

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANNA CESARO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA RIBONUCLEASE RRP44
DE *Trypanosoma brucei***

CURITIBA

2018

GIOVANNA CESARO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRURAL DA RIBONUCLEASE RRP44 DE
*Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof(a). Dra. Beatriz Gomes Guimaraes

Co-orientadora: Dra. Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Cesaro, Giovanna

Caracterização funcional e estrutural da ribonuclease RRP44 de
Trypanosoma brucei. / Giovanna Cesaro. – Curitiba, 2018.
90 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Beatriz Gomes Guimaraes

Co-orientadora: Flávia Raquel Gonçalves Carneiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. Ribonucleases. I. Título II. Guimaraes, Beatriz
Gomes. III. Carneiro, Flávia Raquel Gonçalves. IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.873283



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GIOVANNA CESARO** intitulada: **Caracterização funcional e estrutural da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2018.

BEATRIZ GOMES GUIMARAES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

WANDERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Interno (UFPR)

DANIELA PARADA PAVONI
Avaliador Externo (ICC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da Vida e da evolução e por poder estar sendo útil à sociedade.

Às minhas orientadoras, Beatriz e Flávia, pelos ensinamentos a mim passados e ao Nilson que também me auxiliou nesses dois anos. Agradeço em especial à Beatriz pela paciência e resignação em me ensinar cristalografia.

Aos meus colegas de LPEP pela cumplicidade e companheirismo nesses últimos anos, sem vocês meus dias não seriam os mesmos.

Aos meus pais por todo apoio moral e pelos exemplos de dedicação, paciência e resignação, sem os quais não tornariam esse trabalho possível.

Ao Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR por permitir a realização dos meus experimentos em suas instalações.

À CAPES pela bolsa durante esses dois anos.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) pela oportunidade a mim confiada.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

(Marie Curie)

RESUMO

Os tripanossomatídeos, grupo de protozoários ao qual pertencem os agentes causadores de várias doenças em humanos, como a doença do sono e a doença de Chagas, apresentam muitas diferenças ao nível molecular em relação aos demais eucariotos. No que diz respeito à estrutura dos ribossomos, enquanto nos demais eucariotos a subunidade 60S é formada por três moléculas de RNA (5S, 5.8S e 25S/28S), em tripanossomatídeos a subunidade 60S contém oito RNAs. Isto porque nestes organismos a molécula correspondente ao RNA de 25S/28S é dividida em seis segmentos. Tais diferenças estruturais indicam diferenças no processo de maturação do RNA ribossomal (rRNA), que resulta na excisão de sete sequências espaçadoras internas do precursor do rRNA. Entretanto, poucas endo e exonucleases envolvidas no processo de maturação do rRNA em tripanossomatídeos foram identificadas e caracterizadas.

O exossomo é um complexo proteico formado por 11 proteínas, responsável pela degradação e processamento de diversos tipos de RNA, entre eles os rRNA. Das onze proteínas, apenas duas apresentam atividade catalítica, a RRP44 e RRP6. A RRP44 é uma proteína que apresenta atividade endo e exonucleolítica, e está envolvida, entre outros processos, na maturação do rRNA.

O projeto tem como objetivo caracterizar funcionalmente e estruturalmente a proteína RRP44 de *Trypanosoma brucei*. A proteína e duas variantes contendo os sítios ativos endo e exonucleolítico (TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1, respectivamente) foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia. A estrutura cristalográfica de TbRRP44_NPIN foi determinada a 2,3 Å de resolução e permitiu a análise de seu sítio catalítico e comparação com a estrutura da proteína homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*. Tal comparação revelou diferenças na região do sítio ativo, com a identificação de um segundo domínio de ligação a zinco, bem como diferenças estruturais que podem indicar as bases moleculares para a não associação, em tripanossomatídeos, da proteína RRP44 ao complexo exossomo.

Para a análise funcional foram produzidas células *knockdown* de *T. brucei* para a RRP44, através do mecanismo de RNA de interferência. A análise da taxa de proliferação celular mostrou que a proteína TbRRP44 é essencial para sobrevivência do parasita. Análises da integridade e abundância das subunidades 40S, 60S, 80S e

polissomos através de sedimentação em gradiente de sacarose mostraram alterações significativas no perfil das subunidades nas células deficientes em RRP44, indicando um efeito de sua depleção na formação dos ribossomos. Além disso, a análise do processamento do pré-RNA ribossomal através de qPCR indica que a TbRRP4 atua na etapa inicial da maturação do precursor da subunidade maior (LSU), provavelmente na separação do precursor do 5.8S dos demais precursores da LSU.

Palavras-chave: *Trypanosoma brucei*; maturação do rRNA; ribonuclease; RRP44; estrutura cristalográfica.

ABSTRACT

Trypanosomatids form a group of protozoan, which includes the causative agents of a number of serious diseases in humans, such as the sleeping sickness and Chagas disease. These parasites present unique features compared with other eukaryotes, for instance, Trypanosoma ribosomes contain specific RNA expansions and the 60S subunit is composed of eight RNA molecules instead of the three (5S, 5.8S and 25S/28S) found in other eukaryotes. The molecule corresponding to the rRNA 25S/28S is divided in six segments. These structural differences indicate differences in the ribosomal RNA (rRNA) maturation process, which results in the excision of seven internal spacers from the rRNA precursor. However the role of specific endo and exonucleases involved in Trypanosomatids rRNA maturation remains largely unknown.

The exosome is a complex formed by eleven proteins and involved in several pathways related to RNA processing and degradation, including rRNA processing. Among the eleven subunits of the complex, two proteins present catalytic activity, Rrp44 and Rrp6. Rrp44 presents endo and exonuclease activities, and has been related to a specific step of the rRNA maturation.

The objective of the project is to perform structural and functional characterization of RRP44 from *Trypanosoma brucei*. Full-length TbRRP44 and two variants including the endo and the exonuclease domains (TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1, respectively) were overexpressed in *Escherichia coli* and purified by chromatographic methods. The crystal structure of the TbRRP44_NPIN was determined at 2.3 Å resolution and allowed the detailed analysis of the catalytic site and the structural comparison with the orthologue from *Saccharomyces cerevisiae*. The structural analysis revealed a specific metal binding site in the neighborhood of the catalytic site and additional structural differences that could explain the lack of interaction of RRP44 with the exosome complex, previously reported in Trypanosomatids.

T. brucei knockdown cells for RRP44 were generated using RNA interference (RNAi) to perform phenotypic characterization. Proliferation curves confirmed that RRP44 is essential for the parasite survival. Moreover, analysis of 40S, 60S, 80S

subunits and polysomes by sucrose gradient sedimentation showed remarkable differences between knockdown and control cells and analysis of the pre-rRNA processing intermediates by qPCR suggest that TbRRP44 has a role in the initial step of the ribosome large subunit (LSU) maturation, probably in the separation of the 7S from the other rRNA LSU intermediates.

Key-words: *Trypanosoma brucei*; rRNA processing; ribonuclease; RRP44; Crystallographic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das etapas do processamento do RNA ribossomal em leveduras.....	26
Figura 2 – Representação esquemática das etapas da maturação do RNA ribossomal de <i>T. brucei</i>	27
Figura 3 - Representação da estrutura do ribossomo de <i>T. brucei</i> determinada por criomicroscopia eletrônica.....	28
Figura 4 – Representação da estrutura cristalográfica dos exossomos de levedura nuclear (A, código PDB: 5c0w) e citoplasmático (B, código PDB: 5jea).....	30
Figura 5 - Representação da estrutura tridimensional da Rrp44 de levedura (PDB: 5c0w) mostrando seus domínios.....	31
Figura 6 - Representação esquemática do exossomo de levedura mostrando diferentes mecanismos do processamento de RNA pela Rrp44.....	32
Figura 7 – Esquema das construções da TbRRP44 desenhadas nesse trabalho.....	34
Figura 8 – Análise dos testes de expressão das variantes TbRRP44_NPIN (24,8 kDa) e TbRRP44_PIN (19 kDa) em SDS-PAGE.....	49
Figura 9 – Análise do teste de expressão da variante TbRRP44_CSD1-S1 (84,6 kDa) em SDS-PAGE.....	50
Figura 10 – Análise do teste de expressão das variantes TbRRP44_RNB (48,6 kDa) e TbRRP44 (110 kDa) em SDS-PAGE.....	50
Figura 11 - Resultados da cromatografia de afinidade da variante TbRRP44_CSD1-S1.....	52
Figura 12 - Resultados da cromatografia de troca iônica da variante TbRRP44_CSD1-S1.....	53
Figura 13 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da variante TbRRP44_CSD1-S1 em coluna Superdex 200 16/60.....	53
Figura 14 - Resultados da cromatografia por afinidade a níquel da TbRRP44.....	54
Figura 15 - Resultados da cromatografia de troca iônica da TbRRP44.....	54
Figura 16 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da TbRRP44 em coluna Superdex 200 16/60.....	55
Figura 17 - Resultados da cromatografia de afinidade da variante TbRRP44_NPIN.....	56
Figura 18 - Resultados da cromatografia de troca iônica da variante TbRRP44_NPIN.....	56

Figura 19 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da variante TbRRP44_NPIN em Superdex 75 16/60.....	57
Figura 20 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes aos picos de eluição 2, 3 e 4 da cromatografia por troca iônica.....	58
Figura 21 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 2 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl ₂	58
Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 3 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl ₂	59
Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 4 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl ₂	59
Figura 24 – Análise da desnaturação térmica de TbRRP44_NPIN.....	60
Figura 25 – A: Cristais da TbRRP44 obtido na condição E8 do kit JCSG. B: Cristais de TbRRP44_NPIN de forma hexagonal observados na condição B10 do kit Pact Premier.....	61
Figura 26 - Cristais de TbRRP44_NPIN obtidos após refinamento com PEG 3350....	61
Figura 27 – Modelo inicial de TbRRP44_NPIN construído pelo programa Buccaneer..	63
Figura 28 - Motivo de ligação a zinco CR3 em TbRRP44.....	64
Figura 29 - Segundo sítio de ligação a zinco presente na estrutura de TbRRP44 entre os aminoácidos H69, N70 e H175.....	64
Figura 30 – Presença de Mn no sítio ativo do monômero B.....	65
Figura 31 - Sobreposição dos seis monômeros de TbRRP44_NPIN presentes na unidade assimétrica e identificação das estruturas secundárias.....	67
Figura 32 – Representação do sítio catalítico do domínio PIN de TbRRP44.....	68
Figura 33 – Representação do segundo sítio de ligação a zinco identificado de TbRRP44. As esferas em cinza representam os íons de Mg e em amarelo é representado o Zn.....	68
Figura 34 – Sobreposição dos domínios PIN de TbRRP44 e ScRrp44 nas duas conformações.....	69
Figura 35 - Sobreposição do domínio PIN de TbRRP44 com as estruturas de ScRrp44 nas duas conformações.....	70

Figura 36 – Comparação entre o sitio ativo de TbRRP44 e ScRrp44.....	70
Figura 37 - Sobreposição da estrutura do domínio PIN de TbRRP44 (azul) e VapC (salmão).....	71
Figura 38 – Comparação entre a interface de interação do domínio PIN de ScRrp44 na conformação 1 com a estrutura do domínio PIN de TbRRP44.....	72
Figura 39 - Comparação entre a interface de interação do domínio PIN de ScRrp44 na conformação 2 com a estrutura do domínio PIN de TbRRP44.....	73
Figura 40 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína RRP44 utilizando-se o programa Clustal Muscle.....	74
Figura 41 - Curvas de proliferação de <i>T. brucei</i> 29-13.....	75
Figura 42 - Western blot utilizando soro imunizado contra a proteína TbRRP44 para verificação dos seus níveis de expressão após indução do RNAi.....	76
Figura 43 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil de subunidades ribossomais após 48 horas de indução do RNAi para TbRRP44.....	77
Figura 44 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil de subunidades ribossomais após 72 horas de indução do RNAi para TbRRP44.....	77
Figura 45 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil das subunidades ribossomais das células de <i>T. brucei</i> em privação de nutrientes....	78
Figura 46 - Análise das amostras de RNA por Bioanalyzer. M: Marcador de peso molecular de RNA, em verde está o marcador de RNA que atua como controle positivo do experimento.....	80
Figura 47 - Precursores do RNA ribossomal de <i>T. brucei</i>	82
Figura 48 - Análise do processamento do pré-rRNA qPCR (cálculo pelo método de Pfaffl), utilizando GAPDH como normalizador.....	83
Figura 49 - Análise do processamento do pré-rRNA qPCR (cálculo pelo método de Pfaffl), utilizando α -Actina como normalizador.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DESENHADOS PARA OS EXPERIMENTOS DE qPCR.....	48
TABELA 2 – ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	62
TABELA 3 – ESTATÍSTICA DO REFINAMENTO.....	66
TABELA 4 – EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS TESTADOS PARA qPCR.....	79

LISTA DE SIGLAS

CD – Dicroísmo Circular

CSD – do inglês Cold Shock Domain

DO – Densidade Ótica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ETS – Região Espaçadora Externa

IPTG – do inglês Isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside

ITS – Região Espaçadora Interna

LSU – do inglês Large Subunit

PEG – Polietilenoglicol

PIN – do inglês PiT N-terminus

PMSF – do inglês Phenylmethylsulfonyl fluoride

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

RMSD – do inglês Root Mean Square Deviation

RNAi – RNA de Interferência

SDS-PAGE – do inglês PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

srRNA (SR) – do inglês Small Ribosomal RNA

SSU – do inglês Small Subunit

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	18
1.2	OBJETIVOS.....	19
1.2.1	Objetivo Geral.....	19
1.2.2	Objetivos Específicos.....	19
1.3	METODOLOGIA.....	19
1.3.1	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes.....	19
1.3.2	Caracterização Estrutural.....	20
1.3.2.1	Dicroísmo Circular.....	20
1.3.2.2	Cristalografia.....	21
1.3.3	Produção e Caracterização Fenotípica das Células <i>knockdown</i>	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	SÍNTESE DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	23
2.2	SÍNTESE DE RIBOSSOMOS.....	24
2.3	COMPLEXO EXOSSOMO E A PROTEÍNA RRP44.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	33
3.1.1	Teste de Expressão.....	33
3.1.2	Expressão da Proteína TbRRP44 e Variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1.....	35
3.2	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E VARIANTES TbRRP44_NPIN E TbRRP44_CSD1-S1.....	36
3.3	ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E VARIANTE TbRRP44_NPIN.....	37
3.4	DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA.....	38
3.5	CARACTERIZAÇÃO DA VARIANTE TbRRP44_NPIN POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	39
3.6	CONSTRUÇÃO DAS CÉLULAS KNOCKDOWN DE <i>T. brucei</i> PARA RRP44.....	39
3.6.1	Western blot.....	40
3.7	ANÁLISE DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	41
3.8	ANÁLISE DAS SUBUNIDADES 40S, 60S, 80S E POLISSOMOS.....	42
3.8.1	Sedimentação de Polissomos em Gradiente de Sacarose.....	42

3.8.2	Análise das Frações do Gradiente por Espectrometria de Massas.....	43
3.9	ANÁLISE DO PROCESSAMENTO DO PRÉ-RNA RIBOSSOMAL POR PCR EM TEMPO REAL.....	45
3.9.1	Extração do RNA e Obtenção do cDNA.....	45
3.9.2	Testes de Eficiência dos Oligonucleotídeos.....	46
3.9.3	Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	EXPRESSÃO DA TbRRP44 E VARIANTES TbRRP44_NPIN E TbRRP44_CSD1-S1.....	49
4.2	PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	51
4.2.1	Expressão e Purificação da Variante TbRRP44_CSD1-S1.....	51
4.2.2	Expressão e Purificação da TbRRP44.....	53
4.2.3	Expressão e Purificação da Variante TbRRP44_NPIN.....	55
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA VARIANTE TbRRP44_NPIN POR DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	57
4.4	CRISTALIZAÇÃO DE TbRRP44 E TbRRP44_NPIN.....	60
4.5	PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA VARIANTE TbRRP44_NPIN.....	62
4.6	ANÁLISES ESTRUTURAIS.....	66
4.7	ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> PARA TbRRP44.....	75
4.7.1	Análise da Taxa de Proliferação Celular.....	75
4.7.2	Confirmação da Depleção de TbRRP44 por Western blot.....	76
4.7.3	Análise das Subunidades 40S, 60S, 80S e Polissomos.....	76
4.7.4	Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal.....	79
4.7.4.1	Análise da Qualidade do RNA por Bioanalyzer.....	79
4.7.4.2	Eficiência dos Pares de Oligonucleotídeos.....	80
4.7.4.3	Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal.....	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
5.1	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Alguns protozoários da família Trypanosomatidae são os agentes causadores de várias doenças que afetam tanto humanos quanto animais, como a doença do sono, doença de Chagas e leishmaniose, cujos causadores são o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* ssp., respectivamente. No processo evolutivo dos eucariotos, os tripanossomatídeos formam um grupo divergente e apresentam algumas diferenças importantes em seus mecanismos moleculares, como a disposição da maioria dos RNAs em forma policistrônica, a regulação da expressão gênica pós-transcricional e o processamento das moléculas precursoras do RNA para formação do ribossomo (HERNÁNDEZ; CEVALLOS, 2014; SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006).

Os ribossomos são complexos responsáveis por fazer a tradução de moléculas de mRNA em proteínas. Esses são formados por duas subunidades: em eucariotos, a subunidade maior (LSU) é composta pelas formas maduras de RNAs ribossomais 5S, 5.8S e 25S/28S e 46 proteínas (em levedura), enquanto a subunidade menor (SSU) é composta pela forma madura 18S do rRNA além de 33 proteínas (em levedura). A biogênese do ribossomo é um processo complexo, que demanda um alto gasto energético, e que ainda não foi totalmente elucidado. A síntese dos ribossomos começa com transcrição de várias cópias do rDNA pelas RNA polimerases I e III produzindo as moléculas precursoras de rRNA. A RNA polimerase I é responsável pela síntese em um grande segmento policistrônico de RNAs que darão origem às formas maduras 18S, 5.8S e 25S/28S, enquanto a RNA polimerase III é responsável pela síntese do rRNA 5S (WILSON; CATE, 2012; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

As moléculas precursoras do RNA ribossomal passam por várias etapas de maturação para a excisão de espaçadores internos e externos (ITS e ETS, respectivamente). Em tripanossomatídeos, a maneira como os rRNAs estão dispostos e como o processamento para formação do ribossomo é feito são bastante diferentes em relação aos outros eucariotos. Nesses organismos, o rRNA da subunidade maior correspondente ao 28S/25S dos demais eucariotos é dividido em 6 fragmentos e a molécula precursora do rRNA possui 7 regiões ITS ao contrário de 3 nos demais eucariotos (HERNANDEZ; CEVALLOS, 2014).

O complexo proteico exossomo atua no processamento e degradação de diversos tipos de RNA. Tal complexo é responsável por degradar os RNAs produzidos

incorretamente e em excesso, e atua na maturação do RNA ribossomal, sendo o principal complexo de degradação de RNA no sentido 3' – 5'. O exossomo foi caracterizado em vários eucariotos, está presente tanto no núcleo da célula quanto no citoplasma, é composto por nove proteínas que formam o chamado Exo-9 sem atividade catalítica, além das duas subunidades catalíticas RRP44 e RRP6 (revisão em JANUSZYK; LIMA, 2014).

A proteína Rrp44 caracterizada em leveduras possui homologia com uma enzima da família RNase II, a RNase R de *Escherichia coli*, uma exonuclease 3' – 5' (LORENTZEN et al., 2008). A proteína também possui um domínio denominado PIN que possui atividade de endonuclease na presença de íons de manganês (SCHAEFFER et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009).

O complexo exossomo foi também identificado em tripanossomatídeos, entretanto estudos mostraram que a subunidade RRP44 não estaria associada ao complexo (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001), o que sugere que tal enzima poderia estar envolvida em outras vias de processamento de RNA não associadas ao exossomo.

1.1 JUSTIFICATIVA

A biogênese do ribossomo é uma etapa extremamente complexa e de grande importância para a célula, pois sem a síntese de proteínas a célula não é capaz de sobreviver. A maneira como a síntese do ribossomo ocorre ainda não foi totalmente elucidada principalmente em relação às clivagens endo e exonucleolíticas para a maturação do RNA ribossomal. Por isso o estudo da proteína RRP44 é de extrema importância para uma maior compreensão desse processo. Além disso, no que diz respeito à maturação do rRNA de tripanossomatídeos, que é diferente dos demais eucariotos, o estudo se torna ainda mais importante, pois a caracterização funcional da RRP44 pode contribuir para a elucidação de etapas do processamento ainda não conhecidas. Ainda, a caracterização de RRP44 de *T. brucei* por cristalografia permitirá sua comparação com a proteína ortóloga de leveduras e análise de possíveis diferenças estruturais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo a caracterização estrutural e funcional da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Expressão da proteína recombinante e de variantes contendo seus domínios estruturais e purificação por métodos cromatográficos;
- b) Caracterização por dicroísmo circular;
- c) Cristalização, determinação e análise da estrutura cristalográfica;
- d) Caracterização fenotípica de células *knockdown* de *T. brucei* deficientes em RRP44, obtidas pela técnica de RNA de interferência, através da análise:
 - i) da taxa de proliferação celular;
 - ii) da integridade e abundância de 40S, 60S, 80S e polissomos através de sedimentação de polissomos em gradiente de sacarose;
 - iii) do padrão de processamento do pré-rRNA através de qPCR.

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

A proteína de interesse e suas variantes foram expressas de forma recombinante em sistema bacteriano. O sistema utilizado foi baseado nos vetores da série pET (pET28) em *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) (STUDIER; MOFFATT, 1986).

Para a obtenção das proteínas foram realizadas três etapas de purificação, primeiramente por cromatografia de afinidade a níquel, então por troca iônica e por último uma cromatografia de exclusão por tamanho.

A cromatografia de afinidade com metal imobilizado possui, como o próprio nome diz, um metal imobilizado na matriz da coluna como zinco, cobre ou níquel.

Alguns aminoácidos como a histidina possuem afinidade por metais. As proteínas recombinantes podem ser fusionadas com sequências dos aminoácidos citados acima e durante a purificação, quando a amostra passa pela coluna, as proteínas com as fusões se ligam aos metais e ficam presas à coluna. Compostos como o imidazol, que também possui afinidade por metais, são utilizados como competidores pelos sítios de ligação, promovendo assim a remoção das proteínas da matriz. A proteína é então eluída da coluna (CHEUNG; WONG; NG, 2012).

O princípio da troca iônica se baseia na atração entre cargas diferentes da amostra e da coluna. As proteínas apresentam cargas de acordo com os resíduos que possuem e o pH do tampão em que estão presentes. A proteína interage com a matriz da coluna, que pode ser tanto aniônica quanto catiônica, se ligando a ela, então a proteína é eluída com um tampão contendo sal em concentração suficiente para competir com a proteína pela matriz da coluna (SELKIRK, 2004).

A cromatografia de exclusão por tamanho molecular (size exclusion chromatography, SEC) tem como princípio a filtração, em que uma matriz com microesferas de tamanhos específicos separa a proteína por tamanho ou forma. O tamanho dos poros da matriz determina a capacidade de separação da resina. As moléculas maiores não “entram” nesses poros, por isso são eluídas antes, enquanto as moléculas pequenas ficam retidas na matriz e são eluídas com maiores volumes de tampão (FISCHER, 2006).

Os resultados da expressão e purificação das proteínas são verificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

1.3.2 Caracterização Estrutural

1.3.2.1 Dicroísmo Circular

A proteína purificada foi utilizada em experimentos de Dicroísmo Circular, o qual consiste na medida da diferença de absorção, por parte da amostra, dos componentes da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda em função do comprimento de onda. Os espectros obtidos são comparados a padrões específicos característicos da composição estrutural das proteínas, fornecendo informações a respeito do enovelamento, conteúdo de estrutura secundária e estabilidade da proteína (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

1.3.2.2 Cristalografia

A cristalografia de raios X permite a determinação da estrutura tridimensional de proteínas em nível atômico e, com isso, a análise detalhada de mecanismos, interações com ligantes e o estudo da relação estrutura-função de proteínas. A técnica baseia-se na difração dos raios X por monocristais da proteína de interesse. Os padrões de difração gerados, característicos de cada cristal, são interpretados gerando mapas de densidade eletrônica a partir dos quais um modelo da molécula é construído e refinado (LATTMAN; LOLL, 2008).

Para aplicação da técnica é necessária a obtenção de cristais da proteína de interesse, sendo o método mais empregado o de difusão de vapor (LATTMAN; LOLL, 2008). Kits comerciais contendo soluções com diversas combinações de pH, agentes precipitantes e sais são utilizados como agentes precipitantes na busca das condições iniciais de cristalização. As condições mais promissoras são otimizadas através da variação do pH, concentração do precipitante e concentração da proteína.

Dois métodos principais podem ser utilizados para a determinação da estrutura cristalográfica, a substituição molecular, que utiliza a estrutura de uma proteína homóloga, quando disponível, como modelo para cálculo inicial, e os métodos de difração anômala, que utilizam o efeito, no padrão de difração, de átomos pesados (alto número atômico) presentes no cristal para cálculo inicial do mapa de densidade eletrônica (McPHERSON, 2009).

1.3.3 Produção e Caracterização Fenotípica das Células *knockdown*

As células de *T. brucei* deficientes em RRP44 foram produzidas utilizando-se a técnica de RNA de interferência (RNAi) com o objetivo de se caracterizar os efeitos da depleção da proteína. A técnica do RNAi consiste na produção de uma molécula de RNA dupla fita (dsRNA) complementar a um RNA mensageiro de interesse. O dsRNA é clivado em pequenos segmentos com cerca de 23 nucleotídeos, pela enzima Dicer, que se ligam à enzima Argonauta, componente do complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex) que separa as duas fitas do RNA mantendo uma ligada a ele (fita guia) e degradando a outra. A fita guia servirá para o pareamento com o RNA mensageiro de interesse devido à sua complementariedade e direcionando o mRNA de interesse à degradação (ALBERTS, 2010).

A caracterização fenotípica das células *knockdown* foi realizada através da análise da taxa de proliferação celular, análise das subunidades 40S, 60S, 80S e polissomos e análise do padrão de processamento do pre-rRNA por PCR quantitativo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNTESE DE RNA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os tripanossomatídeos formam um grupo de protozoários que engloba espécies patogênicas como o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* ssp. causadoras de doenças em humanos e animais. No processo evolutivo dos eucariotos, os tripanossomatídeos formam um grupo divergente e apresentam diferenças moleculares fundamentais (SIMPSON et al., 2006).

Estes organismos não possuem os fatores centrais de transcrição e a falta de promotores da RNA polimerase II faz com que a regulação da expressão gênica ocorra principalmente ao nível pós-transcricional (CLAYTON, 2016; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Além disso, apresentam seus transcritos organizados de forma policistrônica em seus cromossomos, podendo um policístron conter até 100 genes. Os genes de um policístron codificam proteínas que não são funcionalmente relacionadas nem atuam na mesma via metabólica (DE GAUDENZI et al., 2011).

As regiões intergênicas dos policístrons são ricas em pirimidinas, que servem de sinalização para o processamento de RNAs mensageiros (mRNA) (DE GAUDENZI et al., 2011). A maneira como os tripanossomatídeos realizam o processamento do pré-mRNA policistrônico também é peculiar, através de um processo denominado *trans-splicing*. O *trans-splicing* se caracteriza pela junção de duas moléculas de RNA transcritas a partir de genes diferentes (*spliced leader* + mRNA), enquanto que no *cis-splicing* ocorre a remoção dos introns de um pré-mRNA transcrito de um único RNA, ocorrendo no processamento dos pré-mRNAs dos demais eucariotos, cujos genes contêm introns. Apesar de não usual em tripanossomatídeos o *cis-splicing* também pode ocorrer, em casos específicos de genes que possuem introns como o gene que codifica a Polimerase Poli(A) e outro gene que codifica uma RNA helicase putativa, ambos em *T. brucei* (IVENS et al., 2005; MAIR et al., 2000).

No processo de *trans-splicing*, uma sequência de RNA de 39 nucleotídeos denominada *spliced leader*, transcrita como um pré-RNA por um gene independente, é adicionada na região 5' não traduzida do pré-mRNA, através de uma reação de splicing (clivagem e ligação) de RNA. A reação de *trans-splicing* é então responsável pela formação da extremidade 5' dos mRNAs maduros. A maturação dos mRNAs é

completada pela clivagem do pré-mRNA na região 3' não traduzida, a 3' da sequência codificadora, seguida da reação de poliadenilação da extremidade 3'.

Como consequência do *trans-splicing*, os mRNAs de tripanossomatídeos possuem uma sequência comum na extremidade 5', o *spliced leader* e tal extremidade dos mRNA de tripanossomatídeos também é uma característica do grupo. Diferentemente dos demais eucariotos que possuem uma estrutura denominada cap-0, que consiste numa 7-metilguanossina (m⁷G) adicionada na extremidade 5', os tripanossomatídeos possuem cap-4, o qual contém, além da 7-metilguanossina (m⁷G), metilações em mais quatro nucleotídeos na extremidade 5' (GÜNZL, 2010; LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003; PREUSSE; JAÉ; BINDEREIF, 2012).

Diferentemente dos demais eucariotos que fazem a síntese de mRNA somente pela RNA polimerase II e utilizam a RNA polimerase I para síntese de rRNA, o *T. brucei* é capaz de sintetizar alguns RNA mensageiros através da RNA polimerase I, como os que codificam as glicoproteínas variantes de superfície. Esse grupo de proteínas é extremamente importante, pois essas proteínas revestem a célula e apresentam grande variação, essa variação funcionando como um mecanismo de escape ao ataque por parte do sistema imune dos hospedeiros (GÜNZL et al., 2003).

Outro fator que distingue os tripanossomatídeos dos outros eucariotos são os diferentes precursores de rRNA e a maturação desses. Essas diferenças serão detalhadas no próximo tópico.

2.2 SÍNTESE DE RIBOSSOMOS

Os ribossomos são complexos responsáveis pela tradução de moléculas de mRNA para proteínas. A biogênese do ribossomo é um processo que demanda um grande gasto de energia, sendo necessários mais de 200 fatores para a montagem do ribossomo (THOMSON et al., 2013). Esse é formado por duas subunidades: em eucariotos, a subunidade maior 60S (LSU, do inglês *large subunit*) é composta pelas formas maduras de RNA ribossomal 5S, 5.8S e 25S/28S (25S em levedura e 28S em humanos) e 46 proteínas em levedura, enquanto a subunidade menor 40S (SSU, do inglês *small subunit*) é composta pela forma madura 18S do rRNA além de 33 proteínas ribossomais em levedura (WILSON; CATE, 2012; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

A síntese dos ribossomos nos eucariotos começa com a transcrição a partir do rDNA em que as RNA polimerases I e III sintetizam as moléculas precursoras do rRNA. A primeira sintetiza, no nucléolo, os RNAs que darão origem às formas maduras 18S, 5.8S e 25S/28S, além dos espaçadores externos e internos (ETS e ITS, respectivamente) enquanto a segunda sintetiza a forma 5S. (CIGANDA; WILLIAMS, 2011; MHT; XUE, 1995; WILSON; CATE, 2012; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

O processamento do rRNA em leveduras (figura 1) se inicia com a clivagem do ETS 3' do transcrito primário 35S, através da ribonuclease Rnt1. Já a remoção do ETS 5' ocorre em duas etapas, primeiramente através de uma clivagem no sítio A₀ formando um transcrito 33S, então o sítio A₁ é clivado, gerando o pré-rRNA 32S. Então ocorre uma clivagem na ITS1 através da ribonuclease Rcl1, no sítio A₂, separando pré-rRNA 20S, que formará o 18S, e 27SA₂, que irá gerar o 5.8S e 25S. Nesta etapa fatores como snRNA, proteínas ribossomais e outras proteínas com a função de estabilizar as estruturas secundárias e terciárias de algumas regiões do RNA começam a se ligar aos pré-rRNAs (HORN; MASON; KARBSTEIN, 2011; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

A associação do pré-rRNA 20S com as proteínas formam um complexo 43S, que é transportado através do nucleoplasma para o citoplasma, onde o restante da ITS1 será removido através da clivagem do sítio D realizado pela ribonuclease Nob1, formando a molécula madura do rRNA 18S. O pré-rRNA 27SA₂ também é ligado a proteínas ribossomais formando um complexo 66S que continua sendo processado no nucléolo. O processamento do 27SA₂ pode ocorrer de duas maneiras, em uma, a qual acontece em aproximadamente 85% das vezes, ocorre a remoção do restante da ITS1, a partir do sítio A₃ até o sítio B_{1s} pelo complexo MRP RNase, enquanto a outra, que ocorre 15% das vezes, também acontece da ITS1 a partir do sítio A₃, porém vai até o sítio B_L. Após a remoção da ITS1, independentemente de qual maneira, ocorre uma clivagem endonucleolítica pela ribonuclease Las1 no sítio C₂ presente na ITS2 (GASSE; FLEMMING; HURT, 2015), formando os pré-rRNAs 25.5S e 7S_s ou 7S_L. Parte da ITS2 ainda ligada ao 25.5S é removido pela ribonuclease Rat1 formando a forma madura do rRNA 25S, enquanto a parte da ITS2 ligada ao pré-rRNAs 7S_s ou 7S_L são clivadas pelo exossomo e pela ribonuclease Ngl2 para gerar a forma madura do 5.8S (revisão em FROMONT-RACINE et al., 2003; HORN; MASON; KARBSTEIN, 2011; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

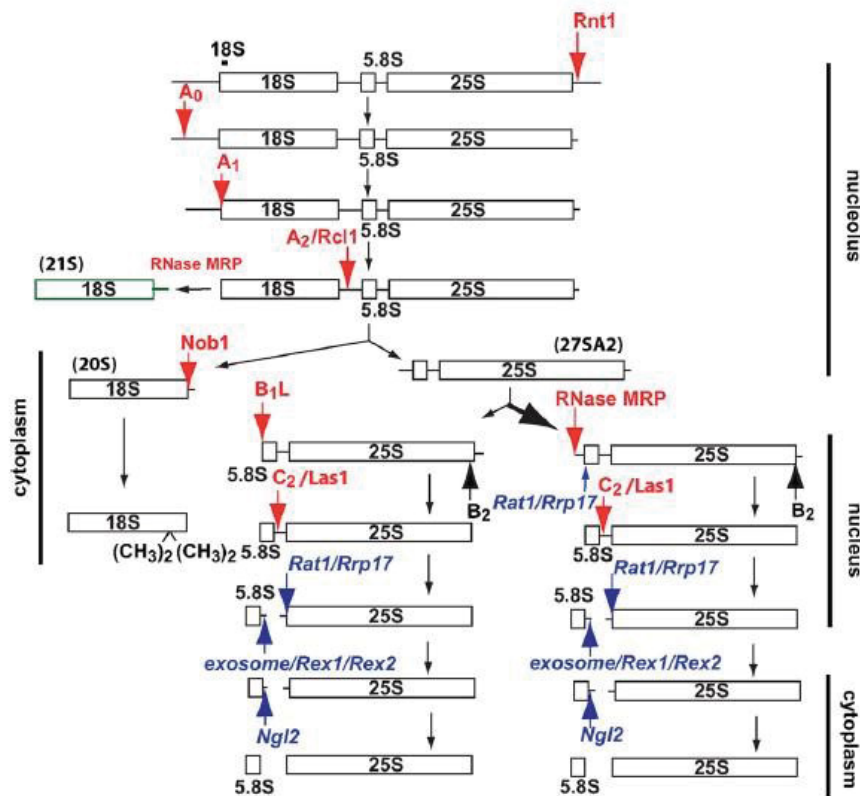


Figura 1 - Representação esquemática das etapas do processamento do RNA ribossomal em leveduras. Em vermelho são representadas as clivagens endonucleolíticas, enquanto em azul as exonucleolíticas, com a identificação das enzimas responsáveis pelas clivagens. Fonte: Modificado de HORN et al., 2011.

Em tripanossomatídeos, a molécula precursora do RNA ribossomal bem como as sequências a serem maturadas são bastante diferentes em relação aos outros eucariotos. Por exemplo, a região correspondente à subunidade 28S/25S nos demais eucariotos é subdividida em 6 fragmentos e a molécula precursora do rRNA possui 7 regiões ITS ao contrário das três presentes nos demais eucariotos (HERNANDEZ; CEVALLOS, 2014).

As etapas envolvidas na maturação do rRNA em tripanossomatídeos são pouco caracterizadas. Porém sabe-se que diferentemente de levedura, a primeira clivagem ocorre no sítio B₁, resultando em uma molécula de 3,4 kb, contendo a 5' ETS, a molécula 18S a ser maturada e a ITS1, além de um intermediário de 5,8 kb contendo as demais moléculas a serem maturadas (figura 2). A 5' ETS é removida em 3 etapas, pela clivagem do sítio A, A₀ e A₁, respectivamente (CAMPBELL et al., 1987; HARTSHORNE; TOYOFUKU, 1999). A ITS1 é removida no citoplasma nas últimas etapas do processamento da SSU, com uma clivagem no sítio A₂ realizada pela Nob1 (KALA et al., 2017). Uma clivagem endonucleolítica na região ITS2 da molécula de 5,8 kb separa o precursor do 5.8S do precursor do LSU1, LSU2 e SRs (srRNA)

(MICHAELI, 2012). A maturação do 5.8S é finalizada pelo complexo exossomo, através do processamento da extremidade 3' do precursor (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001). Posteriormente este último sofre uma clivagem na ITS5 separando o intermediário que contém LSU1, SR1 e LSU2 do que contém SR2, SR6 e SR4. As demais etapas de processamento, os sítios específicos de clivagem e as ribonucleases envolvidas nas diferentes etapas ainda não foram caracterizadas (MICHAELI, 2012).

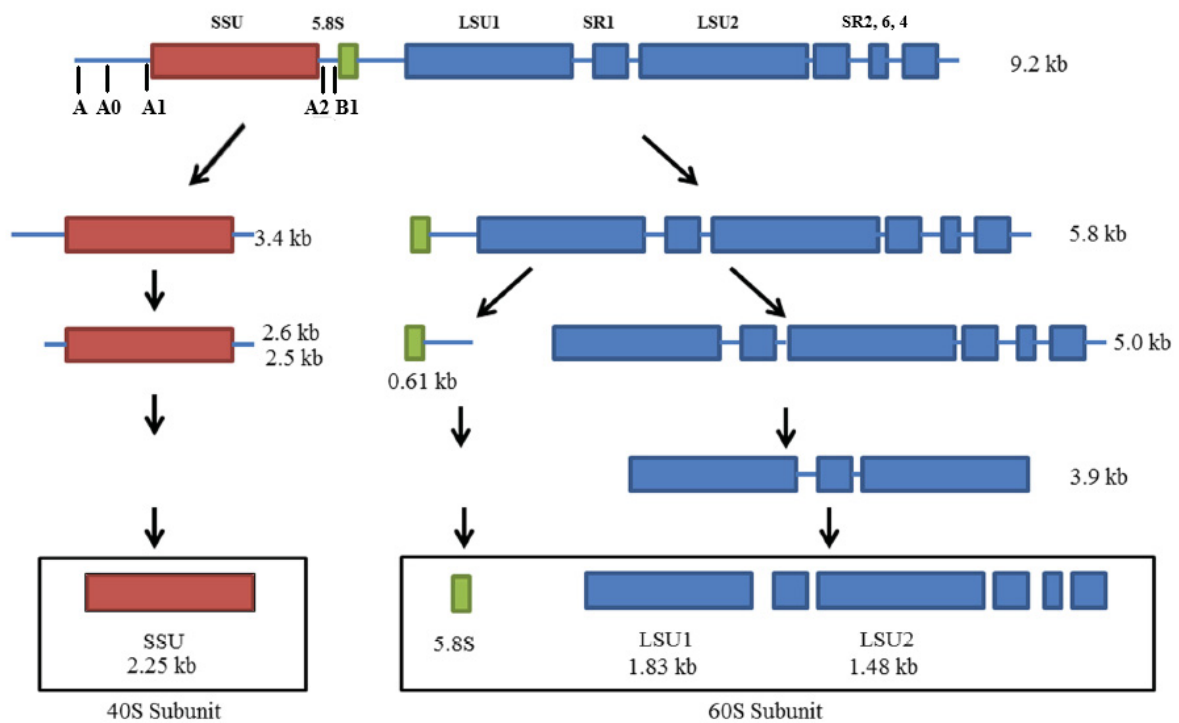


Figura 2 – Representação esquemática das etapas da maturação do RNA ribossomal de *T. brucei*. SSU: Subunidade menor; LSU: Subunidade maior; SR: srRNA. Fonte: adaptado de UMAER et al, 2014.

Análises dos genomas de tripanossomatídeos revelam que algumas ribonucleases que participam da maturação do rRNA em outros eucariotos possuem homólogos nestes parasitas. Em particular, as ribonucleases Rcl1, Rex1, Rat1, Las1, Nob1 e Ngl2, que atuam no processamento do rRNA em leveduras, apresentam homólogas em *T. brucei*, porém, com exceção da Nob1 e Rat1 (XRN em *T. brucei*), suas atividades não foram caracterizadas neste organismo. Por outro lado, uma importante diferença encontrada em tripanossomatídeos é a ausência do complexo RNase MRP. Tal complexo foi identificado em *S. cerevisiae* e é constituído de um componente ribonucleico de 340 nucleotídeos além de 10 proteínas essenciais. Nem as subunidades proteicas nem a subunidade ribonucleica foram identificadas em tripanossomas e leishmanias, sugerindo que a atividade endoribonucleolítica atribuída

ao complexo RNase MRP em eucariotos é desempenhada por outras enzimas/complexos nesses organismos.

Além das diferenças no rRNA, o ribossomo de *T. brucei* apresenta diferenças estruturais adicionais em relação ao ribossomo de outros eucariotos (figura 3), destacando-se segmentos de extensão proteicos tanto na subunidade maior quanto menor que formam quatro pontes entre as subunidades, o que causa um aumento na massa do ribossomo. Ainda, o RNA ribossomal apresenta um domínio exclusivo de kinetoplastídeos na subunidade menor que interage com os rRNAs SR2, SR6 e SR4 (HASHEM et al., 2013).

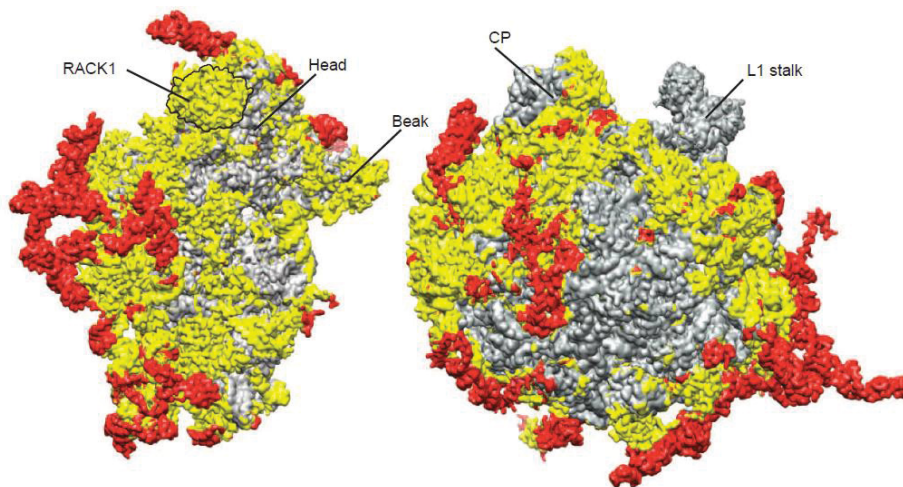


Figura 3 - Representação da estrutura do ribossomo de *T. brucei* determinada por criomicroscopia eletrônica. Em cinza estão representadas as regiões que são conservadas em procariotos e eucariotos, enquanto em amarelo são representadas as regiões que são conservadas entre os eucariotos. Em vermelho são indicadas as regiões que são específicas de tripanossomatídeos. Fonte: HASHEM et al., 2013.

2.3 O COMPLEXO EXOSSOMO E A PROTEÍNA RRP44

O exossomo é um complexo proteico envolvido no processamento e degradação de diversos tipos de RNA. Tal complexo foi caracterizado em vários eucariotos e está presente tanto no núcleo da célula quanto no citoplasma. No núcleo é responsável e degradação dos RNAs produzidos incorretamente e em excesso, faz o controle de expressão de alguns mRNAs e também atua na maturação do RNA ribossomal e de snoRNA (*small nucleolar RNA*), sendo o principal complexo de degradação de RNA no sentido 3' – 5'. No citoplasma, o único substrato conhecido para o exossomo é o mRNA (revisão em HOUSELEY; LACAVA; TOLLERVEY, 2006).

Estudos estruturais realizados principalmente com o exossomo de leveduras permitiram uma caracterização detalhada da associação das proteínas que constituem o complexo. No núcleo, este é composto por nove proteínas que formam o chamado Exo-9, que não apresenta atividade catalítica. Dentre estas proteínas, seis (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Mtr3, Rrp45 e Rrp46) formam uma estrutura em anel e possuem domínios tipo RNase PH (do inglês “*phosphorolytic exoribonucleases*, por homologia à RNase PH de *E. coli*). No topo desse anel ligam-se as três proteínas Rrp4, Rrp40 e Csl4, que formam uma “tampa” ou um *cap* e possuem domínios de ligação ao RNA (figura 4, A). Adicionalmente, duas proteínas associam-se ao Exo-9 e conferem atividade catalítica ao exossomo: a exoribonuclease Rrp6 e a Rrp44, que possui atividades endo e exoribonucleolítica. A Rrp6 liga-se ao complexo no topo das três proteínas que formam a “tampa”, fazendo interação com a subunidade Csl4, além das subunidades Mtr3 e Rrp43 do anel. Por sua vez, a Rrp44 associa-se ao complexo pelo lado oposto do anel (BONNEAU et al., 2009; LORENTZEN et al., 2008; MAKINO et al., 2013, 2015). No citoplasma a estrutura do exossomo se repete, porém, a proteína Rrp6 é substituída pela GTPase Ski7 (figura 4, B), a qual tem um papel importante na verificação da síntese do mRNA, em um mecanismo conhecido como *nonstop decay*, em que é verificado se a molécula de mRNA apresenta códon de terminação. A Ski7 também atua como um cofator para a associação do complexo Ski ao complexo exossomo, sendo que o complexo Ski atua na ativação do exossomo (HOUSELEY et al, 2006; KOWALINSKI et al. , 2016).

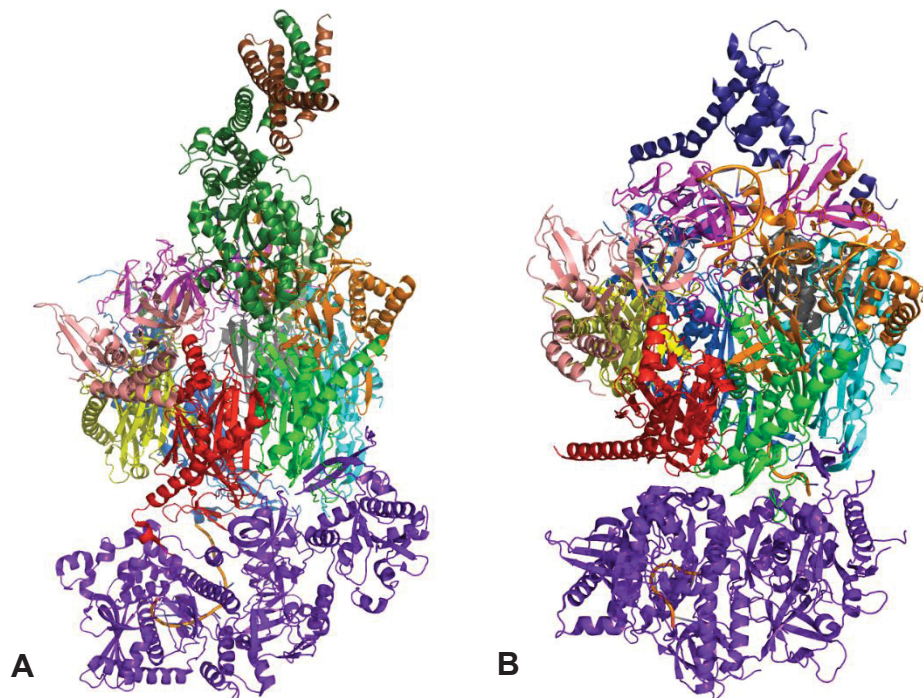


Figura 4 – Representação da estrutura cristalográfica dos exossomos de levedura nuclear (A, código PDB: 5c0w) e citoplasmático (B, código PDB: 5jea). RRP45: Vermelho; RRP41: Verde; RRP43: Azul; RRP46: Amarelo; RRP42: Ciano; RRP40: Salmão; Mtr3: Cinza; RRP4: Laranja; CSL4: Magenta; RRP44: Roxo; RRP6: Verde escuro; RRP47: Marrom; Ski7: Azul escuro.

A Rrp44 de levedura é uma proteína de aproximadamente 114 kDa e possui 6 domínios distintos: um domínio N-terminal seguido de um domínio do tipo PIN (segundo nomenclatura do domínio PiIT N-terminus), dois domínios do tipo *cold shock* (CSD1 e CSD2), um domínio ribonuclease do tipo RNB e um domínio C-terminal do tipo S1 normalmente encontrado em proteínas de interação a RNA (figura 5). Estudos com Rrp44 de leveduras mostraram que o domínio PIN possui atividade de endonuclease na presença de íons de manganês, além de ser a região da Rrp44 com maior superfície de interação com o complexo Exo-9. No domínio PIN também se encontra um motivo de ligação a zinco que tem papel na atividade enzimática da proteína, estando relacionado com a ligação da Rrp44 ao complexo exossomo, sendo que mutações nesse motivo causam uma perda de afinidade da associação da Rrp44 ao exossomo (BONNEAU et al., 2009; SCHAEFFER et al., 2009, 2012; SCHNEIDER et al., 2009).

O domínio RNB, por sua vez, é responsável pela atividade de exonuclease 3' – 5' da Rrp44. Juntamente com os outros três domínios CSD1, CSD2 e S1 eles formam uma estrutura homóloga à RNase II de *Escherichia coli*, também chamado domínio EXO, sendo que os domínios CSD1, CSD2 e S1 formam um sítio de ancoragem para RNA simples fita auxiliando no transporte do RNA para o sítio ativo

para degradação (LORENTZEN et al, 2008). O sítio catalítico responsável pela atividade exonucleolítica é formado por um canal que interage com 9 nucleotídeos o qual se inicia nos domínios CSD1/CSD2 e vai até o sitio ativo RNB. O interior do canal é carregado positivamente, o que favorece a interação molécula de RNA (MAKINO et al., 2015; VUKOVIC et al., 2016). Lorentzen e colaboradores (2008) determinaram a estrutura cristalográfica do domínio RNB de Rrp44 de levedura. Bonneau e colaboradores (2009) cristalizaram a Rrp44 inteira em complexo com as subunidades do exossomo Rrp41 e Rrp45, enquanto Makino e colaboradores (2013) determinaram a estrutura tridimensional do complexo exossomo associado à Rrp44.

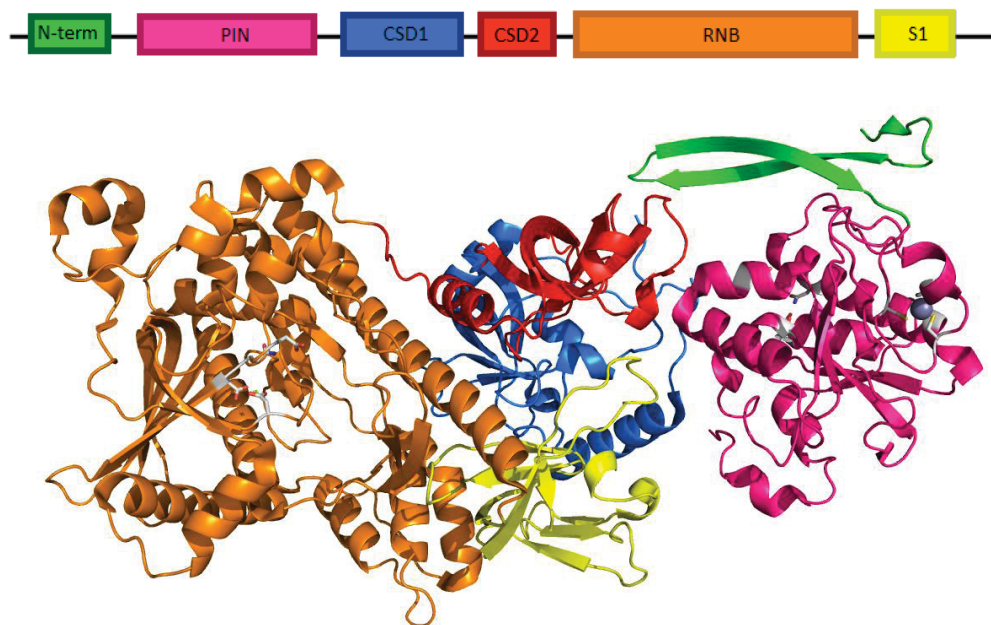


Figura 5 - Representação da estrutura tridimensional da Rrp44 de levedura (PDB: 5c0w) mostrando seus domínios. Destacado em verde está o N-terminal da proteína, em rosa está sendo mostrado o domínio PIN, seguido pelos dois domínios tipo *cold shock domain*, CSD1 e CSD2, em azul e vermelho, respectivamente. Em laranja está o domínio RNB e por último o domínio S1, em amarelo.

Estes e outros estudos estruturais e bioquímicos permitiram a caracterização da Rrp44 de levedura, indicando que ela pode atuar de duas maneiras diferentes, em associação com o exossomo, que será chamada de conformação 1, ou de maneira independente, a qual será chamada de conformação 2. No primeiro caso, como mostra o esquema da figura 3A, a molécula de RNA entra através do *cap*, atravessa o canal central formado pelo anel Exo-9 antes de alcançar o sítio catalítico da Rrp44 para degradação. No segundo, mudanças conformacionais na Rrp44 e nas subunidades Rrp6 e Rrp47, no lado oposto ao *core*, favorecem a interação direta do substrato com a Rrp44 (figura 6B) (MAKINO et al., 2015).

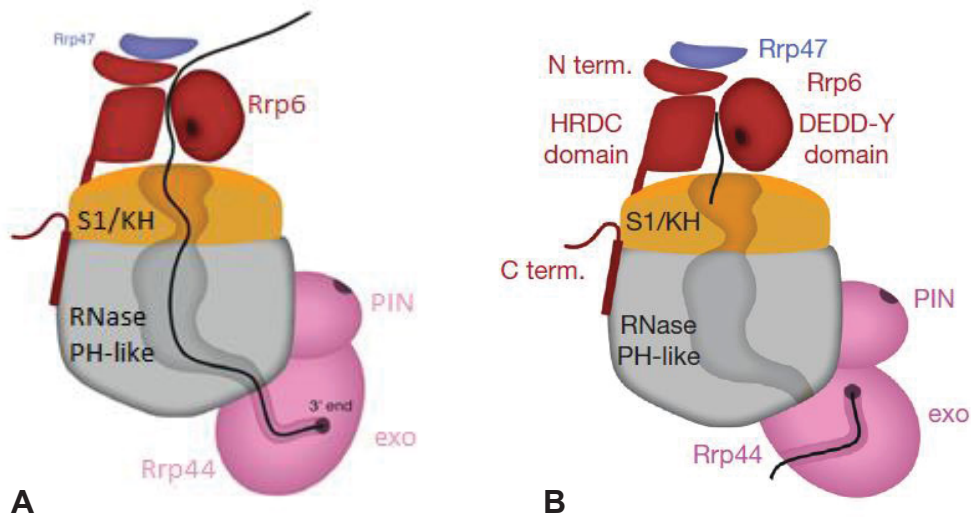


Figura 6 - Representação esquemática do exossomo de levedura mostrando diferentes mecanismos do processamento de RNA pela Rrp44. O chamado core Exo-9 é representado em cinza (anel formado por seis subunidades RNase-PH), em laranja (proteínas da "tampa") e em preto é mostrado o substrato. Em A: Na conformação 1, a molécula de RNA, representada pela linha preta, interage com a proteína Rrp6 e atravessa o canal central até chegar ao sítio catalítico da Rrp44, representada em lilás, para ser degradado. B: Na conformação 2, o RNA interage diretamente com a Rrp44 e é degradado. Fonte: Adaptado de MAKINO et al., 2015.

O complexo exossomo foi inicialmente estudado em *T. brucei* por Estevez e colaboradores (2001; 2003). Tais estudos mostraram que a composição do complexo em *T. brucei* é bastante semelhante ao de leveduras, com exceção da proteína RRP44 que através de ensaios por duplo-híbrido não foi identificada associada ao complexo, o que indica que tal proteína pode atuar independente do exossomo. Outra exceção é que tanto as formas nucleares quanto citoplasmáticas do exossomo apresentam a RRP6, ao invés da proteína Ski7 presente no exossomo citoplasmático de leveduras. Em experimentos realizados em *T. brucei* foi comprovado que todas as subunidades do exossomo são essenciais para manter a viabilidade celular, com exceção da CSL4 (ESTÉVEZ et al., 2001). Estévez e colaboradores (2001) também mostraram, através de experimentos de RNAi, que a ausência da RRP44 causa acúmulo e processamento incompleto do intermediário 7S do rRNA, molécula precursora da subunidade 5.8S. Entretanto, um estudo mais abrangente da função da RRP44 no processamento do RNA ribossomal, principalmente no que diz respeito à sua atividade endonucleolítica, e o seu papel no mecanismo distinto de processamento dos rRNAs em tripanossomatídeos ainda deve ser realizado, como por exemplo a identificação de seu(s) sítio(s) de clivagem e a caracterização das etapas da maturação do rRNA nas quais tal enzima está envolvida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.1.1 Testes de Expressão

Primeiramente foram definidas as construções para a expressão da proteína TbRRP44 inteira e de variantes contendo seus domínios. Assim, através da análise de um modelo baseado na estrutura tridimensional de Rrp44 de levedura, definimos 4 construções truncadas para posteriores testes de expressão (figura 7): a) TbRRP44_NPIN, que compreende os resíduos 1 a 216; b) TbRRP44_PIN, incluindo os resíduos 56 a 216; c) TbRRP44_RNB, contendo os resíduos 492 a 905; d) TbRRP44_CSD1-S1, incluindo os resíduos 232 a 972. Além do gene para expressão da TbRRP44 inteira (sequência GenBank CAC39259.1), as sequências de interesse foram sintetizadas e subclonadas no vetor pET28a (empresa GeneCust). As sequências sintetizadas foram otimizadas para expressão em *Escherichia coli*.

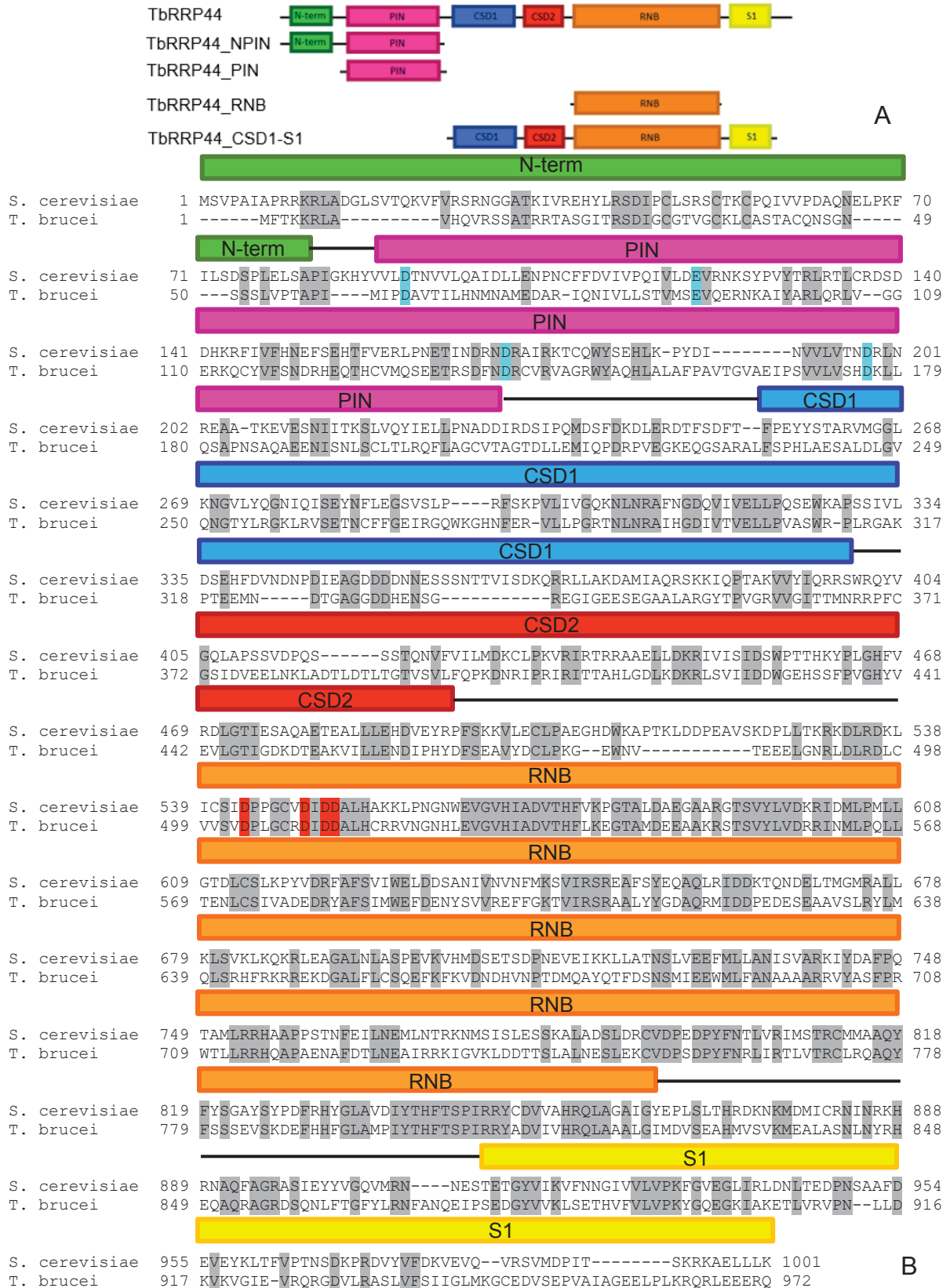


Figura 7 – Esquema das construções da TbRRP44 desenhadas nesse trabalho. A) Em verde é representado o N-terminal, em rosa o domínio PIN, em azul o domínio CSD1, em vermelho o CSD2, já em laranja é mostrado o domínio RNB e em amarelo o domínio S1. B) Alinhamento das sequências de ScRrp44 e TbRRP44, os domínios estruturais estão identificados conforme em A. Em cinza são mostrados os resíduos conservados, em azul claro o sítio catalítico endonucleolítico e em vermelho o exonucleolítico.

O processo detalhado a seguir foi realizado para todas as variantes da proteína. Primeiramente as células de *E. coli* (DE3) BL21 Star foram transformadas com vetor de expressão pET28a por choque térmico e as células foram plaqueadas em meio LB ágar e canamicina (25 µg/mL). A placa foi deixada em estufa a 37°C, *overnight*. Uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB e canamicina (25 µg/mL), cultivada a 200 RPM, 37°C, *overnight*. Foi feito inóculo com 2% (v/v) do pré-inóculo em 70 mL de meio LB com canamicina (25 µg/mL). As células foram cultivadas a 200 RPM, a 37°C até atingirem a densidade ótica (600 nm) de 0,7. Então dos 70 mL, 50 mL foram induzidos com 0,2 mM de IPTG e os 20 mL restantes foram cultivados sem indução. Ambas as culturas permaneceram a 18°C, 200 RPM, *overnight*.

As culturas foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos (4°C), o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 8.0; 0,2 M NaCl) na proporção de 3 mL de tampão para pellet de 50 mL de cultura. A suspensão foi congelada em gelo seco por 20 minutos e então descongelada em gelo para a adição de lisozima (200 µg/mL) para lise das células (30 minutos, em gelo). As células foram centrifugadas por 30 minutos a 10000 RPM (4°C), o sobrenadante foi armazenado em gelo e os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (3 mL para amostras induzidas e 1,5 mL para amostras não induzidas). As amostras das frações solúveis e insolúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

3.1.2 Expressão da proteína TbRRP44 e variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1

O procedimento explicado a seguir foi utilizado para a expressão da proteína TbRRP44 inteira e das variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1. Primeiramente, a partir de estoque em glicerol 80% das bactérias transformadas mantido a -80°C foi riscada uma placa de LB ágar com canamicina (25 µg/ml). Uma colônia isolada foi então inoculada em 3 mL de meio LB suplementado com canamicina (25 µg/ml). A cultura foi mantida sob agitação (200 rpm) a 37°C, *overnight*.

Para a expressão das variantes, foi usado 1 L de meio LB suplementado com canamicina (separados em dois erlenmeyers de 2 L) foi inoculado com 2% (v/v) do pré-inóculo crescido *overnight*. As culturas foram mantidas a 37°C, sob agitação de 200 RPM e seu crescimento foi monitorado através de medida da densidade ótica

(DO) a 600 nm. Quando a DO atingiu 0,6 foi feita indução com 0,2 mM de IPTG. As culturas foram então mantidas *overnight* a 18°C sob agitação (200 RPM).

As culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 x g. Os pellets foram ressuspensos em 10 mL de tampão A (50 mM de tris HCl pH 8; 0,3 M de NaCl; 20 mM de imidazol), as células foram lisadas utilizando-se de um microfluidificador (Microfluidics™) em 12 passagens, sob pressão de 80 psi e esse lisado foi centrifugado por 30 minutos a 40000 x g. O sobrenadante foi retirado e guardado em gelo para purificação.

3.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E VARIANTES TbRRP44_NPIN E TbRRP44_CSD1-S1

A primeira etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade utilizando-se coluna HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences) em cromatógrafo FLPC (AKTA, GE Healthcare Life Sciences). Após injeção da amostra foi realizada lavagem com 4 volumes de coluna (VC) com tampão A e a eluição com o tampão B (50 mM de tris HCl pH 8; 0,3 M de NaCl; 0,5 M de imidazol) através de um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B, em 10 VC. Para as variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1 foi usado tampão B (50 mM de tris HCl pH 8; 0,3 M de NaCl; 0,8 M de imidazol) e a eluição foi feita através de um gradiente segmentado de 0 a 10% em 10 VC e linear até chegar a 100% de tampão B em 15 VC.

As frações referentes aos picos de absorvância (280 nm) observadas no cromatograma foram analisadas por SDS-PAGE. As amostras correspondentes à proteína de interesse foram reunidas e diluídas em tampão A de troca iônica (50 mM Tris HCl pH8), na razão 1:3 (proteína : tampão) no caso da TbRRP44 e da variante TbRRP44_CSD1-S1. Já para a TbRRP44_NPIN foi utilizado tampão A de troca iônica (50 mM Tris HCl pH6,7) e foi diluído na razão 1:6 (proteína : tampão) para a diminuição da concentração de NaCl.

Na segunda etapa de purificação, a cromatografia de troca iônica, foram utilizadas coluna HiTrap Q HP para TbRRP44 e TbRRP44_CSD1-S1 e para TbRRP44_NPIN a HiTrap SP HP, ambas de 5 mL. A eluição foi realizada através de um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (TbRRP44 e TbRRP44_CSD1-S1: 1 M

NaCl; 50 mM Tris HCl pH8; TbRRp44_NPIN: 1 M NaCl; 50mM Tris HCl pH6,7) em 20 VC.

Os picos observados no cromatograma foram analisados através de SDS-PAGE e as amostras correspondentes à proteína de interesse foram reunidas e concentradas com concentrador de filtro 3K (Amicon® Ultra) e centrifugadas a 4000 x g, 4°C até atingir o volume de 1 mL, volume recomendado de injeção para uma boa resolução da cromatografia de exclusão por tamanho.

A última etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Hiloal Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) para TbRRP44 e TbRRP44_CSD1-S1 e Hiloal Superdex 75 16/60 para TbRRP44_NPIN, ambas de 120 mL. Após a injeção da amostra, essa foi eluída com tampão 30 mM Tris HCl pH8; 150 mM NaCl para TbRRP44 e TbRRP44_CSD1-S1, enquanto para a construção TbRRP44_NPIN foi utilizado tampão 30 mM Tris HCl pH6,7; 150 mM NaCl.

As amostras referentes aos picos observados no cromatograma foram analisadas por SDS-PAGE e após o resultado do gel foram escolhidas as amostras para concentração.

Para estimativa da concentração de proteínas, primeiramente, foi utilizada a plataforma ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), na qual foi inserida a sequência de aminoácidos da proteína e foi obtido o coeficiente de extinção e a absorvância (0,1%) correspondente a 1 mg/mL da proteína considerando os resíduos de cisteína no estado reduzido. A absorvância da amostra a 280 nm foi medida em um espectrofotômetro nanodrop (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific).

As amostras foram concentradas para 5 mg/mL, utilizando-se o concentrador de filtro 3K por centrifugação a 4000 x g, 4°C para os ensaios de cristalização.

3.3 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E VARIANTE TbRRP44_NPIN

A proteína TbRRP44 (5 mg/mL em tampão 30 mM Tris HCl pH8; 150 mM NaCl) e a variante TbRRP44_NPIN (5 mg/mL em tampão 30 mM Tris HCl pH6,7; 150 mM NaCl) foram submetidas a ensaios de cristalização utilizando dois kits comerciais, PACT Premier e JCSG-*plus* HT-96 (Molecular Dimensions) através do método de difusão de vapor, então foi realizado refinamento a partir das condições iniciais. Os cristais obtidos da variante TbRRp44_NPIN foram congelados em nitrogênio líquido

em solução crioprotetora constituída da solução de crescimento dos cristais acrescida de 20 % de glicerol (0,2 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 M MES pH 6.0; 20% (w/v) PEG 6000 ou 3350; 20% (w/v) glicerol) para posterior coleta de dados.

3.4 DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA

A coleta de dados de difração foi realizada na linha de luz PROXIMA 1 do Synchrotron SOLEIL (França) pela Dra. Beatriz Guimaraes. Os dados de difração foram coletados em um detector PILATUS 2M (DECTRIS), com parâmetros de oscilação de $0,1^\circ$ e tempo de exposição de 0,1s por imagem, sendo coletadas 3600 imagens. A energia da radiação incidente foi 9,6679 keV, energia correspondente à borda de absorção do zinco.

Através do programa XDS (KABSCH, 2010) foram feitas as análises iniciais que correspondem a indexação, integração e escalonamento dos dados de difração. Após esse processamento inicial, o número de moléculas presente na unidade assimétrica do cristal foi estimado através do cálculo do coeficiente de Mathew's utilizando-se o programa Mathew's_coeff, presente no pacote de programas CCP4 (KANTARDJIEFF, 2003; WINN et al., 2011).

Para a determinação das posições dos átomos pesados, neste caso do Zn, foi utilizado o programa SHELXD (SHELDRICK, 2015) e a partir destas, foi realizado o cálculo das fases iniciais com o programa PHASER (MCCOY et al., 2007), seguido pela modificação de densidade eletrônica utilizando-se o programa Parrot (COWTAN, 2010). Para a construção do modelo inicial foi utilizado o programa Buccaneer (COWTAN, 2006).

Para o refinamento da estrutura foi utilizado o programa BUSTER (SMART et al., 2012), sendo utilizado os comandos para restrições de simetria não cristalográfica (NCS) e TLS. Para a reconstrução do modelo foi usado o COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004), sendo alternado o refinamento pelo BUSTER e reconstrução manual pelo COOT. A validação do modelo foi feita através do software Molprobity (CHEN et al., 2010).

As sobreposições feitas nas análises da estrutura foram feitas através do programa COOT e as imagens foram obtidas pelo programa PyMol (DELANO, 2002).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA VARIANTE TbRRP44_NPIN POR DICROÍSMO CIRCULAR

As análises de dicroísmo circular foram realizadas no espectrofotômetro Jasco-815. Primeiramente o tampão de diluição da proteína (30 mM Tris HCl pH6,7; 150 mM NaCl) foi diluído 6 vezes para testar qual seria a interferência do tampão na leitura, usando uma cubeta de caminho ótico 0,2 mm. Após verificarmos que a diluição dos componentes do tampão estava adequada, através do monitoramento da leitura de alta tensão, foi realizada a leitura do tampão, usada como branco. O espectro de dicroísmo foi adquirido a 20°C no intervalo de comprimento de onda de 190 nm a 260 nm, com a proteína na concentração de 36 µM em tampão 5 mM Tris HCl pH 6,7; 25 mM NaCl.

Para testar se a ausência do zinco causaria alteração na estrutura da proteína, um espectro foi adquirido nas mesmas condições acima após a incubação da proteína por 30 minutos em solução de EDTA 2,5 mM. Neste caso, para a leitura da linha de base também foi adicionado ao tampão EDTA 2,5 mM.

Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com a proteína na concentração de 7 µM, utilizando a cubeta de caminho ótico 1 mm, no intervalo de 20°C a 90°C, sendo feita a medida a cada 3°C. Os dados foram adquiridos em dois comprimentos de onda, 208 nm e 222 nm, comprimentos de onda em que é possível estimar o sinal proveniente de α -hélice, já que foi observado nos experimentos anteriores que a porcentagem de α -hélice é predominante.

Também foram realizadas análises dos diferentes picos obtidos na cromatografia de troca iônica, sendo utilizado o mesmo protocolo acima para cubeta de caminho ótico 0,2 mm, porém além da incubação com EDTA também foi feita incubação com MnCl₂ (0,1mM) para verificar se haveria alguma modificação da estrutura pela adição do metal.

3.6 CONSTRUÇÃO DAS CÉLULAS KNOCKDOWN DE *T. brucei* PARA RRP44

A técnica de RNA de interferência (RNAi) foi utilizada para reduzir os níveis de expressão de RRP44. O segmento de DNA (472 pb) para a geração do RNA dupla fita (dsRNA) foi amplificado do DNA genômico de *T. brucei* usando os oligonucleotídeos TbRRP4_xba_RNAiF (CATCTCTAGATGTCACTAGATGTCTGCGGCAGGCAC) e TbRRP4_xho_RNAiR (GATCCTCGAGCCGCACTTCAATAC

CAACCTTCACC) e, posteriormente, clonado no vetor p2T7-177 (WICKSTEAD et al., 2002) que possui resistência à fleomicina. Células de *E. coli* DH5 α foram utilizadas para amplificação dos vetores. O vetor foi linearizado com a enzima de restrição *NotI* para transformação por eletroporação de células procíclicas de *T. brucei* cepa 29-13 (WIRTZ et al., 1999). As células transfectadas foram selecionadas com fleomicina por cerca de 20 dias e a indução do RNAi foi regulada pela adição de tetraciclina. Os experimentos para a produção das células *knockdown* foram realizados pela Dra. Flávia Carneiro. A ação do RNAi foi confirmada através de experimentos de *Western blot* utilizando anticorpos produzidos em camundongos contra a proteína de interesse.

3.6.1 *Western blot*

Primeiramente foram coletadas amostras das células *knockdown* em tempos de até 72 horas, sendo coletadas amostras a cada 24 horas. Então foram contadas as células para que cada amostra tivesse 10^7 células, o meio foi removido após centrifugação de 3000 g por 5 minutos e as células foram lavadas em PBS para total remoção do meio. As células foram centrifugadas novamente, o PBS foi removido e as mesmas foram ressuspendidas em tampão de amostra (tampão Laemmli concentrado 4 vezes), obtendo-se então o extrato de *T. brucei*. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, sendo aplicado 10 μ L de extrato (extrato contendo 10^7 células). A tensão usada para migração das amostras foi de 130 V.

Para transferir o conteúdo do gel para a membrana de PVDF (Difluoreto de polivinilideno), as membranas foram ativadas com Metanol (100%) por 15 segundos, depois colocadas em água durante 1 à 2 minutos e por último foram colocadas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20%(v/v) metanol), onde ficaram até serem colocadas na cuba de transferência. A transferência foi realizada a 20 V por 25 minutos em cuba de transferência BIORAD. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante uma hora a temperatura ambiente, em agitação, com uma mistura de TBS e 5% de leite em pó desnatado.

Para a detecção da proteína RRP44 foram utilizados soros obtidos de camundongos, a partir da inoculação da proteína purificada nos animais. Os experimentos para a produção dos anticorpos policlonais foram realizados pelo biotério do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ-PR. Os soros foram diluídos 200 vezes em 3,5 mL de TBS-Tween (0,1% Tween).

A membrana foi incubada com o soro por 16 horas, a 4°C em câmara fria, sob agitação e lavada com TBS-Tween três vezes por dez minutos.

O anticorpo secundário (Anti-IgG mouse conjugado com fosfatase alcalina) foi diluído na proporção 1:8000 em 10 mL de TBS-Tween com 5% de leite em pó. As membranas foram incubadas por 60 minutos, sob agitação, e então foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween por 10 minutos.

A revelação foi feita com uma mistura de 10 mL de tampão da fosfatase (0,1 M Tris HCl; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂ pH 9,5), com 66 µL do reagente NBT (nitro blue tetrazolium) e 33 µL do reagente BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), que foi realizada em ausência de luz. Os 10 mL foram colocados, com a ajuda de uma pipeta, sobre as fitas mantendo os recipientes em agitação.

3.7 ANÁLISE DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foi realizada a comparação do crescimento da cultura de células controle (*T. brucei* cepa 29-13 e cepa 29-13 transfectada com vetor p2T7-177 na ausência de tetraciclina) e das células *knockdown* para TbRRP44 (induzidas com tetraciclina). As células foram cultivadas em meio SDM 79 suplementado com 10% de soro fetal bovino, higromicina (50 µg/mL) e G418 (15 µg/mL). As culturas de células transfectadas com o vetor p2T7-177 foram também mantidas com antibiótico fleomicina (25 µg/mL). Na cultura controle de *T. brucei* 29-13 foi adicionado tetraciclina (1 µg/mL) para verificar se a presença deste antibiótico influenciaria no crescimento das células. Para indução do RNAi foi adicionado tetraciclina 2 µg/mL no primeiro dia da curva de crescimento e 1 µg/mL nos demais dias.

O experimento foi executado em uma placa de 24 poços em 120 horas, sendo que a cada 24 horas as células eram contadas em contador de partículas (Beckman Coulter Z1 Particle and Cell Counter). Foi adicionado 1 mL (10⁶ células/mL) de cultura em cada poço para posterior contagem das células nos tempos 24 e 48 horas. A placa foi deixada em estufa a 28°C e 5% de CO₂. Após 48 horas, as culturas foram diluídas para a densidade de 10⁶ células/mL, a partir do poço 48 horas, a fim de evitar a saturação do meio de cultura e não influenciar a contagem das células nos tempos adicionais.

3.8 ANÁLISE DAS SUBUNIDADES 40S, 60S, 80S E POLISSOMOS

3.8.1 Sedimentação de Polissomos em Gradiente de Sacarose

Para a sedimentação de polissomos foi utilizado um protocolo adaptado de Brecht e Parsons (1998) e Jensen e colaboradores (2003). Primeiramente foram preparados os gradientes de sacarose, para isso foram preparadas duas soluções de sacarose, uma contendo 15% (w/v) de sacarose e outra 55%. Ambas foram diluídas em 10 mM de Tris HCl pH 7,5, 300 mM de KCl e 10 mM de MgCl₂ e água para um volume final de 50 mL. Foram adicionados cicloheximida (100 µg/mL) e PMSF (1 mM) às soluções de sacarose.

Para a formação dos gradientes, em um volume final de 12 mL, foi utilizada uma cuba formadora de gradientes, que consiste em dois reservatórios conectados onde são colocadas as soluções de sacarose. Essas são homogeneizadas por uma barra magnética enquanto são aspiradas por uma bomba peristáltica. O gradiente é formado em um tubo de baixo para cima. Os gradientes foram armazenados em gelo até as células serem processadas.

Foram escolhidos dois tempos após a indução do RNAi, 48 e 72 horas, pois foi quando foi observado na curva de crescimento que a ausência da proteína começou a afetar a proliferação celular. Para o experimento no tempo 48 horas, foram feitas duas culturas de célula em meio SDM 79, uma para as células induzidas e outra para as células não induzidas. Para as células induzidas foram utilizados 80 mL de cultura e para não induzidas 60 mL, ambas as culturas partiram de uma concentração inicial de 10⁶ células/mL. As culturas receberam fleomicina (25 µg/mL) para manutenção do vetor e às células induzidas foi adicionado tetraciclina para indução do dsRNA. No primeiro dia foram adicionados 2 µg/mL e após 24 horas foi adicionada metade dessa concentração. Para o experimento no tempo 72 horas foi feito o mesmo procedimento, porém após 48 horas foi feita diluição das culturas para 10⁶ células/mL, pois as células começam a sofrer estresse devido a falta de nutrientes. Para as células induzidas foi usado 160 mL de cultura, enquanto para as não induzidas foi usado 80 mL.

As células dos dois tempos foram processadas da mesma maneira. Primeiramente foi realizada a contagem das células para que fossem usadas quantidades semelhantes nas condições induzidas e não induzidas no experimento.

Para o tempo 48 horas foram utilizadas $5,8 \times 10^8$ células, para 72 horas foram utilizadas $2,5 \times 10^8$ células.

As culturas foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado de maneira que ainda restassem 5 mL, volume ao qual foram adicionados 50 μL e 25 μL de cicloheximida nas amostras correspondentes aos tempos 48 horas e 72 horas, respectivamente. As culturas foram incubadas com cicloheximida por 10 minutos a 28°C , então foram centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 8 mL de tampão TKM com cicloheximida (10 mM Tris HCl pH 7,5; 300 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cicloheximida) antes de nova centrifugação. As amostras foram ressuspensas em 800 μL de tampão TKM e transferidas para eppendorf e centrifugadas. O sobrenadante foi removido, cada amostra foi ressuspensa em 450 μL tampão TKM com cicloheximida e PMSF (440 μL TKM; 5 μL cicloheximida; 5 μL PMSF) e foram adicionados 50 μL do tampão de lise 10X (10 mM Tris HCl pH 7,5; 300 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 10% (v/v) NP-40; 2M sacarose). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente e rapidamente até a lise das células e posteriormente centrifugadas a $16000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado em gelo até sua aplicação ao gradiente.

Os gradientes com os extratos foram centrifugados em ultracentrífuga (HITACHI himac CP80WX) por 2,5 horas a 39000 RPM. Após a centrifugação, foram coletadas as frações dos gradientes em coletor ISCO Foxy R1 e foi gerado um gráfico de absorvância em 254 nm através do leitor Teledyne ISCO, que mostra o perfil das subunidades 40S e 60S, 80S e polissomos. Frações dos gradientes foram coletadas em volume de aproximadamente 500 μL .

A fim de compararmos o perfil do gradiente de polissomos de células sob estresse nutricional, $2,5 \times 10^8$ células foram centrifugadas para remoção do meio e foram deixadas em PBS por 1,5 hora antes do processamento citado acima.

3.8.2 Análise das Frações do Gradiente por Espectrometria de Massas

As frações dos gradientes foram submetidas à análise por espectrometria de massas a fim de verificar o conteúdo proteico das frações iniciais dos gradientes. Para isso, primeiramente foi feito um pool das frações 1, 2, e 3, contendo 50 μL de cada, então esse pool e as frações 4 e 5 (250 μL) foram submetidas à precipitação. 150 μL do pool das frações 1, 2 e 3 foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e 600 μL

de metanol foram adicionados à amostra, seguido por homogeneização vigorosa. Foram adicionados 150 µL de clorofórmio e homogeneizado vigorosamente. Então foram adicionados 450 µL de água e homogeneizado rapidamente. As amostras foram centrifugadas a 20000 x g, por 5 minutos, 4°C.

Formaram-se 3 fases, sendo a do meio a correspondente à amostra proteica, os conteúdos das fases de cima e de baixo foram removidas. Adicionou-se metanol, homogeneizou-se rapidamente e o processo de centrifugação foi repetido. Ao final da centrifugação é possível ver um precipitado esbranquiçado correspondente ao conteúdo proteico. O metanol foi removido delicadamente com ajuda de uma pipeta e o restante foi seco por evaporação.

As frações 4 e 5 foram submetidas ao mesmo processo, porém a precipitação foi feita a partir de 250 µL, o volume dos reagentes adicionados foi aumentado respeitando a proporção.

As amostras após a precipitação foram ressuspensas em 45 µL (pool frações 1, 2 e 3) e em 38 µL (frações 4 e 5) de tampão Laemmli concentrado 2 vezes e as amostras foram aplicadas em SDS-PAGE. A corrida foi interrompida após a entrada das amostras no gel de separação e as bandas foram cortadas para a análise por espectrometria de massas.

O experimento de espectrometria de massas foi realizado pelo Dr. Michel Batista da plataforma de Espectrometria de Massas do ICC-Fiocruz-PR. As amostras foram removidas do gel, cortadas em pequenos pedaços, descoradas e secas a vácuo. Então a amostra é incubada com tripsina, após a tripsinização os peptídeos são extraídos do gel e concentrados.

Para a análise dos peptídeos foi utilizada a técnica de LC-MS/MS sendo utilizado o cromatografo Thermo Scientific Easy-nLC 1000 acoplado ao LTQ Orbitrap XL ETD. A cromatografia foi realizada em um gradiente de 5 a 40% de MeCN em 0,1% de ácido fórmico e 5% de DMSO. A identificação das proteínas foi feita através da plataforma MaxQuant (versão 1.5.5.1). Os peptídeos encontrados foram comparados contra um banco de dados de sequências de proteínas de *T. brucei* 927 obtido através do servidor Uniprot.

3.9 ANÁLISE DO PROCESSAMENTO DO PRÉ-RNA RIBOSSOMAL POR PCR EM TEMPO REAL

3.9.1 Extração do RNA e Obtenção do cDNA

As células de *T. brucei* foram coletadas como descrito na seção 3.6.1, porém foram usadas apenas as amostras correspondentes aos tempos 48 e 72 horas (células controle e *knockdown*), também sendo usadas 10^7 células, porém após a remoção do meio foi adicionado 750 μ L de Trizol[®] e colocado rapidamente em gelo seco para extração do RNA.

Para a extração do RNA as amostras foram descongeladas e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Então foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação formam-se três fases, sendo a fase do topo a correspondente ao RNA. Essa fração foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 500 μ L de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos.

Foi feita uma nova centrifugação a 12000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido delicadamente, pois o RNA fica no fundo no tubo. Esse foi lavado com 1 mL de etanol 75% e agitado vigorosamente. Foi centrifugado por 5 minutos a 7000 x g. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA ficou secando a temperatura ambiente. Após essa etapa o RNA foi ressuspensionado em 20 μ L de água autoclavada com DEPC (Pirocarbonato de Dietila).

Antes da síntese do DNA complementar (cDNA) as amostras de RNA foram testadas para verificação de sua integridade e concentração através do Bioanalyser (Agilent 2100 Bioanalyzer). Primeiramente foi realizada a filtração do gel (RNA 6000 Pico Gel Matrix, fornecido pelo fabricante do equipamento) para RNA, sendo colocados 550 μ L do gel em um filtro fornecido pelo fabricante do equipamento e centrifugado a 1500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram utilizados 65 μ L do gel, aos quais foi adicionado 1 μ L de corante, também fornecido pelo fabricante do equipamento, seguido de centrifugação por 10 minutos a 13000 x g, a temperatura ambiente. 9 μ L da mistura gel e corante foram aplicados no poço do chip (Agilent RNA 6000 Nano Chip) designado para o gel e com a ajuda de uma seringa e um suporte o gel foi espalhado pelo chip em consequência da pressão exercida pela seringa.

Também foram colocados 9 μL da mistura do gel em mais dois poços do chip também designados para gel. Foram colocados 5 μL de marcador de RNA (RNA 6000 Nano Marker) em todos os poços com a exceção dos poços em que foi colocado gel e 1 μL de amostra. Também foi colocado 1 μL de marcador de peso molecular para RNA (RNA 6000 NanoLadder). O chip com as amostras foi colocado em um IKA vortex e agitado a 2400 RPM por 1 minuto. Foi feita leitura do chip no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer.

A síntese do cDNA foi feita a partir de 0,5 μg de RNA. Ao RNA foram adicionados 3 μg de “random primer”, 1 μL de dNTP 10 mM e água para um volume de final de 20 μL . Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C e resfriada em gelo. Ao tubo foram adicionados 4 μL de tampão 5x First-Strand, 2 μL de DTT 0,1 M e 1 μL de RNaseOUT™ (40 unidades/ μL). A mistura foi homogeneizada delicadamente e aquecida a 37°C por 2 minutos. Foram adicionadas 200 unidades da Transcriptase reversa M-MLV RT e a reação foi incubada por 10 minutos a 25°C. Essa mistura passou por mais duas incubações, 50 minutos a 37°C e 15 minutos a 70°C para inativar a reação.

3.9.2 Testes de Eficiência dos Oligonucleotídeos

A eficiência dos oligonucleotídeos desenhados para a análise do processamento do pré-rRNA (tabela 1) foi inicialmente testada. Primeiramente os oligonucleotídeos foram testados a fim de verificar se a amplificação estava ocorrendo e se apresentavam apenas um produto de amplificação, para isso foi utilizado o cDNA obtido anteriormente foi diluído 10 vezes como *template*. Cada reação foi realizada em um volume final de 20 μL , sendo composto de 10 μL de SYBR Green; 0,8 μL dos oligonucleotídeos senso e antisenso (5 μM); 7,4 μL de água e 1 μL de cDNA ou 1 μL de água para o controle negativo. Os 20 μL foram colocados em placa de 96 poços para qPCR e cada teste foi feito em triplicata. A PCR foi realizada utilizando-se o equipamento Roche LightCycler® 96 Instrument com os seguintes parâmetros: pré-incubação por 5 minutos a 95°C; 3 passos de amplificação: 95°C por 10 s, 60°C por 20 s e 72°C por 30 s (45 ciclos); melting: 95°C por 10 s, 65°C por 60 s e 97°C por 1 s. Após o término da reação, os dados foram processados através do software do próprio equipamento (LightCycler® 96 SW 1.1). Após esta primeira etapa de verificação dos oligonucleotídeos passou-se ao teste de suas eficiências. Para isso foi feita uma

diluição seriada até 10^{-6} de cDNA que foi usada como *template* das reações. A PCR foi feita seguindo os parâmetros citados acima. Foram escolhidos os primers que apresentaram eficiência entre 85% e 105% e $R^2 > 0,98$.

3.9.3 Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal

Após a obtenção do cDNA das amostras das células controle e das células *knockdown* para a TbRRP44 foi realizada a qPCR. As amostras de cDNA foram misturadas ao SYBR Green (SYBR Green Master Mix) e ao par de oligonucleotídeos para a amplificação das regiões correspondentes ao 5' e 3' das moléculas de rRNA maduros e às ITSs (tabela 1). Também foram utilizados oligonucleotídeos para a amplificação do mRNA das proteínas GAPDH e α -Actina que foram utilizadas como normalizadores. 20 μ L das amostras foram aplicadas em placa de 96 poços em triplicata e então foi feita a reação da mesma maneira que nos testes descritos acima.

Para o cálculo da razão da expressão foram utilizados os valores de Cq correspondentes ao mRNA de GAPDH e α -Actina para normalização dos dados, para isso foi utilizado o métodos de Pfaffl (PFAFFL, 2001), sendo feitos os seguintes cálculos. Primeiramente foi feita uma média entre as Cq obtidas para as triplicatas, sendo Cq o número de ciclos em que a fluorescência é detectada acima do valor de *threshold*, já que existe uma fluorescência basal detectada.

Para o cálculo através do método de Pfaffl é necessário levar em consideração a eficiência dos oligonucleotídeos. O valor da eficiência de cada par de oligonucleotídeos testado é elevado à diferença do valor de Cq das células controle e células *knockdown*, esse valor é dividido pelo valor da eficiência da reação do par de oligonucleotídeos normalizador elevado à diferença do valor de Cq da célula controle e célula *knockdown*, como mostrado na equação 1.

$$\text{Razão da expressão} = \frac{\text{Eficiência do oligonucleotídeo testado}^{(C_q \text{ Células controle} - C_q \text{ Células knockdown})}}{\text{Eficiência do oligonucleotídeo normalizador}^{(C_q \text{ Células controle} - C_q \text{ Células knockdown})}} \quad (1)$$

Na tabela 1 estão as sequências dos pares de oligonucleotídeos desenhados para a análise do processamento do rRNA de *T. brucei* e adquiridos da Sigma Aldrich e IDT (Integrated DNA Technologies). Devido ao seu pequeno tamanho não foi possível desenhar oligonucleotídeos para as regiões: 3' SR1; ITS4 e 5' LSU2.

TABELA 1 - LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DESENHADOS PARA OS EXPERIMENTOS DE qPCR.

Identificação	Sequência Senso	Sequência Antisenso
5'18	TGTGCTGTTTGTGTGTTCCC	AATGAGCCATGCGCAGATTC
3'18	CCCGTCGTTGTTTCCGATGA	ACCTTGTTACGACTTTTTGCTTCC
ITS1	GACATGGGAGATGAGGGATGTT	CACAGACACTCTAACACACATACA
5'5.8S	TGCTATGTGTATATAAACCTCGCA	ACTTTGCTGCGTTCCTTCAAC
3'5.8S (1)	GCATGGGAGAAGCTCTCTCG	TTTGTGCGTGCGTTGAACAA
3'5.8S (2)	CGTGATGCCACATTTCTCAG	ATATGCACCACACGAGGAGAAG
3'5.8S (3)	TGCCACATTTCTCAGTGTCG	TTGTGCGTGCGTTGAACAA
ITS2	GCACAATGATGTATGTCACGCA	GCTCAACACACAAATCCACACA
5'LSU1	TGTGCTTCTTTCTGTACGC	ACGGTTGTTTTCTTTCCCTCCG
3'LSU1 (1)	GGGGTTTGTGTGTTTACCGG	TCACTCACACACACATGGCT
3'LSU1 (2)	GAAAAGGGGCAACAGAGAAC	CGACAATCACTCACACACACA
3'LSU1 (3)	GGCTTATCTGAAAAGGGCAAC	ACGACAATCACTCACACACAC
ITS3 (1)	AGCCATGTGTGTGTGAGTGA	GCTCAGTTGTGAAGAGCGTG
ITS3 (2)	AGAAATTGCATGTGGGACAGA	TGTGAAGAGCGTGTTTTGGT
5'SR1	GCTCTTCACAACCTGAGCTGTC	GTCACCTGGCAAGTGTTTCG
3'LSU2 (1)	CTTGGCTGGAGATTGCGAGT	TGTTGTGTGCTGAGATGGCA
3'LSU2 (2)	CGTGAGACAGGTTGGTTTTACC	CAAGCACATGCCACCGAAC
ITS5	CATCTCAGCACACAACATTTATG	ACATATACACGTGTGTATAACAGC
5'SR2	CTGCCATCTCAGCACACAAC	TGCGAGATCCCTTCACAATCTC
3'SR2	TAAGCCAGAAACCAGTCCCAAG	CACAAGCCGTGCCACAC
ITS6 (1)	TGGCTCATTGACGTTGAAGG	TATGCCCGCACACAAAACAC
ITS6 (2)	GTGAGACGTGTTTTGTGTGC	TGTCTTGAGCGTGAACAGAC
5'SR6	TGTCTGTTACGCTCAAGAC	AGCCCACCAGATAAGAGAAGTG
3'SR6	CGCCCAGTACCTTCATTTTAC	AGCCCACCAGATAAGAGAAGTG
ITS7 (1)	TGTATTGTTGCGCGTCACAC	TTGGTGGCACTTACACACAC
ITS7 (2)	TAATGATGCGGAGGTGTGAGAG	TGTGACGCGCAACAATACAG
5'SR4	AGTGCCACCAACTCTGTGAAC	GCTCATGCCAGCCCATGCAT
3'SR4	AGGCGCTGAACCTTGATGC	CTCGACTCAACGTAACACAACAC
GAPDH	AGATTGATGTCGTTGCTGTTGTG	ATGGCTTGCTCTTCGTAGTCG
α -Actina	AGACTGGTATGACGTTACCAC	AAGTTCGAACGGTTCCTTCGC

Os identificadores indicam a região do pré-rRNA que será analisada com o referido par de oligonucleotídeos. GAPDH e α -Actina foram utilizados como normalizadores. FONTE: o autor (2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPRESSÃO DA TbRRP44 E VARIANTES TbRRP44_NPIN E TbRRP44_CSD1-S1

Observamos expressão de todas as proteínas testadas, as variantes TbRRP44_PIN e TbRRP44_RNB permaneceram na fração insolúvel do extrato bacteriano, enquanto a proteína TbRRP44 inteira e as variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1 foram obtidas na fração solúvel (figuras 8, 9 e 10). As variantes para as quais obtivemos bom nível de expressão na fração solúvel contém os domínios presentes nas variantes TbRRP44_PIN e TbRRP44_RNB. Assim prosseguimos com a purificação da TbRRP44 inteira e as variantes TbRRP44_NPIN e TbRRP44_CSD1-S1.

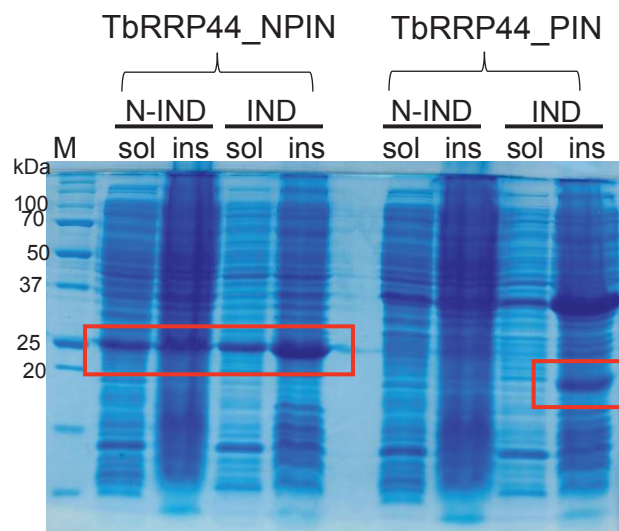


Figura 8 – Análise dos testes de expressão das variantes TbRRP44_NPIN (24,8 kDa) e TbRRP44_PIN (19 kDa) em SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular; N-IND: expressão não induzida com IPTG; IND: expressão induzida com IPTG; sol: fração solúvel; ins: fração insolúvel. Em vermelho estão destacadas as bandas de expressão.

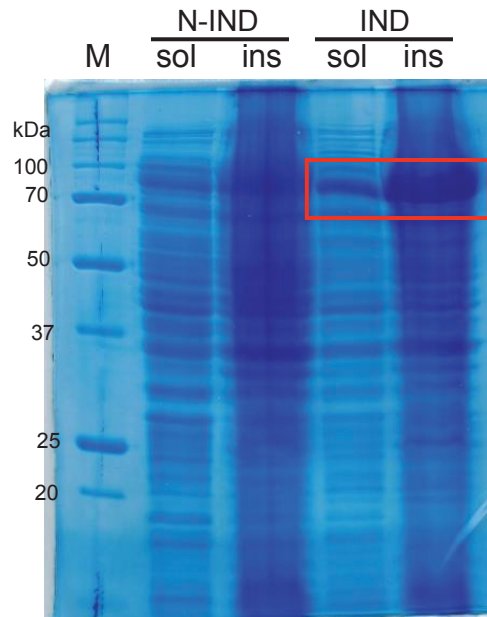


Figura 9 – Análise do teste de expressão da variante TbRRP44_CSD1-S1 (84,6 kDa) em SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular; N-IND: expressão não induzida com IPTG; IND: expressão induzida com IPTG; sol: fração solúvel; ins: fração insolúvel. Em vermelho estão destacadas as bandas de expressão.

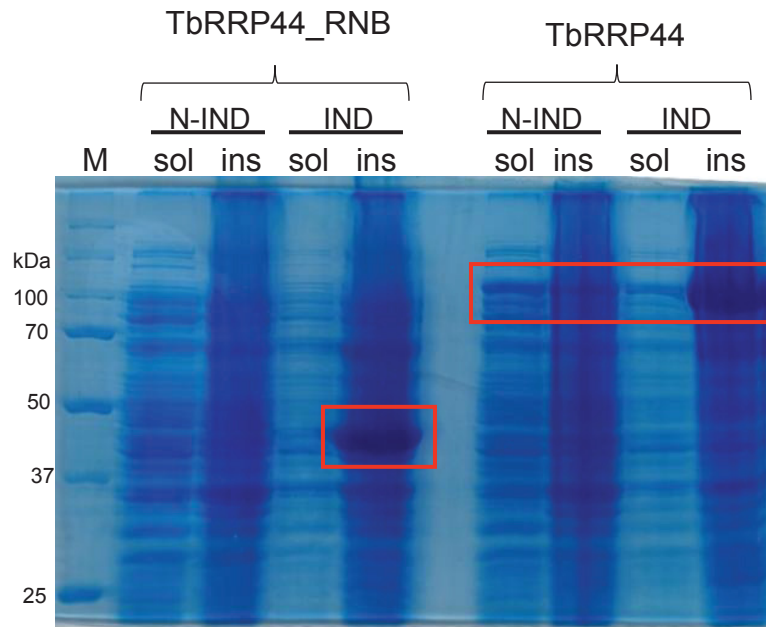


Figura 10 – Análise do teste de expressão das variantes TbRRP44_RNB (48,6 kDa) e TbRRP44 (110 kDa) em SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular; N-IND: expressão não induzida com IPTG; IND: expressão induzida com IPTG; sol: fração solúvel; ins: fração insolúvel. Em vermelho estão destacadas as bandas de expressão.

4.2 PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.2.1 Expressão e Purificação da variante TbRRP44_CSD1-S1

A variante TbRRP44_CSD1-S1 foi purificada a partir de 1 L de cultura bacteriana e passou por três etapas de purificação. A primeira etapa, cromatografia por afinidade a níquel, resultou no aparecimento de dois picos, sendo que os dois picos se referem à proteína de interesse (figura 11), o primeiro sendo eluído em 8% e o segundo em 25% de tampão B. As amostras 49 a 68, referentes ao pico majoritário foram diluídas 3 vezes em tampão A de troca iônica a fim de diminuir a concentração de sal. Na segunda etapa de purificação, foi observado um pico majoritário eluído em 31% de tampão B (figura 12). As frações correspondentes ao pico majoritário, 40 a 46, foram concentradas para 1 mL para posterior purificação por exclusão de tamanho. A proteína de interesse foi eluída em um pico único em cerca de 70 mL (figura 13), o que corresponde à massa molecular aproximada de um monômero segundo o manual da coluna, sendo utilizada a coluna Superdex 200 16/60.

A variante TbRRP44_CSD1-S1 apresentou bom rendimento, mas apesar das três etapas de purificação a proteína não apresenta um grau de pureza satisfatório, sendo que os contaminantes observados no gel podem ser degradações da própria proteína, sendo necessário realização de *Western blot* para confirmação. Otimizações no método de purificação devem ser realizados.

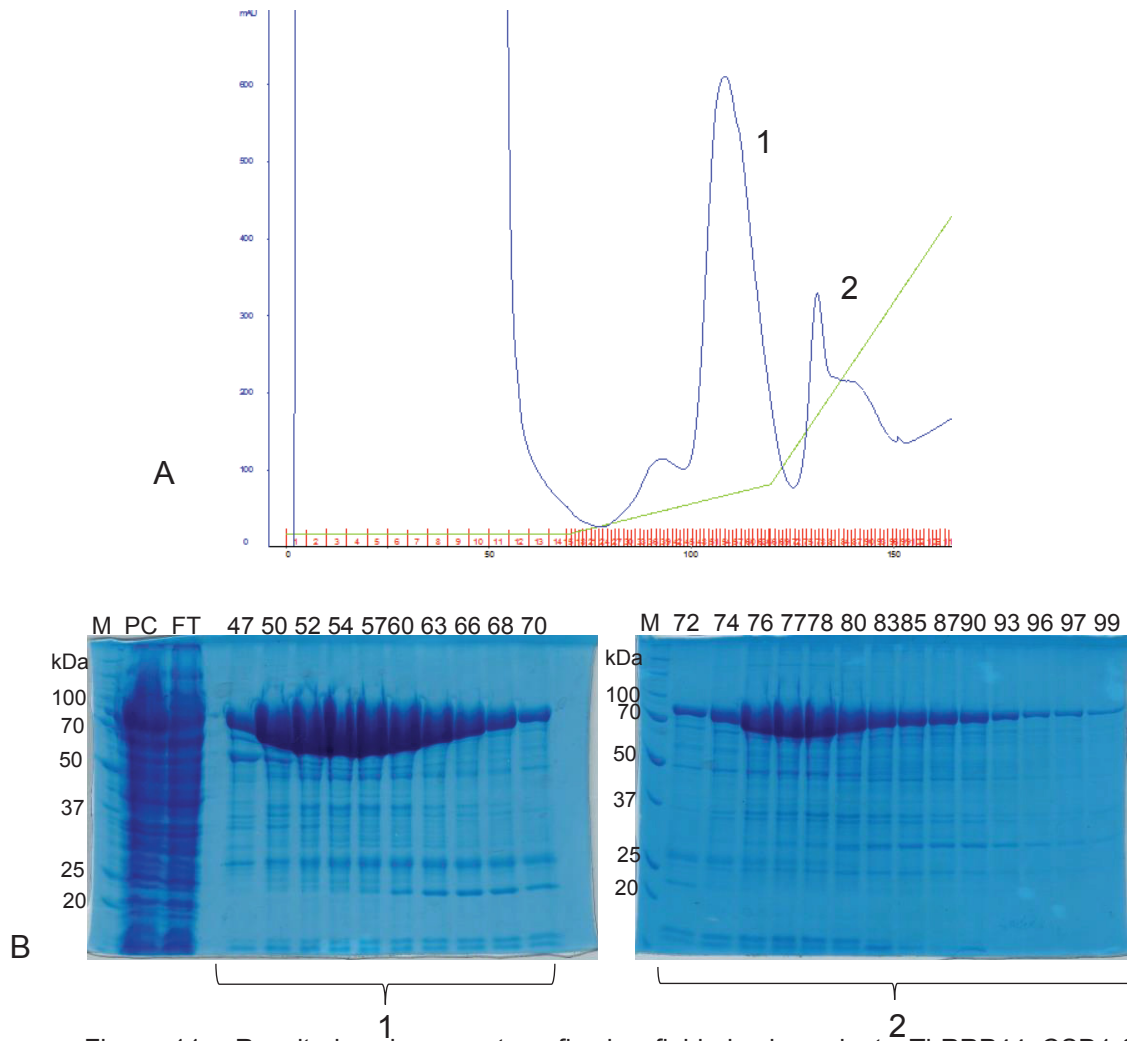


Figura 11 - Resultados da cromatografia de afinidade da variante TbRRP44_CSD1-S1. A: Cromatograma da purificação por afinidade a níquel, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicado a coluna e FT ao *flowthrough* (amostras que não se ligaram à coluna). No primeiro gel são mostradas as amostras referentes ao pico 1, enquanto no segundo, são mostradas amostras correspondentes ao pico 2.

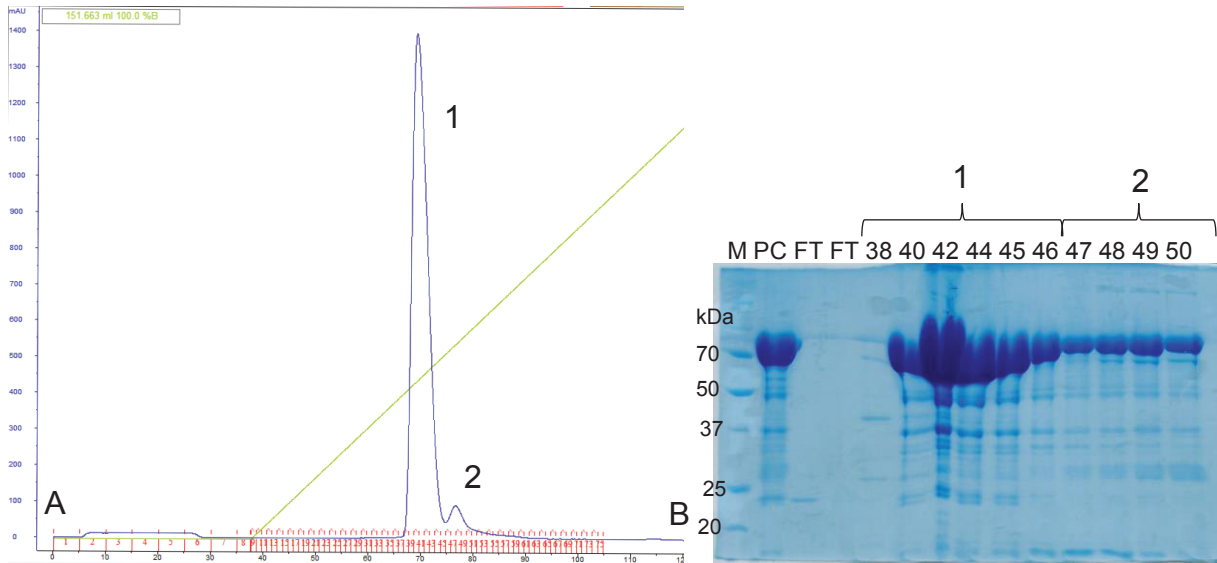


Figura 12 - Resultados da cromatografia de troca iônica da variante TbRRP44_CSD1-S1. A: Cromatograma da purificação por troca iônica, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicada na coluna e FT ao *flowthrough* (amostras que não se ligaram na coluna).

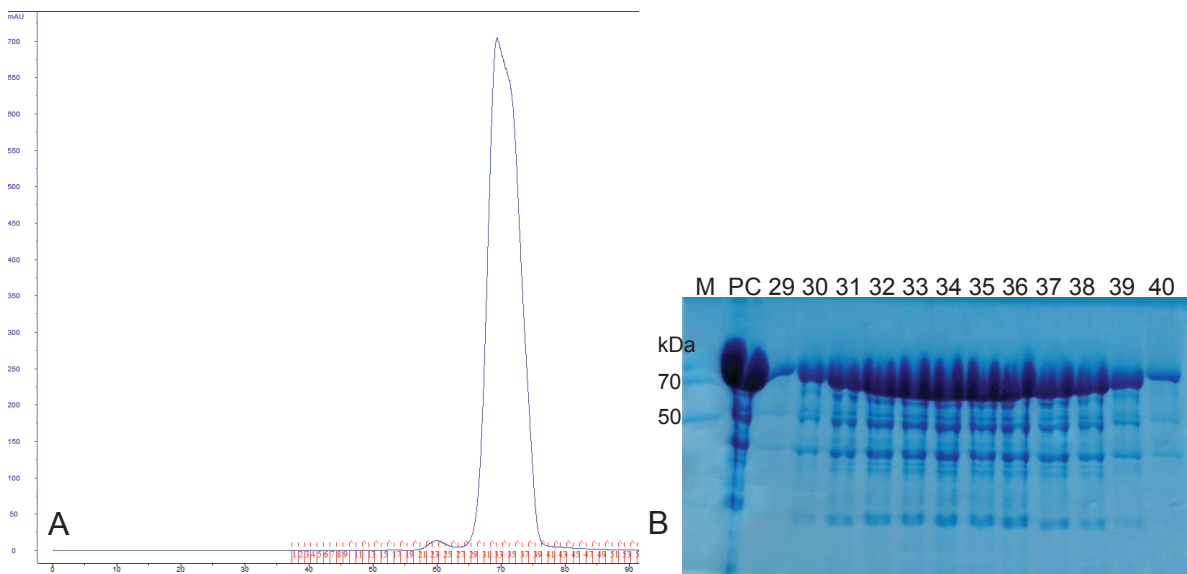


Figura 13 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da variante TbRRP44_CSD1-S1 em coluna Superdex 200 16/60. A: Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicada na coluna.

4.2.2 Expressão e Purificação da TbRRP44

A proteína TbRRP44 foi purificada a partir de 1 L de cultura bacteriana também em três etapas de cromatografia. Na cromatografia por afinidade nota-se a presença de um pico único (figura 14), que foi eluído em 32% do tampão B, as frações 28 a 33

foram diluídas 4 vezes em tampão A de troca iônica. No cromatograma da purificação por troca iônica observam-se dois picos, correspondendo à proteína de interesse (figura 15), sendo que o majoritário foi eluído em 28% e o menor em 32% de tampão B. As frações 36 a 38, correspondentes ao pico majoritário foram concentradas para 1mL para a etapa de purificação por exclusão de tamanho, em Superdex 200 16/60. Nessa nota-se também a presença de dois picos no cromatograma (figura 16), sendo o primeiro um possível oligômero, eluído em 54 mL, e o segundo, correspondendo ao monômero, eluído em 65 mL. Apesar de possíveis bandas de degradação, as amostras 24 a 29 foram concentradas para 5 mg/mL para ensaios de cristalização.

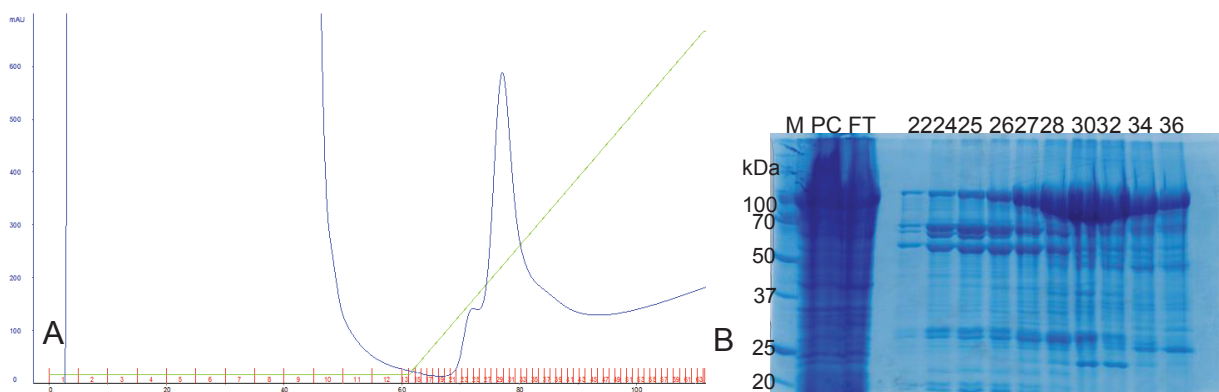


Figura 14 - Resultados da cromatografia por afinidade a níquel da TbRRP44. A: Cromatograma da purificação por afinidade a níquel, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicada na coluna e FT ao *flowthrough* (amostra que não se ligou à coluna).

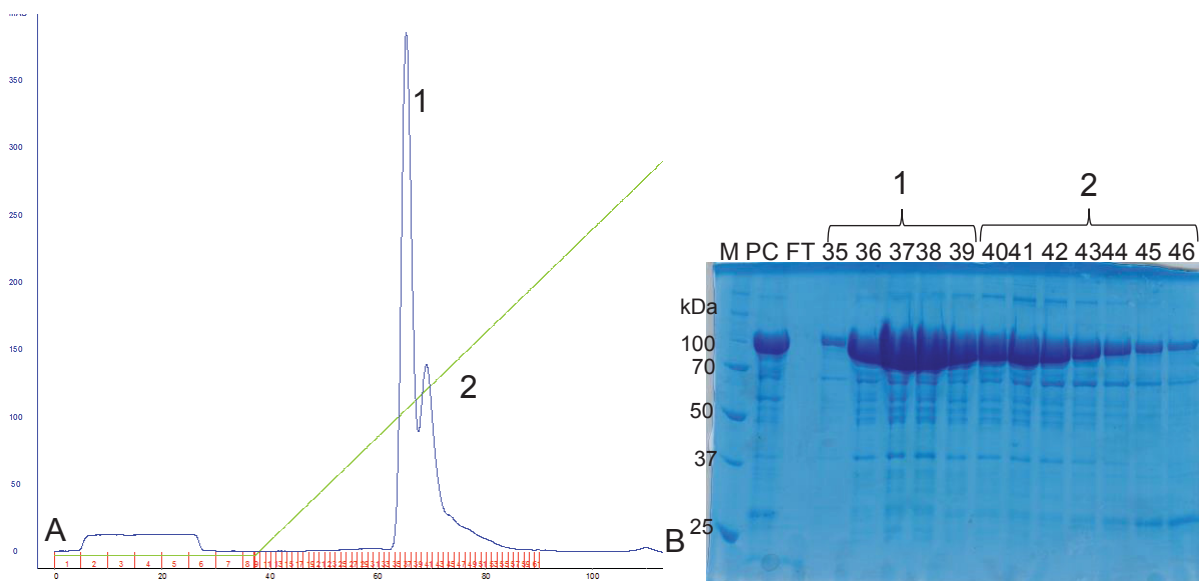


Figura 15 - Resultados da cromatografia de troca iônica da TbRRP44. A: Cromatograma da purificação troca iônica, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicada na coluna e FT ao *flowthrough* (amostra que não se ligou à coluna).

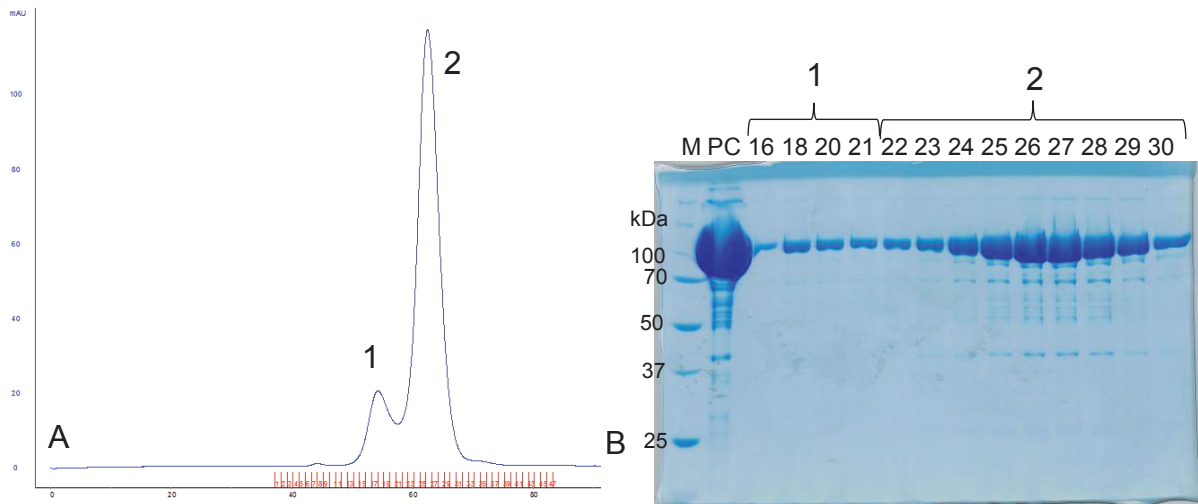


Figura 16 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da TbRRP44 em coluna Superdex 200 16/60. A: Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicado a coluna.

4.2.3 Expressão e Purificação da Variante TbRRP44_NPIN

A purificação da variante TbRRP44_NPIN foi feita a partir de 1 L cultura bacteriana, passando também por três etapas de purificação. Na purificação por afinidade notam-se 3 picos no cromatograma (figura 17), os dois picos indicados correspondem a proteína de interesse, o pico 1 foi eluído em 29% e o 2 em 37% de tampão B. As amostras 78 a 85, referentes ao pico 1, foram diluídas 6 vezes em tampão A de troca iônica para diminuição da concentração de sal. A segunda etapa de purificação resultou no aparecimento de 4 picos correspondendo à mesma proteína (figura 18), sendo que o primeiro foi eluído em 29%, o segundo em 37%, o terceiro em 52% e o quarto em 62% de tampão B. As amostras correspondentes aos três últimos picos foram analisadas por dicroísmo circular para detecção de possíveis diferenças conformacionais da proteína (seção 4.3). Então foram escolhidas as frações do terceiro pico, 55 a 65, essas foram concentradas para 1 mL para a última etapa de purificação. Na cromatografia por exclusão de tamanho, realizada em coluna Superdex 75 16/60, observou-se a presença de um único pico (figura 19), eluído em 73 mL. As frações 34 a 37 foram reunidas e concentradas para 5 mg/mL para ensaios de cristalização.

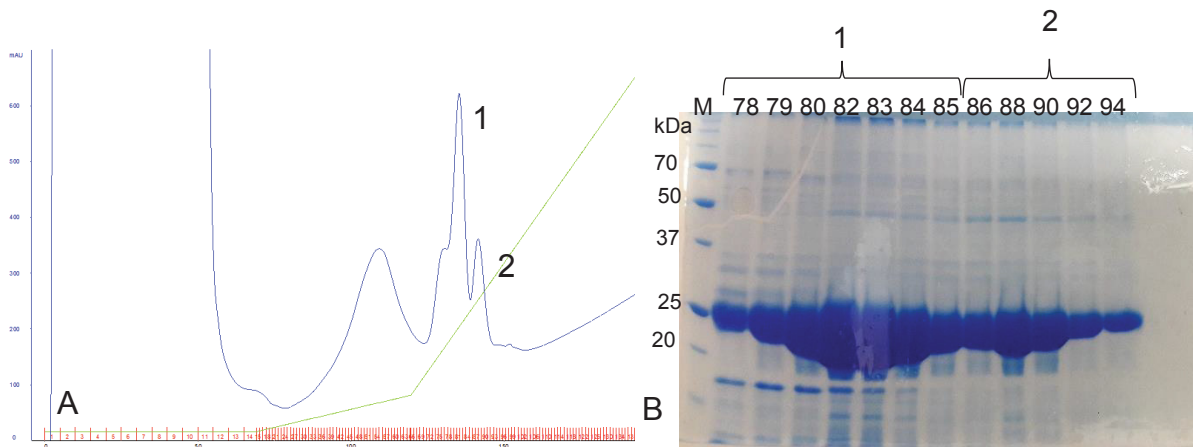


Figura 17 - Resultados da cromatografia de afinidade da variante TbRRP44_NPIN. A: Cromatograma da purificação por afinidade a níquel, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicado a coluna e FT ao *flowthrough* (amostra que não se ligou à coluna).

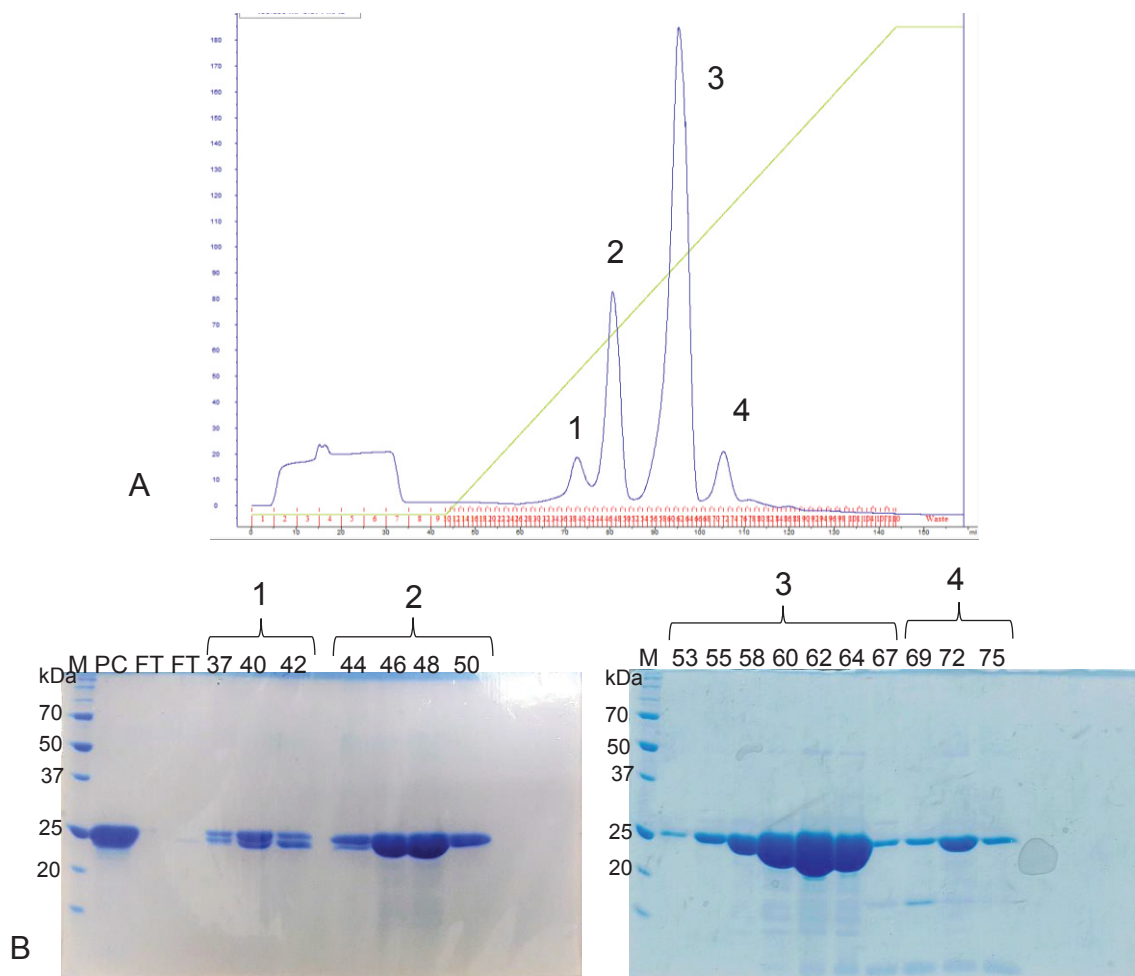


Figura 18 - Resultados da cromatografia de troca iônica da variante TbRRP44_NPIN. A: Cromatograma da purificação troca iônica, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha verde mostra o gradiente de tampão B. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicado a coluna e FT ao *flowthrough* (amostra que não se ligou à coluna).

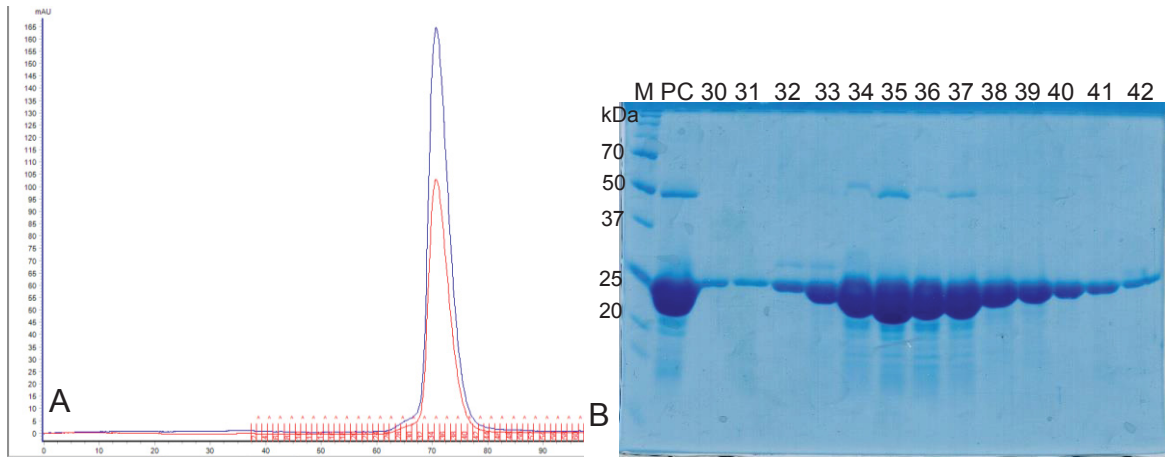


Figura 19 - Resultados da cromatografia por exclusão de tamanho da variante TbRRP44_NPIN em Superdex 75 16/60. A: Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho, sendo o eixo “y” a absorbância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e em vermelho as frações coletadas. A linha vermelha mostra a absorbância a 260 nm. B: SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma. M refere-se ao marcador de peso molecular, PC corresponde à amostra aplicado a coluna.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA VARIANTE TbRRP44-NPIN POR DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

A ligação de metais aos domínios PIN com atividade endonucleolítica tem sido descrita na literatura (MATELSKA; STECZKIEWICZ; GINALSKI, 2017). Além disso, tendo em vista os resultados obtidos na purificação de TbRRP44_NPIN, indicando heterogeneidade da proteína, ensaios de dicróismo circular foram realizados na presença de metais e/ou EDTA a fim de investigarmos possíveis alterações em sua estrutura.

Amostras correspondentes aos picos 2, 3 e 4 eluídos da coluna de troca iônica (figura 18) foram analisados para comparação entre suas conformações e após incubação com EDTA 2,5 mM e $MnCl_2$ 0,1mM. A tentativa de incubação com $ZnCl_2$ provocou a precipitação da amostra, impossibilitando a análise. Os espectros de CD nas diferentes condições são mostrados nas figuras 20 a 23.

Analisando os espectros de dicróismos circular mostrados na figura 20, nota-se uma pequena diferença no espectro correspondente ao pico 4 o que poderia ser explicado pelo fato do pico 4 corresponder à proteína TbRRP44_NPIN em seu estado dimérico, como previamente verificado através de cromatografia de exclusão por tamanho, ao contrário das amostras correspondentes aos picos 2 e 3 que apresentam-se como monômero de TbRRP44_NPIN (resultados não mostrado).

Ao comparar os espectros das amostras referentes aos três picos após incubação com EDTA ou $MnCl_2$ (figuras 21, 22 e 23), observa-se que não houve

alterações na estrutura das proteínas detectáveis por CD, indicando que os diferentes picos obtidos na cromatografia de troca iônica podem corresponder a alterações conformacionais locais que não alteram o conteúdo de estrutura secundária da proteína. Além disso, o papel da ligação dos metais nestas alterações não podem ser determinadas por esta técnica.

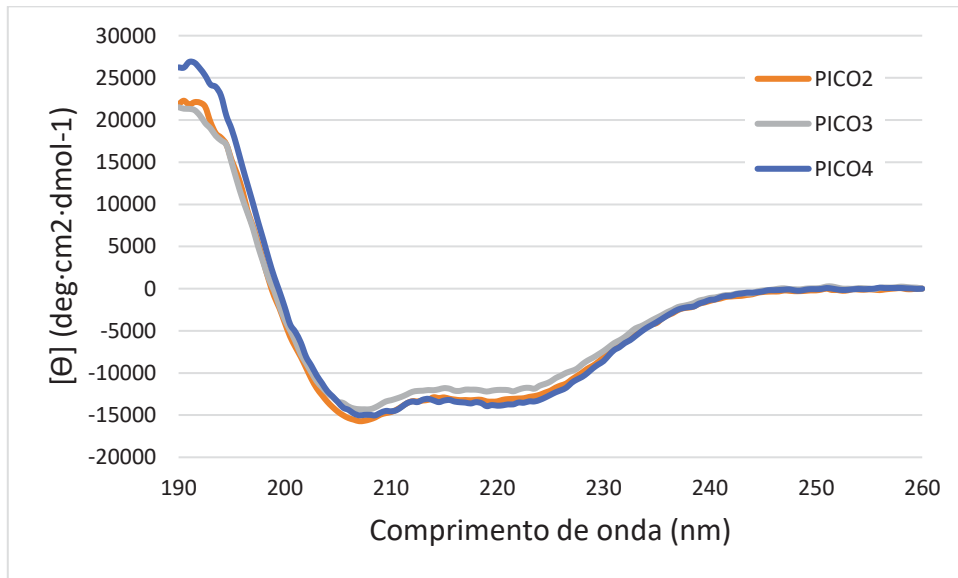


Figura 20 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes aos picos de eluição 2, 3 e 4 da cromatografia por troca iônica.

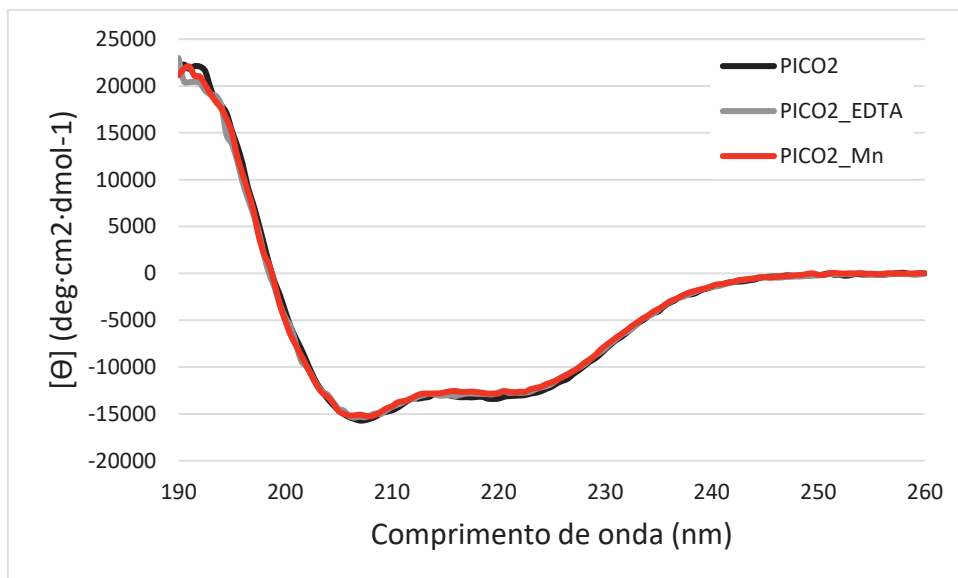


Figura 21 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 2 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl₂.

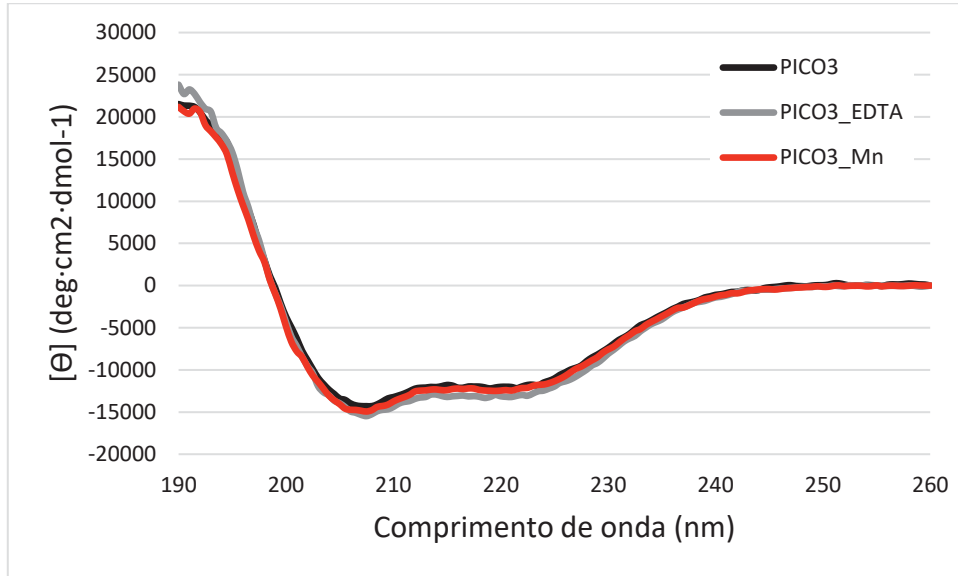


Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 3 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl_2 .

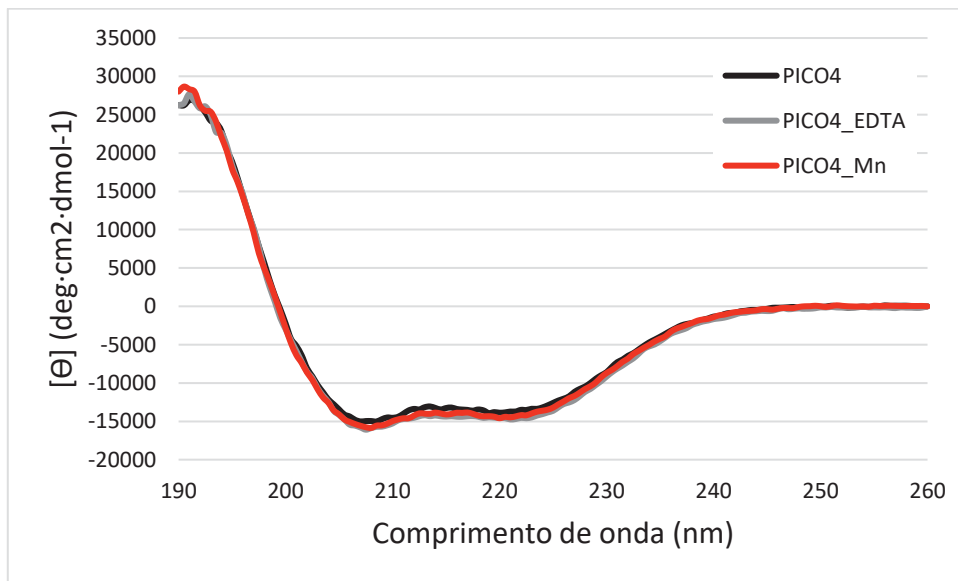


Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular de TbRRP44_NPIN. Amostras correspondentes ao pico 4 da cromatografia por troca iônica na presença de EDTA e MnCl_2 .

Também foram realizados ensaios de desnaturação térmica através de medida de sinal de dicroísmo circular a 208 nm, entre 20°C e 90°C (figura 24). Nota-se que a proteína se mantém estável até aproximadamente 50°C, temperatura a partir da qual, observa-se perda de estrutura.

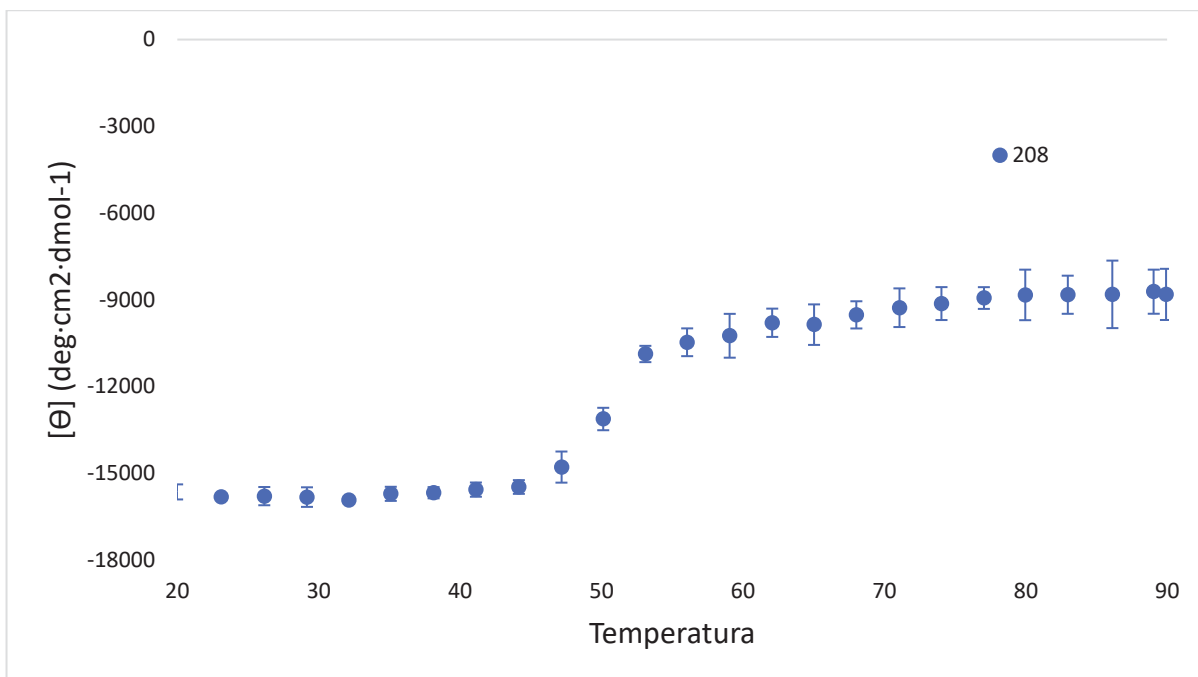


Figura 24 – Análise da desnaturação térmica de TbRRP44_NPIN. Sinal de dicroísmo circular em 208 nm em função da temperatura.

4.4 CRISTALIZAÇÃO DE TbRRP44 E TbRRP44_NPIN

Os ensaios iniciais de cristalização da proteína TbRRP44 e a variante TbRRP44_NPIN apresentaram condições promissoras, sendo a primeira na condição E8 do kit JCSG (fosfato de amônio dibásico 1 M; Acetato de sódio 0,1 M pH 4,5) e a segunda na condição B10 do kit Pact Premier (0,2 M MgCl₂; 0,1 M MES pH 6; 20% PEG 6000) e A5 do kit JCSG (Formato de Magnésio dihidratado; 20% PEG 3350) (figura 25).

Foram feitos refinamentos para a TbRRP44 alterando o sal e o pH, porém apenas observou-se precipitado cristalino e não cristais como era esperado, enquanto para a variante TbRRP44_NPIN foram realizados refinamentos para a condição B10 alterando a concentração do sal, o pH e a porcentagem do PEG, porém a condição inicial se mostrou a melhor.

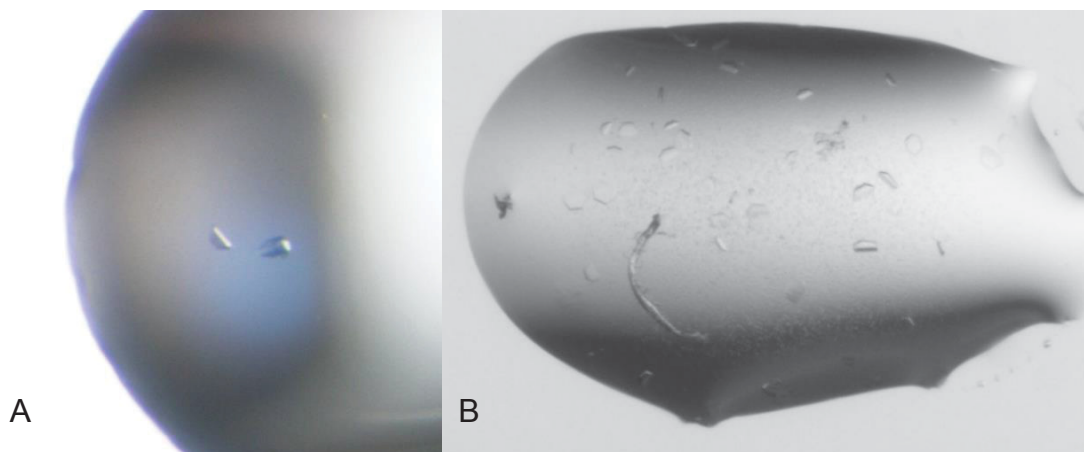


Figura 25 –. A: Cristais da TbRRP44 obtido na condição E8 do kit JCSG. B: Cristais de TbRRP44_NPIN de forma hexagonal observados na condição B10 do kit Pact Premier.

Após as primeiras coletas de dados de difração de raio X, notou-se que os cristais da variante TbRRP44_NPIN eram múltiplos e que formavam placas, o que atrapalharia no processamento dos dados e que o único cristal da TbRRP44 encontrado era um cristal de sal.

Novos ensaios de cristalização foram realizados com a variante TbRRP44_NPIN, porém o PEG utilizado foi alterado para o PEG 3350, presente em outra condição, A5 do kit JCSG. Os cristais formados na presença de PEG 3350 continuaram a apresentar placas, porém eram mais bem formados e maiores (figura 26).

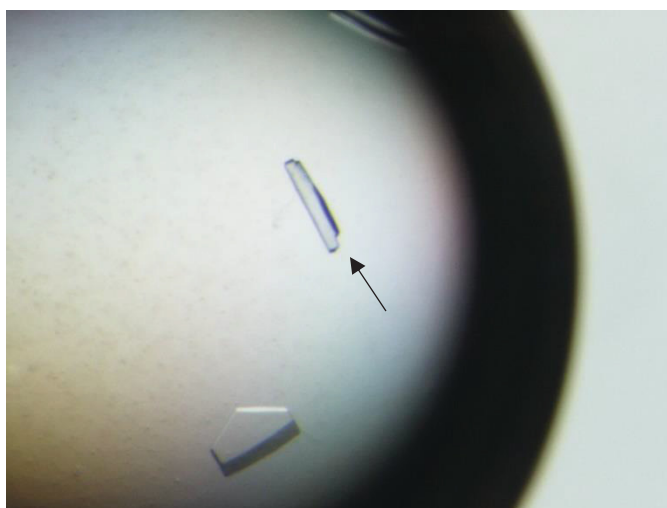


Figura 26 - Cristais de TbRRP44_NPIN obtidos após refinamento com PEG 3350. Cristais maiores em relação ao mostrado anteriormente, porém apresentando placas sobrepostas, como indicado pela seta.

4.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA VARIANTE TbRRP44_NPIN

Foram realizadas duas coletas de dados no Sincrotron SOLEIL (França) sendo levados em torno de 30 cristais da variante TbRRP44_NPIN para a coleta de dados, a qualidade dos dados de difração variou entre os cristais devido ao fato dos cristais apresentarem múltiplas placas, este obstáculo também dificultou a indexação das reflexões. Após análise de vários conjuntos de dados, foi possível identificar um de melhor qualidade e a partir deste conjunto de dados foram obtidas estatísticas mostradas a seguir (tabela 2). Esses dados também foram utilizados para determinação da estrutura. A primeira etapa do processamento dos dados mostrou que a simetria do cristal foi $P6_5$ e a mais alta resolução foi de 2,3 Å.

TABELA 2 – ESTATÍSTICA DOS DADOS

Fonte	SOLEIL-PX1
Comprimento de Onda (Å)	1,2824
Resolução (Å)	50 – 2,3 (2,5 - 2,30)
Grupo espacial	$P6_5$
Célula Unitária	a=b= 89,57 c=321,61
Reflexões observadas	1300612 (204730)
Reflexões Únicas	128512 (20379)
Completeza (%)	99,6 (97,9)
Multiplicidade	10,1 (10)
Rmeas (%)	14,1 (179,2)
I/σ	13,92 (1,00)
CC $\frac{1}{2}$	99,8 (41,9)
SigAno	1,03 (3,08 Å)
ccAno	19 (3,08)

FONTE: o autor (2018). *Os valores entre parêntesis correspondem à última camada de resolução.

A partir da determinação da célula unitária, a porcentagem de solvente e a quantidade de moléculas na unidade assimétrica foram estimadas. A porcentagem de

solvente encontrada foi de 51%, valor coerente, sendo a porcentagem possível de 27% a 78% (KANTARDJIEFF, 2003). Enquanto foram encontradas 6 moléculas na unidade assimétrica.

Utilizando o programa SHELX foi possível determinar a posição dos átomos pesados, para isso foi selecionado o método SAD (Single Anomalous Wavelength Diffraction). Para o cálculo das posições foi fornecido ao programa a informação de que em cada célula assimétrica existiam 6 moléculas e à cada molécula existia um átomo de zinco ligado.

Após a determinação da posição dos átomos pesados foi realizado o cálculo das fases iniciais, possibilitando o cálculo do mapa experimental e foi realizado o achatamento de solvente utilizando-se os programas Phaser e Parrot, respectivamente.

Para a construção inicial automática do modelo foi utilizado o programa Buccaneer, para isso foi fornecido ao programa o mapa experimental e a sequência de aminoácidos. Foi possível construir automaticamente cerca de 80% da cadeia. As altas porcentagens obtidas indicam a boa qualidade do mapa experimental (figura 27).

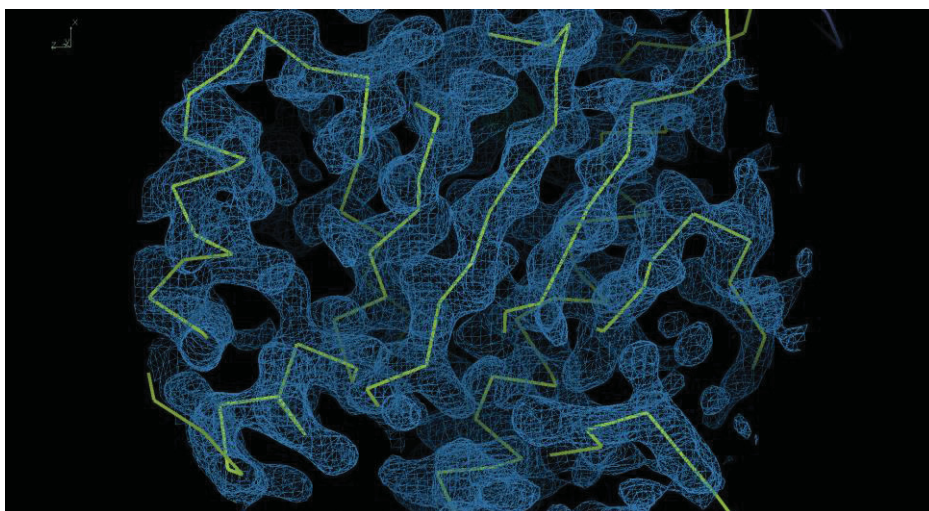


Figura 27 – Modelo inicial de TbRRP44_NPIN construído pelo programa Buccaneer. Em amarelo é mostrada a cadeia principal e o mapa experimental, em azul, está contornado a 1σ .

A partir do modelo inicial foi realizado o refinamento da estrutura, sendo alternados ciclos de refinamento pelo programa BUSTER e construção manual e refinamento pelo COOT. Para a identificação das posições dos átomos de zinco no modelo, foi utilizado o mapa de diferença anômala, mapa gerado utilizando-se como amplitudes para o cálculo da função densidade eletrônica, a diferença média das amplitudes dos pares de Friedel. Através do mapa foi possível confirmar a presença

do motivo de ligação a zinco, situado na região N-terminal da proteína (figura 28). Além disso, observou-se a presença de um segundo sítio de ligação a zinco coordenado pelas cadeias laterais dos resíduos H175, H69 e N70, que ainda não havia sido descrito (figura 29).

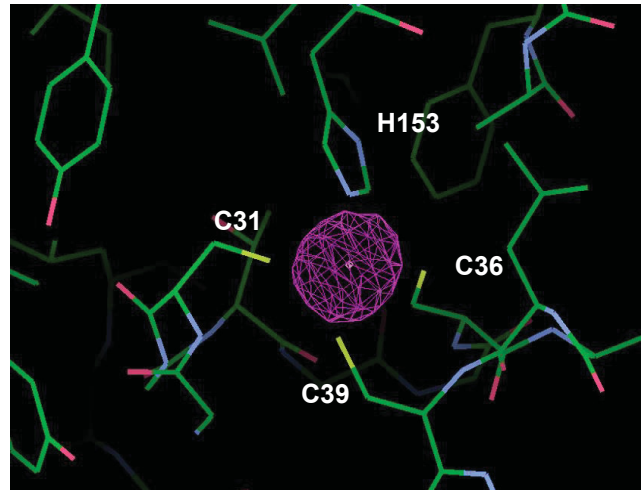


Figura 28 - Motivo de ligação a zinco CR3 em TbRRP44. Mapa de diferença anômala em rosa contornado a 10σ .

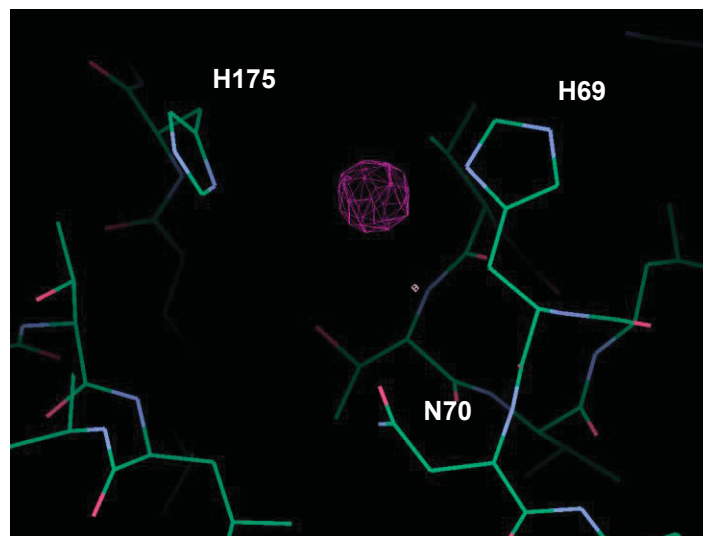


Figura 29 - Segundo sítio de ligação a zinco presente na estrutura de TbRRP44 entre os aminoácidos H69, N70 e H175. Mapa de diferença anômala em rosa, contornado a 5σ .

Conforme o refinamento foi sendo realizado, foi possível modelar o sítio ativo da proteína. Nesta região encontraram-se picos positivos no mapa diferença (Fo-Fc) que sugerem a presença de metais (figura 30, A), já que domínios PIN podem possuir até 3 íons divalentes sendo coordenados no sítio ativo, como Mg^{2+} e Mn^{2+} (MATELSKA; STECZKIEWICZ; GINALSKI, 2017). Devido à presença de magnésio na solução de cristalização foram adicionados dois íons de magnésio em cada sítio ativo de cada monômero, com exceção do monômero A que não apresentou densidade

para o segundo metal. Porém no monômero B, notou-se que mesmo após a dição de magnésio ao modelo ainda observavam-se picos positivos do mapa diferença (Fo-Fc) (figura 30, B), indicando a presença de átomos de maior número atômico, por isso foram adicionados dois íons de manganês os quais resolveram os picos do mapa diferença de forma correta (figura 30, C).

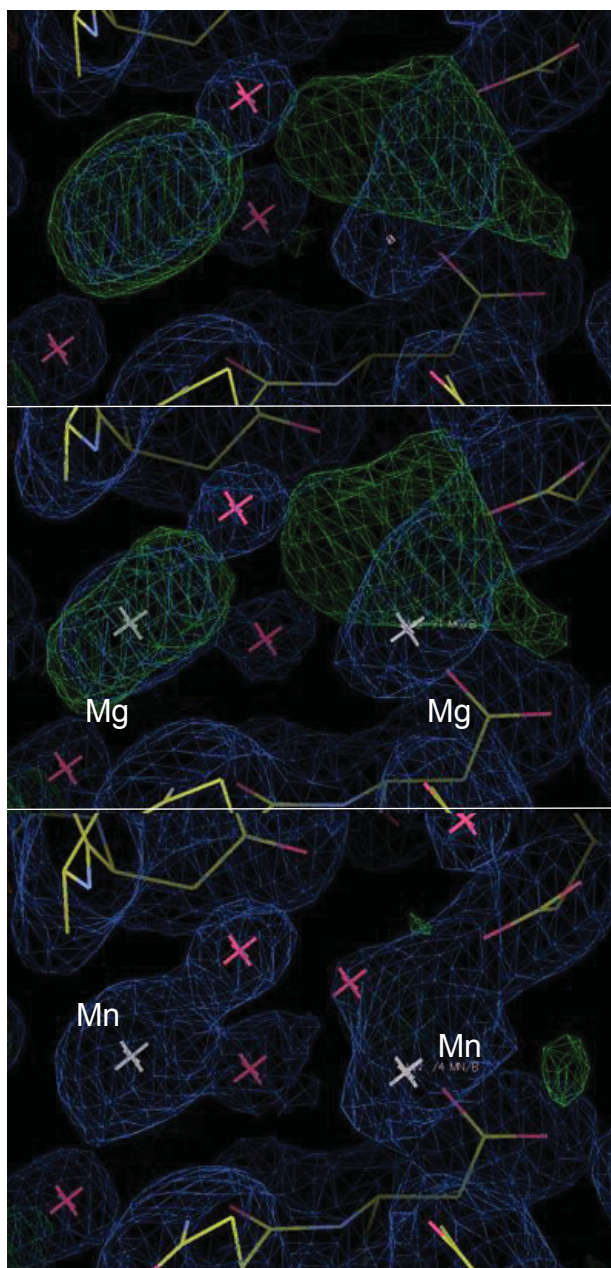


Figura 30 – Presença de Mn no sítio ativo do monômero B. O mapa $2Fo-Fc$ é mostrado em azul e está contornado a 1σ , enquanto o mapa $Fo-Fc$, em verde, está contornado a 3σ . A: Picos positivos no mapa $Fo-Fc$ presentes na região do sítio ativo. B: Adição de dois íons Mg no sítio ativo, porém sem resolver os picos positivos do mapa $Fo-Fc$. C: Adição de dois íons Mn no sítio ativo resolvendo os picos positivos do mapa $Fo-Fc$. As moléculas de água estão representadas como X vermelho.

Próximo do final do refinamento, percebeu-se ainda a presença de picos positivos no mapa $Fo-Fc$ que não correspondiam a moléculas de águas. Alguns íons

cloretos foram adicionados ao modelo, estes são, possivelmente, provenientes da solução de cristalização.

Ao final do refinamento a estrutura foi validada pelo servidor Molprobit. Um resumo da estatística final do refinamento é apresentado na tabela 3.

TABELA 3 - ESTATÍSTICA DO REFINAMENTO

Rwork	0,20
Rfree	0,23
RMSD comprimento de ligação (Å)/ RMSD ângulo de ligação (°)	0,01/1,13
Fator B médio (cadeia principal) (Å ²)	66,4
Número de átomos da proteína	8619
Zn/Mg/Mn/Cl	12/9/3/11
Moléculas de água	659
Gráfico Ramachandran	
Favoráveis (%)	94,3
Outliers (%)	0

FONTE: o autor (2018)

4.6 ANÁLISES ESTRUTURAIS

A estrutura do domínio PIN de TbRRP44 apresenta as cinco fitas β paralelas, sendo essas fitas posicionadas de maneira a possuir uma α hélice à frente e outra atrás da fita β , como anteriormente descrito por Matelska e colaboradores (2017). Os 6 monômeros presentes na unidade assimétrica são bastante semelhantes entre si (figura 31), sua sobreposição resulta em um RMSD variando entre 0,25 e 0,55 Å. Em 4 regiões flexíveis, 1) N-terminal; 2) região entre os resíduos 40 a 50; 3) região entre os resíduos 127 e 136; 4) região entre os resíduos 180 e 190 o mapa de densidade

eletrônica não permitiu a construção das cadeias. Nos monômeros A, D e E uma região adicional apresentou-se desordenada, entre os resíduos 127 e 136.

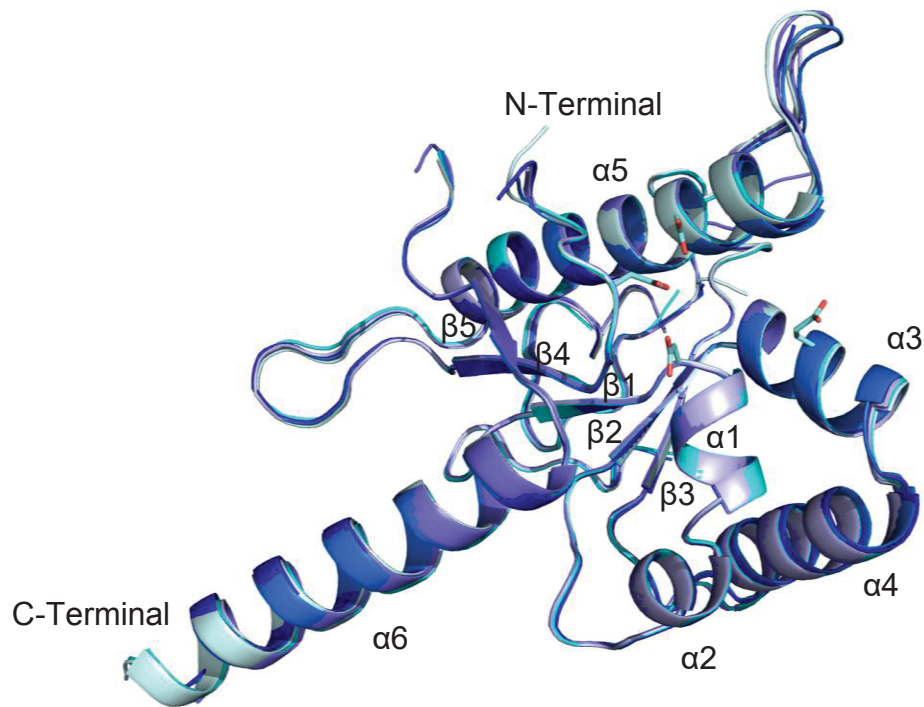


Figura 31 - Sobreposição dos seis monômeros de TbRRP44_NPIN presentes na unidade assimétrica e identificação das estruturas secundárias.

O sítio endonucleolítico de TbRRP44 é composto pelos aminoácidos D63, E91, D140 e D176. Os rotâmetros das cadeias laterais desses resíduos se conservam nos seis monômeros com a exceção do E91, que apresenta uma variabilidade conformacional como mostrado na figura 32.

Como mencionado anteriormente um segundo sítio de ligação a zinco foi identificado na estrutura de TbRRP44 formado pelos resíduos H69, N70 e H175 não conservados em estruturas homólogas. Devido a sua proximidade ao sítio ativo (figura 33) pode-se especular se a ligação ao zinco estaria relacionada à uma regulação da ligação do substrato ao sítio endonucleolítico de TbRRP44.

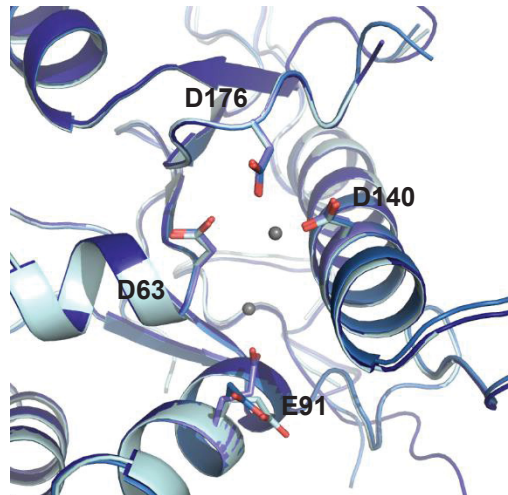


Figura 32 – Representação do sítio catalítico do domínio PIN de TbRRP44. A cadeia lateral do resíduo E91 apresenta maior variabilidade conformacional como pode ser visto através da sobreposição dos monômeros C, E e F (azul claro até o mais escuro). Em cinza estão representados os metais encontrados no sítio catalítico.

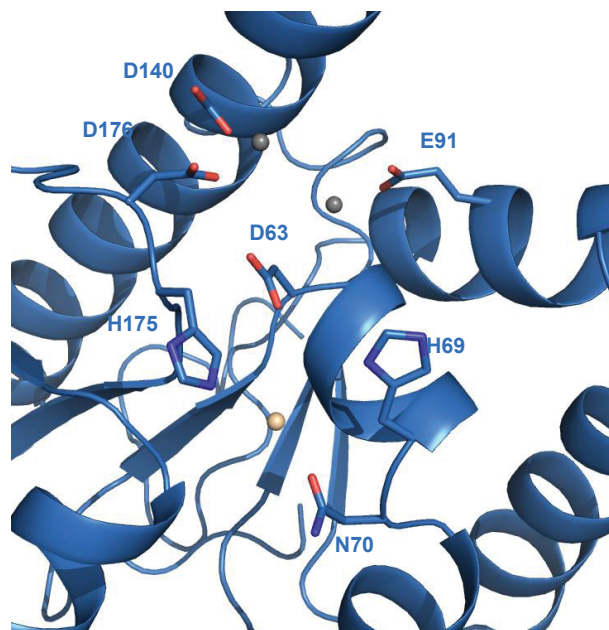


Figura 33 – Representação do segundo sítio de ligação a zinco identificado de TbRRP44. As esferas em cinza representam os íons de Mg e em amarelo é representado o Zn.

Para as análises estruturais a seguir foi escolhido o monômero F para comparação com as estruturas homólogas.

Foi realizada a sobreposição da estrutura obtida do domínio PIN de TbRRP44 com a do domínio PIN de Rrp44 de *S. cerevisiae* (ScRrp44) tanto na conformação 1, ou seja em associação com o core do exossomo (PDB: 5JEA), quanto na conformação 2, independente do Exo-9 (PDB: 5K36). A estrutura de TbRRP44 é bastante conservada em relação às de ScRrp44, sendo observado RMSD de 1,22 Å para a

sobreposição com a estrutura no estado 1 e 1,45 Å no estado 2. No entanto observa-se a presença de uma inserção no domínio PIN de TbRRP44 entre $\alpha 5$ e $\beta 4$ (figura 34, seta 1), enquanto existe uma inserção na estrutura de ScRrp44 (figura 34, seta 2). Além da presença de um *loop* na estrutura de TbRRP44 que substituído por uma hélice na estrutura de ScRRP44 na conformação 2 (figura 34, circulado).

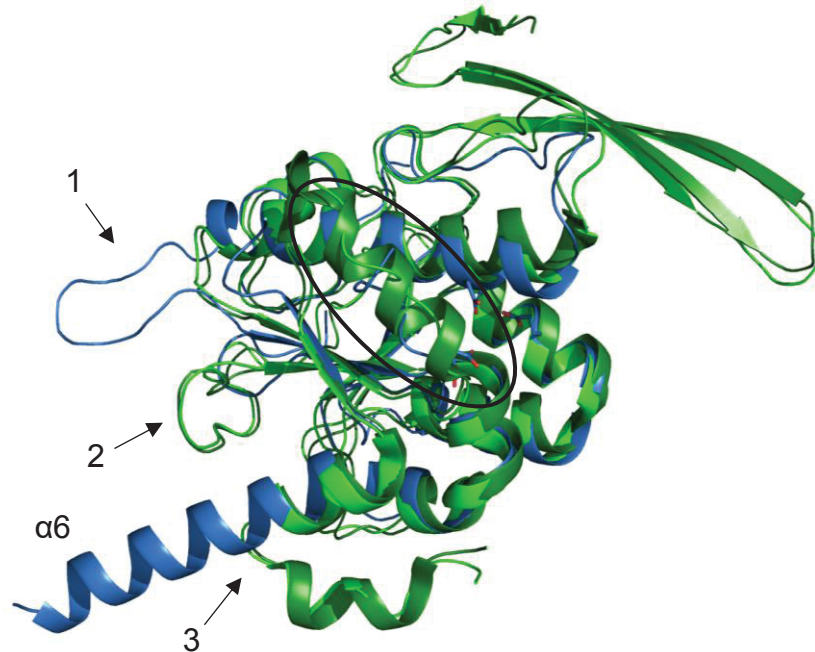


Figura 34 – Sobreposição dos domínios PIN de TbRRP44 e ScRrp44 nas duas conformações. Em azul pode ser vista a estrutura de TbRRP44, em verde claro a estrutura de ScRrp44 na conformação 1 e em verde escuro na conformação 2. As principais diferenças estruturais são indicadas.

A sobreposição da estrutura de TbRRP44_NPIN com a de ScRrp44 também mostrou, que na região C-terminal do domínio PIN de TbRRP44 existe uma hélice longa ($\alpha 6$), enquanto em ScRrp44 ocorre uma quebra nessa hélice (figura 34, seta 3). Além disso, nas estruturas cristalográficas de ScRRP44 um segmento entre o domínio PIN e o domínio CSD1 está ausente no modelo, indicando que esta região é flexível, o que é condizente com a mudança conformacional observada entre os estados 1 e 2 (figura 35). A ausência dessa quebra na hélice em TbRRP44 poderia indicar uma diferença no posicionamento do domínio PIN em relação aos demais domínios, em relação à estrutura de ScRrp44. Deve-se considerar o fato da variante TbRRP44_NPIN ter sua sequência truncada logo após o término da hélice $\alpha 6$, o que não permite a completa comparação entre as duas estruturas, mas é interessante ressaltar a presença de uma prolina em ScRrp44 na posição de quebra da hélice $\alpha 6$ (Pro226). Tal resíduo, conhecido por desestabilizar estruturas em α -hélice, é substituído por uma valina em TbRRP44.

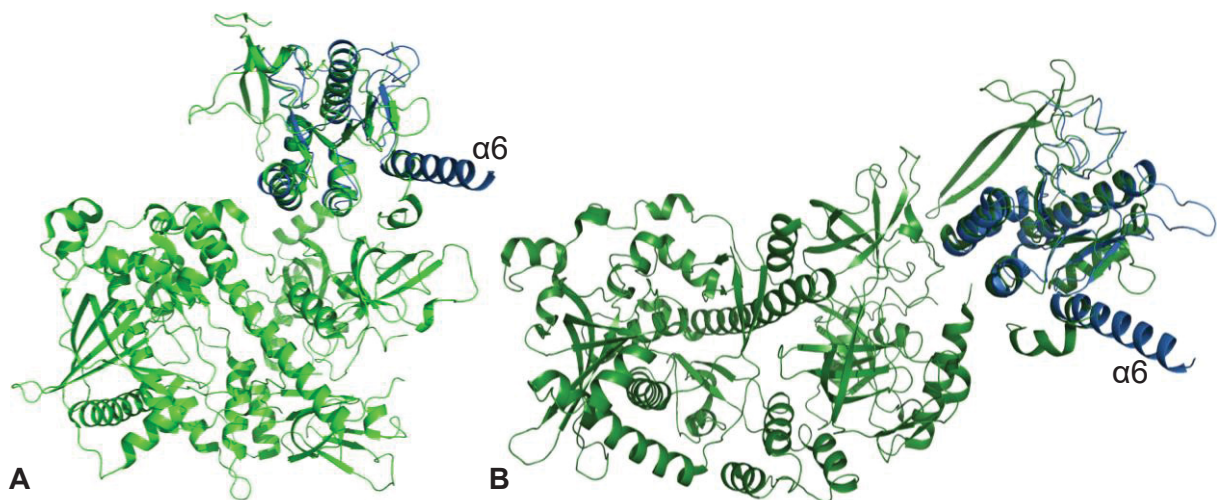


Figura 35 - Sobreposição do domínio PIN de TbRRP44 com as estruturas de ScRrp44 nas duas conformações. A: Sobreposição do domínio PIN de TbRRP44, azul, com a ScRrp44 inteira na conformação 1 (verde claro); B: Sobreposição do domínio PIN de TbRRP44, em azul, com a ScRrp44 inteira na conformação 2 (verde escuro). A hélice $\alpha 6$ de TbRRP44 é identificada.

O sítio catalítico das duas proteínas também é bastante conservado, como visto na figura 36 A, porém as duas estruturas de ScRrp44 usadas para comparação possuem uma mutação no resíduo D171N. A figura 36 B mostra o segundo sítio de ligação a zinco identificado em TbRRP44_NPIN, próximo ao sítio ativo, formado pelos resíduos H69, N70 e H175. Tais resíduos são substituídos por Q97, A98 e N197, respectivamente em ScRRP44.

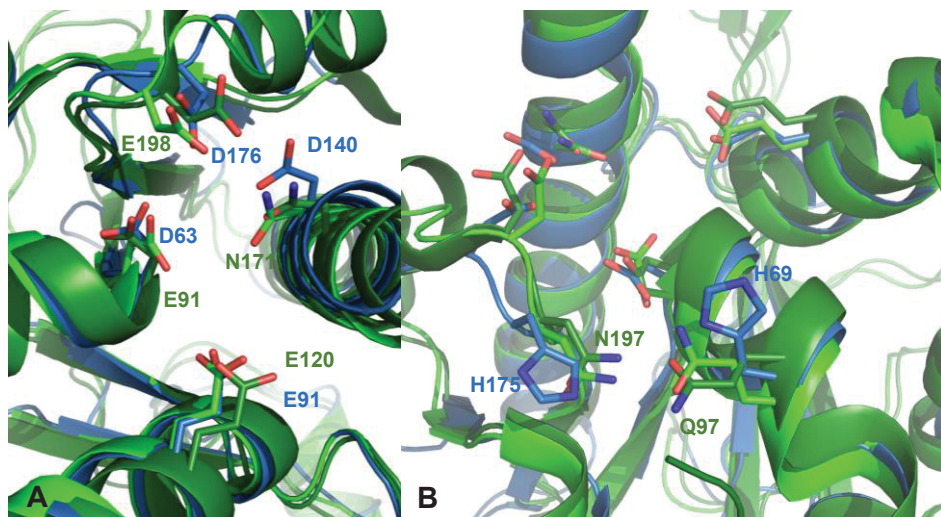


Figura 36 – Comparação entre o sítio ativo de TbRRP44 e ScRrp44. Em A: Nota-se a conservação estrutural entre os sítios ativos. Em B: Presença do segundo sítio de ligação a zinco na estrutura de TbRRP44.

Matelska e colaboradores (2017) determinaram 5 classificações estruturais para o domínio PIN, sendo uma proteína específica nomeando cada um: FEN; VapC;

NYN; PRORP; Mut7-C. O domínio PIN de TbRRP44 é classificado no grupo estrutural VapC, uma toxina de *Mycobacterium tuberculosis*. A sobreposição de TbRRP44_NPIN com VapC de *M. tuberculosis* (PDB: 4chg) apresenta um RMSD de 2,76Å, sendo observadas diferenças estruturais significativas. Somente a região do sítio catalítico e a folha β apresentam uma sobreposição estrutural, como pode ser visto na figura 37. Nota-se a presença de resíduo adicional no sítio catalítico de VapC, E116.

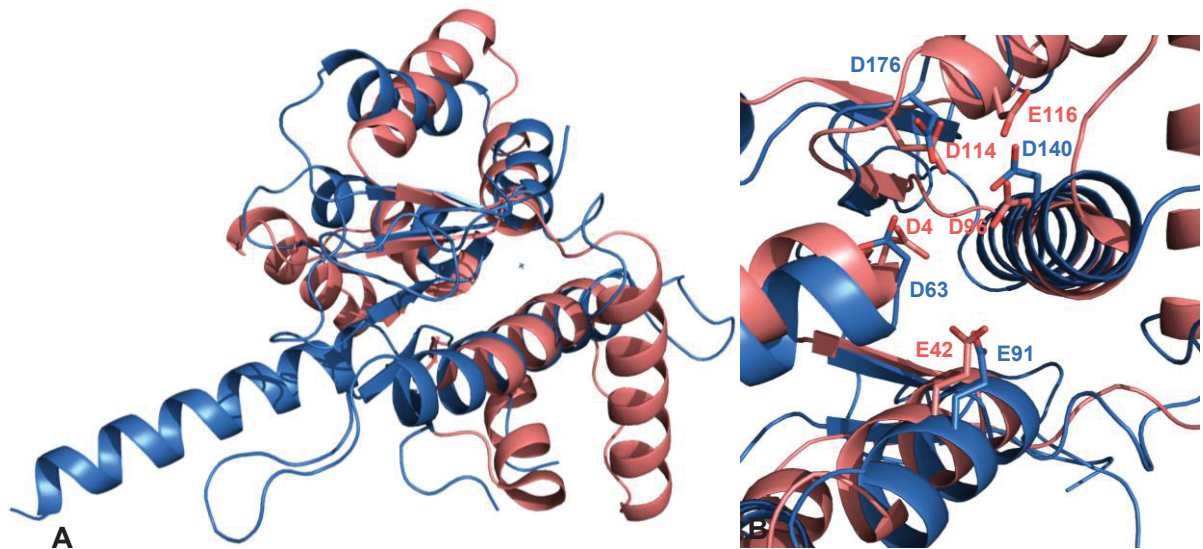


Figura 37 - Sobreposição da estrutura do domínio PIN de TbRRP44 (azul) e VapC (salmão). Em A: Sobreposição global entre as estruturas, em especial a sobreposição das 5 fitas β . Em B: Detalhe dos sítios catalíticos.

Devido ao fato da RRP44 de *T. brucei* não estar associada ao exossomo (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001), foi realizada uma análise comparativa entre os resíduos de ScRrp44 envolvidos na interação com as subunidades do Exo-9, nas duas conformações da proteína. Em relação à estrutura de ScRRP44 na conformação 1, que faz interação com as subunidades Rrp41 e Rrp42 do exossomo, observa-se uma substituição não conservativa de 3 resíduos na proteína de *T. brucei*: R133Q, H149S (interação com Rrp41) e R160M (interação com Rrp42) e a conservação do resíduo D44 (figura 38). Enquanto em relação à estrutura de ScRrp44 na conformação 2 que interage apenas com a Rrp41, ocorrem as duas mesmas alterações, R133Q e H149S, e a conservação do D44, além de uma alteração do resíduo R122Q. Nota-se que os resíduos de ScRrp44 são resíduos básicos e são substituídos por resíduos polares na estrutura de TbRRP44 (figura 39), o que sugere uma alteração de carga na superfície e no potencial para interações com outras subunidades.

A fim de analisarmos se tal substituição de resíduos também ocorre em RRP44 de outros tripanossomatídeos foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína RRP44 dos organismos *S. cerevisiae*, *Leishmania major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, utilizando-se o programa (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (figura 40). Dos 28 resíduos que participam da interação de ScRrp44 com as outras subunidades do exossomo, 8 são conservados nos tripanossomatídeos analisados, 5 apresentam substituição conservativa, ou seja, o resíduo foi substituído por outro que conserva suas propriedades, e 15 substituições não conservativas são observadas. Além disso, é interessante notar que o resíduo de prolina (P226), responsável pela quebra da hélice α_6 do domínio PIN de ScRrp44 também não é conservado em RRP44 de *L. major* e *T. cruzi*.

As substituições de resíduos descritos por participarem da interação de Rrp44 com as outras subunidades do exossomo em leveduras, além da diferença estrutural da hélice α_6 do domínio PIN observada em TbRRP44 podem indicar as bases moleculares da não associação de RRP44 com o complexo Exo-9 em tripanossomatídeos, como observado por Estévez e colaboradores (2001) em *T. brucei* e Cristodero e colaboradores (2008) em *L. tarentolae*.

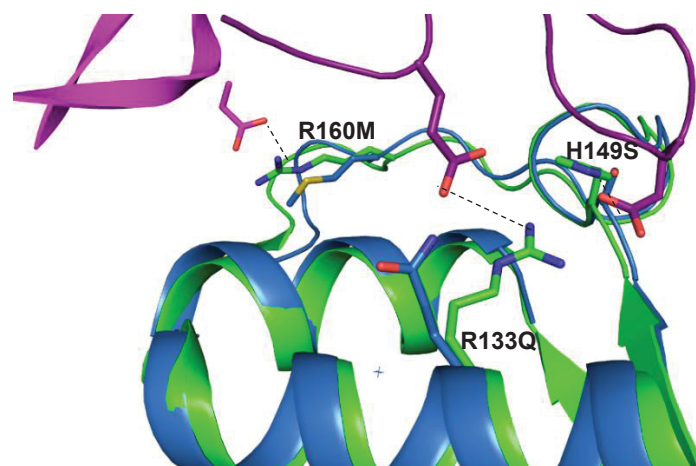


Figura 38 – Comparação entre a interface de interação do domínio PIN de ScRRP44 na conformação 1 com a estrutura do domínio PIN de TbRRP44. Em Azul está representada a estrutura de TbRRP44, em verde a de ScRRP44, em roxo escuro está a estrutura da proteína Rrp41 e em magenta a estrutura da Rrp42, sendo as duas últimas constituintes do Exo-9.

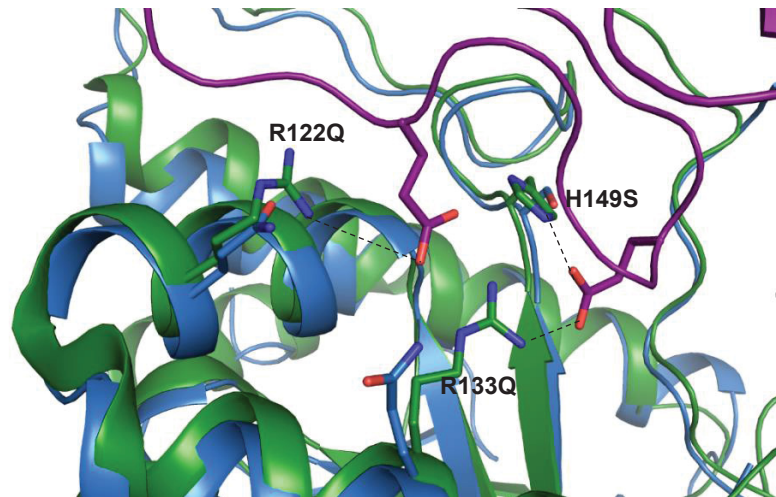


Figura 39 - Comparação entre a interface de interação do domínio PIN de ScRRP44 na conformação 2 com a estrutura do domínio PIN de TbRRP44. Em Azul está representada a estrutura de TbRRP44, em verde a de ScRRP44, em roxo escuro está a estrutura correspondente a proteína Rrp41, sendo esta última constituinte do Exo-9.

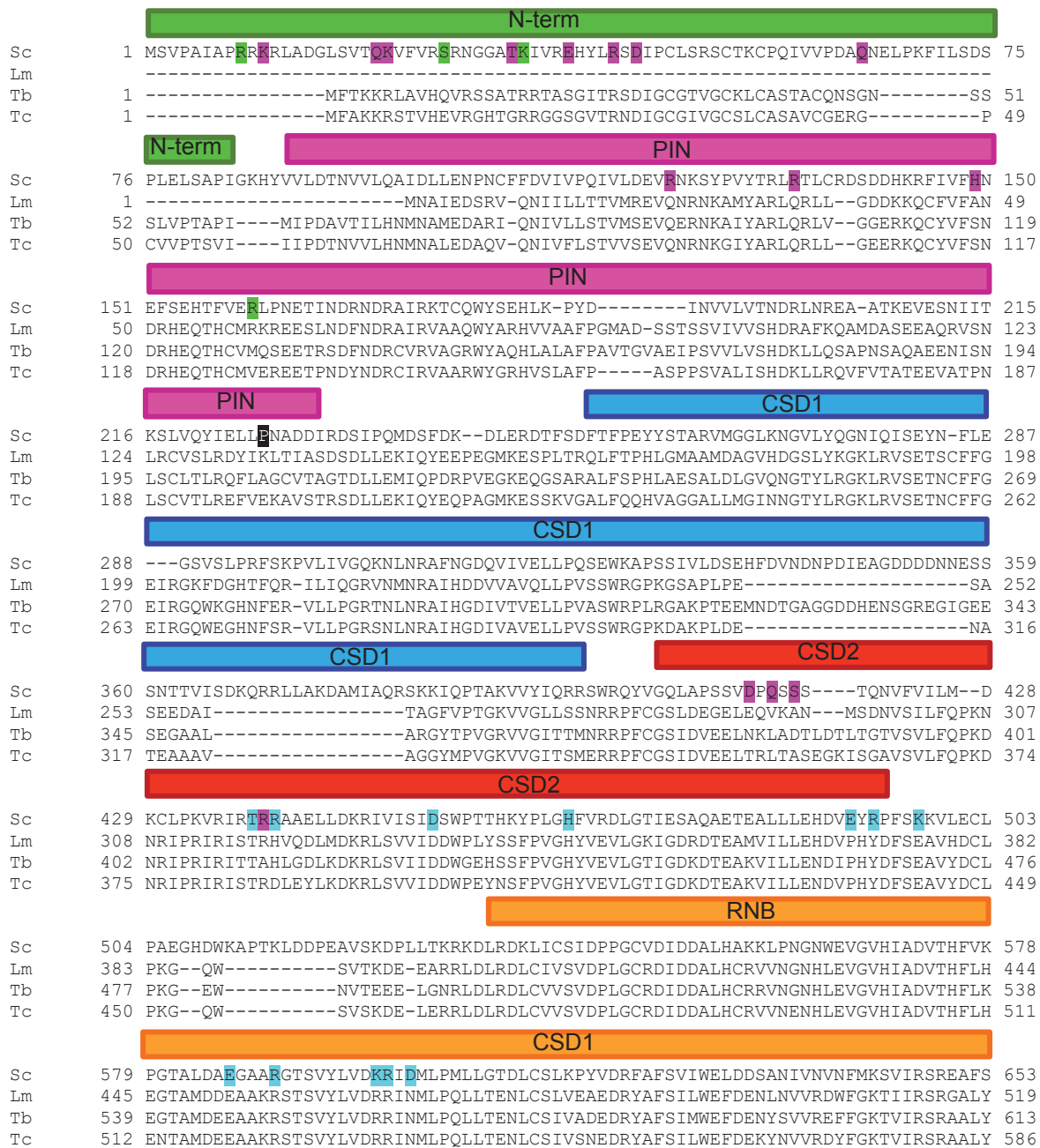


Figura 40 – Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da proteína RRP44 utilizando-se o programa Clustal Muscle. Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (DAA10760.1); Lm: *Leishmania major* (XP_001684311.1); Tb: *Trypanosoma brucei* (CAC39259.1); Tc: *Trypanosoma cruzi* (PBJ78554.1). Em verde estão destacados os resíduos da ScRrp44, que fazem interação com a subunidade Rrp42 do Exo-9. Em rosa são mostrados os resíduos da ScRrp44, nas duas conformações, que fazem interação com a subunidade Rrp41 do Exo-9. Em ciano são mostrados os resíduos de ScRrp44, na conformação 2, que fazem interação com subunidade Rrp45 do Exo-9. Em preto é destacada a Pro226. O alinhamento é mostrado até por volta do resíduo 650 de ScRrp44, pois resíduos posteriores não estão envolvidos nas interações.

4.7 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS *KNOCKDOWN* PARA TbRRP44

Com o objetivo de investigar a função da RRP44 em *T. brucei* foram realizadas as análises da taxa de proliferação celular, da sedimentação das subunidades 40S, 60S, 80S e polissomos em gradiente de sacarose e análise do processamento do pré-rRNA por PCR quantitativa em tempo real.

4.7.1 Análise da Taxa de Proliferação Celular

A taxa de proliferação celular foi monitorada em 120 horas, comparando dois controles, o primeiro com as células *T. brucei* cepa 29-13 não transfectadas com o vetor p2T7-177 e outro sem indução do RNAi (RNAi RRP44 Tet-), com as células *knockdown* para a RRP44 (RNAi RRP44 Tet+). Os valores encontrados são mostrados na figura 41 e são resultado de uma média de três experimentos.

Os dados mostram que as células controle 29-13 não têm o crescimento afetado pela presença de tetraciclina. Porém observa-se que após 48 horas ocorre uma diminuição considerável da proliferação das células *knockdown* em relação ao controle e após 72 horas de indução já não ocorre mais a proliferação das células com TbRRP44 depletada. Os dados observados em relação à taxa de proliferação celular corroboram com o resultado obtido por de Estévez e colaboradores (2001), mostrando que RRP44 é essencial à viabilidade de *T. brucei*.

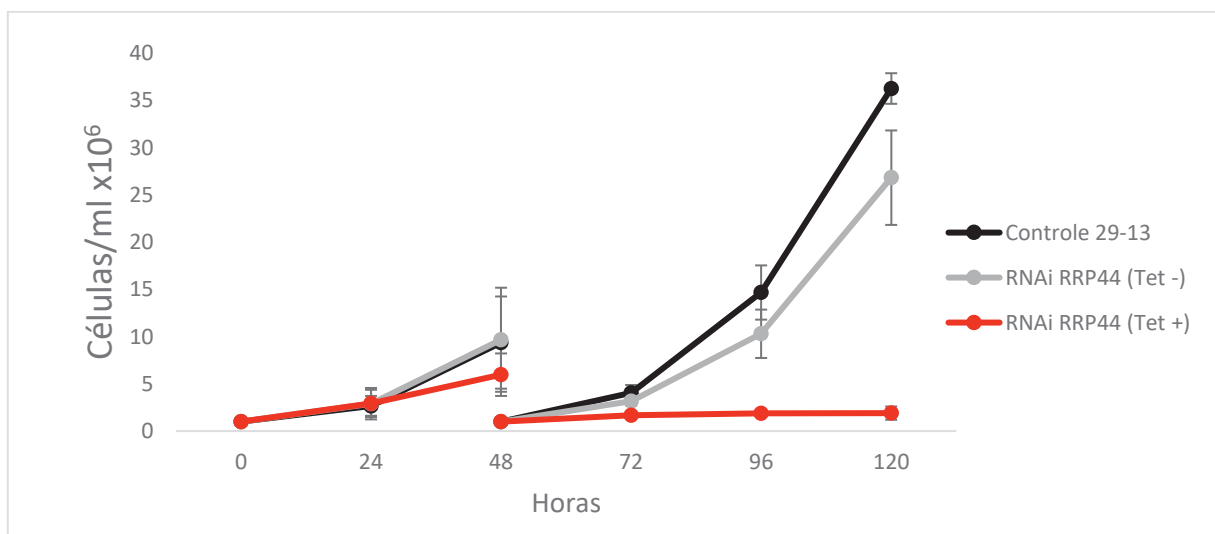


Figura 41 - Curvas de proliferação de *T. brucei* 29-13. Em preto está a curva da 29-13 (células não transfectadas, em presença de tetraciclina), em cinza a das células transfectadas sem adição de tetraciclina (não induzido) e em vermelho está apresentada a curva das células *knockdown* para TbRRP44 (induzido).

4.7.2 Confirmação da Depleção de TbRRP44 por *Western blot*

Através de *Western blot* utilizando soro de camundongos imunizados contra a TbRRP44 (figura 42) observa-se a diminuição da proteína em extrato coletado de células de *T. brucei* com até 72 horas de indução, indicando o correto funcionamento do mecanismo de RNAi. Foi usado soro contra a proteína GAPDH como normalizador do experimento.

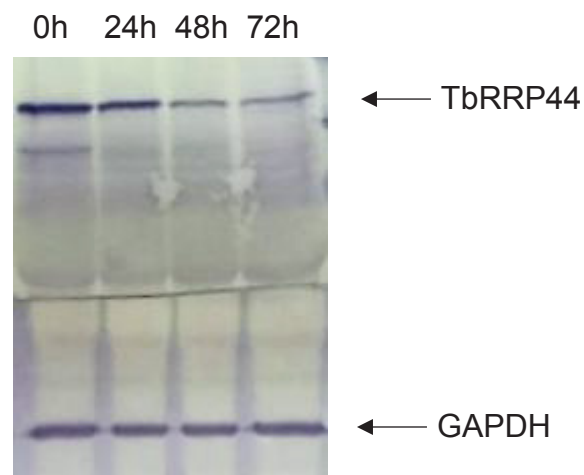


Figura 42 - Western blot utilizando soro imunizado contra a proteína TbRRP44 para verificação dos seus níveis de expressão após indução do RNAi.

4.7.3 Análise das Subunidades 40S, 60S, 80S e Polissomos

A análise das subunidades das subunidades 40S, 60S, 80S e polissomos foi feita através da sedimentação em gradiente de sacarose. Neste experimento foram comparadas células controle, sem indução do RNAi, e células *knockdown* para a TbRRP44.

Na figura 43 é possível notar nas células após 48 horas de indução o alargamento da fração mais leve, fração que não entra no gradiente, o desaparecimento do pico correspondente à subunidade 40S e a diminuição dos picos correspondentes aos polissomos em relação às células controle.

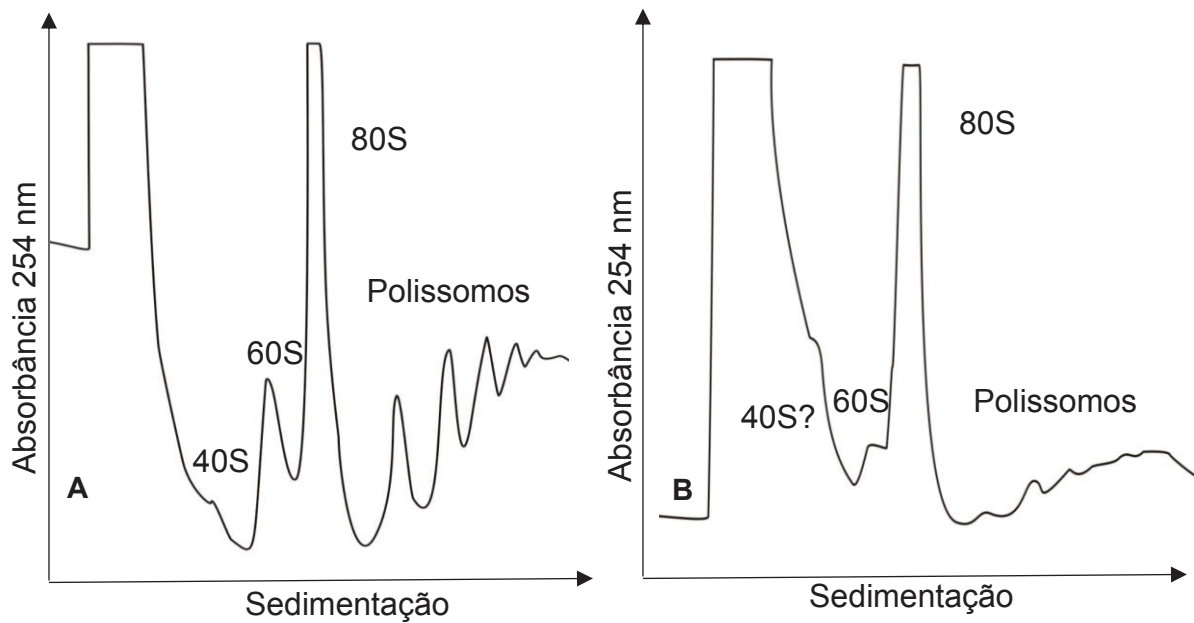


Figura 43 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil de subunidades ribossomais após 48 horas de indução do RNAi para TbRRP44. A: Células controle; B: Células *knockdown*.

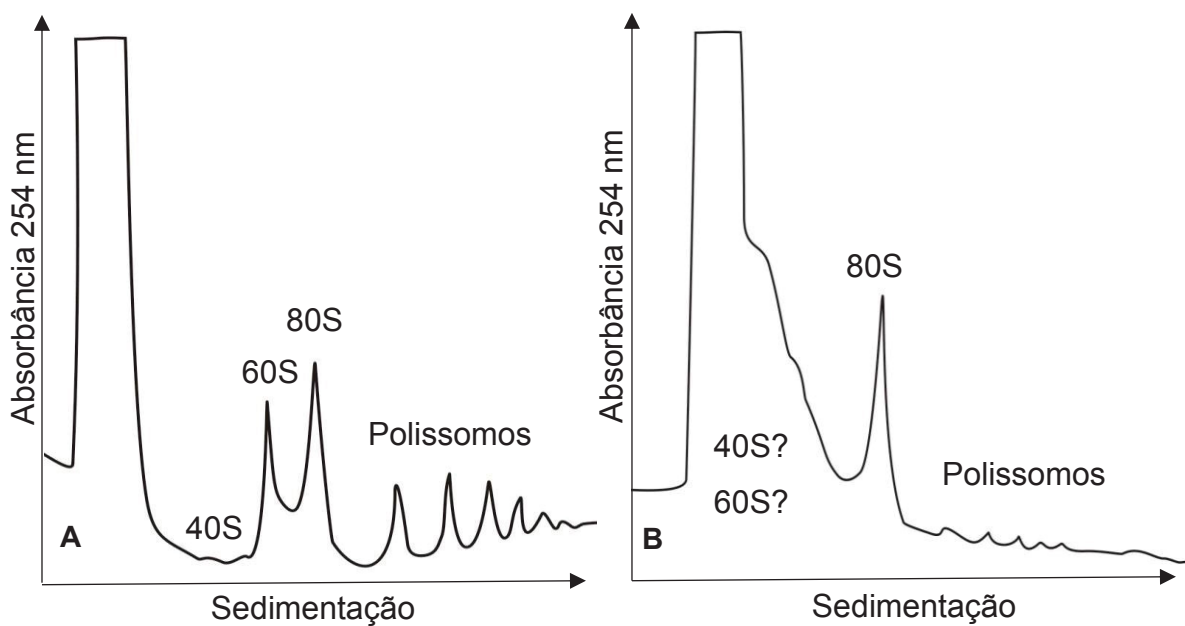


Figura 44 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil das subunidades ribossomais das células após 72 horas de indução do RNAi para TbRRP44. A: Células controle; B: Células *knockdown*.

Após 72 horas de indução, percebe-se a intensificação do fenótipo, os picos correspondentes às subunidades 40S e 60S desaparecem, o pico da unidade 80S aumenta e os picos dos polissomos praticamente desaparecem (figura 44).

A fim de avaliarmos se o fenótipo observado de alargamento do pico correspondente às frações mais leves do gradiente pode ser atribuído à ausência da TbRRP44 e não consequência, por exemplo, de estresse celular, analisamos o perfil das células controle em gradiente de sacarose após serem submetidas à restrição de nutrientes. Podemos observar nesse caso (figura 45) um fenótipo distinto do observado para as células *knockdown* e semelhante ao descrito na literatura para estresse nutricional, apoiando assim a conclusão de que a mudança no perfil das subunidades ribossomais observada nas figuras 42 e 43 é devido à depleção da proteína TbRRP44.

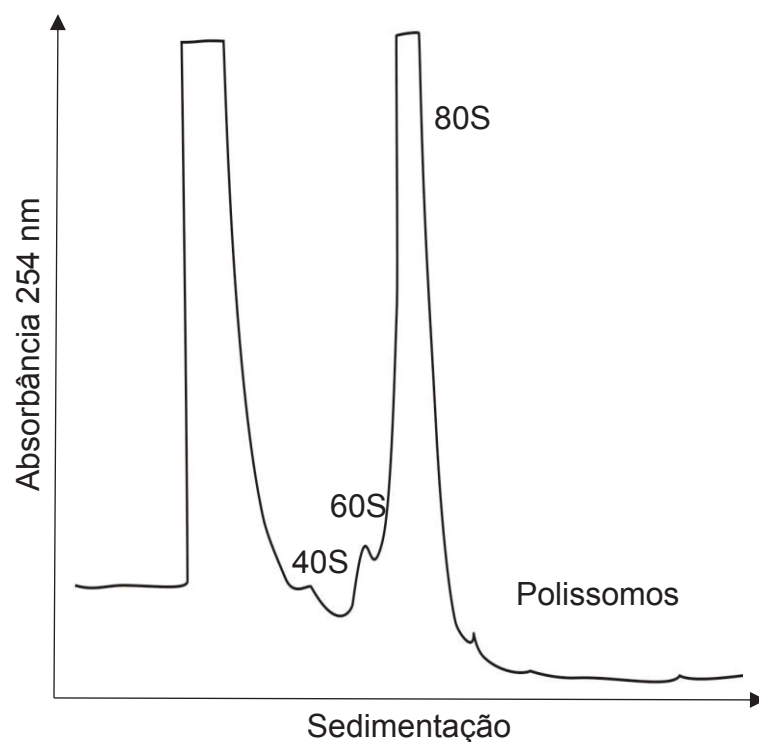


Figura 45 - Análise de sedimentação de ribossomos em gradiente de sacarose, perfil das subunidades ribossomais das células de *T. brucei* em privação de nutrientes.

Com o objetivo de avaliarmos o conteúdo proteico das amostras correspondentes à região onde observa-se o alargamento das frações iniciais do gradiente, estas foram analisadas por espectrometria de massas. Entretanto, a comparação entre as proteínas identificadas em frações correspondentes das células controle e células *knockdown* não mostraram resultados conclusivos em termos de um grupo de proteínas que poderiam estar acumulando-se nestas frações (resultados não mostrados).

O fenótipo observado através destes experimentos decorrente da ausência da TbRRP44 não foi descrito anteriormente na literatura, pode-se sugerir que seja

consequência de um efeito mais global, e não simplesmente em uma etapa específica do processamento do rRNA.

Tal fenótipo é diferente daquele característico de proteínas silenciadas ligadas exclusivamente ao processamento do rRNA, que seria o aumento da subunidade 40S e a diminuição da subunidade 60S ou o inverso e conseqüentemente a diminuição dos polissomos, como visto em vários trabalhos com os de Sakiyama e colaboradores (2013) e Jensen e colaboradores (2003). No trabalho de Sakiyama foi feita a depleção da proteína XRN em células de *T. brucei* 29-13, proteína essa que é homóloga à proteína Rat1 de levedura, que atua no processamento da subunidade maior do ribossomo. A análise da sedimentação de polissomos em gradiente de sacarose mostrou a diminuição do pico correspondente à subunidade 60S e o aumento do pico correspondente à subunidade 40S. Também foi observado o aparecimento de ombros nos picos correspondentes aos polissomos, indicando a ligação da subunidade 40S ao mRNA, mas sem a ligação do 60S. Já no trabalho de Jensen foi realizada a depleção da proteína NOG1, que atua na biogênese da subunidade maior do ribossomo de maneira ainda desconhecida. Análises através de gradiente de sacarose mostram que houve um aumento do pico correspondente à subunidade 40S e diminuição do pico correspondente à subunidade 60S.

A Rrp44 foi caracterizada em leveduras como estando envolvida em diversas vias de processamento de RNA e o perfil das subunidades ribossomais observado em nossos experimentos poderia estar relacionado a um acúmulo de defeitos que afetariam a síntese dos ribossomos.

4.7.4 Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal

4.7.4.1 Análise da Qualidade do RNA por Bioanalyzer

Após a extração do RNA, as amostras foram submetidas à análise através do Bioanalyzer. Foram feitas extrações a partir de 3 curvas de crescimento celular, porém as amostras referentes a apenas uma das curvas apresentaram integridade satisfatória do RNA (figura 46).

Nota-se que todas as amostras das células controle apresentam boa qualidade, mesmo a amostra 72h que apresenta leves sinais de degradação foi considerada adequada para as quantificações. Já nas amostras das células *knockdown* observa-

se problemas na amostra 24h e 120h, sendo que a amostra 96h também mostra sinais de degradação. Os experimentos posteriores de qPCR foram realizados utilizando-se o RNA extraído nos tempos 48 e 72 horas.

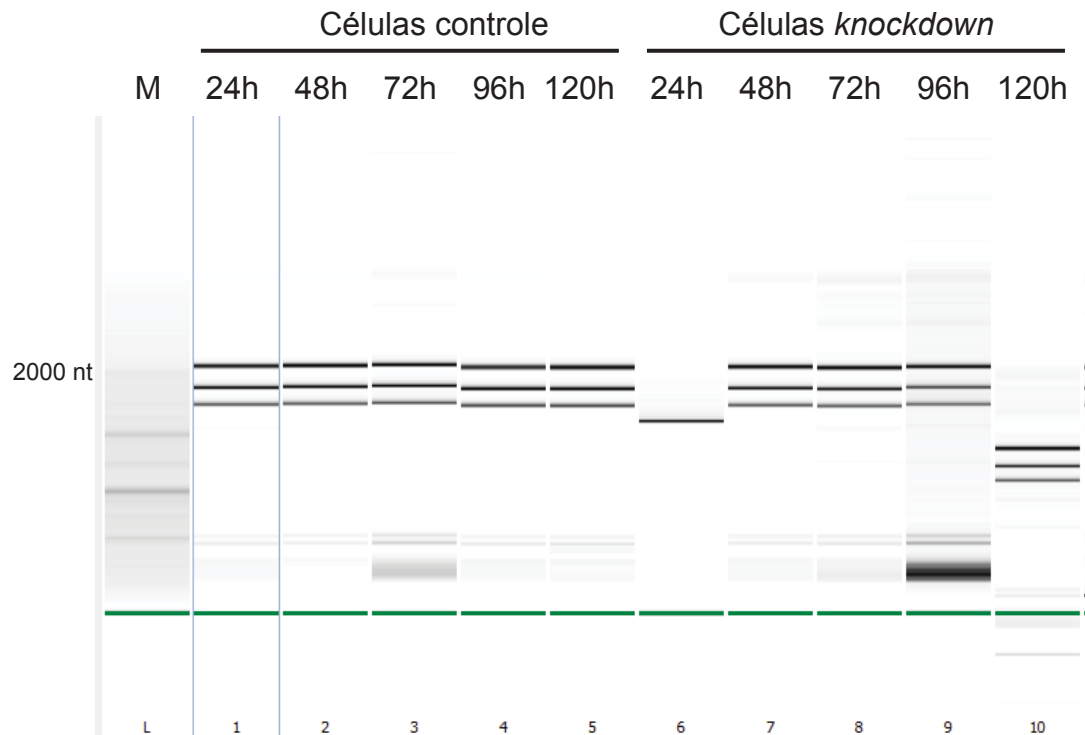


Figura 46 - Análise das amostras de RNA por Bioanalyzer. M: Marcador de peso molecular de RNA, em verde está o marcador de RNA que atua como controle positivo do experimento.

4.7.4.2 Eficiência dos Pares de Oligonucleotídeos

Os resultados dos testes de eficiência dos oligonucleotídeos são mostrados na tabela 4. Para os experimentos posteriores foram utilizados aqueles apresentando eficiência entre 85% e 105%.

TABELA 4 - EFICIÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS TESTADOS PARA qPCR

Identificação	Eficiência (%)	R ²
5'18	90	0,98
3'18	94	0,99
ITS1	Não amplificou	-
5'5.8S	97	0,98
3'5.8S (1)	73	0,98
3'5.8S (2)	104	0,98
3'5.8S (3)	Não amplificou	-
ITS2	87	0,98
5'LSU1	86	0,98
3'LSU1 (1)	76	0,98
3'LSU1 (2)	112	0,88
3'LSU1 (3)	98	1,00
ITS3 (1)	99	1,00
ITS3 (2)	78	1,00
5'SR1	96	1,00
3'LSU2 (1)	79	0,99
3'LSU2 (2)	90	1,00
ITS5	Não amplificou	-
5'SR2	112	0,99
3'SR2	93	1,00
ITS6 (1)	116	0,99
ITS6 (2)	100	1,00
5'SR6	99	1,00
3'SR6	97	1,00
ITS7 (1)	Dois produtos de amplificação	-
ITS7 (2)	98	1,00
5'SR4	88	1,00
3'SR4	105 (problemas na amplificação)	0,98
GAPDH	97	0,99
α -Actina	105	1

FONTE: o autor, 2018.

4.7.4.3 Análise do Processamento do pré-RNA Ribossomal

O processamento do pré-rRNA foi analisado por qPCR a fim de identificar-se possíveis sítios de clivagem sob atuação da TbRRP44, através de pares de oligonucleotídeos que amplificam as regiões 5' e 3' das moléculas a serem maturadas, bem como as ITSs (figura 47). Os resultados obtidos foram normalizados utilizando-se o mRNA das proteínas GAPDH e α -Actina, sendo obtido o valor da quantidade relativa de RNA (comparação células controle e células *knockdown*) pelo método de Pfaffl (figuras 48 e 49).

Os resultados mostram um aumento significativo dos produtos de amplificação para todos os oligonucleotídeos relacionados à subunidade maior do ribossomo. Os resultados são reprodutíveis quando comparam-se os dois métodos de cálculo bem como os normalizadores utilizados. Observa-se ainda que ocorre uma intensificação do fenótipo entre as amostras com 48 horas de indução do RNAi para as amostras com 72 horas de indução. Por outro lado, as regiões analisadas referentes ao processamento da subunidade menor do ribossomo não sofrem alterações significativas. Os experimentos serão repetidos a partir da extração de RNA de outras duas culturas independentes, para a confirmação dos resultados.

O aumento, especificamente na região 3'5.8S, era esperado, pois Estevez e colaboradores (2001) já haviam mostrado que a TbRRP44 atua na etapa final de maturação do 5.8S, através do processamento exonucleolítico 3' – 5' do intermediário 7S. Porém o aumento observado nas outras regiões sugere um bloqueio anterior do processamento das moléculas da subunidade maior, na clivagem na ITS2 que separa o precursor do 5.8S, causando um acúmulo do intermediário de 5,8 kb (figura 2) e afetando as etapas subseqüentes. Uma análise mais detalhada através, por exemplo, de experimentos de Northern blot, é necessária para a identificação dos intermediários que estariam sendo acumulados, mas nossos resultados indicam fortemente o envolvimento da TbRRP44 na clivagem endonucleolítica do pré-rRNA, função não antes demonstrada para esta proteína.

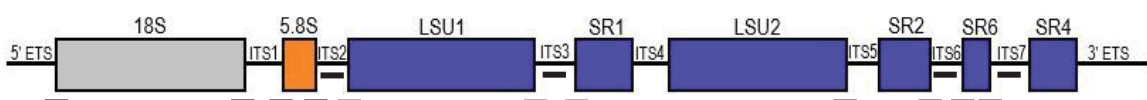


Figura 47 - Precursores do RNA ribossomal de *T. brucei*. Em preto estão demarcadas as regiões que foram analisadas através de qPCR.

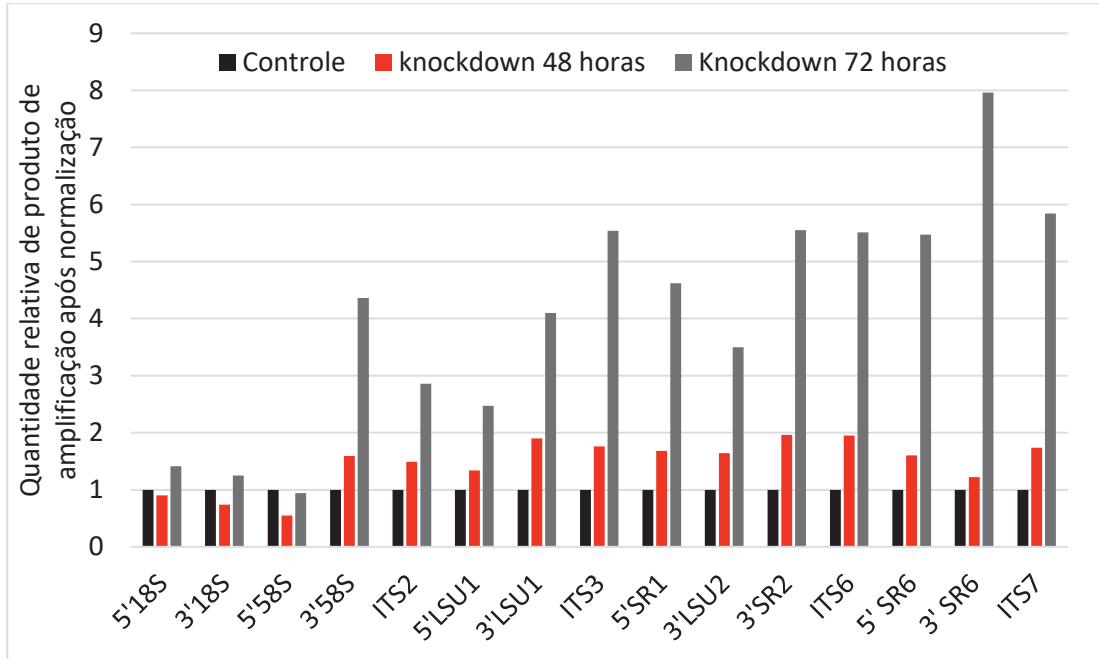


Figura 48 - Análise do processamento do pré-rRNA por qPCR (cálculo pelo método de Pfaffl), utilizando GAPDH como normalizador.

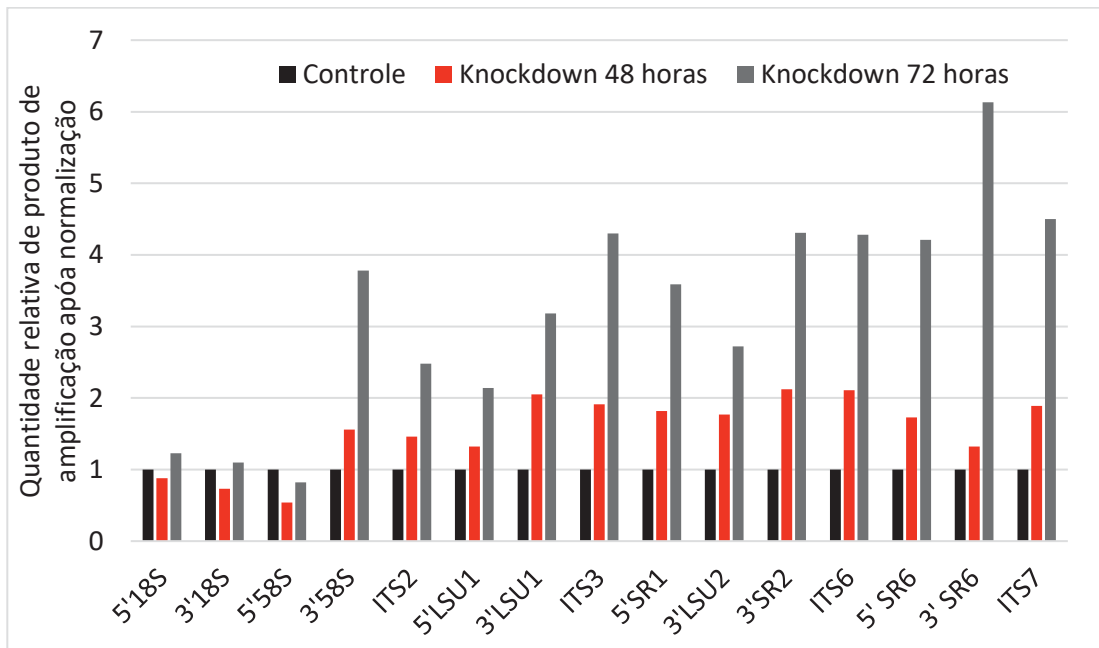


Figura 49 - Análise do processamento do pré-rRNA qPCR (cálculo pelo método de Pfaffl), utilizando α -Actina como normalizador.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram a caracterização estrutural do domínio endonucleolítico da proteína RRP44 de *T. brucei* e forneceram importantes informações sobre sua função. A proteína TbRRP44 foi expressa e purificada, bem como construções contendo seus domínios catalíticos. A construção TbRRP44_NPIN que inclui o domínio com atividade endonucleolítica foi cristalizada e sua estrutura cristalográfica foi determinada e refinada a 2,3 Å de resolução.

A análise da estrutura mostrou que o sítio catalítico e o sítio de ligação ao zinco são conservados em relação à estrutura do domínio PIN da ScRRP44. Observou-se ainda a presença de um segundo sítio de ligação a zinco no domínio PIN de TbRRP44, próximo ao sítio catalítico, que poderia estar envolvido no mecanismo de interação com o substrato. Análises comparativas entre o domínio PIN de TbRRP44 e ScRRP44 mostram que os resíduos de ScRRP44 que fazem interação com as demais subunidades do exossomo são resíduos básicos que são substituídos por resíduos polares em TbRRP44. Outra diferença importante encontrada foi em relação à última hélice do domínio PIN, hélice esta localizada próxima da região em que ocorre a mudança conformacional em ScRRP44 relacionada aos dois mecanismos de degradação do substrato de RNA. Na estrutura de ScRRP44 existe uma quebra nessa hélice enquanto na estrutura de TbRRP44 essa quebra não se conserva indicando uma certa rigidez nessa região, que poderia estar relacionada ao fato de que TbRRP44 não é encontrada associada ao exossomo.

A depleção de RRP44 em *T. brucei* através da técnica de RNAi, mostrou que TbRRP44 é essencial para a viabilidade celular, reproduzindo resultados descritos na literatura. Além disso a análise das subunidades ribossomais e polissomos através de sedimentação em gradiente de sacarose mostraram que a depleção da TbRRP44 produz um fenótipo que se diferencia dos efeitos normalmente descritos relacionados unicamente à maturação das subunidades ribossomais.

As análises do processamento do pré-rRNA através de qPCR indicam que a depleção da TbRRP44 causa um bloqueio na etapa inicial do processamento do precursor das moléculas da subunidade maior do ribossomo e sugerem a atuação da TbRRP44 na clivagem endonucleolítica da ITS2.

5. 1 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este projeto estão a realização de experimentos a fim de identificar os sítios de clivagem da RRP44 em *T. brucei* durante a maturação do rRNA. Também serão feitas novas tentativas de cristalização da TbRRP44 inteira da variante TbRRP44_CSD-S1.

Serão feitos novos experimentos de sedimentação em gradiente de sacarose aumentando o tempo de centrifugação a fim de melhorar a resolução das frações iniciais e novos experimentos de espectrometria de massas também serão feitos.

Também serão analisadas as modificações na célula de *T. brucei* causadas pela depleção da TbRRP44 através de tomografia de raios X.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- BONNEAU, F. et al. The Yeast Exosome Functions as a Macromolecular Cage to Channel RNA Substrates for Degradation. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 547–559, 2009.
- BRECHT, M.; PARSONS, M. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 97, n. 1–2, p. 189–198, nov. 1998.
- CAMPBELL, D. A. et al. Precise identification of cleavage sites involved in the unusual processing of trypanosome ribosomal RNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 1, p. 113–124, 1987.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.
- CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: A review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1411–1420, 2012.
- CIGANDA, M.; WILLIAMS, N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 4, p. 523–533, 2011.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.
- COWTAN, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 9, p. 1002–1011, 2006.
- COWTAN, K. Recent developments in classical density modification. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 470–478, 2010.
- CRISTODERO, M. et al. The *Leishmania tarentolae* exosome: Purification and structural analysis by electron microscopy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 24–29, 2008.
- DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays In Biochemistry**, v. 51, p. 31–46, 2011.
- DELANO, W. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 700, 2002.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, 2004.

ESTÉVEZ, A. M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, v. 20, n. 14, p. 3831–3839, 2001.

ESTÉVEZ, Antonio M. et al. The roles of intersubunit interactions in exosome stability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34943–34951, 2003.

FISCHER, D. C. H. Fundamentos de cromatografia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 308–308, jun. 2006.

FROMONT-RACINE, M. et al. Ribosome assembly in eukaryotes. v. 313, p. 17–42, 2003.

GASSE, L.; FLEMMING, D.; HURT, E. Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1 Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. **Molecular Cell**, v. 60, n. 5, p. 808–815, 2015.

GÜNZL, A. et al. RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei* RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 542–551, 2003.

GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, 2007.

HARTSHORNE, T.; TOYOFUKU, W. Two 5'-ETS regions implicated in interactions with U3 snoRNA are required for small subunit rRNA maturation in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 16, p. 3300–3309, 1999.

HASHEM, Y. et al. High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome. **Nature**, v. 494, n. 7437, p. 385–9, 2013.

HERNÁNDEZ, R.; CEVALLOS, A. M. Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. 2014.

HORN, D. M.; MASON, S. L.; KARBSTEIN, K. Rcl1 Protein, a Novel Nuclease for 18 S Ribosomal RNA. v. 286, n. 39, p. 34082–34087, 2011.

HOUSELEY, J.; LACAVA, J.; TOLLERVEY, D. RNA-quality control by the exosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 529–539, 2006.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JANUSZYK, K.; LIMA, C. D. **The eukaryotic RNA exosome** *Current Opinion in Structural Biology*, 2014.

JENSEN, B. C. et al. The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 34, p. 32204–32211, 2003.

KABSCH, W. Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

KALA, S. et al. The interaction of a *Trypanosoma brucei* KH-domain protein with a ribonuclease is implicated in ribosome processing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 211, p. 94–103, 2017.

KANTARDJIEFF, K. A. Matthews coefficient probabilities : Improved estimates for unit cell contents of proteins , DNA , and protein – nucleic acid complex crystals. p. 1865–1871, 2003.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KOWALINSKI, E. et al. Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex. *Molecular Cell*, v. 63, n. 1, p. 125–134, 2016.

LATTMAN, Eaton E.; LOLL, Patrick J. **Protein Crystallography: A Concise Guide**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2008.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S. trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation *MINIREVIEWS* trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. *Eukaryotic cell*, v. 2, n. 5, p. 830–840, 2003.

LORENTZEN, E. et al. Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Molecular Cell*, v. 29, n. 6, p. 717–728, 2008.

MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism : cis -splicing of pre-mRNA. *Rna*, v. 6, p. 163–169, 2000.

MAKINO, D. L. et al. RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature*, v. 524, n. 7563, p. 54–58, 2015.

MAKINO, D. L.; BAUMGÄRTNER, M.; CONTI, E. Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature*, v. 495, n. 7439, p. 70–75, 2013.

MATELSKA, D.; STECZKIEWICZ, K.; GINALSKI, K. Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. 12, p. 6995–7020, 2017.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

McPHERSON, Alexander. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

MHT, T.; XUE, Z. The nucleolus : an organelle formed by the act of building a ribosome. **Current Opinion on Cell Biology**, p. 319–324, 1995.

MICHAELI, S. RNA Metabolism in Trypanosomes. **Nucleic Acids and Molecular Biology** v. 28, 2012.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.

PREUSSE, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, 2012.

SAKYIAMA, J. et al. Ribosome biogenesis requires a highly diverged XRN family 5'→3' exoribonuclease for rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 19, n. 10, p. 1419–31, 2013.

SCHAEFFER, D. et al. **Nature Structural and Molecular Biology**. v. 16, n. 1, p. 56–62, 2009.

SCHAEFFER, D. et al. The CR3 motif of Rrp44p is important for interaction with the core exosome and exosome function. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 9298–9307, 2012.

SCHNEIDER, C. et al. The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 4, p. 1127–1140, 2009.

SELKIRK, C. Ion-Exchange Chromatography. In: CUTLER, P. (Ed.). . **Protein Purification Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 125–131.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. Md, p. 3–8, 2015.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.

SMART, O. S. et al. Exploiting structure similarity in refinement: Automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 368–380, 2012.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

THOMSON, E.; FERREIRA-CERCA, S.; HURT, E. Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 21, p. 4815–21, 2013.

UMAER, K.; CIGANDA, M.; WILLIAMS, N. Ribosome biogenesis in African trypanosomes requires conserved and trypanosome-specific factors. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 6, p. 727–737, 2014.

VUKOVIC, L. et al. Molecular Mechanism of Processive 3' to 5' RNA Translocation in the Active Subunit of the RNA Exosome Complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 12, p. 4069–4078, 2016.

WILSON, D. N.; CATE, J. H. D. The Structure and Function of the Eukaryotic. **Cold Spring Harbor Perspect Biol Perspect Biol**, v. 4:a011536, p. 1–18, 2012.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for dominant negative approaches in *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89–101, 1999.

WOOLFORD, J. L.; BASERGA, S. J. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 195, n. 3, p. 643–681, 2013.