a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in mRNA Biogenesis in *Xenopus laevis* Oocytes. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 5, p. 1665-1676, 2002.

HUGHES, A. L., & PIONTKIVSKA, H. Molecular phylogenetics of trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.2, n.15. 2003.

INOUE, A. H., SERPELONI, M., HIRAIWA, P. M., YAMADA-OGATTA, S. F., MUNIZ, J. R. C., MOTTA, M. C. M., ÁVILA, A. R. Identification of a Novel Nucleocytoplasmic Shuttling RNA Helicase of Trypanosomes. **PLoS ONE**, 9(10), e109521. 2014.

INOUE, A. H. Exportação de mRNA em Trypanosoma cruzi: Análise funcional de TcHel45. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15572>

ISKEN, O.; MAQUAT, L. E. Quality control of eukaryotic mRNA : safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes Dev**, v. 21, n. 15, p. 1833-1857, 2007.

JIMENO, S. RONDÓN, A. G. LUNA, R. AGUILERA, A. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. **EMBO J.**v. 21. P 3526-3535. 2002

KATAHIRA, J. Nuclear export of messenger RNA. **Genes**. v.6, p. 163-184. 2015.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 7, p. 533-543, jul. 2007.

KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat Protoc**, v. 4, n. 3, p. 363-731, jan. 2009.

KEMINER, O; PETERS R. permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 77(1): 217-28. 1999.

KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature reviews. Molecular cell biology**. v. 8, n. 10, p. 761-73. 2007.

KOLEV, N. G; TSCHUDI, C; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryotic Cell**. v. 10, n 9, p. 1156-1163. 2011.

KUGERATSKI, F.G; BATISTA, M; INOUE, A. H; RAMOS, B.D; KRIEGER, M.A; MARCHINI, F. K. pTcGW plasmid vectors 1.1 version: a versatile tool for Trypanosoma cruzi gene characterization. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Agosto. 2015.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation**. v. 14, p. 1035-60. 1956

LI, X., GAO, X., WEI, Y., DENG, L., OUYANG, Y., CHEN, G., LI, X., ZHANG, Q., WU, C. Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration *Plant Cell*.v. 23. P. 1416-1434. 2011.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple ' mini-prep ' procedure. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.

MARTINEZ-CALVILLO, S; VIZUET-DE-RUEDA, J; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E; MANNING-CELA, R. G; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010.

MASUDA, S. et al. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. **Genes Dev**, v. 19, n. 13, p. 1512-1517, 2005.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**. v. 6. p: 459-474. Abril. 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

McANDREW, M. et al. Testing Promoter Activity in the Trypanosome Genome Isolation of a Metacyclic-Type VSG Promoter , and Unexpected Insights into RNA Polymerase II Transcription. **Exp Parasitol Parasitol**, v. 76, n. 90, p. 65-76, 1998.

MOTTA, M. C. M., MARTINS, A. C. D. A., DE SOUZA, S. S. A., CATTAPRETA, C. M. C., SILVA, R., KLEIN, C. C., ... DE VASCONCELOS, A. T. R. Predicting the Proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and Their Respective Endosymbionts Reveals New Aspects of the Trypanosomatidae Family. **PLoS ONE**, 8(4). 2013.

MURUNGI, E; BARLOW, L. D; VENKATESH, D; ADUNG'A, V. O; DACKS, J. B; FIELD, M. C; CHRISTOFFELS, A. A comparative analysis of trypanosomatid SNARE proteins. **Parasitol Int**. 63(2):341-8. 2014

MY, Z; CLARK, S. E; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Universal cloning method by TA strategy. **Biotechniques**. 19(1). 1995.

NARDELLI, S. C., AVILA, A. R., FREUND, A., MOTTA, M. C., MANHÃES, L., DE JESUS, T. C., SCHENKMAN, S., FRAGOSO, S. P, KRIEGER, M. A., GOLDENBERG, S., DALLAGIOVANNA, B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**.v. 6. P. 337-345. 2006

OBADO, S. O; BRILLANTES, M; URYU, K; ZHANG, W; KETAREN, N. E; CHAIT, B.T; FIELD, M. C; ROUT, M. P. Interactome mapping reveals the evolutionary history of the nuclear pore complex. **PLoS Biology**. v.14. 2016.

OEFFINGER, M. et al. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. **Nat Methods**, v. 4, n. 11, p. 951-956, 2007.

O'LEARY, N. A, WRIGHT, M. W, BRISTER , J. R. CIUFO, S. HADDAD, D. MCVEIGH, R. RAJPUT, B. ROBERTSE, B. SMITH-WHITE, B. AKO-ADJEI, D. ASTASHYN, A. BADRETDIN, A. BAO, Y. BLINKOVA, O. BROVER, V. CHETVERNIN, V. CHOI, J. COX, E. ERMOLAEVA, O. FARRELL, C. M. GOLDFARB, T. GUPTA, T. HAFT, D. HATCHER, E. HLAVINA, W. JOARDAR, V. S. KODALI, V. K. LI, W. MAGLOTT, D. MASTERSON, P. MCGARVEY, K. M.

MURPHY, M. R. O'NEILL, K. PUJAR, S. RANGWALA, S. H. RAUSCH, D. RIDDICK, L. D. SCHOCH, C. SHKEDA, A. STORZ, S. S. SUN, H. THIBAUD-NISSEN, F. TOLSTOY, I. TULLY, R. E. VATSAN, A. R. WALLIN, C. WEBB, D. WU, W. LANDRUM, M. J. KIMCHI, A. TATUSOVA, T. DICUCCIO, M. KITTS, P. MURPHY, T. D. PRUITT, K. D. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* v.44. p.733-745. 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 3th ed., 2001.

SMIRCICH, P., EASTMAN, G., BISPO, S., DUHAGON, M. A., GUERRA-SLOMPO, E. P., GARAT, B., GOLDENBERG, S., MUNROE, D.J., DALLAGIOVANNA, B., HOLETZ, F., SOTELO-SILVEIRA, J. R. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* **BMC Genomics.** V. 16. P. 416-443. 2015.

REED, R. HURT, E. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. **Cell.** v. 108. p. 523-531. 2002

REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol,** v. 128, n. 1, p. 115-118, 25 abr. 2003.

RICE, P. The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet,** v. 16, n. 6, p. 276-277, 2000.

RIGOU, P. PIDDUBNYAK, V. FAYE, A. RAIN, J. C. MICHEL, L. CALVO, F. POYET, J. L. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. **EMBO J.** v. 28. p. 1576-1588. 2009

RODRÍGUEZ-NAVARRO, S; FISCHER, T; LUO, M; ANTÚNEZ, O; BRETTSCHEIDER, S; LECHNER, J; PÉREZ-ORTÍN, J.E; REED, R; HURT, E. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. **Cell.** 116:75–86. 2004.

ROUT, M. P; AITCHISON, J. D; SUPRAPTO, A; HJERTASS, K, ZHAO, Y; CHAIT, B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture and transport mechanism. *J Cell Biol.* v. 148(4). P. 635-651. 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 3th ed., 2001.

SERPELONI, M., VIDAL, N. M., GOLDENBERG, S., AVILA, A. R., & HOFFMANN, F. G. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC Evolutionary Biology,** 11(1), 7. 2011a.

SERPELONI, M., MORAES, C. B., MUNIZJOÃ, J. R. C., MOTTA, M. C. M. RAMOS, A. S. P., KESSLER, R. L., ÁVILA, A. R. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. **PLoS ONE,** 6(6). 2011b.

SCHWEDE, A. et al. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 16, p. 5511-28, set. 2009.

SEGREF, A; SHARMA, K; DOYE, V; HELLWIG, A; HUBER, J. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. **Embo J**. v. 16. P. 3256–3271. 1997.

STUTZ, F. IZAURRALDE, E. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. **Trends Cell Biol**. v. 13. p. 319-327.2003

STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 7, p. 490-501, jul. 2010.

STRASSER, K; MASUDA, S; MASON, P; PFANNSTIEL, J; OPPIZZI, M. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. **Nature**. v. 417. p. 304–308. 2002

STRÄSSER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 648-652., 2001.

TAMURA, K; HARA-NISHIMURA, I. The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *Journal of experimental botany*. 64(4). P. 823-832. 2012.

TENG, I. F., & WILSON, S. A. Mapping Interactions between mRNA Export Factors in Living Cells. **PLoS ONE**, 8(6). 2013.

TEWARI M, YU M, ROSS B, DEAN C, GIORDANO A, RUBIN R, AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. **Cancer Res**; v. 57: p. 4063-4069. 1997

TEWARI, R. et al. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 8, p. 470-481, ago. 2010.

TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: prodecure and some applications. **Biotechnology**. 1992.

ULLU, E; TSCHUDI, C; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**. 6(6), 509-519. 2004.

ULLMAN, K. S; SHAH, S; POWERS, M. A.; FORBES, D. J. The nucleoporin Nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. **Mol. Biol. Cell** v. 10; p. 649–664. 1999.

VAGENENDE, V, YAP, M. G. S, TROUT, B. L Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. **Biochemistry**. v 48 (46), p 11084–11096. 2009.

VAN DIJK, T. B., GILLEMANS, N., STEIN, C., FANIS, P., DEMMERS, J., VAN DE CORPUT, M., ... PHILIPSEN, S. Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*, 30(1), 260–272. 2010.

VIPHAKONE, N. HAUTBERGUE, G. M. WALSH, M. CHANG, C. T. HOLLAND, A. FOLCO, E. G. REED, R. WILSON, S. A. TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. *Nat Commun*. 3:1006. 2012

VIPHAKONE, N., HAUTBERGUE, G. M., WALSH, M., CHANG, C., HOLLAND, A., FOLCO, E. G., ... WILSON, S. A. TREX exposes the RNA binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, *Europe PMC Funders Group* 1–24. 2013.

WICKRAMASINGHE, V.O; LASKEY, R. A. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. v.16, p. 431-440, July. 2015

WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 125, n. 1-2, p. 211-216, 2002.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 99, n. 1, p. 89-101, 15 mar. 1999

WOLYNIAK, M.J., COLE, C.N. Harnessing genomics to explore the processes and evolution of mRNA export. *RNA Biol*. v.5. p. 68–72. 2008

XIANG, K. et al. Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature*, v. 467, n. 7316, p. 729-733, 2010

ZAMANI, A. MAT JUSOH, S. A. AL-JAMAL, H. A. SUL'AIN, M. D. JOHAN, M. F. Anti-Proliferative Effects of *Dendrophthoe pentandra* Methanol Extract on BCR/ABL-Positive and Imatinib-Resistant Leukemia Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. V. 17. P. 4857-4861. 2016

ZAMUDIO, J. R. et al. Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. *Mol Microbiol*, v. 72, n. 5, p. 1100-1110, 2009.

ZULLO, A. J. MICHAUD, M. ZHANG, W. GRUSBY, M, J. Identification of the small protein rich in arginine and glycine (SRAG): a newly identified nucleolar protein that can regulate cell proliferation. *J Biol Chem*. v. 284. p. 12504-11. 2009.

ANEXO 1 - DELEÇÃO MOTIVO UBM de TcFOP-like

Outra estratégia em andamento seria a deleção do motivo UBM mais próximo da região C-terminal da proteína TcFOP-like, a essa construção chamamos de TcFOP-like Δ UBM. Sabe-se que em outros eucariotos, mamíferos por exemplo, Uap56/Sub2 se liga à FOP via motivo UBM (Uap56/Sub2 *Binding Motif*) (CHANG et al, 2013). Nosso intuito seria avaliar o papel deste motivo na interação entre TcFOP-like e TcSub2. A Figura 65 ilustra de forma esquemática a região deletada. Os oligonucleotídeos iniciadores e a metodologia utilizada para a construção da deleção estão descritos o item 4.6.2.1.



FIGURA 67. CONSTRUÇÃO DA DELEÇÃO DE TcFOP-like Δ UBM Em vermelho destaca-se a região deletada da construção de TcFOP-like Δ UBM.

Para obtenção de linhagens expressando proteína TcFOP-like Δ UBM fusionada a etiquetas, inicialmente as sequências foram clonadas em vetor de entrada da plataforma Gateway, pDONR™221 (Invitrogen). O *amplicon* obtido, ilustrado na figura 66A, de aproximadamente 615 pares de bases foi então recombinado em pDONR™221 conforme manual do fabricante, e as reações dessa recombinação foram utilizadas para transformação em *E. coli* DH5- α eletrocompetente, conforme descrito em métodos (item 4.5.4.2). Os clones foram selecionados com análise por PCR de colônia, como descrito no item 4.5.4.3, para verificar a presença dos insertos (dados não mostrados). A figura 66B ilustra a confirmação da clonagem de TcFOP-like Δ UBM em vetor de entrada pDONR™221 através da análise da amplificação dos insertos por PCR de colônia. Para confirmar as sequências clonadas, as amostras foram enviadas para sequenciamento usando o serviço da *Macrogen* Korea (Coréia do Sul, informações disponíveis em <http://www.macrogen.com/>).

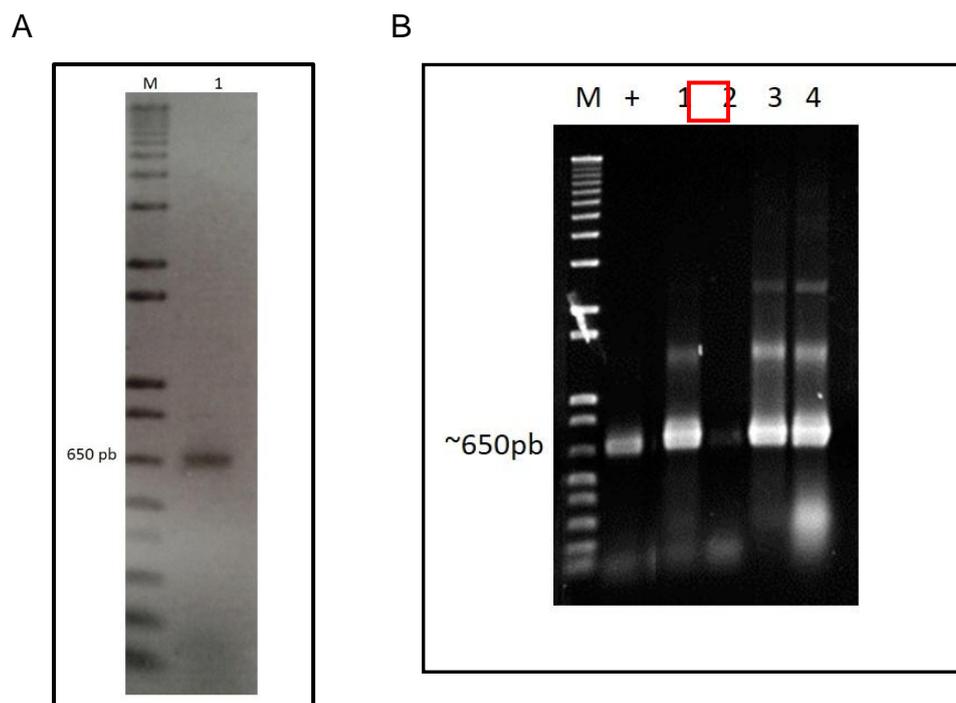


FIGURA 68. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR E PCR DE COLÔNIA DE TcFOP-like Δ UBM Géis de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A) PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR DE TcFOP-like Δ UBM 1: amplicon de 615 pares de bases resultante da amplificação por PCR utilizando como molde DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* e para as amplificações oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ UBM. B) PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE TcFOP-like Δ UBM EM VETOR pDONR™221 (Invitrogen). (+): Controle positivo da reação de amplificação utilizando como molde DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ UBM resultando em amplicon de 615 pb. 1 - 4: resultado PCR de colônia, utilizando como molde os plasmídeos e para amplificações os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ UBM. Destacado em vermelho o clone utilizado.

TcFOP-like Δ UBM clonados em pDONR™221, foram recombinados nos vetores pTcGWGFPN (BATISTA, et al 2010), e pTcGWPTPN (KUGERATSKI et al, 2015). As reações de recombinação foram usadas para transformar bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes conforme descrito no item 4.5.4.2, e as análises dos clones positivos foi feita através de PCR de colônia, item 4.5.4.3.(figura 67). Para o isolamento dos plasmídeos, colônias positivas (destacados em vermelho nas figuras) foram inoculadas em 150 mL de meio LB, adicionado de 100 ng/mL de ampicilina. Essa purificação do plasmídeo foi realizada para posterior transfecção em *T. cruzi*.

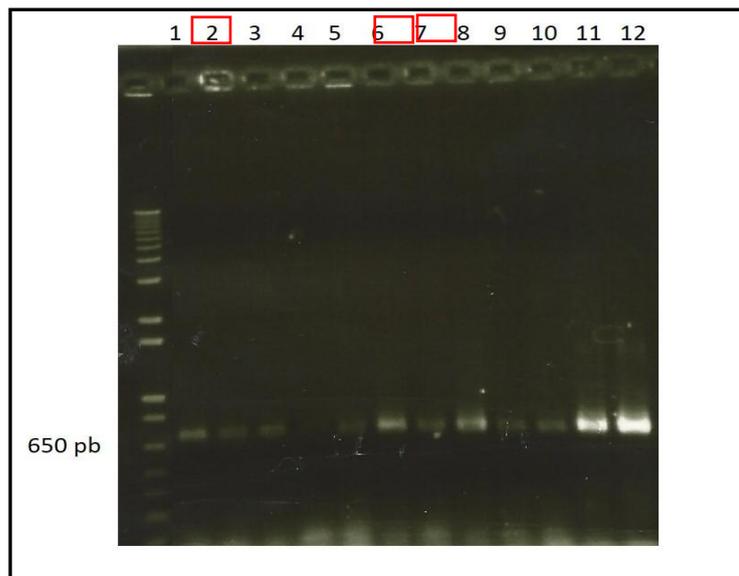


FIGURA 69. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE TcFOP-like Δ UBM EM VETOR pTcGWGFP E pTcGWPTPN.

Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1 - 5: resultado da amplificação por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ UBM para confirmação de clonagem em vetor pTcGWGFP. 6 - 12: resultado da amplificação por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcFOP-like Δ UBM para confirmação de clonagem em vetor pTcGWPTPN.

Por duas vezes fizemos a transfecção dos parasitas com a construção que deleta o motivo de ligação a Sub2 (UBM), e nas duas vezes os parasitas são selecionados com a adição de G418 ao meio de cultura, resistência conferida pelo vetor. No entanto quando fazemos extrato proteico para *western blot* não visualizamos a banda correspondente a proteína recombinante, e se observarmos a cultura em citometro de fluxo vemos que a intensidade de fluorescência, de uma população que deveria expressar GFP, é correspondente ao parasita selvagem.

A obtenção dessa linhagem fica como perspectiva, uma vez que os resultados obtidos com essa ferramenta são de grande relevância para o trabalho.

ANEXO - 2 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO COM EXTRATOS PROTEICOS DE PARASITAS EXPRESSANDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP

Os testes apresentados a seguir foram realizados com os extratos proteicos provenientes de parasitas expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à PTP, preparados conforme descrito no item 4.15.2. Para a solubilização do “pó de células” foram utilizados diferentes tampões com diferentes concentrações de sais e detergentes (TABELA 9). Os dados obtidos mostram um perfil eletroforético, nos géis de acrilamida, idêntico entre o controle e transfectantes, mostrando que o protocolo foi ineficiente conforme mostrado nas figuras 68, 68 e 70.

TABELA 10. COMPOSIÇÃO DOS DIFERENTES TAMPÕES UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like E TcAPI5-like FUSIONADAS À PTP PARA SUSPENSÃO DO “PÓ DE CÉLULAS”.

TAMPÃO 1	TAMPÃO 2	TAMPÃO 3	TAMPÃO 4	TAMPÃO 5
NaCitrato 10 mM	NaCl 50 mM	NaCitrato 50 mM	NaCitrato 10 mM	NaCitrato 10 mM
Triton X-100 0,1%	Triton X-100 0,1%	Triton X-100 0,1%	CHAPS 0,1 %	NOCT 0,1%
Hepes 20 mM				
MgCl ₂ 10 mM				
CaCl ₂ 10 μ M				
E64 10 μ M				

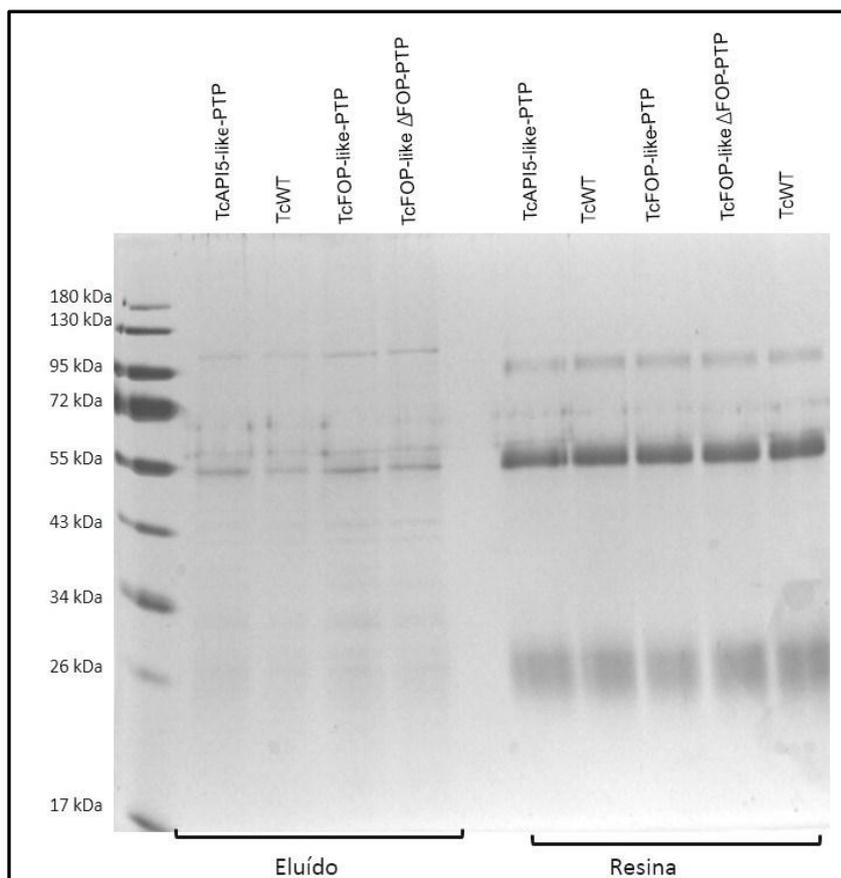


FIGURA 70. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP E TcAPI5-like COM O TAMPÃO 1. SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando frações eluídas de testes de copurificações com extrato de parasita selvagem e expressando TcFOP-like, TcFOP-likeΔFOP e TcAPI5-like fusionadas à PTP. O tampão 1 contém 10 mM de NaCitrato, 0,1% de Triton X-100, Hepses 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μM e E64 10 μM.

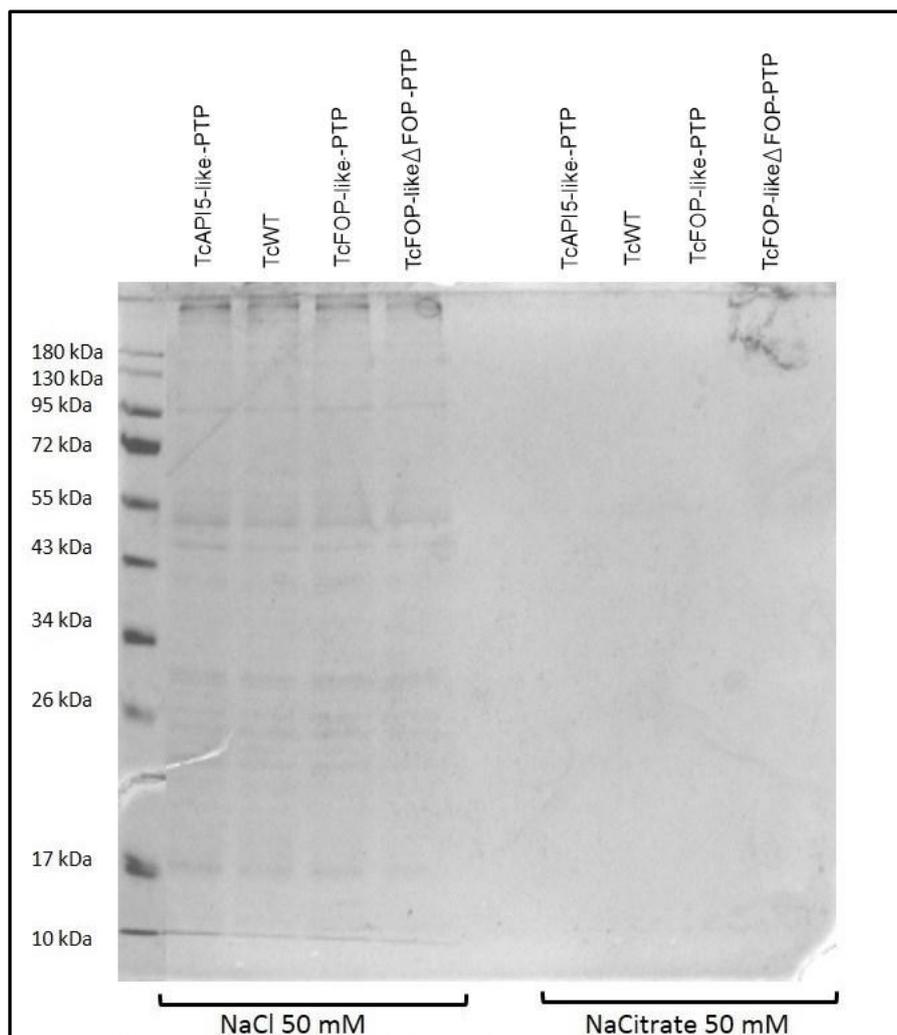


FIGURA 71. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5-like COM OS TAMPÔES 2 E 3. SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando frações eluídas de testes de copurificações com extrato de parasita selvagem e expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à PTP. O tampão 2 contém: NaCl 50 mM, Triton X-100 0,1%, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M, E64 10 μ M. O tampão 3 contém: NaCitrate 50 mM, Triton X-100 0,1%, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M.

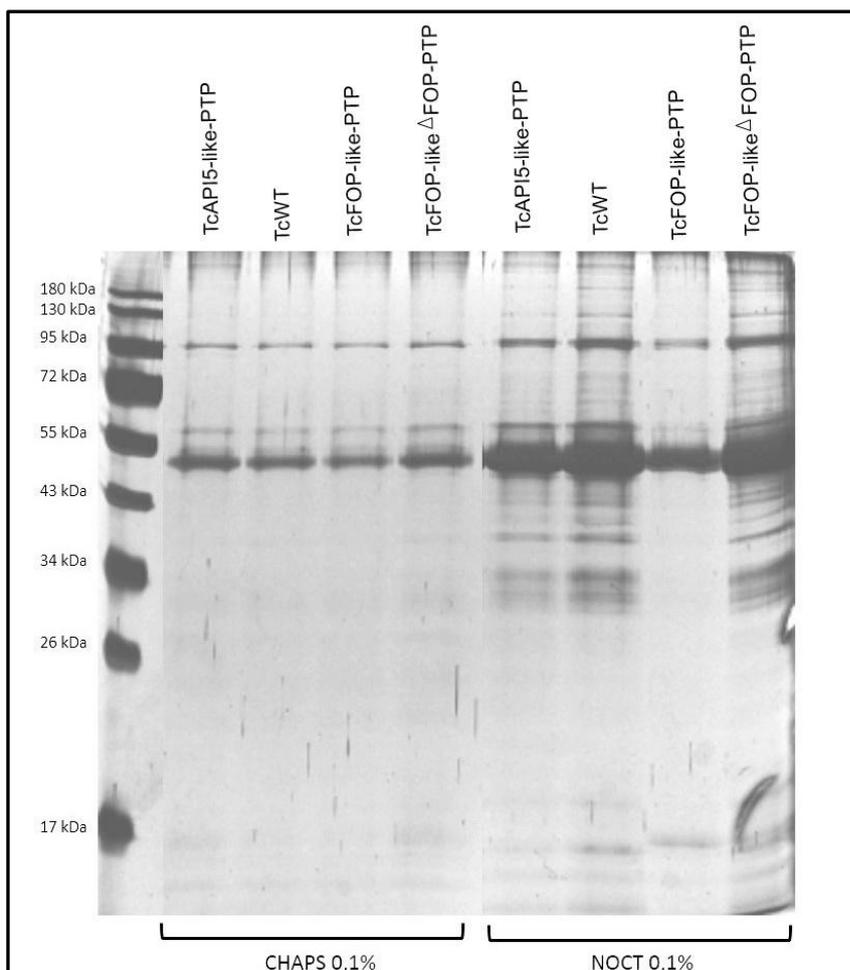


FIGURA 72. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP E TcAPI5 COM O TAMPÕES 4 E 5 SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando as frações eluídas de imunoprecipitações testes com extrato de parasita selvagem e expressando TcFOP-like, TcFOP-like Δ FOP e TcAPI5-like fusionadas à GFP. O tampão 4 contém: NaCitrato 10 mM, CHAPS 0,1 %, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M, E64 10 μ M. O tampão 5 contém: NaCitrato 10 mM, NOCT 0,1%, Hepes 20 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 μ M, E64 10 μ M.