

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GERSON LUIZ DOS SANTOS JUNIOR

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO 3XMBT-GST PARA USO COMO
FERRAMENTA NO ENRIQUECIMENTO DE SÍTIOS DE METIL-LISINA EM
Trypanosoma cruzi.**

CURITIBA

2017

GERSON LUIZ DOS SANTOS JUNIOR



EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO 3XMBT-GST PARA USO COMO FERRAMENTA NO ENRIQUECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE METIL-LISINA EM *Trypanosoma cruzi*.

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Co-orientadora: Dra. Lyris Martins Franco de Godoy

**CURITIBA
2017**

RESUMO

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida classicamente através do contato humano com as fezes de insetos hematófagos previamente infectados. Nas áreas endêmicas estima-se que existam aproximadamente entre 12 a 14 milhões de pessoas infectadas. Em seu ciclo biológico, o parasito pode exibir quatro formas evolutivas: tripomastigota sanguínea, epimastigota, tripomastigota metacíclico e amastigota. Todas essas transformações evolutivas são mediadas por proteínas, as quais são passíveis de centenas de modificações pós-traducionais, como por exemplo a metilação, a qual é conhecida por ocorrer em histonas. A busca por padrões de metilação, que pode ocorrer tanto em resíduos de Arginina (R) como em Lisina (K), além da epigenética, vem despertando um grande interesse da comunidade científica. Estudos em células humanas e de *Trypanosoma brucei* demonstraram que esta modificação detêm uma enorme importância no ciclo de vida destas células. Então, devido a esta descoberta, a determinação destas modificações no *T. cruzi* é de interesse para melhor compreensão da biologia do protozoário e também para a determinação de novos métodos de intervenção em seu ciclo biológico. Além disso, pesquisas indicam que as metilações são modificações relativamente abundantes e de extrema importância para o controle e sinalização celular. Diante de tudo isso, diferentes métodos de detecção vêm sendo desenvolvidos para a identificação de sítios contendo lisinas metiladas, como por exemplo, a utilização de domínios proteicos ligantes de metil-lisina. Dentre estes domínios destaca-se a tripla repetição do domínio MBT (3xMBT), um reagente de alta afinidade desenhado a partir da proteína L3MBTL1 e que se mostrou uma ferramenta útil para a detecção e enriquecimento e de sítios mono- e dimetilados em lisina, tanto em proteínas individuais quanto em escala proteômica. A ausência de informações sobre a função da metilação em *T. cruzi*, além da ausência de ferramentas para a aquisição dessas informações, tornam este trabalho necessário tanto para o entendimento dos mecanismos e enzimas envolvidos com a metilação de proteínas, quanto e conseqüentemente para entender o papel destas modificações na virulência e na aquisição de infectividade pelo parasito. Primeiramente, foi realizada a amplificação por PCR dos genes do 3xMBT e 3xMBT-D355n, seguido de restrição enzimática para avaliação dos plasmídeos importados. Após transformação da cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli* com os plasmídeos, foram testadas diversas condições de expressão do 3xMBT-GST. Após testes de indução, a expressão da proteína foi detectada e a mesma foi purificada através de cromatografia de afinidade a Glutathione. Com o domínio purificado foram realizados ensaios de Far Western Blot para determinação da sua afinidade e especificidade a proteínas contendo sítios de lisina metilados. Estes ensaios determinaram que aparentemente o 3xMBT se ligava a peptídeos metilados de maneira específica, pois o seu controle negativo 3xMBT-D355N não apresentou os mesmos padrões de identificação. É necessária a confirmação da presença desta PTM por outros métodos, como a espectrometria de massas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Modificações pós-traducionais. Metilação. 3xMBT.

ABSTRACT

Chagas' Disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and it is transmitted classically through human contact with the feces of previously infected hematophagous insects. In endemic areas, it is estimated that there are approximately 12 to 14 million people infected. In its biological cycle, the parasite may exhibit four evolutionary forms: blood trypomastigote, epimastigote, metacyclic trypomastigote and amastigote. All these evolutionary transformations are mediated by proteins, which are subject to hundreds of post-translational modifications, such as methylation, which is known to occur in histones. The search for methylation patterns, which can occur in both Arginine (R) and Lysine (K) residues, beyond to epigenetics, has aroused great interest in the scientific community. Studies in human cells and *Trypanosoma brucei* have demonstrated that this modification holds a huge importance in the life cycle of these cells. Therefore, due to this discovery, the determination of these modifications in *T. cruzi* becomes of interest for a better understanding of the protozoan and for the determination of new methods of intervention in its biological cycle. In addition, research indicates that methylations are relatively abundant and extremely important modifications for cell signaling and control. In the light of all this, different detection methods have been developed for the identification of sites containing methylated lysines, for example, the use of methyl lysine binding protein domains. Among these domains is the triple replication of the MBT domain (3xMBT), a high affinity reagent designed from the L3MBTL1 protein, which proved to be a useful tool for the detection and enrichment of mono- and dimethylated sites in lysine, both in individual proteins as well as in proteomic scale. The lack of information on the function of methylation in *T. cruzi*, in addition to the lack of tools for the acquisition of this information, makes this work necessary both for the understanding of the mechanisms and enzymes involved in the methylation of proteins, and consequently to understand the role of these modifications in the virulence and the acquisition of infectivity by the parasite. First, PCR amplification of the 3xMBT and 3xMBT-D355n genes was performed, followed by enzyme restriction to evaluate the imported plasmids. After transformation of the *E. coli* BL21 Star (DE3) strain with the plasmids, several expression conditions were tested. After induction tests, protein expression was detected and the purification was performed by glutathione affinity chromatography. With the purified domain, Far Western Blot assays were performed to determine its affinity and specificity for proteins containing methylated lysine sites. These assays determined that apparently 3xMBT bound to methylated peptides in a specific manner, as its 3xMBT-D355N negative control did not exhibit the same identification patterns. Confirmation of the presence of this PTM is required by other methods, such as mass spectrometry.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas' Disease. Post-translational modifications. Methylation. 3xMBT.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Trypanosoma cruzi.....	6
1.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	12
1.3 PROTEÍNAS E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS.....	14
1.3.1 Metilação em proteínas.....	17
1.3.2 Metilação em lisinas.....	20
1.4 3xMBT.....	22
2. OBJETIVO GERAL.....	26
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	27
4.1.1 Tampões para Purificação de Proteínas fusionadas a GST:.....	28
4.1.2 Tampões para Extração de Histona de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	28
4.2.1 Meios de cultura de bactéria.....	28
4.2.2 Meios de cultura para células eucarióticas.....	29
4.3 LINHAGENS CELULARES.....	29
4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	29
4.4 ANÁLISE DE SÍTIOS DE METIL-LISINA EM AMOSTRAS NÃO ENRIQUECIDAS.....	29
4.5 VETORES.....	30
4.5.1 pGEX6P1-3xMBT e pGEX6P1-3xMBT-D355N.....	30
4.5.2 pGEX-4T1.....	31
4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	32
4.7 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DIAGNÓSTICA.....	33
4.8 ELETROFORESE DE DNA.....	33
4.9 TRANSFORMAÇÃO EM <i>Escherichia coli</i>	34
4.10 TESTE DE EXPRESSÃO DO DOMÍNIO 3xMBT-GST.....	34
4.11 EXPRESSÃO EM MAIOR ESCALA DO 3xMBT-GST.....	35
4.12 PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO 3xMBT-GST.....	35

4.13	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS HeLa.....	37
4.14	OBTENÇÃO E CULTIVO de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.15	EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.16	EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE CÉLULAS HELA.....	38
4.17	LISE DAS CÉLULAS HeLa e de <i>T. cruzi</i> PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO TOTAL.....	39
4.18	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	39
4.19	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO 3xMBT POR FAR- WESTERN BLOT.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	ANÁLISE PRELIMINAR IN SILICO DOS SÍTIOS METILADOS EM <i>T. cruzi</i> e <i>T.</i> <i>brucei</i>	42
5.2	AQUISIÇÃO E AVALIAÇÃO DOS VETORES pGEX-6P1-3xMBT e pGEX-6P1- 3xMBT-D355N.....	43
5.3	REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES 3xMBT-GST e D355N-GST.....	44
5.4	CONFIRMAÇÃO DOS CLONES POSITIVOS: pGEX-6P1-3xMBT e D355N.....	45
5.5	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO 3xMBT E 3xMBT-D355N FUSIONADOS A GST EM <i>Escherichia coli</i>	47
5.5.1	Testes de Expressão.....	48
5.5.2	Testes de Purificação por Cromatografia de Afinidade à GSH.....	51
5.6	EXPRESSÃO DA GLUTATIONA-S TRANSFERASE EM <i>Escherichia coli</i>	54
5.7	EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> e CÉLULAS HELA.....	55
5.8	ENSAIO DE FAR-WESTERN BLOT PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO 3xMBT.....	57
6.	CONCLUSÕES.....	61
7.	PERSPECTIVAS.....	62
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário, parasita flagelado da família *Trypanosomatidae*, pertencente a ordem *Kinetoplastida*. Esta família é caracterizada pela presença de um único flagelo e apenas uma mitocôndria, na qual está presente o cinetoplasto, uma organela especializada contendo DNA (kDNA). Este protozoário foi descoberto por Carlos Chagas em 1909, enquanto trabalhava no estado de Minas Gerais. Sua curiosidade nata o levou a estudar animais e habitantes da região, buscando identificar as principais patologias presentes naquela área. Após estudar insetos hematófagos, chamados popularmente de “Barbeiros” ou “Chupões”, Chagas constatou a presença de um ser unicelular diferente dos descritos até então. A partir desta descoberta, o jovem médico, passou a buscar a presença deste tripanossomatídeo no sangue de pacientes da região, encontrando assim a primeira paciente confirmada, Berenice. Apesar de trabalhar em condições precárias, Chagas descreveu em detalhes uma doença infecciosa previamente desconhecida, seu patógeno, vetor, hospedeiro, reservatórios, manifestações clínicas e dados epidemiológicos (CHAGAS, 1909; NEVES *et al.*, 2016; TELLERIA & TIBAYRENC, 2017).

Chagas também descreve a morfologia deste novo parasita em seu artigo original em 1909. Os tripanossomatídeos em geral apresentam uma série de características morfológicas únicas a esta família (Figura 1) como a presença de cinetoplasto, de um glicossomo, acidocalcissomo, um bastão paraflagelar e uma bolsa flagelar (DE SOUZA, 2008).

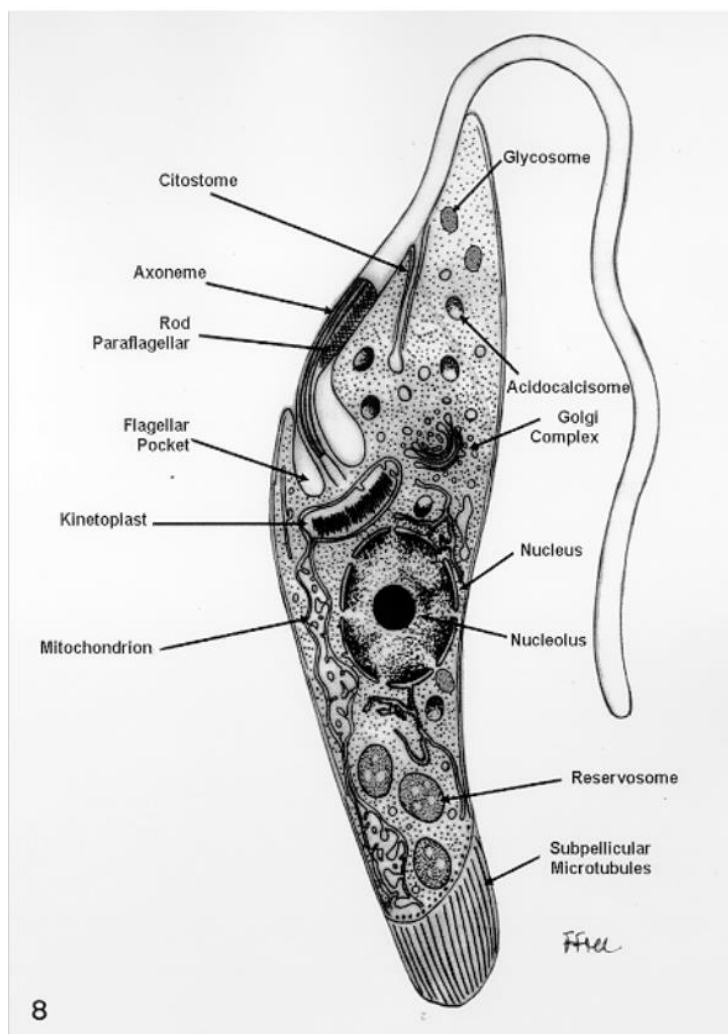


FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA FORMA EPIMASTIGOTA DO *Trypanosoma cruzi*. Presente neste esquema diversas estruturas únicas aos membros da ordem *Kinetoplastida* como: cinetoplasto, glicossomo, bolsa flagelar, entre outros.
 FONTE: adaptado de DE SOUZA (1999).

O cinetoplasto, inicialmente chamado de blefaroplasto por Chagas, forma uma estrutura em forma de disco na maioria dos tripanossomatídeos, sendo exceção as formas tripomastigotas, que apresentam esta estrutura em uma forma mais arredondada. Essa estrutura abriga o DNA do cinetoplasto (kDNA), o qual é o equivalente ao DNA mitocondrial em tripanossomatídeos e se diferencia das demais moléculas de DNA presentes na natureza devido a forma a qual se organiza. O kDNA é composto de moléculas circulares topologicamente interligadas, formando assim uma única rede. Essa rede contém dois tipos de moléculas de DNA, os maxicírculos,

presente na forma de algumas dúzias de cópias, e os minicírculos, contendo milhares de cópias (LIU *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2010).

Os maxicírculos são os homólogos funcionais do DNA mitocondrial (mDNA) em outros eucariotos. Eles têm tamanhos entre 20 e 40 pares de quilo-bases (kb), codificando RNAs ribossomais e diversas proteínas, que em sua maioria estão envolvidas nos processos energéticos mitocondriais. Em contrapartida, os minicírculos, que constituem cerca de 90% da molécula de kDNA, detêm tamanhos entre 0,5 e 2,9 kb e estão envolvidos principalmente na codificação de pequenos RNAs guia (~70 pares de base - bp) que determinam a especificidade da edição do RNA (SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

Sendo um parasita de ciclo heteroxênico, *T. cruzi* tem como seu vetor invertebrados hemípteros hematófagos da família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, onde há cerca de 140 espécies reconhecidas (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009). Pesquisas tem se concentrado no *Triatoma infestans* (Figura 2), *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* devido a seu papel na transmissão do *T. cruzi*. A maior parte dos membros desta subfamília pertencem às Américas, onde vivem em diferentes habitats como palmeiras, ninhos de pássaros, tocas de roedores, tocas de gambás e pilhas de pedras. São espécies oportunistas, que apresentam um comportamento de “intrusão”, ou seja, invadindo domicílios, com alguns membros podendo se estabelecer dentro destas casas. Eles apresentam hábitos noturnos e permanecem escondidos em seus ninhos durante o dia (KLOTZ *et al.*, 2010; TELLERIA & TIBAYRENC, 2017).



FIGURA 2. *Triatoma infestans*. Um dos principais vetores do *Trypanosoma cruzi* no Brasil.

FONTE: Disponível em:

<http://animaldiversity.org/collections/contributors/Grzimek_insects/Hemiptera/Triatoma_infestans/medium.jpg>

Quando o hospedeiro invertebrado se alimenta, ele acaba também depositando suas fezes próximo a ferida causada pela sua picada. Devido aos parasitos ficarem, principalmente, na parte final do intestino posterior do inseto, eles são liberados durante o repasto sanguíneo. A picada do triatomíneo causa prurido no local, o que leva o ser humano a coçar a região, empurrando as fezes do inseto em direção ao local da picada. Assim o protozoário *T. cruzi* ganha a corrente sanguínea, infectando o seu hospedeiro (CHAGAS, 1909; TELLERIA & TIBAYRENC, 2017).

Dentro do novo hospedeiro, o parasito pode seguir com o seu ciclo de vida, o qual apresenta 3 formas distintas, em dois diferentes hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Essas formas são diferenciadas tanto morfológicamente quanto fisiologicamente, sendo elas: o epimastigota, o tripomastigota e o amastigota. (CHAGAS, 1909). A forma epimastigota está presente no trato intestinal e urinário do hospedeiro invertebrado, onde se reproduzem por fissão binária e apresentam um flagelo livre, proveniente de uma posição anterior ao núcleo (TELLERIA & TIBAYRENC, 2017). Por sua vez, os tripomastigotas podem estar presentes tanto no sangue do hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguíneo) quanto na porção final do intestino do

vetor (tripomastigota metacíclico). Os tripomastigotas apresentam um flagelo livre, posicionado posteriormente ao núcleo celular. E por fim, os amastigotas, os quais são formas arredondadas, que possuem um pequeno flagelo não-livre e vivem intracelularmente, onde se reproduzem por fissão binária (DE SOUZA, 2002).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 3) começa em um reservatório animal, geralmente mamíferos, incluindo humanos. O vetor triatomíneo ingere o parasita enquanto se alimenta do sangue do reservatório. Após ser ingerido, o parasita passa pelo fenômeno chamado epimastigogênese, que é a passagem da forma tripomastigota sanguínea para a epimastigota, a qual é uma das formas replicativas do protozoário. Após a etapa de reprodução por fissão binária, os epimastigotas se movem para a região posterior do intestino do triatomíneo, onde na parede celular retal passam por nova transformação, desta vez chamada metaciclogênese, de onde surge a forma infectante do parasita, o tripomastigota metacíclico (NEVES *et al.*, 2016).

Quando o vetor realiza um novo repasto sanguíneo em um humano, ele deposita suas fezes próximo ao local da picada. Os tripomastigotas metacíclicos presentes nestas fezes podem então entrar em contato com células do hospedeiro. Após a invasão destas células, os tripomastigotas podem ser encontrados no interior de um vacúolo, o vacúolo parasitóforo. Imediatamente inicia-se uma nova transformação, chamada amastigogênese, dando origem as formas intracelulares e replicativas chamadas amastigotas (LEY *et al.*, 1988). Aproximadamente 5 dias após esse processo, amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, adquirindo um flagelo mais longo e assim iniciam uma movimentação intensa, que é uma das responsáveis pelo rompimento da célula hospedeira, liberando assim um grande número de parasitas, que podem infectar outras células (BRENER, 2000).

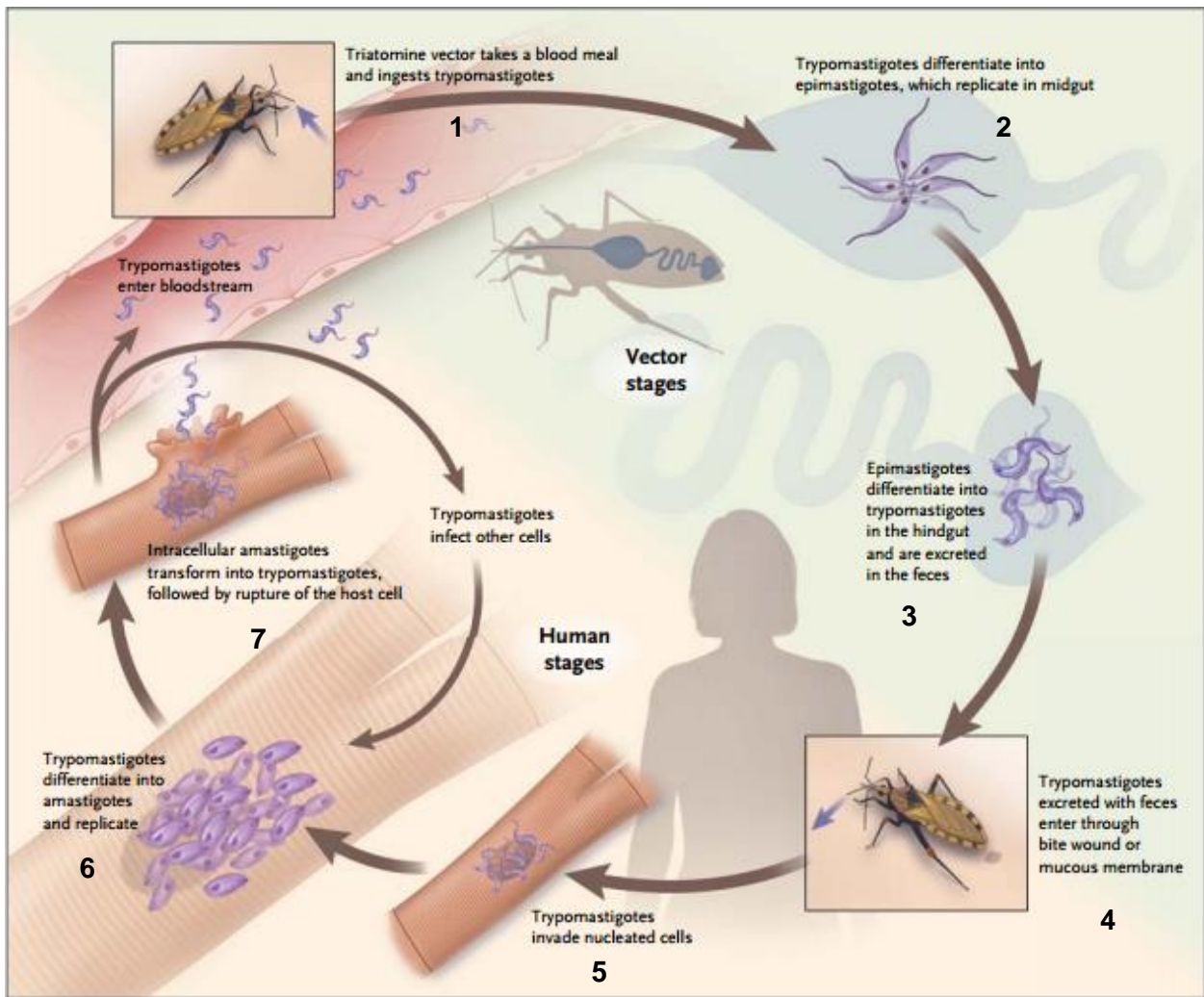


FIGURA 3 – CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*. Neste esquema encontram-se tanto os estágios humanos quanto os estágios presentes no vetor invertebrado. (1) O ciclo no vetor invertebrado tem início com a ingestão, através do repasto sanguíneo, das formas tripomastigotas presentes no sangue de humanos infectados. (2) Em seguida, estas se diferenciam em epimastigotas, formas replicativas encontradas no intestino médio do vetor. (3) Então, há uma nova diferenciação em tripomastigotas, na porção final do intestino, onde estas são excretadas nas fezes. (4) O hospedeiro vertebrado é infectado através de mucosas, ou da ferida provocada pela picada do vetor invertebrado, o qual realiza o repasto sanguíneo e defeca em seguida. (5) Uma vez na corrente sanguínea de humanos, as formas tripomastigotas invadem células nucleadas onde irão se diferenciar em amastigotas (6) para se replicarem. (7) Essas formas se transformam então em tripomastigotas, as quais rompem a célula hospedeira, ganhando a corrente sanguínea dando início ao ciclo novamente.

FONTE: Adaptado de BERN (2015).

1.2 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é a doença resultante da infecção com o protozoário *T. cruzi* e estima-se que entre 5 e 6 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas. A Doença de Chagas é endêmica apenas no continente americano, especialmente em 21 países presentes na América Latina (BERN, 2015), sendo os vetores de transmissão presentes desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Entretanto, devido aos grandes movimentos migratórios, a infecção por este parasita também está presente em países não endêmicos, onde não há a presença natural dos vetores, como Canadá, Espanha e em países asiáticos (CDC, 2016; TELLERIA & TIBAYRENC, 2017).

O perfil epidemiológico global da Doença de Chagas é resultado de duas grandes forças: transmissão doméstica via vetores na população latina; e migração rural-urbana em larga escala nos últimos 50 anos (BERN, 2015). A Doença de Chagas é considerada uma das maiores causas de impacto socioeconômico na América Latina, devido à perda de produtividade com um custo estimado de U\$ 1,2 bilhões anualmente. Levando também em consideração custos com relação a tratamento essa cifra é muito maior. Somente na Colômbia, o custo anual com cuidados médicos de pacientes com Doença de Chagas foi estimado em U\$ 267 milhões em 2008 (WHO, 2017).

Na América Latina, a transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente pelo contato com fezes ou urina dos triatomíneos infectados, embora tenha havido uma diminuição expressiva no número de casos de transmissão vetorial da doença nas últimas décadas. O protozoário pode também ser transmitido por transfusão sanguínea de doadores infectados, de forma congênita, passando da mãe para o recém-nascido durante a gestação ou durante parto, em transplantes de órgãos a partir de um doador infectado e acidentes laboratoriais. Também é possível ocorrer a transmissão a partir do consumo de comida contaminada com o parasita, por exemplo ingestão de caldo de cana que acidentalmente foi moída juntamente com o inseto infectado, sendo esta forma de contaminação associada a uma maior incidência de miocardite e maior mortalidade (BERN, 2015; CDC, 2017).

Em pacientes infectados pelo *T. cruzi*, a Doença de Chagas apresenta duas fases, conforme descrito a seguir:

Na fase aguda inicial, que dura cerca de 2 meses após a infecção, um grande número de parasitas circula na corrente sanguínea do indivíduo infectado. Porém, na maioria dos casos os sintomas são leves e inespecíficos, como: febre, fadiga, dores no corpo, dores de cabeça, erupções cutâneas, perda de apetite, diarreia e vômito, ou inexistentes. Em menos de 50% dos casos de infecção ocorre o sinal de Romana, um dos marcadores mais conhecidos da Doença de Chagas aguda e é caracterizado pelo inchaço da pálpebra próxima ao local da picada. Morte nesta fase é rara (<5%), podendo ocorrer em crianças pequenas devido a inflamação severa no músculo cardíaco (miocardite) ou no tecido cerebral (meningoencefalite) (CDC, 2016; WHO, 2017).

Durante a segunda fase, chamada de fase crônica, a infecção pode permanecer silenciosa por décadas, com os parasitas se alojando principalmente no coração e nos músculos do aparelho digestivo. Entretanto, entre 20 e 30% dos pacientes infectados sofrem de desordens cardíacas. A cardiopatia chagásica é altamente arritmogênica e é caracterizada por bradicardias sinusoidal e juncional, fibrilação atrial, palpitações, bloqueios atrioventriculares e taquicardia ventricular (RASSI *et al.*, 2010). Pacientes afetados eventualmente progridem para quadros de cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Aneurismas do ventrículo esquerdo também são quadros comuns em pacientes com cardiopatia chagásica avançada (BRENER, 2000; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Cerca de 10% dos pacientes diagnosticados com Doença de Chagas crônica sofrem com problemas no aparelho digestivo, tipicamente alargamento do esôfago ou do colón (RASSI *et al.*, 2012). As manifestações esofageais vão desde desordens assintomáticas de motilidade e acalasia (alteração neuromuscular hipertônica do mecanismo esfinteriano da cárdia, causando dificuldade de passagem do alimento do esôfago para o estômago) até quadros severos de megaesôfago, com sintomas que incluem disfagia, odinofagia (deglutição dolorosa), refluxo esofágico, perda de peso, tosse e regurgitação (DE OLIVEIRA, 1998; PARK & VAEZI, 2005).

Com relação as manifestações na região do colón intestinal, o megacolón é caracterizado por constipação prolongada, que pode dar origem a fecaloma (endurecimento das fezes), vólvulo (torção intestinal) e isquemia intestinal.

Manifestações gastrointestinais são mais frequentes no Cone Sul da América do Sul, provavelmente devido a genótipo do *T. cruzi* presente na região (BERN, 2015).

A Doença de Chagas pode ser tratada com benzonidazol ou nifurtimox. Ambos medicamentos são quase 100% efetivos em curar a doença se administrados logo no início da infecção ou nos primeiros sinais da fase aguda, inclusive nos casos de transmissão congênita. Entretanto, a eficácia de ambos diminuem consideravelmente, quanto mais demorado for para o início do tratamento (BRENER, 2000).

O tratamento também é indicado para aqueles em que a infecção foi reativada (por exemplo, por imunossupressão) e para pacientes durante a fase crônica precoce. Os adultos infectados, especialmente aqueles sem sintomas, devem receber o tratamento antiparasitário pois o mesmo pode prevenir ou reduzir a progressão da doença assim como evitar a transmissão congênita em mulheres grávidas. Nesses casos, os potenciais benefícios da medicação na prevenção ou atraso do desenvolvimento da Doença de Chagas devem ser pesados contra a longa duração do tratamento (até 2 meses) e possíveis reações adversas (ocorrendo em até 40% dos pacientes tratados) (WHO).

Entretanto, os únicos medicamentos disponíveis e empregados no tratamento causam efeitos colaterais severos. Além disso, parasitas resistentes aos mesmos, vem sendo identificados ao longo dos anos, demonstrando a urgência no desenvolvimento de novas terapias.

1.3 PROTEÍNAS E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Proteínas são as macromoléculas que medeiam a maior parte dos mecanismos moleculares que ocorrem em uma célula, como por exemplo a interação entre parasito-célula hospedeira. Devido a isso, estas se tornam interessantes alvos a serem estudados para a geração de novas intervenções terapêuticas para a Doença de Chagas.

As proteínas consistem de uma ou mais cadeias de resíduos de aminoácidos. Elas também são as macromoléculas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes de uma célula. Estes polímeros de aminoácidos diferem um dos outros

principalmente em sua sequência primária, ou seja, em sua sequência de aminoácidos, a qual é traduzida a partir da sequência de nucleotídeos em seu gene codificante. Sua sequência primária então resulta em uma sequência tridimensional específica, a qual por sua vez determina sua função (ALBERTS *et al.*, 2014).

Todas as proteínas, sejam de organismos extremamente antigos, como bactérias ou de formas de vidas mais complexas, como os eucariotos superiores, são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos, cada um deles codificados diretamente a partir do DNA. Eles apresentam diferentes propriedades químicas, contribuindo assim para a complexidade imensa que proteínas apresentam, sendo estas as moléculas estruturalmente e funcionalmente mais sofisticadas conhecidas pelo ser humano (NELSON & COX, 2012).

Para gerar uma proteína, os aminoácidos codificados se ligam de modo covalente em uma cadeia simples, longa e característica, através das chamadas ligações peptídicas. A partir dos 20 aminoácidos iniciais, há infinitas possibilidades de combinações, levando a produção de polipeptídeos bastante diversos e diferentes entre si, variando desde hormônios com algumas dezenas de resíduos de aminoácidos até anticorpos que contém milhares de kilodaltons (STRYER *et al.*, 2006).

Rapidamente após a tradução, ou até mesmo durante esse processo, os resíduos laterais de uma proteína são frequentemente modificados por enzimas específicas, produzindo assim as chamadas modificações pós-traducionais (PTMs, do inglês *post-translational modifications*) (Figura 4), as quais alteram as propriedades químicas e físicas como dobramento, estabilidade, atividade e por fim, a função da proteína modificada. Essas modificações também controlam as taxas de biossíntese e de degradação proteica, e falhas nesse complexo controle molecular tem efeitos muito negativos, potencialmente fatais para a célula. Isso explica o grande leque de PTMs e seus substratos envolvidos em patologias e desordens, incluindo câncer, diabetes e numerosas desordens neurológicas (PRATT *et al.*, 2006; WALSH, 2006).

Devido a esse amplo espectro de efeitos, identificar e associar modificações pós-traducionais com consequências funcionais em proteínas, células ou organismo é um objeto de estudo para pesquisadores nas mais diversas áreas das Ciências Biológicas.

Mais de 300 diferentes tipos de PTMs são conhecidas, com novas modificações sendo descobertas regularmente (LARSEN *et al.*, 2006).

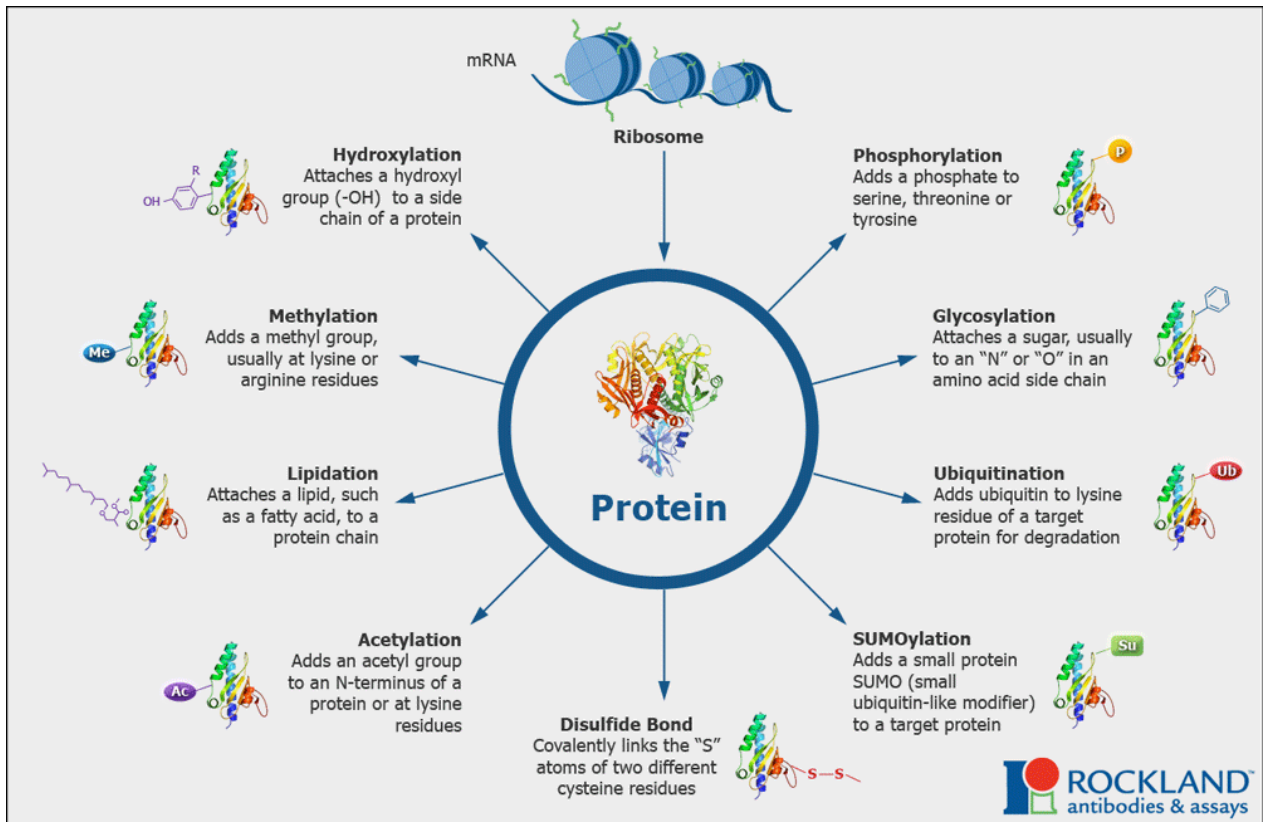


FIGURA 4 – POSSÍVEIS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS QUE PODEM OCORRER EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS. Hidroxilação: adição de um grupo hidroxila a cadeia lateral de uma proteína, Metilação: adição de um grupamento metil, geralmente em um resíduos de lisina e arginina, Lipidação: ligação de um lipídeo, como um ácido graxo, a uma cadeia proteica, Acetilação: adição de um grupamento acetil na região N-terminal de uma proteína ou em resíduos de lisina, Pontes dissulfeto: promovem a ligação covalente de dos átomos S de dois resíduos de cisteína diferentes, SUMOilação: adição de uma pequena proteína SUMO (pequeno modificar do tipo ubiquitina) a uma proteína alvo, Ubiquitinação: adiciona ubiquitinas a resíduos de lisina de uma proteína marcada para degradação, Glicosilação: ligação a um açúcar, geralmente a um N ou O em uma cadeia lateral de aminoácido, Fosforilação: adiciona um fosfato a uma serina, treonina ou tirosina.

FONTE: Adaptado de ROCKLAND ANTIBODIES AND ASSAYS (2016).

As modificações pós-traducionais podem ser separadas em duas grandes categorias. A primeira agrupa todas as adições covalentes realizadas por enzimas, geralmente um fragmento eletrofílico, proveniente de um co-substrato, em um resíduo lateral da proteína. É estimado que 5% do proteoma compreende enzimas que estão envolvidas com as mais diversas PTMs, incluindo quinases, fosforilases, fosfatases, metiltransferases, demetilases, entre tantas outras. A segunda categoria engloba as

PTMs que ocorrem a partir da clivagem covalente do esqueleto peptídico, tanto por ação de proteases quanto por clivagem auto catalítica. Proteólise localizada pode auxiliar no controle da localização, atividade e tempo de meia-vida das proteínas modificadas (WALSH *et al.*, 2005; WALSH, 2006).

De acordo com Khoury *et al.* 2011, as 10 modificações pós-traducionais mais encontradas experimentalmente são: fosforilação, acetilação, N-glicosilação, amidação, hidroxilação, O-glicosilação, ubiquitinação, adição de ácido piroglutâmico, sulfatação e a metilação.

1.3.1 Metilação em proteínas

Há 48 anos, foi demonstrada pela primeira vez a presença da ϵ -N-metil-lisina em uma proteína flagelar de *Salmonella typhimurium* (AMBLER & REES, 1959). Cinco anos depois, a ϵ -N-metil-lisina foi encontrada em histonas e também foi determinado que a presença desta modificação era proveniente da interação de cadeias laterais proteicas com a molécula S-adenosil-L-metionina (SAM ou AdoMet) (MURRAY, 1964; PAIK *et al.*, 2007).

O termo metilação se refere a adição de um grupo metil (CH_3) em um substrato, ou a substituição de um átomo (um grupamento químico) por um grupo metil. A metilação é uma forma de alquilação, utilizando um grupamento metil ao invés de uma longa cadeia carbônica, substituindo um átomo de hidrogênio. Em proteínas, embora esta modificação pós-traducional possa ocorrer em diversos resíduos de aminoácidos, entre eles: histidina (H), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), serina e treonina (T), ela é mais frequentemente encontrada em resíduos de lisina (K) e arginina (R) (AFJEHI-SADAT & GARCIA, 2013). Além disso, as enzimas envolvidas nesse processo não exibem especificidade apenas para os resíduos de aminoácidos, mas também para as estruturas terciárias que seus substratos proteicos apresentam.

Essas enzimas, chamadas de lisina metiltransferases (KMT) e arginina metiltransferases (PRMT) utilizam o substrato SAM como fonte de grupos metil. Em resíduos de lisina, o seu grupo ϵ -amino pode ser mono-, di- ou trimetilado, enquanto que em resíduos de arginina, podem ser adicionadas mono- ou dimetilações. Uma característica única com relação a metilação em argininas é que dois grupos metil

podem ser adicionados em um único átomo de nitrogênio, dando assim origem a dimetilação assimétrica ou em dois nitrogênios distintos, em uma dimetilação simétrica (Figura 5) (BIGGAR & LI, 2014).

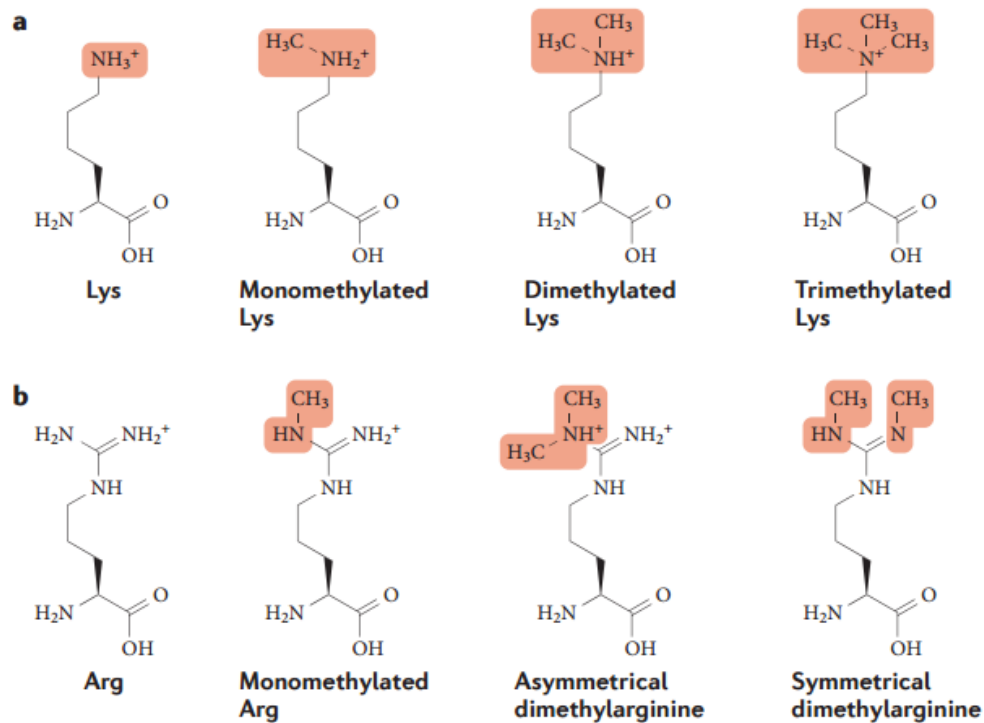


FIGURA 5 – POSSÍVEIS FORMAS DE METILAÇÃO EM LISINA E ARGININA. A: Lisinas (Lys) podem ser mono-, di- ou trimetiladas. B: Argininas (Arg), por sua vez, podem ser mono- e dimetiladas, podendo a dimetilação ocorrer de modo simétrico ou assimétrico. Methylated: metilada; assymmetrical: assimétrica; symmetrical; simétrica.

FONTE: Traduzido de BIGGAR & LI (2014).

Em contraste com outras modificações pós-traducionais como a acetilação e a fosforilação, as metilações, especialmente a trimetilação, eram consideradas como reações irreversíveis devido à alta estabilidade termodinâmica da ligação N-CH₃, além do fato de que se observava que a meia-vida de uma histona metilada era aproximadamente a mesma de uma histona não-metilada (HAMAMOTO *et al.*, 2015). Entretanto, a descoberta da amina-oxidase LSD1 (KDM1, lisina demetilase 1) alterou esta visão (SHI *et al.*, 2004; CLOOS *et al.*, 2008). Essas enzimas, pertencentes a família Jumonji (Jmj), catalisam a remoção do grupo metil em lisinas mono-, di- e trimetiladas. Por sua vez, demetilases específicas para remoção de grupamentos em arginina ainda não foram descritas, mas se especulam alguns candidatos. De maneira

geral, este processo dinâmico de metilação e demetilação pode ser representado pelo modelo “*writer-reader-eraser*” (ALMEIDA, 2017). Os *writers* são as enzimas que realizam as modificações, os *erasers*, por sua vez, são as enzimas que removem as PTMs e os *readers*, são as proteínas que se ligam especificamente ao sítio modificado, modulando e exercendo suas funções a partir da presença daquela modificação.

Histonas estão entre as proteínas que mais estão sujeitas a uma vasta gama de PTMs, com metilações e acetilações estando entre as mais frequentes, ocorrendo principalmente em suas caudas N-terminais. Estas modificações estão envolvidas em diversos processos celulares, abrangendo desde remodelagem da cromatina até mecanismos de replicação e reparo do DNA. Apesar do processo de metilação ser melhor conhecido em histonas, essa modificação em resíduos de lisina e arginina nas demais proteínas tem surgido como uma PTM prevalente com importantes papéis regulatórios em diversos processos celulares, incluindo transdução de sinal, processamento transcricional e *splicing* de mRNA (PAIK *et al.*, 2007; CLOOS *et al.*, 2008).

Além de funções atribuídas apenas à metilação, algumas proteínas estão sujeitas a diversas PTMs em um dado momento, as quais devem agir de modo coordenado para garantir o resultado biológico esperado. Portanto, não é surpreendente que uma rede extensiva de comunicação, *crosstalk*, tenha sido encontrada entre diferentes tipos de modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação e acetilação. De modo similar, diferentes sítios de metilação podem interferir em sua própria regulação durante etapas de diversos processos celulares (BIGGAR & LI, 2014).

Modificações pós-traducionais, incluindo a metilação, eram inicialmente identificadas por degradação de Edman, marcação por radioisótopos ou por métodos baseados em anticorpos, incluindo arranjos de peptídeos e proteínas. Estes métodos apresentam diversas desvantagens como: inespecificidade e *low throughput*, além de deterem uma faixa dinâmica baixa para ensaios quantitativos. Nesse sentido, a chegada de técnicas envolvendo espectrometria de massas auxiliou de maneira substancial o progresso nesta área de estudo, promovendo a identificação de PTMs em

larga escala e, conseqüentemente, a obtenção de novos dados relacionados as funções biológicas destas modificações (LANUOETTE *et al.*, 2014).

1.3.2 Metilação em lisinas

Com a descoberta da metilação em resíduos de lisina por Ambler e Rees (1959), surgiram questões como a origem e função desta modificação, e estas permaneceram um mistério na época. Entretanto, a observação da presença de metil-lisinas em histonas e a subsequente descoberta desta modificação em uma ampla gama de proteínas confirmaram a importância desta PTM para o bom funcionamento celular.

Nas últimas décadas essa PTM confirmou-se como uma das modificações mais predominantes da biologia, presente nos três grandes domínios da vida. Metiltransferases são encontradas desde os organismos mais primitivos, como os *Archaea*, até eucariotos superiores. O interesse em metilação de lisina aumentou de maneira substancial após a observação que a metilação em lisinas da histona H3 levava ao recrutamento da proteína HP1 à cromatina, promovendo a formação da heterocromatina (BANNISTER *et al.*, 2001). Essa descoberta sugeriu que modificações em histonas tem um papel importante na regulação da expressão gênica, sendo capazes de alterar drasticamente o *pool* de genes transcritos (SIMS III *et al.*, 2003).

Devido a sua abundância e fácil enriquecimento, histonas se encontram entre as primeiras proteínas caracterizadas como passíveis de metilação (MARTIN & ZHANG, 2005). Após pesquisas mais aprofundadas, diversos sítios de metilação foram mapeados em histonas, e essas modificações foram relacionadas com funções biológicas específicas (BLACK *et al.*, 2012). Entre as funções encontradas estão, por exemplo, o aumento de atividade em sítios de iniciação de transcrição após a metilação do resíduo K4 de histonas H3, silenciamento do cromossomo X e repressão transcricional (H3 K27) (CAO & ZHANG, 2004; PLATH, 2003).

O estudo de metilação em histonas abriu caminho para a identificação da presença dessa modificação em diversas proteínas, principalmente envolvidas com a regulação dos processos de transcrição e tradução. Modificações da proteína p53

estavam entre esses estudos, os quais mostravam que a presença de grupamentos metil em diversos resíduos de lisina funcionava como um interruptor, ativando ou desligando a atividade pró-apoptótica da p53 (ZHANG *et al.*, 2011). Além disso, diversos fatores de transcrição sofrem modificações por metiltransferases, tendo suas atividades moduladas de diferentes maneiras. Por exemplo, a metilação pode marcar determinados fatores de transcrição, levando-os a degradação proteossomal, ou ainda, em outros fatores, pode aumentar sua afinidade pela RNA Polimerase II, assim estimulando a transcrição de genes específicos. A metilação pode também diminuir a afinidade de certas proteínas FOX com relação ao DNA, diminuindo a expressão de genes envolvidos com crescimento celular, proliferação e longevidade (LANOUILLE *et al.*, 2014).

Em adição aos fatores de transcrição e a maquinaria de tradução, uma grande variedade de proteínas são metiladas pelas KMTs (lisina metil-transferases), demonstrado por estudos tanto direcionados quanto em larga escala. Em todos os reinos da vida, várias funções críticas são reguladas pela metilação em lisinas (Figura 6).

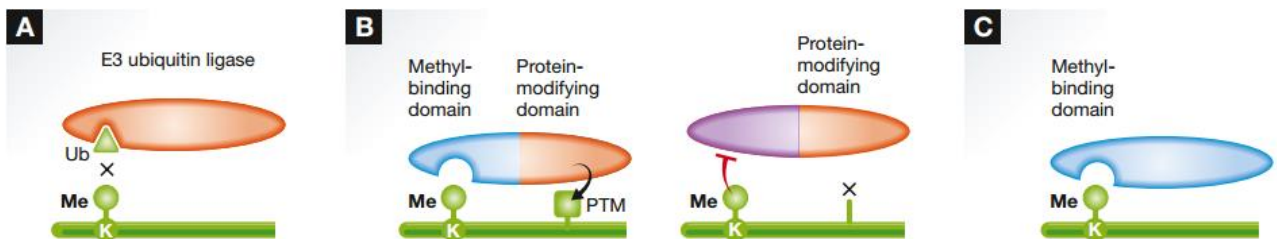


FIGURA 6 – EXEMPLOS DAS DIVERSAS FUNÇÕES QUE A METILAÇÃO EM LISINAS PODE EXERCER. A: A metilação pode funcionar como um repressor na inserção de outras PTMs. B: Sítios de metilação podem agir como interruptores, regulando tanto positivamente quanto negativamente a inserção de outra PTM ou proteína. C: A metilação também pode servir de ancoragem para outras proteínas, permitindo assim diversas interações proteína-proteína.

FONTE: adaptado de LANOUILLE *et al.* (2014).

Devido aos desafios relacionados a sua detecção, a identificação de metil-lisinas inicialmente dependeu de experimentos dependentes de sequenciamento de aminoácidos, ensaios marcados com radioisótopos ou *western blotting*. Embora a degradação de Edman seja uma técnica precisa o suficiente para detectar lisinas metiladas, ela é uma técnica complexa e que demanda tempo, necessitando grandes quantidades de proteínas, limitando assim a sua utilização para estudos direcionados. Radioisótopos também foram utilizados em meios de cultura e substratos doadores de

metil, entretanto, o difícil manuseio deste material e a impossibilidade de identificação precisa dos sítios de metilação, fazem com que esta técnica seja muito menos utilizada. Estudos mais recentes, tem utilizado ensaios de *western blotting* na busca de potenciais identificações de metilação. Porém, os anticorpos pan-específicos contra metil-lisina apresentam baixa especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (MOORE *et al.*, 2013; LANOUILLE *et al.*, 2014).

Uma nova abordagem de detecção tem sido desenvolvida, baseada em domínios ligantes de metil-lisina, substituindo os anticorpos pan-específicos. Como por exemplo, a utilização do cromo domínio HP1 b como isca em ensaios envolvendo extratos celulares e arranjos de peptídeos, buscando identificar possíveis interações dependentes de metil-lisina (LIU *et al.*, 2006). Outro domínio, o 3xMBT, desenhado a partir da proteína L3MBTL1 e desenvolvido por Moore *et al.*, 2013, vem sendo utilizado em ensaios envolvendo inibidores de metiltransferases e SILAC, do inglês *Stable Isotope Labeling with Aminoacids in Cell culture*. O SILAC é uma abordagem simples para a incorporação *in vivo* de marcação por isótopos estáveis em proteínas, para utilização em técnicas de proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massa (MS). O SILAC é baseado na incorporação metabólica de uma dada forma "leve" ou "pesada" do aminoácido nas proteínas.

1.4 3xMBT

Atualmente, existem muitos domínios proteicos identificados na literatura capazes de reconhecer lisinas metiladas. Dentre eles encontram-se as repetições de ankirina, WD40, homodomínios de plantas, CW, PWWP, modificadores da organização da cromatina (*Chromodomains*) e o MBT, do inglês *malignant brain tumor* (YAP & ZHOU, 2010).

O 3xMBT é um reagente de alta afinidade construído a partir das três repetições do MBT, presentes na proteína L3MBTL1, as quais possuem aproximadamente 70 aminoácidos e são conservadas desde organismos multicelulares simples até seres humanos (LI *et al.*, 2007). Em *Drosophila spp.*, esta proteína atua no cérebro da larva, agindo como um supressor de tumor. O gene homólogo em humanos é localizado em

uma região cromossômica, que quando deletada, é comumente associada com neoplasias mielóides, sugerindo que em mamíferos ela também atue como uma proteína supressora de tumor. A L3MBTL1 age como um repressor transcricional e atua na compactação da cromatina (HOYA-ARIAS *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a tripla repetição do domínio MBT pode servir como uma ferramenta para detecção, enriquecimento e identificação de lisinas mono- e dimetiladas, tanto em proteínas individuais quanto em escala proteômica. Sendo este domínio altamente específico, ele se liga aos resíduos metilados independente da sequência proteica ao entorno do sítio (LI *et al.*, 2007; MIN *et al.*, 2007; NADY *et al.*, 2012).

O reconhecimento de lisinas metiladas ocorre através de um bolsão de ligação aromático em forma de gaiola, estrutura a qual é extremamente conservada. Análises estruturais demonstraram que essa gaiola é formada por seis resíduos de aminoácidos: três aromáticos (Phe, Trp ou Tyr) formando uma das “paredes”, dois hidrofóbicos formando a outra “parede” (Asp e Asn) e um resíduo pequeno, como a cisteína, constituindo o chamado “chão” da estrutura (WANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007) (Figura 7).

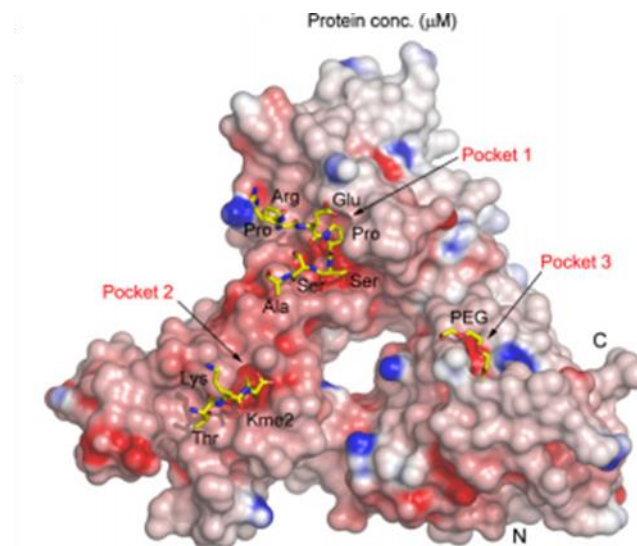


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO CRISTAL DO COMPLEXO L3MBTL1197–526-H1.523–27K27ME2. FONTE: adaptado de LI *et al.* (2007).

Embora as três repetições MBT da L3MBTL1 tenham estruturas tridimensionais similares e uma alta identidade entre as suas sequências, apenas a segunda repetição MBT (MBT2) se liga ao peptídeo modificado. A sobreposição das três repetições MBT revelou que a menor cadeia lateral da Cys363 no bolsão de ligação do MBT2 foi substituída por uma longa cadeia lateral (arginina ou fenilalanina) na MBT3 e MBT1. Além disso, o entrave estérico entre as regiões do bolsão do MBT3 e MBT1 provavelmente previne a ligação das metil-lisinas. No MBT3, a repulsão eletrostática entre metil-lisina e a arginina pode também prevenir a ligação ao peptídeo modificado. Sendo assim, apesar do 3xMBT possuir três repetições MBT, ele acaba sendo um reagente monovalente em relação a ligação com peptídeos mono- ou dimetilados (MIN *et al.*, 2007).

Embora a caracterização de PTMs seja um processo árduo e desafiador, ela fornece uma visão inestimável das funções celulares e de onde elas se originam. Tecnicamente, os principais desafios envolvidos no estudo de proteínas modificadas se encontram do desenvolvimento de métodos de purificação e de detecção específica. Felizmente, novas técnicas proteômicas e o desenvolvimento de reagentes que detêm essa especificidade esperada, como o 3xMBT, auxiliam grandemente a vencer estes obstáculos técnicos.

Até o início deste ano, havia uma total ausência de informações sobre a função da metilação em *T. cruzi*, entretanto ALMEIDA (2017) propõe a primeira análise, em escala proteômica, do metilproteoma de *T. cruzi*, que também é o primeiro estudo a caracterizar a metilação em lisinas em tripanossomatídeos. O autor conclui que a metilação em lisinas está fortemente relacionada a processos envolvidos com a síntese e distribuição proteica, apontando a grande importância dessa modificação pós-traducional no ciclo de vida e possivelmente na virulência do parasita.

Isso demonstra o crescente interesse nessa área de estudo, onde a ausência de ferramentas específicas para a aquisição dessas informações, dificultando assim a coleta de dados, tornam esse trabalho necessário. O entendimento dos mecanismos e enzimas envolvidos com a metilação de proteínas, e conseqüentemente o papel destas modificações na virulência do parasito assim como da aquisição de infectividade é de

fundamental importância, tendo em vista que através da identificação das relações-chaves para estes processos, surgem novos alvos para a intervenção terapêutica.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer a utilização do domínio 3xMBT recombinante para enriquecimento e identificação de sítios de metil-lisina em *Trypanosoma cruzi* por análise proteômica baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, são propostas as seguintes metas específicas:

3.1 - Determinar o nível basal de identificação de sítios de metil-lisina em amostras não enriquecidas de *T. cruzi*, a partir da reanálise de dados proteômicos previamente disponíveis na literatura;

3.2 - Avaliar as condições dos plasmídeos pGEX6P1-3xMBT (contendo o inserto de interesse) e pGEX6P1-3xMBT-D355N (controle negativo), previamente desenvolvidos por MOORE *et al.* (2013) e obtidos comercialmente, quanto a presença e tamanho dos insertos no local correto;

3.3 - Determinar as melhores condições de expressão dos domínios 3xMBT-GST e 3xMBT-D355N em bactérias, a partir dos vetores supracitados;

3.4 - Padronizar a purificação destes domínios a partir do lisado das bactérias induzidas à expressão;

3.5 - Testar a afinidade e especificidade do 3xMBT-GST purificado com relação à proteínas contendo sítios de metil-lisina em *T. cruzi*.

4. METODOLOGIA

4.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 5x: Tris-base 54 g, ácido bórico 27,5 g e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 20 mL 0,5 M, ajustar pH para 8,3.
- Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose 6x: azul de bromofenol 0,1% (m/v), xilenocianol 0,1% (m/v) e Ficoll tipo 400 15% (m/v).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x: Tris-HCl 1 mM pH 6,8, SDS (duodecil sulfato de sódio) 10% (m/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v) e β -mercaptoetanol 14,3 mM.
- Tampão Tris-Glicina para SDS-PAGE 1x: 25 mM Tris-base, 190 mM glicina e 0,1% SDS 10%.
- Tampão de transferência para Western Blot: 25 mM Tris, 190 mM glicina e 20% metanol (v/v).
- Tampão de Lise para bactérias (Teste de Expressão): 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,2 M NaCl e 1% SDS (v/v).
- Tampão de Lise para bactérias (Purificação): 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 0,05% (v/v) NP-40 e 250 μ g/mL de lisozima.
- Tampão NP-40: 150 mM NaCl, 1% NP-40 (v/v) e 50 mM Tris-HCl pH 8,0.
- Tampão NIB (*Nuclear Isolation Buffer*): 15 mM Tris, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ e 250 mM sucrose, ajustar o pH para 7,5.
- Tampão Fosfato-Salino (PBS) 1x: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄.
- Solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250*: *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v), metanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água destilada 45% (v/v).
- Solução Descorante para *Coomassie Brilliant Blue R-250*: 40% metanol (v/v) e 10% ácido acético glacial (v/v).

- Solução Corante de Ponceau S: 5% ácido acético glacial (v/v) e 0,2% Ponceau S (w/v).
- Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosídeo (IPTG): Solução estoque 1 M, concentração para uso em meios líquidos 0,2 mM ou 0,5 mM.

4.1.1 Tampões para Purificação de Proteínas fusionadas a GST:

- Tampão de Lavagem 1 (W1): 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4.
- Tampão de Lavagem 2 (W2): 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4.
- Tampão de Lavagem 3 (W3): 500 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4.
- Tampão de Equilíbrio (EQ): 50 mM Tris pH 8,0.
- Tampão de Eluição 1 (E1): 50 mM Tris pH 8,0, GSH 5 mg/mL.
- Tampão de Eluição 2 (E2): 50 mM Tris pH 8,0, GSH 10 mg/mL.
- Tampão de Eluição 3 (E3): 50 mM Tris pH 8,0, GSH 20 mg/mL.

4.1.2 Tampões para Extração de Histona de *Trypanosoma cruzi*

- Tampão A: 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 3 mM CaCl₂, 250 mM Sucrose e 0,5% Saponina (v/v);
- Tampão B: 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 3 mM CaCl₂, 250 mM Sucrose;
- Tampão C: 10 mM Tris pH 7,4, 250 mM EDTA, 150 mM NaCl e 1% Triton X-100[®] (v/v).

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meios de cultura de bactéria

- Meio líquido LB (Luria Bertani): Triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1% (m/v).

- Meio sólido LB-ágar: Meio líquido LB e ágar 1,5% (m/v).

4.2.2 Meios de cultura para células eucarióticas

- *Trypanosoma cruzi*: Meio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino:
- Linhagem HeLa: Meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% penicilina-estreptomicina (v/v) e 1% L-glutamina (v/v).

4.3 LINHAGENS CELULARES

4.3.1 *Escherichia coli*

Para as etapas de amplificação plasmideal e também expressão do 3xMBT e 3xMBT-D355N foram utilizadas as seguintes cepas:

- *DH5 α* : genótipo *dlacZ* Delta M15 Delta(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rK-mK+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*
- *BL21 Star (DE3)*: genótipo F-*ompT hsdSB* (rB-, mB-) *galdcmrne131* (DE3)

4.4 ANÁLISE DE SÍTIOS DE METIL-LISINA EM AMOSTRAS NÃO ENRIQUECIDAS

Para fins de comparação, arquivos gerados em experimentos anteriores (de GODOY *et al.*, 2013) foram analisados novamente, desta vez em busca de sítios de metil-lisina. Como estas amostras não estavam enriquecidas para este tipo de modificação pós-traducional, acreditamos que o número e os sítios encontrados sirvam como um número basal para comparação com os números encontrados após o enriquecimento.

Para esta análise, foi utilizado o software MaxQuant (<http://maxquant.org>).

4.5 VETORES

4.5.1 pGEX6P1-3xMBT e pGEX6P1-3xMBT-D355N

Os plasmídeos utilizados por Moore *et al.* (2013), o pGEX6P1-3xMBT, com o inserto de interesse e o pGEX6P1-3xMBT-D355N (controle) foram obtidos através da compra pelo banco de plasmídeos AddGene (<http://www.addgene.org>). O plasmídeo controle pGEX6P1-D355N detêm apenas uma mudança pontual de códon com relação ao 3xMBT, onde o aminoácido aspartato, na posição 355, foi substituído por uma asparagina, removendo assim a capacidade do domínio reconhecer as lisinas metiladas.

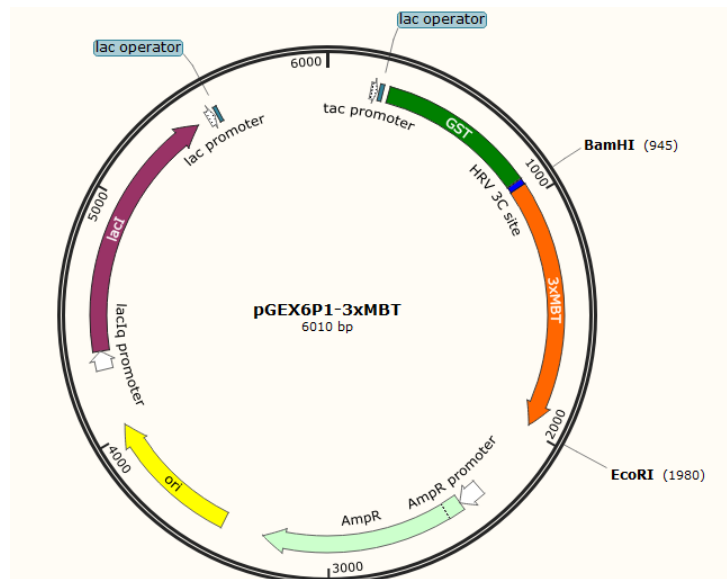


FIGURA 8 – MAPA DO VETOR PGEX6PI-3XMBT. O vetor pGEX6PI-3xMBT possui 6010 pares de base, gene que confere resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação bacteriana (ori), sistema para indução da expressão através do promotor *lac* (*lac* promoter), proteína de fusão GST, sítio de clivagem HRV 3C (HRV 3C site) e o gene do domínio 3xMBT.

FONTE: Addgene.org, mapa gerado a partir do programa *SnapGene® Viewer* (2017)

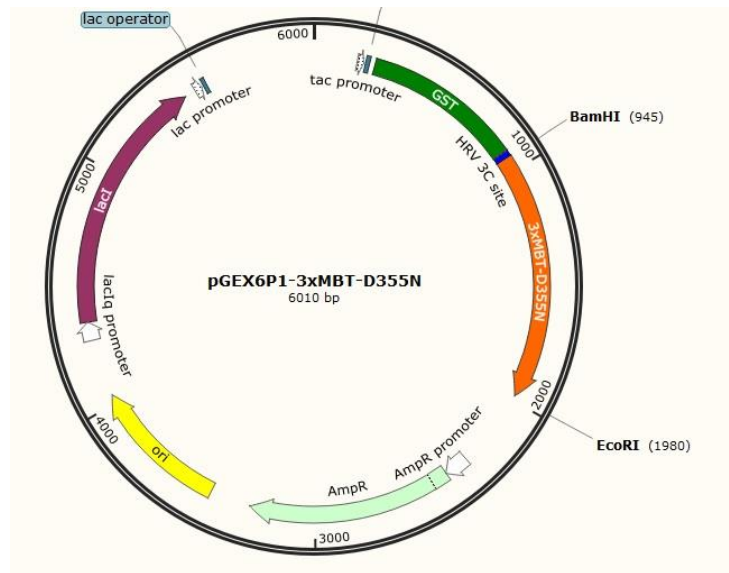


FIGURA 9 – MAPA DO VETOR PGEX6PI-3XMBT-D355N. O vetor pGEX6PI-3xMBT-D355N possui 6010 pares de base, gene que confere resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação bacteriana (ori), sistema para indução da expressão através do promotor *lac* (*lac* promoter), proteína de fusão GST, sítio de clivagem HRV 3C (HRV 3C site) e o gene do domínio 3xMBT mutado (D355N).

FONTE: Addgene.org, mapa gerado a partir do programa *SnapGene® Viewer* (2017)

4.5.2 pGEX-4T1

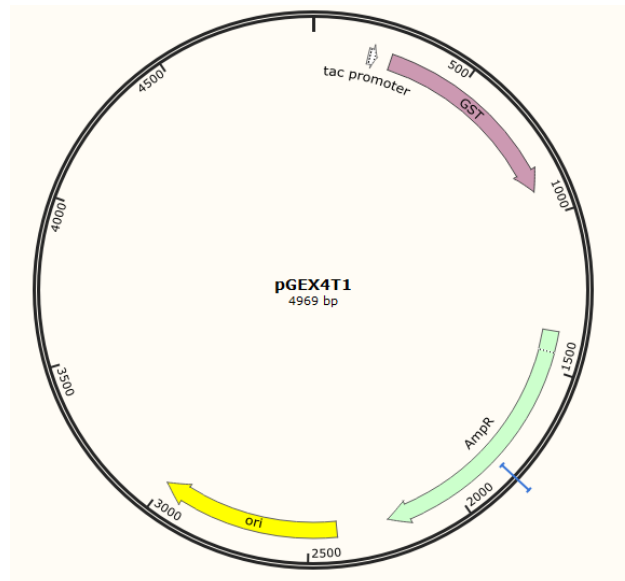


FIGURA 10 – MAPA DO VETOR PGEX4T1. O vetor pGEX4T1 possui 4969 pares de base, gene que confere resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação bacteriana (ori), sistema para indução da expressão através do promotor *tac* (*tac* promoter) e gene que codifica a proteína de fusão GST.

FONTE: GE Healthcare, mapa gerado a partir do programa *SnapGene® Viewer* (2017)

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A confirmação da presença correta dos insertos nos vetores pGEX-GP1, foi realizada através de reações de PCR. Em cada reação, 10 ng dos plasmídeos foram adicionados a uma solução contendo Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$, Sigma®) 50 mM, em água 18.2 Ω . Adicionou-se então a Taq DNA Polimerase (produzida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP)), na concentração de 5 unidades de enzima por μL ($5U \cdot \mu L^{-1}$), seguido do tampão próprio para o funcionamento da polimerase (1x). Foram adicionados ainda 100 nM dos *primers* diretos e reversos de cada plasmídeo como descrito no quadro 1:

<i>Primers</i>	
3xMBT	3xMBT-D355N
Direto	
5'-d[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]- 3'	5'-d[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]- 3'
Reverso	
5'-d[CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG]- 3'	5'-d[CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG]- 3'

QUADRO 1 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE DIAGNÓSTICAS.

FONTE: O autor (2017)

Estes *primers*, direto e reverso, anelam-se ao final da tag de GST amino-terminal e ao final do gene do domínio 3xMBT, respectivamente, amplificando assim o gene do domínio de interesse e parte da tag amino-terminal GST, os quais em conjunto apresentam cerca de 1200 pb.

O termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf®) foi programado com as seguintes condições: Início a 94 °C por 5 min, após esse período iniciam-se 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, seguido de 55 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min. Por fim, 72 °C por um período de 5 min. Os *amplicons* resultantes destas reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

4.7 RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DIAGNÓSTICA

Além da reação em cadeia da polimerase, restrições enzimáticas foram realizadas como meio de diagnosticar a presença correta do inserto no plasmídeo base.

Como demonstrado no mapa dos vetores (Figuras 8 e 9), os sítios de restrição para as enzimas BamHI (Invitrogen®) e EcoRI (Invitrogen®) retiram o inserto de seu plasmídeo. O plasmídeo pGEX6P1-3xMBT apresenta 6010 pb enquanto o gene da tripla repetição do domínio MBT possui 1026 pb. Portanto, após a análise do gel de eletroforese é possível determinar com certa acurácia, a presença correta do inserto dentro do vetor.

A dupla restrição enzimática ocorrerá sob os parâmetros listados no quadro 2:

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO
Buffer 2.1 (10x)	1x
BamHI	3U/ μ g DNA
EcoRI	3U/ μ g DNA
H ₂ O	qsp 10 μ L
DNA	500 ng

QUADRO 2 – REAGENTES E CONCENTRAÇÕES DAS REAÇÕES DE DIGESTÃO DIAGNÓSTICA.

4.8 ELETROFORESE DE DNA

As eletroforeses dos DNAs plasmideais e dos *amplicons* resultantes da reação de PCR, assim como dos produtos da restrição diagnóstica, foram realizadas em géis de agarose horizontal. Cerca de 10 μ L das amostras foram adicionadas a 1 μ L de Tampão de amostra para DNA e aplicadas em gel de agarose 1%, assim como 3 μ L do marcador de pares de base (1 Kb Plus – Invitrogen®). Esses géis foram preparados em tampão TBE 0,5X, e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, a 80 V constantes durante 1 hora. Os géis foram incubados em solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), lavados com água e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em sistema de vídeo documentação L-PIX EX (Loccus®).

4.9 TRANSFORMAÇÃO EM *Escherichia coli*

Os plasmídeos purificados, tanto pGEX6P1-3xMBT quanto pGEX6P-3xMBT-D355N, foram então transformados em cepas BL21 Star (DE3) (Invitrogen®) de *Escherichia coli* a partir do método de choque térmico. Para a reação adicionou-se a solução contendo os plasmídeos (100 ng de DNA) na solução contendo 50 µL de bactérias competentes. A solução foi incubada no gelo por 5 min seguido de choque térmico a 42 °C por 90 seg e retorno ao gelo por 2 min. As células foram incubadas para recuperação da membrana adicionando-se meio LB líquido sem antibiótico a 37 °C e agitação à 200 rpm por 30 min.

Após este período as células foram centrifugadas por 30 seg à 13000 rpm e ressuspensas em 100 µL do meio. As células ressuspensas foram então plaqueadas em LB-ágar contendo 25 µg/mL de ampicilina (Sigma®) e levadas a estufa à 37 °C *overnight*.

4.10 TESTE DE EXPRESSÃO DO DOMÍNIO 3xMBT-GST

Para determinação das melhores condições de expressão dos domínios de interesse, foi realizada uma série de testes, alterando variáveis como tempo e temperatura de indução. Essas condições podem levar a alterações nos níveis de expressão ou reduzir a presença do produto de interesse nas frações insolúveis, as quais acrescentam uma maior complexidade ao processo de purificação. Os testes foram realizados nas seguintes condições demonstradas no quadro 3.

Temperatura	Tempo de Indução			Agitação
25 °C	24h			200 rpm
37 °C	2h	4h	<i>Overnight</i>	

QUADRO 3 – CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E TEMPO DE INDUÇÃO NOS TESTES EM BL 21 STAR (DE3).

Após o plaqueamento, foram realizados os 6 pré-inóculos, inoculando uma colônia isolada de cada construção em 5 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico

de seleção (Ampicilina, Sigma[®], 50 µg/mL). As culturas preparadas foram levadas para agitação à 37 °C, 200 rpm durante a noite.

Na manhã seguinte foram preparados os inóculos, diluindo 100 µL (2%) de cada cultura em 5 mL de um novo meio LB, novamente contendo ampicilina (Sigma[®]) na concentração de 50 µg/mL e incubadas à 37 °C, 200 rpm por 2 horas.

A partir deste momento cada cultura foi exposta a diferentes tempos de indução de acordo com o Quadro 3. Para isso, foram adicionados 0,2 mM Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma[®]) no meio LB para induzir a expressão da proteína de interesse. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 7000 x g por 8 min à 4°C para a formação dos *pellets* das células e estes seguiram para a etapa de lise e separação das frações solúveis e insolúveis.

Para analisar a solubilidade do 3xMBT e 3xMBT-D355N recombinantes, os precipitados bacterianos resultantes dos testes de expressão foram ressuspensos em 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 mM NaCl) e as células foram lisadas através da adição de lizozima (250 µg/mL). As frações solúveis e insolúveis dos produtos foram separadas por centrifugação durante 20 min a 13000 rpm e temperatura de 4 °C. As amostras obtidas foram visualizadas em gel de SDS-PAGE.

A fim de ser utilizada como controle, também foi expressada a proteína glutathione s-transferase (GST) a partir do vetor pGEX-4T1 (GE Healthcare[®]), onde foram testadas as mesmas condições que foram utilizadas para a expressão do 3xMBT-GST.

4.11 EXPRESSÃO EM MAIOR ESCALA DO 3xMBT-GST

Após a determinação das melhores condições de expressão, os domínios recombinantes foram expressos em 100 mL à 37 °C, agitação de 200 rpm, por 4 h. Seguido do período de indução as culturas foram centrifugadas a 7000 x g por 8 min à 4 °C para a formação do *pellet* bacteriano, que então seguiram para as etapas de lise e purificação do domínio recombinante.

4.12 PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO 3xMBT-GST

Subsequente a superexpressão, o domínio 3xMBT-GST e seu controle negativo

(3xMBT-D355N-GST) foram purificados seguindo técnicas de cromatografia por afinidade através de uma resina de glutationa-sefarose (GSH) (GE Healthcare®). A escolha desta coluna deve-se a presença da Glutathione S-Transferase (GST) na região amino-terminal do domínio de interesse. A forte interação entre a GST-GSH permite a aderência a coluna e subsequente remoção das proteínas indesejadas.

Para isso, os *pellets* obtidos foram ressuspendidos em 10 mL de Tampão de Lise para bactérias (Purificação) (razão 1 mL de tampão para cada 10 mL de cultura original) e deixados em gelo por 45 min. Em seguida, os mesmos foram submetidos a lise por sonicação (output 30%, 20 seg (1s on, 1s off), 20 repetições, sempre em gelo). As amostras sonicadas foram então centrifugadas a 20000 x g por 25 min à 4 °C para clareamento do lisado (Fração *Input*). O lisado resultante foi incubado com 1 mL da resina de GSH-sefarose (50% resina), já equilibrada com o mesmo tampão de lise. A incubação ocorreu durante a noite e à 4 °C em orbital 3D.

Na manhã seguinte, as *beads* foram centrifugadas a 500 x g por 2 min à 4 °C. O sobrenadante (Fração *Flow Through*) foi descartado e as *beads* então passaram por três etapas de lavagem com os seguintes tampões: Tampão de Lavagem 1, Tampão de Lavagem 2 e Tampão de Lavagem 3, com centrifugações de 500 x g à 4 °C entre cada etapa (Frações W1, W2 e W3). Após as lavagens, a resina passou por uma etapa de equilíbrio, onde houve a adição do tampão EQ que possui um pH mais elevado (Fração EQ). Então, as *beads* seguiram para etapas de Eluição, que consistiram na adição crescente de GSH-reduzida nos tampões: Tampão de Eluição 1 (incubada por 30 min à 4 °C), Tampão de Eluição 2 (incubada por 2 horas à 4 °C) e Tampão de Eluição 3 (incubada por 30 min à 4 °C). É importante ressaltar que todos os tampões listados foram suplementados com inibidores de protease cOmplete® EDTA-free (1 tablete para cada 10 mL de tampão) (Roche®) e com 1 mM de PMSF (fenil-metano(sulfonil)fluoreto), ambos adicionados apenas no momento do uso.

Foram salvos 1mL de cada fração do processo de purificação para posterior análise por SDS-PAGE.

4.13 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS HeLa

A linhagem de células tumorais HeLa, obtida do Laboratório de Biologia Básica de Células Tronco do Instituto Carlos Chagas, foi cultivada em garrafas de 75 cm² até atingirem uma confluência acima de 80%. As células foram então lavadas duas vezes com solução salina balanceada (sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺). Em seguida foi adicionada a solução de tripsina 0,05% (w/v) contendo EDTA 0,02% (w/v), as células foram deixadas na garrafa em estufa de CO₂ por 3 min. Para verificar se as células estavam desaderidas, a garrafa foi visualizada sob microscópio de luz invertida. Foi adicionado, no mesmo volume da tripsina, o meio de cultura. Em câmara de fluxo laminar, o conteúdo das garrafas foi colocado em tubo cônico de centrifuga com capacidade para 15 mL e homogeneizado utilizando pipeta e pipetador automático. Por último, as células foram centrifugadas por 5 min a 2000 rpm a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os *pellets* celulares foram congelados (-20 °C) até o momento do uso.

4.14 OBTENÇÃO E CULTIVO de *Trypanosoma cruzi*

Células epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c em fase de crescimento exponencial foram mantidas pelos alunos da pós-graduação Rafael Almeida e Matheus Fernandes, em cultura axênica em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal a 28 °C, com passagens a cada 3-4 dias. Foram obtidas células de epimastigota na ordem de 3,2 x 10⁹. Este total de células foi dividido em três tubos, cada um com aproximadamente 1,06 x 10⁹ células. Estas células de cada tubo foram centrifugadas a 5000 x g, por 10 min a 4 °C, lavadas em 5 mL de PBS 1x, centrifugadas novamente a 5000 x g, por 10 min a 4 °C, ressuspensas em 1 mL de PBS 1x, centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e os *pellets* foram congelados (-20 °C) até o uso.

4.15 EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE *Trypanosoma cruzi*

Para extração e posterior enriquecimento das histonas de *T. cruzi*, os *pellets* resultantes do cultivo (item 4.14) foram ressuspensos em 1 mL do Tampão A, seguido de centrifugação a 5000 x g por 10 min à 4 °C. Os *pellets* resultantes, contendo debri

celular e núcleos, foram lavados com a adição de 1 mL do Tampão B, centrifugados a 5000 x g por 10 min à 4 °C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de Tampão C para rompimento do núcleo e para a separação das proteínas nucleares foi realizada uma centrifugação a 10000 x g por 20 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram realizadas três etapas de lavagem com 100 mM Tris-HCl pH 8,0, com centrifugações de 5000 x g por 5 min à 4 °C entre cada lavagem. Os *pellets* contendo as proteínas nucleares foram ressuspensos em 1 mL de HCl 0,4 N e incubadas em gelo por 2 horas em agitador orbital 3D. As proteínas contidas no sobrenadante foram recuperadas após centrifugação a 10000 x g por 15 min à 4 °C, em seguida foram adicionados 8x o volume inicial (8 mL) de Acetona (Merck®) 100% ao sobrenadante e incubados *overnight* à -20 °C.

Na manhã seguinte, foi realizada uma centrifugação a 3100 x g por 15 min à 4 °C, a acetona foi removida cuidadosamente e os *pellets* de proteína resultantes foram lavados 3 vezes com 1 mL de Acetona 100%, com centrifugação de 6100 x g por 10 min à 4 °C entre as lavagens. Os tubos foram mantidos em gelo e deixados abertos para secagem de acetona residual e os *pellets* ressuspensos em 50 µL de água 18.2 Ω. O processo de enriquecimento foi então avaliado por SDS-PAGE.

Todos os tampões utilizados foram suplementados com inibidor de protease cOmplete mini EDTA-free (Roche®) 1x e 1 mM de PMSF.

4.16 EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE CÉLULAS HELA

Os *pellets* resultantes do cultivo de células HeLa (item 4.13) foram lavados com o Tampão NIB numa proporção 1:10 (v/v) e removido por centrifugação de 700 x g por 5 min. As células foram então lisadas a partir da adição de 1:10 (v/v) do Tampão NIB contendo 0,2% de NP-40 (v/v) e mantidas no gelo por 10 min. Após centrifugação de 1000 x g por 10 min à 4 °C, o pellet resultante continha em sua maior parte o núcleo das células. O pellet nuclear foi então lavado com Tampão NIB (1:10, v/v) para a remoção do detergente antes da etapa de extração de histonas, seguido de nova centrifugação a 1000 x g por 10 min à 4 °C.

O *pellet* nuclear foi ressuspendido em 0,2 M de H₂SO₄ (Nova Química®), incubado em agitador orbital 3D por 4 horas à 4 °C e em seguida centrifugado a 3400 x g 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para precipitar as histonas, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 100% numa proporção 1:3 (v/v), a fim de obter uma concentração final de TCA de 33%. A mistura foi então incubada à 4 °C *overnight*.

Na manhã seguinte, a mistura foi centrifugada a 3400 x g por 5 min, seguido de uma breve lavagem com acetona + 0,1 % HCl. Após centrifugação de 3400 x g por 2 min o sobrenadante foi removido e o tubo foi mantido aberto em gelo para secagem de acetona residual. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 100 µL de água 18.2 Ω. O processo de enriquecimento foi então avaliado por SDS-PAGE.

Todos os tampões utilizados foram suplementados com inibidor de protease cOmplete mini EDTA-free (Roche®) 1x, 1 mM de PMSF e 4 mM de DTT.

4.17 LISE DAS CÉLULAS HeLa e de *T. cruzi* PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO TOTAL

Os pellets das células, obtidos no item 4.13 e 4.14 desta seção, foram lavados três vezes com PBS (1:3 v/v). Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C e ressuspendidas em 1 mL de tampão NP- 40 gelado ou Tampão C, o qual havia sido suplementado com inibidores de protease instantes antes do seu uso. As células então foram incubadas em gelo por 30 min e o lisado celular foi centrifugado por 12.000 x g durante 10 min a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi separado e armazenado a - 20 °C até uso.

4.18 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para a corrida eletroforética dos testes de indução, foi adicionado tampão de amostra de Laemmli (4x) à 25 µg de amostra proteica e em seguida estas foram aquecidas à 95 °C por 5 min. Essa eletroforese consistiu de um gel de poliacrilamida Tris-Glicina 10% 1.0 mm. Já para os géis de solubilidade, as amostras da fração solúvel foram dosadas e 25 µg de proteína foram aplicadas ao gel. As frações insolúveis, por

sua vez, foram solubilizadas a partir da adição de 200 μL de tampão de amostra de Laemmli (4x) e 10 μL foram aplicados no gel.

Para a corrida eletroforética das frações da purificação, foram adicionados 5 μL tampão de amostra de Laemmli (4x) à 5 μL de cada fração e em seguida aquecidas à 95 °C por 5 min. Essa eletroforese consistiu de um gel de poliacrilamida Tris-Glicina 10% 0.75 mm.

Por fim, para avaliação da extração e enriquecimento de histonas de *T. cruzi* e células HeLa, foram adicionados 10 μg de cada réplica à 5 μL tampão de amostra de Laemmli (4x), também aquecidas por 5 min a 95 °C. As amostras foram então aplicadas em gel Tris-Glicina 15% 1.0 mm.

Em todos os géis de eletroforese foram utilizados 3 μL do marcador de massa molecular *Benchmark Protein Ladder* (Invitrogen®). As corridas ocorreram por 1 hora à 150 V constantes e os géis resultantes foram corados em *Coomassie Blue R-250* por 20 min.

4.19 DETERMINAÇÃO DA AFINIDADE E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO 3xMBT POR FAR- WESTERN BLOT

Por fim, realizada a purificação, foi determinada a especificidade e a afinidade do domínio. Isto foi realizado através do ensaio de *Far-Western Blot*, o qual consiste da utilização do domínio 3xMBT purificado para a identificação dos sítios de metil-lisina de diversas proteínas.

Os extratos celulares (*T. cruzi* e HeLa) e as amostras provenientes da extração das histonas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% como descrito no item 4.18 de Materiais e Métodos. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad®) por 40 min sob tensão de 20 V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 1 horas com caseína 5 % diluída em tampão PBS-T (Tampão PBS contendo Tween-20 0,05 %) e então incubadas por 16 horas a 4 °C com os domínios 3xMBT ou 3xMBT-D355N (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$): buscando identificar proteínas que contenham sítios de lisina metilados. Após o tempo de incubação foram realizadas 3 lavagens de 5 min com tampão PBS-T e então as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, anti-GST (1:5000 ou 1:10000) (Thermo Scientific®) por 2 horas à

temperatura ambiente, seguida de novas lavagens com PBS-T. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário: anti-rabbit (1:5000 ou 1:10000) (Sigma®) conjugado com peroxidase, por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas contendo o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foram reveladas com o substrato para quimioluminescência Super Signal West Pico Plus Substrate (Thermo-Scientific®) e visualizadas com o auxílio do equipamento ChemiExpress (Loccus®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE PRELIMINAR *IN SILICO* DOS SÍTIOS METILADOS EM *T. cruzi* e *T. brucei*.

Para confirmar a ocorrência, determinar o potencial papel da metilação na regulação de processos biológicos, bem como avaliar os diferentes tipos de metilação, foi inicialmente realizada uma análise preliminar durante a metaciclologênese de *T. cruzi*, a partir da reanálise de arquivos gerados em trabalho proteômico anterior (DE GODOY *et al.*, 2012). Foi possível determinar este número de sítios e compará-los aos números encontrados em trabalho anterior de *T. brucei* (dados do nosso grupo, não publicados), como demonstrado na Figura 11.

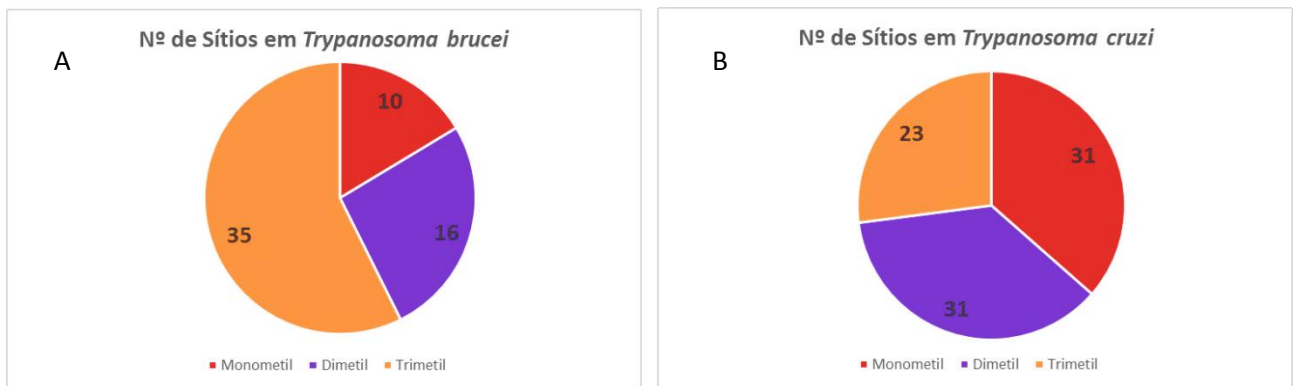


FIGURA 11 - NÚMERO DE SÍTIOS DE LISINA METILADA ENCONTRADOS A PARTIR DA REANÁLISE DE DADOS PROTEÔMICOS DE *T. brucei* (A) e *T. cruzi* (B).
 FONTE: O autor (2017)

Foram encontrados sítios de metilação mesmo em amostras não enriquecidas, demonstrando que essa modificação pós-traducional está presente em relativa abundância em ambos os tripanossomatídeos. Embora haja diferenças entre os números de sítios em *T. cruzi* e *T. brucei*, esses dados não são conclusivos devido a análise ter sido realizada em apenas um arquivo proteômico. Após essa análise, o grupo produziu uma caracterização do metilproteoma do *T. cruzi*, onde foram encontrados números muito maiores tanto de sítios de metilação em lisinas, quanto em argininas, evidenciando ainda mais a potencial importância desta PTM.

Após esta comparação, foi determinada a localização intracelular de cada proteína contendo metil-lisina encontrada para *T. cruzi* (Figura 12), a partir do número de ontologia do gene (GO) encontrados no banco de dados *TriTrypDB*.

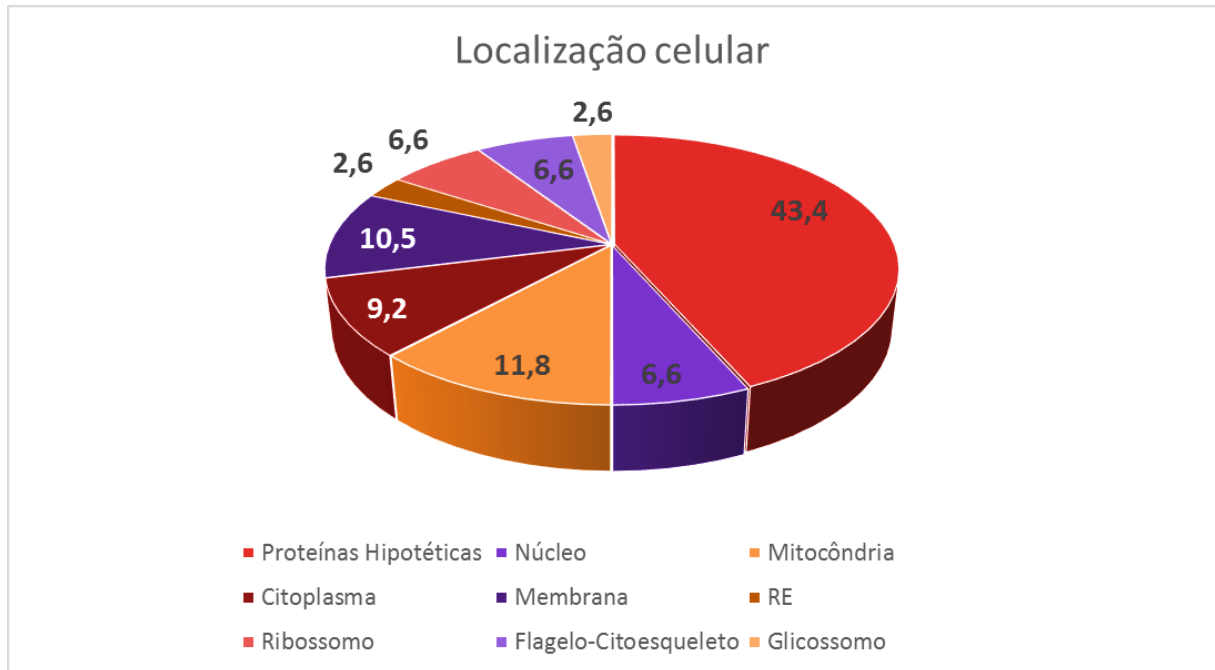


FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NA BUSCA POR PEPTÍDEOS METILADOS. Dados apresentados em porcentagem. FONTE: O autor (2017)

A maior parte dos sítios de lisina metilados foram encontrados em proteínas hipotéticas. Em segundo lugar se encontram as proteínas ribossomais, isto corrobora com os dados do grupo (ALMEIDA, 2017), no qual os dados do metilproteoma de *T. cruzi*, indicam uma concentração desta modificação pós-traducional em processos envolvidos com a síntese e degradação proteica no parasita.

5.2 AQUISIÇÃO E AVALIAÇÃO DOS VETORES pGEX-6P1-3xMBT e pGEX-6P1-3xMBT-D355N

Após a chegada das cepas de *E. coli* DH5 α contendo os plasmídeos de interesse, essas foram estriadas em placas LB-ágar (contendo ampicilina 50 μ g/mL) e

incubadas *overnight* a 37 °C para isolamento de colônias. Quatro colônias isoladas de cada placa foram então inoculadas em meio LB líquido com Ampicilina (Sigma®) 25 µg/mL para amplificação dos plasmídeos e seguiram para a purificação plasmideal realizado através de kit comercial *NucleoSpin® Plasmid QuickPure* (Macherey-Nagel®). Tanto pGEX6P1-3xMBT quanto o pGEX6P1-3xMBT-D355N possuem 6010 pares de base. Os plasmídeos purificados seguiram então para etapas de verificação por PCR e digestão diagnósticas.

5.2.1 REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES 3xMBT-GST e D355N-GST

Para confirmar a presença do inserto dentro do vetor importado, reações de PCR foram realizadas para as quatro colônias isoladas de cada plasmídeo. Os insertos do 3xMBT e 3xMBT-D355N apresentam um tamanho de 1126 pb. Conforme visualizado no gel de agarose (Figura 13) portanto os *amplicons* gerados por esta reação apresentaram os tamanhos esperados.

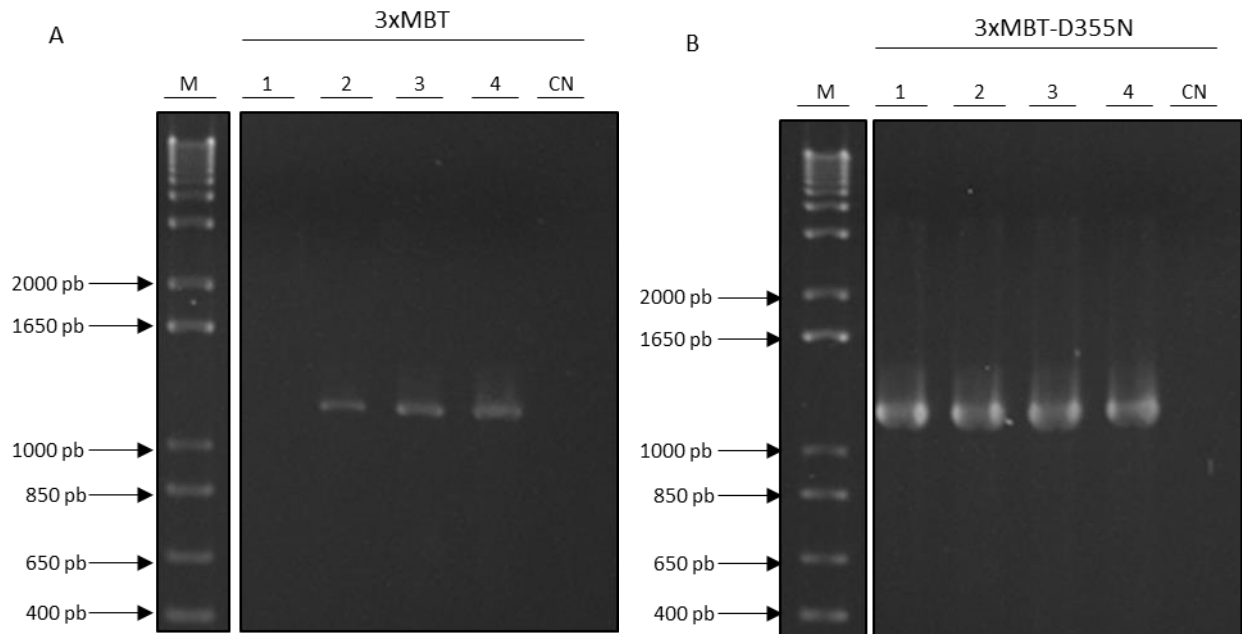


FIGURA 13 – CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES DOS DOMÍNIOS 3xMBT E 3xMBT-D355N NO VETOR pGEX-6P1. Análise eletroforética das reações de PCR em gel de agarose 1% onde foram testadas 4 colônias para o pGEX-6P1-3xMBT (A) e 4 colônias para seu controle negativo, o pGEX-6P1-3xMBT-D355N (B). *M*: marcador de pares de base; (1, 2, 3 e 4): colônias selecionadas; *CN*: controle negativo.

FONTE: O autor (2017)

O gel mostra padrões de eletroforese próximos ao marcador de 1000 pb, demonstrando que o inserto de ambas as formas do 3xMBT estavam presentes nos vetores de origem. Um controle negativo, onde a reação de PCR foi preparada da mesma maneira, exceto pela inserção do DNA plasmídeo, também foi realizada. Não foram constatadas bandas na região, indicando assim que os reagentes utilizados não estavam contaminados com nenhum tipo de DNA.

A colônia 1 do 3xMBT não apresentou um *amplicon* nesta reação. Há várias hipóteses para esta ausência, dentre elas: erros de pipetagem de algum dos reagentes, quantidade insuficiente de DNA para esta reação ou a ausência propriamente dita do inserto no vetor presente nesta colônia. Logo, a colônia 1 não seguiu para os próximos testes, tampouco para as etapas de expressão.

5.2.2 CONFIRMAÇÃO DOS CLONES POSITIVOS: pGEX-6P1-3xMBT e D355N

Uma segunda avaliação quanto a integridade do plasmídeo e presença do inserto foi realizada, consistindo da digestão com enzimas de restrição, gerando assim fragmentos previsíveis, cuja presença no gel de eletroforese é um grande indicativo de que o plasmídeo contém os insertos esperados. As enzimas utilizadas foram a *BamHI* e a *EcoRI*, ambas foram escolhidas pois seus sítios de restrição estão próximos do início e término do gene do 3xMBT. A utilização destas enzimas gera um fragmento de aproximadamente 1030 pb, o qual corresponderia ao inserto, e outro de aproximadamente 5000 pb, o qual corresponderia a porção restante do plasmídeo pGEX-6P1.

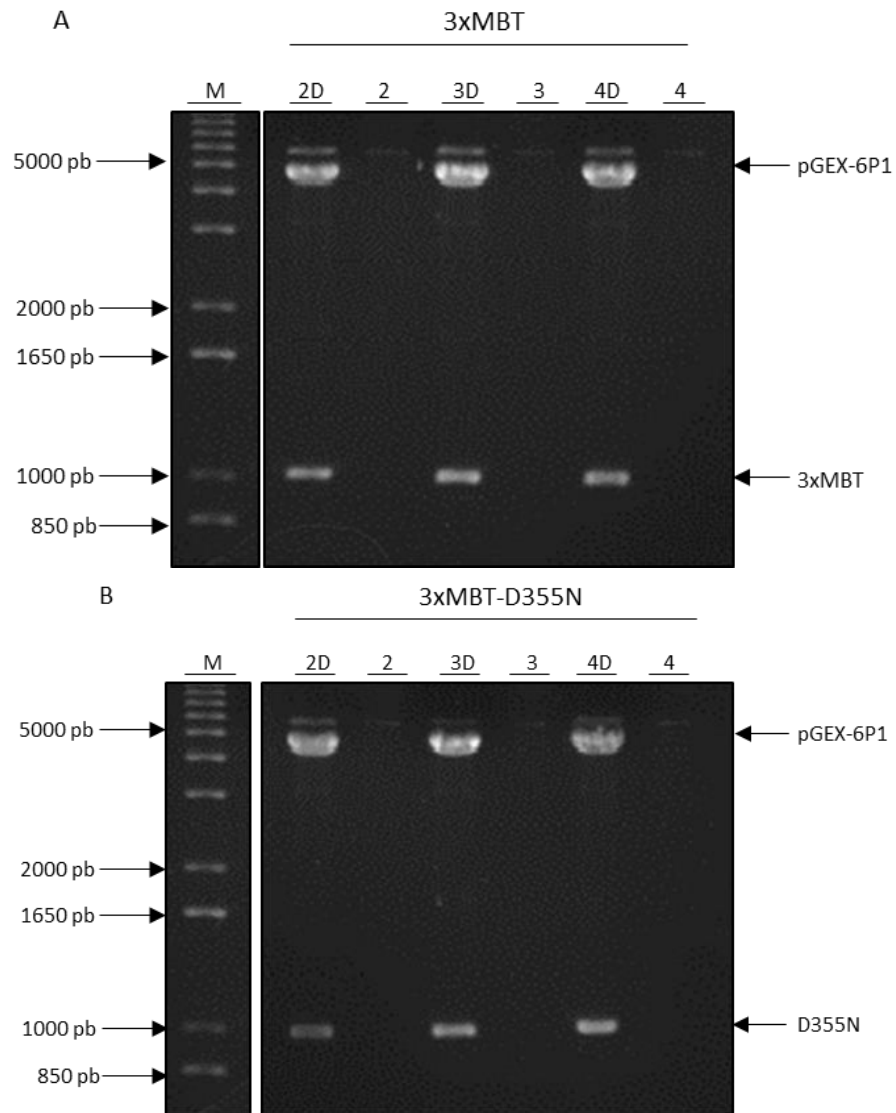


FIGURA 14 – RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS GENES DOS DOMÍNIOS 3xMBT E 3xMBT-D355N NO VETOR pGEX-6P1. Análise eletroforética em gel de agarose 1% demonstrando o resultado das digestões diagnósticas dos vetores pGEX-6P1-3xMBT (A) e seu controle negativo, o pGEX-6P1-3xMBT-D355N (B). *M*: marcador de pares de base; (2, 3 e 4): Plasmídeos provenientes das colônias 2, 3 e 4 não digeridos; (2D, 3D, 4D): Plasmídeos e insertos provenientes das colônias 2, 3 e 4 após a reação de restrição por BamHI e EcoRI
 FONTE: O autor (2017)

Padrões eletroforéticos são encontrados nas alturas de 1000 pb, 5000 pb e 6000pb. Os padrões de 1000 pb provavelmente correspondem ao inserto após a digestão, enquanto os demais padrões indicam a presença de diferentes conformações do plasmídeo pGEX-6P1.

5.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS 3xMBT E 3xMBT-D355N FUSIONADOS A GST EM *Escherichia coli*

Os genes da tripla repetição do domínio MBT e seu controle negativo foram clonados pelo laboratório do Dr. Or Gozani, da Universidade de Stanford, no vetor comercial pGEX-6P1 (MOORE *et al.*, 2013). Este vetor foi escolhido por possuir a proteína de fusão GST, a qual auxilia no correto enovelamento proteico e também contribui para uma maior solubilidade das proteínas. Devido a essas características, o 3xMBT e seu controle 3xMBT-D355N foram clonados no vetor pGEX-6P1 em fusão N-terminal com a GST (3xMBT-GST e 3xMBT-D355N-GST).

Para o desenvolvimento do presente trabalho os vetores já clonados, contendo os insertos, foram obtidos através do repositório AddGene[®]. Após a confirmação que os plasmídeos mantiveram suas características, estes foram transformados (item 4.6) e em seguida as cepas foram induzidas a expressar este domínio conforme descrito no item 4.7. O domínio 3xMBT apresenta cerca de 38 kDa enquanto a GST fusionada a sua extremidade amino-terminal apresenta cerca de 25,5 kDa. Portanto, o tamanho esperado da proteína expressa será a soma de ambas, ou seja, aproximadamente 63 kDa.

5.3.1 Testes de Expressão

A figura 15 mostra o teste de expressão realizado a 37 °C, durante 2h, 4h e 16h (O.N), com a adição de 0,2 mM de IPTG no meio de cultivo para indução da expressão.

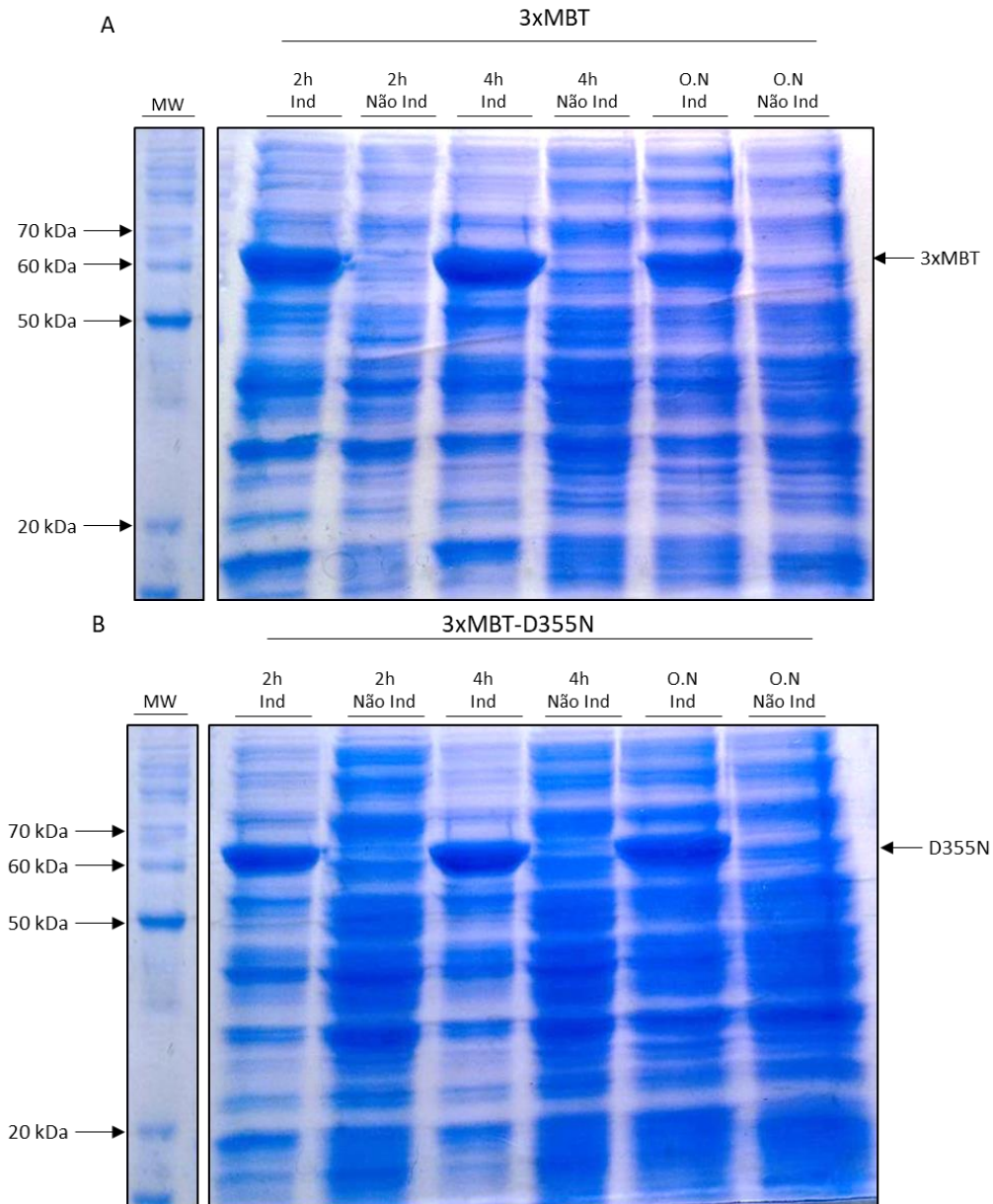


FIGURA 15 – TESTE DE EXPRESSÃO DOS DOMÍNIOS 3xMBT E 3xMBT-D355N EM *Escherichia coli* À 37 °C. Gel de poliácridamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após a indução da expressão dos domínios (A) 3xMBT e seu controle negativo, (B) 3xMBT-D355N. Foi utilizada a cepa BL21 Star DE3, cultivado à 37 °C e indução com 0,2 mM de IPTG. Foram observadas bandas na região de 60 kDa correspondente a expressão da proteína. MW: marcador de peso molecular; 2h, 4h e O.N (*overnight*): Tempos de indução; Ind: Induzido; Não Ind: Não Induzido.

FONTE: O autor (2017)

Em todas as condições testadas, bandas mais intensas foram encontradas na região de ~60 kDa, quando comparadas as culturas que não foram induzidas. Estas bandas eram esperadas para os domínios 3xMBT-GST e 3xMBT-D355N, correspondendo então à expressão dos domínios de interesse.

Também foram realizados testes de expressão e solubilidade à 25 °C, onde teoricamente se esperava um aumento de proteína na fração solúvel, por 24h (Figuras 16 e 17). A solubilidade da proteína foi avaliada através da separação por centrifugação das frações solúveis e insolúveis provenientes da lise das células bacterianas.

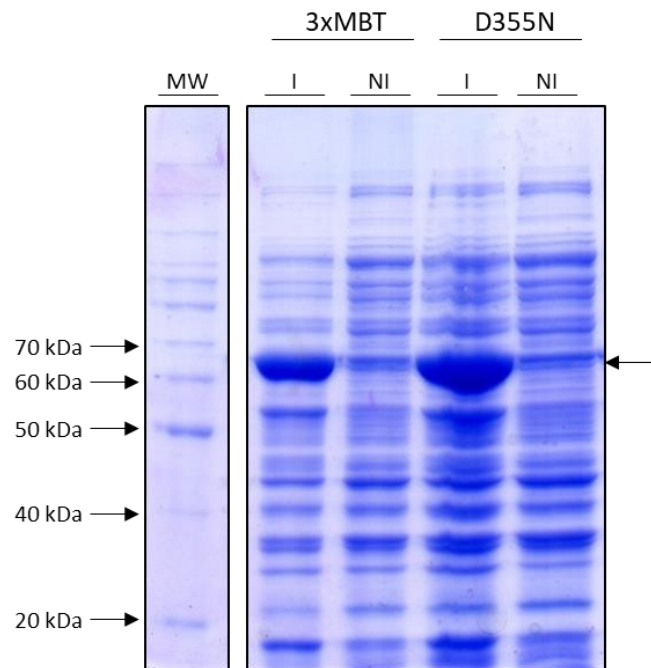


FIGURA 16 – TESTE DE EXPRESSÃO DO DOMÍNIO 3xMBT E 3xMBT-D355N EM *Escherichia coli* À 25 °C. Gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após a indução da expressão dos domínios 3xMBT e seu controle negativo 3xMBT-D355N. Foi utilizada a cepa BL21 Star DE3, cultivo à 25 °C e indução com 0,2 mM de IPTG por 24h. Foram observadas bandas na região de 60 kDa correspondente a expressão da proteína. *MW*: marcador de peso molecular; *I*: Induzido; *NI*: Não Induzido.

FONTE: O autor (2017)

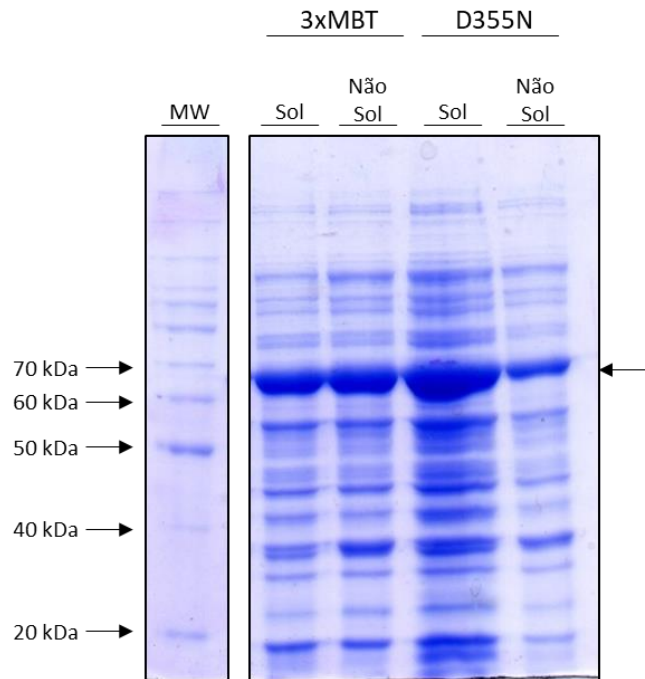


FIGURA 17 - TESTE DE SOLUBILIDADE DOS DOMÍNIOS 3xMBT E SEU CONTROLE NEGATIVO, 3xMBT-D355N À 25 °C. Gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após a indução da expressão e separação das frações solúvel e insolúvel dos domínios 3xMBT e seu controle negativo 3xMBT-D355N. Foi utilizada a cepa BL21 Star DE3, cultivado à 25 °C e indução com 0,2 mM de IPTG por 24h. Foram observadas bandas na região de 60 kDa correspondente a expressão da proteína em ambas as frações. *MW*: marcador de peso molecular; *Sol*: Fração Solúvel; *Não Sol*: Fração Insolúvel. FONTE: O autor (2017)

Com esse teste, constatou-se que, mesmo com a diminuição da temperatura de indução, a proporção de proteína presente na fração solúvel com relação a fração insolúvel permaneceu a mesma, exceto pela fração solúvel do controle D355N, onde percebe-se uma maior quantidade de maneira geral. No entanto, isso provavelmente se deve a aplicação de mais proteína ao gel.

Assim, como não houve alteração significativa, optou-se então pela indução a 37 °C por 4h para as expressões em maior escala.

5.3.2 Testes de Purificação por Cromatografia de Afinidade à GSH

Após a etapa de padronização da expressão, partiu-se para a expressão em maior escala seguida da padronização do processo de purificação dos domínios, conforme descrito no item 4.8.

Inicialmente, com apenas duas etapas de lavagem com o Tampão de Lavagem 1 e uma única etapa de eluição, ainda havia a presença de contaminantes no eluato, além de observar-se uma grande quantidade de proteína ainda ligada a GSH-sefarose (coluna R) (Figura 18). Portanto, um refinamento desse processo ainda era necessário.

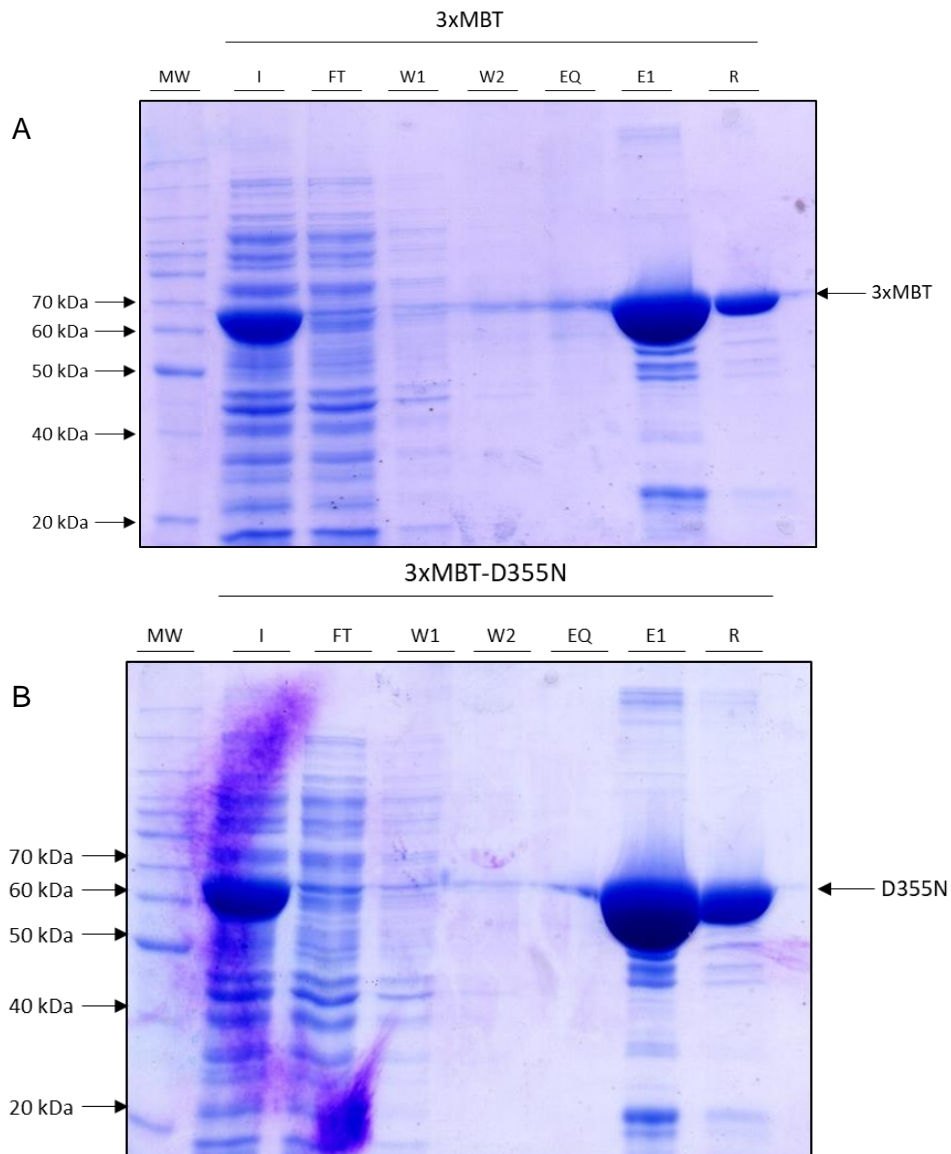


FIGURA 18 - RESULTADO DA PURIFICAÇÃO INICIAL DOS DOMÍNIOS 3xMBT (A) E SEU CONTROLE NEGATIVO, 3xMBT-D355N (B). Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a GSH-Sefarose e analisadas em gel SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie blue* R-250. A banda de aproximadamente 60 kDa, referente ao 3xMBT-GST/3xMBT-D355N-GST, está presente no eluato, porém também se encontra ligada a resina. *MW*: marcador de peso molecular; *I*: *Input*; *FT*: *Flow-Through*; *W1-W2*: Lavagens 1 e 2; *EQ*: Equilíbrio; *E1*: Eluição; *R*: Resina
FONTE: O autor (2017)

Então, decidiu-se por acrescentar mais etapas de lavagem, com concentração crescente de NaCl nos tampões, visando a remoção dos contaminantes presentes no eluato final. Além disso, mais passos de eluição também foram realizados, com concentrações crescentes do competidor (GSH), buscando recuperar uma maior quantidade de proteína que ainda estaria ligada a resina, além de determinar a concentração ideal de GSH para eluição do domínio. Também procurou-se investigar se os contaminantes presentes seriam eluídos em uma concentração diferente de GSH do que o 3xMBT.

Pode-se observar na Figura 19 que, apesar do aumento no número de etapas de lavagem, ainda há a presença de outras proteínas presentes no eluato. Porém, é possível que as bandas situadas (50 kDa a 60 kDa) logo abaixo da grande banda pertencente ao domínio sejam produtos de degradação do 3xMBT-GST, apesar da presença de inibidores de protease nos tampões utilizados. Também é possível notar uma banda presente na região de 20-25 kDa, possivelmente indicando a presença da GST isolada. Ambas as situações podem ocorrer devido a uma série de fatores, sendo o principal deles a manipulação da amostra e a utilização do método de sonicação para a lise das células bacterianas.

Também é possível observar que, apesar da introdução de mais passos de eluição ao protocolo, ainda há proteína ligada à GSH-sefarose, sugerindo uma possível interação entre a proteína e matriz de sefarose da resina, para contornar esse problema, adição de mais NaCl ou aumento do pH nos tampões de eluição podem reduzir essas interações inespecíficas indesejadas.

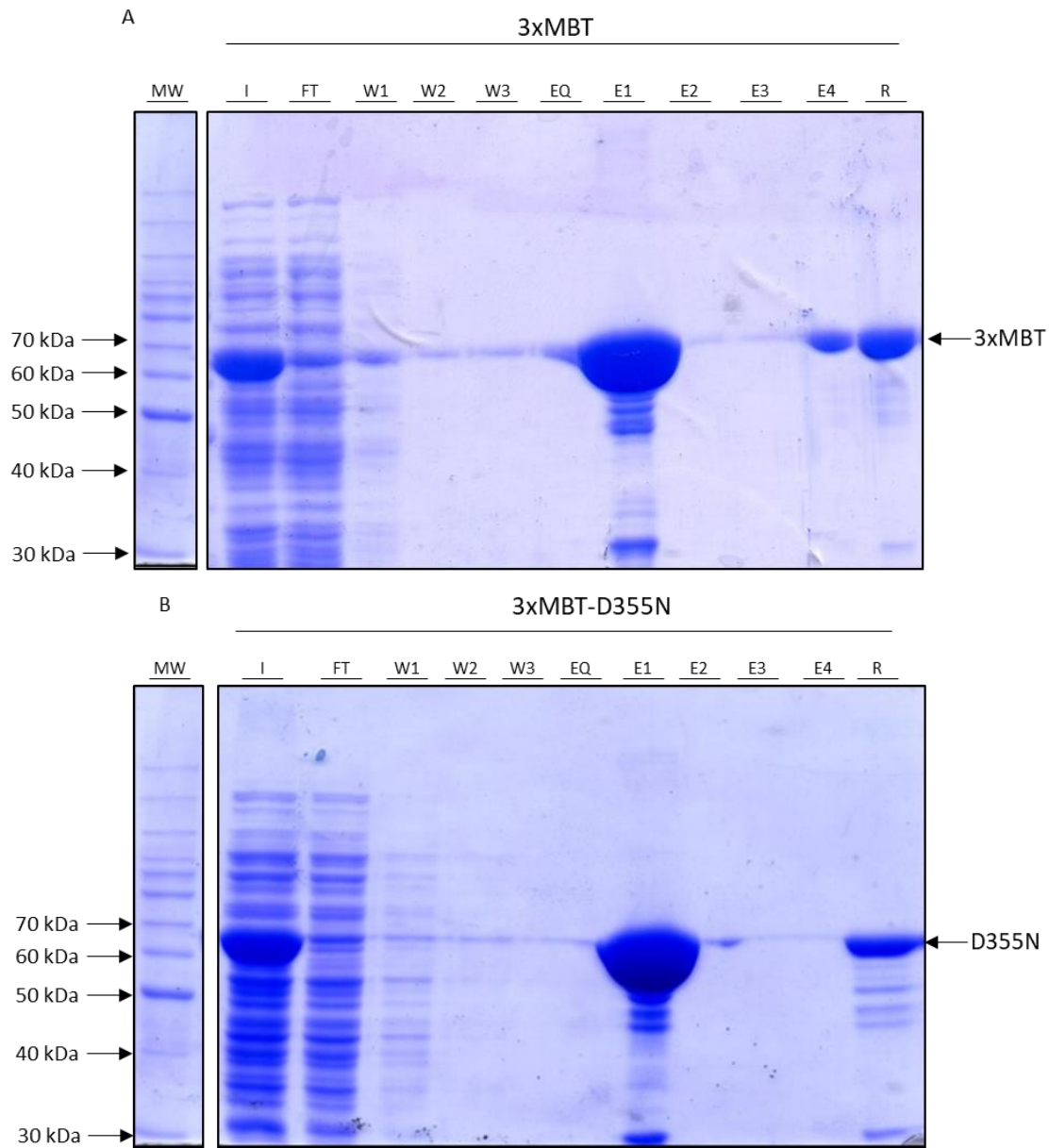


FIGURA 19 - RESULTADO DO REFINAMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS 3XMBT E SEU CONTROLE NEGATIVO, 3XMBT-D355N. Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a GSH-Sefarose e analisadas em gel SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie blue* R-250. A banda de aproximadamente 60 kDa, referente ao 3xMBT-GST/3xMBT-D355N-GST, está presente no eluato, porém também continua ligada a resina, apesar das etapas adicionais de lavagem e eluição. *MW*: marcador de peso molecular. *MW*: marcador de peso molecular; *I*: Input; *FT*: Flow-Through; *W1-W3*: Lavagens 1 a 3; *EQ*: Equilíbrio; *E1-E4*: Eluições 1 a 4; *R*: Resina.

FONTE: O autor (2017)

5.6 EXPRESSÃO DA GLUTATIONA-S TRANSFERASE EM *Escherichia coli*

A figura 20 mostra o teste de expressão realizado a 37 °C, durante 2h, 4h e a 30 °C por 24h, com a adição de 0,5 mM de IPTG no meio de cultivo para indução da expressão. Em todas as condições testadas, bandas mais intensas foram encontradas na região de 25 kDa, quando comparadas as culturas que não foram induzidas. Estas bandas eram esperadas para a GST, correspondendo então a expressão da proteína de interesse.

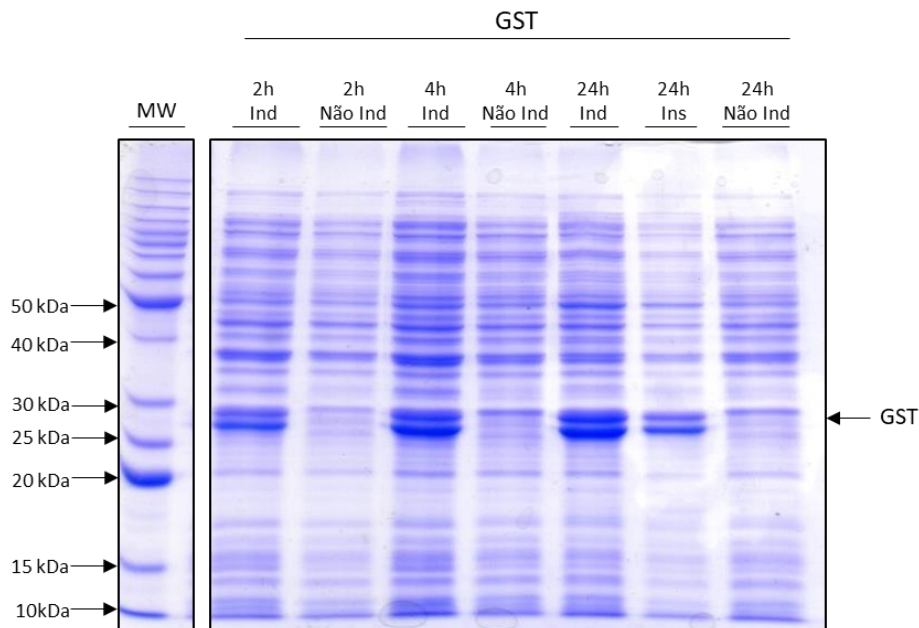


FIGURA 20 - TESTE DE EXPRESSÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM *Escherichia coli*. Gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após a indução da expressão da Glutaciona S-Transferase. Foi utilizada a cepa BL21 Star DE3, cultivado à 37 °C para os tempos de 2h e 4h e cultivado a 30 °C para o tempo de 24h, a indução foi realizada com 0,5 mM de IPTG. Foram observadas bandas na região de 25 kDa correspondente a expressão da proteína. *MW*: marcador de peso molecular; *2h*, *4h* e *24h* Tempos de indução; *Ind*: Induzido; *Não Ind*: Não Induzido; *Ins*: Fração Insolúvel.
 FONTE: O autor (2017)

A proteína Glutaciona S-Transferase foi utilizada como controle, tanto para a validar a marcação específica do anticorpo anti-GST utilizado nos ensaios de Far-Western Blot, indicando que o anticorpo estaria se ligando de maneira específica somente a GST fusionada ao domínio, e não inespecificamente as outras bandas presentes nas amostras, quanto como controle da técnica quando incubado juntamente do domínio controle 3xMBT-D355N.

5.7 EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE HISTONAS DE *T. cruzi* e CÉLULAS HeLa

O processo de extração e enriquecimento de histonas ocorre pela técnica chamada de extração ácida, devido as histonas serem proteínas muito ricas em resíduos de aminoácidos básicos, como a lisina e arginina. Elas estão entre as proteínas mais básicas do núcleo, permitindo assim elas serem solubilizadas e extraídas a partir da adição de um ácido forte, como o H_2SO_4 ou HCl (SIDOLI *et al.*, 2016).

A extração de histonas foi realizada com o intuito de fornecer um controle positivo para a identificação de peptídeos contendo lisinas metiladas pelo domínio 3xMBT, visto que já foram descritos na literatura diversos sítios contendo esta modificação tanto em histonas de células humanas (Black *et al.*, 2013) quanto em histonas de *Trypanosoma cruzi* (Picchi *et al.*, 2017).

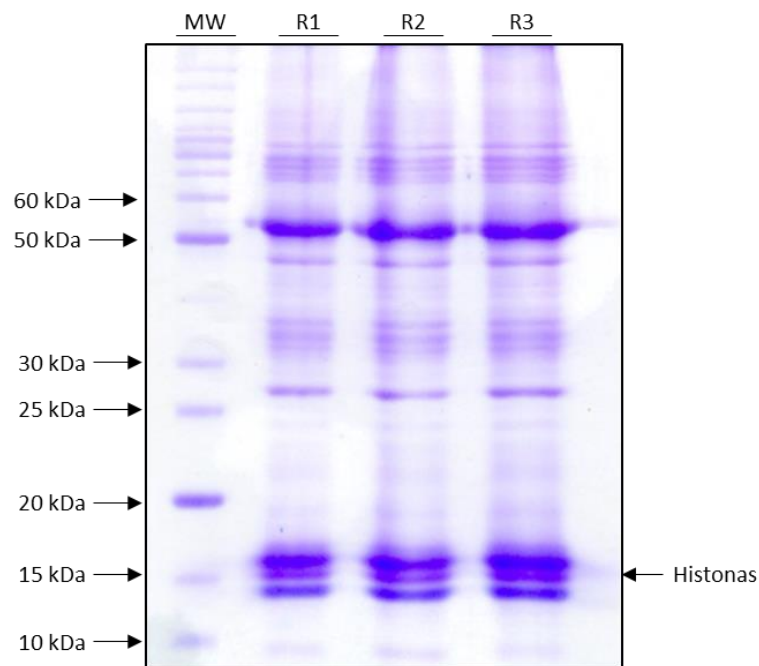


FIGURA 21 – RESULTADO DA EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS HISTONAS PROVENIENTES DE *Trypanosoma cruzi*. Gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após as etapas de enriquecimento de histonas. Foi utilizada a cepa Dm28c e o processo foi realizado em triplicatas. Foram observadas bandas na região entre 10 e 20 kDa correspondente a massa molecular esperada das histonas. *MW*: marcador de peso molecular; *R1-3*: Replicatas 1 a 3.

FONTE: O autor (2017)

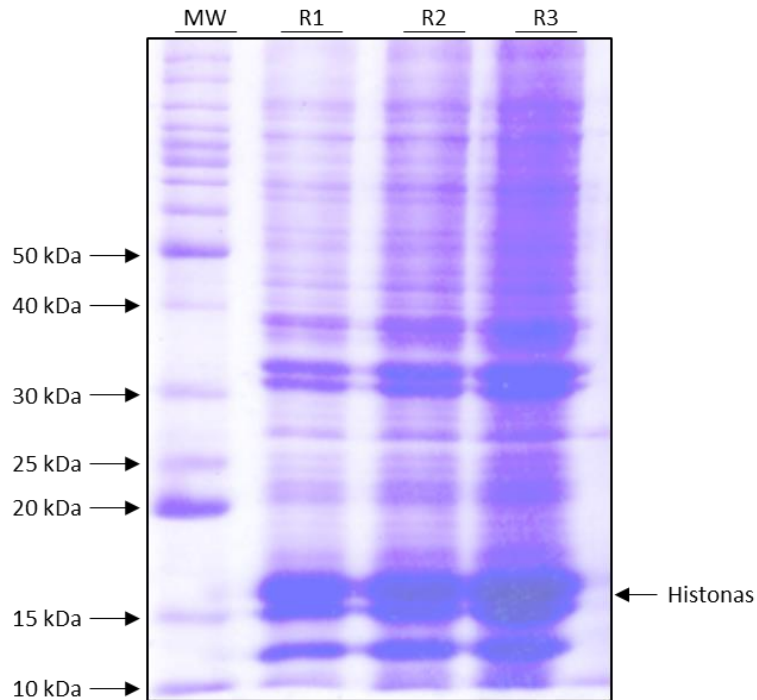


FIGURA 22 – RESULTADO DA EXTRAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS HISTONAS PROVENIENTES DE CÉLULAS HELA. Gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue R-250* realizado após as etapas de enriquecimento de histonas. Foi utilizada linhagem celular HeLa e o processo foi realizado em triplicatas. Foram observadas bandas na região entre 10 e 20 kDa correspondente a massa molecular esperada das histonas. MW: marcador de peso molecular; R1-3: Replicatas 1 a 3.
FONTE: O autor (2017)

Conforme demonstrado nas figuras 21 e 22, as amostras foram realmente enriquecidas, podendo ser observadas três bandas distintas e mais fortemente coradas, localizadas entre os marcadores de 10 e 20 kDa. Estas bandas provavelmente correspondem as histonas H4 (12 kDa), H2B (14 kDa) e H3 (15 kDa). Estes extratos enriquecidos foram então utilizados nos ensaios de Far-Western Blot descritos no item 4.15.

5.8 ENSAIO DE FAR-WESTERN BLOT PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO 3xMBT

As amostras provenientes da extração proteica total de células HeLa e das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, bem como as amostras enriquecidas de histonas de ambos os tipos celulares foram então submetidas a SDS-PAGE seguido de transferência a membrana de nitrocelulose. Foram aplicadas duas quantidades diferentes de material para verificar se haveria uma grande diferença no sinal encontrado e assim determinar qual a quantidade ideal para os próximos procedimentos. A membrana foi então incubada com o domínio 3xMBT e os anticorpos primário (anti-GST) e secundário (anti-Rabbit, acoplado a peroxidase).

O resultado pode ser visto na figura 23, onde há uma marcação de modo geral em todas as amostras aplicadas.

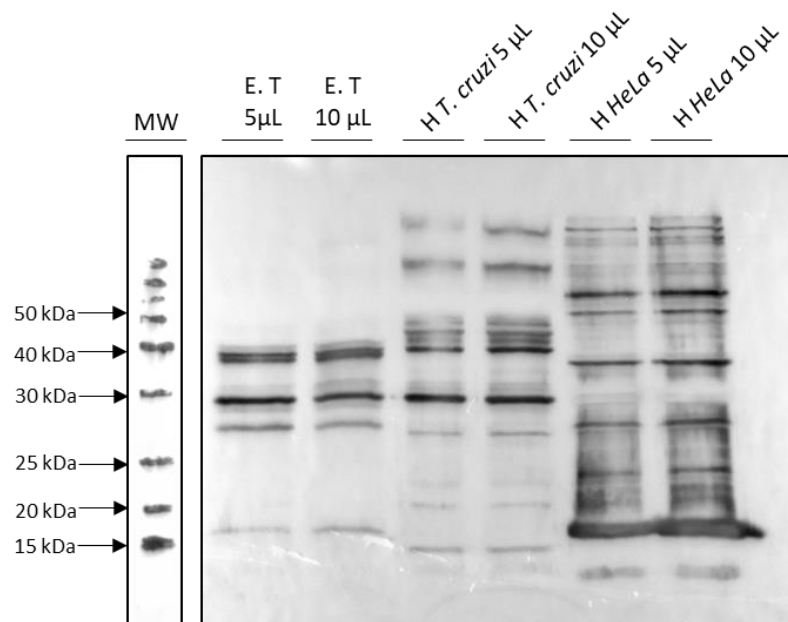


FIGURA 23 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CONTENDO LISINAS METILADAS PELO DOMÍNIO 3xMBT. Far Western Blot revelado a partir do método de quimiluminescência utilizando a peroxidase acoplada ao anticorpo secundário, tempo de exposição de 5 min. Incubação da membrana com o domínio 3xMBT (3 µg/mL), seguida de incubação com α -GST (1:10000) e α -Rabbit (1:10000). MW: marcador de peso molecular; E.T (5-10 µL): Extrato Total de *Trypanosoma cruzi*; H T. cruzi (5-10 µL): Enriquecimento de histonas de *Trypanosoma cruzi*; H HeLa (5-10 µL): Enriquecimento de histonas de células HeLa.

Existem marcações nas amostras de histonas de *T. cruzi*, embora em menor intensidade que o esperado na região de 10 a 20 kDa. Isto pode ocorrer pois as modificações pós-traducionais nestas proteínas são transientes e podem variar

grandemente dependendo do estado ou do estímulo nas células. Já nas histonas de células HeLa, há uma marcação muito forte na região de 15 kDa e uma marcação mais fraca logo abaixo, muito provavelmente correspondendo a histonas contendo lisinas metiladas. Houve também a marcação de outras proteínas nas amostras enriquecidas, demonstrando que há a presença desta modificação de maneira geral dentro do núcleo, visto que o processo de extração ácida não purifica especificamente histonas, mas enriquece proteínas básicas, as quais são encontradas em grandes quantidades no núcleo.

Também foram realizados os mesmos procedimentos com o controle negativo, 3xMBT-D355N, onde, como esperado, não houve o aparecimento de bandas após a revelação (dados não mostrados). Entretanto, a ausência de um controle positivo da técnica impossibilitou a afirmação de que aquela ausência de marcação era resultado da não ligação do 3xMBT-D355N e não de falhas nos procedimentos ou ausência total de proteínas transferidas a aquela membrana. Portanto, era necessário adicionar um controle que demonstrasse que os anticorpos utilizados estavam funcionando corretamente e que de fato havia ocorrido a transferência de proteínas para a membrana incubada com o 3xMBT-D355N. Para este controle, foi então utilizada a proteína GST, a qual indicaria a especificidade do anticorpo anti-GST e a presença de uma proteína conhecida na membrana incubado com o 3xMBT-D355N.

Após tentativas de reprodução falharem, foi necessário um aumento na concentração do anticorpo primário (anti-GST, 1:10000 para 1:5000) e do anticorpo secundário (anti-Rabbit, 1:10000 para 1:5000). Foram então repetidas as etapas de corrida eletroforética e transferência, com a diferença da adição do extrato proveniente da indução da GST em *Escherichia coli*. Os resultados apresentados na figura 24 (A) mostram novamente diversas marcações em todas as amostras transferidas. Vale ressaltar a marcação na região de 15 kDa nas amostras de histonas de HeLa, apontando para uma possível histona marcada. Podemos afirmar que estas marcações são específicas para lisinas metiladas devido a total ausência de bandas na membrana tratada com o 3xMBT-D355N, a banda clara marcada na altura esperada para a GST mostra que o anticorpo está reconhecendo especificamente áreas que contenham o domínio fusionado ou a GST superexpressa. Também é possível notar marcações no

extrato de GST que não são a GST propriamente dita, mostrando assim a presença de metilação em diversas proteínas de *Escherichia coli*.

Estranhamente, nas primeiras cinco amostras aplicadas, não há marcações na região abaixo de 26 kDa, isto pode ter ocorrido por problemas no momento da transferência ou pela ausência de proteínas contendo lisinas metiladas nesta região, sendo a primeira hipótese a mais provável, repetições são necessárias para definir quais as causas deste fenômeno.

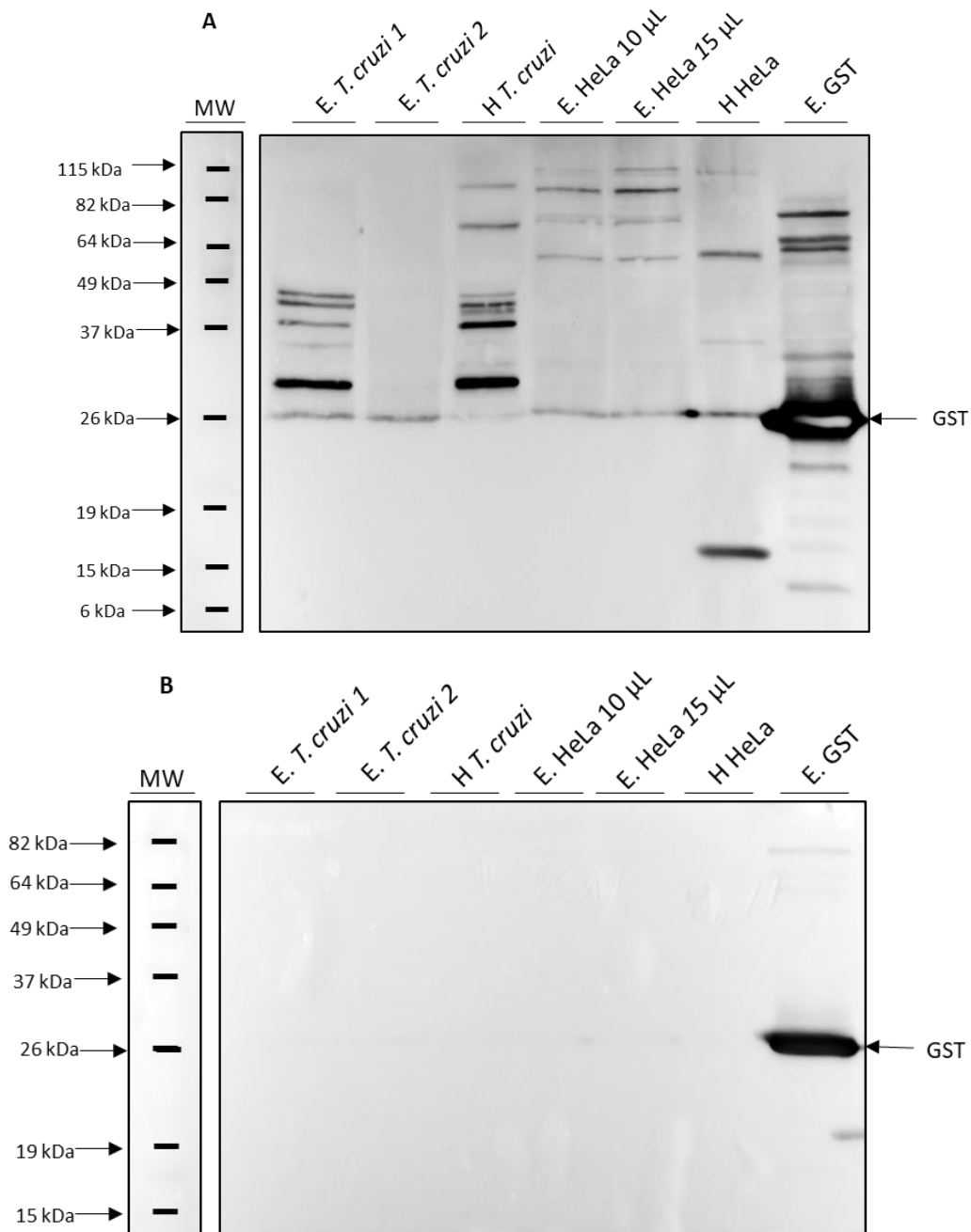


FIGURA 24 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CONTENDO LISINAS METILADAS PELO DOMÍNIO 3xMBT (A) e 3xMBT-D355N (B). Far Western Blot revelado a partir do método de quimiluminescência utilizando a peroxidase acoplada ao anticorpo secundário, tempo de exposição de 5 min. Incubação da membrana com o domínio 3xMBT (3 μ g/mL), seguida de incubação com α -GST (1:5000) e α -Rabbit (1:5000). MW: marcador de peso molecular; *E. T. cruzi* 1: Extrato Total de *Trypanosoma cruzi* realizado com Tampão NP-40; *E. T. cruzi* 2: Extrato Total de *Trypanosoma cruzi* realizado com Tampão C; H *T. cruzi*: Enriquecimento de histonas de *Trypanosoma cruzi*; *E. HeLa* (10-15 μ L): Extrato Total de células HeLa; H HeLa: Enriquecimento de histonas de células HeLa; *E. GST*: Extrato proveniente da indução da expressão de GST em BL 21 Star DE3 por 4h a 37 °C.

6. CONCLUSÕES

Os plasmídeos comerciais recebidos estavam íntegros e partiram para a etapa de transformação em cepas próprias para a expressão do gene de interesse.

Estas cepas foram, então, cultivadas e induzidas a expressar os domínios 3xMBT e 3xMBT-D355N. Os testes de expressão realizados determinaram que as melhores condições de cultivo foram: indução por 0,2 mM de IPTG, por 4h à 37 °C, otimizando assim o processo de produção da ferramenta.

Após determinar as melhores condições para realizar o teste de indução da expressão, também foram estabelecidos os protocolos de purificação. A purificação baseada em cromatografia de afinidade provou-se um bom método de purificação, retirando grande parte dos contaminantes.

As extrações de histonas ocorreram de forma satisfatória, produzindo amostras bem enriquecidas destas proteínas que foram utilizadas como um controle positivo nos ensaios de afinidade e especificidade do domínio 3xMBT.

O 3xMBT demonstrou ter afinidade e especificidade por proteínas que contenham sítios de lisina metilados, demonstrado a partir de ensaios de Far Western Blot, onde o seu controle negativo, o domínio 3xMBT-D355N não apresentou as mesmas características, verificado através da ausência de marcações na membrana incubada com o domínio mutado. Embora haja grandes indicativos de que estas marcações sejam específicas para lisinas metilada, esses resultados devem ser ainda confirmados através de outras técnicas mais sensíveis e específicas, como análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

7. PERSPECTIVAS

Após a conclusão dos testes de afinidade e especificidade do domínio 3xMBT através do Far Western Blot, as perspectivas do trabalho são, inicialmente, a padronização e a utilização do 3xMBT-GST purificado para enriquecer proteínas e/ou peptídeos metilados em lisinas extraídos do *Trypanosoma cruzi*, através de ensaios de *pull-down*. Após padronização das etapas de enriquecimento, visamos identificar os sítios de metil-lisina contidos nas proteínas e/ou peptídeos enriquecidos e, por fim, avaliar a eficiência de enriquecimento do domínio 3xMBT.

Em última instância, a utilização desta ferramenta abre espaço para a aquisição de informações sobre a função da metilação em *T. cruzi*, algo que apenas recentemente tem sido investigado. O 3xMBT poderá auxiliar na elucidação dos mecanismos e principalmente determinar quando e onde ocorre esta modificação pós-traducional. Após compreendermos o papel da metilação neste organismo, podemos explorar o quanto elas são importantes para sua sobrevivência e na aquisição de infectividade pelo parasito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFJEHI-SADAT, L.; GARCIA, B. A. Comprehending dynamic protein methylation with mass spectrometry. **Curr Opin Chem Biol.** vol. 17(1), p. 12–19, 2013.
2. ALBERTS, B. JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell.** 6ª Edição. Garland Science, 2014.
3. ALMEIDA, R. F. **Caracterização do metilproteoma de *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia – Instituto Carlos Chagas, Curitiba, 2017.
4. AMBLER, R. P.; REES, M. W. e-N-methyl-lysine in bacterial flagellar protein. **Nature.** Vol. 184, p. 56–57, 1959.
5. BANNISTER, A. J.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J. F.; MISKA, E.A.; THOMAS J.O.; ALLSHIRE R. C.; KOUZARIDES T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature.** vol. 410, p. 120-4, 2001.
6. BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine.** p 456-66. 2015.
7. BIGGAR, K. K.; LI, S. S. C. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** vol. 16, p. 5–17, 2015.
8. BLACK, J. C.; VAN RECHEM, C.; WHETSTINE, J. R. Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. **Mol Cell.** vol. 48, 2012.
9. BRENER, Z.; ANDRADE, Z. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.** 2ª Edição, São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.
10. CAO, R.; ZHANG, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. **Mol Cell.** vol. 15(1), p. 57-67, 2004.
11. CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) - Biology.** 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> Acesso em 10 junho 2017.
12. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. vol. 1, n. 2, p. 159-256, 1909.

13. CHRISTOPHER, T. WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. JR. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. **Angew. Chem. Int. Ed.** vol. 44, p. 7342 – 7372, 2005.
14. CLOOS, P. A.; CHRISTENSEN, J.; AGGER, K.; HELIN, K. Erasing the methyl mark: Histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. **Genes and Development**, v. 22, n. 9, p. 1115–1140, 2008.
15. DE GODOY, L. M. F. et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics*, p. 2694–2703, 2012.
16. DE OLIVEIRA, R. B.; TRONCON, L. E.; DANTAS, R. O.; MENGHELLI, U. G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterology**. vol. 93, p. 884-9, 1998.
17. DE SOUZA, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. vol. 94, p. 89-100, 1999.
18. DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res**; vol. 88 (12):101325, 2012.
19. DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. vol. 104, p. 89-100, 2009.
20. HAMAMOTO, R.; SALOURA, V.; NAKAMURA, Y. Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**. vol.15, p. 110–124, 2015.
21. HOYA-ARIAS, R.; TOMISHIMA, M.; PERNA, F.; VOZA, F.; NIMER, S. D. L3MBTL1 Deficiency Directs the Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Trophectoderm. **Stem Cells Dev**. vol. 20(11), p. 1889-900, 2011.
22. KHOURY, G. A.; BALIBAN, R. C.; FLOUDAS, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. **Scientific Reports**. vol. 1, Article number: 90, 2011.
23. KLOTZ, J. H.; DORN, P. L.; LOGAN, J. L.; STEVENS, L.; PINNAS, J. L.; SCHMIDT, J. O.; KLOTZ, S. A. Kissing bugs: potential disease vectors and cause of anaphylaxis. **Clinical Infectious Diseases**. vol. 50 (12), p. 1629–34, 2010.
24. LANOUILLE, S.; MONGEON, V.; FIGEYS, D.; COUTURE, J. The functional diversity of protein lysine methylation. **Mol Syst Biol**. vol. 10, 2014.
25. LARSEN, M. R.; TRELLE, M. B.; THINGHOLM, T. E.; JENSEN, O. N. Modification-Specific Proteomics: Characterization of Post-Translational Modifications by Mass

- Spectrometry. Jensen, Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **Biotechniques**. vol. 40(6), p. 790-8, 2006.
26. LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. "Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells". **Journal of Experimental Medicine**. vol. 168 (2), p. 649–59, 1988.
 27. LI, H.; FISCHLE, W.; WANG, W.; DUNCAN, E. M.; LIANG, L.; MURAKAMI-ISHIBE, S.; ALLIS, C. D.; PATEL, D. J. Structural Basis for Lower Lysine Methylation State-Specific Readout by MBT Repeats of L3MBTL1 and an Engineered PHD Finger. **Mol Cell**. vol. 28(4), p. 677-91, 2007.
 28. LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E.; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. **Trends Parasitol**. vol. 21, p. 363-9, 2005.
 29. LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T.; DIAS, F. A.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, G. C.; ZIMMERMANN, L. T.; SILVA, T. L. A.; VERMELHO, A. B. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**. vol. 4, p. 30-59, 2010.
 30. MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**. vol. 115 (9), p. 1109–23, 2007.
 31. MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**. vol. 6(11), p. 838-49, 2005.
 32. MIN, J.; ALLALI-HASSANI, A.; NADY, N.; QI, C.; OUYANG, H.; LIU, Y.; MACKENZIE, F.; VEDADI, M.; ARROWSMITH, C. H. L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. **Nat Struct Mol Biol**. vol. 14(12), p. 1229-30, 2007.
 33. MOORE, K. E.; CARLSON, S. M.; CAMP, N. D.; CHEUNG, P.; JAMES, R. G.; CHUA, K. F.; WOLF-YADLIN, A.; GOZANI, O. A General Molecular Affinity Strategy for Global Detection and Proteomic Analysis of Lysine Methylation. **Mol Cell**. vol. 50(3), p. 444-56, 2013.
 34. MURRAY, K. The occurrence of e-N-methyl lysine in histones. **Biochemistry**. vol. 3, p. 10–15, 1964.
 35. NADY, N.; KRICHEVSKY, L.; ZHONG, N.; DUAN, S.; TEMPEL, W.; AMAYA, M. F.; RAVICHANDRAN, M.; ARROWSMITH, C. H. Histone Recognition by Human Malignant Brain Tumor Domains. **J Mol Biol**. vol. 423(5), p. 702-18, 2012.
 36. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6ª Edição. W.H. Freeman, 2012.

37. NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA, R. W. **Parasitologia Humana**. 13ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.
38. PAIK, W. K.; PAIK D. C.; KIM, S. Historical review: the field of protein methylation. **Trends Biochem Sci**. vol. 32(3), p.146-52, 2007.
39. PARK, W.; VAEZI, M. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. **American Journal of Gastroenterology**. vol. 100 (6), p. 1404–1414, 2005.
40. PICCHI, G. F.; ZULKIEVICZ, V.; KRIEGER, M. A.; ZANCHIN, N. T.; GOLDENBERG, S.; DE GODOY, L. M. Post-translational Modifications of Trypanosoma cruzi Canonical and Variant Histones. **J Proteome Res**. vol. 3;16(3), p. 1167-1179, 2017.
41. PLATH, K.; FANG, J.; MLYNARCZYK-EVANS S. K.; CAO, R.; WORRINGER, K.A.; WANG, H.; DE LA CRUZ, C.C.; OTTE, A.P.; PANNING, B.; ZHANG, Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. **Science**. vol. 300, p. 131–135, 2003.
42. PRATT, D. V.; G. VOET, J. G.; CHARLOTTE, W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level**. 2ª edição. Hoboken, NJ, EUA: Wiley, 2006.
43. RASSI, A. JR.; RASSI A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**. vol. 375, p. 1388- 402, 2010.
44. RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, vol. 26, p. 275-91, 2012.
45. SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Trop**.110:88100, 2009.
46. SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**. vol. 49, p. 117-143, 1995.
47. SHI Y.; LAN F.; MATSON C.; MULLIGAN P.; WHETSTINE J. R.; COLE P. A.; CASERO R. A.; SHI Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**. vol. 119(7), p. 941-53, 2004.
48. SIDOLI, S.; BHANU, N. V.; KARCH, K. R.; WANG, X.; GARCIA, B, A. Complete Workflow for Analysis of Histone Post-translational Modifications Using Bottom-up Mass Spectrometry: From Histone Extraction to Data Analysis. **J. Vis. Exp.** (111), 2016.

49. SIMS III, R. J.; NISHIOKA, K.; REINBERG, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. **Trends in Genetics**. vol. 19, n. 11, p. 629-639, 2003.
50. STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. 6ª Edição. W.H. Freeman, 2006.
51. TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis, Chagas' Disease: One Hundred Years of Research**. 2ª Edição. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2017.
52. WALSH, C. **Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory**. Englewood, CO: Roberts and Co. Publishers, 2006.
53. WHO (*World Health Organization*). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 10 junho 2017.
54. YAP, K. L.; ZHOU, M. Keeping It in the Family: Diverse Histone Recognition by Conserved Structural Folds. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. vol. 45(6), p. 488–505, 2010.
55. ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation: beyond histones. **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai. vol. 44(1), p. 14-27, 2012.