

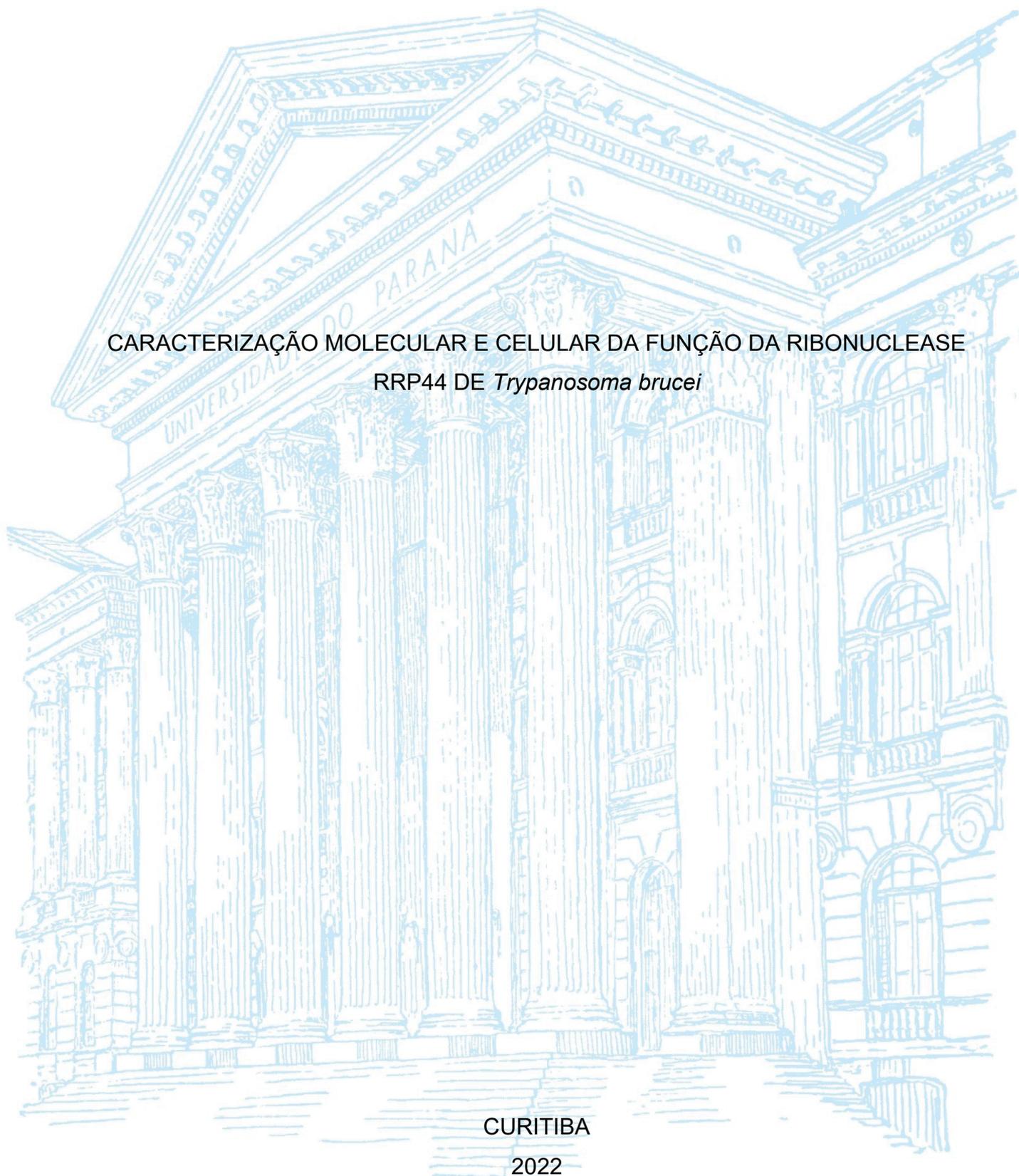
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANNA CESARO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CELULAR DA FUNÇÃO DA RIBONUCLEASE  
RRP44 DE *Trypanosoma brucei*

CURITIBA

2022



GIOVANNA CESARO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CELULAR DA FUNÇÃO DA RIBONUCLEASE  
RRP44 DE *Trypanosoma brucei*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cesaro, Giovanna.

Caracterização molecular e celular da função da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei*. / Giovanna Cesaro. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Beatriz Gomes Guimarães.

Coorientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin.

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

1. Ribonucleases. 2. *Trypanosoma brucei*. 3. Maturação. 4. RNA. 5. Tomografia. 6. Raio. 7. Cristalografia. I. Título. II. Guimarães, Beatriz Gomes. III. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GIOVANNA CESARO** intitulada: **Caracterização molecular e celular da função da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei***, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ GOMES GUIMARAES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 30 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

19/04/2022 11:43:15.0

BEATRIZ GOMES GUIMARAES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/04/2022 15:21:03.0

SERGIO SCHENKMAN

Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica

08/04/2022 19:01:24.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/04/2022 20:00:21.0

RICHARD CHARLES GARRATT

Avaliador Externo (UNIVERSIDA DE SÃO PAULO - USP)

Assinatura Eletrônica

20/04/2022 06:03:58.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: [pgbioq@ufpr.br](mailto:pgbioq@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 173012

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 173012

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus orientadores, Beatriz e Nilson, que desde a iniciação científica vêm me acompanhando, auxiliando no meu desenvolvimento científico e profissional. Agradeço em especial à Beatriz por todo incentivo, empenho e paciência em ensinar e explicar, repetidas vezes, até que eu compreendesse. Também pelo exemplo de profissional, de mulher na ciência e por ser alguém que ama tanto o que faz que inspira todos a buscar esse mesmo sentimento.

Aos meus colegas e amigos de LBEP, mesmo os que não ficaram tanto tempo no laboratório, pela cumplicidade e companheirismo em todos esses anos, sem vocês o doutorado não seriam os mesmos!

Aos meus pais por todo apoio moral e por me proporcionarem esta e tantas outras oportunidades. Por sempre me incentivarem a fazer o que gosto!

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

Ao CNPq pela bolsa durante o doutorado e à CAPES/COFECUB durante o período sanduiche.

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

“Os laboratórios são templos em que a inteligência é concitada ao serviço de Deus, e, ainda mesmo quando a cerebração se perverte, transitoriamente subornada pela hegemonia política, geradora de guerras, o progresso da Ciência, como conquista divina, permanece na exaltação do bem, rumo a glorioso porvir.”

Emmanuel

## RESUMO

O estudo de protozoários da família *Trypanosomatidae* desperta bastante interesse, tanto por serem agentes etiológicos de doenças como a doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose, quanto por apresentarem várias características celulares e moleculares únicas. Em particular, os tripanossomatídeos possuem mecanismos não canônicos de expressão gênica e processamento de RNA, como o processamento dos RNAs mensageiros e RNAs pequenos nucleolares (mRNA e snoRNA, respectivamente) por *trans-splicing*. Em relação 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, sendo que a molécula correspondente ao RNA de 25S/28S é dividida em seis segmentos. Tais diferenças indicam diferenças no processo de maturação do RNA ribossomal (rRNA), que é necessário para a excisão de sete sequências espaçadoras internas do precursor. Apesar do processo de maturação do rRNA ser um interessante tema de estudo em tripanossomatídeos, poucas endo- e exonucleases envolvidas neste processo foram identificadas e caracterizadas. Uma das ribonucleases envolvidas no processamento do rRNA é a Rrp44, também responsável pela degradação de mRNAs e RNA transportadores (tRNA) que são transcritos erroneamente. Rrp44 apresenta atividades endo- e exonucleolítica e pertence à família RNase II/RNB de exonucleases 3'-5'. O objetivo deste estudo foi a caracterização estrutural e funcional da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei*. A proteína selvagem e quatro variantes, três contendo mutações nos sítios endo e exonucleolíticos (TbRRP44<sup>D140N</sup>, TbRRP44<sup>D511N</sup>, TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>) e outra, um mutante de deleção da região N-terminal contendo o domínio endonucleolítico PIN (TbRRP44-ΔNPIN) foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia. A estrutura cristalográfica da TbRRP44-ΔNPIN foi determinada a 2,23 Å de resolução em complexo com um oligoribonucleotídeo, capturando um estado pós-clivagem do substrato. Análises estruturais mostraram que o domínio exonucleolítico da TbRRP44 possui a estrutura e o sítio catalítico conservados em relação aos outros membros da família RNase II/RNB, apresentando maior similaridade com a Rrp44 de *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar desta similaridade, o fato do modelo cristalográfico de TbRRP44-ΔNPIN representar a proteína em sua forma ativa, permitiu a descrição de detalhes adicionais do sítio ativo, como a localização do segundo íon Mg<sup>2+</sup>

envolvido na reação de clivagem do substrato. Ensaios *in vitro* de degradação de RNA mostraram que a TbRRP44 possui preferência por substratos ricos em uracila, sendo também capaz de degradar RNAs estruturados sem extremidade 3' livre. Os ensaios de degradação juntamente com os ensaios de desvio de mobilidade eletroforética mostraram que o domínio PIN é importante estruturalmente para interação com o substrato, principalmente no caso de RNAs estruturados. Os efeitos da depleção de RRP44 a nível celular e molecular foram analisados utilizando células *knockdown* de *T. brucei* para RRP44, geradas através do mecanismo de RNA de interferência (RNAi). As células foram analisadas utilizando-se a técnica de tomografia de raios X moles, que permite a obtenção de imagens tridimensionais a alta resolução. Tais análises mostraram diversas alterações celulares como o aumento de vacúolos de baixa absorção, alterações no núcleo, além do aumento do volume e quantidade dos acidocalcissomos e gotas lipídicas. Comparações dos efeitos do RNAi com os efeitos do tratamento com inibidores de vias específicas revelaram que o fenótipo decorrente da depleção de TbRRP44 assemelha-se aos observados pela inibição da síntese de rRNA e inibição da maturação do mRNA. O processamento do rRNA foi analisado por Northern blot, utilizando-se sondas para a detecção de regiões específicas dos espaçadores internos (ITSs). Na ausência da TbRRP44, as células de *T. brucei* apresentam acúmulo do precursor do rRNA que contém os rRNAs da subunidade maior do ribossomo, além de acúmulo do pre-rRNA de 7S, o qual não é processado corretamente para formação do rRNA 5.8S maduro.

Palavras-chave: ribonuclease RRP44, *Trypanosoma brucei*; maturação do rRNA; degradação de RNA; tomografia de raios X moles; estrutura cristalográfica.

## ABSTRACT

The scientific interest on protozoa of the Trypanosomatidae family arises both from the fact that they are etiological agents of diseases such as Chagas disease, sleeping sickness, and leishmaniasis, and from their unique cellular and molecular features. As compared to other eukaryotes, trypanosomatids have non-canonical mechanisms of control of gene expression and RNA processing. With regard to the ribosome structure, while in the other eukaryotes the 60S subunit is formed by three RNA molecules (5S, 5.8S, and 25S / 28S), in trypanosomatids the 60S subunit contains eight RNAs, in which the molecule corresponding to the 25S / RNA 28S is divided into six segments. Such structural differences indicate differences in the maturation process of the ribosomal RNA (rRNA), during excision of the seven internal spacer sequences from the precursor. Although the rRNA maturation process is an interesting topic in trypanosomatids, few endo and exonucleases involved in this process have been identified and characterized. Rrp44 is a conserved ribonuclease involved in pre-rRNA processing. It acts also in the degradation of defective mRNAs and transfer RNAs (tRNAs). Rrp44 presents endo- and exonuclease activities and belongs to the RNase II/RNB family of 3'-5' exonucleases. The aim of this study is to perform structural and functional characterization of the ribonuclease RRP44 from *Trypanosoma brucei*. The wild type TbRRP44 and four variants, three of them containing catalytic site mutations (TbRRP44<sup>D140N</sup>, TbRRP44<sup>D511N</sup>, TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>), and a fourth one with deletion of the N-terminal and endonucleolytic (PIN) domain (TbRRP44- $\Delta$ NPIN), were overexpressed in *Escherichia coli* and purified by chromatographic methods. The crystal structure of TbRRP44- $\Delta$ NPIN was determined at 2.23 Å resolution in complex with an oligoribonucleotide, revealing a post cleavage state of the substrate. The structural analysis revealed conservation of both TbRRP44 overall structure and catalytic site relative to the other RNase II/RNB family members, especially to *Saccharomyces cerevisiae* Rrp44. Despite this similarity, the fact that the TbRRP44- $\Delta$ NPIN crystallographic model shows an active state of the protein, allowed the description of additional details of the active site, such as the location of the second Mg<sup>2+</sup> ion involved in the substrate cleavage reaction. *In vitro* RNA degradation assays showed that TbRRP44 has higher activity on uracil-rich substrates, being also able to degrade structured RNAs lacking 3'-end overhang. The RNA degradation assays together with electrophoretic mobility shift assays showed that the physical presence

of the PIN domain is important for interaction with the substrate, especially in the case of structured RNAs. Analyses of the effects of RRP44 depletion at the cellular and molecular level were performed using a *T. brucei* strain genetically modified for conditional *knockdown* of the RRP44 protein, using the RNA interference mechanism. The cells were analyzed using the soft X-ray tomography, which allows for reconstruction of high-resolution three-dimensional images. These analyses revealed several cellular alterations such as increase of low absorption vacuoles that occupy a large volume of the cytoplasm, nucleus alteration, in addition to the increase in the volume and quantity of acidocalcysomes and lipid droplets. Comparisons between the effects of RNAi and treatments with inhibitors of specific pathways revealed that the phenotype resulting from TbRRP44 depletion resembles those observed by inhibition of rRNA transcription and mRNA maturation. Processing of the rRNA was analyzed by Northern blot, using probes complementary to specific regions of the internal transcribed spacers (ITSs). In the absence of TbRRP44, *T. brucei* cells showed accumulation of the largest rRNA precursor of the large ribosomal subunit of the ribosome, in addition to accumulation of the 7S pre-rRNA which is not properly processed for formation of the 5.8S mature rRNA.

Keywords: *Trypanosoma brucei*; rRNA processing; RRP44; RNA degradation assays; soft X ray tomography; Crystallographic structure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quadro comparativo entre as sequências de processamento do mRNA por <i>cis-splicing</i> e <i>trans-splicing</i> .....	27
Figura 2 - Esquema simplificado da biogênese de ribossomos em eucariotos. ....	31
Figura 3 – Representação esquemática das etapas do processamento do RNA ribossomal em leveduras.....	33
Figura 4 - Comparação dos diferentes precursores do pré-rRNA de tripanossomatídeos.....	34
Figura 5 - Representação esquemática das etapas da maturação do RNA ribossomal de <i>T. brucei</i> . ....	35
Figura 6 - Representação da estrutura do ribossomo de <i>T. brucei</i> determinada por crio-microscopia eletrônica.....	36
Figura 7 - Representação da estrutura cristalográfica do exossomo de levedura. ....	38
Figura 8 - Representação da estrutura tridimensional da Rrp44 de levedura (PDB: 5c0w) com seus domínios destacados.....	39
Figura 9 - Visão da região catalítica da família RNase II/ RNB.. ....	40
Figura 10 – Sobreposição dos modelos do domínio NPIN de RRP44 de <i>T. brucei</i> e das subunidades TbRRP41 e TbRRP42 do core do exossomo, com a estrutura cristalográfica do complexo de <i>S. cerevisiae</i> (PDB 4IFD). ....	44
Figura 11 - Esquema das estruturas secundárias dos substratos usados nos ensaios.....	51
Figura 12 - Esquema das sondas adquiridas para análise de precursores do rRNA de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	60
Figura 13 - Imagem ilustrativa do <i>grid</i> utilizado nos experimentos.....	64
Figura 14 - Detalhes do equipamento Cryo Plunger.. ....	65
Figura 15 – Purificação de TbRRP44 (110 kDa). ....	71
Figura 16 – Purificação de TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> (110 kDa).....	73
Figura 17 – Purificação de TbRRP44 <sup>D140N</sup> (110 kDa).....	75
Figura 18 - Purificação de TbRRP44- $\Delta$ NPIN (84 kDa).....	77
Figura 19 – Purificação de TbRRP44- $\Delta$ NPIND <sup>511N</sup> (84 kDa).....	79
Figura 20 - Cristais de TbRRP44- $\Delta$ NPIN identificados nos <i>screenings</i> iniciais.....	81
Figura 21 - Cristais de TbRRP44- $\Delta$ NPIN obtidos após refinamento das condições C4 e G8 dos kits JBS1 a JBS4 e PEGion, respectivamente.....	82

Figura 22 - Diferentes formas de cristais da proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN.....	83
Figura 23 - Posicionamento do oligonucleotídeo de RNA ligado à região do sítio ativo de TbRRP44- $\Delta$ NPIN. ....	85
Figura 24 - Clivagem do RNA pela TbRRP44 na presença de dois íons $Mg^{2+}$ .....	87
Figura 25 - Representação da estrutura cristalográfica da TbRRP44- $\Delta$ NPIN em complexo com RNA.....	89
Figura 26 - Comparação entre as posições relativas dos domínios RNB e CSD1 nos membros da família RNase II/RNB.. ....	90
Figura 27 - Sobreposição das estruturas TbRRP44- $\Delta$ NPIN (verde), ScRrp44 (azul) e hDis3 (rosa), utilizando o domínio RNB para a sobreposição.....	91
Figura 28 - Análise da rota de entrada do substrato na família RNase II/RNB.....	94
Figura 29 - Visão detalhada da região de ligação ao substrato na proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN.. ....	96
Figura 30 - Modificações estruturais na região do sítio catalítico da TbRRP44- $\Delta$ NPIN na presença de RNA.. ....	97
Figura 31 - Mecanismo de clivagem do tipo <i>two-metal-ion</i> com a presença do segundo íon magnésio proposto neste trabalho.....	99
Figura 32 - Degradação <i>in vitro</i> de substratos de fita simples pela TbRRP44 analisado em gel desnaturante.. ....	101
Figura 33 - Degradação <i>in vitro</i> de substratos de fita simples pela TbRRP44 e suas variantes, analisada em gel desnaturante.....	103
Figura 34 - Degradação <i>in vitro</i> de substratos estruturados pela TbRRP44 e suas variantes, analisada em gel desnaturante.....	105
Figura 35 - Análise da interação entre TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN <sup>D511N</sup> com diferentes substratos por EMSA.....	107
Figura 36 - Ensaios para a determinação dos coeficientes de dissociação entre as proteínas TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN <sup>D511N</sup> e o substrato GNRA0 através de EMSA.....	108
Figura 37 - Ensaios para a determinação dos coeficientes de dissociação entre as proteínas TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN <sup>D511N</sup> e o substrato GNRA18 através de EMSA.. ....	109
Figura 38 - Resultados dos ensaios de interação da variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN <sup>D511N</sup> com os substratos GNRA18, GNRA0 e PoliU por termoforese em microescala.....	111

Figura 39 - Variação da mobilidade termoforética do substrato GNRA18 em função da concentração da proteína TbRRP44 <sup>ΔNPIN/D511N</sup> .....	112
Figura 40 - Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das proteínas TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN <sup>D511N</sup> .....	113
Figura 41 - Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) da proteína TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> antes e depois da concentração e comparação com TbRRP44-ΔNPIN <sup>D511N</sup> ..	114
Figura 42 - Análise por DLS da proteína TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> em tampão contendo aditivos.....	115
Figura 43 - Fracionamento do extrato de <i>T.brucei</i> após indução de TbRRP44-HA por cromatografia de exclusão por tamanho e análise por Western blot.....	116
Figura 44 - Análise dos resultados da co-imunoprecipitação por SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata.....	117
Figura 45 - Análise, por Western blot, dos resultados da imunoprecipitação após fracionamento, por cromatografia de exclusão por tamanho, do extrato de <i>T.brucei</i> após indução de TbRRP44-HA.....	118
Figura 46 - Esquema das sondas utilizadas para análise de precursores do rRNA de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	119
Figura 47 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA em células <i>knockdown</i> para TbRRP44 com indução do RNAi até 96 horas, através de sondas complementares ao 5.8S (esquerda), junção 5.8S- ITS2 (centro) e ITS3 (direita)..	120
Figura 48 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA através de sondas complementares ao 5.8S e junção 5.8S-ITS2.....	121
Figura 49 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA através de sondas complementares à ITS3 e à ITS7.....	123
Figura 50 - Esquema do precursor do RNA ribossomal de <i>T. brucei</i> mostrando os intermediários acumulados em decorrência da depleção da TbRRP44.....	125
Figura 51 - <i>Slices</i> de volume des tomografias de raios X. ....	127
Figura 52 - Diferenças observadas na bolsa flagelar. ....	128
Figura 53 - Reconstrução tridimensional das células de <i>T. brucei</i> .....	129
Figura 54 – Identificação de acidocalcissomos por espectromicroscopia.. ....	131
Figura 55 - Análise dos volumes e número dos acidocalcissomos nas células controle e deficientes em TbRRP44 ( <i>knockdown</i> ).....	132

Figura 56 - Análise do número de gotas lipídicas por célula (direita) e seus volumes (esquerda).....	133
Figura 57 - Gráfico dos valores de coeficiente de absorção linear (LAC) obtidos para as células controle, com e sem PFA (cinza e preto), e <i>knockdown</i> (vermelho).....	134
Figura 58 – Análise, por microscopia, das células marcadas com MitoTracker. ....	136
Figura 59 - Análise dos resultados de citometria das células marcadas com MitoTracker.. .....	137
Figura 60 - Análise, por microscopia, das células marcadas com LysoTracker. ....	139
Figura 61 - Análise, por citometria, da fluorescência das amostras marcadas com LysoTracker.....	140
Figura 62 - Semelhança entre vesículas observadas nas células <i>knockdown</i> nas análises de microscopia de fluorescência e tomografia de raios X moles.....	140
Figura 63 – Análise do ciclo celular por citometria utilizando marcação com iodeto de propídeo.. .....	141

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos usados nos ensaios de co-cristalização..	49
.....	
Tabela 2 - Sequências dos substratos utilizados nos ensaios de degradação..	51
Tabela 3 - Sequências das sondas utilizadas nos experimentos de Northern blot....	60
Tabela 4 – Condições de cristalização promissoras observadas nos screenings iniciais. ....	81
Tabela 5 - Estatísticas dos dados de difração dos cristais da TbRRP44- $\Delta$ NPIN, processados utilizando-se o programa XDS e Staraniso..	84
Tabela 6 – Estatísticas finais do refinamento.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CSD – do inglês Cold Shock Domain

DO – Densidade Ótica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ETS – Região Espaçadora Externa

IPTG – do inglês Isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

ITS – Região Espaçadora Interna

LSU – do inglês Large Subunit

PEG – Polietilenoglicol

PIN – do inglês PiT N-terminus

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

## LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

® - marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	21
1.2 OBJETIVOS .....	22
Objetivo geral .....	22
Objetivos específicos .....	23
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1 OS TRIPANOSSOMATÍDEOS E SUAS PARTICULARIDADES .....	24
2.1.1 Características Celulares dos Tripanossomatídeos .....	24
2.1.2 Processamento do RNA .....	25
2.1.2.1 RNA mensageiro .....	25
2.1.2.2 RNA Transportador.....	28
2.1.2.3 Pequenos RNA Nucleares.....	28
2.1.2.4 Pequenos RNAs Nucleolares .....	29
2.1.2.5 RNA Ribossomal .....	30
2.2 O COMPLEXO EXOSSOMO E A RIBONUCLEASE Rrp44 .....	36
2.2.1 Complexo Exossomo e Rrp44 em Tripanossomatídeos .....	42
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	45
3.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E SUAS VARIANTES.....	47
3.3 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DA TbRRP44 E DAS VARIANTES TbRRP44- ΔNPIN E TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> .....	48
3.4 COLETA, PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE TbRRP44-ΔNPIN .....	49
3.5 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE RNA <i>IN VITRO</i> .....	50
3.6 ENSAIO DE DESVIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA.....	52
3.6.1 Cálculo do Coeficiente de Dissociação (Kd) .....	53
3.7 TERMOFORESE EM MICROESCALA .....	54
3.8 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ .....	55
3.9 ENSAIOS DE CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO .....	55
3.9.1 Geração de Células <i>Knockdown</i> para TbRRP44 com Sistema de Complementação para Expressão da Proteína Exógena .....	55
3.9.2 Preparação dos Extratos Celulares .....	56

3.9.3 Purificação do Extrato de <i>T. brucei</i> pré-imunoprecipitação .....	57
3.9.4 Western Blot .....	57
3.9.5 Co-Imunoprecipitação .....	58
3.10 ANÁLISE POR NORTHERN BLOT DE INTERMEDIÁRIOS DO PROCESSAMENTO DO RNA RIBOSSOMAL .....	59
3.11 ANÁLISE CELULAR POR TOMOGRAFIA DE RAIOS X MOLES .....	62
3.11.1 Cultura Celular .....	63
3.11.2 Fixação das Células .....	63
3.11.3 Preparação dos Grids .....	64
3.11.4 Coleta de Dados de Tomografia de Raios X Moles .....	65
3.11.5 Processamento das Imagens .....	66
3.11.6 Cálculo do Coeficiente de Absorção Linear .....	67
3.11.7 Cálculo do Volume das Organelas .....	68
3.12 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	68
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
4.1 ANÁLISES ESTRUTURAIS E ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DE TbRRP44 .....	70
4.1.1 Purificação da Proteína TbRRP44 e Suas Variantes .....	70
4.1.1.1 Purificação da Proteína TbRRP44 .....	70
4.1.1.2 Purificação da Variante TbRRP44 <sup>D140N/D511N</sup> .....	72
4.1.1.3 Purificação da Variante TbRRP44 <sup>D140N</sup> .....	73
4.1.1.4 Purificação da Variante TbRRP44-ΔNPIN .....	76
4.1.1.5 Purificação da Variante TbRRP44-ΔNPIN <sup>D511N</sup> .....	78
4.1.2 Cristalização da Variante TbRRP44-ΔNPIN .....	80
4.1.3 Coleta e Processamento dos Dados de Difração e Determinação da Estrutura Cristalográfica de TbRRP44-ΔNPIN .....	83
4.1.4 Análises Estruturais .....	88
4.1.4.1 Estrutura da TbRRP44-ΔNPIN .....	88
4.1.4.2 Rota de Entrada do Substrato .....	91
4.1.4.3 Análise do Sítio Exonucleolítico de TbRRP44 .....	94
4.1.5 Ensaios de Degradação <i>in vitro</i> .....	99
4.1.6 Análise da Interação Entre TbRRP44 e Diferentes Substratos .....	105
4.1.6.1 Análise da Interação por Ensaio de Desvio de Mobilidade Eletroforética ...	106
4.1.6.2 Análise da Interação por Termoforese em Microescala .....	110

4.2 ANÁLISE POR CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE DA PRESENÇA DE TBRRP44 EM COMPLEXOS.....	115
4.3 ANÁLISES FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> DE TBRRP44 .....	119
4.3.1 Análise por Northern Blot de Intermediários do Processamento do rRNA .....	119
4.3.2 Análise Celular por Tomografia de Raios X Moles .....	125
4.3.2.1 Análise da Reconstrução e Segmentação das Imagens Obtidas por Tomografia de Raios X Moles .....	125
4.3.2.2 Identificação dos Acidocalcissomos .....	130
4.3.2.3 Análise do Volume de Acidocalcissomos e Gotas Lipídicas.....	132
4.3.2.4 Análise do Coeficiente de Absorção Linear .....	133
4.3.3 Análises Celulares por Citometria e Microscopia de Fluorescência.....	134
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>143</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>146</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Protozoários da família *trypansomatidae* compõem um grupo de organismos desafiadores tanto do ponto de vista de saúde pública como do ponto de vista científico. Alguns tripanossomatídeos despertam especial interesse pelo fato de causarem doenças humanas graves, fazendo parte deste grupo *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e diversas espécies de *Leishmania* que causam, respectivamente, a doença do sono, a doença de Chagas e leishmanioses em humanos e animais (SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006). A falta de vacinas e os efeitos colaterais graves causados pelos tratamentos disponíveis fazem com que tais doenças continuem a representar um desafio mundial de saúde pública.

Do ponto de vista científico, os tripanossomatídeos apresentam peculiaridades comuns ao grupo Kinetoplastida, tanto em relação à sua estrutura celular, quanto em relação a mecanismos moleculares específicos. Em relação às características celulares únicas, os cinetoplastídeos derivam seu nome da presença do cinetoplasto, um DNA mitocondrial encontrado em uma parte especializada da mitocôndria. A mitocôndria, por sua vez, constitui outra particularidade dos tripanossomatídeos, os quais apresentam apenas uma mitocôndria que se estende por toda a periferia do citoplasma, diferentemente dos demais eucariotos que apresentam várias mitocôndrias menores distribuídas pelo citoplasma (ZHOU; HU; LI, 2014). A bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática de onde sai o flagelo, também está presente em tripanossomatídeos (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2017; FIELD; CARRINGTON, 2009).

Do ponto de vista molecular, destaca-se a organização dos genes que codificam proteínas em grandes *clusters* no genoma, cuja transcrição resulta em longos pre-mRNAs policistrônicos, que são processados por *trans-splicing* (DE GAUDENZI et al., 2011). Com relação à regulação da expressão gênica, não apresentam fatores canônicos de transcrição, nem promotores para a RNA polimerase II adjacentes a cada gene, sendo a que a regulação da expressão acontece essencialmente após a transcrição (CLAYTON, 2016; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Outra diferença em relação a grande parte dos eucariotos envolve a estrutura dos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) e a maneira como os transcritos precursores são maturados. A molécula precursora do rRNA é composta de espaçadores externos e internos (ETS e ITS, respectivamente) e pelas sequências

que irão compor os rRNAs maduros (WILSON; CATE, 2012). Em tripanossomas, o rRNA correspondente à molécula 25S/28S dos demais eucariotos é subdividido em 6 fragmentos com a molécula precursora do rRNA possuindo 7 regiões ITS ao contrário das 3 presentes nos demais eucariotos (HERNÁNDEZ; CEVALLOS, 2014).

Entre as ribonucleases envolvidas na maturação de diversos tipos de RNA em eucariotos está o complexo proteico exossomo. Este complexo é composto por 9 proteínas que formam o chamado *core* Exo-9, que não apresenta atividade catalítica, ao qual associam-se a exoribonuclease Rrp6 e a Rrp44, que possui atividades endo e exoribonucleolítica (JANUSZYK; LIMA, 2014; MAKINO et al., 2015a). Rrp44 é uma proteína multi-domínios pertencente à família RNase II, formada por exonucleases que degradam o RNA no sentido 3' – 5'. Além do módulo exoribonucleolítico comum aos membros da família RNase II, a Rrp44 possui também o chamado domínio PIN, o qual apresenta atividade endonucleolítica (SCHAEFFER et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009a).

A caracterização do complexo exossomo em *T. brucei* mostrou que sua composição é bastante semelhante ao de leveduras e humanos, com exceção da proteína RRP44 que não foi identificada associada ao complexo (ESTEVEZ et al., 2003). Apesar de não estar associada ao exossomo, Estévez e colaboradores (2001) mostraram, através de experimentos de RNA de interferência, que TbRRP44 é essencial à viabilidade celular e que sua depleção causa acúmulo e processamento incompleto do intermediário 7S do rRNA, que é uma molécula precursora do rRNA 5.8S.

Nossos estudos estruturais anteriores mostraram que resíduos do domínio PIN da Rrp44 de levedura, que participam da interação com o exossomo, não são conservados no domínio PIN de TbRRP44. Além disso, análises por modelagem molecular de subunidades do *core* do exossomo de *T. brucei* indicaram uma extensão C-terminal que impediria a interação da TbRRP44, sugerindo as bases moleculares que podem explicar a não associação, em tripanossomatídeos, da proteína RRP44 ao complexo exossomo (CESARO, 2018).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Os diversos tipos de RNA presentes nas células possuem funções específicas, seja como parte da maquinaria de síntese de proteínas, como o RNA mensageiro

(mRNA), o RNA transportador (tRNA) e também o RNA constituinte da estrutura do ribossomo (rRNA), ou no controle da expressão gênica, como é o caso de MicroRNAs (miRNAs) e pequenos RNAs de interferência (siRNA), que se ligam ao mRNA suprimindo ou estimulando a tradução de proteínas, ou sinalizando para a sua degradação. Alguns RNAs também atuam no processamento de outros RNAs, como é o caso dos pequenos RNAs nucleares e nucleolares (snRNA e snoRNA, respectivamente) que atuam na excisão de íntrons do mRNA e no processamento do rRNA, respectivamente.

Os RNAs são transcritos na forma de precursores, que passam por etapas de processamento ou maturação, nas quais estão envolvidas endo- e exonucleases, para formação dos RNAs maduros. A ribonuclease Rrp44 está envolvida no processamento, maturação e controle de qualidade de grande parte das moléculas de RNA, atuando na maturação de rRNA e de alguns miRNAs, e também na degradação de mRNAs não transcritos corretamente e de tRNAs hipomodificados ou que não possuam modificações necessárias para que se dobrem corretamente e sejam funcionais.

Apesar de grandes avanços nos estudos de processamento, maturação e degradação dos diferentes tipos de RNA, muitas etapas ainda não foram elucidadas, principalmente em organismos que causam doenças negligenciadas. Sendo assim, o estudo da Rrp44 se faz de extrema importância para um maior entendimento desses processos. O estudo da RRP44 de *T. brucei* ganha mais interesse devido às particularidades no processamento do RNA de tripanossomatídeos.

## 1.2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo a caracterização estrutural, molecular e celular da função da ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei*.

## Objetivos específicos

Este trabalho visou completar e aprofundar a caracterização de RRP44 de *T. brucei*, iniciada em trabalho anterior (CESARO 2018). Assim, tivemos como objetivos específicos:

- i) Determinar a estrutura cristalográfica da proteína completa e/ou de seu domínio exonucleolítico, visando a análise detalhada de seu sítio catalítico e a comparação estrutural com homólogas, já que a estrutura da porção endonucleolítica já foi resolvida durante o mestrado.
- ii) Analisar a atividade *in vitro* da TbRRP44 frente a diferentes substratos de RNA. Em particular, caracterizar o papel dos domínios endo- e exoribonucleolítico na interação e degradação do substrato, através de ensaios utilizando mutantes específicos.
- iii) Analisar a atuação de TbRRP44 no processamento do precursor do RNA ribossomal, bem como identificar os intermediários acumulados devido à depleção da TbRRP44.
- iv) Investigar as alterações nas estruturas sub-celulares causadas pela depleção de TbRRP44, utilizando a técnica de tomografia de raios X moles.
- v) Identificar, por co-imunoprecipitação e espectrometria de massas, complexos envolvendo a proteína TbRRP44.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OS TRIPANOSSOMATÍDEOS E SUAS PARTICULARIDADES

Os tripanossomatídeos são protozoários da família tripanosomatidae, parasitas obrigatórios de plantas, insetos, animais e humanos. Dentre os mais conhecidos estão o *Trypanosoma brucei*, que causa a doença do sono ou tripanossomíase africana em humanos e a nagana no gado, o *T. cruzi*, que causa a doença de Chagas em humanos e várias espécies do gênero *Leishmania* que causam diferentes tipos de leishmanioses tanto em humanos quanto em animais. Durante a evolução dos eucariotos, os tripanossomatídeos formaram um grupo divergente, apresentando diferenças celulares e moleculares, algumas delas exploradas a seguir (LUKEŠ et al., 2018; SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006).

#### 2.1.1 Características Celulares dos Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos apresentam uma organela, que caracteriza a ordem Kinetoplastida, conhecida como cinetoplasto, que é uma estrutura especializada da mitocôndria que comporta o DNA mitocondrial. Este DNA mitocondrial, conhecido como kDNA, também apresenta particularidades, sendo formado por círculos, maxi e minicírculos, compreendendo cerca 30% do DNA total. O cinetoplasto está localizado próximo à bolsa flagelar e sua posição pode variar de acordo com o ciclo celular do parasita (CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018). Diferentemente dos outros eucariotos, que possuem várias mitocôndrias espalhadas pela célula, esses parasitas possuem uma única mitocôndria, que se estende por toda a periferia do citoplasma (PRIEST; HAJDUK, 1994).

Os tripanossomatídeos apresentam um flagelo ligado à célula, que se origina de uma invaginação da membrana celular conhecida como bolsa flagelar. Toda a internalização de nutrientes é feita por processos de endocitose, sendo que os tripanossomatídeos são também capazes de interagir com o hospedeiro através de exocitose. A bolsa flagelar é uma organela extremamente importante, pois é através dela que grande parte dos processos de endo e exocitose são realizados. Assim como o cinetoplasto, a bolsa flagelar muda de posição conforme o ciclo celular (HALLIDAY et al., 2020).

Outra organela característica de tripanossomatídeos é o glicosomo, organelas estas que são peroxissomos modificados que contém grande quantidade de enzimas glicolíticas e gliconeogênicas, sendo várias dessas enzimas essenciais para a viabilidade celular. Os glicosomos ficam espalhados por todos o citoplasma, sendo identificados 60 a 65 glicosomos em uma única célula de *T. brucei* (MICHELS et al., 2006; QUIÑONES et al., 2020).

### 2.1.2 Processamento do RNA

Os diversos tipos de RNA sejam eles codificantes, como é caso dos mRNAs, ou não codificantes, como rRNA, tRNA, miRNA, snRNA e snoRNA são transcritos como precursores e passam por etapas de processamento, para formação dos RNAs maduros e funcionais (LI; LIU, 2019).

#### 2.1.2.1 RNA mensageiro

Em eucariotos, o RNA mensageiro, sintetizado pela RNA polimerase II, passa por 3 grandes eventos de processamento. Sua extremidade 5' é modificada pela adição do chamado cap-0, um nucleotídeo de guanina modificado, 7-metilguanosina ( $m^7G$ ) que é ligado ao primeiro nucleotídeo do transcrito por uma ligação trifosfato 5'-5'. Através do processo de *splicing*, as sequências não codificantes, chamadas de íntrons, presentes entre sequências codificantes, os éxons, são removidas através da atuação dos spliceossomos, complexos formados por snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6), que reconhecem sequências específicas de RNA, e proteínas que promovem a abertura das fitas (helicases) e as clivagens (ribonucleases). Estes complexos se associam ao íntron, formando um laço juntando suas duas extremidades, reunindo então os éxons enquanto o íntron é removido, em uma reação de transesterificação. A maturação do mRNA envolve ainda a modificação de sua extremidade 3' pela adição de uma cauda poli(A) que vai sendo polimerizada pela adição de adeninas e que varia de tamanho entre os diferentes organismos. As modificações nas extremidades do RNA aumentam a estabilidade da molécula, protegendo-a de diferentes ribonucleases, além de promoverem a tradução. O mRNA maduro é exportado para o citoplasma onde é traduzido pelo ribossomo (revisão em PAL, 2020).

Os tripanossomatídeos processam os diferentes tipos de RNA de maneira diferente, quando comparado com os demais eucariotos. Nestes parasitas, a regulação da expressão gênica é essencialmente pós-transcricional, por não apresentarem fatores canônicos de transcrição, nem promotores para a RNA polimerase II adjacentes a cada gene (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Nestes organismos as sequências codificadoras de proteínas estão organizadas em clusters no genoma, em orientação 5'-3'. Cada cluster corresponde a uma unidade transcricional, cuja transcrição pela RNA polimerase II produz longos transcritos policistrônicos, com um único transcrito codificando várias proteínas diferentes, não funcionalmente relacionadas. As regiões intergênicas dos policistrons são ricas em pirimidinas, que servem de sinalização para o processamento dos RNAs mensageiros (DE GAUDENZI et al., 2011).

O mecanismo de processamento do mRNA também é distinto dos demais eucariotos, nos quais o mRNA é maturado através do chamado *cis-splicing*, descrito acima, em que os íntrons presentes em um pré-mRNA são removidos e os exons da mesma molécula de mRNA são ligados entre si. Nos tripanossomatídeos, ocorre o *trans-splicing*, caracterizado pela junção de duas moléculas de RNA transcritas a partir de genes diferentes (*spliced leader* + mRNA). O chamado *spliced leader*, composto por uma sequência conservada de 39 nucleotídeos, formará a extremidade 5' de todos os mRNAs maduros. Apesar de não usual em tripanossomatídeos o *cis-splicing* também pode ocorrer, em casos específicos de genes que possuem íntrons 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).

A biogênese do *spliced leader* (SL) ocorre em diversas etapas e envolve a participação de diversas proteínas acessórias. Resumidamente, o pré-RNA SL é transcrito, com uma cauda poli(U) na extremidade 3', a partir de um gene independente sob regulação de um promotor da RNA polimerase II, representando uma exceção ao mecanismo de transcrição de tripanossomatídeos. Tal como nos demais eucariotos, ocorre a adição do cap-0 ( $m^7GTP$ ) na extremidade 5' do RNA. Entretanto, o cap do RNA SL sofre modificações adicionais que inclui metilações no O2' da ribose dos quatro primeiros nucleotídeos (AACU), além de metilações na base do primeiro ( $m_2^6A$ ) e quarto ( $m^3U$ ) nucleotídeos do SL, realizadas por metiltransferases específicas. Uma etapa final da biogênese do SL consiste na remoção da cauda poli(U) por uma exonuclease 3'-5' ainda não identificada. O *spliced*

*leader* com sua estrutura 5' hipermetilada, denominada cap-4, é incorporado ao mRNAs através do processo de *trans-splicing*. Tal processo, uma reação de transesterificação em duas etapas é responsável pela formação da extremidade 5' comum a todos os mRNAs maduros em tripanossomatídeos. A estrutura intermediária gerada em forma de Y é análoga à estrutura em “laço” gerada na reação de *cis-splicing* (figura 1). A maturação dos mRNAs é completada pela clivagem do pré-mRNA na região 3' não traduzida, seguida da reação de poliadenilação da extremidade 3' (GÜNZL, 2010; LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003; MICHAELI, 2011).

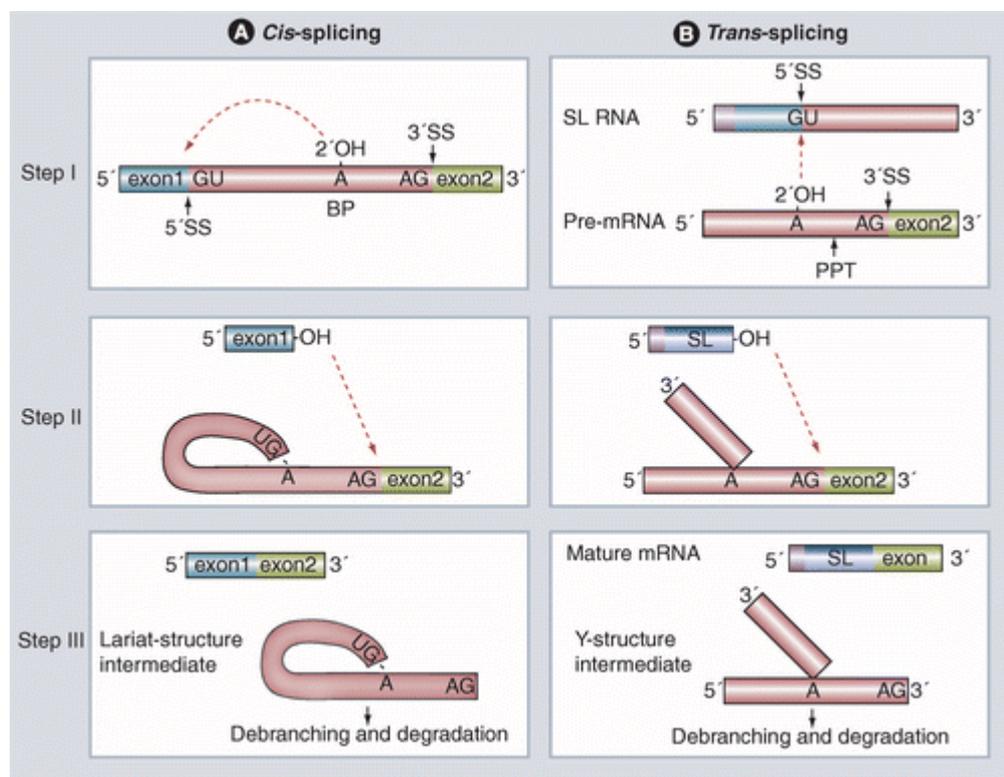


Figura 1 - Quadro comparativo entre as seqüências de processamento do mRNA por *cis-splicing* e *trans-splicing*. A: No processamento do mRNA por *cis-splicing* o intron, representado em vermelho, é removido através da atuação de complexos proteicos contendo pequenos RNAs nucleares (snRBPs). O intron é “dobrado” na forma de um laço (estrutura Lariat), sua extremidade 5' se liga a uma adenina conservada, liberando a extremidade 3' do éxon1 (azul), o que consiste na primeira reação de transesterificação. Então a extremidade 3' do intron é clivada (segunda reação de transesterificação) permitindo a ligação entre a extremidade 3' do éxon1 com a extremidade 5' do éxon2. B: No processamento do mRNA por *trans-splicing*, o RNA contendo o *spliced leader* (SL) se associa ao pré-mRNA através da atuação de snRBPs. O SL RNA é clivado no limite 3' da seqüência do *spliced leader* (identificado na figura como 5'SS) por reação com o sítio A localizado na seqüência intergênica a 5' da região codificadora do pré-mRNA. A seqüência intergênica por sua vez é separada do pré-mRNA por um ataque nucleofílico do 3'OH do *spliced leader* no sítio 3'SS do pré-mRNA, que finalmente permite a união do SL com o éxon. Fonte: (MICHAELI, 2011).

Uma particularidade de *T. brucei*, é a capacidade de sintetizar alguns RNAs mensageiros através da RNA polimerase I, enquanto os demais eucariotos sintetizam

o mRNA apenas através da RNA polimerase II. São exemplos de transcritos da RNA polimerase I, as glicoproteínas variantes de superfície (VSG), as quais são extremamente importantes, pois revestem a célula e, graças a sua grande variação, fornecem um mecanismo de escape ao ataque por parte do sistema imune dos hospedeiros (GÜNZL et al., 2003).

#### 2.1.2.2 RNA Transportador

Os tRNAs sintetizados pela RNA polimerase III contém uma sequência líder na extremidade 5' e uma sequência "trailer" na extremidade 3'. A sequência líder é removida pela endonuclease RNase P e a extremidade 3' é removida por diferentes ribonucleases, dependendo do organismo. A enzima tRNA nucleotidiltransferase promove a adição/correção da sequência CCA na extremidade 3' do tRNA, onde posteriormente será ligado o aminoácido por uma aminoacil-tRNA sintetase (BETAT et al., 2014). O tRNA é exportado para o citoplasma onde os que possuem íntrons serão processados por *splicing*. O *splicing* realizado em tRNA é diferente do observado em mRNAs. Nos tRNAs a região intrônica é excisada por um complexo de endonucleases chamado TSEN e a molécula de RNA que foi dividida em duas é religada por RNA ligases RTCB (HAYNE et al., 2020). Após o *splicing* estas moléculas passam por uma série de modificações nas bases como metilações e pseudo-uridilações que são de extrema importância para o correto funcionamento desses RNAs (PAN, 2018).

Apesar do processamento e estrutura dos tRNAs serem muito conservados entre os organismos, os tRNAs de origem mitocondrial, que participam da tradução na mitocôndria não existem em tripanossomatídeos. Todos os tRNAs envolvidos na tradução mitocondrial precisam ser importados do citoplasma. Diferentemente de outros organismos, apenas um dos tRNAs em *T. brucei* apresenta íntron, o tRNA<sup>Tyr</sup>, com uma sequência de 11 nucleotídeos que é removida por *splicing* (revisão em SHIKHA et al., 2019).

#### 2.1.2.3 Pequenos RNA Nucleares

Os snRNAs também são sintetizados pela RNA polimerase II, com exceção do snRNA U6, que é transcrito pela RNA polimerase III. Assim como os mRNAs, a

extremidade 5' dos snRNAs é modificada por estruturas do tipo “cap” contendo 7-metilguanosina (m<sup>7</sup>G) ou 5'-trimethylguanosina. Tal modificação é mediada pelo *cap binding complex* (CBC). Já na extremidade 3', existe uma sequência “3'- box” que é removida durante a maturação pelo complexo *integrator*, por um mecanismo ainda desconhecido (CHEN; WAGNER, 2010; EGLOFF; O'REILLY; MURPHY, 2008). Apesar dos snRNAs serem estudados há algumas décadas, muitas etapas do seu processamento permanecem a ser desvendadas.

Os snRNAs encontrados em tripanossomatídeos são menores em relação aos demais eucariotos (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003). Apesar do mRNA ser processado por *trans-splicing* nesses organismos, os snRNA também atuam no processamento do mRNA, com a mesma função de identificar sequências específicas de RNA (TSCHUDI; ULLU, 2002).

#### 2.1.2.4 Pequenos RNAs Nucleolares

Os processos de transcrição e maturação dos snoRNAs variam bastante entre os organismos, por esta razão, será comentado apenas este processamento em *S. cerevisiae*. Em leveduras os snoRNAs podem ser transcritos individualmente ou de forma policistrônica. Quando transcritos de forma policistrônica, os RNAs são separados pela endonuclease Rnt1p (CHANFREAU; LEGRAIN; JACQUIER, 1998), e processados por exonucleases, como a Rat1 ou Xrn1p, que clivam no sentido 5' – 3' (QU et al., 1999) e a Rrp6, componente do complexo exossomo, responsável pelo processamento no sentido 3' – 5' (ALLMANG et al., 1999).

Em tripanossomatídeos os snoRNAs estão organizados em clusters e são transcritos de maneira policistrônica pela RNA polimerase II. Também, são processados co-transcricionalmente por *trans-splicing* e poliadelinados na extremidade 3', como os mRNAs (KOLEV et al., 2010). Este processamento incomum estabiliza os snoRNAs até que sejam clivados para a formação de RNAs individuais (MICHAELI et al., 2012). A enzima responsável por tais clivagens endonucleolíticas ainda não foi identificada.

### 2.1.2.5 RNA Ribossomal

A síntese dos ribossomos é extremamente complexa, sendo envolvidos mais de 200 fatores para a montagem do ribossomo em eucariotos. Eles são formados por duas subunidades, uma subunidade maior (LSU, do inglês *large subunit*), também chamada de 60S, que é formada pelos rRNAs 5S, 5.8S e 25/28S (25S em levedura e 28S em humanos) e por 46 proteínas ribossomais (em levedura), e outra subunidade menor, 40S ou SSU (do inglês *small subunit*), composta pelo rRNA 18S e 33 proteínas ribossomais (em levedura) (WOOLFORD; BASERGA, 2013).

A biogênese do ribossomo se inicia com a transcrição do RNA ribossomal a partir do rDNA. A RNA polimerase I sintetiza no nucléolo a molécula precursora que dará origem aos RNAs maduros 18S, 5.8S e 25S/28S enquanto a RNA polimerase III realiza a transcrição do precursor do RNA 5S. Co-transcricionalmente, as proteínas ribossomais e os fatores de montagem são produzidas no citosol, transportadas para o núcleo e vão se associando ao RNA formando as chamadas pré-subunidades, esses pré-complexos passam por várias etapas de processamento no nucléolo e núcleo, onde os vários fatores de montagem se associam e dissociam dos pré-complexos. Estes fatores consistem de diversas proteínas que estabilizam os complexos, ou que servem de “ponte” para outras proteínas ou são fatores que realizam as reações catalíticas que ocorrem durante a maturação do rRNA como clivagens, pseudouridilações ou metilações no RNA. Pequenos RNAs nucleolares (snoRNA) também atuam na maturação do rRNA e montagem dos ribossomos, podendo interagir diretamente com os rRNAs ou com proteínas, participando de clivagens ou se ligando ao rRNA, impedindo clivagens precoces ou estabilizando-os. As pré-subunidades ribossomais são então transportadas para o citoplasma onde ocorre a finalização do processamento dos pré-complexos e tem-se os ribossomos maduros (figura 2) (revisão em BASSLER; HURT, 2019).

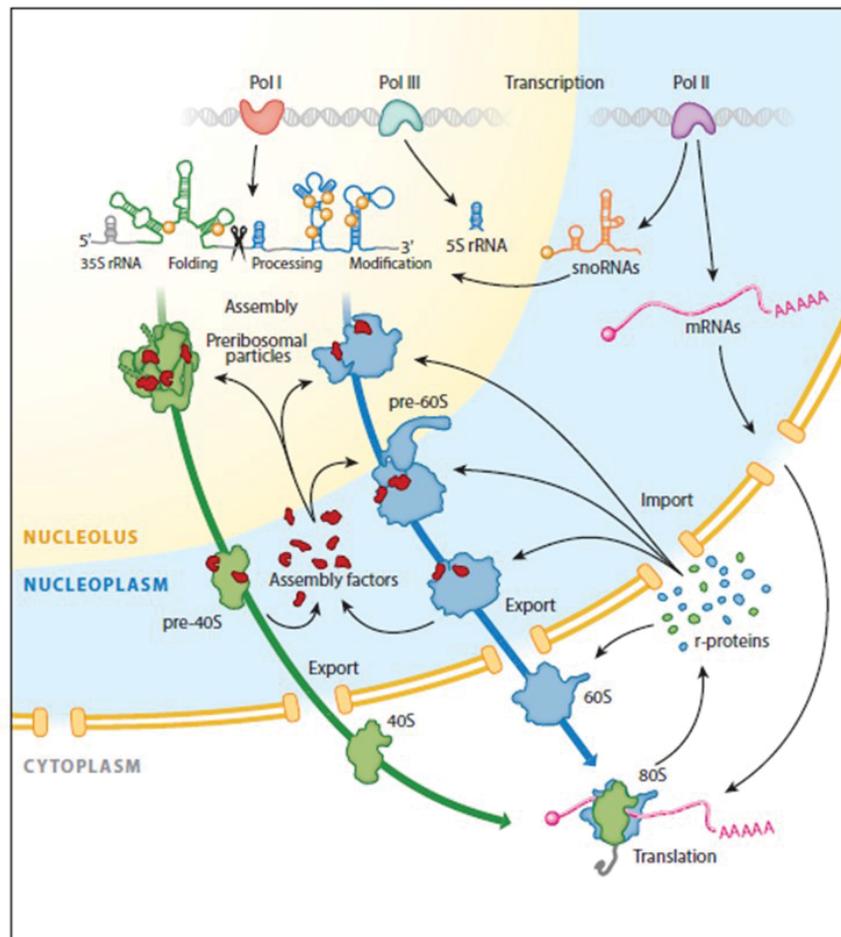


Figura 2 - Esquema simplificado da biogênese de ribossomos em eucariotos. Em azul são esquematizadas as moléculas referentes à montagem da subunidade ribossomal maior, enquanto em verde as da subunidade menor. Os principais componentes estão identificados na própria figura. Fonte: BASSLER; HURT, 2019.

De maneira geral, em eucariotos, a RNA polimerase I sintetiza um único transcrito (35S em levedura), que possui os três RNAs 18S, 5.8S e 25/28S intercalados por duas regiões espaçadoras internas ou ITSs (ITS1 e ITS2), além de duas regiões espaçadoras externas, ou ETSs, nas extremidades 5' e 3'. A maturação do rRNA em levedura (figura 3) se inicia com a clivagem endonucleolítica da 3' ETS catalisada pela ribonuclease Rnt1. Já a remoção da 5' ETS ocorre em duas etapas. Primeiramente através de uma clivagem no sítio A<sub>0</sub> formando o precursor 33S, então o sítio A<sub>1</sub> é clivado, gerando o pré-rRNA 32S. A seguir ocorre uma clivagem na ITS1 através da ribonuclease Rcl1, no sítio A<sub>2</sub>, separando pré-rRNA 20S, que formará o rRNA 18S, e o pre-rRNA 27SA<sub>2</sub>, que dará origem aos rRNAs 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, 2011a; WOOLFORD; BASERGA, 2013).

A associação do pré-rRNA 20S com as proteínas ribossomais formam um complexo 43S, que é transportado do nucleoplasma para o citoplasma, onde o restante da ITS1 será removida através da clivagem do sítio D, realizada pela ribonuclease Nob1, formando a molécula madura do rRNA 18S. O pré-rRNA 27SA<sub>2</sub> também é ligado às proteínas ribossomais formando o complexo 66S que continua sendo processado no nucléolo. O processamento do 27SA<sub>2</sub> pode ocorrer por duas vias. Numa delas, a qual acontece em aproximadamente 85% das vezes, ocorre a remoção do restante da ITS1, a partir do sítio A<sub>3</sub> até o sítio B1<sub>s</sub> pelo complexo MRP RNase, enquanto na outra, que ocorre 15% das vezes, acontece a remoção da ITS1 a partir do sítio A<sub>3</sub> até o sítio B<sub>L</sub>. Após a remoção da ITS1, independentemente de qual maneira, ocorre uma clivagem endonucleolítica pela ribonuclease Las1 no sítio C<sub>2</sub> presente na ITS2 (GASSE; FLEMMING; HURT, 2015), formando os pré-rRNAs 25.5S e 7S<sub>S</sub> ou 7S<sub>L</sub>. Parte da ITS2 ainda ligada ao 25.5S é removida pela ribonuclease Rat1 gerando a forma madura do rRNA 25S, enquanto a parte da ITS2 ligada ao pré-rRNAs 7S<sub>S</sub> ou 7S<sub>L</sub> 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).

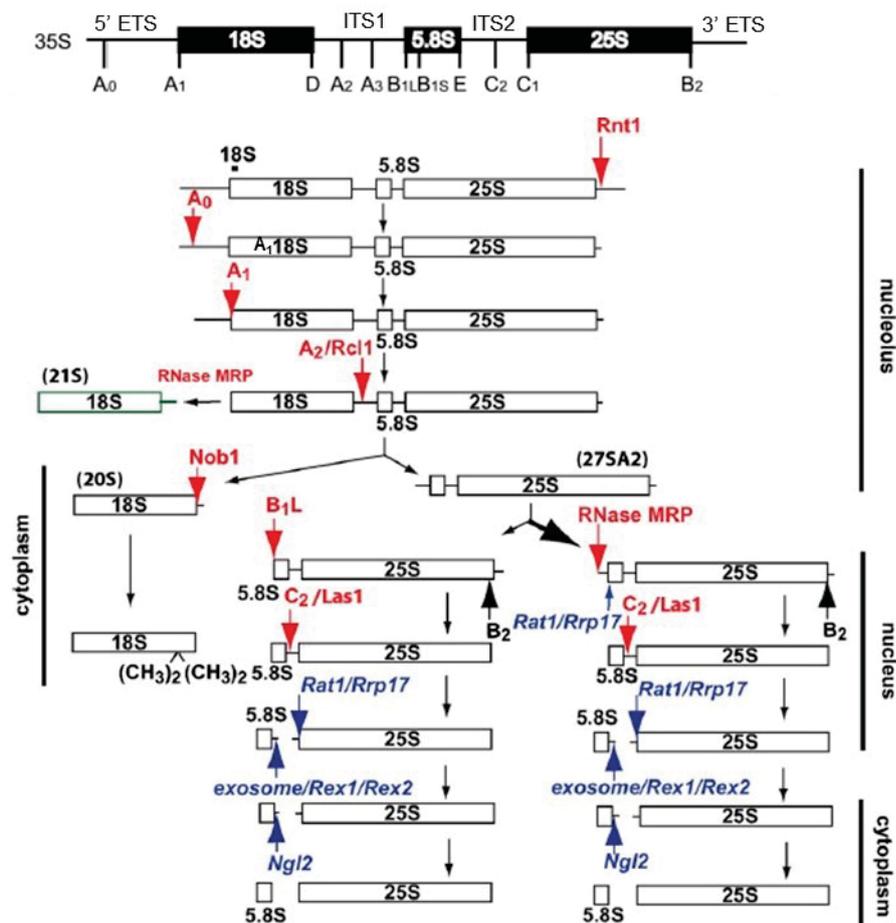


Figura 3 – Representação esquemática das etapas do processamento do RNA ribossomal em leveduras. Em vermelho são representadas as clivagens endonucleolíticas, enquanto em azul as exonucleolíticas, com a identificação das enzimas responsáveis pelas clivagens. Fonte: Adaptado de BLEICHERT et al., 2006 e HORN; MASON; KARBSTEIN, 2011.

Nos tripanossomatídeos, a molécula precursora do RNA ribossomal, correspondente ao transcrito 35S de levedura apresenta uma estrutura bastante diferente. O tamanho do rRNA 18S é maior do que o dos demais eucariotos e a região correspondente ao 25S/28S dos demais eucariotos, no caso de *T. brucei* e *T. cruzi* é subdividida em 6 fragmentos e de *L. major* em 7 fragmentos. Conseqüentemente, o transcrito inicial de rRNA possui 7 ou 8 regiões espaçadoras internas (ITSs), ao contrário das duas presentes nos demais eucariotos (figura 4) (WHITE et al., 1986; HERNÁNDEZ; CEVALLOS, 2014).

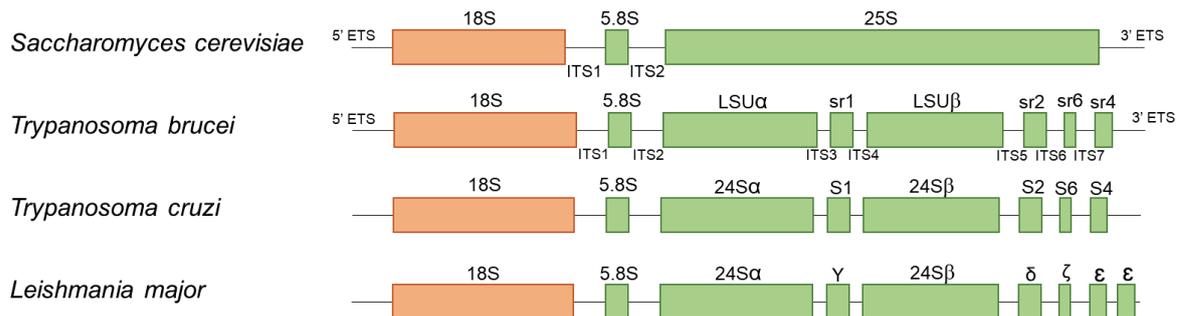


Figura 4 - Comparação dos diferentes precursores do pré-rRNA de tripanossomatídeos. Em laranja são destacadas as regiões correspondentes à subunidade menor, enquanto em verde à subunidade maior do ribossomo. Fonte: Adaptado de HERNANDEZ; CEVALLOS, 2014.

A maturação do rRNA nesses parasitas ainda é pouco caracterizada. Porém sabe-se que, diferentemente de levedura, a primeira clivagem no precursor de 9,6 kb ocorre na ITS1 no sítio B<sub>1</sub>, gerando uma molécula de ~3,4 kb e outra de 5,8kb. A molécula de ~3,4 kb consiste no rRNA precursor da subunidade 40S e contém a 5' ETS, a sequência que dá origem ao rRNA 18S e parte da ITS1. A molécula de 5,8 kb contém as sequências das demais moléculas de rRNA que fazem parte subunidade ribossomal maior, intercaladas pelas sequências espaçadoras internas 2 a 7 além da região 3'ETS (figura 5). A região 5' ETS é removida em 3 etapas, pela clivagem dos sítios A', A<sub>0</sub> e A<sub>1</sub>, respectivamente (CAMPBELL et al., 1987; HARTSHORNE; TOYOFUKU, 1999). A região da ITS1 que permanece ligada ao pre-rRNA da subunidade menor, assim como em levedura, é removida no citoplasma nas últimas etapas do processamento da SSU, com uma clivagem no sítio A<sub>2</sub> realizada pela Nob1 (KALA et al., 2017). Uma clivagem endonucleolítica na região ITS2 da molécula de 5,8 kb separa o precursor do rRNA 5.8S do precursor contendo o LSUα, LSUβ e os pequenos rRNA (srRNA) denominados SR1, SR2, SR4 e SR6 (RAJAN et al., 2019). A maturação do 5.8S requer a participação do complexo exossomo e da TbRRP44, através do processamento da extremidade 3' do precursor 7S (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001). As demais etapas de processamento, os sítios específicos de clivagem e as ribonucleases envolvidas nas diferentes etapas da maturação do rRNA em tripanossomatídeos ainda não foram caracterizadas.

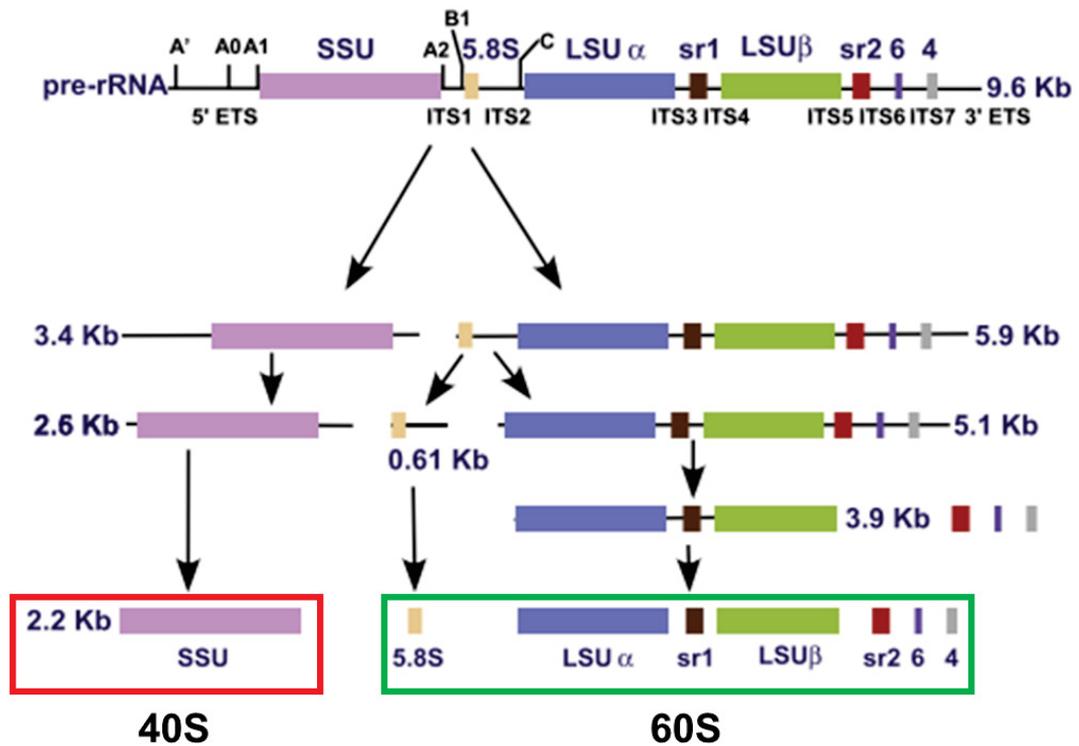


Figura 5 - Representação esquemática das etapas da maturação do RNA ribossomal de *T. brucei*. Em vermelho é destacada a molécula correspondente ao 40S e em verde as moléculas correspondentes ao 60S. SSU: Subunidade menor. LSU: subunidade maior. sr: pequenos rRNAs. Fonte: adaptado de RAJAN et al., 2019.

Dentre as peculiaridades presentes nos rRNAs de tripanossomatídeos, vale mencionar também a presença de um domínio específico conhecido como KSD (do inglês *kinetoplastid-specific domain*) na subunidade maior do ribossomo, que interage diretamente com os rRNAs sr2, sr6 e sr4 (figura 6) (HASHIM et al., 2013), além de grandes extensões proteicas e ribonucleicas.

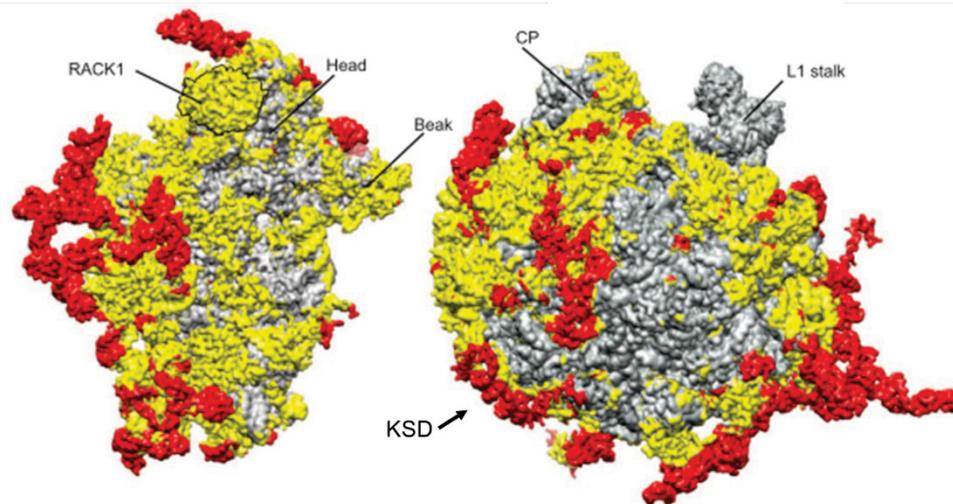


Figura 6 - Representação da estrutura do ribossomo de *T. brucei* determinada por crio-microscopia eletrônica. Na estrutura da esquerda é representada a subunidade menor do ribossomo, enquanto à direita a subunidade maior. Em cinza estão representadas as regiões que são conservadas em procariotos e eucariotos, 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.

As diferenças observadas, em tripanossomatídeos, nos diversos tipos de RNA e mecanismos para o seu processamento apontam para a relevância do estudo de proteínas envolvidas neste processamento e, entre elas, as ribonucleases, enzimas responsáveis por clivagens endo- e exonucleolíticas essenciais aos processos de maturação do RNA.

## 2.2 O COMPLEXO EXOSSOMO E A RIBONUCLEASE Rrp44

O exossomo é um complexo proteico presente em eucariotos, tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, atuando na maturação, degradação e processamento de diversos tipos de RNA, sendo o complexo com atividade ribonucleolítica mais importante da célula (KILCHERT; WITTMANN; VASILJEVA, 2016).

No núcleo, o exossomo é composto por um *core* de 9 proteínas desprovido de atividade catalítica, conhecido como Exo-9. Seis dessas nove proteínas (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 e Mtr3) possuem domínios tipo RNase PH (do inglês *phosphorolytic exoribonucleases*, por homologia à RNase PH de *E. coli*) e formam uma estrutura em anel. As outras três proteínas do Exo-9 (Rrp4, Rrp40 e Csl4) apresentam domínios S1 e KH de ligação a RNA e se associam ao topo do anel

formando o chamado *cap* ou *lid* (LIU; GREIMANN; LIMA, 2006). As duas subunidades catalíticas do exossomo, Rrp6 e Rrp44 (também denominada Dis3), são responsáveis pela atividade exonucleolítica do complexo no sentido 3' – 5', sendo que Rrp44/Dis3 possui, adicionalmente, atividade endoribonucleolítica. Rrp6 associa-se às proteínas do *lid* do exossomo enquanto Rrp44/Dis3 liga-se ao lado oposto do anel (figura 7, A) (MAKINO et al., 2015a; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013).

No citoplasma, a estrutura do exossomo é majoritariamente conservada, porém, a proteína Rrp6 é substituída pela GTPase Ski7 (*Superkiller 7*) (figura 7, B) (KOWALINSKI et al., 2016), que atua como um cofator para a associação do complexo Ski ao complexo exossomo, sendo o complexo Ski formado pelas proteínas Ski2, Ski3 e Ski8, que recrutam e regulam a atividade do exossomo citoplasmático para a degradação de mRNA (ZHANG et al., 2019). Parte dos exossomos citoplasmáticos, apresentam em sua composição uma proteína ortóloga à Rrp44, a Dis3L (*Dis3-like*), que será mais detalhada mais a frente (STAALS et al., 2010).

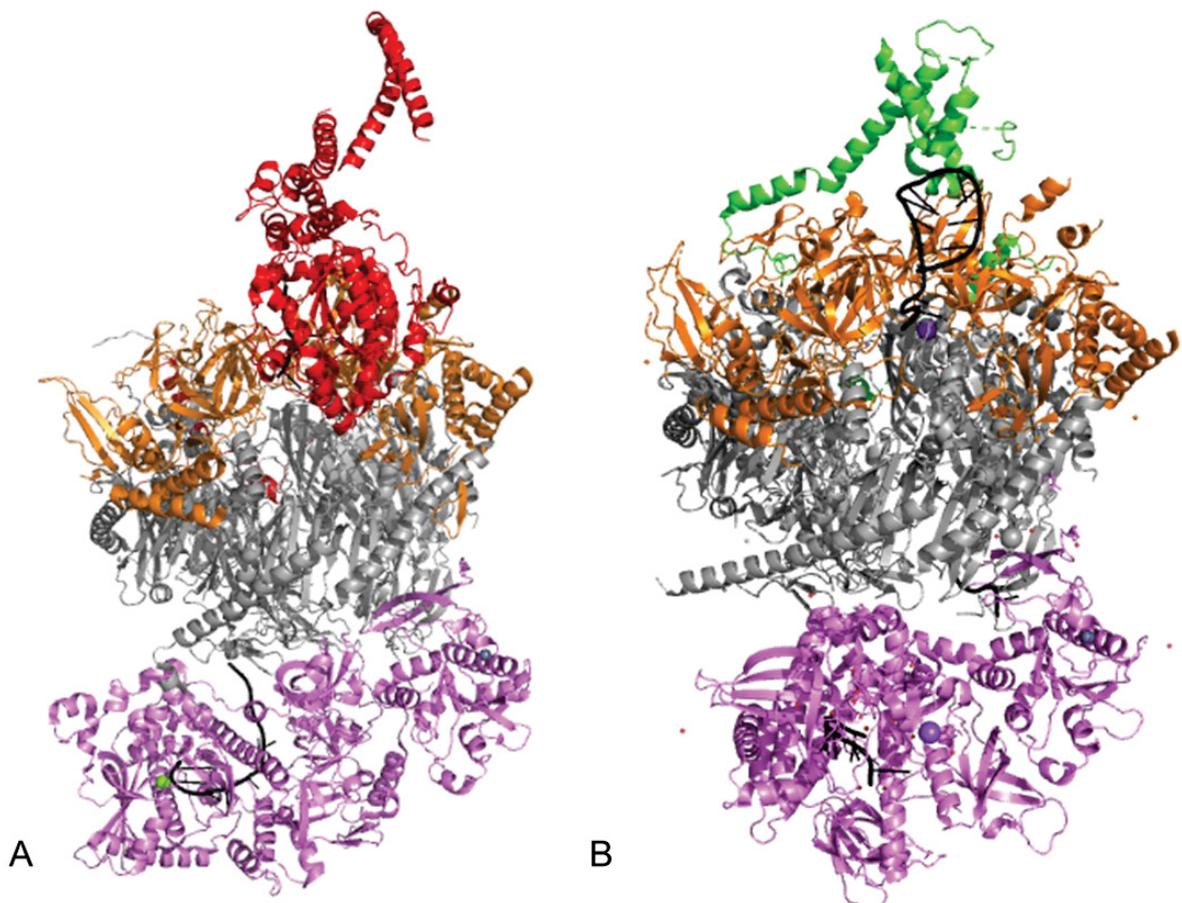


Figura 7 - Representação da estrutura cristalográfica do exossomo de levedura. A) Complexo nuclear, código PDB: 5c0w. B) Complexo citoplasmático, código PDB: 5jea. Em laranja são representadas as proteínas que formam o chamado *lid* do Exo-9 (Rrp4, Rrp40 e Csl4), enquanto em cinza são destacadas as proteínas que formam o anel central do Exo-9 (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Mtr3, Rrp45 e Rrp46). São destacados em lilás a Rrp44/Dis3, em vermelho a Rrp6, presente no exossomo nuclear e em verde a proteína Ski7 presente no exossomo citoplasmático. Em preto é representado o RNA presente nas estruturas.

A ribonuclease Rrp44/Dis3 pertence à família RNase II/RNB que incluem as RNase II e RNase R bacterianas. Esta família se caracteriza por uma estrutura formada por 4 domínios: dois domínios do tipo *cold shock* (CSD1 e CSD2), um domínio denominado RNB com atividade exonucleolítica no sentido 3' – 5' e um domínio C-terminal do tipo S1, este normalmente encontrado em proteínas de interação a RNA. Adicionalmente, Rrp44/Dis3 possui um domínio endonuclease PIN (segundo nomenclatura do domínio PiIT N-terminus) em sua região N-terminal (figura 8) (BONNEAU et al., 2009; LORENTZEN et al., 2008). Os domínios CSD1, CSD2 e S1 formam uma região de ancoragem e uma fenda onde o RNA de fita simples interage e é direcionado para degradação pelo domínio RNB. O bolsão catalítico, região que

compreende os nucleotídeos N1 a N5 na figura 9A, é carregado positivamente (figura 9B), o que favorece a interação molécula de RNA (FRAZÃO et al., 2006; VUKOVIĆ et al., 2016).

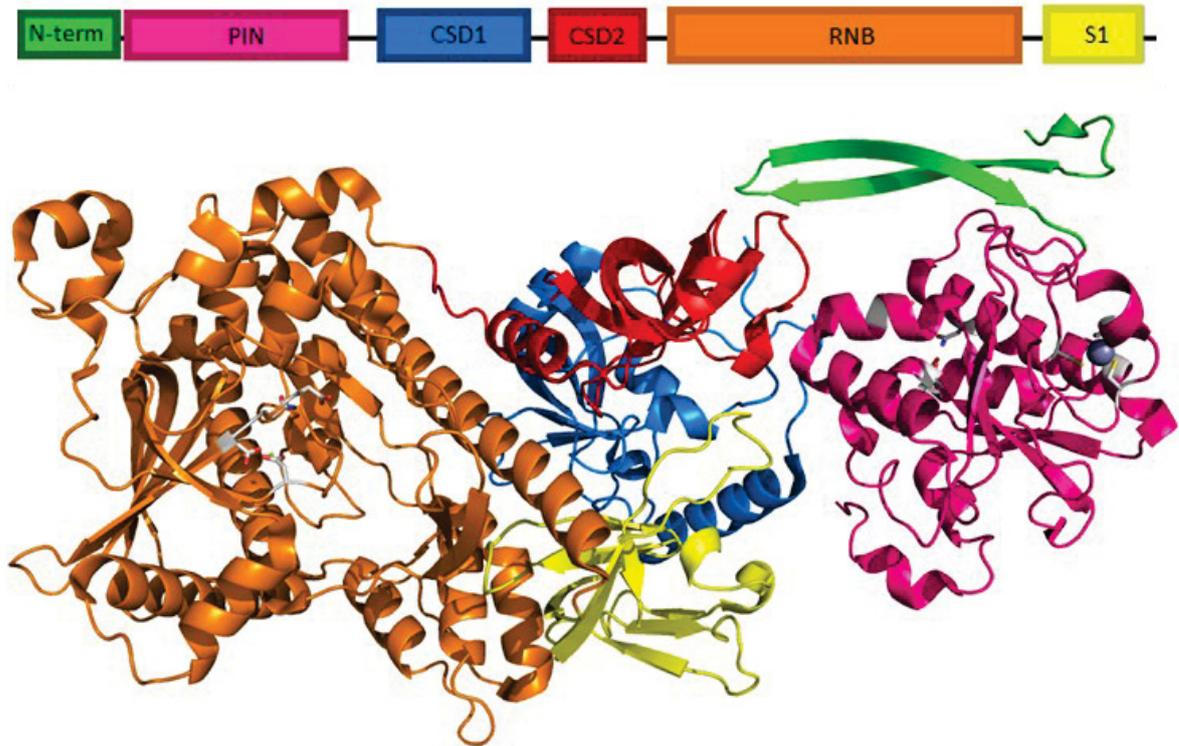


Figura 8 - Representação da estrutura tridimensional da Rrp44 de levedura (PDB: 5c0w) com seus domínios destacados. Em verde está representado o domínio N-terminal, em rosa está o domínio PIN, seguido pelos dois domínios tipo *cold shock domain*, CSD1 e CSD2, em azul e vermelho, respectivamente. Em laranja está o domínio RNB e por último o domínio S1, em amarelo.

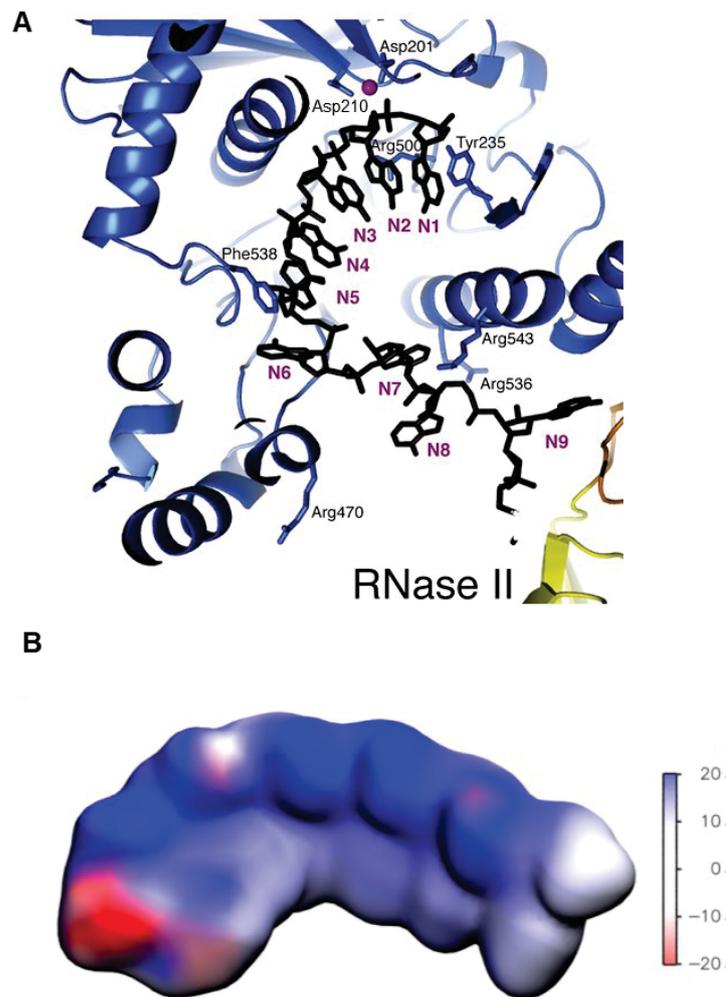


Figura 9 - Visão da região catalítica da família RNase II/ RNB. A: Região catalítica da RNase II de *E. coli*, sendo o RNA representado em preto. O nucleotídeo N1 corresponde à extremidade 3' do substrato. F538 juntamente com Y235 foram um “clamp” que prende o RNA da região catalítica e a R500 estabiliza a ligação fosfodiéster a ser clivada, entre N1 e N2. Os ácidos aspárticos D201 e D210 estão envolvidos na reação catalítica. Fonte: LORENTZEN et al., 2008. B: Representação da superfície de potencial eletrostático da região catalítica da Rrp44 de *S. cerevisiae*, correspondendo à região de interação dos nucleotídeos N1 a N5. Em azul são mostradas as regiões carregadas positivamente, enquanto em vermelho as carregadas negativamente. Fonte: VUKOVIĆ et al., 2016.

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 (DRAŻKOWSKA et al., 2013; SCHAEFFER et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009a). O domínio PIN possui ainda um motivo conservado de ligação a zinco, formado por resíduos Cys-Cys-Cys-His (não sequenciais), que tem papel na atividade enzimática da proteína, estando relacionado com a ligação da Rrp44 ao complexo exossomo. Mutações nesse motivo causam perda de afinidade da associação da Rrp44 ao exossomo (SCHAEFFER et al., 2012).

Estudos estruturais mostraram que Rrp44 de levedura pode assumir diferentes conformações para degradação do RNA. Em uma delas, o substrato é direcionado ao sítio catalítico do domínio RNB passando pelo canal central formado pelo anel Exo-9, enquanto que na segunda, apesar de associada ao exossomo, Rrp44 interage e degrada o RNA sem a participação direta das demais subunidades do complexo. Para isso, Rrp44 adota uma conformação dita “aberta” onde observa-se uma mudança conformacional do domínio PIN em relação ao módulo exoribonucleolítico (MAKINO et al., 2015).

No núcleo, a Rrp44 atua no processamento e degradação de vários tipos de RNA, como por exemplo os RNAs transportadores (tRNA) que quando apresentam enovelamento incorreto são degradados pelo exossomo (LACAVA et al., 2005). Também atua na degradação dos chamados CUTs (do inglês *cryptic unstable transcripts*), RNAs não codificantes (ncRNA) transcritos a partir da RNA polimerase II, que apresentam estrutura *cap* no 5' e poliadenilação no 3', porém não possuem pautas abertas de leitura (KILCHERT; WITTMANN; VASILJEVA, 2016).

Rrp44 atua ainda no processamento do rRNA 5.8S, sendo responsável pela remoção de parte da ITS2 presente no 3' do precursor 7S. Em leveduras, foi demonstrado que, após a clivagem endonucleolítica realizada pela proteína Las1, a Rrp44 degrada toda a ITS2 até que sobrem 30 nucleotídeos. Subsequentemente Rrp6 degrada parte desses 30 nucleotídeos, formando o chamado intermediário 6S (BRIGGS; BURKARD; BUTLER, 1998; FLEMMING et al., 2017). Além da remoção da ITS2, estudos recentes em levedura indicam que a Rrp44 também atua na degradação do 5' ETS. Após a clivagem no sítio A1, pela Utp24, o fragmento entre o sítio A0 e A1 é degradado pelo exossomo no pré-complexo 90S, recrutado novamente pela Mtr4 (LAU et al., 2021).

No citoplasma, a Rrp44 atua principalmente na degradação e controle de qualidade de RNAs mensageiros. O mRNA é degradado após remoção, pela ribonuclease Cc44p, da cauda poli-A presente na extremidade 3'. A partir da deadenilação, uma das rotas possíveis é a degradação pelo exossomo, a partir da extremidade 3' do mRNA até a região próxima ao *cap* 5'. O *cap* será removido pela enzima Dcs1p, liberando o pequeno oligoribonucleotídeo remanescente. Na segunda, o *cap* 5' é removido pela Dcp2p, deixando a extremidade 5' exposta para que a ribonuclease Xrn1 degrade o mRNA. Em leveduras, a segunda rota é a mais utilizada (SCHAEFFER et al., 2010).

Humanos e camundongos apresentam uma ou duas proteínas ortólogas à Rrp44/Dis3, denominadas Dis3L e Dis3L2 (*Dis3-like*). A Dis3L associa-se ao exossomo citoplasmático e possui os mesmos domínios que a Rrp44/Dis3, porém o domínio PIN apresenta uma mutação no sítio endonucleolítico e não possui atividade catalítica (STAALS et al., 2010; TOMECKI et al., 2010). Dis3L, participa da degradação do rRNA 28S em humanos. Os rRNAs a serem degradados são clivados ao meio e poliadenilados, esta poliadenilação atuando como uma marcação para degradação, tanto pelo exossomo que cliva no sentido 3' – 5' quanto para a ribonuclease Xrn1 que cliva no sentido 5' – 3' (SLOMOVIC et al., 2010).

Dis3L2, presente também em *Schizosaccharomyces pombe* (MALECKI et al., 2013), é também citoplasmática, mas, ao contrário de Rrp44/Dis3 e Dis3L, não possui o domínio PIN e, conseqüentemente, não interage com o exossomo, atuando de maneira independente no citoplasma (LUBAS et al., 2013; MALECKI et al., 2013). A Dis3L2 está envolvida na degradação de inúmeros tipos de RNAs como micro RNAs (miRNA), mRNAs e outros RNAs não produzidos corretamente, mas em especial RNAs não codificantes. Esses RNAs são marcados por uridilações (adição de uracilas) e a Dis3L2 é recrutada para degradação (PIROUZ et al., 2016; USTIANENKO et al., 2016). Dis3L2 degrada preferencialmente substratos ricos em uracilas, tornando-a bastante específica para estes substratos (FAEHNLE; WALLESHAUSER; JOSHUA-TOR, 2014).

### 2.2.1 Complexo Exossomo e Rrp44 em Tripanossomatídeos

O complexo exossomo de tripanossomatídeos foi inicialmente caracterizado em *T. brucei* por Estévez e colaboradores (2001; 2003) e em *L. tarentolae* por Cristodero e colaboradores (2008). Tais estudos mostraram que a composição do complexo é semelhante ao de leveduras e humanos, com todas as proteínas conservadas, com exceção da proteína RRP44 que, em ensaios de duplo-híbrido em leveduras e ensaios de purificação utilizando outras subunidades do complexo como isca, não foi identificada associada ao complexo. Apesar da não associação ao complexo, a proteína RRP44 é conservada em tripanossomatídeos.

Nestes estudos iniciais de Estévez e colaboradores (2001), tanto o exossomo quanto a TbRRP44 foram identificados no núcleo e no citoplasma, no entanto, estudos mais recentes de Kramer e colaboradores (2016) mostraram que tanto o exossomo

quanto a TbRRP44 estão majoritariamente presentes no núcleo, principalmente na borda no nucléolo. Nos mesmos estudos foi observado que a proteína RRP6 está presente tanto no exossomo citoplasmático quanto no nuclear (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001), diferentemente de levedura que apresenta a proteína Ski7 no exossomo citoplasmático. Através de experimentos realizados em *T. brucei* aplicando a técnica de RNA de interferência, foi comprovado que todas as subunidades do exossomo são essenciais para a viabilidade celular, com exceção da CSL4. Além disso, TbRRP44 é também essencial à proliferação do parasita (ESTÉVEZ et al., 2001), indicando sua atuação, de forma independente do exossomo, em vias essenciais de processamento do RNA em tripanossomatídeos.

Em tripanossomatídeos, a função do exossomo no processamento do rRNA foi também demonstrada, sendo essencial à maturação do rRNA 5.8S (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001). Além disso, em trabalho anterior mostramos que em *T. brucei*, a depleção de RRP44, além do acúmulo do intermediário 7S, precursor do 5.8S, causa o bloqueio do processamento de todos os precursores dos rRNAs correspondentes à subunidade maior do ribossomo (CESARO, 2018). Também é interessante notar que o complexo Ski, que atua em conjunto com o exossomo citoplasmático em leveduras não está presente em tripanossomatídeos (CLAYTON; ESTEVEZ, 2010).

Ainda em trabalho anterior, através da determinação da estrutura cristalográfica do domínio endonucleolítico PIN de TbRRP44, mostramos que resíduos da Rrp44 de levedura que participam da interação com o exossomo não são conservados no domínio PIN de TbRRP44 (CESARO et al., 2019). Além disso, análises por modelagem molecular de subunidades do *core* Exo-9 do exossomo de *T. brucei* indicaram uma extensão C-terminal que impediria a interação da TbRRP44, sugerindo as bases moleculares para a não associação, em tripanossomatídeos, da proteína RRP44 ao complexo exossomo (figura 10). Foi também observado que no domínio PIN da TbRRP44, além do motivo de ligação a zinco CCCH, conservado nas homólogas, existe um segundo sítio de ligação a zinco próximo ao sítio endonucleolítico, que pode estar envolvido com os mecanismos de ligação e/ou degradação do substrato (CESARO, 2018).

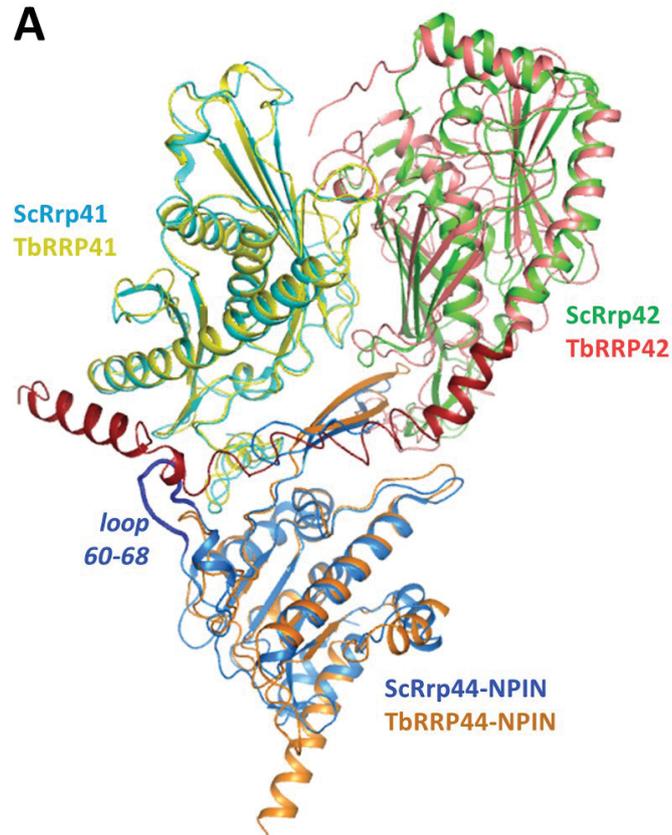


Figura 10 – Sobreposição dos modelos do domínio NPIN de RRP44 de *T. brucei* e das subunidades TbRRP41 e TbRRP42 do core do exossomo, com a estrutura cristalográfica do complexo de *S. cerevisiae* (PDB 4IFD). As proteínas são identificadas na figura por diferentes cores. Uma extensão C-terminal (vermelho escuro) de TbRRP42, ausente em ScRrp42, colidiria com TbRRP44 em situação correspondente à formação do complexo, de acordo com as predições estruturais. (Fonte: CESARO, 2018)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Adotamos a seguinte nomenclatura para as seis proteínas produzidas e utilizadas ao longo deste trabalho: TbRRP44 (ou TbRRP44<sup>WT</sup>) refere-se à proteína contendo a cadeia polipeptídica selvagem, sem a introdução de mutações; TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> contém mutações no sítio endonucleolítico (D140N) e exonucleolítico (D511N) visando a sua inativação; os mutantes simples TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44<sup>D511N</sup> contém mutações visando a inativação dos sítios endo- e exonucleolítico, respectivamente; já o mutante de deleção TbRRP44- $\Delta$ NPIN, que compreende os resíduos 232-972 de TbRRP44, inclui o módulo exonucleolítico RNase II, contendo os domínios CSD1, CSD2, RNB e S1, enquanto TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> refere-se à variante de deleção do domínio PIN contendo uma mutação no sítio exonucleolítico.

As sequências codificadoras das proteínas TbRRP44 (GenBank: AJ308998.1) e TbRRP44- $\Delta$ NPIN foram otimizadas para expressão em *Escherichia coli*, sintetizadas e clonadas em vetor de expressão pET28a, entre os sítios de restrição NcoI e XhoI, pela empresa GeneCust. Semelhantemente, a sequência codificadora de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> foi sintetizada e clonada em vetor de expressão pET28a, entre os sítios de restrição NcoI e XhoI, pela empresa Biomatik. Os mutantes simples foram produzidos a partir da construção TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>, que possui um sítio de restrição PstI entre os sítios NcoI e XhoI. Para a construção do mutante simples do sítio endonucleolítico (TbRRP44<sup>D140N</sup>), um fragmento de DNA correspondente à região entre os sítios NcoI e PstI da construção TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> foi fusionado a um outro fragmento contendo a região entre PstI e XhoI da construção TbRRP44. Já para o mutante simples TbRRP44<sup>D511N</sup>, foram fusionados os segmentos entre NcoI e PstI da construção TbRRP44 e PstI e XhoI da construção TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>.

A construção da variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> foi feita por PCR de fusão a partir da sequência de TbRRP44- $\Delta$ NPIN que foi usada como template. Inicialmente foram feitas duas reações de PCR independentes. A primeira com um primer forward com uma mutação para substituição do ácido aspártico 511 por uma asparagina (5' GGGCTGTCGTGATATTAATGACGCTCTGCATTGC 3') e, um primer reverso que anela ao terminador T7 do plasmídeo pET28a e, a segunda com um primer reverso

também com uma mutação para substituição do ácido aspártico 511 por uma asparagina (5' GCAATGCAGAGCGTCATTAATATCACGAC AGCCC 3') e, um primer forward que se anela ao promotor T7 do pET28a. Os dois produtos foram então purificados a partir de um gel de agarose com os kits NucleoSpin Gel e PCR Cleanup kit (Macherey-Nagel). Estes produtos de PCR contendo regiões parciais da sequência codificadora de TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> foram usados para reconstituir a respectiva sequência completa numa reação que PCR de fusão, a qual foi feita em duas etapas. Na primeira, foram feitos 9 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific), só com os dois produtos de PCR sem primers adicionais. Na segunda foram adicionados os primers externos, que anelam nas regiões do promotor e terminador T7, e foram feitos mais 30 ciclos de amplificação. O produto da reação de PCR de fusão dos dois fragmentos foi purificado do gel, usando os mesmos kits citados acima, e digerido com as enzimas de restrição NcoI e XhoI, assim como o vetor pET28a, então foi feita ligação com a T4 DNA ligase (Invitrogen). A construção foi confirmada através de sequenciamento de DNA. Todas as etapas de clonagem foram feitas pela pós-doutoranda Eloise Pavão Guerra Slompo.

Para produção das proteínas recombinantes, os vetores de expressão foram transformados em *E. coli* BL21 Star (DE3) e as culturas foram armazenadas em 80% de glicerol, a -80°C. Tais culturas foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido com 25 µg/mL de canamicina. A partir de uma colônia foi feito um pré-inóculo em 3 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina, este foi incubado a 37°C, sob agitação (200 RPM), por aproximadamente 16 horas.

Foi feito então o inóculo com 0,2% (v/v) do pré-inóculo crescido overnight em 1 litro de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi mantida sob agitação (200 RPM), a 37°C. O crescimento bacteriano foi controlado através da medida da densidade ótica (D.O.) a 600 nm. Quando a D.O. atingiu 0,6 foi feita indução da expressão do gene de interesse com 0,2 mM de IPTG. As culturas foram então mantidas a 18°C sob agitação (200 RPM), por aproximadamente 17 horas.

As culturas foram centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos, para remoção do meio de cultura e o pellet bacteriano foi ressuspendido em 30 mL de tampão A (50 mM Tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) adicionado de inibidores de protease (coquetel EDTA/Roche 1 comprimido/10mL). As células foram lisadas através de 6 a 8 passagens em microfluidificador (Microfluidics™). O lisado foi

centrifugado por 30 minutos a 30000 x g, o sobrenadante foi removido e reservado em gelo até a purificação.

### 3.2 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TbRRP44 E SUAS VARIANTES

As purificações das proteínas foram realizadas em 3 etapas, uma cromatografia de afinidade a níquel, seguida de uma cromatografia por troca iônica e uma cromatografia de exclusão por tamanho.

A TbRRP44 selvagem e as variantes TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>, TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44<sup>D511N</sup> foram purificadas seguindo o mesmo protocolo, enquanto o protocolo para purificação das variantes TbRRP44- $\Delta$ NPIN e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> apresentam modificações relação ao primeiro. Desta forma, nos referiremos a seguir à proteína TbRRP44 para descrição do protocolo seguido para a purificação do primeiro grupo e à TbRRP44- $\Delta$ NPIN para descrição do segundo protocolo.

As cromatografias de afinidade a níquel foram realizadas em coluna HisTrap HP de 5 mL (antiga GE Healthcare Life Sciences, atual Cytiva Life Sciences) para todas as proteínas, previamente equilibrada em tampão A (50 mM Tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) em cromatografo AKTA (antiga GE Healthcare Life Sciences, atual Cytiva Life Sciences). Após a injeção da amostra foi feita lavagem com 4 VC para remoção das proteínas que não se ligaram à coluna. Para a proteína TbRRP44 foi feita eluição linear de 0 a 100 % de tampão B (50 mM Tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 0,8 M imidazol) em 10 VC. Para a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi feita eluição segmentada de 0% a 5% de tampão B em 4 VC, 5% a 8% em 2 VC, de 8% a 15% e linear até 100% de tampão B.

As frações correspondentes aos picos de absorvância (280 nm) observados no cromatograma foram analisadas por SDS-PAGE. As amostras correspondentes ao pico de interesse foram reunidas e diluídas em tampão A de troca iônica (50 mM Tris HCl pH 8,0), na razão 1:3 (proteína : tampão).

Para a cromatografia de troca iônica foi usada coluna HiTrap HP Q de 5 mL (Cytiva Life Sciences). A eluição da TbRRP44 foi feita em gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (1 M NaCl; 50 mM Tris HCl pH 8,0) em 20 VC. Já para a proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN a eluição foi feita em gradiente linear de 0 a 45% de tampão B (1 M NaCl; 50 mM Tris HCl pH 8,0) em 10 VC.

As frações correspondentes ao pico de absorvância (280 nm) foram analisadas através de gel desnaturante de SDS. As frações contendo as amostras de interesse foram concentradas para 1 mL ou 500  $\mu$ L, ambas em concentrador de filtro 3K (Amicon® Ultra) para aplicação em coluna de exclusão por tamanho.

Na última etapa de purificação, cromatografia por exclusão por tamanho, para a TbRRP44 e para as construções com mutantes simples foi utilizada coluna Superdex 200 10/300 (Cytiva Life Sciences), enquanto para as variantes TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi usada coluna Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences). Foi realizada eluição isocrática em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl.

As amostras correspondentes ao pico de absorvância (280 nm) foram analisadas em gel de SDS e as frações contendo as amostras de interesse foram concentradas em concentrador com filtro 3K até 6 mg/mL no caso das variantes TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN e 5 mg/mL para a TbRRP44 para os ensaios de cristalização. Já para os ensaios de degradação as proteínas foram diluídas para 0,5 mg/mL e congeladas em gelo seco e posteriormente transferidas para freezer - 80°C.

### 3.3 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DA TbRRP44 E DAS VARIANTES TbRRP44- $\Delta$ NPIN E TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>

Após a purificação, TbRRP44 e a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN foram submetidas a ensaios de cristalização pelo método de difusão de vapor, utilizando os seguintes Kits comerciais: Crystal screen 1 e 2 (Hampton Research), Wizard 1 e 2 (Emerald Biosystems), Structure screen 1 e 2 (Molecular Dimensions), JBS1 a JBS4 (Jena Bioscience), JBS5 a JBS8 (Jena Bioscience), Salt RX (Hampton) e PEG/Ion 1 e 2 (Hampton). A TbRRP44 estava concentrada a 5 mg/mL e a TbRRP44- $\Delta$ NPIN a 6 mg/mL, ambas em tampão 30 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl. Os screenings de cristalização foram realizados na Plataforma de Cristalografia do Instituto Pasteur, Paris, França. Já para a construção TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> foram feitos ensaios de cristalização com três diferentes kits JCSG plus (Molecular Dimensions), PEG/Ion (Hampton Research) e Index (Hampton Research), sendo estes ensaios realizados no Laboratório de Cristalização do Instituto Calos Chagas/ Fiocruz Paraná.

Para a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN, que apresentou cristais, foram feitas otimizações das melhores condições variando as concentrações dos agentes precipitantes e pH. Nas condições que foram otimizadas e para os ensaios de cristalização da variante TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> foram feitos testes de co-cristalização, em que a proteína de interesse foi previamente incubada com oligoribonucleotídeos de RNA (tabela 1) por aproximadamente uma hora à temperatura ambiente. Como a construção TbRRP44- $\Delta$ NPIN não possui mutações no sítio ativo para sua inativação, a proteína foi incubada com 2,5 mM de EDTA por 30 minutos em gelo antes da adição do oligoribonucleotídeo. Este procedimento teve como objetivo a captura dos metais divalentes (Mg<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>) eventualmente presentes e necessários à atividade catalítica da enzima.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' – 3')
<b>C2A10C2</b>	CCAAAAAAAAAACC
<b>G2U10G2</b>	GGUUUUUUUUUUGG

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos usados nos ensaios de co-cristalização. Fonte: o Autor (2022).

Os cristais da variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN foram resfriados em nitrogênio líquido em solução crioprotetora (solução de reservatório acrescida de 20% de glicerol ou 33% de etilenoglicol) e enviados ao Sincrotron SOLEIL (França) para coleta de dados.

### 3.4 COLETA, PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DE TbRRP44- $\Delta$ NPIN

As coletas de dados de difração foram realizadas nas linhas de luz PROXIMA-1 e PROXIMA-2A do Sincrotron SOLEIL (França), com parâmetros de rotação de 0,1° e tempo de exposição de 0,1 s por imagem, sendo coletadas 3600 imagens em comprimento de onda 0,9786 Å. As linhas de luz PROXIMA-1 e PROXIMA-2A são equipadas com detectores EIGER 16M e EIGER X 9M (DECTRIS), respectivamente.

O processamento de dados, que inclui a indexação, integração e escalonamento dos dados de difração foi realizado utilizando-se o programa XDS (KABSCH, 2010). A análise dos dados revelou anisotropia no padrão de difração, e

uma correção adicional dos dados foi realizada utilizando o programa Staraniso (TICKLE et al, 2018).

A estrutura da variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi determinada através do método de substituição molecular. Um modelo por homologia gerado pelo servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015) baseado na estrutura da Rrp44 de levedura (código PDB: 5c0W) foi utilizado como modelo de busca para substituição molecular. Para a determinação da estrutura do complexo com RNA a estrutura apo foi utilizada como modelo inicial. A determinação da estrutura foi realizada utilizando-se o programa Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010). Para o refinamento da estrutura foi usado o programa BUSTER (SMART et al., 2012) e para a reconstrução do modelo foi usado o programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004), sendo alternado o refinamento pelo BUSTER e reconstrução interativa pelo COOT. A validação do modelo foi feita através do servidor Molprobitry (CHEN et al., 2010). As análises das estruturas foram realizadas utilizando-se os programas COOT e Pymol (DELANO, 2002). As análises de interação proteína-RNA foram realizadas utilizando o programa PLIP (ADASME et al., 2021).

### 3.5 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE RNA *IN VITRO*

A fim de reconstituir a atividade da proteína TbRRP44 e suas variantes, foram feitos ensaios de degradação *in vitro* utilizando-se diferentes substratos de RNA, sendo eles de fita simples ou estruturados. Foram usados 3 oligoribonucleotídeos de fita simples: PoliA (15-nt), PoliU (15-nt) e PoliAU (49-nt) e 2 substratos contendo uma estrutura do tipo *stem loop* incluindo um *tetra*loop do tipo GNRA. Tais substratos foram denominados GNRA0, referindo-se ao substrato contendo um *stem loop* sem uma extensão de fita simples na extremidade 3' e GNRA18, referindo-se ao substrato contendo uma extensão de fita simples de 18 nucleotídeos na extremidade 3' do *stem loop* (figura 11). Os oligoribonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Eurogentec, com marcação 6-FAM na extremidade 5'. Suas sequências são mostradas na tabela 3.



As amostras foram analisadas em gel desnaturante contendo 20% de poliacrilamida, 8 M ureia e tampão TBE (Tris borato, pH 8,0, EDTA). A corrida eletroforética foi realizada em um sistema PROTEAN II xi 20 cm Cell (Bio-Rad Laboratories Inc.). Antes das amostras serem carregadas no gel, foi feita uma pré-corrida à 150 V, por 30 minutos para estabilização das cargas e os poços foram lavados com uma seringa para remoção da ureia excedente. A corrida eletroforética foi realizada em aproximadamente 14,5 horas, aplicando-se uma tensão de 160V, sendo que nos primeiros 30 minutos, a corrida foi feita a 100V para que as amostras entrassem no gel. Para aquisição das imagens dos produtos das reações de degradação, o gel foi visualizado no scanner iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

### 3.6 ENSAIO DE DESVIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA

Para investigar interação da proteína TbRRP44 e do mutante de deleção TbRRP44- $\Delta$ NPIN, com RNA, foram realizados ensaios de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA, do inglês *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), em que ocorre uma alteração na mobilidade eletroforética do RNA quando o mesmo interage com a proteína. Para estes ensaios foram usadas as variantes TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup>, que possuem os resíduos do sítio catalítico mutados e consequentemente não degradariam o substrato.

Foram feitos testes iniciais utilizando duas concentrações das proteínas, 0,2 e 2  $\mu$ M. As reações foram feitas em tampão contendo 30 mM Tris pH 8,0, 75 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>. Previamente à adição do substrato à reação, ele foi incubado a 85°C por 4 minutos e resfriado à temperatura ambiente. Foram utilizados os substratos PoliAU, PoliU, GNRA0 e GNRA18, cujas sequências estão na tabela 3. Assim como nos ensaios de degradação, a proteína foi pipetada na parede no tubo e foi feita uma centrifugação rápida para que a proteína entrasse em contato com o oligonucleotídeo ao mesmo tempo nos diferentes tubos. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos.

Ao final da incubação, foram adicionados 20% de glicerol em cada tubo para que as amostras pudessem ser carregadas em gel nativo com poliacrilamida 6% e TBE (130 mM Tris base pH 8.0, 45 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA). A corrida eletroforética foi feita a 150V por aproximadamente 4 horas em tampão TBE. Antes

de carregar as amostras no gel, foi feita uma pré-corrída durante 30 minutos a 100 V. Os resultados dos testes de interação foram visualizados usando o scanner iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

Após os ensaios iniciais, foram feitos novos experimentos apenas com os substratos GNRA0 e GNRA18, seguindo o mesmo protocolo, porém com diferentes concentrações das proteínas.

### 3.6.1 Cálculo do Coeficiente de Dissociação (Kd)

O cálculo do coeficiente de dissociação (Kd) foi feito seguindo o protocolo definido por Seo e colaboradores (2019). Inicialmente foram obtidos os valores das intensidades das bandas (RID, do inglês *Raw Integrated Density*) correspondentes ao substrato livre para cada concentração de proteína testada, através do software ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004), para isso as bandas foram delimitadas com um retângulo de mesmo tamanho. Uma vez que os valores de intensidade foram obtidos, foi calculado o valor de intensidade relativa ( $RID_{rel}$ ) subtraindo cada valor de intensidade pelo menor valor de intensidade ( $RID_{menor\ valor\ entre\ as\ amostras}$ ), correspondente ao substrato livre, obtido.

Então cada valor de intensidade relativa foi dividido pelo maior valor de intensidade relativa ( $RID_{rel\ maior\ valor\ entre\ as\ amostras}$ ) e multiplicado por 100, resultando em valores de porcentagem de intensidade ( $RID_{\%}$ ). Por sua vez, estes valores foram subtraídos por 100 resultando na porcentagem de substrato ligado. Os cálculos estão resumidos nas equações abaixo.

$$RID - RID_{menor\ valor\ entre\ as\ amostras} = RID_{rel}$$

$$(RID_{rel} \div RID_{rel\ maior\ valor\ entre\ as\ amostras}) \times 100 = RID_{\%}$$

$$RID_{\%} - 100 = \% \text{ de substrato ligado}$$

O gráfico dos valores de porcentagem de substrato ligado em função da concentração de proteína foram obtidos utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 9.0.0) e foi feita análise por regressão não linear (*curve fit*), selecionando a opção “*one site-specific binding*” que calcula automaticamente o valor de Kd.

### 3.7 TERMOFORESE EM MICROESCALA

A termoforese em microescala (MST, do inglês *MicroScale Thermophoresis*) é uma técnica que permite a detecção de interação entre duas biomoléculas, como a interação de duas proteínas, de proteínas com seus substratos, como RNA ou DNA, bem como o cálculo do coeficiente de dissociação (Kd). Esta técnica explora a diferença na mobilidade de moléculas em solução quando expostas a um gradiente de temperatura (termoforese), essa mobilidade estando sujeita a propriedades como tamanho, carga ou conformação. Desta maneira, quando duas moléculas interagem, ocorre alteração neste padrão termoforético e sua medida permite a determinação da constante de dissociação entre as moléculas. Os ensaios de termoforese em microescala foram realizados utilizando-se o equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). A curva de termoforese é detectada através de fluoróforos que podem ser intrínsecos à molécula ou acoplados, neste caso foram usados oligonucleotídeos que possuem marcação 6-FAM na extremidade 5'. Nos experimentos, as moléculas que apresentam fluorescência (denominadas "alvos") são mantidas em concentração constante, enquanto são testadas diferentes concentrações do ligante (JERABEK-WILLEMSEN et al., 2014).

Para realização dos ensaios é necessário que tanto a molécula alvo como o ligante estejam em um mesmo tampão, neste caso o tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 75 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercapto, 100  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>). Os oligoribonucleotídeos, utilizados como moléculas alvo, foram diluídos para 200 nM, incubados a 85°C por 4 minutos e resfriados a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. A proteína foi preparada na concentração de 40  $\mu$ M. Proteína e oligoribonucleotídeo foram centrifugados por 15 minutos a 20000 x g, 4°C.

A partir da concentração máxima de 20  $\mu$ M de proteína nos ensaios foram realizadas 16 diluições seriadas, na proporção de 1:1 em um volume final de 16  $\mu$ L. Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise dos dados bem como o cálculo do coeficiente de dissociação foram realizados utilizando-se o software MO.Affinity Analysis v.2.2.7, (NanoTemper Technologies).

### 3.8 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

As variantes TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup>, utilizadas nos ensaios de interação com oligonucleotídeos foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz utilizando-se o equipamento Prometeus Panta (NanoTemper Technologies). As proteínas foram utilizadas nas concentrações de 3, 5 e 10  $\mu$ M em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 75 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -mercapto, 100  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> (utilizado nos ensaios de interação), e no mesmo tampão foram adicionados de 0,05% (v/v) Tween 20, 10 ou 20% (v/v) de glicerol. Os resultados foram analisados utilizando-se o software PR.Panta Analysis (NanoTemper Technologies).

### 3.9 ENSAIOS DE CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

#### 3.9.1 Geração de Células *Knockdown* para TbRRP44 com Sistema de Complementação para Expressão da Proteína Exógena

Para os ensaios de co-imunoprecipitação foram utilizadas células *knockdown* para RRP44, previamente geradas a partir do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) durante o mestrado (CESARO, 2018). Resumidamente, células de *T. brucei* 29-13 foram transfectadas com o vetor p2T7-177 (WIRTZ et al., 1999) que contém promotor que controla a transcrição de um RNA pequeno com sequência complementar a uma região do mRNA da TbRRP44. Ao adicionar tetraciclina ao meio, a tetraciclina irá se ligar ao promotor, induzindo a transcrição do RNA de interferência.

Para realização dos experimentos de co-imunoprecipitação as células *knockdown* para TbRRP44 foram transfectadas com um vetor contendo a sequência codificadora de TbRRP44 para expressão da proteína exógena fusionada a uma cauda HA (*influenza hemagglutinin*). Resumidamente, o gene que codifica TbRRP44 foi inserido no vetor pTbFIX (NIEMIROWICZ et al., 2018), gentilmente concedido por León A. Bouvier (Universidad Nacional de San Martín), com algumas modificações. As modificações introduzidas no vetor pTbFIX incluem substituição da marca de seleção de higromicina para puomicina e adição de sítio de restrição para inclusão da cauda HA. O sistema funciona de modo que, concomitantemente à indução do RNAi, a proteína TbRRP44 exógena é expressa, ambos induzidos pela adição de tetraciclina. A sequência codificante para expressão da proteína exógena corresponde

ao gene sintético de TbRRP44 otimizado para expressão em *E. coli*. Desta forma, a diferença na sequência de nucleotídeos é suficiente para que o gene sintético não seja alvo da maquinaria de RNA de interferência. Todas as etapas da construção do vetor de complementação, transfecção e seleção das células de *T. brucei* foram realizadas pela pós-doutoranda Eloise Pavão Guerra Slompo. Tais células foram gentilmente cedidas para utilização neste trabalho visando a investigação dos complexos envolvendo TbRRP44.

### 3.9.2 Preparação dos Extratos Celulares

As células foram cultivadas em meio SDM 79 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de higromicina e 15 µg/mL de G418. Também foram adicionados fleomicina (2,5 µm/mL), cujo gene de resistência está presente no vetor p2T7-177 e puromicina (10 µm/mL) cujo gene de resistência está presente no vetor de complementação pTbFIX. Para os ensaios de imunoprecipitação foram utilizadas as células contendo o vetor de complementação para expressão da proteína TbRRP44-HA. Culturas não induzidas foram utilizadas como controle e foi realizada a indução de TbRRP44-HA com tetraciclina por 48 horas, sendo adicionados 2 µm/mL de tetraciclina no primeiro dia e 1 µm/mL após 24 horas. As culturas foram feitas a partir da concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL, em 120 mL de cultura para cada as duas condições, sendo esses 120 mL distribuídos em 6 garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, sem filtro (20 mL em cada garrafa). As células foram mantidas em estufa a 28°C.

As células foram contadas em um contador de partículas (Beckman Coulter Z1 Particle and Cell Counter) para que as duas condições tivessem o mesmo número de células. Foi então centrifugado volume equivalente à  $1 \times 10^9$  células das duas condições, 800 x g, durante 8 minutos. O meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS, com os mesmos parâmetros de centrifugação. Após a remoção do PBS na última lavagem, as amostras foram congeladas imediatamente em gelo seco e ficaram armazenadas em freezer, a -80°C.

Para a lise, as células foram descongeladas em gelo, ressuspendidas em 500 µL de tampão de lise (20 mM Tris HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,05% CHAPS; inibidor de protease - Roche®) e lisadas em sonicador (QSonica, Q700), sendo as amostras sonicadas 10 vezes, com intervalo de 40 segundos no gelo, com amplitude 5. As amostras foram centrifugadas a 16000 x g, a 4°C, por 10 minutos,

esta etapa foi repetida 3 vezes, sempre transferindo o sobrenadante para um tubo eppendorf novo. O extrato ficou em gelo até ser injetado na coluna.

### 3.9.3 Purificação do Extrato de *T. brucei* pré-imunoprecipitação

Após ensaios iniciais para padronização dos experimentos de imunoprecipitação, observou-se, na amostra eluída, excesso de proteínas que provavelmente ligaram-se inespecificamente à resina ou à proteína de interesse, por isso foi adicionada uma etapa inicial de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho a fim de remover contaminantes e, também separar as frações em que TbRRP44 fosse eluída na forma monomérica, dissociada de qualquer complexo.

O extrato celular (500 µL) foi aplicado na coluna Superdex Increase 10/300 previamente equilibrada com tampão 20 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e CHAPS (0,05%) em cromatografo AKTA (GE Healthcare Life Sciences). Foi realizada eluição isocrática com o mesmo tampão em que a coluna havia sido equilibrada, sendo coletas frações de 500 µL.

### 3.9.4 Western Blot

A fim de identificar em quais frações da purificação a TbRRP44 estava presente foi feito um Western blot, para isso uma pequena amostra de cada fração foi misturada ao tampão de amostra (tampão Laemmli concentrado 4 vezes). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, sendo aplicado 10 µL de amostra. A tensão usada para migração das amostras foi de 170 V.

O conteúdo do gel foi transferido para membranas de PVDF (Difluoreto de polivinilideno), as quais foram previamente hidratadas com metanol (100%) por 15 segundos, depois foram lavadas em água por 1 a 2 minutos e foram deixadas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20%(v/v) metanol) até a montagem do sanduiche. A transferência foi feita a 100 V por uma hora ou 20 V *overnight* em cuba de transferência Bio-Rad onde as membranas ficaram submersas em tampão de transferência, a 4°C. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite em pó desnatado diluído em PBS-Tween (0,05% Tween).

Para detecção da proteína TbRRP44 endógena foi utilizado um anti-soro, obtido em trabalho anterior a partir da inoculação da proteína purificada em camundongos (CESARO et al., 2018). Os experimentos para a produção dos anti-soro foram realizados pelo biotério do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ-PR. O soro foi diluído 250 vezes em 4 mL de PBS-Tween (0,05% Tween). Já para a detecção da TbRRP44-HA foi utilizado anticorpo comercial anti-HA produzido em coelho (Invitrogen) diluído 500 vezes nos mesmos 4 mL de PBS-Tween (0,05% Tween) em que o primeiro anticorpo foi diluído. As membranas foram incubadas com os anticorpos durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação leve. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,05% Tween), sendo cada lavagem de 5 minutos.

As membranas foram então incubadas por uma hora à temperatura ambiente sob agitação leve, com anticorpo anti-camundongo conjugado com cromóforo com excitação a 680 nm (Invitrogen), na diluição de 1:10000 e com anticorpo anti-coelho conjugado com cromóforo com excitação a 800 nm (Invitrogen), diluído 15000 vezes. Após a incubação as membranas foram lavadas 3 vezes, durante 5 minutos, em PBS-Tween (0,05% Tween).

A aquisição das imagens das membranas foi feita em um scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) em dois comprimentos de onda, a 700 nm para identificar a proteína TbRRP44 endógena e a 800 nm para detecção da TbRRP44-HA.

### 3.9.5 Co-Imunoprecipitação

As frações em que a TbRRP44 estava presente não correspondendo a sua forma monomérica foram reunidas e concentradas até um volume de 500  $\mu$ L e incubadas com 50  $\mu$ L de resina conjugada a anticorpos anti-HA (Roche) em agitação leve, a 4°C, *over night*.

A resina foi centrifugada por 1 minuto, a 20000 x g, a 4°C, o sobrenadante foi reservado e a resina foi lavada 3 vezes com 750  $\mu$ L de tampão de lavagem (20 mM Tris HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,05% CHAPS), sendo o sobrenadante de cada lavagem armazenado em gelo para verificar a eficiência das lavagens. A resina foi então incubada por duas horas, a 4°C, sob agitação leve, com 50  $\mu$ L (300 ng/ $\mu$ L) do peptídeo HA (Roche, cod. 11815016001), para eluição da TbRRP44-HA com as proteínas associadas a ela.

As amostras foram centrifugadas, com os mesmos parâmetros anteriores e o sobrenadante foi reservado. As lavagens e as amostras eluídas foram analisadas por SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata e então as amostras foram congeladas até a análise por espectrometria de massas.

### 3.10 ANÁLISE POR NORTHERN BLOT DE INTERMEDIÁRIOS DO PROCESSAMENTO DO RNA RIBOSSOMAL

Como mencionado anteriormente, as células knockdown para RRP44 foram previamente geradas a partir do mecanismo de RNAi (CESARO, 2018). Para a análise do processamento do rRNA as células foram cultivadas em meio SDM 79 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de higromicina, 15 µg/mL de G418 e fleomicina (2,5 µm/mL). Para a indução da transcrição do RNAi foram adicionados 2 µg/mL de tetraciclina no primeiro dia e 1 µg/mL nos dias subsequentes. Nos primeiros experimentos foram usadas células com 0 a 96 horas de indução, coletadas a cada 24 horas. Após as primeiras 48 horas, as células foram diluídas para  $1 \times 10^6$  células/mL para que o meio não saturasse. Nos demais experimentos foram utilizadas células com 72 horas de indução. A fim de garantir a quantidade de amostra necessária para as análises, os volumes de cultura seguiram o protocolo a seguir. Para os tempos de 24 e 48 horas, foi utilizado um volume total de cultura de 80 mL dividido em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, com 20 mL em cada, para as duas culturas, induzidas e não induzidas, com concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL. Já para os tempos 72 e 96 horas foram cultivadas em 80 mL de cultura controle (não induzida) e 120 mL de cultura induzida, também com concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Para a extração do RNA, as células foram centrifugadas a 3000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspendido em Trizol®, na proporção 200 µL:  $10^7$  células e os tubos foram colocados rapidamente em gelo seco para que o RNA fosse extraído em outro dia.

As células congeladas em Trizol foram descongeladas em gelo e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Então foram adicionados 200 µL 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 µL de isopropanol, seguido de incubação *over night*, a -80°C.

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 ressuscendido em 20 µL de água autoclavada com DEPC (pirocarbonato de dietila).

Para identificação dos intermediários foram desenhados oligonucleotídeos que anelam em regiões das ITSs e ETSs do precursor do rRNA (figura 12). Tais oligonucleotídeos foram sintetizados incluindo fluoróforos IRDye-700 ou IRDye-800 na região 5' pela empresa Integrated DNA Technologies (indicar onde fica a sede). Nos primeiros experimentos foram testadas as sondas para identificação do 5.8S, junção 5.8S-ITS2 e ITS3 (tabela 3). Em função dos primeiros resultados e para completar os experimentos foram adquiridas novas sondas, mostradas também na tabela 3, para uma melhor compreensão das etapas de processamento.

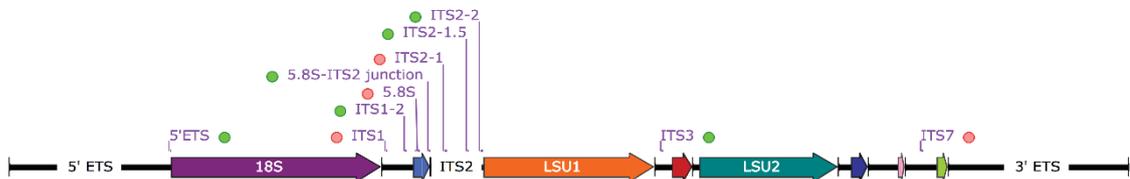


Figura 12 - Esquema das sondas adquiridas para análise de precursores do rRNA de *Trypanosoma brucei*. A identificação verde ao lado dos nomes das sondas indica que possuem cromóforos IRDye 700 e as vermelhas IRDye 800. Fonte: cedida por Eloise Pavão Guerra Slompo.

Sondas	IRDye	Sequência (5' – 3')
<b>Pre-18S</b>	700	TCAAGTGTAAGCGCGTGATCCGCTGTGG
<b>ITS1</b>	800	GGTTGCATACTGTGCAATTATACATGCAC
<b>ITS1-2</b>	700	GATAGATACGCATTACATACGTATTCTC
<b>5.8S</b>	800	CGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACG
<b>5.8S-ITS2</b>	700	GTGTTTTGTTTTATATTTCGACACTGAGAA
<b>ITS2-1</b>	800	CACTCACTACACACACGTATATGCGTGAC
<b>ITS2-1.5</b>	700	CTCTATACGGGGCGCCAAAATACATGCG
<b>ITS2-2</b>	700	GTGAAGCGTACACGAAAGAAGCACAAGCAC
<b>ITS3</b>	700	ACGACAATCACTCACACACACATGGCTAT
<b>ITS7</b>	800	TATGTAGTACCACACAGTGTGACGCGCAAC

Tabela 3 - Sequências das sondas utilizadas nos experimentos de Northern blot. Fonte: o Autor (2022).

O material (plásticos, vidrarias) a ser usado nos experimentos foi tratado com 3% de peróxido de hidrogênio ou DEPC (Diethyl pyrocarbonate) para inativação de RNAses. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,2%, para isso foram dissolvidos 2,04 g de agarose em 123,5 mL de água DEPC (água acrescida de 0,1% de DEPC), esperou-se a agarose esfriar até por volta de 37°C e foram adicionados 17 mL de MOPS 10X (200 mM MOPS; 50 mM acetato de sódio; 10 mM EDTA Na<sub>2</sub> pH 8) e 29,5 mL de formaldeído. Tais quantidades correspondem a um gel de 20x15x0,8 cm.

Enquanto o gel polimerizava foram preparadas as amostras, 8 µg de RNA foram diluídos em tampão de amostra. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C e então foi colocado 1 µL de brometo de etídeo (0,1%). Para migração das amostras foi utilizada voltagem de 35 V durante a noite (~16,5 horas) em tampão de corrida MOPS 1X.

O gel foi lavado em água DEPC por 20 minutos para remoção do formaldeído, então foi incubado em NaOH (0,05 M) por 30 minutos e depois foi incubado em SSC 20X (3 M NaCl; 0,3 M Citrato de Sódio pH 7,0) por 5 minutos. A membrana de nylon Hybond N+ (Amershan Biosciences) foi cortada 1 cm maior que o gel e foi lavada em água DEPC por 30 minutos e depois foi incubada por 20 minutos em SSC 20X.

Foi montado aparato para transferência do RNA para a membrana. Em uma vasilha grande foi colocado o tampão SSC 20X até metade da altura da vasilha, dentro foi colocado um suporte, sob este suporte foi colocado papel Whatman 3MM fazendo contato com tampão de maneira a trazer o líquido por capilaridade para a parte superior do aparato. Acima deste papel foram colocados o gel e a membrana, nesta ordem. Entre a membrana e a torre de papel toalha foram colocadas duas folhas de papel Whatman 3MM. Em cima foi colocado um peso, a fim de segurar o papel toalha e de maneira distribuir a pressão do peso de maneira homogênea. A transferência foi feita por 24 horas.

A eficiência da transferência foi verificada expondo a membrana e gel à luz ultravioleta (UV), observando-se as 3 bandas de rRNA 18S, LSU $\alpha$  e LSU $\beta$  na membrana. A membrana foi seca em papel filtro e o RNA foi fixado na membrana através de exposição à luz UV utilizando o equipamento Spectrolinker UV Crosslinker, colocando a membrana com a face contendo o RNA voltada para cima, sendo exposto por 1 minuto e descanso de 3 minutos, utilizando a configuração do equipamento chamada "optimal crosslink" e por mais 1 minuto novamente.

Foi feita pré-hibridização das membranas com tampão Church modificado (1% de BSA; 1 mM EDTA pH 8,0; 5% SDS; 0,5 M tampão fosfato pH 7,2) por 2 horas a 37°C, em agitação. O volume de tampão utilizado foi calculado respeitando a relação 0,3 mL/cm<sup>2</sup>.

A hibridização das sondas também foi feita em tampão Church modificado, respeitando a proporção de 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de membrana. As sondas usadas para identificação do 5.8S, ITS3 e ITS7 foram adicionadas na concentração de 200 ng/mL, enquanto a sonda para identificação da junção entre a ITS2 e 5.8S na concentração de 400 ng/mL. A hibridização foi feita *over night*, a 37°C, sob agitação e coberta para que não houvesse degradação das sondas.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas inicialmente em 30 mL de solução lavagem (SSC 2X; 0,05% de SDS) por 10 minutos, a 37°, sob agitação. Esta etapa foi repetida 3 vezes. Foi realizada a leitura das membranas em um scanner de infravermelho Odyssey (LI-COR Biosciences). As leituras foram feitas em dois comprimentos de onda, 700 nm para a sonda para identificação da ITS3 e da junção ITS2 e 5.8S, e 800 nm para as sondas 5.8S e ITS7. Caso ainda houvesse marcações inespecíficas, foram sendo feitas novas lavagens, aumentando a temperatura para 42°C e o tempo para 30 minutos e abaixando-se a concentração do SSC para 1X ou 0,5X. Após cada lavagem a membrana era lida novamente.

### 3.11 ANÁLISE CELULAR POR TOMOGRAFIA DE RAIOS X MOLES

A tomografia de raios X moles é uma técnica que permite a obtenção de imagens tridimensionais com resolução entre 25 e 50 nm de células e tecidos, sendo possível a análise detalhada de subestruturas celulares, como as organelas, além da visualização de células eucarióticas inteiras. A técnica consiste na obtenção de várias projeções bidimensionais da amostra, sendo esta rotacionada 0,5° a 1° para a obtenção de cada imagem. As imagens em 2D são adquiridas através da exposição da amostra a um feixe de radiação em um intervalo de energia conhecido como janela d'água, entre a borda de absorção do carbono (284 eV) e oxigênio (543 eV). Neste intervalo, o coeficiente de absorção linear de amostras orgânicas é cerca de uma ordem de grandeza maior que o da água. Desta forma, a composição química de estruturas celulares apresenta contraste suficiente para a sua identificação. Adquire-se assim imagens que correspondem à projeção do feixe transmitido através da

amostra que conterà informação sobre a distribuição de sua composição. Ao final, as imagens 2D em diferentes ângulos de orientação são combinadas para a reconstrução da imagem tridimensional da amostra estudada. Esta técnica apresenta vantagens em relação às outras de microscopia, como a rapidez na aquisição das imagens e análise da amostra em estado quase nativo (sem fixação ou cortes). O único processamento da amostra no caso da tomografia de raios X moles é o congelamento da amostra para que ela resista aos danos causados pela radiação incidente (revisão em HARKIOLAKI et al., 2018).

### 3.11.1 Cultura Celular

Os parasitas foram cultivados em meio SDM 79 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fleomicina. Para a indução da transcrição do RNAi foram adicionados 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina no primeiro dia e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nos demais dias. A curva de crescimento foi realizada para duas culturas de células, partindo de uma cultura inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL, uma dessas culturas sendo induzida com tetraciclina. As células foram cultivadas em tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL, contendo 10 mL de cultura, sendo estas mantida em estufa a  $28^\circ\text{C}$ . Foram coletadas amostras a cada com 48 e 72 horas de indução, sendo que após 48 horas as culturas foram diluídas em novo meio para  $1 \times 10^6$  células/mL para evitar saturação.

### 3.11.2 Fixação das Células

Primeiramente as células foram centrifugadas a  $3000 \times g$ , por 5 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , sendo pego volume de cultura para que houvesse  $5 \times 10^7$  células. O meio foi removido e o pellet foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado e foi feita nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores. O sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas em 250  $\mu\text{L}$  de PBS e foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de Paraformaldeído (8%) preparado em PBS. As células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente.

As células foram centrifugadas  $3000 \times g$ , por 5 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado. Essa etapa de centrifugação e lavagem foi repetida duas vezes. Ao final as células foram

ressuspendidas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e mantidas a 4°C até a amostra ser adicionada nos grids.

### 3.11.3 Preparo dos Grids

Como suporte das amostras para os experimentos de tomografia de raios X moles, foram utilizados grids que possuem um lado coberto com uma camada de carbono, lado em que a amostra será colocada (figura 13). Primeiramente os grids foram expostos a luz ultravioleta por 30 minutos, então sobre a superfície do carbono foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de poli lisina e os grids permaneceram em estufa, a 37°C por 30 minutos. Após a incubação os grids foram lavados duas vezes em água milli-Q e então foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de ouro, que serão usados como marcadores para o alinhamento das imagens, e deixou-se secar.

As nanopartículas haviam sido preparadas previamente, o tubo contendo as nanopartículas foi agitado manualmente e uma alíquota foi pega do tubo estoque ( $5,6 \times 10^9$  nanopartículas/mL). As nano partículas foram sonicadas por 10 segundos e deixadas por 10 segundos em descanso, essa etapa foi repetida 3 vezes a fim de separar as nanopartículas, as quais tendem a ficar aderidas formando *clusters*. Após a sonicação as nanopartículas de ouro foram depositadas imediatamente nos grids.

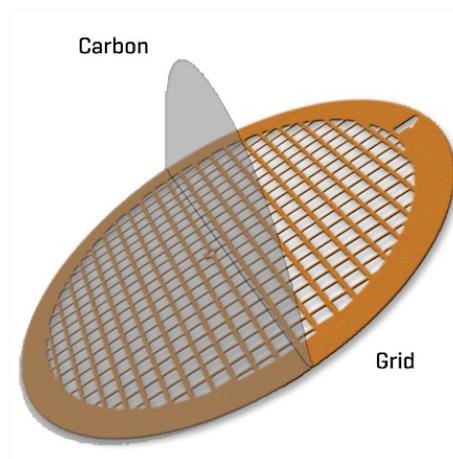


Figura 13 - Imagem ilustrativa do *grid* utilizado nos experimentos. Fonte: <https://emresolutions.com/product/carbon-film-on-nickel-200-mesh-25/>

Após a preparação dos grids, foram depositados 5  $\mu\text{L}$  da cultura de parasitas e esperou-se 1 minuto. Utilizou-se então um equipamento de Cryo Plunge (Leica EM

GP) (figura 14, A), para a remoção do excesso de líquido através do contato do grid com um papel de *blotting* (figura 14, B). Após a etapa de *blotting* o *grid* é rapidamente submerso em etano líquido presente em um reservatório na base do equipamento resfriando a amostra (figura 14, C). Os *grids* foram mantidos em nitrogênio líquido até coleta de dados.

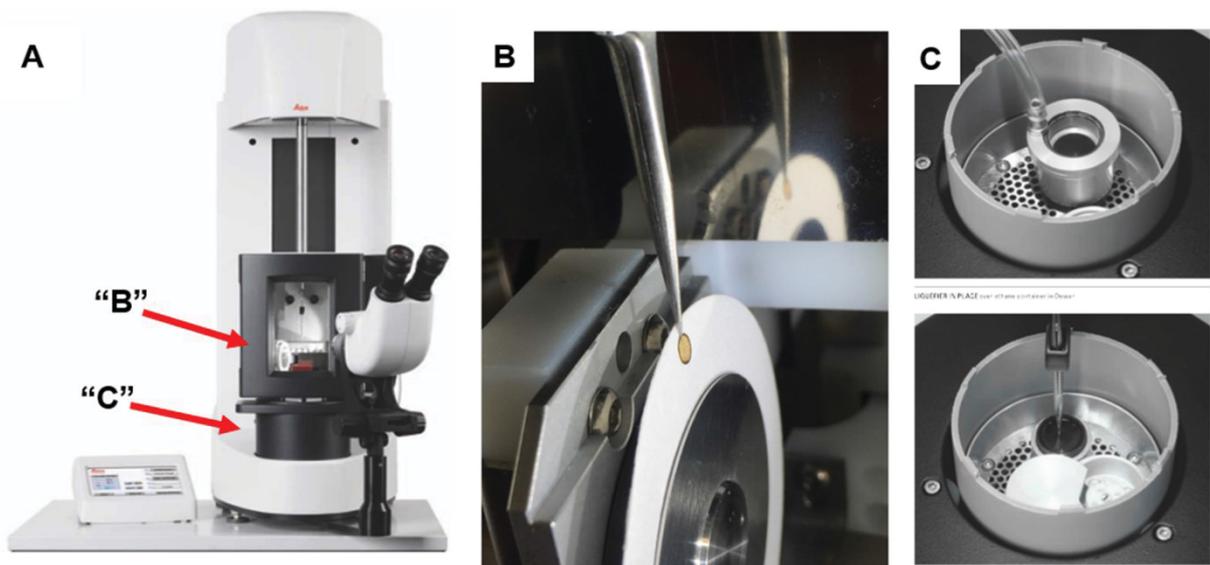


Figura 14 - Detalhes do equipamento Cryo Plunger. A. Imagem do equipamento; B: Detalhe da região do equipamento em que é feito o *blotting*; C: Detalhe da região em formato de tambor em que é colocado o etano líquido e onde ocorre o resfriamento. Fonte: A e C: <https://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20EM%20GP/Brochures/Leica%20EM%20GP%20Brochure%20EN.pdf>; B: imagem cedida por Frédéric Jamme.

#### 3.11.4 Coleta de Dados de Tomografia de Raios X Moles

A coleta de dados de tomografia de raios X moles foi realizada na linha MISTRAL no Sincrotron ALBA, Espanha. Os *grids* foram colocados dentro de uma câmara contendo nitrogênio líquido, essa câmara foi acoplada ao microscópio de transmissão e os *grids* foram transferidos ao porta-amostras para coleta das imagens.

Primeiramente era coletada imagem do *grid* inteiro, chamado de mosaico, para seleção das regiões em que seriam coletadas as imagens da célula. Após uma primeira seleção, foram escolhidas células que estavam na posição vertical e que não havia sobreposição de outras células.

A série de imagens em 2D foram coletadas, em sua maioria, do ângulo  $-70^\circ$  até  $+70^\circ$ , com energia de 520 eV. As imagens das células controle e *knockdown* após 48

horas de indução foram coletadas com tamanho de pixel 15 nm, com exceção das duas primeiras que foram coletadas com pixel de tamanho 13 nm. O tempo de exposição foi de 1 segundo para aquisição dos tomogramas e abertura de 10 nm das fendas que definem o feixe incidente. As tomografias das células *knockdown* após 72 horas de indução foram coletadas com tamanho de pixel de 14 nm. O tempo de exposição também foi de 1 segundo para aquisição dos tomogramas e abertura de 10 nm das fendas para as 4 primeiras tomografias e de 15 nm para as demais. Ao total foram coletadas 15 tomografias das células controle, 20 e 16 das células *knockdown* após 48 e 72 horas de indução, respectivamente.

A fim de identificar os acidocalcissomos, vesículas ricas em cálcio, foram coletadas novas tomografias na energia da borda de absorção do cálcio (351 eV) e energia inferior a da borda de absorção (348 eV). Nas regiões da célula em que há presença de cálcio, haverá absorção máxima da radiação incidente, quando na energia da borda, enquanto as tomografias coletadas em energia abaixo da borda do cálcio, irão absorver menos e aparecerão com intensidade aumentada nestas regiões. Assim, através da subtração dos sinais nas duas condições pode-se identificar precisamente a localização destas vesículas ricas em cálcio. As tomografias foram coletadas do ângulo  $-65^\circ$  a  $+65^\circ$ . Todas as tomografias foram coletadas com pixel de 14 nm e 2 s de tempo de exposição. As coletas foram realizadas com 10 nm de abertura das fendas, com exceção das amostras *knockdown* com 72 horas de indução que foram coletadas com abertura das fendas de 15 nm. Ao total foram coletadas 20 tomografias das células controle, 25 e 3 tomografias das células *knockdown* após 48 e 72 horas de indução, respectivamente.

### 3.11.5 Processamento das Imagens

Após a obtenção das imagens, foi feito alinhamento dessas utilizando-se o programa *etomo* (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996), o qual localiza a posição das nanopartículas de ouro e alinha as imagens através dessas. Depois do alinhamento foi feita a reconstrução dos tomogramas com o software Tomo3D (AGULLEIRO; FERNANDEZ, 2015), obtendo-se então a tomografia da célula.

Os programas Microscopy Image Browser (MIB) (BELEVICH et al., 2016) ou Amira® (Visage Imaging, versão 5.0) foram utilizados para a segmentação manual das imagens, ou seja, a célula foi dividida em regiões específicas, seguindo as

delimitações de cada organela. A visualização do modelo criado a partir da segmentação a partir do programa MIB foi feita através do programa IMOD (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996).

As tomografias para identificação de cálcio passaram por mais uma etapa de processamento, onde foi feita subtração das imagens coletadas nos diferentes comprimentos de onda, resultando no realce das regiões ricas em cálcio. As imagens coletadas na energia de 351 eV foram coloridas em tons de vermelho proporcionalmente ao coeficiente de absorção, enquanto as coletadas em 348 eV foram coloridas em tons de ciano. Ao realizar a subtração das imagens, as regiões que apresentam coeficiente de absorção semelhante vão ficar como a imagem original, pois a soma entre as cores vermelho e ciano (verde + azul) resulta em branco, removendo assim as colorações vermelho e ciano, porém as regiões ricas em cálcio são ressaltadas em vermelho, uma vez que a absorção nestas regiões é bastante superior para a energia incidente de 351 eV. Essas análises foram realizadas através do software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012).

### 3.11.6 Cálculo do Coeficiente de Absorção Linear

O coeficiente de absorção linear (LAC ou  $\mu$ ) é uma constante de atenuação, característica do material, que descreve a fração de atenuação dos fótons incidentes por unidade de espessura, para um determinado comprimento de onda.

Para calcular o coeficiente de absorção linear de diferentes regiões da amostra, os dados das imagens já alinhadas pelo programa *etomo*, foram linearizados aplicando o logaritmo neperiano, através do software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012), tornando possível o cálculo do LAC:  $-\ln(I/I_0) = \mu$ , onde  $I$  é a intensidade transmitida e  $I_0$  é a intensidade incidente. Então foi realizada nova reconstrução através do plugin TomoJ (MESSAOUDII et al., 2007) instalado no software Fiji. Após a reconstrução 3D, é possível calcular o valor do voxel, que representa um valor proporcional ao coeficiente de absorção em uma posição no espaço tridimensional.

O cálculo do voxel, ou do LAC indiretamente, foi realizado utilizando-se o programa Fiji, selecionando-se manualmente posições específicas das organelas. Os valores de LAC assim obtidos foram divididos pelo tamanho do pixel, resultando assim no valor do voxel naquelas posições. Nas organelas maiores como núcleo, nucléolo e

mitocôndria foram selecionadas diferentes posições e feita uma média dos valores obtidos.

### 3.11.7 Cálculo do Volume das Organelas

Os volumes das organelas, gotas lipídicas e acidocalcissomos, foram calculados utilizando-se o programa MIB (BELEVICH et al., 2016). Cada gota lipídica e acidocalcissomo foram segmentados e o software fornece os valores de volume em pixel<sup>3</sup>, então esses foram convertidos para  $\mu\text{m}^3$  multiplicando-se o valor do volume pelo tamanho do pixel ao cubo (valor em pixel<sup>3</sup> x (tamanho do pixel)<sup>3</sup>).

## 3.12 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para os ensaios de citometria as células foram cultivadas seguindo o mesmo protocolo descrito da sessão 2.9.1, sendo utilizadas células com 72 horas de indução do RNAi e células sem indução por tetraciclina como controle. Com o objetivo de comparação dos fenótipos celulares, também foram analisadas culturas de *T. brucei* após tratamento com 3 compostos, BMH-21 (0,3  $\mu\text{M}$ ), sinefungina (0,85  $\mu\text{M}$ ) e PAC-1 (35  $\mu\text{M}$ ). As células foram diluídas para concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e foram incubadas com os compostos nas concentrações indicadas durante 24 horas. No caso do PAC-1 foram testados dois tempos de incubação, 8 e 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para as análises do ciclo celular, as células foram lavadas em PBS e foram ressuspensas em 1 mL de etanol 70% e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  por pelo menos 24 horas. Essas foram lavadas em PBS e ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de PBS e 200  $\mu\text{L}$  de solução corante de iodeto de propídeo (3,4 mM Tris HCl pH 7,4, 0,1% NP-40, 10 mg/mL RNase A, 10 mM NaCl, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  iodeto de propídeo).

A células foram analisadas através da marcação por LysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes/ThermoFisher), que identifica vesículas ácidas e MitoTracker Orange CMTMROS (Molecular Probes/ThermoFisher), que permite a observação da atividade mitocondrial. A marcação por LysoTracker e Mitotracker foram feitas seguindo o protocolo a seguir: uma cultura contendo  $1 \times 10^6$  células foi centrifugada a  $3000 \times g$ , por 5 minutos e as células foram ressuspensas em meio SDM-79

previamente aquecido a 28°C acrescido de 60 nM de LysoTracker ou 10 nM de Mitotracker. As células foram incubadas durante 30 minutos em estufa a 28°C, centrifugadas a 3000 x g, por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de PBS.

A leitura das amostras marcadas com LysoTracker foi feita no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences) e do MitoTracker no CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences) em decorrência dos diferentes filtros presentes no equipamento, sendo que foram obtidos dados a partir de 20000 eventos de cada amostra. Os experimentos foram realizados na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas (ICC-Fiocruz Paraná). As análises estatísticas foram feitas a partir do valor da mediana de cada amostra no programa GraphPad Prims 9 e os dados também foram analisados no software FlowJo (versão 10.8.1). As análises dos dados foram realizadas conjuntamente com a Dra. Priscila M. Hiraiwa, colaboradora do projeto.

As análises por microscopia de fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento Leica Microsystems DMI6000B da Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas (ICC/ Fiocruz Paraná). As células marcadas com LysoTracker foram observadas diretamente no microscópio sem fixação, enquanto as células marcadas com MitoTracker foram centrifugadas a 3000 x g, por 5 minutos e lavadas com 500 µL de PBS. As células foram centrifugadas novamente pelo mesmo tempo e velocidade e o pellet foi ressuspensado em 10 µL de PBS e 10 µL de paraformaldeído 8%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISES ESTRUTURAIS E ATIVIDADE *IN VITRO* DE TbRRP44

#### 4.1.1 Purificação da Proteína TbRRP44 e Suas Variantes

##### 4.1.1.1 Purificação da Proteína TbRRP44

A proteína TbRRP44 (110 kDa) foi purificada a partir de 1 L de cultura bacteriana através de 3 etapas. Na primeira etapa de purificação, por cromatografia de afinidade a níquel, observou-se eluição da proteína de interesse numa região bastante larga do gradiente de imidazol com dois máximos, sendo o primeiro em ~10% e o segundo em ~39% de tampão B (figura 15, A). Este padrão de eluição indica que a coluna pode ter sido sobrecarregada e também que a proteína pode apresentar mais de uma conformação. As frações 1A8 a 1B6, correspondentes à região central de eluição, foram reunidas e diluídas três vezes em tampão de A de troca iônica. Na segunda etapa de purificação, cromatografia de troca iônica, observou-se um pico principal que foi eluído com ~31% de tampão B, o qual é seguido por dois picos secundários (figura 15, B). As frações do pico principal (2C2 a 2C4) foram reunidas e concentradas para 0,5 mL para realização da última etapa de purificação. A cromatografia de exclusão por tamanho em Superdex 200 (10/300) revelou um pico principal que eluiu em 12,3 mL, sendo compatível com a forma monomérica da proteína (figura 15, C). Este pico principal foi precedido por um pequeno pico, que eluiu em 10,7 mL, o qual corresponde a alguma forma oligomérica ou agregada da TbRRP44. As frações 1C1 e 1C2 foram concentradas a 5 mg/mL para os ensaios de cristalização.

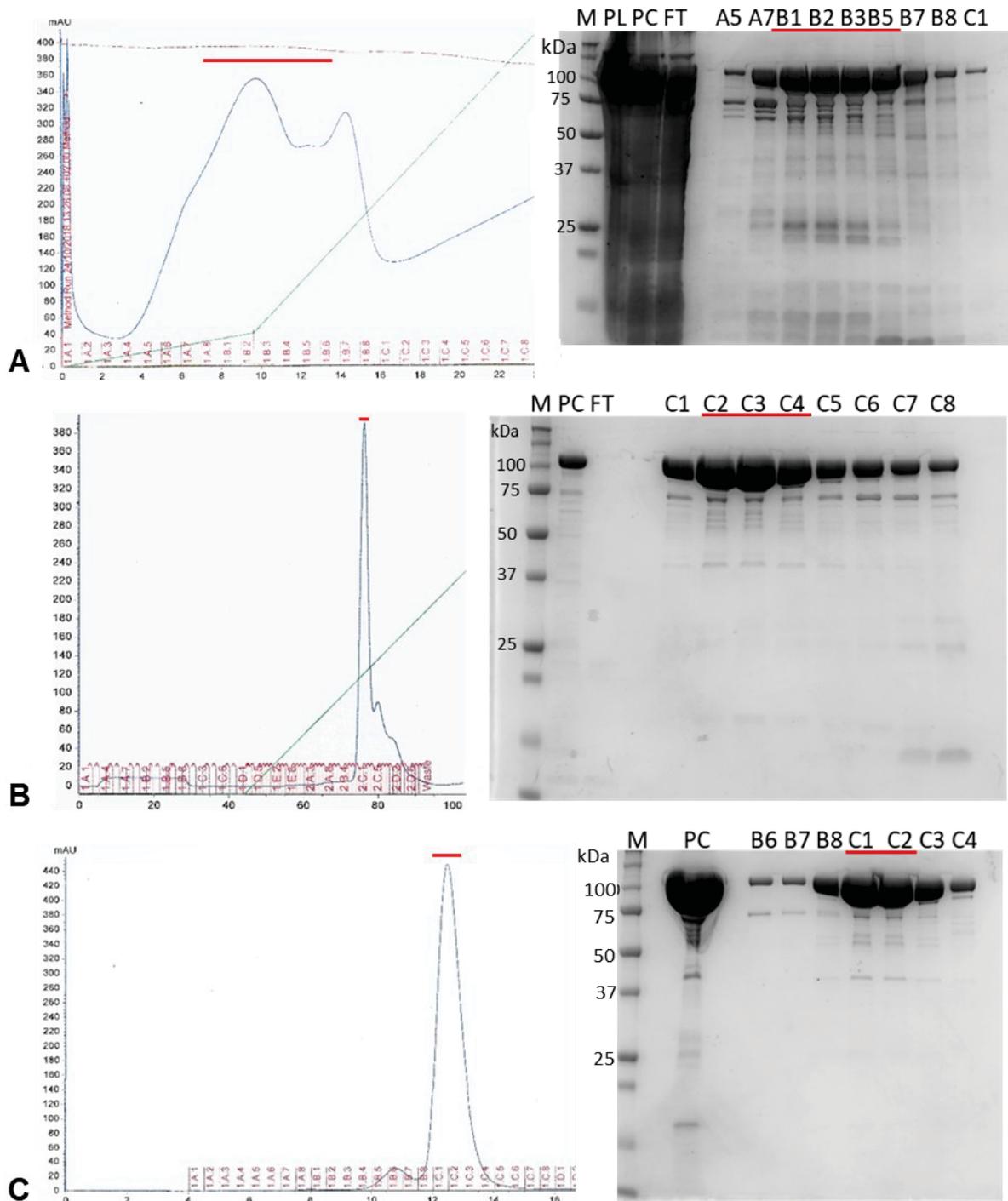


Figura 15 – Purificação de TbRRP44 (110 kDa). A) Resultado da cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP 1 mL. B) Resultado da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q HP 5 mL. C) Resultado da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 10/300. No lado esquerdo são mostrados os cromatogramas, com o eixo “y” representando a absorvância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e as regiões destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. A linha verde, quando presente, mostra o gradiente de tampão B. No lado direito são mostradas as análises por SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma e

as frações destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. M refere-se ao marcador de peso molecular, PL ao pellet, PC corresponde à amostra aplicada na coluna e FT ao *flowthrough* (amostra que não se ligou à coluna).

#### 4.1.1.2 Purificação da Variante TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>

Semelhantemente à proteína selvagem, a construção TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> (110 kDa) foi purificada a partir de 1 L de cultura bacteriana em 3 etapas. Na primeira etapa de purificação, cromatografia de afinidade a níquel, nota-se o aparecimento de um único pico no cromatograma (figura 16, A), sendo eluído em ~23% de tampão B. Após análise por SDS-PAGE as amostras 26 a 31 referentes ao pico foram reunidas e diluídas 1:3 vezes em tampão A de troca iônica. A cromatografia de troca iônica, resultou no aparecimento de dois picos, ambos correspondendo à proteína de interesse (figura 16, B), sendo o pico maior eluído em ~32% de tampão B e o menor em ~37%. O aparecimento de múltiplos picos correspondendo à proteína de interesse indica a presença de populações distintas da proteína, que podem apresentar diferenças conformacionais. As frações 36 a 39, correspondentes ao primeiro pico foram reunidas e concentradas para 1 mL para a próxima etapa de purificação, cromatografia de exclusão por tamanho. Nesta etapa o perfil de eluição foi idêntico ao de proteína selvagem, com um pico principal eluindo com cerca de 65 mL, correspondente à massa molecular aproximada de um monômero, segundo o manual da coluna Superdex 200 16/60 (figura 16, C), sendo precedido por um pico com uma quantidade mínima, no limite de detecção, que pode contar uma forma oligomérica ou agregada da proteína. Apesar de algumas bandas de degradação, as amostras 25 a 27 foram reunidas e concentradas para os ensaios de cristalização.

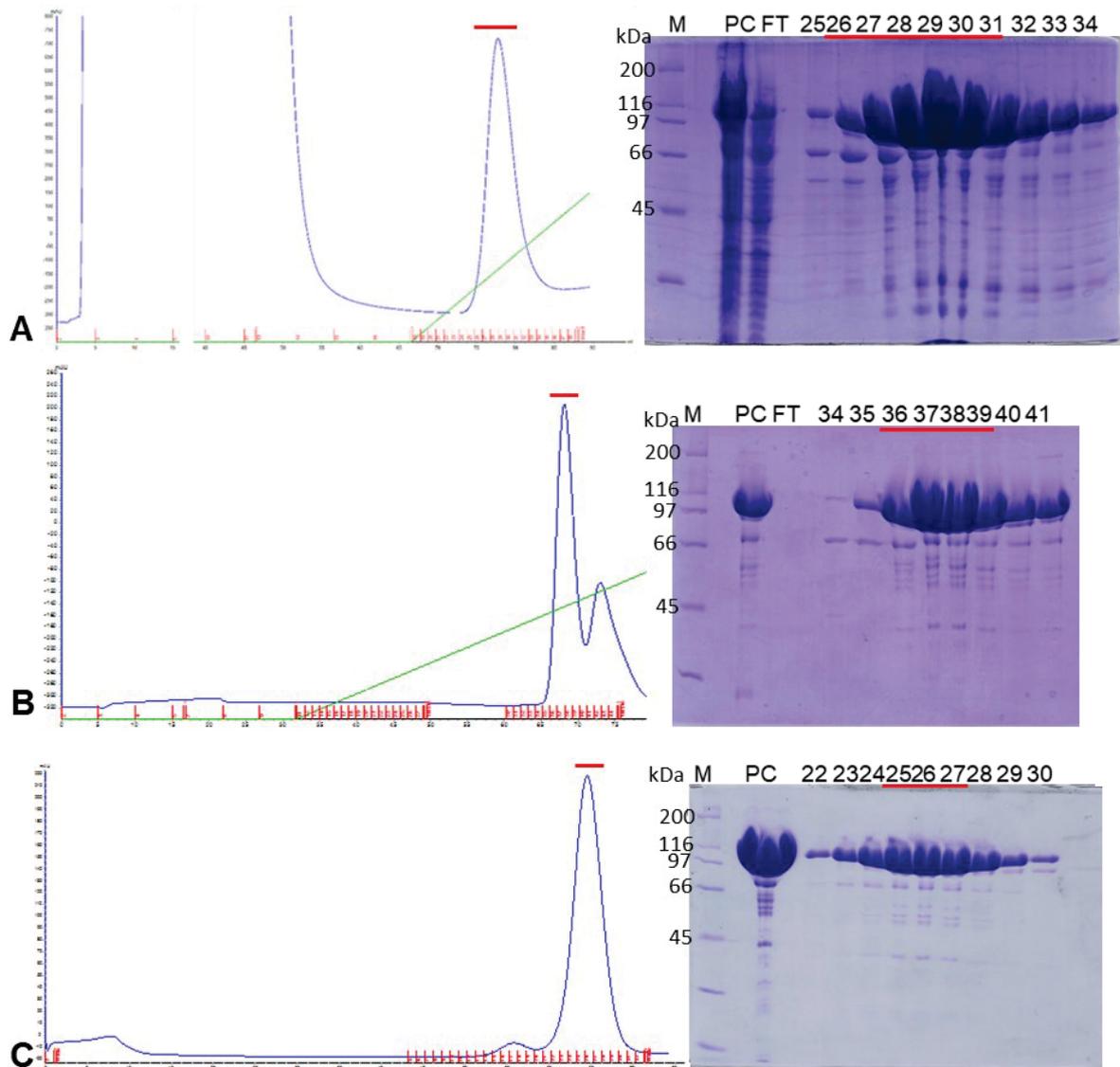


Figura 16 – Purificação de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> (110 kDa). A) Resultado da cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP 5 mL. B) Resultado da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q HP 5 mL. C) Resultado da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 16/60. No lado esquerdo são mostrados os cromatogramas, com o eixo “y” representando a absorvância a 280 nm e o eixo “x” o volume em mL e as regiões destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. A linha verde, quando presente, mostra o gradiente de tampão B. No lado direito são mostradas as análises por SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma e as frações destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. 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).

#### 4.1.1.3 Purificação da Variante TbRRP44<sup>D140N</sup>

TbRRP44<sup>D140N</sup> (110 kDa) foi purificada em 3 etapas, a partir de 1 L de cultura bacteriana. Na cromatografia de afinidade a níquel, primeira etapa de purificação,

observa-se um pequeno pico único, eluído em ~18% de tampão B (figura 17, A). As amostras 22 a 26 foram reunidas e diluídas na proporção 1:3 em tampão A de troca iônica. Na cromatografia de troca iônica, assim como as proteínas anteriores, está também foi separada em dois picos, sendo o primeiro e principal eluído em ~31% e o segundo em ~35% de tampão B (figura 17, B). Após análise em SDS-PAGE, as frações 26, 27 e 28 que correspondiam ao pico majoritário, foram concentradas até 500 µL para a cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 10/300. A TbRRP44<sup>D140N</sup> foi eluída em um pico majoritário, em aproximadamente 15 mL (figura 17, C), compatível com a forma monomérica da proteína sendo precedida por uma pequena fração de maior tamanho. A fração 14 foi diluída para 0,5 mg/mL e congelada em gelo seco e armazenada a -80°C para ensaios de degradação de RNA.

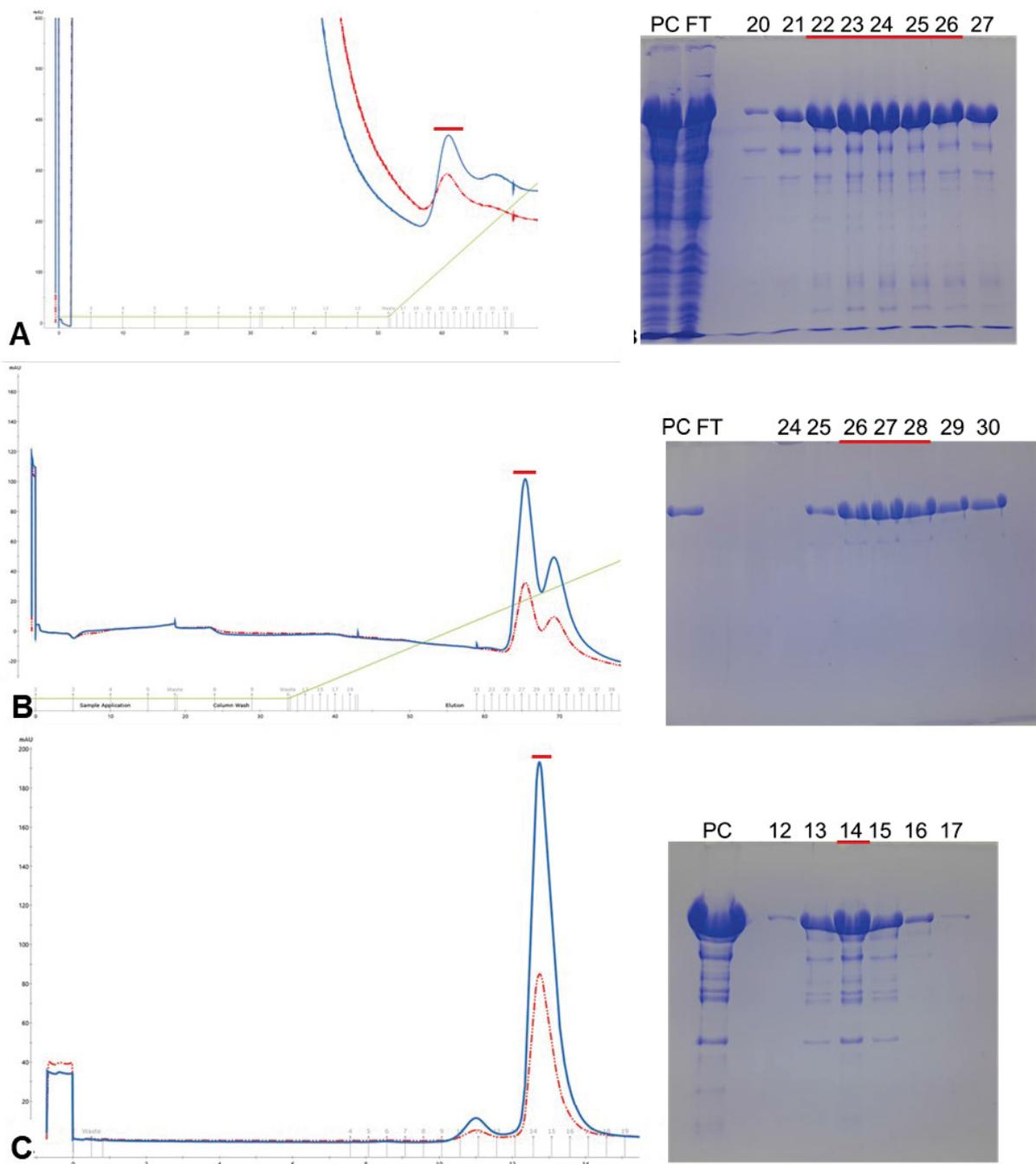


Figura 17 – Purificação de TbRRP44<sup>D140N</sup> (110 kDa). A) Resultado da cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP 5 mL. B) Resultado da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q HP 5 mL. C) Resultado da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 16/60. No lado esquerdo são mostrados os cromatogramas, com o eixo “y” representando a absorbância a 280 nm (perfil representado em azul) e o eixo “x” o volume em mL e as regiões destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. O perfil em vermelho corresponde à absorbância a 260 nm. A linha verde, quando presente, mostra o gradiente de tampão B. No lado direito são mostradas as análises por SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma e as frações destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. 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).

#### 4.1.1.4 Purificação da Variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN

A variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN (84 kDa) foi purificada a partir de 1 L de cultura bacteriana e também passou por 3 etapas de purificação. Na primeira etapa por cromatografia de afinidade a níquel, obteve-se apenas um pico largo cuja eluição iniciou em ~6% de tampão B (figura 18, A). As amostras 37 a 53 foram concentradas para diminuir o volume então diluídas 3 vezes em tampão A de troca iônica, a fim de diminuir a quantidade de sal. Na etapa de troca iônica, a proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN também foi separada em 2 picos (figura 18, B). O pico majoritário foi eluído em ~35% de tampão B, enquanto o pico menor em ~40%. As frações 36 a 40, referentes ao pico majoritário foram concentradas até 1 mL para a cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 16/600. A variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi eluída em aproximadamente 70 mL (figura 18, C), compatível com a forma monomérica da proteína. A fração 30 foi concentrada para 6 mg/mL para os ensaios de cristalização.

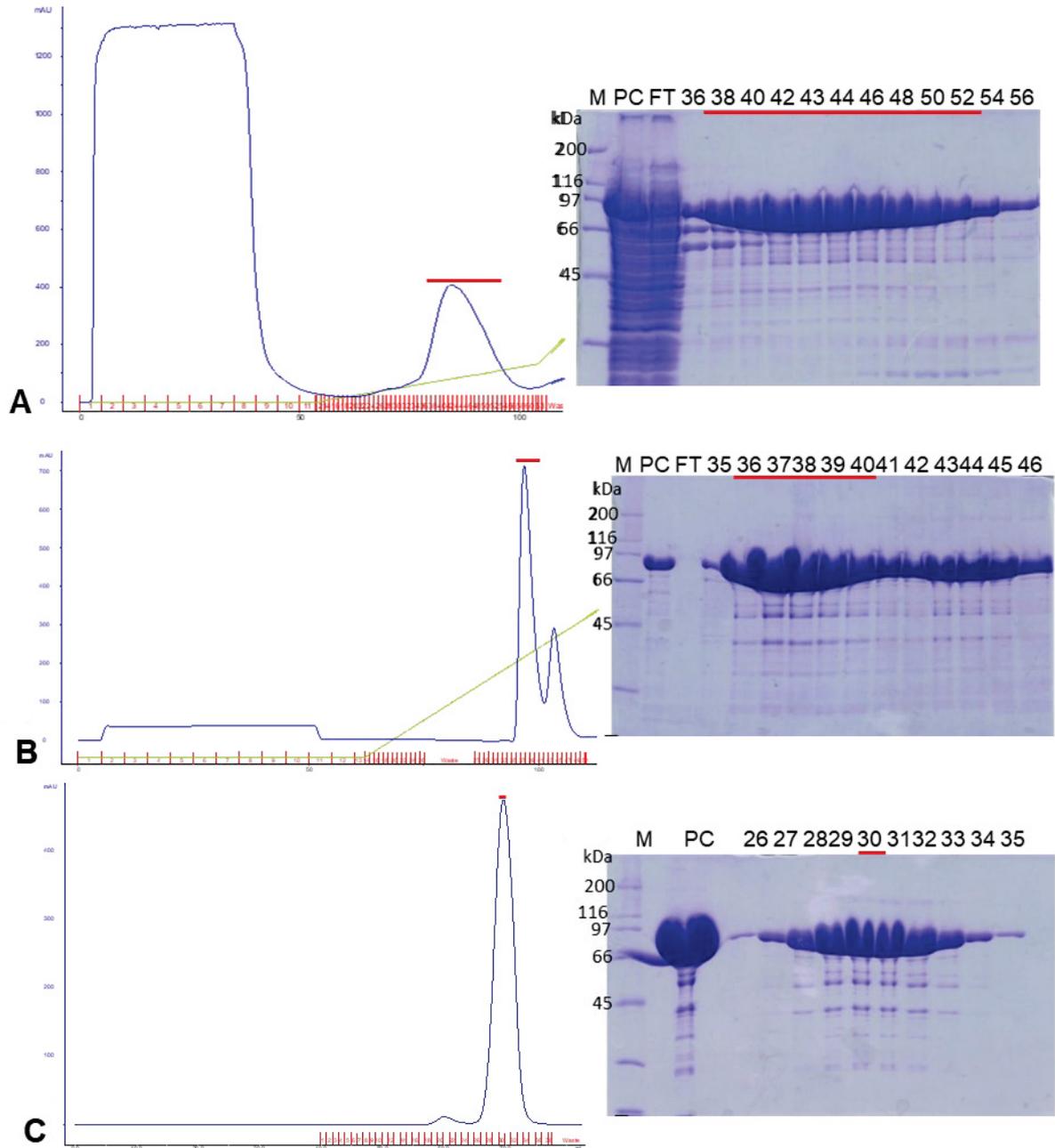


Figura 18 - Purificação de TbRRP44- $\Delta$ NPIN (84 kDa). A) Resultado da cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP 5 mL. B) Resultado da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q HP 5 mL. C) Resultado da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 16/60. No lado esquerdo são mostrados os cromatogramas, com o eixo "y" representando a absorbância a 280 nm e o eixo "x" o volume em mL e as regiões destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. A linha verde, quando presente, mostra o gradiente de tampão B. No lado direito são mostradas as análises por SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma e as frações destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. 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).

#### 4.1.1.5 Purificação da Variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup>

Assim como as demais variantes, a TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> (84 kDa) foi purificada a partir da expressão em 1L de cultura bacteriana. Na purificação por afinidade a níquel, observou-se a presença de um único pico no cromatograma, eluído a partir de ~5% de tampão B (figura 19, A). Após análise em SDS-PAGE, as amostras 27 a 46 foram concentradas até 10 mL e diluídas em tampão A de troca iônica na proporção 1:3. Assim como para a proteína selvagem e demais variantes, na cromatografia de troca iônica observa-se um pico majoritário eluído em ~30% e um pico secundário em ~36% de tampão B (figura 19, B). As amostras correspondendo ao pico majoritário, 31 a 35, foram concentradas até 1 mL para serem carregadas na coluna de gel filtração Superdex 200 16/600. Na última etapa de purificação, observou-se o aparecimento de um pico único, eluído em aproximadamente 70 mL, compatível com a forma monomérica da proteína (figura 19, C). A fração 18 foi aliquoteada e congelada em gelo seco e posteriormente armazenada a -80°C para os ensaios de termoforese em microescala e EMSA.

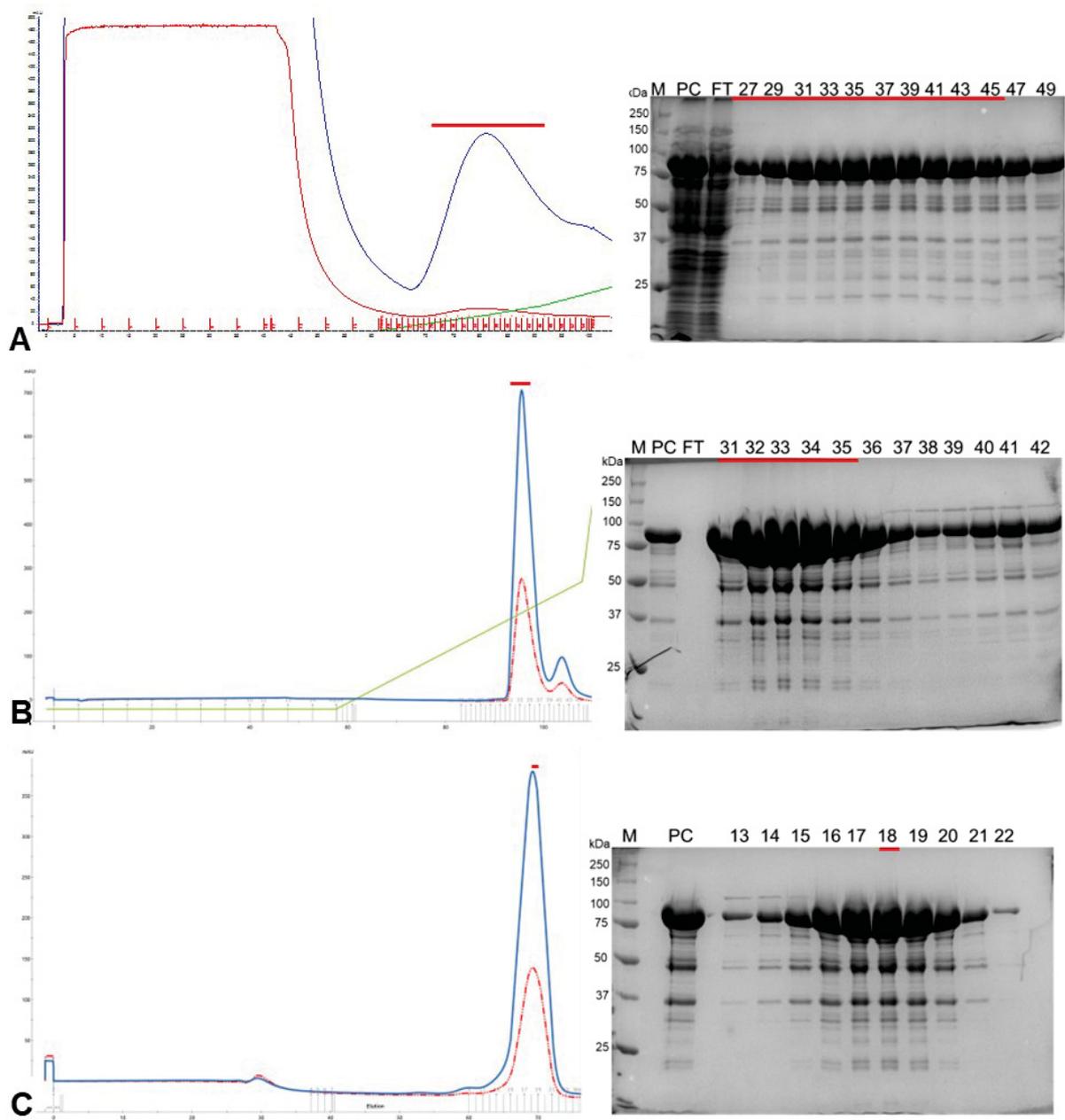


Figura 19 – Purificação de TbRRP44- $\Delta$ NPIND<sup>511N</sup> (84 kDa). A) Resultado da cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP 5 mL. B) Resultado da cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q HP 5 mL. C) Resultado da cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 200 16/60. No lado esquerdo são mostrados os cromatogramas, com o eixo “y” representando a absorbância a 280 nm (perfil representado em azul) e o eixo “x” o volume em mL e as regiões destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. O perfil em vermelho corresponde à absorbância a 260 nm. A linha verde, quando presente, mostra o gradiente de tampão B. No lado direito são mostradas as análises por SDS-PAGE das amostras correspondentes aos picos do cromatograma e as frações destacadas em vermelho referem-se às frações selecionadas. 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).

Todas as proteínas foram expressas com alto rendimento e o grau de pureza obtido variou conforme a variante purificada. A cromatografia por troca iônica permitiu a separação de duas “populações” da proteína, que embora sejam aparentemente semelhantes quando analisadas por eletroforese em condições desnaturantes, podem corresponder a conformações diferentes da TbRRP44 recombinante e daí a separação por cromatografia de troca iônica. Optamos por utilizar as frações correspondentes ao pico majoritário a fim de manter a consistência entre diferentes preparações. Após a terceira etapa cromatográfica, de exclusão por tamanho, bandas de menor peso molecular, em quantidade não desprezível, permanecem observáveis na análise por SDS-PAGE. Acreditamos que tais bandas, ou a maioria delas, correspondam a produtos de degradação da proteína de interesse. Procuramos minimizar este efeito diminuindo o tempo total do processo de purificação. Também pudemos observar uma melhoria quando a purificação foi inteiramente realizada a 4°C, entretanto nossa infraestrutura não permitiu que este procedimento fosse seguido sistematicamente. Entretanto, apesar do grau de pureza não completamente satisfatório, a proteína de interesse é altamente majoritária em todos os casos. Acreditamos que, tendo em vista a consistência entre as purificações (realizadas diversas vezes para cada uma das variantes) e as análises funcionais comparativas realizadas a partir das amostras obtidas, a qualidade das mesmas é satisfatória para os objetivos propostos.

#### 4.1.2 Cristalização da Variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN

Os ensaios de cristalização foram realizados com a proteína TbRRP44, TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN, porém só foram obtidas condições promissoras de cristalização para a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN. Ao total foram encontradas 7 condições diferentes de cristalização, descritas na tabela abaixo.

Kit de Cristalização	Condição
PEGion (Hamptom)	H3 (20% PEG 3350; 0,1 M CBTP pH 6,4)
PEGion (Hamptom)	G8 (2% tacsinato; 0,1 M Citrato de Sódio pH 5,6; 16% PEG 3350)
JBS1 a JBS4 (Jena Bioscience)	H5 (0,05 M MgSO <sub>4</sub> ; 0,2 M LiCl; 8% PEG 8000)
JBS1 a JBS4 (Jena Bioscience)	C4 (0,2 M MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M MES pH 6,5; 10% PEG MME 5000)
JBS1 a JBS4 (Jena Bioscience)	F2 (0,6 M NaCl; 0,1 M MES pH 6,5; 20% PEG 4000)
Structure Screen (Molecular Dimensions)	F10 (0,1 M MES pH 6,5; 12% PEG 20000)
Wizard 1 e 2 (Emerald Biosystems).	E8 (10% PEG 8000; 0,1 M Potassium phosphate monobasic/ Sodium phosphate dibasic pH 6,2; 0,2 M NaCl)

Tabela 4 – Condições de cristalização promissoras observadas nos *screenings* iniciais com TbRRP44- $\Delta$ PIN. Fonte: o Autor (2022).

Foram selecionadas 4 condições para refinamento G8, C4, F2 e F10 (figura 20) levando-se em conta a morfologia do cristal e também a disponibilidade de reagentes. Porém ao reproduzir as gotas manualmente, as condições F2 e F10 não geraram novos cristais, observava-se apenas a formação de precipitado cristalino.

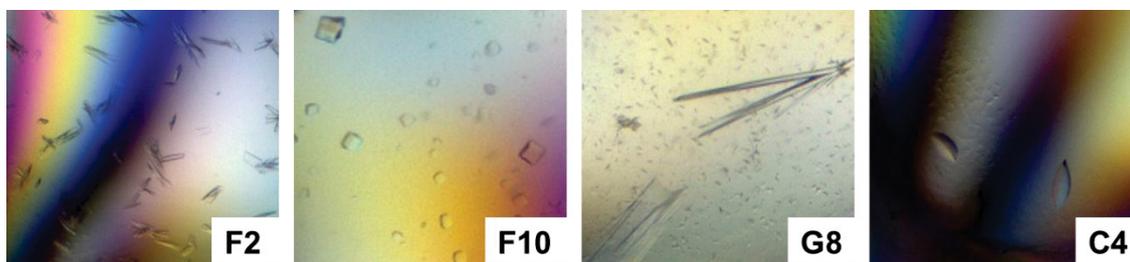


Figura 20 - Cristais de TbRRP44- $\Delta$ NPIN identificados nos *screenings* iniciais. Os rótulos correspondem às condições de cristalização descritas na tabela 4.

Refinamentos foram feitos alterando-se a concentração de proteína e o pH dos tampões. Para a condição C4 ao diluir a solução de reservatório em 30 a 40%, os

cristais diminuíram em número e aumentaram em tamanho. Já para a condição G8, quando se alterou a concentração de componentes da solução de reservatório, os cristais diminuíram de tamanho e aumentaram em quantidade (figura 21).

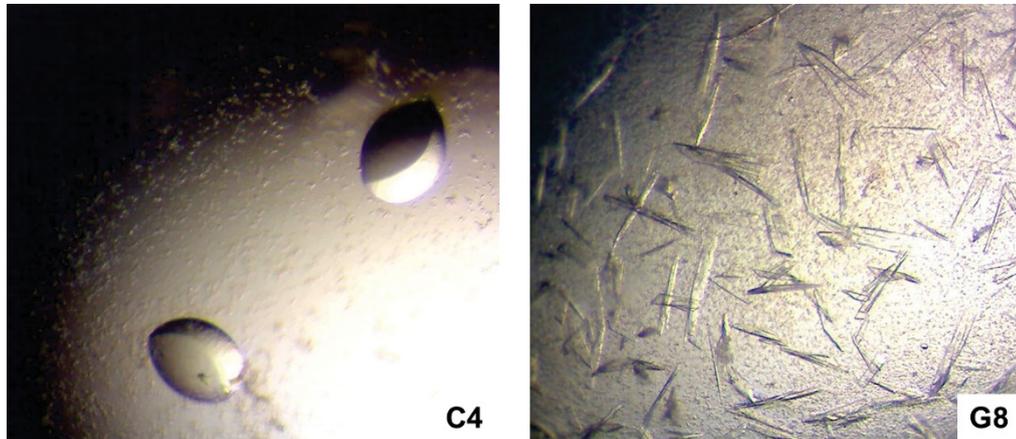


Figura 21 - Cristais de TbRRP44- $\Delta$ NPIN obtidos após refinamento das condições C4 e G8 dos kits JBS1 a JBS4 e PEGion, respectivamente.

Os cristais foram submetidos à coleta de dados de difração, que resultaram em conjuntos de dados a baixa resolução ( $\sim 4$  Å). Dessa forma, optamos por realizar ensaios de co-cristalização com oligonucleotídeos de RNA, o que poderia conferir maior estabilidade conformacional à proteína e conseqüentemente os cristais e os dados de difração poderiam ser de melhor qualidade. As melhores condições de cristalização iniciais foram testadas novamente, após incubação prévia da proteína com os oligoribonucleotídeos descritos na tabela 1 (5'-CCAAAAAAAAAACC e 5'-GGUUUUUUUUUGG). Além disso, foi feito refinamento das melhores condições, sendo as melhores condições encontradas as variações de F10 (15% PEG 20000; 0,1 M MES pH 6) e E8 (12% PEG 8000; 0,1 M Fosfato NaK pH 5,5; 0,2 M NaCl), resultando em diferentes e novos formatos de cristal, como o mostrado na figura 22.



Figura 22 - Diferentes formas de cristais da proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN. Os cristais da primeira e última imagem são formados nas variações da condição E8 (12% PEG 8000; 0,1 M Fosfato NaK pH 5,5; 0,2 M NaCl), alterando-se a proporção de proteína. O cristal da imagem do meio é formado nas variações da condição F10 (15% PEG 20000; 0,1 M MES pH 6).

#### 4.1.3 Coleta e Processamento dos Dados de Difração e Determinação da Estrutura Cristalográfica de TbRRP44- $\Delta$ NPIN

Foram realizadas três coletas de dados no Synchrotron SOLEIL (França), tendo sido analisados mais de 70 cristais. Os diferentes cristais, de diferentes formas, variaram na qualidade dos dados de difração, sendo os de formato ovalado e de placa os que apresentaram dados de difração a mais alta resolução. Os cristais de formato de losango arredondado, apesar de visualmente bons, não renderam bons dados.

Os conjuntos de dados obtidos na primeira coleta foram processados e foi dado início ao refinamento da estrutura. Entretanto, os dados ainda apresentavam baixa resolução (3,5 Å para o melhor conjunto de dados) e outros problemas, como alta mosaicidade dos cristais. Assim, optamos por realizar novas tentativas de otimização dos cristais. A partir dos dados obtidos durante a segunda coleta, foram selecionados os 5 melhores conjuntos de dados, os quais foram processados através do programa XDS. Após a análise inicial, foi escolhido um conjunto de dados a 3,1 Å, correspondente a um cristal da proteína na sua forma apo para a resolução da estrutura, cujos dados de processamento são apresentados na tabela 5.

A estrutura foi determinada pelo método de substituição molecular, utilizando um modelo de TbRRP44 obtido através do servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015), como modelo de busca. A estrutura foi parcialmente refinada até valores de  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  de 0,236 e 0,283, respectivamente. Entretanto, muitas regiões da cadeia polipeptídica não puderam ser modeladas devido à falta de densidade eletrônica, incluindo grande parte da região C-terminal.

Uma terceira rodada de otimização das condições de cristalização incluindo a co-cristalização com oligonucleotídeos gerou novos conjuntos de dados. Dentre 9 conjuntos de dados selecionados para o processamento o melhor foi obtido a partir da co-cristalização com o oligonucleotídeo G2U10G2 (tabela 1). A tabela 5 mostra a estatísticas dos dados após correção de anisotropia utilizando-se o servidor Staraniso (TICKLE et al, 2018).

	<b>Proteína na forma apo</b>	<b>Proteína na forma holo</b>
<b>Fonte</b>	SOLEIL-PROXIMA-2A	SOLEIL-PROXIMA 1
<b>Grupo espacial</b>	P3 <sub>2</sub> 2 1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Célula Unitária</b>	a=b= 86,399 c=237,736 $\alpha=\beta= 90^\circ\gamma=120^\circ$	a= 66,30 b= 91,11 c=148,30 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
<b>Resolução (Å)</b>		
Limite isotrópico	50 – 3,1 (3,28 – 3,09)	77 – 2,23 (2,55 – 2,23)
Limite anisotrópico#		a*= 2.91; b*= 2.21; c*= 2.96
<b>Reflexões observadas</b>	384867 (58058)	593016 (22350)
<b>Reflexões Únicas</b>	19525 (3029)	24678 (1235)
<b>Rmeas</b>	0,18 (3,88)	0,25 (1,65)
<b>Completeza (esférica) (%)</b>	99,7 (98,6)	54,9 (8,2)
<b>Completeza (elipsoidal) (%)</b>	-	93,8 (70,6)
<b>Multiplicidade</b>	19,7 (19,2)	24,0 (18,1)
<b>I/<math>\sigma</math></b>	14,71 (0,62)	12,1 (1,8)
<b>CC 1/2</b>	100 (30,3)	99,8 (63,2)

Tabela 5 - Estatísticas dos dados de difração dos cristais da TbRRP44- $\Delta$ NPIN, processados utilizando-se os programas XDS e Staraniso. Os valores entre parêntesis correspondem à última camada de resolução. Os limites de resolução anisotrópica seguiram o critério de corte  $I/\sigma(I) \geq 1.20$  (local). Fonte: o autor (2022).

A estrutura foi resolvida por substituição molecular utilizando a estrutura da proteína na forma apo como modelo para cálculo inicial das fases, usando o programa Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010). A estrutura foi refinada alternando ciclos de refinamento pelo programa BUSTER e construção interativa utilizando o programa COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004).

Com o progresso do refinamento da estrutura, nós observamos, próximo ao sítio catalítico (resíduos D503, D509, D511 e D512), picos positivos nos mapas de densidade eletrônica (*mFo-DFc* e *2mFo-DFc*), indicando a presença do oligonucleotídeo ligado. A modelagem de resíduos de RNA e um novo ciclo de refinamento confirmou a presença do substrato ligado ao sítio catalítico (figura 23).

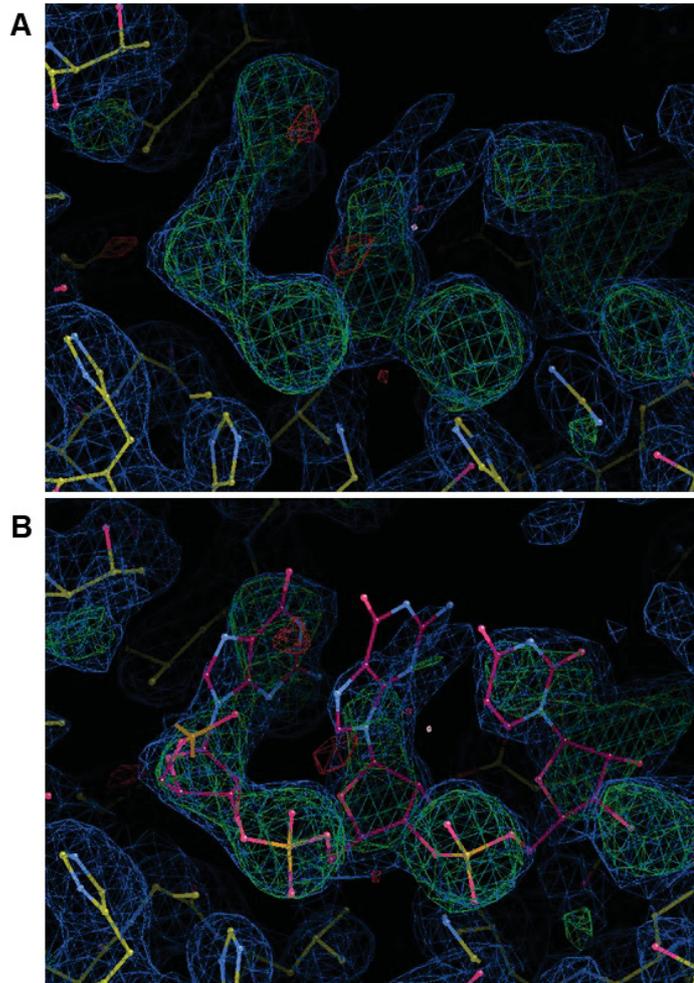


Figura 23 - Posicionamento do oligonucleotídeo de RNA ligado à região do sítio ativo de TbRRP44-ΔNPIN. O mapa *2mFo-DFc* é mostrado em azul, contornado a  $1\sigma$ , enquanto o mapa *mFo-DFc*, contornado a  $3,5\sigma$ , é mostrado em verde (positivo). A: Resultado do refinamento anterior à inclusão do oligonucleotídeo. B: Modelagem do oligonucleotídeo de RNA.

O substrato presente no modelo final contém os 5 resíduos da extremidade 5' dos 14 resíduos originalmente presentes no oligoribonucleotídeo utilizado nos ensaios de cristalização (5' **GGUUUUUUUUUGG** 3'), indicando a degradação do RNA. O substrato foi inicialmente modelado assumindo a ligação fosfodiéster intacta, como observado em outras estruturas de RNase II e Rrp44/Dis3 (FRAZÃO et al., 2006; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013). Entretanto, observou-se um pico negativo

no mapa de densidade eletrônica *mFo-DFc* na região do grupo fosfato do nucleotídeo 1 (extremidade 3' do substrato), além de um pico positivo na proximidade, sugerindo uma mudança conformacional no grupo fosfato (figura 24, A). Nós testamos então diferentes modelos para o refinamento, em que o nucleotídeo monofosfato (UMP), produto da reação, estivesse em uma conformação pós-clivagem, ou um modelo onde houvesse uma mistura dos estados pré e pós clivagem, refinando-se a ocupação nos diferentes estados. A análise dos mapas de densidade eletrônica e valores de  $R_{\text{free}}$  em cada etapa indicou que o modelo que melhor explica os dados obtidos corresponde à presença do produto em conformação pós clivagem, mas anterior à sua liberação do sítio catalítico (figura 24, B), estágio ainda não descrito em outras estruturas.

Durante o refinamento também foi possível identificar a presença de dois íons de magnésio no sítio ativo de TbRRP44- $\Delta$ NPIN. A posição do íon  $\text{Mg}^{2+}$  identificado como Mg1 na figura 24 é conservada em relação ao descrito em outras estruturas de proteínas da família RNasell/RNB (FRAZÃO et al., 2006; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013; WEICK et al., 2018). Sabe-se que na reação de clivagem, conhecida como mecanismo *two-metal-ion* (STEITZ; STEITZ, 1993), são necessários dois íons  $\text{Mg}^{2+}$ , que estabilizam os intermediários da reação. Porém, o segundo íon  $\text{Mg}^{2+}$  (Mg2 na figura 24) não havia sido observado nas estruturas descritas anteriormente. Tais estruturas foram determinadas a partir de cristais das proteínas no estado inativo, devido à mutação no ácido aspártico catalítico correspondente ao D511 em TbRRP44. O fato da estrutura de TbRRP44- $\Delta$ NPIN revelar a forma ativa da enzima propiciou a observação do segundo íon de magnésio, como será discutido posteriormente.

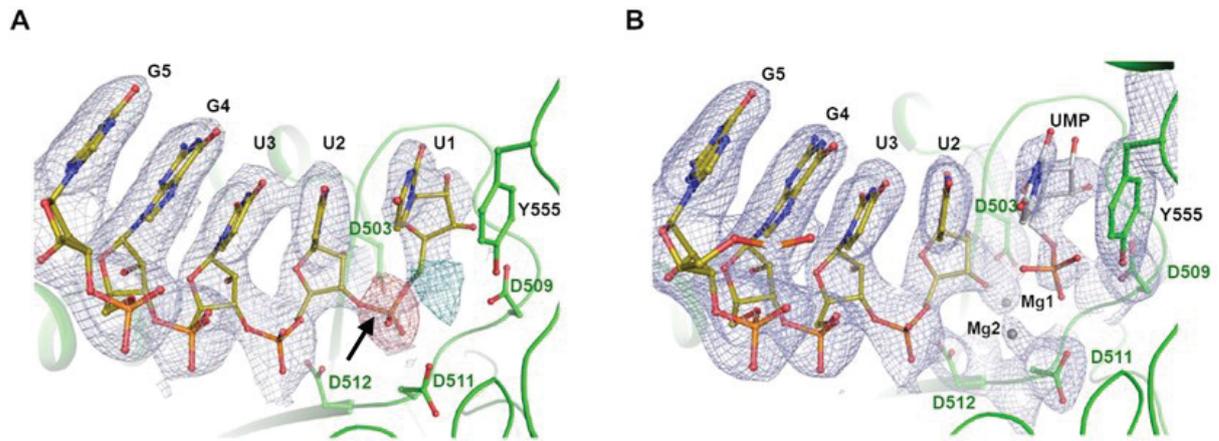


Figura 24 - Clivagem do RNA pela TbRRP44 na presença de dois íons Mg<sup>2+</sup>. A: Pico negativo no mapa de densidade eletrônica *mFo-DFc* destacado em vermelho, devido a presença do grupo fosfato e da ligação fosfodiéster intacta entre os nucleotídeos 1 e 2 (numeração a partir da extremidade 3'). A seta indica a ligação que é clivada pela ação da RRP44. O mapa *2mFo-DFc* está representado em cinza, contornado à 1  $\sigma$ , e o mapa *mFo-DFc* está contornado a 3,5  $\sigma$  com o pico negativo representado em vermelho e positivo em verde. B: Modelo final da região do sítio catalítico com os dois íons de Mg<sup>2+</sup> representados com esferas cinzas e o UMP separado do restante da cadeia em uma conformação pós-clivagem. O mapa *2mFo-DFc* está representado em azul, contornado a 1  $\sigma$ .

O modelo final foi validado utilizando-se o servidor Molprobit (CHEN et al., 2010). Um resumo da estatística final do refinamento é apresentado na tabela 6.

<b>R<sub>factor</sub></b>	0,1945
<b>R<sub>free</sub></b>	0,2640
<b>RMSD comprimento/ ângulo de ligação (Å) / (°)</b>	0,009/0,96
<b>Fator B médio (cadeia principal, Å<sup>2</sup>)</b>	49,3
<b>Átomos de proteína</b>	5331
<b>Átomos de Mg</b>	2
<b>Átomos de RNA</b>	87
<b>Número de moléculas de água</b>	253
<b>Gráfico de Ramachandran</b>	
<b>Favoráveis (%)</b>	96.8
<b>Outliers (%)</b>	0

Tabela 6 – Estatísticas finais do refinamento. Fonte: o autor (2022).

#### 4.1.4 Análises Estruturais

##### 4.1.4.1 Estrutura da TbRRP44- $\Delta$ NPIN

Análises mais detalhadas foram realizadas utilizando-se a estrutura em complexo com o substrato, refinada a mais alta resolução, entretanto, também serão mostradas algumas comparações com a primeira estrutura resolvida, na forma apo, apesar de não termos finalizado seu refinamento.

A estrutura da TbRRP44- $\Delta$ NPIN em complexo com RNA foi refinada a uma resolução de 2,23 Å e valores finais de  $R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  de 0,195 e 0,264, respectivamente. O modelo final compreende os resíduos 235 a 945 (dos 232 a 972 incluídos na construção). Algumas regiões do mapa *2mFo-DFc* não apresentaram densidade eletrônica suficiente para que fosse construída a cadeia peptídica, como entre os resíduos 315 e 341, que corresponde a uma conexão entre as fitas  $\beta_4$  e  $\beta_5$  do domínio CSD1, 384 e 388, 926 e 932 e os resíduos do C-terminal 946 a 972 que fazem parte do domínio S1.

Assim como as outras estruturas da família RNase II/RNB (FRAZÃO et al., 2006; LORENTZEN et al., 2008; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013), o módulo exonucleolítico da TbRRP44 é formado por dois domínios do tipo *cold shock*, CSD1 (resíduos 232 a 365) e CSD2 (resíduos 366 a 447), o domínio catalítico RNB (resíduos 448 a 869) e um domínio S1 (resíduos 870 a 945), presente no C-terminal da proteína. Os domínios CSD1, CSD2 e S1 ficam posicionados em um dos lados do domínio RNB (figura 25), sendo que esses três domínios possuem enovelamento conhecido como OB (do inglês *oligonucleotide/oligosaccharide-binding*) (AGRAWAL; KISHAN, 2005).

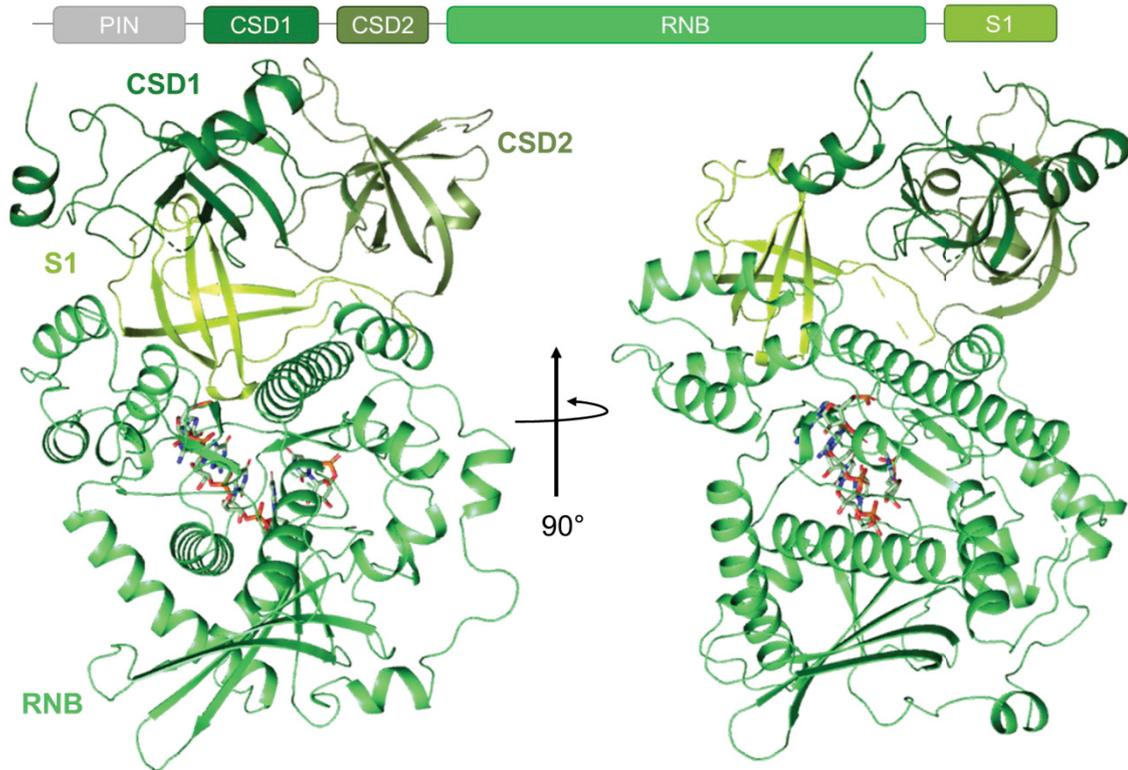


Figura 25 - Representação da estrutura cristalográfica da TbRRP44- $\Delta$ NPIN em complexo com RNA. Os domínios estruturais do módulo exonucleolítico estão representados no topo da figura e identificados (o domínio PIN, ausente na construção aparece em cinza). O oligonucleotídeo ligado ao domínio RNB está representado em bastões. Acima do domínio RNB estão posicionados os 3 domínios do tipo OB. A estrutura da esquerda foi rotacionada 90° em relação à da direita.

A estrutura de TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi comparada com as estruturas de membros da família RNase II/RNB disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Nos casos em que havia mais de uma estrutura da RRP44 de um mesmo organismo, foi escolhida apenas uma estrutura para representar o organismo. Assim foram escolhidas a estrutura da RNase II de *E. coli* (PDB: 2ix1), duas estruturas de Dis3L2, uma de *Schizosaccharomyces pombe* (SpDis3L2) e outra de *Mus musculus* (MmDis3L2) (PDB: 4RO1 e 4PMW, respectivamente), a Dis3 de humanos (hDis3), estrutura determinada em associação ao exossomo (PDB: 6d6r), além da Rrp44 de *S. cerevisiae* (ScRrp44) (PDB: 2vnu). A sobreposição das estruturas mostrou alta conservação do domínio RNB, mas uma grande variabilidade na orientação dos demais domínios, principalmente do domínio CSD1 (figura 26).

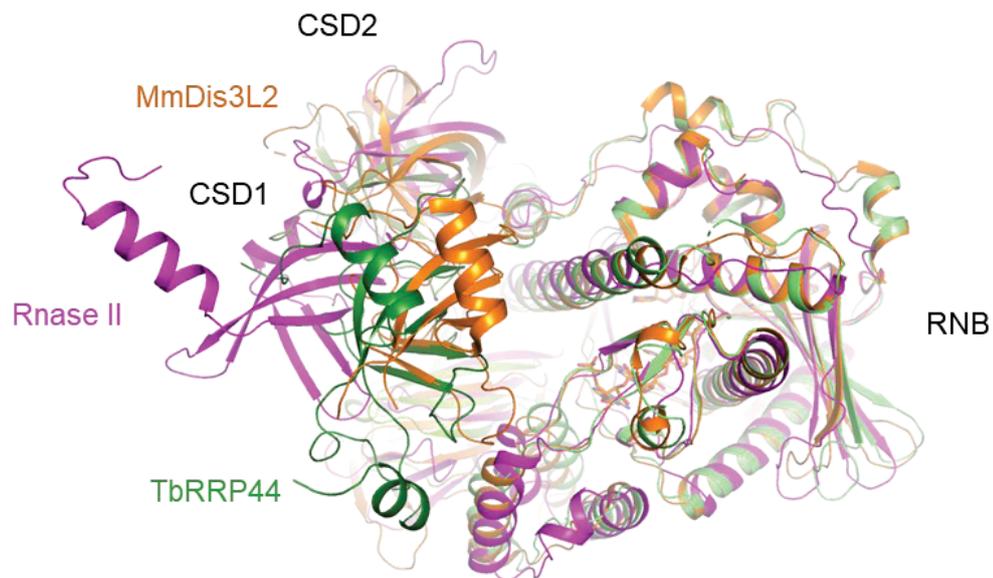


Figura 26 - Comparação entre as posições relativas dos domínios RNB e CSD1 nos membros da família RNase II/RNB. São mostradas as estruturas que mais apresentam variação de distância, sendo a estrutura da RNase II, mostrada em magenta, a que possui o domínio CSD1 mais distante do RNB, enquanto a estrutura de MmDis3L2, em laranja, é a que possui os dois domínios mais próximos. A TbRRP44, em verde, apresenta os domínios com distância intermediária quando comparada às estruturas da RNase II e MmDis3L2.

Comparações estruturais mais detalhadas foram realizadas com uma construção de ScRrp44 contendo apenas o módulo exonucleolítico, assim como a utilizada neste trabalho, com Rrp44/Dis3 humana (hDis3) e Dis3L2 de *M. musculus* (MmDis3L2).

Na figura 27 é possível notar que as estruturas são bastante conservadas, sendo o domínio RNB o mais conservado. As sobreposições dos domínios RNB de TbRRP44- $\Delta$ NPIN e ScRrp44 e hDis3 resultaram nos valores de desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) de 0,555 Å para a ScRrp44, com 323 C- $\alpha$  alinhados, e 0,905 Å para a hDis3, com 337 C- $\alpha$  alinhados (figura 28, A). Observamos ainda que o domínio S1 apresenta uma diferença em sua topologia quando comparado com outros membros da família RNase II/RNB. Em TbRRP44 o domínio S1 não apresenta uma folha  $\beta$  extra formada por 3 fitas entre as fitas  $\beta$ 3 e  $\beta$ 4, observada nas estruturas da ScRrp44 e hDis3 (figura 27).

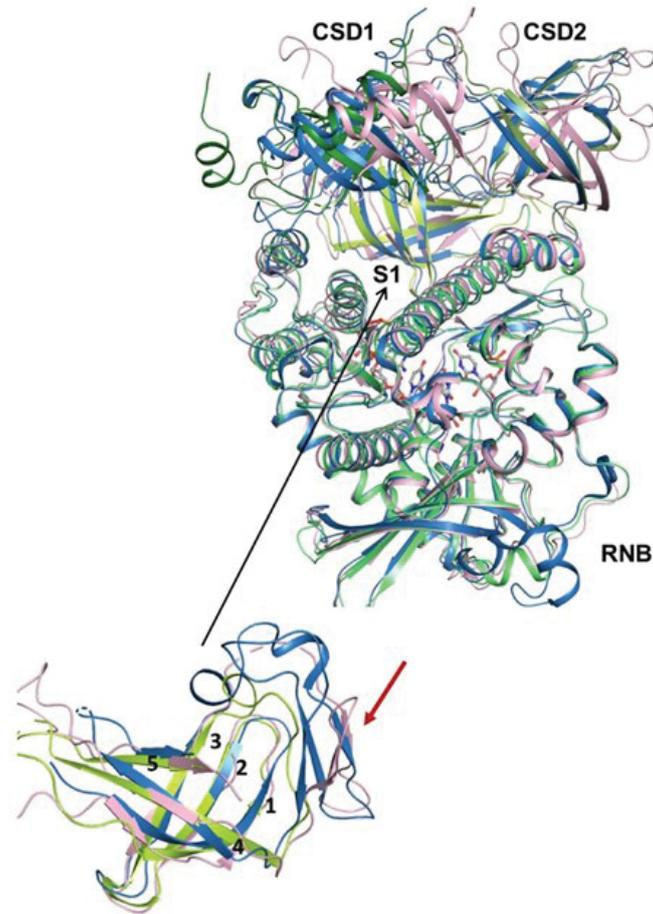


Figura 27 - Sobreposição das estruturas TbRRP44- $\Delta$ NPIN (verde), ScRrp44 (azul) e hDis3 (rosa), utilizando o domínio RNB para a sobreposição. Em destaque é mostrado o domínio S1, com a seta vermelha indicando a folha  $\beta$  extra observada entre as fitas  $\beta$ 3 e  $\beta$ 4, presente em membros da família RNase II/RNB e ausente em TbRRP44.

#### 4.1.4.2 Rota de Entrada do Substrato

Devido ao fato da proteína cristalizada apresentar-se na forma ativa, o oligonucleotídeo de RNA foi degradado e não pudemos analisar a rota de entrada do substrato para degradação. Entretanto, hipóteses sobre o recrutamento do substrato pela TbRRP44 puderam ser levantadas com base em comparações estruturais com as homólogas.

A RNase II bacteriana, Dis3L2 de camundongo (MmDis3L2) e a Dis3 humana possuem a conformação do CSD1, CSD2 e S1 semelhante, formando uma fenda pela qual o RNA entra para ser degradado, chamada de entrada pela via apical (FAEHNLE; WALLESHAUSER; JOSHUA-TOR, 2014; GERLACH et al., 2018; LORENTZEN et al.,

2008) (figura 28, A e B). Diferentemente dos demais membros da família RNase II/RNB, a ScRrp44 possui uma conformação dos domínios CSD1, CSD2 e S1 que oclui a via apical de entrada do substrato, sendo observada a chamada via lateral, formada entre os domínios CSD1 e RNB (figura 28, B). Em ScRrp44, o sexto nucleotídeo (contando a partir da extremidade 3', ligada ao sítio catalítico) é estabilizado por duas argininas (R811 e R896), em posição vizinha ao local de "curvatura" do RNA, observada nesta rota do substrato (figura 28, C). Estruturas cristalográficas de ScRrp44 mostraram a proteína em duas conformações distintas, a chamada conformação fechada em que o substrato passa pelo canal central do core Exo-9 do exossomo e é direcionada à Rrp44 para degradação e a conformação dita aberta, onde o substrato interage diretamente com a Rrp44. Nessas duas conformações, o RNA segue esta mesma rota lateral (figura 28, C) (MAKINO et al., 2015b; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013).

Assim como a ScRrp44, a TbRRP44 apresenta os domínios CSD1, CSD2 e S1 mais próximos, deixando a fenda da chamada via apical mais estreita. Considerando o recrutamento do RNA pela mesma rota que a RNase II, Dis3L2 e a hDis3, o substrato colidiria com os domínios CSD2 e S1 (figura 28, A). As argininas R811 e R896 presentes na ScRrp44, que são responsáveis por estabilizar o substrato na posição de sua curvatura para a rota lateral (nucleotídeo 6), são conservadas na estrutura da TbRRP44 (R771 e R856) (figura 28, B). Levando em consideração as semelhanças entre a estrutura da ScRrp44 e a TbRRP44, nós acreditamos que o RNA também possa ser recrutado pela via lateral em TbRRP44.

No entanto, foi proposto para a RNase R, que também faz parte da família RNase II/RNB, que o substrato pode seguir tanto a via apical, quanto a via lateral para degradação (CHU et al., 2017). Apesar da via apical estar mais fechada no caso da estrutura de TbRRP44- $\Delta$ NPIN e tendo em vista a flexibilidade interdomínios, interações com o substrato podem causar mudanças conformacionais que permitiriam a entrada do substrato pela via apical. Assim, especulamos a possibilidade de, no caso de TbRRP44, o RNA empregar tanto a via apical, quanto lateral, dependendo da natureza do substrato a ser degradado.

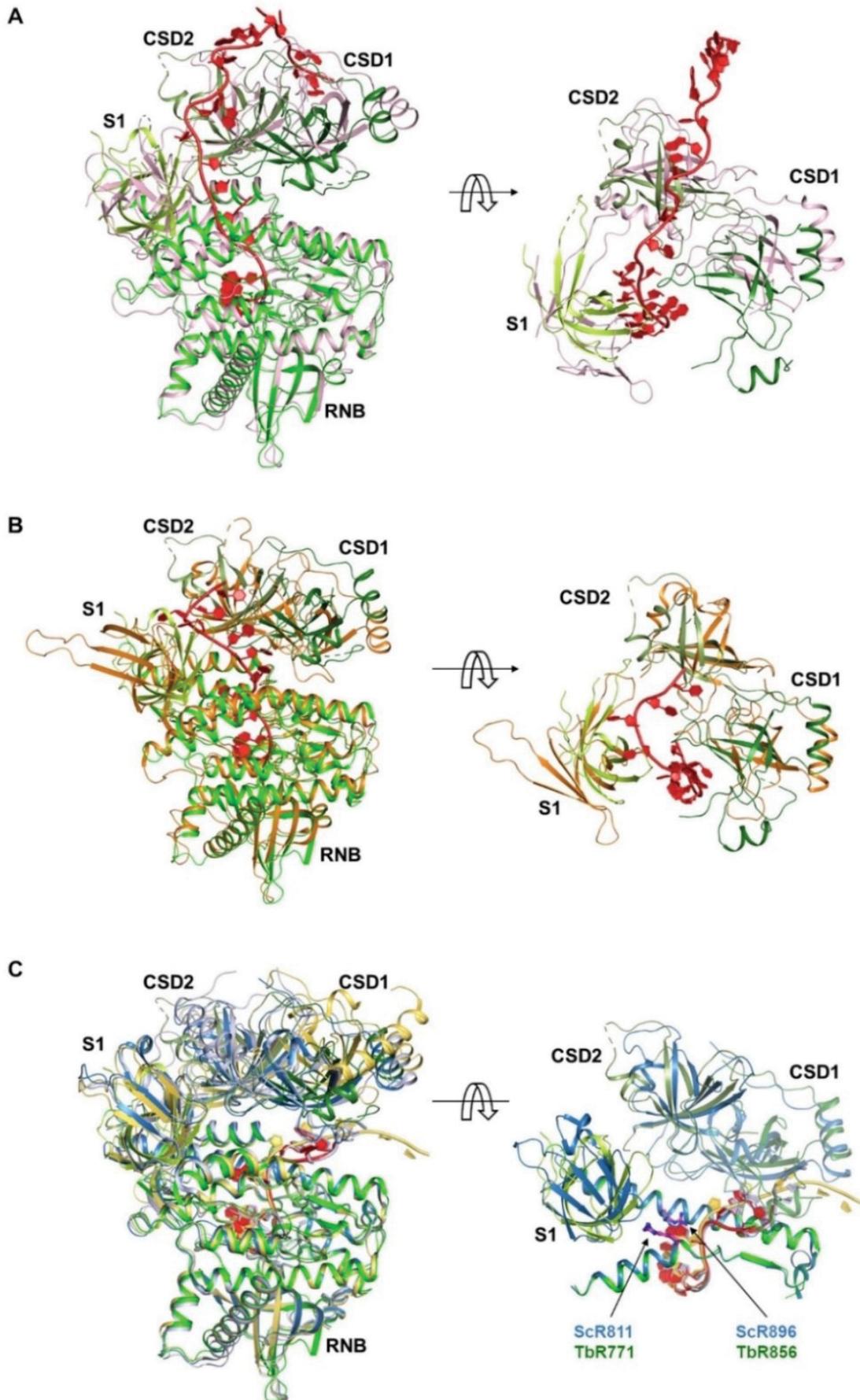


Figura 28 - Análise da rota de entrada do substrato na família RNase II/RNB. As figuras da direita mostram uma visão do topo da estrutura em relação às figuras da esquerda (rotação conforme indicado), com destaque para os domínios CSD1, CSD2 e S1 A: Comparação entre a TbRRP44- $\Delta$ NPIN (verde) e hDis3 (rosa), sendo o RNA presente na estrutura de hDis3 destacado em vermelho, entrando pela via apical. B: Comparação entre a TbRRP44- $\Delta$ NPIN (verde) e MmDis3L2 (laranja), sendo o RNA presente na estrutura MmDis3L2 destacado em vermelho, entrando pela via apical. C: Comparação entre a TbRRP44- $\Delta$ NPIN (verde) e diferentes estruturas da ScRrp44, em azul é mostrada a estrutura correspondente ao PDB 2vnu, que possui apenas a região exonucleolítica, sendo o RNA presente nesta estrutura destacado em vermelho. Em azul claro observa-se a estrutura da ScRrp44 em conformação aberta (PDB: 5c0W). A ScRrp44 na conformação fechada (PDB: 4ifd) é representada em amarelo, assim como seu RNA. Nas figuras da direita são destacados os resíduos de arginina conservados que estabilizam a conformação do nucleotídeo 6 do substrato e seus equivalentes em TbRRP44.

#### 4.1.4.3 Análise do Sítio Exonucleolítico de TbRRP44

A região catalítica e o mecanismo de degradação do RNA são conservados entre os membros da família RNase II/RNB. As bases dos 5 primeiros nucleotídeos da extremidade 3' formam interações do tipo *stacking* entre elas. Quando o primeiro nucleotídeo é clivado e dissocia-se do sítio catalítico, o RNA é translocado e o processo se repete até que de 3 a 5 nucleotídeos permaneçam ligados. O sítio catalítico é formado por 4 resíduos ácidos, além de dois íons  $Mg^{2+}$  que atuam na catálise (revisão em ARRAIANO; MATOS; BARBAS, 2010). Entretanto, até então, somente havia sido possível observar um destes íons nas estruturas descritas (FRAZÃO et al., 2006; MAKINO; BAUMGÄRTNER; CONTI, 2013).

Como mencionado anteriormente, a estrutura de TbRRP44- $\Delta$ NPIN foi resolvida com um oligonucleotídeo de RNA ligado ao sítio catalítico. Como tratava-se de uma construção desprovida de mutações, havíamos tratado a proteína com EDTA antes da incubação com o oligonucleotídeo. O EDTA foi adicionado em concentração e tempo suficientes para inibir a atividade da proteína, segundo descrito por Dziembowski e colaboradores (2007), porém, em nosso caso, o tratamento com EDTA não aboliu a atividade da enzima, resultando na clivagem do substrato de RNA de 14 nucleotídeos (5' GGUUUUUUUUUGG 3'), restando apenas 5 nucleotídeos acomodados na fenda catalítica. As bases destes nucleotídeos, formam uma interação do tipo *stacking* (figura 29, A), como é característico da família RNase II/RNB (ARRAIANO; MATOS; BARBAS, 2010). Os íons  $Mg^{2+}$  presentes no sítio ativo, provenientes do sistema de expressão uma vez que não foram adicionados em nenhuma etapa posterior, permaneceram, provavelmente devido à sua alta afinidade e falta de acesso do agente quelante ao bolsão catalítico. Entretanto, supomos que a presença do EDTA diminuiu consideravelmente a atividade da proteína, devido à

remoção do excesso de íons eventualmente presentes, permitindo a cristalização da proteína em estágio pós clivagem da ligação fosfodiéster, mas anterior à saída do nucleotídeo do sítio catalítico.

O segundo íon  $Mg^{2+}$  magnésio, que não é observado nas estruturas obtidas após a mutação do ácido aspártico catalítico, é coordenado pelo grupo fosfato do produto UMP, o 3'-OH da ribose do segundo nucleotídeo, uma molécula de água, o ácido aspártico catalítico D511 e o resíduo vizinho S804 (figura 29, B). Os dois íons de magnésio estão separados por 3,8 Å. Nossa hipótese é que a posição deste segundo magnésio pode mudar durante a catálise e a estrutura TbRRP44- $\Delta$ NPIN revelou a posição correspondente ao estado imediatamente após a clivagem do substrato.

Além dos resíduos ácidos do sítio ativo (D503, D509, D511 e D512), outros aminoácidos também são importantes para a atividade catalítica, como a tirosina Y253 (numeração da RNase II) que forma um *stacking* com a base do nucleotídeo da extremidade 3' (Nt1), estabilizando sua conformação e a fenilalanina F358 (numeração da RNase II), que junto com a Y253 “preendem” o substrato estabilizando os 5 nucleotídeos no bolsão catalítico (FRAZÃO et al., 2006). Os resíduos correspondentes na estrutura da TbRRP44 são Y555 e L696, envolvidos em interações hidrofóbicas com as bases nas extremidades 3' e 5' do substrato, respectivamente, estabilizando sua conformação (figura 29). TbRRP44 e ScRrp44 possuem um resíduo de fenilalanina (F695 em TbRRP44 e F655 em ScRrp44) vizinho à referida leucina, no entanto tal fenilalanina não se apresenta em conformação para interação com o RNA (LORENTZEN et al., 2008).

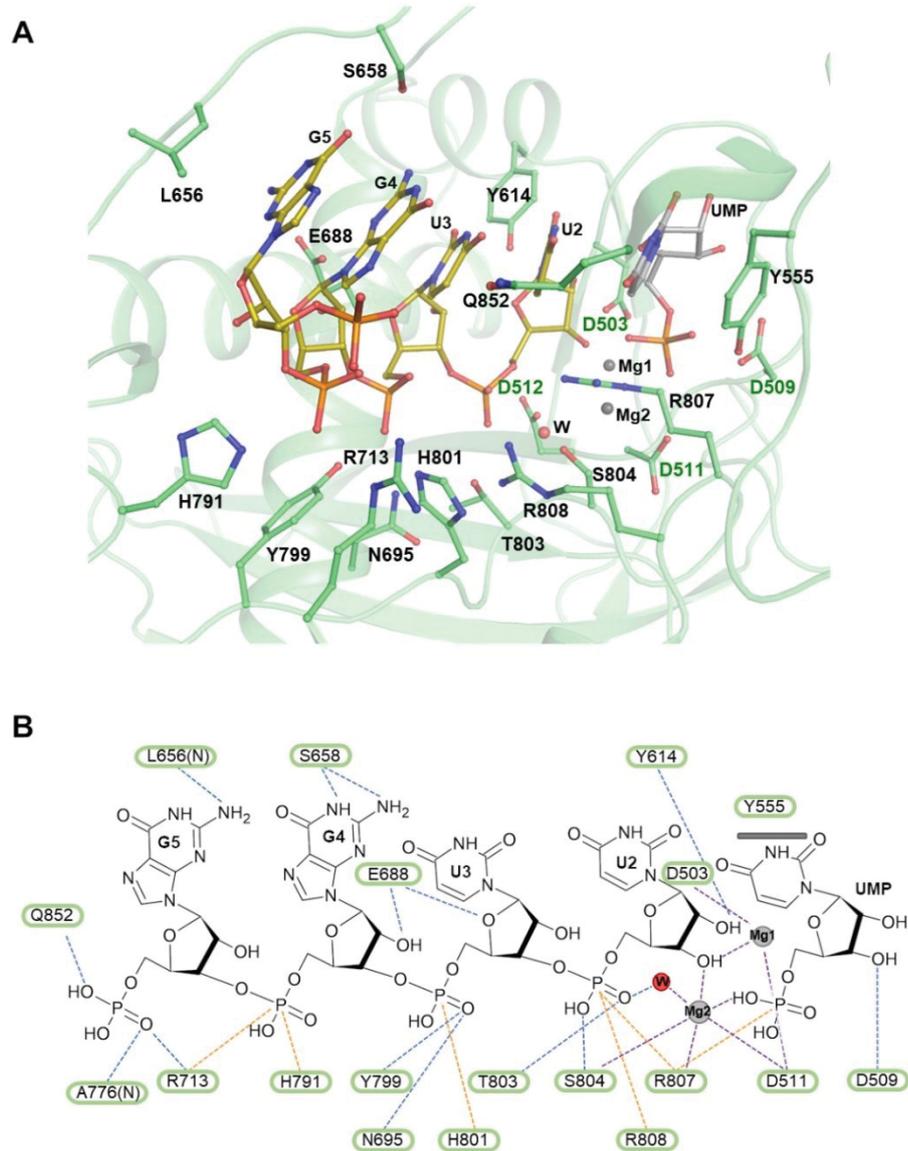


Figura 29 - Visão detalhada da região de ligação ao substrato na proteína TbRRP44- $\Delta$ NPIN. A: Os resíduos que fazem interação com o RNA são destacados mostrando suas cadeias laterais. A cadeia de RNA é mostrada em amarelo, enquanto o produto da reação, o UMP, é indicado em cinza. Os íons  $Mg^{2+}$  são mostrados como esferas em cinza. B: Representação esquemática da interação dos resíduos com o RNA. As pontes de hidrogênio são representadas pelas linhas azuis pontilhadas, enquanto as pontes salinas são mostradas em laranja. A coordenação dos íons  $Mg^{2+}$  são indicadas em roxo. O *stacking* entre a base do UMP e a Y555 é identificada por uma barra cinza. A análise das interações proteína-ligante foi realizada utilizando-se o servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (ADASME et al., 2021).

Outro resíduo importante é a arginina R500 (numeração da RNase II) que fixa a ligação fosfodiéster com o nucleotídeo a ser clivado, aumentando a susceptibilidade do átomo de fósforo para um ataque nucleofílico. Foi mostrado que a mutação R500A causa inativação da enzima (BARBAS et al., 2009; FRAZÃO et al., 2006). A arginina equivalente, R807 em TbRRP44, apresenta uma alteração conformacional na estrutura na forma apo (figura 30, A) demonstrando sua flexibilidade, provavelmente

relacionada às etapas de ligação do substrato, clivagem e liberação do produto. Acreditamos que esta arginina passe à conformação apresentada na estrutura apo nas etapas de liberação do produto e deslocamento do substrato, voltando então à conformação apresentada na estrutura holo para um novo ciclo de clivagem.

A sobreposição das estruturas de TbRRP44- $\Delta$ NPIN nas formas apo e holo revelou ainda mudanças conformacionais adicionais relacionadas à ligação do substrato. A presença do RNA estabiliza algumas estruturas secundárias, como o loop que precede a fita  $\beta$ 7 do domínio RNB, que possui 4 aminoácidos que interagem diretamente com o RNA, e as fitas  $\beta$ 7 e  $\beta$ 8, que só puderam ser construídas na estrutura em complexo com RNA, pois na estrutura apo, não há continuidade no mapa de densidade eletrônica, indicando que esta região é bastante flexível (figura 30, B). Além disso, o loop formado pelos resíduos 503 a 512, entre as fitas  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 do domínio RNB, onde estão situados os quatro ácidos aspárticos que formam o sítio catalítico, é deslocado quando o sítio catalítico está ocupado (figura 30, C).

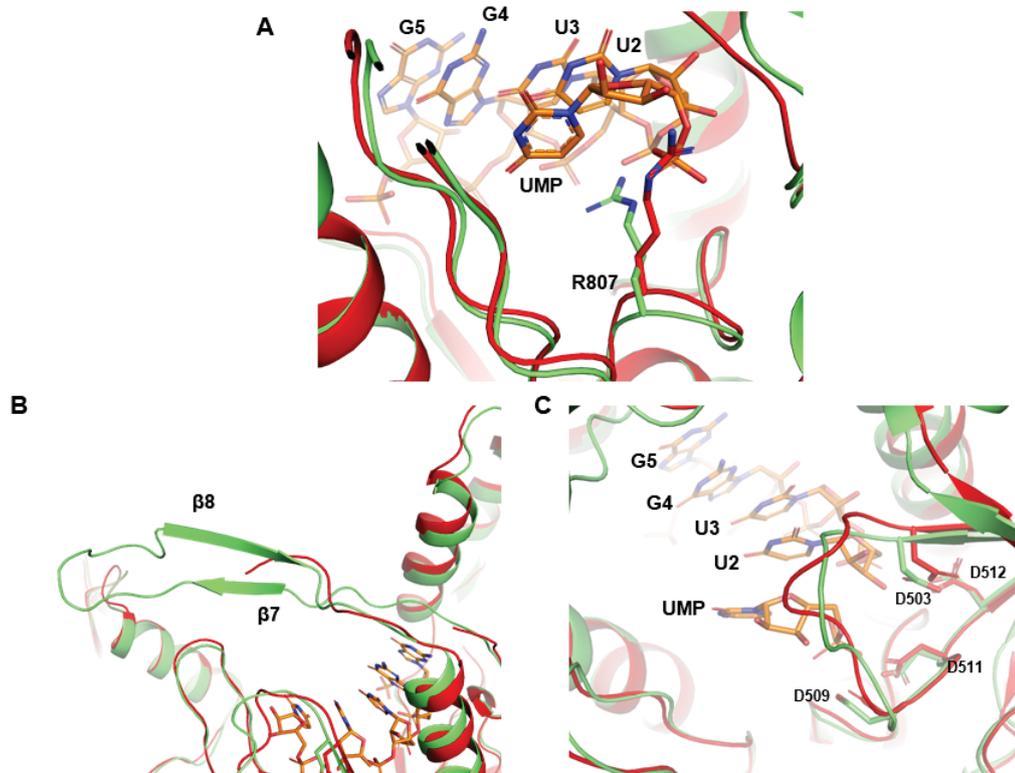


Figura 30 - Modificações estruturais na região do sítio catalítico da TbRRP44- $\Delta$ NPIN na presença de RNA. Em vermelho é mostrada a estrutura na forma apo e em verde na forma holo. A: A cadeia lateral de R807 apresenta conformações distintas nas estruturas apo e holo. A conformação encontrada na estrutura apo colide com o grupo fosfato do produto UMP, modelado na estrutura holo. B: O loop antes da fita  $\beta$ 7, a fita  $\beta$ 7 e a fita  $\beta$ 8 são estabilizados na presença do RNA. Algumas regiões da estrutura foram apagadas para melhor visualização. C: O loop contendo os resíduos catalíticos D503, D509, D511 e D512 muda de conformação quando da ligação do substrato.

Como apresentado anteriormente, a determinação da estrutura de TbRRP44- $\Delta$ NPIN em sua forma ativa, permitiu observar detalhes inéditos que contribuem para a descrição do mecanismo catalítico da família RNase II/RNB. Frazão e colaboradores (2006) mostraram, através da estrutura da RNase II, que o íon de magnésio, identificado como Mg1 na figura 31, atua estabilizando a ligação fosfodiéster para que ocorra a clivagem através de um ataque de uma água hidrolítica ao centro do grupamento fosfato, como pode ser observado na figura 31, A. Nossos estudos então mostraram a posição do segundo íon magnésio que não havia sido observado anteriormente (Mg2 na figura 31), o qual atua estabilizando o produto interagindo com uma molécula de água, além da cadeia lateral dos resíduos D511, S804 e R807 e uma das hidroxilas do grupo fosfato do nucleotídeo recém clivado, nucleotídeo este que se desloca um pouco em relação ao restante da cadeia, mas ainda permanece na região catalítica, fazendo uma interação do tipo *stacking* entre a base do ribonucleotídeo e a Y555 (figura 31, B). Como mencionado nos parágrafos anteriores, acreditamos que a R807 possa estar envolvida na etapa de deslocamento e liberação do produto, já que ocorre uma mudança conformacional na cadeia lateral deste aminoácido, possivelmente deslocando o produto e, assim, assumindo a posição do fosfato do nucleotídeo recém clivado (figura 31, C). Assim que o produto sai da região catalítica, a R807 retorna à conformação anterior permitindo o deslocamento da cadeia de RNA para a degradação do próximo nucleotídeo, reiniciando o processo mostrado na figura 31, A.

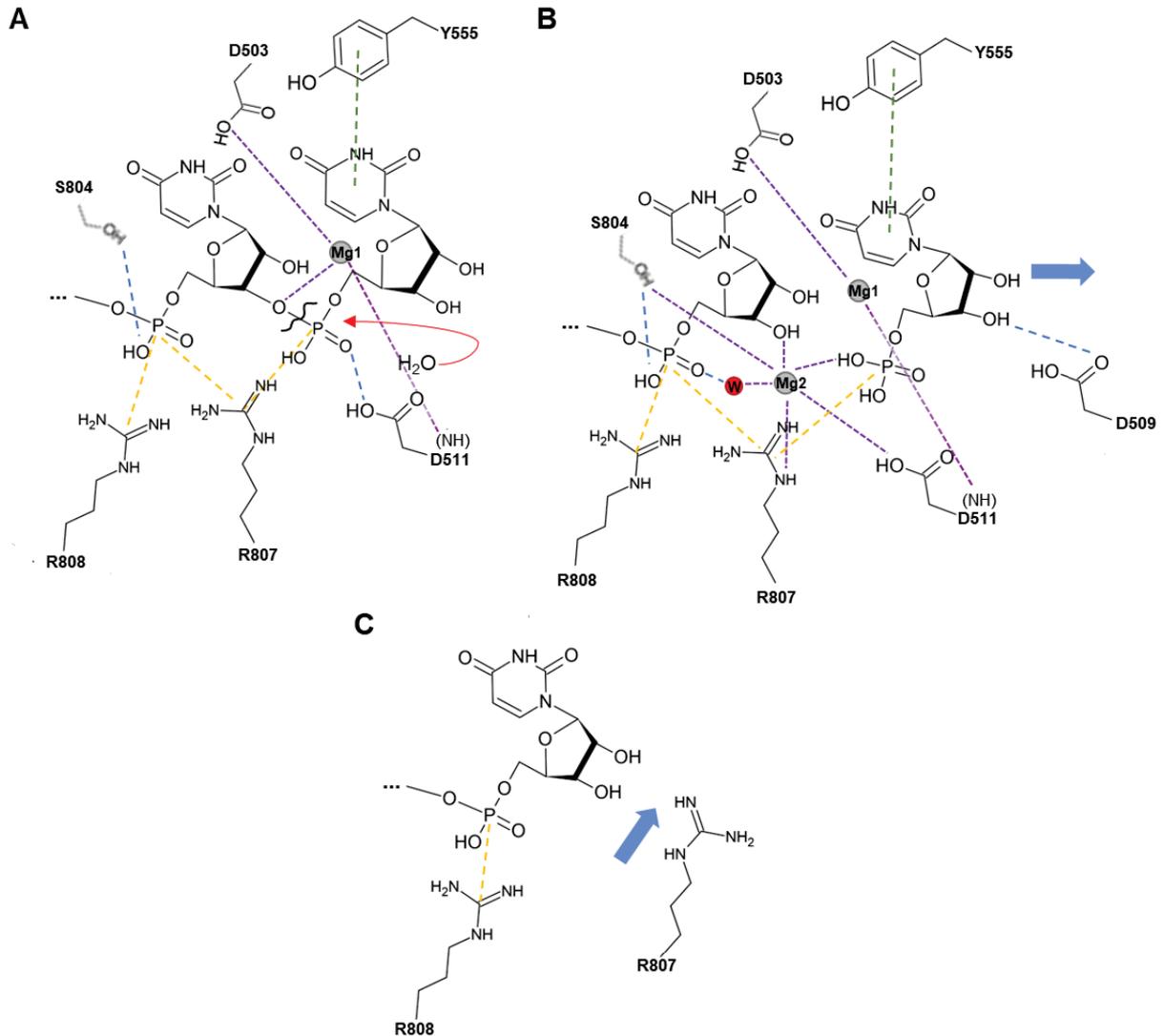


Figura 31 - Mecanismo de clivagem do tipo *two-metal-ion* com a presença do segundo íon magnésio proposto neste trabalho. A: A água ataca o centro do fosfato (indicado pela seta vermelha), doando uma hidroxila ao grupo fosfato, ocorrendo assim a hidrólise da ligação fosfodiéster, sendo que durante a reação, o íon magnésio, Mg1, estabiliza a reação. B: Após a hidrólise, o segundo íon de magnésio, Mg2, identificado pela primeira vez neste trabalho, atua estabilizando o produto formado, interagindo com o grupamento fosfato. C: Após a clivagem do nucleotídeo, a cadeia lateral da Arginida 807 muda de conformação assumindo a posição do fosfato do ribonucleotídeo clivado. As linhas tracejadas em amarelo indicam as pontes salinas, enquanto as azuis as ligações de hidrogênio, as linhas verdes indicam as interações do tipo *stacking* entre a tirosina e a base do ribonucleotídeo. As setas azuis mostram o deslocamento das moléculas.

#### 4.1.5 Ensaios de Degradação de RNA *in vitro*

A fim de analisarmos a atividade de TbRRP44 frente a diferentes substratos foram realizados ensaios de degradação *in vitro*. Inicialmente foram feitos ensaios de degradação utilizando TbRRP44 selvagem e diferentes substratos de fita simples, poliU, poliA e poliAU. A padronização desses experimentos iniciais, assim como os

tempos usados nos ensaios, os quais foram baseados em outros estudos com ensaios de degradação da ScRrp44 (LEBRETON et al., 2008; LORENTZEN et al., 2008), foram realizados pela mestrandia Heloisa Tramontin da Soler (da SOLER, 2022).

Observou-se que a TbRRP44 é capaz de degradar substratos *in vitro* e apresenta preferência por substratos ricos em uracila (figura 32). Esta preferência também foi observada na Rrp44 de *S. cerevisiae* (LIU; GREIMANN; LIMA, 2006; WASMUTH; LIMA, 2012), ao contrário da RNase II bacteriana que apresenta maior eficiência na degradação de substratos poliA (BARBAS et al., 2008). Esta preferência por substratos ricos em uracila condiz com substratos já identificados para a RRP44 em outros organismos, como é o caso de RNAs que contêm marcações com elementos ricos em AU (ARE, do inglês *AU rich elements*) comumente encontrados na região 3'UTR (*Untranslated region*) com a função de regular mRNAs, seja marcando para degradação ou estabilizando os mesmos, através de outras proteínas, impedindo a degradação dessas moléculas (CHEN; SHYU, 1995; OTSUKA et al., 2019). Sabe-se que o exossomo é recrutado e é responsável pela degradação de mRNAs com marcação ARE (CHEN et al., 2001).

Também se observa que a proteína degrada os substratos com eficiência semelhante na presença dos cofatores  $MgCl_2$  e  $MnCl_2$  (figura 32), cofatores esses necessários para a clivagem da ligação fosfodiéster, como citado anteriormente, em um mecanismo conhecido como *two-metal-ion* (STEITZ; STEITZ, 1993). Além disso, embora a adição dos cofatores à mistura de reação aumente a eficiência da enzima, a degradação é observada mesmo sem esta adição, devido à presença de metais no sítio ativo provenientes do sistema de expressão. A estrutura resolvida neste trabalho, mostrou a presença de dois íons  $Mg^{2+}$  ligados ao sítio catalítico do domínio RNB assim como a estrutura do domínio PIN da TbRRP44, previamente determinada havia revelado dois íons  $Mn^{2+}$  ligados ao sítio endonucleolítico (CESARO, 2018), também provenientes da etapa de expressão, já que nenhum desses metais foram adicionados em nenhuma etapa desde a produção até a cristalização da proteína.

Os ensaios também mostraram que em altas concentrações de  $MgCl_2$  ocorre um efeito de inibição (figura 32), como observado no trabalho de Dziembowski e colaboradores (2007), que analisou a atividade do complexo exossomo de *S. cerevisiae*.

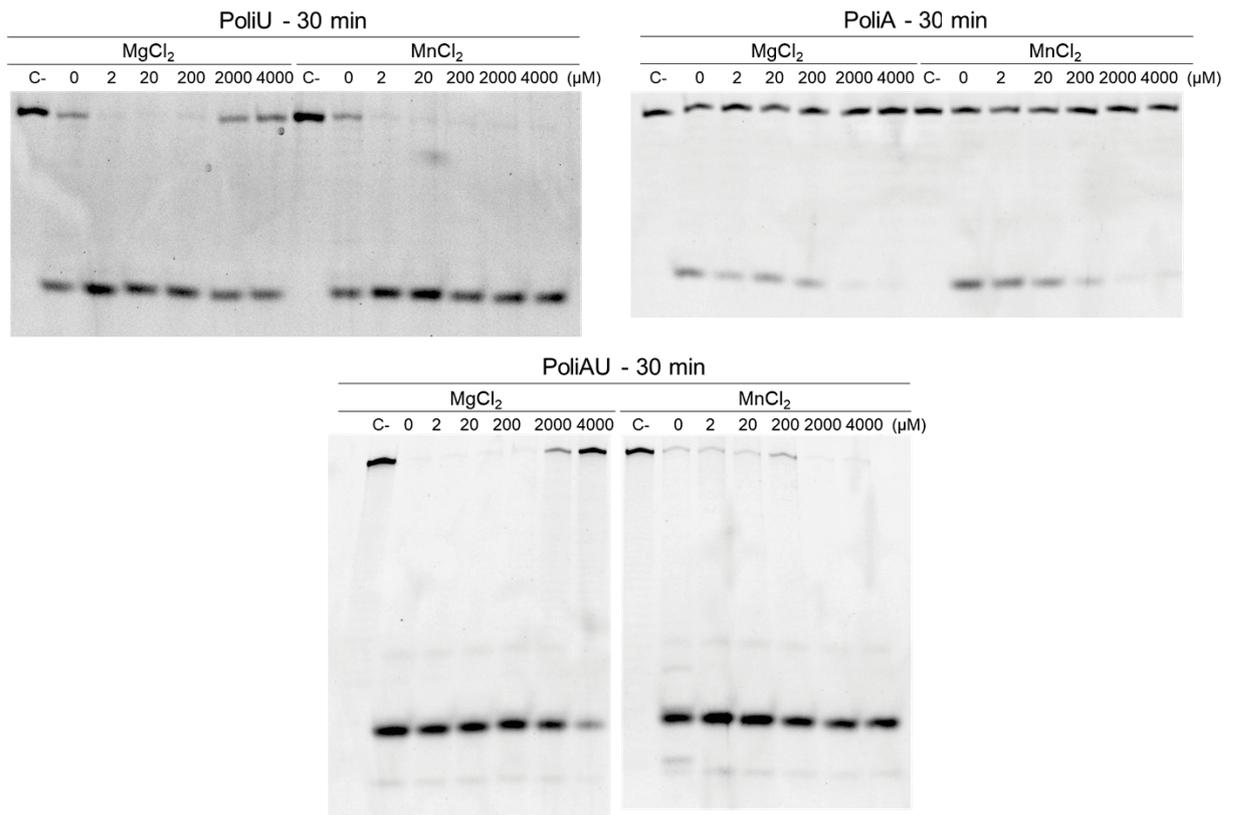


Figura 32 - Degradação *in vitro* de substratos de fita simples pela TbRRP44 analisado em gel desnaturante. Os ensaios de degradação foram feitos em diferentes concentrações de  $MgCl_2$  e  $MnCl_2$ , com tempo de incubação de 30 minutos. C- corresponde ao controle negativo, a mistura de reação na ausência de proteína. Figura gentilmente cedida por Heloisa Tramontin da Soler (da SOLER, 2022).

Uma vez que estes ensaios foram estabelecidos, foram feitos ensaios de degradação com os substratos de fita simples com as demais variantes da TbRRP44. Para facilitar a identificação e comparação dos resultados, passamos a chamar de TbRRP44<sup>WT</sup> a proteína correspondendo à sequência selvagem de aminoácidos. Nestes ensaios foram usadas as variantes TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44<sup>D511N</sup>, que apresentam mutações no sítio endo e exonucleolítico, respectivamente, além da variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN. Como não observamos diferença significativa entre os cofatores nos ensaios iniciais, nos ensaios realizados com as variantes utilizamos apenas o cofator magnésio, com exceção dos ensaios com a variante TbRRP44<sup>D511N</sup>, que possui o sítio endonucleolítico intacto, nos quais testamos também o  $MnCl_2$ , visto que estudos mostraram que a atividade do domínio PIN é dependente de íons  $Mn^{2+}$  (LEBRETON et al., 2008; SCHAEFFER et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009b). Para as variantes com a região exonucleolítica funcional (TbRRP44<sup>WT</sup>, TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN) as reações foram analisadas após 15 minutos, já para a variante TbRRP44<sup>D511N</sup> após 60 minutos. Esses tempos foram escolhidos a partir de testes

iniciais, já que permitiam uma melhor comparação entre os produtos de degradação dos substratos pelas diferentes variantes.

Apesar do maior tempo de incubação, a variante TbRRP44<sup>D511N</sup>, que não possui atividade exonucleolítica, não foi capaz de degradar os substratos de fita simples, tanto na presença de MgCl<sub>2</sub> quanto de MnCl<sub>2</sub> (figura 33), diferentemente do que foi observado para as proteínas homólogas de *S. cerevisiae* (LEBRETON et al., 2008; SCHAEFFER et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009b) e humana (TOMECKI et al., 2010), que apresentam atividade endonucleolítica em substratos de fita simples. No estudo de Schaeffer e colaboradores (2009), em que foi analisada uma construção contendo apenas o domínio PIN, também não foi observada atividade da proteína em tampão de reação contendo Tris-HCl e MgCl<sub>2</sub>, mas puderam constatar atividade substituindo o tampão por HEPES e MnCl<sub>2</sub>. A mestranda Heloisa T. da Soler realizou testes de atividade de TbRRP44<sup>D511N</sup> neste segundo tampão, mas também não foi possível observar degradação dos substratos em até 60 minutos de reação (da SOLER, 2022).

Já as variantes TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN degradaram os substratos poliU e poliAU (figura 33), porém de maneira menos eficiente, quando comparamos com os produtos gerados pela TbRRP44<sup>WT</sup>. Nota-se que a variante que não possui o domínio PIN (TbRRP44-ΔNPIN) é bem menos eficiente na degradação do poliAU, quando comparada com TbRRP44<sup>WT</sup> e TbRRP44<sup>D140N</sup>, isto pode indicar que o domínio PIN possui papel estrutural na associação com o substrato, contribuindo com a degradação exonucleolítica, principalmente em substratos mais longos, como é o caso do poliAU, que possui 49 nucleotídeos, sendo 15 adeninas e 34 uracilas.

Portanto, nossos resultados sugerem que para substratos de fita simples, a atividade catalítica de TbRRP44 é desempenhada preponderantemente pelo domínio exonucleolítico.

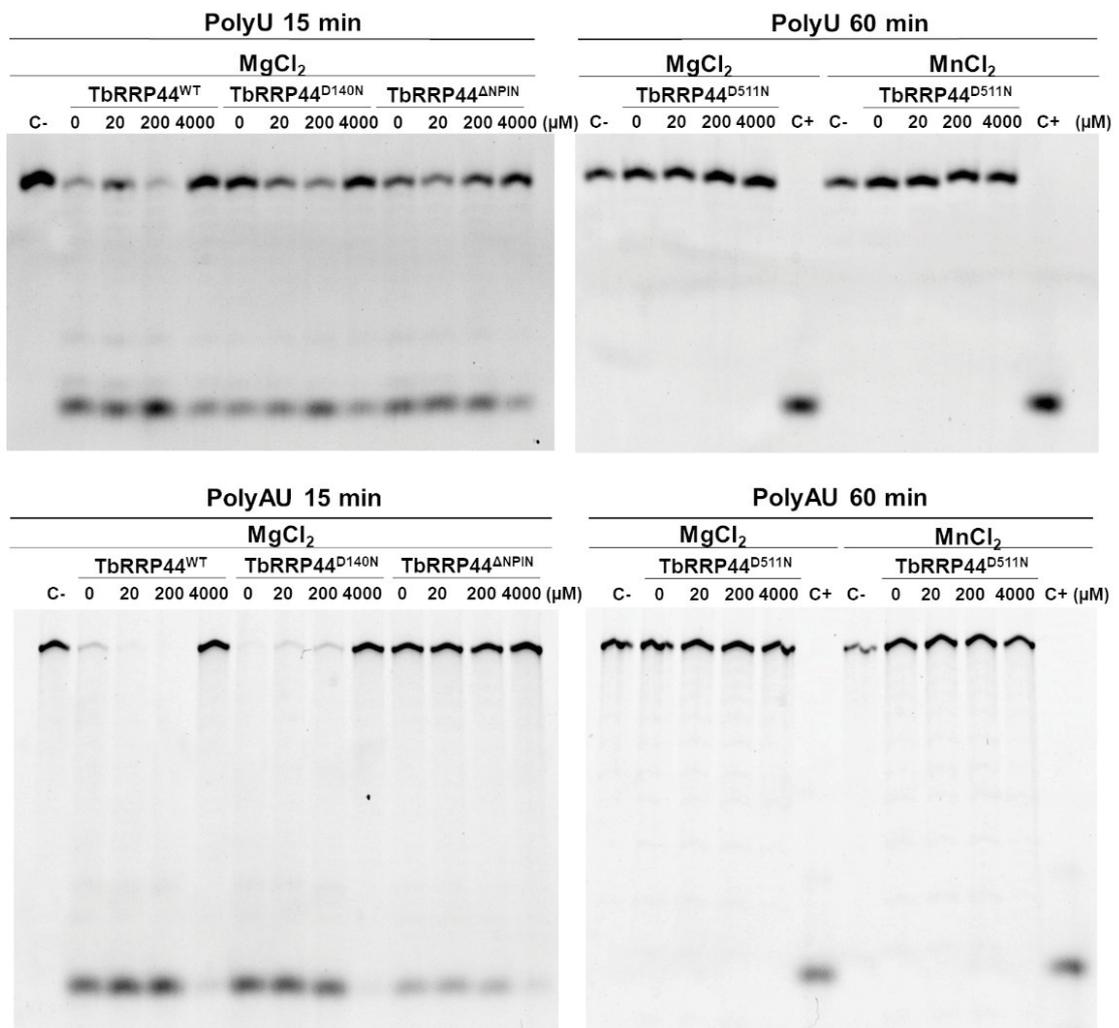


Figura 33 - Degradação *in vitro* de substratos de fita simples pela TbRRP44 e suas variantes, analisada em gel desnaturante. Nos painéis de cima são mostrados os ensaios com o substrato PoliU na presença de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> (indicadas no topo dos géis), enquanto nos painéis de baixo são mostrados os resultados para o substrato PoliAU também na presença de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub>. C- corresponde ao controle negativo, a mistura de reação na ausência do substrato, enquanto C+ indica o controle positivo, a mistura de reação em presença de TbRRP44<sup>WT</sup>.

A seguir foram realizados ensaios de degradação com oligonucleotídeos contendo estruturas do tipo *stem loops*, incluindo *tetra loops* do tipo GNRA. O substrato denominado GNRA0 não apresenta extensão de fita simples na extremidade 3', enquanto o GNRA18 possui uma extensão de fita simples de 18 nucleotídeos na extremidade 3' do *stem loop*. A variante TbRRP44<sup>D511N</sup>, que não possui atividade exonucleolítica, praticamente não apresenta atividade para nenhum dos substratos estruturados (figura 34).

TbRRP44<sup>WT</sup> e as variantes com atividade exonucleolítica, TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN, foram capazes de degradar o RNA estruturado, mesmo sem a presença de uma sequência de fita simples na extremidade 3' (figura 34). Tal resultado contrasta como o observado para a ScRrp44, que é ativa somente em substratos estruturados que possuem 4 ou 5 nucleotídeos livres na extremidade 3' (LORENTZEN et al., 2008) e para a RNase R cuja atividade depende da presença de pelo menos 2 nucleotídeos livres na extremidade 3' (VINCENT; DEUTSCHER, 2006).

Nota-se, pela formação de produto, que a TbRRP44<sup>WT</sup> é mais eficiente que as variantes TbRRP44<sup>D140N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN na degradação do substrato sem fita simples na extremidade 3', sugerindo que a presença do domínio PIN ativo contribui para a degradação deste tipo de substrato. A degradação deste substrato pode sugerir também que a TbRRP44 pode atuar como helicase, abrindo a estrutura de fita dupla do RNA. Estudos como o de Lee e colaboradores (2012) sugerem que o domínio RNB converte a energia química proveniente da hidrólise do RNA em energia mecânica, tornando possível, assim, a abertura de RNA de fita dupla.

Já o substrato GNRA com 18 nucleotídeos de fita simples no 3' é degradado mais rapidamente do que o substrato GNRA0 (figura 34). Assim como para os outros substratos, a proteína TbRRP44<sup>WT</sup> é mais eficiente que suas variantes, principalmente em relação à variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN, indicando que possa existir uma cooperação entre a função endo- e exonucleolítica para determinados substratos, como o caso de RNAs estruturados. Nestes ensaios também foi observado o aparecimento de bandas intermediárias. O intermediário predominante, identificado com um asterisco na figura 34, é 6 nucleotídeos mais curto que o substrato intacto, correspondendo ao substrato estruturado com 12 nucleotídeos de fita simples no 3'. O aparecimento dessas bandas nos substratos GNRA18 e não nos GNRA0 pode indicar que apesar da degradação do oligonucleotídeo GNRA0 ser mais lenta, uma vez que a estrutura tipo *stem-loop* é desfeita e a extremidade 3' esteja livre, a degradação ocorre em uma taxa contínua. No caso do GNRA18, o intermediário observado sugere uma redução significativa na taxa de degradação após a clivagem de 6 nucleotídeos, até que o *stem-loop* seja desfeito por um mecanismo de desenovelamento ou degradação endonucleolítica.

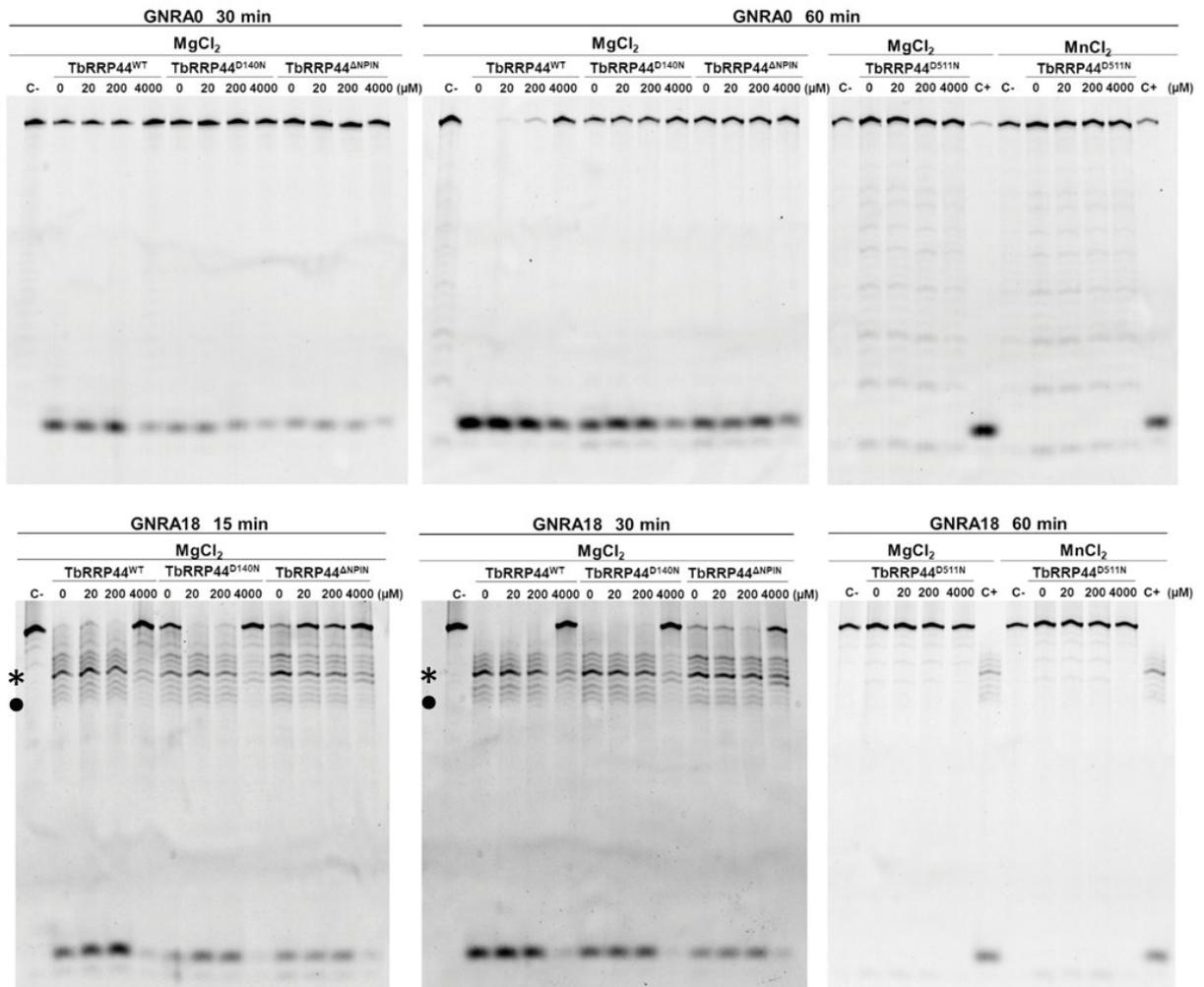


Figura 34 - Degradação *in vitro* de substratos estruturados pela TbRRP44 e suas variantes, analisada em gel desnaturante. Nos painéis de cima são mostrados os ensaios com o substrato GNRA0 na presença de diferentes concentrações de  $MgCl_2$  e  $MnCl_2$  (indicadas no topo dos géis), enquanto nos painéis de baixo são mostrados os resultados para o substrato GNRA18, também na presença de diferentes concentrações de  $MgCl_2$  e  $MnCl_2$ . O asterisco indica a banda intermediária mais forte, que é 6 nucleotídeos menor do que o GNRA18 intacto. Já o círculo preto indica a última banda intermediária visível, que corresponde ao substrato original menos 10 nucleotídeos. C- corresponde ao controle negativo, a mistura de reação na ausência do substrato, enquanto C+ indica o controle positivo, a mistura de reação em presença de TbRRP44<sup>WT</sup>.

#### 4.1.6 Análise da Interação Entre TbRRP44 e Diferentes Substratos

Os ensaios de degradação sugeriram que o domínio PIN pode apresentar uma função estrutural, sendo importante para interação com o substrato. Por isso investigamos, através de ensaios de desvio de mobilidade termoforética (EMSA) e termoforese em microescala (MST), a interação das variantes inativas TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> com substratos poliAU, poliU, GNRA18 e GNRA0.

#### 4.1.6.1 Análise da Interação por Ensaio de Desvio de Mobilidade Eletroforética

Os ensaios foram realizados utilizando duas concentrações de proteína, 0,2 e 2  $\mu\text{M}$  e 100 nM de substrato. Pudemos observar que para os substratos de fita simples, poliAU e poliU, principalmente na concentração proteica de 0,2  $\mu\text{M}$ , a interação do substrato ocorre de maneira relativamente mais fraca com a variante sem o domínio PIN (TbRRP44- $\Delta\text{NPIN}^{\text{D511N}}$ ) (figura 35). Para os substratos estruturados este efeito fica mais evidente, onde podemos ver que no caso do GNRA18, com 0,2  $\mu\text{M}$  de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> há o deslocamento completo do oligonucleotídeo, enquanto para TbRRP44- $\Delta\text{NPIN}^{\text{D511N}}$  ainda podemos observar a presença de substrato livre. Em relação ao substrato GNRA0, nota-se que nas condições de ensaio com 2  $\mu\text{M}$  de TbRRP44- $\Delta\text{NPIN}^{\text{D511N}}$  ainda há presença de substrato livre, enquanto para a TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> há o deslocamento completo da banda correspondente ao substrato. Tais resultados corroboram o papel do domínio PIN na interação de TbRRP44 com o substrato, principalmente no caso de RNAs estruturados.

Na figura 35, nas bandas localizadas na parte superior do gel, como dos substratos estruturados e do PoliAU, bandas estas correspondentes ao complexo proteína substrato, foram observados o aparecimento de duas bandas, sendo a mais baixa, que corresponde à interação entre uma unidade da proteína e uma unidade do substrato, e a mais alta correspondendo possivelmente à duas unidades de proteína e uma de substrato.

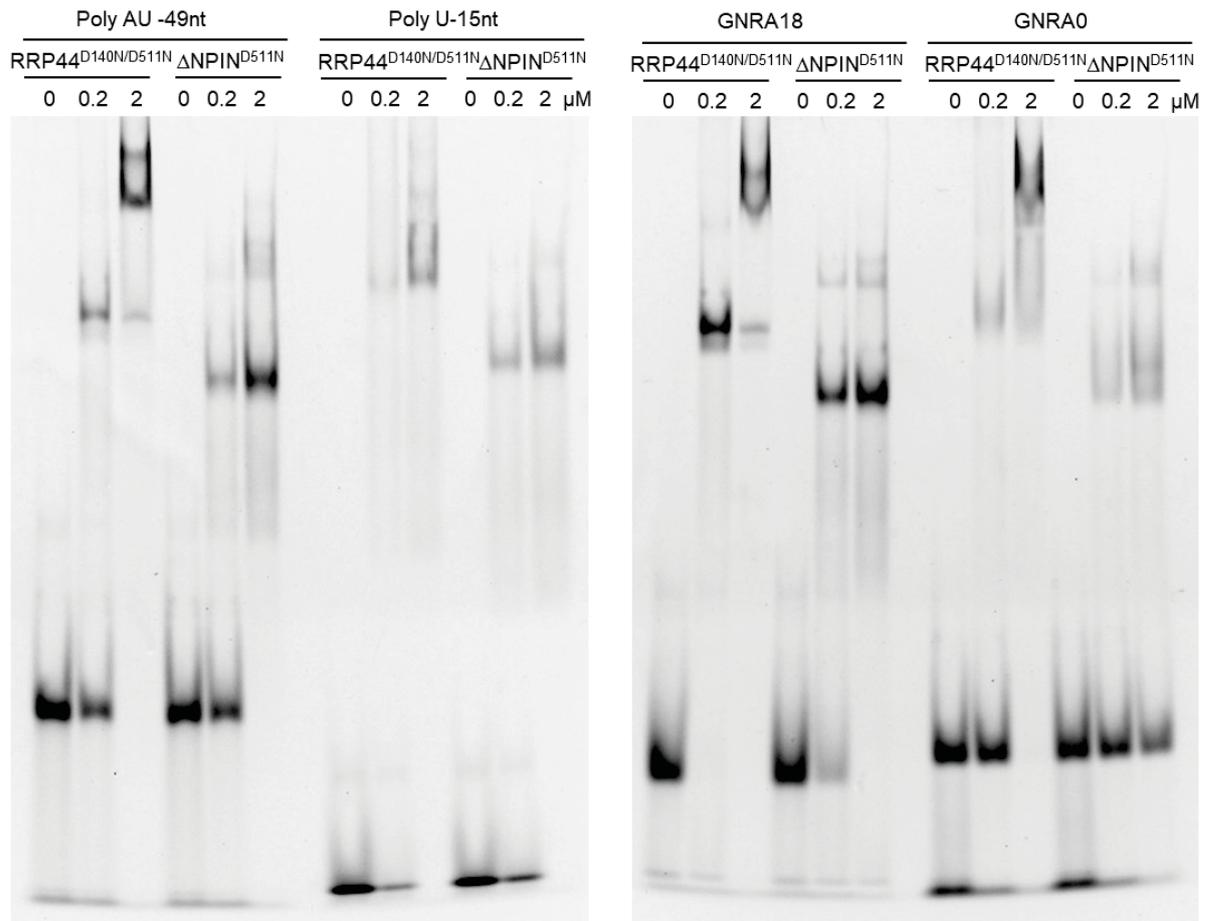


Figura 35 - Análise da interação entre TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> com diferentes substratos por EMSA. A identificação dos substratos, as proteínas utilizadas no ensaio e suas concentrações são mostradas no alto dos géis. Os substratos foram utilizados na concentração de 100 nM.

A fim de determinar as constantes de dissociação ( $K_d$ ) proteína-substrato, fizemos novos experimentos utilizando os substratos GNRA0 e GNRA18 e uma diluição seriada das proteínas. Os resultados obtidos com o substrato GNRA0 corroboram os resultados iniciais, mostrando que para este substrato a deleção do domínio PIN diminui significativamente a afinidade ao substrato (figura 36). O valor de  $K_d$  estimado para a TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> – GNRA0 foi de 458 nM, enquanto para a TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> foi de 7  $\mu$ M. Seria necessária a repetição dos experimentos bem como atingir a saturação da curva de interação com a variante TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> para a determinação acurada das constantes de dissociação.

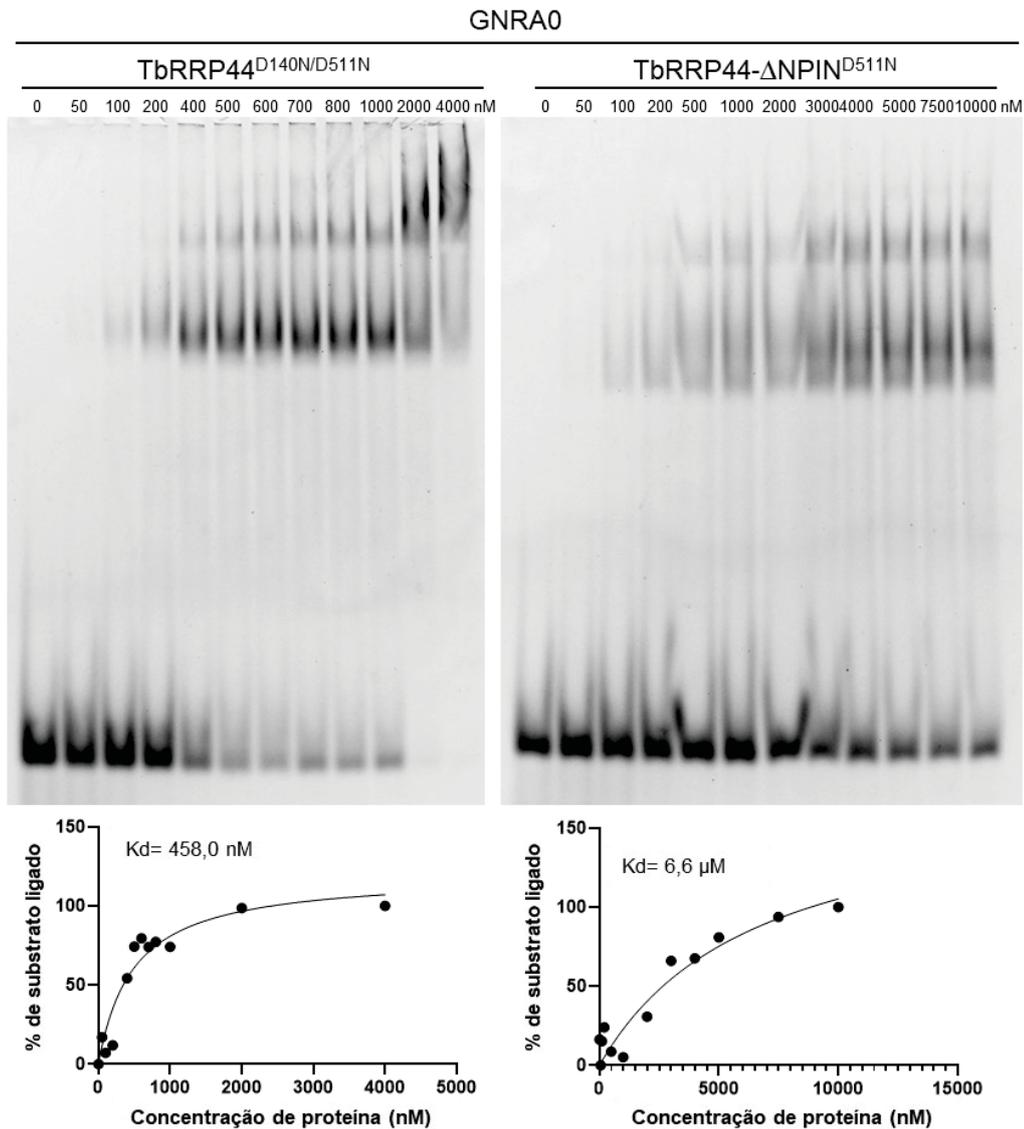


Figura 36 - Ensaio para a determinação dos coeficientes de dissociação entre as proteínas TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup> e o substrato GNRA0 através de EMSA. O substrato foi mantido a uma concentração constante de 100 nM. No alto dos géis são indicadas a concentração da proteína em cada mistura de reação. Na parte inferior mostra-se os gráficos da porcentagem de substrato ligado em função da concentração da proteína, bem como a constante de dissociação ( $K_d$ ) estimada. O valor de  $K_d$  foi calculado a partir dos valores da intensidade das bandas de substrato livre obtidos através do programa ImageJ e análise em função da concentração de proteína utilizando o programa Prisma.

A análise dos resultados dos ensaios da interação entre o substrato GNRA18 e as proteínas TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup>, revelam um comportamento semelhante em relação ao GNRA0, com a deleção do domínio PIN afetando a afinidade proteína-substrato. Entretanto, apesar de notável comparando-se a interação para uma mesma concentração de proteína (por exemplo 200 nM), este efeito é menos significativo do que para o substrato GNRA0 (figura 37).

A quantificação das bandas referentes ao substrato não permitiu a obtenção de uma curva satisfatória da porcentagem de substrato ligado em função da concentração de proteína, portanto, não foi possível estimar valores de  $K_d$  a partir destes ensaios. Observamos que os pontos correspondentes às menores concentrações de proteína não ficaram dispersos o suficiente, sendo necessário uma melhor distribuição das concentrações para a correta determinação dos valores das constantes de dissociação.

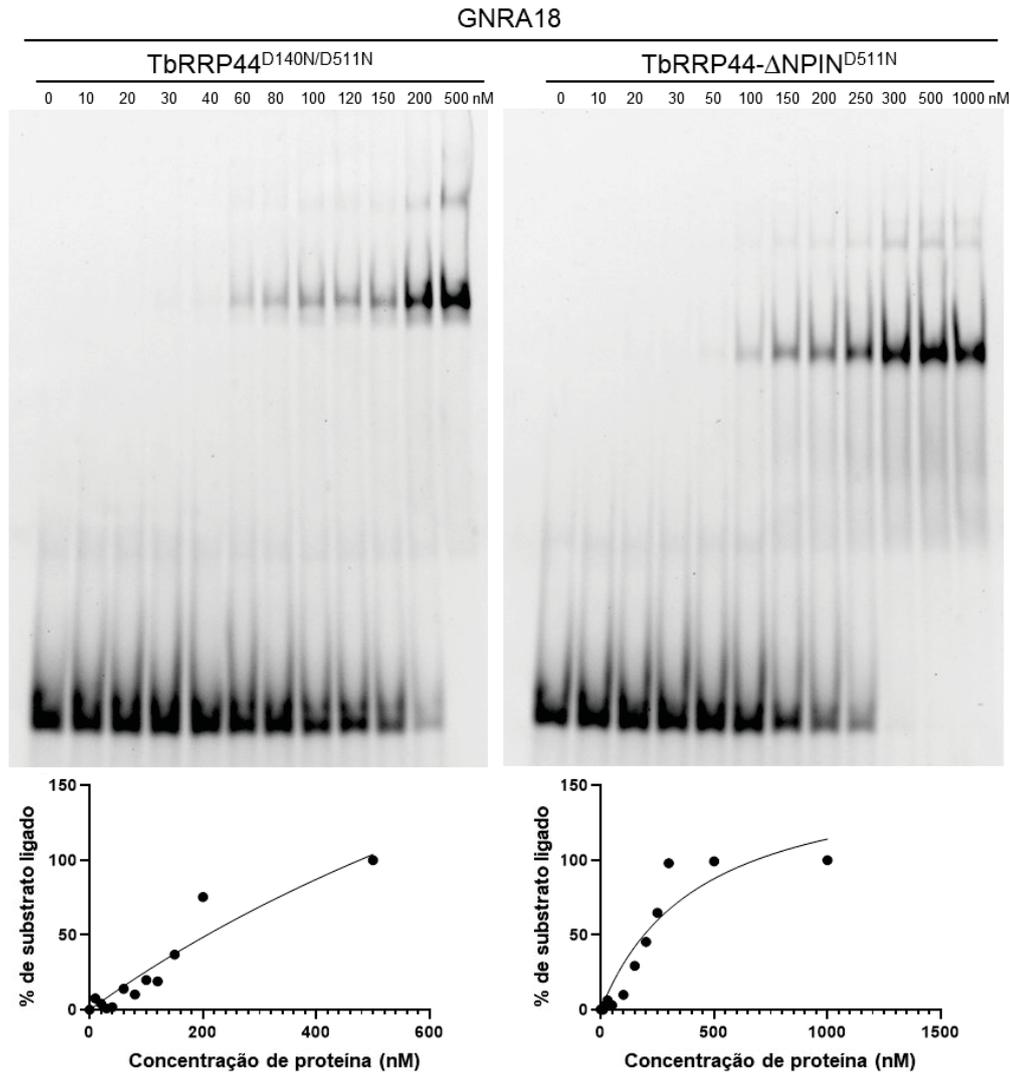


Figura 37 - Ensaio para a determinação dos coeficientes de dissociação entre as proteínas TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup> e o substrato GNRA18 através de EMSA. O substrato foi mantido a uma concentração constante de 100 nM. No alto dos géis são indicadas a concentração da proteína em cada mistura de reação. Na parte inferior mostra-se os gráficos da porcentagem de substrato ligado em função da concentração da proteína. Não foi possível estimar valores de  $K_d$  a partir destes ensaios.

#### 4.1.6.2 Análise da Interação por Termoforese em Microescala

Tendo em vista as dificuldades experimentais para a determinação das constantes de associação pela técnica de EMSA, utilizamos o método de termoforese em microescala visando a determinação destas constantes. A partir dos resultados obtidos nos ensaios de interação por EMSA determinamos como 20  $\mu\text{M}$  a concentração mais alta da proteína nos ensaios, esperando uma saturação da curva nesta concentração.

A variante TbRRP44- $\Delta\text{NPIN}^{\text{D511N}}$  apresenta maior afinidade pelo substrato GNRA18 quando comparado com GNRA0, com os valores de  $K_d$  de  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  e  $4 \pm 1 \mu\text{M}$ , respectivamente (figura 38). Os ensaios utilizando substratos não estruturados permitiram a determinação de uma constante de dissociação de  $0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$  entre TbRRP44- $\Delta\text{NPIN}^{\text{D511N}}$  e o substrato poliU (figura 38), valor semelhante ao obtido com o substrato GNRA18, que possui uma extensão de fita simples de 18 nucleotídeos na extremidade 3'. Não foi possível a obtenção do valor de  $K_d$  utilizando o substrato poliAU, devido a um efeito de aumento de fluorescência quando da titulação da proteína. Tal efeito compromete a utilização da técnica de termoforese em microescala para a determinação da constante de dissociação.

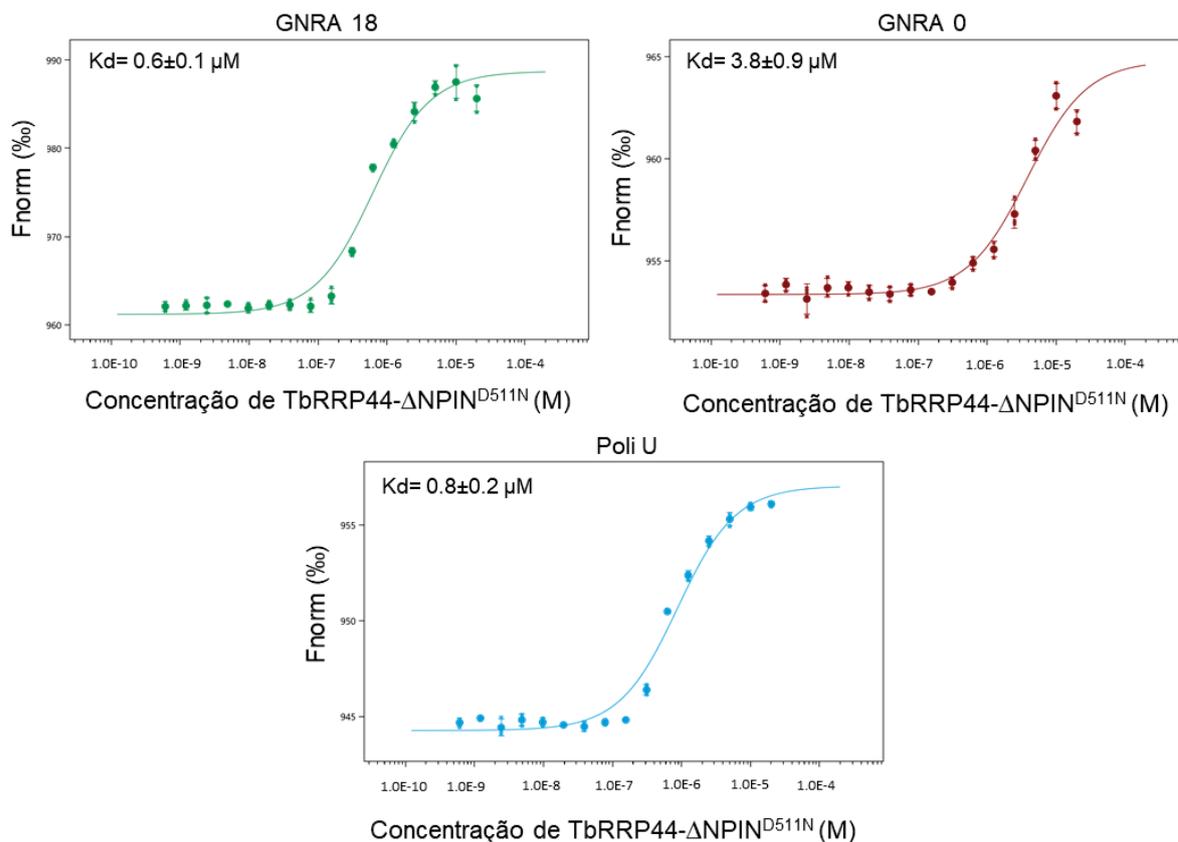


Figura 38 - Resultados dos ensaios de interação da variante TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup> com os substratos GNRA18, GNRA0 e PoliU por termoforese em microescala. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores das constantes de dissociação determinados para os diferentes substratos são mostrados nos respectivos painéis.

Os ensaios utilizando a variante TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> mostrou um resultado inesperado. A variação da mobilidade termoforética do substrato de RNA (utilizado como molécula “alvo” nos ensaios), medida pela variação da fluorescência, seguiu um comportamento ascendente, como esperado, a partir de determinada concentração da proteína, entretanto decaiu após certa concentração, ao invés de atingir uma saturação, seguindo um comportamento sigmoide (figura 39). Tal curva parece indicar uma interação proteína-substrato a partir de ~0,2 μM de proteína, entretanto, em concentrações de proteína superiores a ~0,6 μM a interação diminuiria até não mais ocorrer. Suspeitamos que, em concentrações mais elevadas, a proteína poderia formar oligômeros ou agregados que impediria a detecção de sua interação com o substrato de RNA por esta técnica. Tais resultados impediram as análises quantitativas da interação proteína-substrato com a variante TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup>.

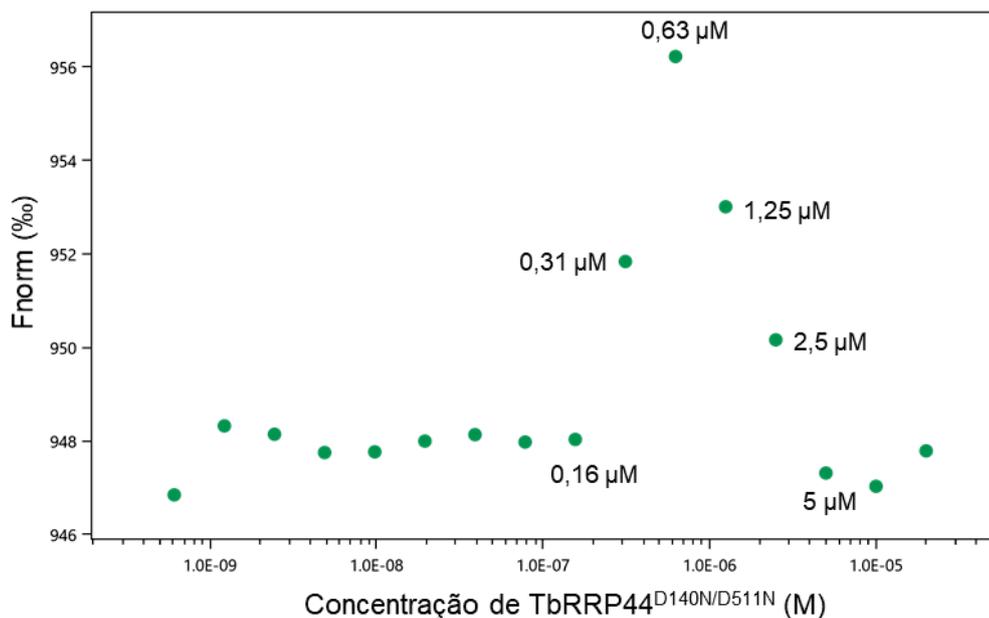


Figura 39 - Variação da mobilidade termoforética do substrato GNRA18 em função da concentração da proteína TbRRP44<sup>ΔNPIN/D511N</sup>. As concentrações indicadas no gráfico indicam provável interação com o substrato a partir de ~0,2  $\mu$ M e perda de interação acima de 0,6  $\mu$ M, concentração a partir da qual a formação de oligômeros/agregados proteicos impediria a detecção da interação proteína-substrato.

A fim de investigar a formação de oligômeros/agregados em função da concentração de proteína, TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> foram submetidas a ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os experimentos foram realizados com as proteínas nas concentrações 3, 5 e 10  $\mu$ M e mostraram que TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> apresenta populações com maior raio hidrodinâmico enquanto TbRRP44- $\Delta$ NPIN<sup>D511N</sup> aparece monodispersa (figura 40).

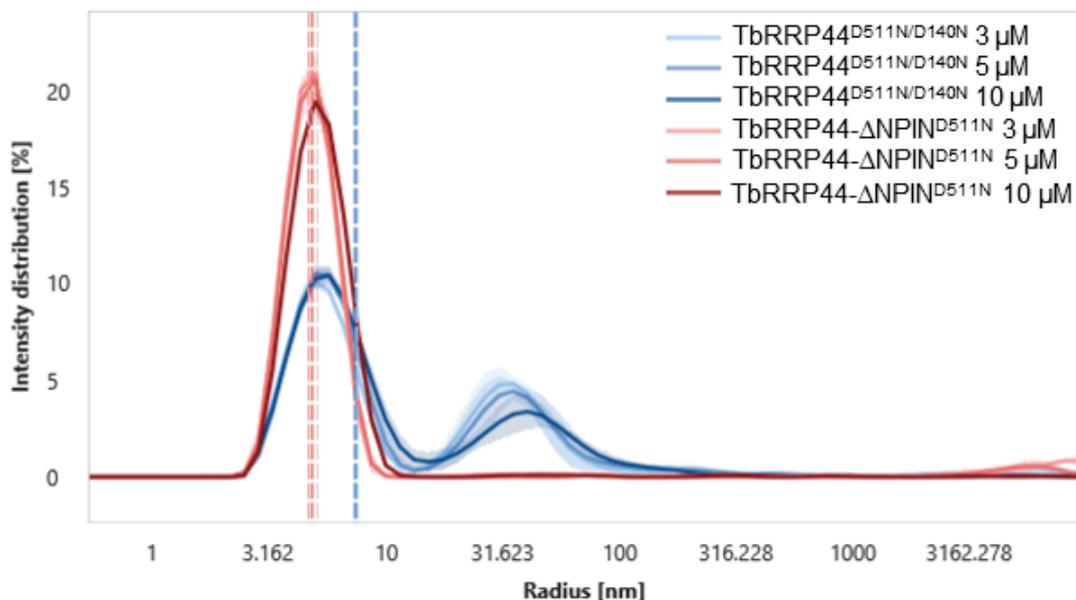


Figura 40 - Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) das proteínas TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> e TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup>. As curvas correspondentes à proteína TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> são representadas em azul, enquanto em vermelho é representada TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup>. Quanto mais escuro o tom da cor, mais concentrada a proteína. Os resultados indicam populações de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> com raios correspondentes a grandes agregados (>30 nm).

Os resultados apresentados na figura 40 não indicaram uma mudança de comportamento significativo com a diluição da proteína, assim, analisamos o perfil do DLS de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> de uma fração eluída da cromatografia de exclusão por tamanho, antes da concentração até 20 μM para os ensaios de termoforese. Tal amostra apresentava uma concentração de 4 μM e foi comparada com a amostra a 3 μM obtida a partir da diluição da proteína inicialmente concentrada e utilizada nos experimentos de termoforese (figura 41). Podemos observar que a população de raio em torno de 30 nm é quase inexistente antes da concentração, passando a ser significativa após a concentração da proteína. Essas análises indicam ainda que a variante TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> é mais propensa à agregação do que o mutante de deleção TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup>. Uma vez que para atingirmos a saturação da curva de ligação em função da concentração da proteína necessitamos realizar a diluição seriada a partir de uma concentração inicial elevada, os experimentos não puderam ser realizados nas condições inicialmente planejadas.

Finalmente, analisamos a proteína TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> após adição de Tween20 e glicerol no tampão (figura 42). Os resultados indicaram que a presença de glicerol promove maior agregação da proteína enquanto o Tween20 favorece a população de menor raio hidrodinâmico. A partir destes resultados repetimos os

ensaios de termoforese em microescala, após adição de 0.05% (v/v) Tween20 no tampão da proteína e no tampão de ensaio. Entretanto, observamos o mesmo comportamento anterior, mostrado na figura 39, o que inviabilizou a continuação dos ensaios.

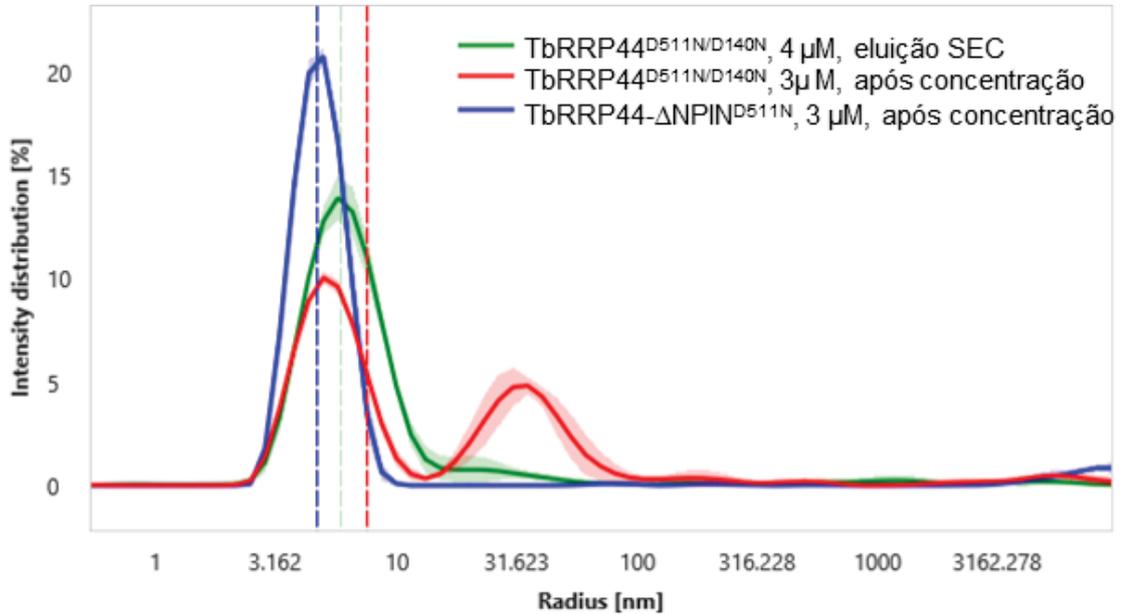


Figura 41 - Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) da proteína TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> antes e depois da concentração e comparação com TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup>. A linha verde refere-se a uma amostra eluída da cromatografia de exclusão por tamanho. Em vermelho é mostrado o perfil da amostra previamente concentrada para os experimentos de termoforese e posteriormente diluída para 3 μM. A linha azul corresponde à proteína TbRRP44-ΔNPIN<sup>D511N</sup> previamente concentrada para os experimentos de termoforese, e posteriormente diluída para 3 μM. Os resultados indicam que o processo de concentração de TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> induz o aparecimento de agregados proteicos e que tais agregados não são desfeitos após diluição da proteína.

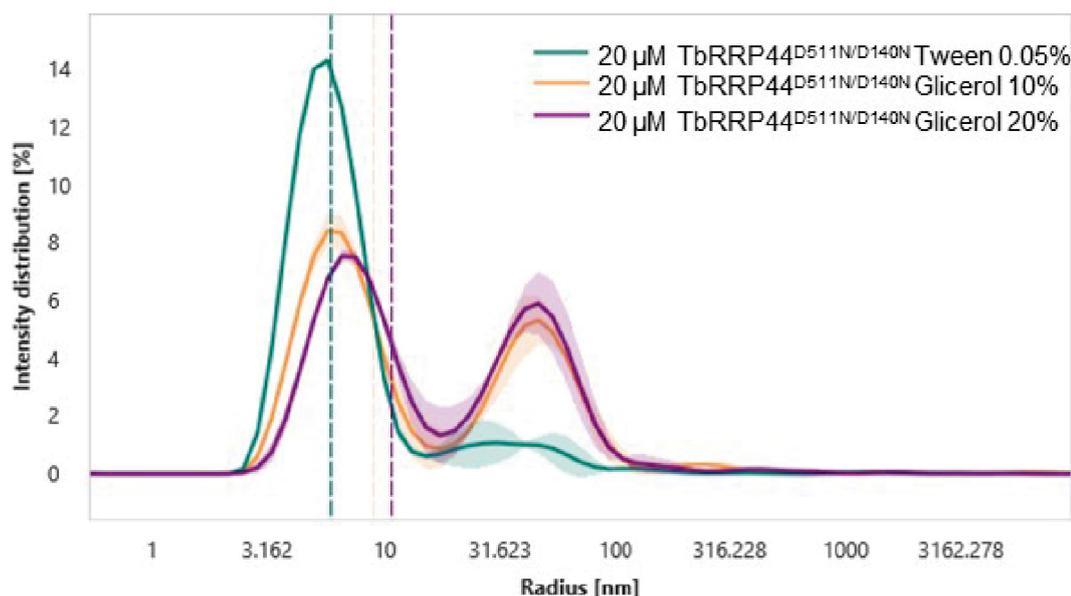


Figura 42 - Análise por DLS da proteína TbRRP44<sup>D140N/D511N</sup> em tampão contendo aditivos. A linha verde mostra o perfil da proteína na presença de 0.05% (v/v) de Tween 20, já as linhas amarela e roxa mostram o perfil da proteína em tampão contendo 10 e 20% de glicerol, respectivamente.

#### 4.2 ANÁLISE POR CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE DA PRESENÇA DE TbRRP44 EM COMPLEXOS

A fim de investigarmos a associação de TbRRP44 a complexos proteicos, realizamos experimentos de co-imunoprecipitação a partir da expressão, em células de *T. brucei*, de TbRRP44 recombinante em fusão com HA (hemaglutinina).

Após a preparação do extrato celular realizamos uma etapa de cromatografia de exclusão por tamanho visando uma pré-purificação das frações contendo a proteína de interesse, bem como a separação das frações em que a mesma se apresentasse na forma monomérica (figura 43, A). As frações contendo TbRRP44-HA foram identificadas através de Western blot utilizando-se anticorpo anti-HA (figura 43, B). A proteína TbRRP44 recombinante, purificada previamente a partir de extrato bacteriano, foi utilizada como “marcador” da forma monomérica (figura 43, C), já que seu volume de eluição já havia sido caracterizado anteriormente (CESARO, 2018). TbRRP44-HA foi majoritariamente eluída nas frações 25 a 28, correspondentes à forma monomérica. Entretanto, TbRRP44-HA foi também identificada nas frações 16 a 21 (figura 43, B e C). Diferentemente do trabalho de Estévez e colaboradores (2001), que em experimentos de gradiente de glicerol e Western blot, identificaram a

TbRRP44 apenas na forma monomérica, nossos resultados mostram uma fração da proteína eluída em volume maiores, o que pode indicar sua participação em complexos.

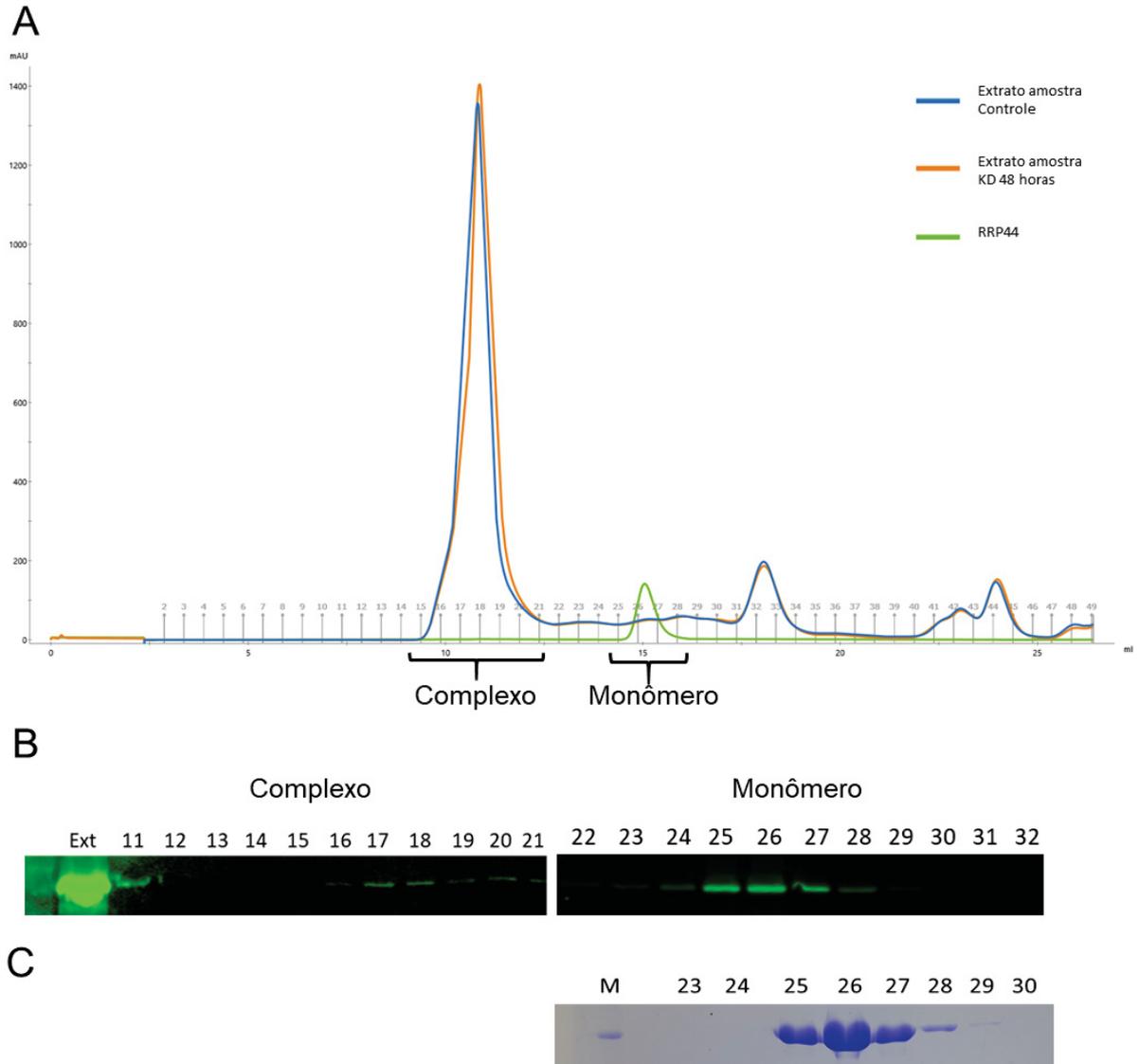


Figura 43 - Fracionamento do extrato de *T. brucei* após indução de TbRRP44-HA por cromatografia de exclusão por tamanho e análise por Western blot. A: Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho, sendo o eixo "y" a absorbância a 280 nm e o eixo "x" o volume em mL e em cinza a identificação das frações coletadas. A linha azul corresponde à cromatografia do extrato das células controle (sem indução do RNAi e expressão de TbRRP44-HA), enquanto a laranja corresponde à amostra das células *knockdown* com 48 horas de indução do RNAi e expressão de TbRRP44-HA. A linha verde representa a cromatografia da TbRRP44 recombinante purificada a partir de extrato bacteriano. B: Western blot utilizando anticorpo anti-HA das frações da cromatografia da amostra das células induzidas. C: SDS-PAGE da cromatografia da TbRRP44 purificada a partir de extrato bacteriano. Frações 25 a 27 mostram a correspondência com a proteína monomérica eluída a partir do extrato de *T. brucei*.

O experimento de co-imunoprecipitação utilizando resina com anticorpo anti-HA foi realizado a partir das frações 16 a 21 eluídas da cromatografia. As frações

correspondentes às lavagens e eluição foram analisadas por SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata. Como mostrado na figura 44, foi observado que a cada lavagem (L) as microesferas ficavam mais limpas, removendo as proteínas que ligaram inespecificamente. Nas amostras eluídas da imunoprecipitação observamos a presença de bandas na amostra das células *knockdown*, que expressam a TbRRP44-HA, que não estão presentes na amostra controle, amostra sem expressão da TbRRP44-HA (painel em destaque da figura 44).

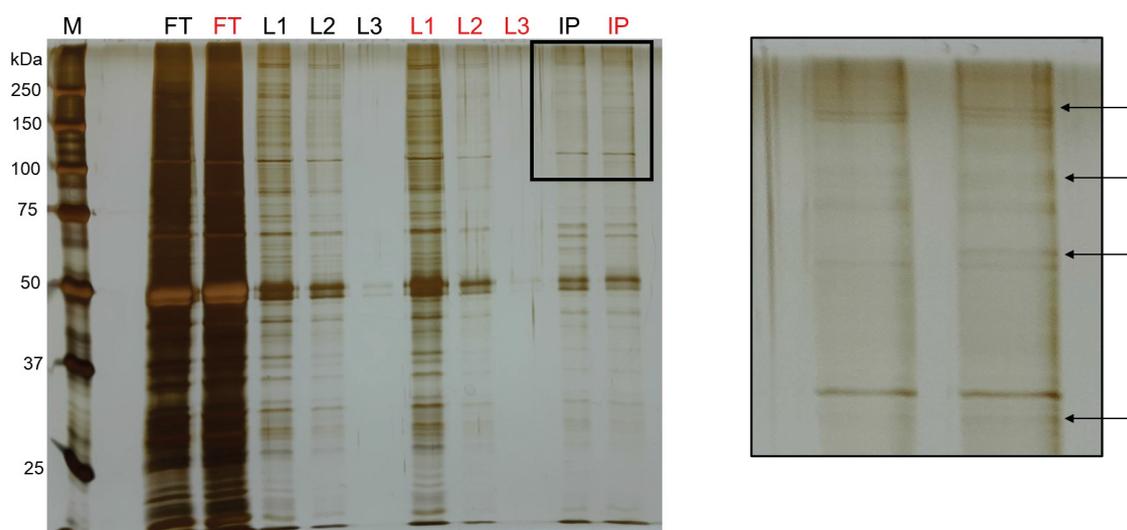


Figura 44 - Análise dos resultados da co-imunoprecipitação por SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata. Em preto são identificadas as amostras controle (células sem a indução do RNAi e expressão de TbRRP44-HA), enquanto em vermelho as amostras das células com indução da TbRRP44-HA. FT: flowthrough (amostras que não se ligaram nas microesferas); L: lavagem, sendo cada número correspondente ao número de lavagens; IP: amostras contendo as proteínas eluídas das microesferas pelo peptídeo competidor. M corresponde ao marcador de peso molecular. No quadro em destaque as setas indicam as bandas identificadas na amostra das células que expressam TbRRP44 fusionada a HA, mas que não foram observadas na amostra controle.

Após análise por SDS-PAGE, não foi possível observar nenhuma banda mais intensa que pudesse ser a proteína TbRRP44-HA, usada como isca. Mesmo assim, as amostras provenientes da imunoprecipitação, tanto o controle quanto amostra das células *knockdown*, foram analisadas por espectrometria de massas. No entanto, novamente não foi possível identificar a própria proteína TbRRP44 e consequentemente os resultados foram inconclusivos.

Diante destes resultados realizamos novo experimento procurando otimizar as etapas de lavagem e eluição, aumentando a quantidade de resina e diminuindo a concentração de detergente (CHAPS) nos tampões. As frações eluídas da cromatografia de exclusão por tamanho, correspondentes à fração monomérica foram

também utilizadas como controle do experimento de imunoprecipitação. A análise por Western Blot revelou que a proteína TbRRP44-HA proveniente das frações da cromatografia correspondendo à população de mais alto peso molecular está presente no *flowthrough*, ou seja, não está se ligando a resina com anticorpo anti-HA acoplado (figura 45, A), enquanto a proteína vinda das frações correspondentes ao monômero interage com a resina e é eluída pelo peptídeo competidor, apesar de sua presença em menor quantidade também no *flowthrough* (figura 45, B).

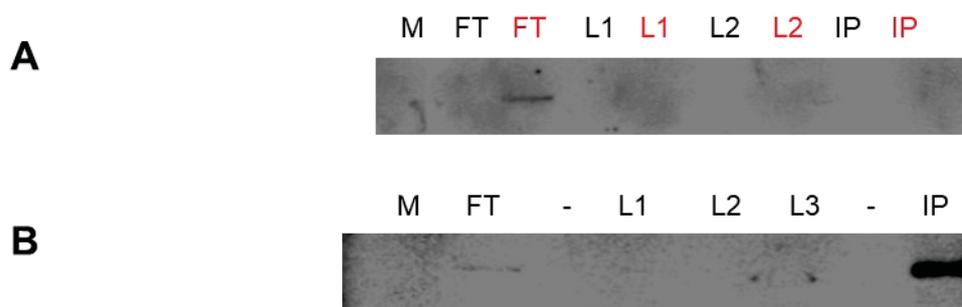


Figura 45 - Análise, por Western blot, dos resultados da imunoprecipitação após fracionamento, por cromatografia de exclusão por tamanho, do extrato de *T.brucei* após indução de TbRRP44-HA. A: Western blot, utilizando anticorpo anti-HA, da imunoprecipitação a partir das frações da purificação que correspondem a populações de alto peso molecular. Em preto são identificadas as amostras controle, enquanto em vermelho as amostras das células com indução da expressão de TbRRP44-HA. B: Western blot, usando anticorpo anti-HA, da imunoprecipitação a partir das frações da purificação que correspondem à proteína em sua forma monomérica. FT: flowthrough (amostras que não se ligaram nas microesferas); L: lavagem, sendo cada número correspondente ao número de lavagens; IP: amostras contendo as proteínas eluídas das microesferas pelo peptídeo competidor; M corresponde ao marcador de peso molecular.

A ausência de interação da TbRRP44-HA proveniente das frações da cromatografia correspondentes a populações de alto peso molecular, com o anti-HA acoplado à resina, pode ser em decorrência do ocultamento da fusão HA, localizada no C-terminal da proteína, pela interação com outras proteínas ou até mesmo pela formação de agregados da própria TbRRP44.

As bandas observadas na amostra das células *knockdown*, não presentes nas células controle, mostradas na figura 66, podem estar relacionadas a alterações na expressão gênica devido à indução do RNAi e à expressão da TbRRP44 exógena, mesmo não tratando-se de proteínas diretamente relacionadas com esta última.

Como tentativa de promover a interação de TbRRP44-HA com a resina, poderia se avaliar a modificação da fusão do C-terminal para o N-terminal e ou o uso de outras etiquetas. Tais modificações não impedem, entretanto, que se incorra no mesmo problema de oclusão da fusão devido à formação de complexos.

### 4.3 ANÁLISES FENOTÍPICAS DAS CÉLULAS *KNOCKDOWN* DE TbRRP44

#### 4.3.1 Análise por Northern Blot de Intermediários do Processamento do rRNA

Durante o trabalho de mestrado foram feitos ensaios iniciais através de qPCR para analisar os intermediários de rRNA acumulados em decorrência da depleção da TbRRP44. Nestes ensaios observamos o acúmulo do primeiro precursor da subunidade maior, bem como de todos os intermediários subsequentes da LSU, indicando que a TbRRP44 pode atuar em uma etapa inicial do processamento e sua depleção bloqueia as etapas seguintes (CESARO, 2018).

A fim de identificarmos esses intermediários, foram feitas análises por Northern blot utilizando oligonucleotídeos que anelam em regiões específicas do pré-rRNA (figura 46). Nos primeiros ensaios, foram analisadas células com 0 a 96 horas de indução do RNAi, utilizando sondas para identificação do 5.8S, junção 5.8S-ITS2 e ITS3 (figura 47).



Figura 46 - Esquema das sondas utilizadas para análise de precursores do rRNA de *Trypanosoma brucei*. A identificação verde ao lado do nome das sondas indica que possuem cromóforos IRDye 700 e as vermelhas IRDye 800. Fonte: cedida por Eloise Pavão Guerra Slompo.

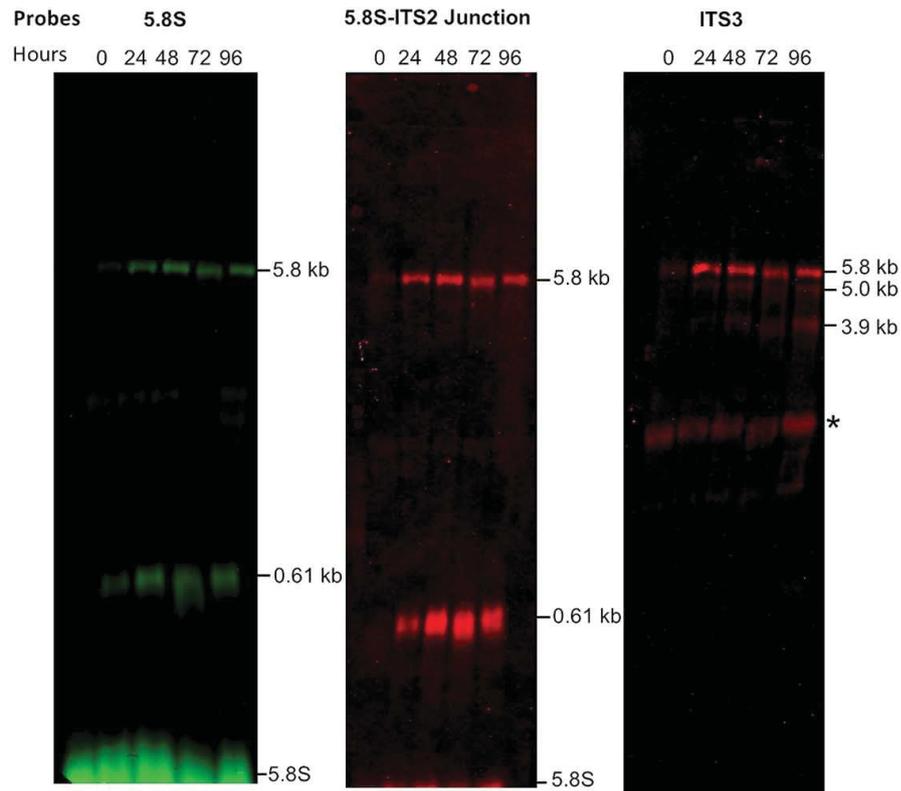


Figura 47 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA em células *knockdown* para TbRRP44 com indução do RNAi até 96 horas, através de sondas complementares ao 5.8S (esquerda), junção 5.8S- ITS2 (centro) e ITS3 (direita). A banda indicada por um asterisco, observada na hibridização com a sonda ITS3, pode corresponder à detecção do LSU $\alpha$ , já que a sonda apresenta complementariedade de 11 nucleotídeos com esta região. O asterisco indica a forma madura de um dos rRNA que foi marcada inespecificamente.

Através da utilização das sondas para identificação do rRNA 5.8S e a junção 5.8S-ITS2 foi observado um acúmulo de uma molécula com tamanho compatível com 0,61 kb, que corresponde ao precursor 7S do rRNA 5.8S. O acúmulo deste intermediário não processado quando da ausência de RRP44 já havia sido mostrado por Estevez e colaboradores (2001). Nossos resultados mostram também o aparecimento de bandas de tamanho compatível com 5,8 kb, correspondente ao precursor completo do pre-rRNA que contém os rRNAs da subunidade maior, além do acúmulo de mais dois precursores de tamanho compatível com 5 kb e 3,9 kb, que corresponderiam ao precursor da LSU excluindo o fragmento de 0,61 kb que contém o rRNA 5.8S e ITS2 e ao precursor com apenas com o LSU $\alpha$ , S1 e LSU $\beta$ , respectivamente (figura 47). Tais resultados serão detalhados a seguir.

Em uma segunda rodada das análises, repetimos os experimentos utilizando as sondas anteriores além da inclusão de uma sonda para detecção de intermediários

contendo a ITS7. As análises por Northern blot foram realizadas utilizando-se o RNA extraído de células controle e *knockdown* com indução do RNAi por 72 horas.

Como mostrado na figura 48, através das sondas 5.8S e junção 5.8S-ITS2 foi possível identificar a molécula precursora da subunidade maior do ribossomo (5,8 kb), o precursor 7S (0,61 kb) e o rRNA 5.8S, como nos primeiros experimentos. Foram identificadas ainda duas bandas fracas adicionais, uma logo abaixo do 5,8 kb, que pode compreender a região entre o 5.8S e o LSU $\beta$  e outra logo acima do 18S, que pode compreender o rRNA 5.8S, a ITS2 e o LSU $\alpha$ , com tamanho de 2,7 kb.

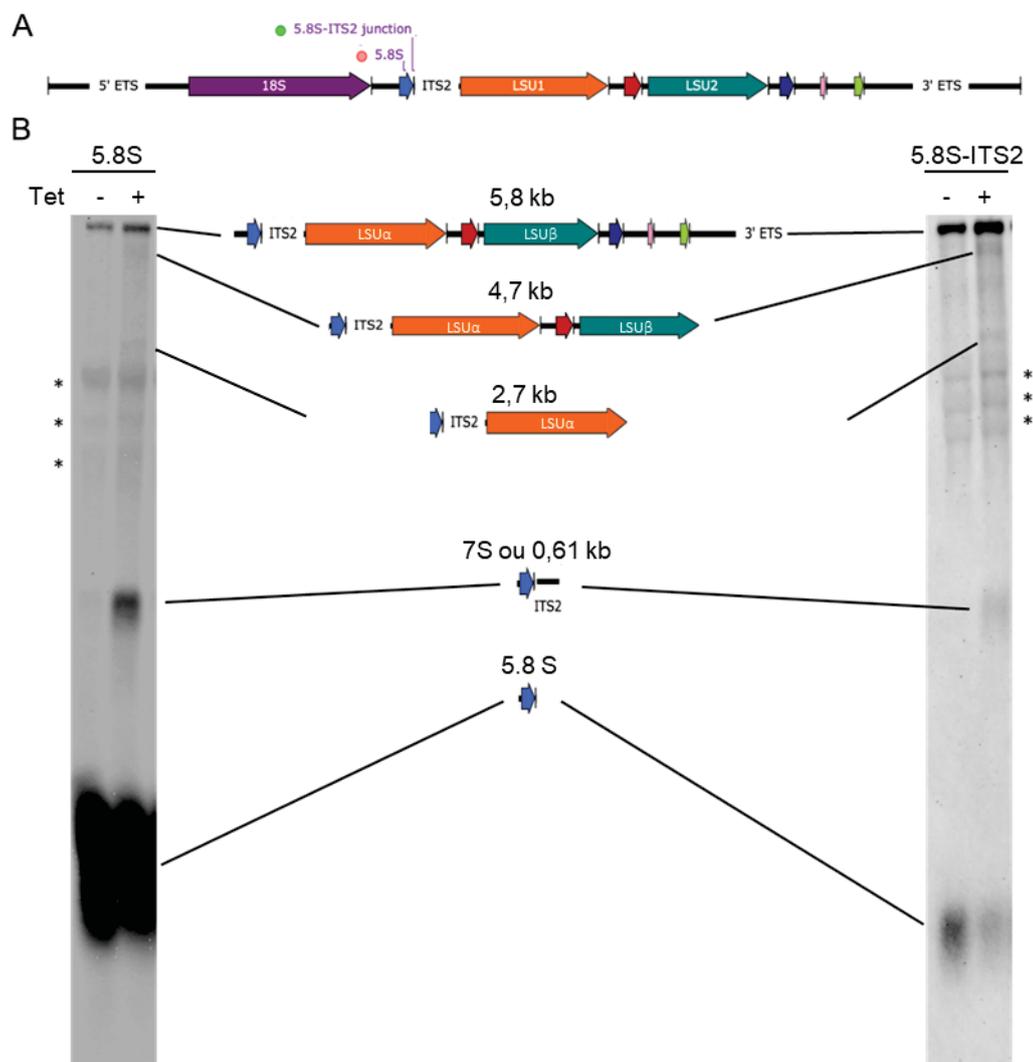


Figura 48 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA através de sondas complementares ao 5.8S e junção 5.8S-ITS2. A: Representação do precursor do rRNA de *T. brucei* com a marcação da posição das sondas utilizadas. B: Resultado da revelação da sonda 5.8S (esquerda) e junção 5.8S-ITS2 (direita). Tet- e Tet+ correspondem às células controle e *knockdown*, respectivamente. No centro da figura são mostrados esquemas dos possíveis intermediários acumulados nas células *knockdown* para TbRRP44. Os asteriscos indicam as formas maduras dos rRNA 18S, LSU $\alpha$  e LSU $\beta$ , que são marcadas inespecificamente.

Na figura 49, observa-se que, assim como nos experimentos iniciais, a sonda ITS3 permitiu a identificação do precursor inicial de 5,8 kb e um intermediário de cerca de 5,1 kb que compreende um fragmento da extremidade 5' do LSU $\alpha$  até a região 3'ETS. A banda de 5,1 kb é gerada em paralelo com o precursor de 0,61 kb através da clivagem precursor de 5,8 kb na ITS2.

Também foi identificado um intermediário de 3,9 kb compreendendo o LSU $\alpha$ , ITS3, SR1, ITS4 e LSU $\beta$ . Também foi observada uma banda logo abaixo do 18S que pode corresponder ao LSU $\alpha$  com parte da ITS3 ou uma região entre a ITS3 e o LSU $\beta$ . Já a sonda ITS7 mostrou o aparecimento da banda correspondente ao precursor inicial de 5,8 kb (identificada por todas as sondas) e a banda de 5,1 kb, também vista com a sonda ITS3. Observou-se ainda uma banda abaixo de 5,1 kb que pode corresponder a uma região entre parte da ITS3 e o ITS7 de aproximadamente 3,3 kb, também vista na sonda ITS3. Esta banda de 3,3 kb é gerada pela clivagem do precursor de 5,8 kb na ITS3, que em paralelo gera a banda de 2,7 kb detectada fracamente pelas sondas 5.8S e 5.8S-ITS Junction. Outra banda foi observada de tamanho menor que o LSU $\beta$ , com aproximadamente 1 kb, a qual acredita-se ser a região que compreende a partir da sr4 até a 3'ETS (figura 49). Este intermediário de aproximadamente 1 kb é gerado pela clivagem dos precursores de 5,8 e 5,1 kb na ITS6, a qual gera em paralelo, respectivamente, os precursores de 4,7 e 3,9 kb. Em alguns casos, observamos a presença de bandas tanto no controle quanto nas células *knockdown*, porém a intensidade das bandas das células *knockdown* é maior em relação ao controle.

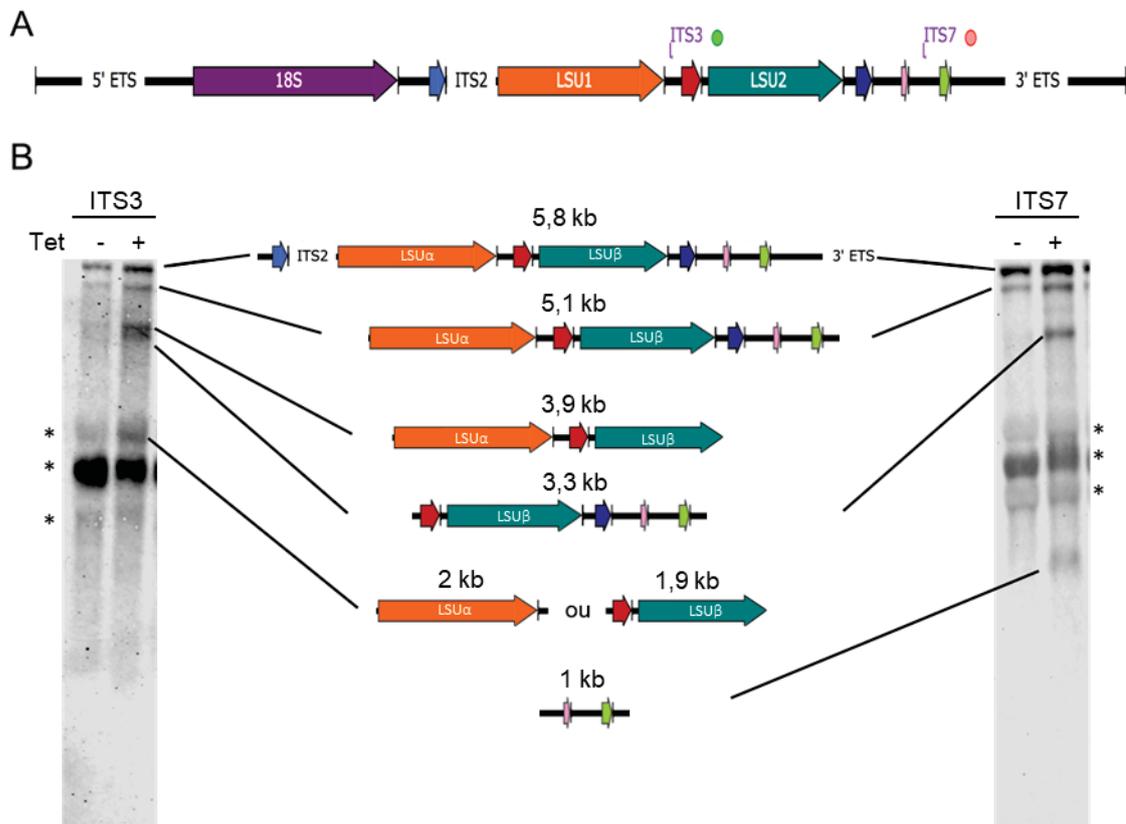


Figura 49 - Análise por Northern blot do processamento do rRNA através de sondas complementares à ITS3 e à ITS7. A: Representação do precursor do rRNA de *T. brucei* com a marcação da posição das sondas utilizadas. B: Resultado da revelação da sonda ITS3 (esquerda) e ITS7 (direita). Tet- e Tet+ correspondem às amostras das células controle e *knockdown*, respectivamente. No centro da figura são mostrados esquemas dos possíveis intermediários acumulados nas células *knockdown* para TbRRP44. Os asteriscos indicam as formas maduras dos rRNA 18S, LSU $\alpha$  e LSU $\beta$ , que são marcadas inespecificamente.

A ausência da TbRRP44 causa acúmulo dos intermediários de rRNA oriundos das etapas de processamento para a formação da subunidade maior do ribossomo. Nossos experimentos mostram um intermediário, de 2,7 kb, identificado por essas mesmas sondas, contendo o 5.8S, ITS2 e LSU $\alpha$ , que não ocorre de forma natural, pois a clivagem na ITS2 precede a clivagem na ITS3. Este intermediário também foi observado em outros dois trabalhos de Jensen e colaboradores (2003; 2005), com as proteínas NOG1 e NOPP44/46 de *T. brucei*, que quando ausentes nas células causavam defeitos no processamento dos rRNAs correspondentes a subunidade maior, assim como ocorre na ausência da TbRRP44.

Através das sondas ITS3 e ITS7 se observou um intermediário de 3,3 kb que também foi descrito nos trabalhos de Jensen e colaboradores (2005) e Barth e colaboradores (2008), em que foram estudadas as proteínas NOPP44/46 e NOP1, respectivamente. A proteína NOPP44/46 parece atuar como uma proteína mediadora

na formação do 60S, recrutando outras proteínas, enquanto a NOP1 é uma proteína que interage diretamente com o *box C/D* snoRNAs (RNAs pequenos nucleolares contendo domínios C/D), esses snoRNAs muitas vezes conduzem a clivagens específicas em RNAs. A ausência dessas proteínas também causa defeitos no processamento dos rRNAs da subunidade maior.

Apesar de a proteína Rrp44 nunca ter sido identificada na atuação de processamento de snoRNAs, ela pode atuar neste tipo de processamento neste organismo. Caso isso ocorra, os intermediários observados podem ter acumulado em decorrência de um efeito secundário, neste caso o não processamento de um snoRNA específico que esteja envolvido em alguma das etapas de maturação.

Os resultados indicam que a ausência da TbRRP44 causa bloqueio de grande parte das etapas de maturação da LSU (figura 50). O acúmulo do precursor de 5,8 kb, sugere que a depleção de TbRRP44 tem um impacto na clivagem endonucleolítica na ITS2, o que poderia indicar um papel direto ou indireto nesta clivagem. Estudos realizados como *S. cerevisiae*, mostram que esta clivagem é catalisada pela proteína Las1 (GASSE; FLEMMING; HURT, 2015), que apresenta homólogo em *T. brucei*, porém sua função não foi caracterizada em tripanossomatídeos. A presença de um possível precursor de 2,7 kb encontrado pelas sondas do 5.8S e junção 5.8-ITS2, compreendendo o rRNA 5.8S, ITS2 e LSU $\alpha$ , fortalece a hipótese de que a depleção de TbRRP44 tem impacto na clivagem endonucleolítica da ITS2, já que a ITS2 permanece intacta neste precursor. O acúmulo do intermediário de 1 kb, contendo os dois últimos rRNAs (SR4 e SR6), ITS6 e ITS7, sugere que a ausência de TbRRP44 possa estar bloqueando alguma etapa do processamento também nestas ITSs, o que impede a maturação correta desses rRNAs pequenos.

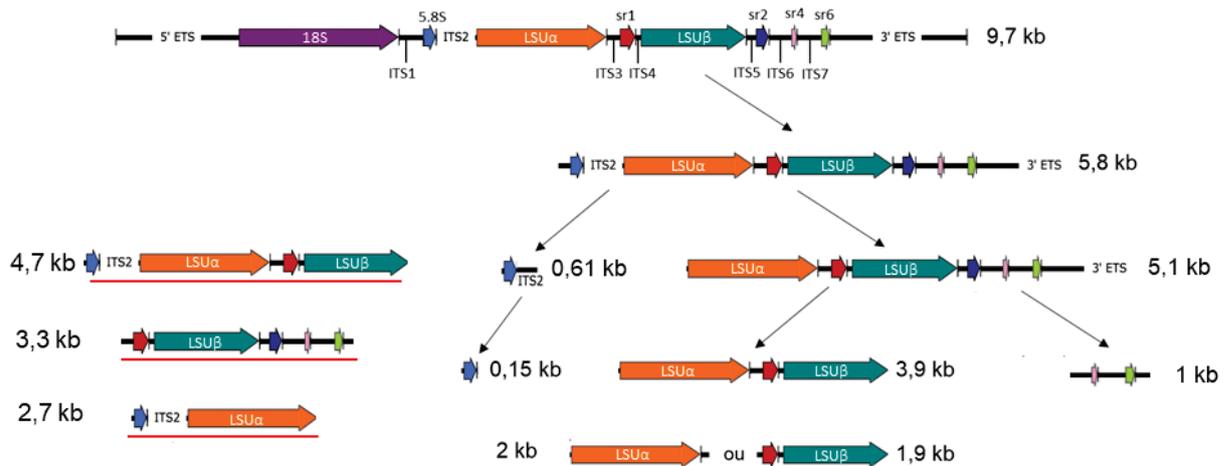


Figura 50 - Esquema do precursor do RNA ribossomal de *T. brucei* mostrando os intermediários acumulados em decorrência da depleção da TbRRP44. Os intermediários sublinhados em vermelho foram identificados em decorrência da depleção da TbRRP44.

Foram observadas algumas marcações inespecíficas das sondas nos rRNAs maduros 18S, LUS1 e LSU $\beta$ , provavelmente devido a sua alta abundância em relação à quantidade dos precursores intermediários, além do fato de algumas sondas, como é o caso da sonda ITS3, apresentar um pequeno segmento de complementaridade com a sequência do o LSU $\alpha$ .

Uma caracterização aprofundada do papel de TbRRP44 na maturação do rRNA em *T. brucei* foi realizada pela pós-doutoranda Eloise Pavão Guerra-Slomp, colaboradora neste projeto (comentários no capítulo de considerações finais).

#### 4.3.2 Análise Celular por Tomografia de Raios X Moles

##### 4.3.2.1 Análise da Reconstrução e Segmentação das Imagens Obtidas por Tomografia de Raios X Moles

Para as análises celulares por tomografia de raios X moles foram preparados 4 *grids* de células controle, sendo adquiridas 15 tomografias. Para as células knockdown foram preparados 8 e 4 *grids* de células com 48 e 72 horas de indução, respectivamente, a partir dos quais foram adquiridas 20 e 16 tomografias. Após a coleta, as projeções foram alinhadas e as tomografias foram reconstruídas com sucesso, tanto pelo programa Etomo ou TomoJ. Porém, devido a um problema de fragilidade e manuseio dos grids, observamos que aqueles preparados contendo as células *knockdown* com 48 horas de indução ficaram curvos e por esse motivo, após

a reconstrução das imagens, houve uma necessidade de correção em ângulo. Isso resultou em que as nanopartículas de ouro ficassem em evidência na frente das imagens, atrapalhando a visualização, por isso, para as células deficientes em TbRRP44 optamos por mostrar somente os resultados das células *knockdown* com 72 horas de indução.

Após a reconstrução das tomografias, nos *slices* de volume, já foi possível observar diferenças entre as células *knockdown* e controle, como o aparecimento de grandes vacúolos de baixa absorção que ocupam grande parte do volume do citoplasma das células *knockdown* (figura 51). Também observamos uma deformação nos núcleos das células *knockdown* que não apresentam um formato arredondado com nas células controle (figura 51).

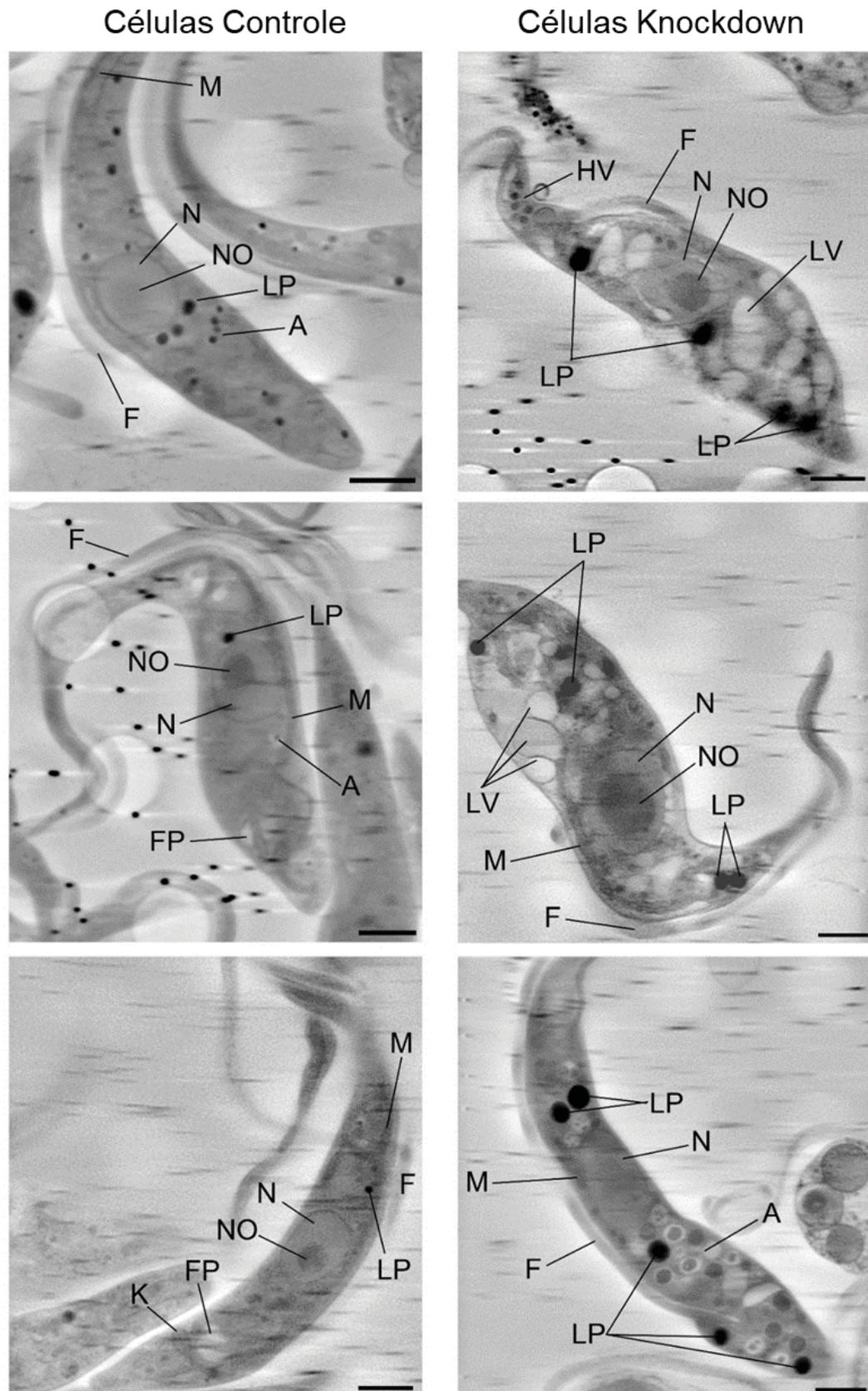


Figura 51 - *Slices* de volume das tomografias de raios X. À esquerda imagens de células controle, e à direita células *knockdown* após 72 horas de indução do RNAi. N: Núcleo; NO: Nucléolo; FP: Bolsa flagelar; F: Flagelo; LP: Gotas lipídicas; HV, Vacúolos de alta absorção; A: Acidocalcisomos; LV: Vacúolos de baixa absorção; M: Mitocôndria. Escala (barra no canto inferior direito): 1,5  $\mu\text{m}$ .

Apesar do relativo baixo contraste das *slices* individuais, além do aparecimento dos vacúolos de baixa absorção, também se observou que algumas das células *knockdown* apresentam diferenças na bolsa flagelar, como a diminuição de seu tamanho e deformações em sua estrutura (figura 52), isto pode ter acontecido devido ao fato de que o lisossomos, organelas que dão origem aos vacúolos de baixa absorção, estão altamente relacionados com a bolsa flagelar e como as células *knockdown* estão repletas desses vacúolos, a bolsa flagelar diminuiu de tamanho e sofreu deformações. A bolsa flagelar deve ter uma estrutura arredondada, como pode ser observada no controle (FIELD; CARRINGTON, 2009).

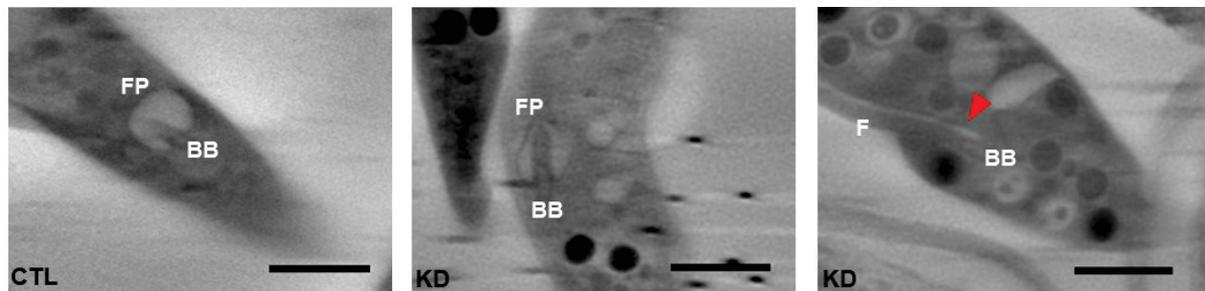


Figura 52 - Diferenças observadas na bolsa flagelar. CTL indica células controle e KD células *knockdown*. F indica o Flagelo, FP a bolsa flagelar e BB o corpo basal. A seta em vermelho indica a bolsa flagelar pequena. Escala: 1,5  $\mu\text{m}$ .

A segmentação das células permitiu mostrar com mais clareza os resultados observados nos *slices* de volume, como a aparecimento dos vacúolos de baixa absorção e como eles ocupam grande volume no citoplasma. A figura 52, nas imagens mais à direita, evidencia um vacúolo de baixa absorção ocupando mais da metade do volume da célula. Também se notou, através da análise de diferentes células, o progresso da formação desses vacúolos. Nas imagens centrais da figura 53 observamos um estágio mais inicial na formação dos vacúolos, enquanto nas imagens da direita observamos o fenótipo mais avançado.



#### 4.3.2.2 Identificação dos Acidocalcissomos

Acidocalcissomos são organelas ricas em cálcio e poli-fosfatos com função de manter a homeostase na célula (MIRANDA et al., 2005). A linha MISTRAL do síncrotron ALBA permite, para determinados elementos químicos, a análise da estrutura na proximidade da borda absorção dos raios-X (XANES, do inglês *X-Ray Absorption Near Edge Structure*). Com isso foi possível identificar tanto a presença global de cálcio nas células como as vesículas que contém cálcio. Para isso, inicialmente, foi realizada uma coleta de dados com varredura do comprimento de onda em torno dos picos de absorção do cálcio. Foram detectados dois picos de absorção que correspondem aos sub-níveis de energia L3 (351 eV) e L2 (354,5 eV), da camada L de absorção (figura 54, A).

A partir da sobreposição das imagens obtidas na borda de absorção do cálcio (351 eV) e abaixo da borda de absorção (348 eV) e subtração das intensidades, foi possível identificar as regiões ricas em cálcio (figura 54, B). Notou-se que os acidocalcissomos estão em maior quantidade e tamanho nas células deficientes em TbRRP44 quando comparado ao controle.

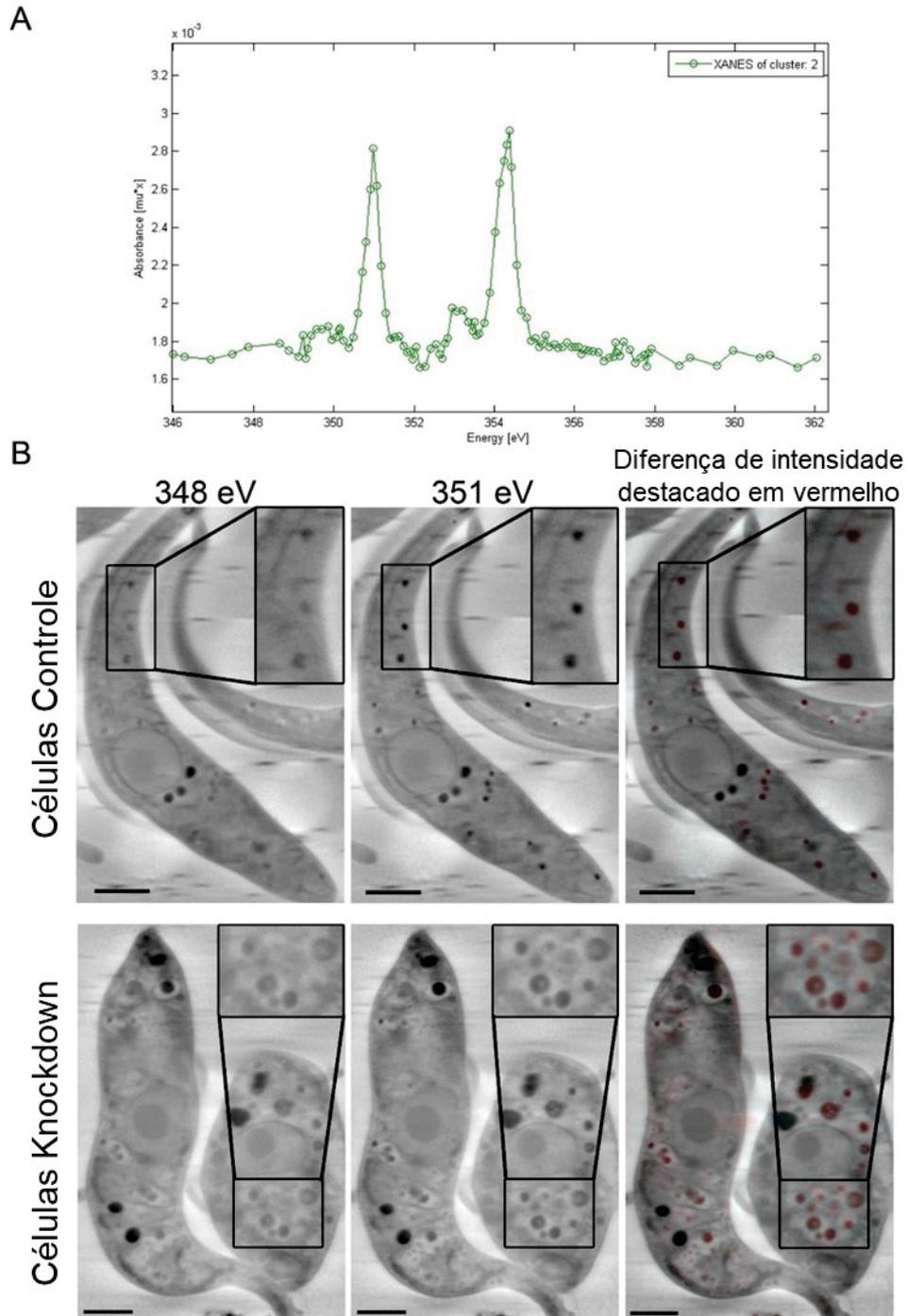


Figura 54 – Identificação de acidocalcissomos por espectromicroscopia. A: Espectro de estrutura na proximidade da borda absorção dos raios-X (XANES, do inglês *X-ray absorption near edge structure*) do cálcio, mostrando os picos a 351 eV e 354,5 eV. B: Na primeira coluna estão as imagens coletadas abaixo da borda de absorção do cálcio (348 eV), na segunda as coletadas na borda de absorção do cálcio (351 eV) e na terceira coluna a diferença de intensidades é destacada em vermelho, sobreposta à imagem em 348 eV. A localização das partículas ricas em cálcio são assim identificadas. Escala 1,5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.3 Análise do Volume de Acidocalcissomos e Gotas Lipídicas

Com o objetivo de aprofundarmos a análise das diferenças entre as células controle e as células deficientes em TbRRP44, após a reconstrução das imagens tridimensionais, foram analisados os volumes de duas organelas específicas, os acidocalcissomos e as gotas lipídicas, as quais sofreram alterações nas células com depleção da TbRRP44. Nas análises dos *slices* de volume, foi observado que os acidocalcissomos das células *knockdown* estavam aumentados em relação ao controle (figura 55). Após a segmentação das organelas nas imagens 3D, foram calculados os volumes dos acidocalcissomos. As células controle apresentam um volume médio dos acidocalcissomos de  $0,013 \mu\text{m}^3$ , enquanto as células deficientes em TbRRP44 a média é de  $0,063 \mu\text{m}^3$  (figura 55). As células controle tem em média 17 acidocalcissomos por célula, já as células *knockdown* apresentam 26 em média (figura 55). Os dados mostrados na figura 55 foram obtidos a partir da análise de apenas 3 células de cada grupo, número considerado baixo para uma análise estatística mais aprofundada, mas indicam claramente que tanto o número como o tamanho dos acidocalcissomos está aumentado nas células deficientes em TbRRP44.

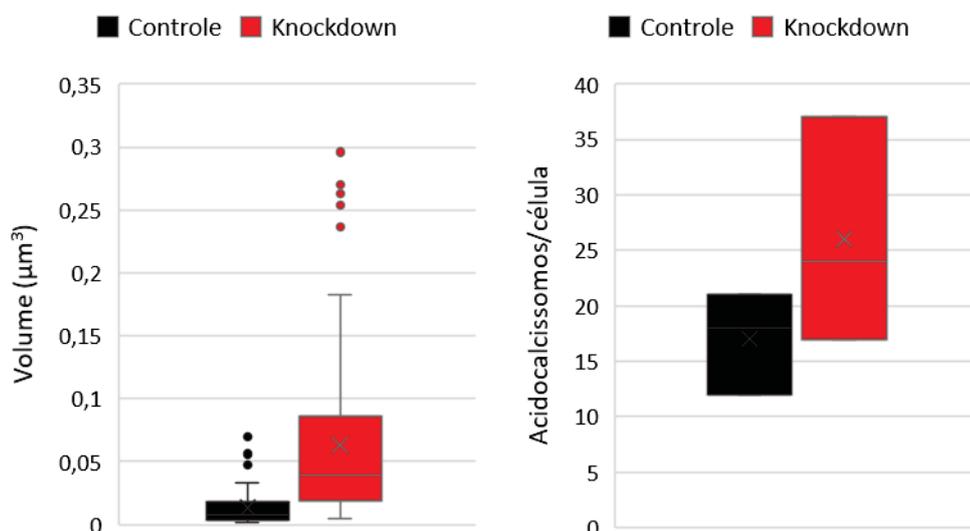


Figura 55 - Análise dos volumes e número dos acidocalcissomos nas células controle e deficientes em TbRRP44 (*knockdown*).

Gotas lipídicas são vesículas constituídas de lipídios neutros, cuja função é de reserva energética (OLZMANN; CARVALHO, 2018). O volume médio das gotas

lipídicas nas células controle é de aproximadamente  $0,058 \mu\text{m}^3$ , enquanto para as células deficientes em TbRRP44 é de  $0,11 \mu\text{m}^3$  (figura 56). Também foi analisado o número de gotas lipídicas por célula, sendo que nas células controle foram observados em média 3 gotas lipídicas, enquanto as células *knockdown* apresentaram aproximadamente 6 gotas por célula (figura 56). Tal análise foi realizada a partir de 10 células de cada grupo. Esta quantificação mostra que, assim com os acidocalcissomos, as gotas lipídicas estão aumentadas em número e tamanho nas células deficientes em TbRRP44.

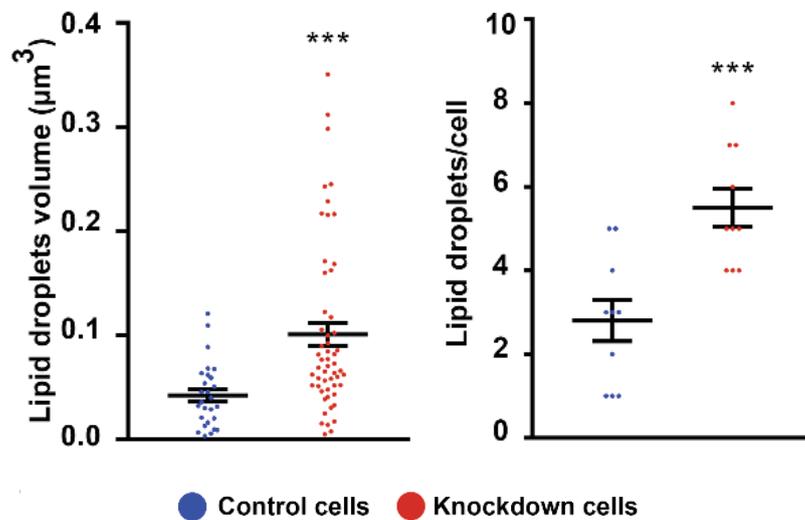


Figura 56 - Análise do número de gotas lipídicas por célula (direita) e seus volumes (esquerda).

#### 4.3.2.4 Análise do Coeficiente de Absorção Linear

A partir das imagens reconstruídas através do programa TomoJ foram calculados os valores do coeficiente de absorção linear (LAC). Notamos que as células *knockdown* apresentavam um coeficiente de absorção maior das organelas do que nas células controle. Porém durante o preparo das amostras para a coleta dos dados foi necessário fixar as células com paraformaldeído (PFA), pois por um lado as células de *T. brucei* selvagem apresentam grande mobilidade, não aderindo aos *grids* e, por outro, e as células deficientes em TbRRP44 apresentavam grande fragilidade, ficando totalmente deformadas quando depositadas nos *grids* sem fixação, fatos que dificultaram em muito a preparação dos *grids* para as tomografias. Ao compararmos os valores de LAC com o de amostras inicialmente coletadas sem PFA notamos uma

grande discrepância entre os valores (figura 57), confirmando que o tratamento com PFA leva a um aumento artificial da absorbância. Desta forma não podemos realizar uma comparação quantitativa dos coeficientes de absorção calculados para as células controle e *knockdown*. Apesar desta limitação, o tratamento com PFA foi essencial para a aquisição de dados com qualidade suficiente para reconstrução das imagens 3D e identificação de diferenças morfológicas e estruturais causadas pela deficiência na proteína TbRRP44, como apresentado anteriormente.

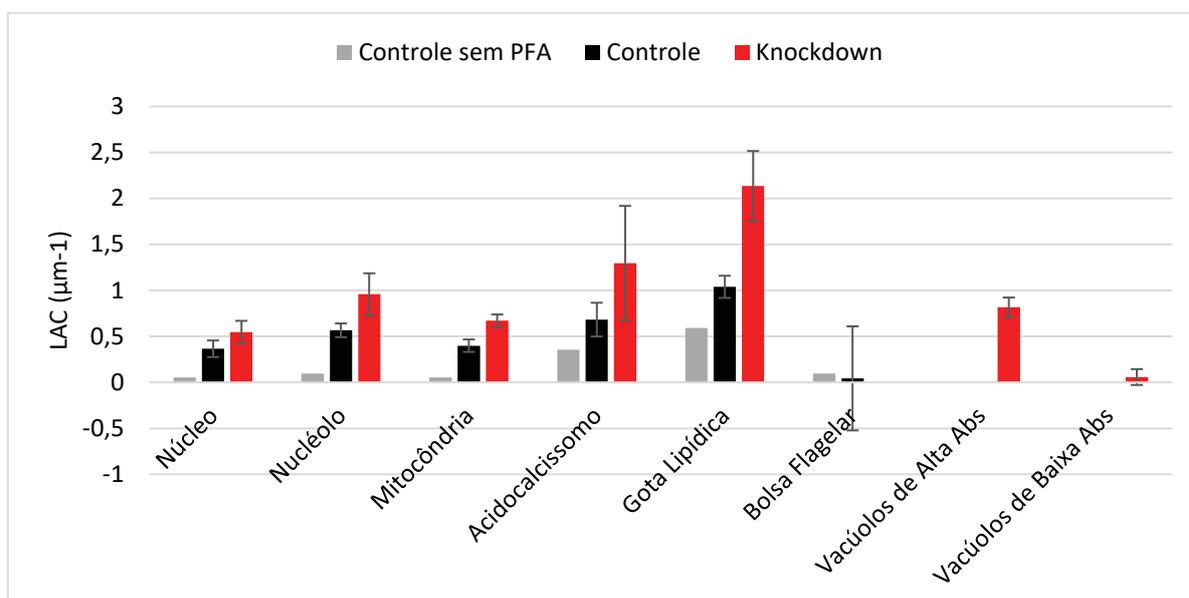


Figura 57 - Gráfico dos valores de coeficiente de absorção linear (LAC) obtidos para as células controle, com e sem PFA (cinza e preto), e *knockdown* (vermelho).

#### 4.3.3 Análises Celulares por Citometria e Microscopia de Fluorescência

Demonstramos que o *knockdown* da TbRRP44 resulta em defeitos na maturação do rRNA ribossomal, que leva a defeitos globais na célula com expansão dos vacúolos que absorvem toda a célula internamente, até atingir um estágio em que não possa mais se replicar. No caso de células de mamíferos e eucariotos multicelulares já está estabelecido que a síntese de ribossomos é um processo altamente sincronizado com os demais processos celulares e a deficiência em várias etapas de sua síntese, incluindo desde defeitos em fatores de síntese de ribossomos até mutações em proteínas ribossomais, pode ativar a via de sinalização da p53 levando a ativação das vias de apoptose (CUI et al., 2014; GOLOMB; VOLAREVIC; OREN, 2014; LINDSTRÖM; NISTÉR, 2010; STEDMAN et al., 2015). *S. cerevisiae*

também possui mecanismos de regulação de síntese de ribossomos sincronizados com crescimento celular (KOS-BRAUN; JUNG; KOŠ, 2017). Os estudos realizados por tomografia de raios X moles nos mostraram extensas alterações celulares em decorrência da depleção da TbRRP44. Estes fenótipos podem ser uma consequência direta da depleção da TbRRP44 ou tratar-se de fenótipos comuns a processos de morte celular, desencadeada pela deficiência na síntese dos ribossomos. A fim de verificar se há correlação entre os fenótipos do *knockdown* da TbRRP44 com os observados em decorrência de alterações em vias celulares específicas, analisamos os fenótipos gerados em *T. brucei* pelos seguintes compostos: a) BMH-21, que inibe a transcrição pela RNA polimerase I (KERRY et al., 2017), responsável pela síntese do precursor do rRNA; b) sinefungina, que inibe a metilação do *spliced leader*, etapa essencial da maturação do mRNA por *trans-splicing* (MCNALLY; AGABIAN, 1992) c) PAC-1, um ativador da procaspase que induz apoptose em *T. cruzi* (DE CASTRO et al., 2017).

As células controle, sem indução do RNAi, e as células *knockdown* para TbRRP44 (72 horas de indução), juntamente com as células tratadas com as drogas acima citadas, foram marcadas com LysoTracker, que cora organelas acídicas como lisossomos e acidocalcissomos (JOHNSON, 2010), e MitoTracker, que é acumulado em mitocôndrias ativas, permitindo assim analisar a atividade mitocondrial (JOHNSON, 2010). As células marcadas foram analisadas por citometria e microscopia de fluorescência.

A análise das células marcadas com MitoTracker indicou uma diminuição da atividade mitocondrial das células deficientes em TbRRP44 e das tratadas com BMH-21 quando comparadas ao controle. Por outro lado, observa-se que o tratamento com sinefungina aumentou consideravelmente a atividade mitocondrial (figuras 58 e 59). Os ensaios após tratamento com PAC-1 por 24 horas mostraram o rompimento de grande parte das células, assim, um novo experimento foi realizado onde as células foram incubadas com PAC-1 por 8 horas, ao invés de 24 horas, como os demais tratamentos. Esses ensaios mostraram que quando comparado ao controle, não há mudança na atividade mitocondrial no tratamento com PAC-1 (figuras 58 e 59).

Ensaio feito em *T. cruzi* tratados com PAC-1 mostraram uma diminuição da atividade mitocondrial (DE CASTRO et al., 2017), diferentemente do que observamos em *T. brucei*.

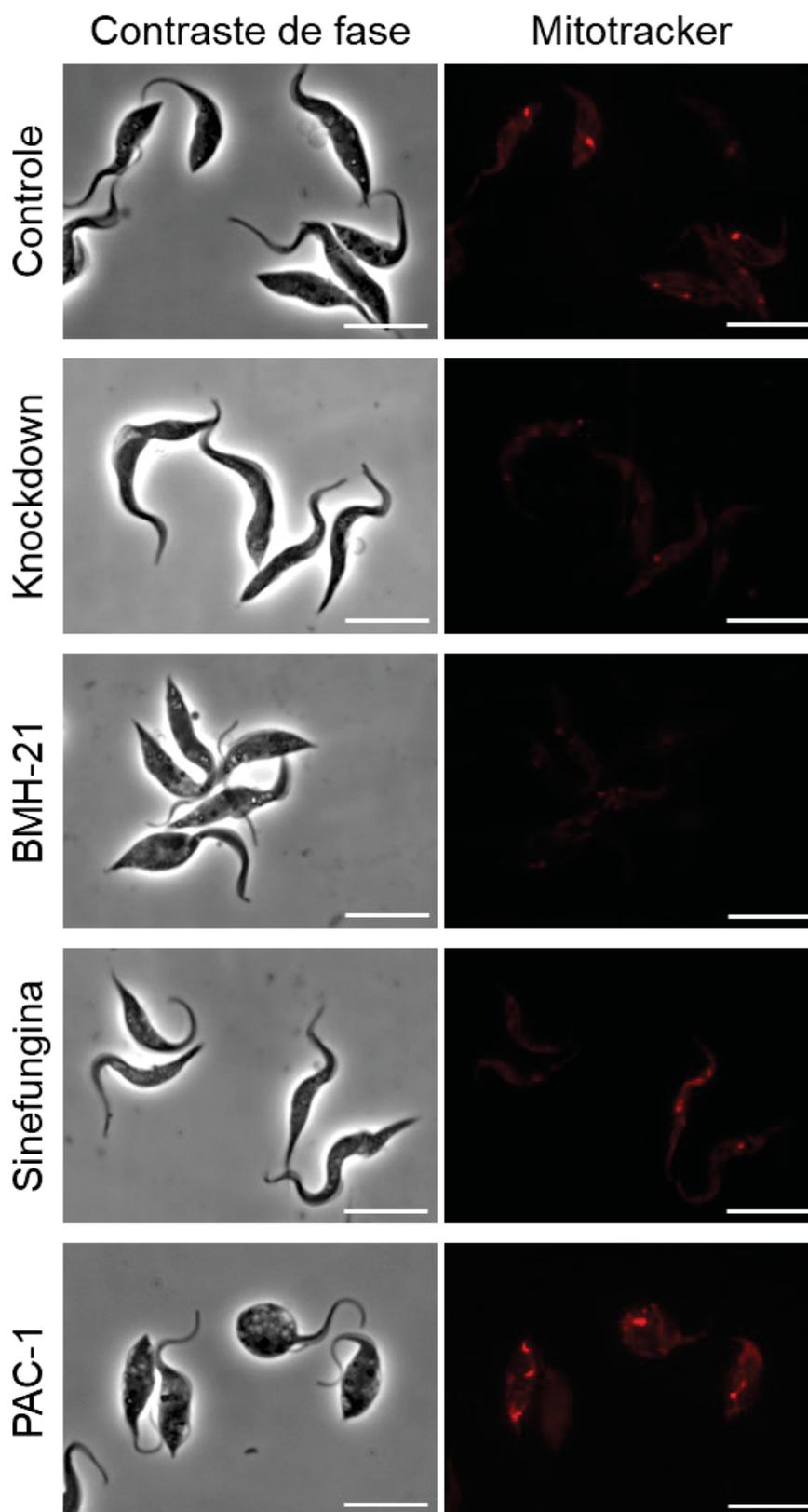


Figura 58 – Análise, por microscopia, das células marcadas com MitoTracker. Imagens das células controle, células *knockdown* induzidas por 72 horas e dos diferentes tratamentos. O tempo de incubação foi de 24 horas com BMH-21 e sinefungina e 8 horas com PAC-1. Do lado esquerdo estão as imagens no campo claro, enquanto no lado direito as imagens de fluorescência. Escala: 10  $\mu$ m.

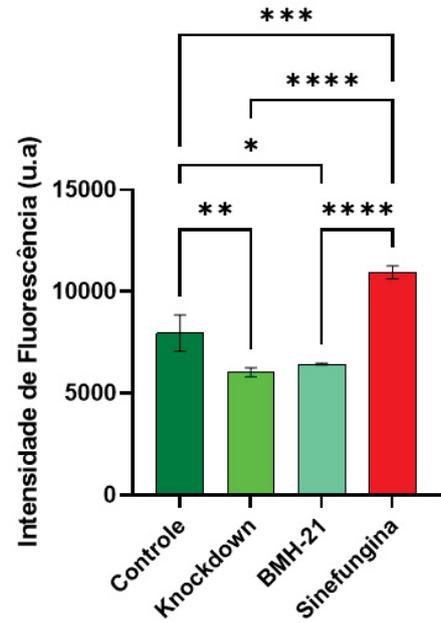
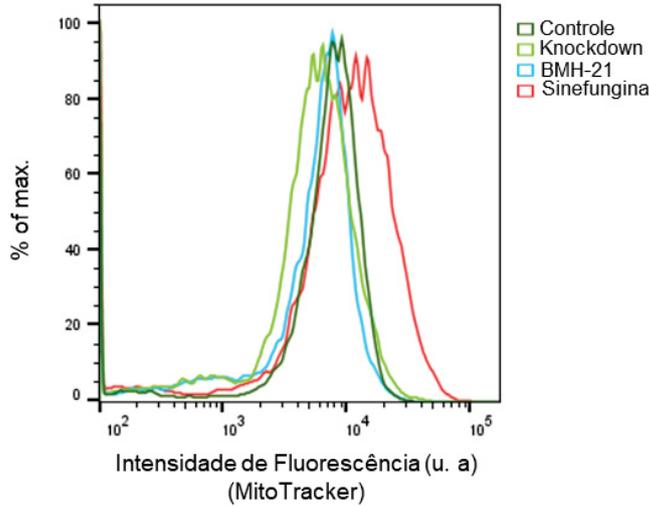
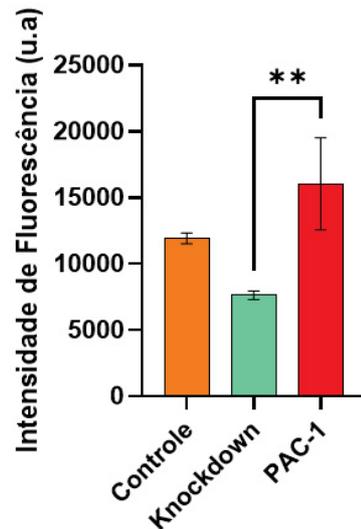
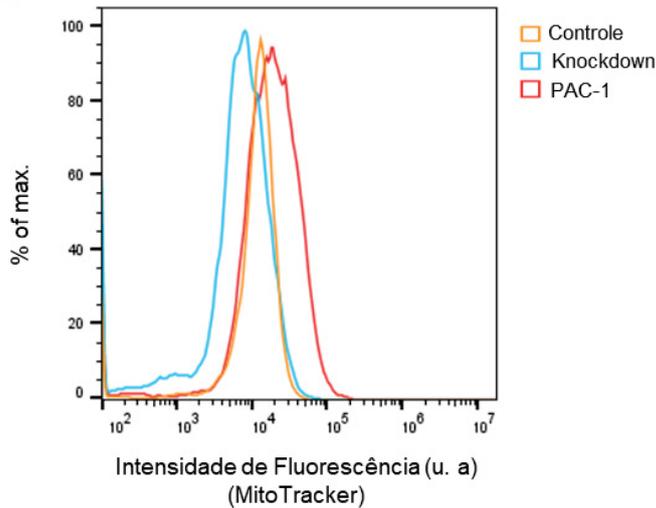
**A****B**

Figura 59 - Análise dos resultados de citometria das células marcadas com MitoTracker. A: O gráfico da esquerda representa o perfil de emissão de um dos experimentos da triplicata das células tratadas com BMH-21 e sinefungina, além do controle e das células induzidas por 72 horas. As curvas representam a % da população analisada (eixo Y), com cada curva normalizada por sua moda, em função da intensidade de fluorescência emitida (unidades arbitrárias). No gráfico da direita são mostradas as intensidades de emissão considerando a média das medianas das distribuições observadas nos 3 experimentos. B: O gráfico da esquerda representa o perfil de emissão de um dos experimentos da triplicata das células tratadas com PAC-1 por 8 horas, além do controle e das células induzidas por 72 horas. No gráfico da direita são mostradas as intensidades de emissão considerando a média das medianas das distribuições observadas nos 3 experimentos. Os experimentos foram realizados em triplicata. \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ , \*\*\* =  $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $P \leq 0,0001$ .

A análise das células marcadas com LysoTracker mostrou que as células controle apresentam menor intensidade de fluorescência quando comparadas às células *knockdown* e tratadas com sinefungina e PAC-1 (figuras 60 e 61). Além disso,

análises por microscopia mostram o aparecimento de grande número de vesículas circulares nas células deficientes em TbRRP44 e nas tratadas com sinefungina e BMH-21, mas não nas tratadas com PAC-1, quando comparadas às células controle. Apesar das células tratadas com BMH-21 mostrarem aumento de fluorescência nas análises por microscopia, a quantificação realizada por citometria mostrou que elas são estatisticamente comparáveis ao controle. Novos experimentos serão feitos a fim de diminuir o desvio observado nessas amostras. Os experimentos realizados por citometria das células tratadas com PAC-1 apresentaram problemas e precisam ser repetidos, assim os resultados referentes a este composto não foram apresentados na figura 61.

Ao analisarmos os resultados de microscopia e tomografia de raios X moles, é possível observar uma semelhança entre as vesículas circulares e os acidocalcissomos (figura 62). Conforme comentado na sessão anterior, essas organelas aumentam de tamanho e quantidade nas células com indução do RNAi para TbRRP44. Estudos feitos por Li e He (2014) mostram que os acidocalcissomos aumentam de quantidade e são essenciais para o processo de autofagia em *T. brucei*. Análises feitas pela colaboradora Dra. Priscila Hiraiwa com marcador para autofagia ATG8.2 também mostram o aumento de autofagossomos nas células *knockdown*, indicando que a depleção da TbRRP44 direciona a célula para um processo de autofagia (CESARO et al., 2020).

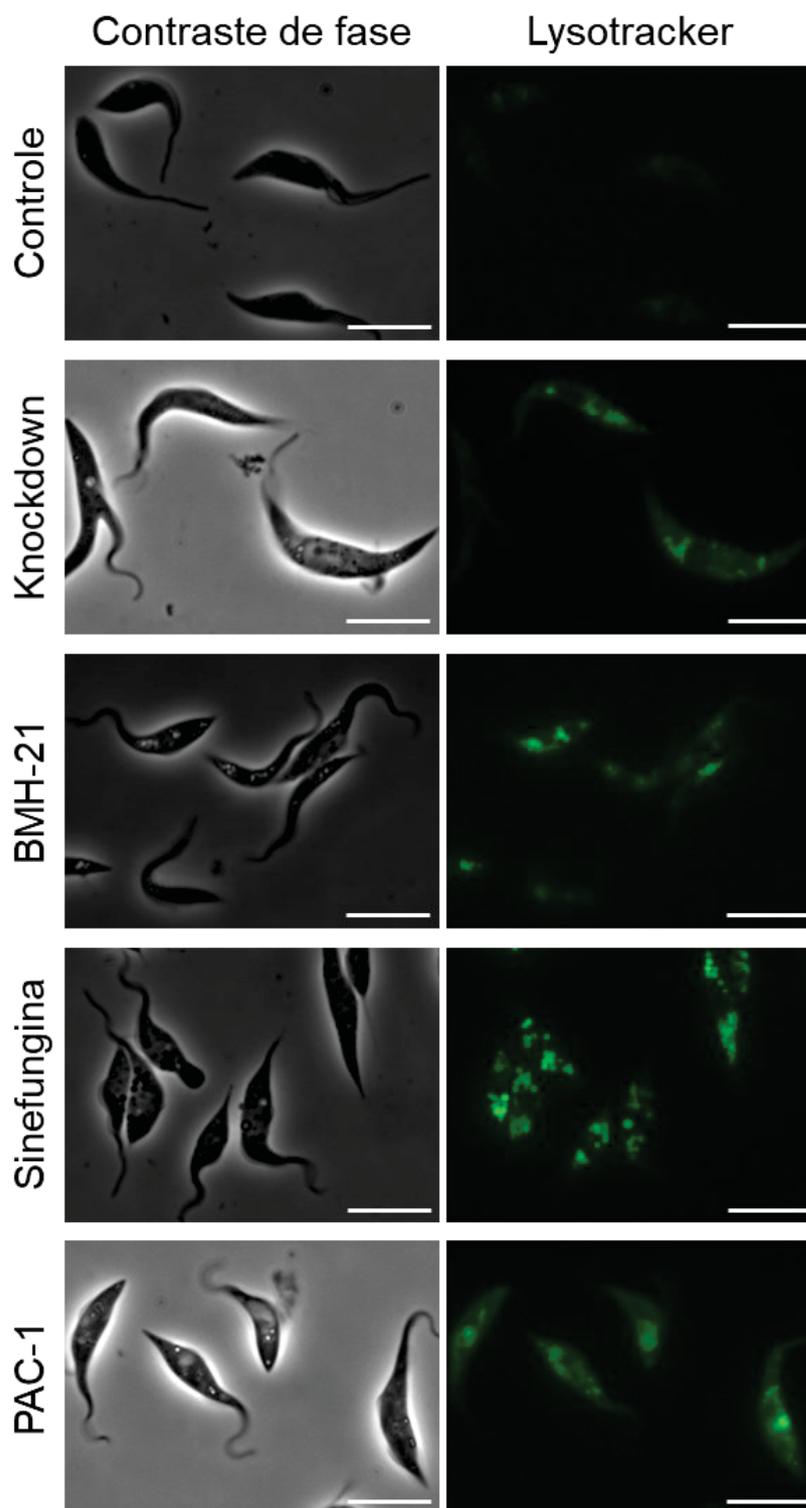


Figura 60 - Análise, por microscopia, das células marcadas com LysoTracker. Imagens das células controle, células *knockdown* induzidas por 72 horas e dos diferentes tratamentos. As células foram incubadas com BMH-21 e sinefungina por 24 horas e PAC-1 por 8 horas. Do lado esquerdo estão as imagens no campo claro, enquanto no lado direito as imagens de fluorescência. Escala: 10  $\mu$ m.

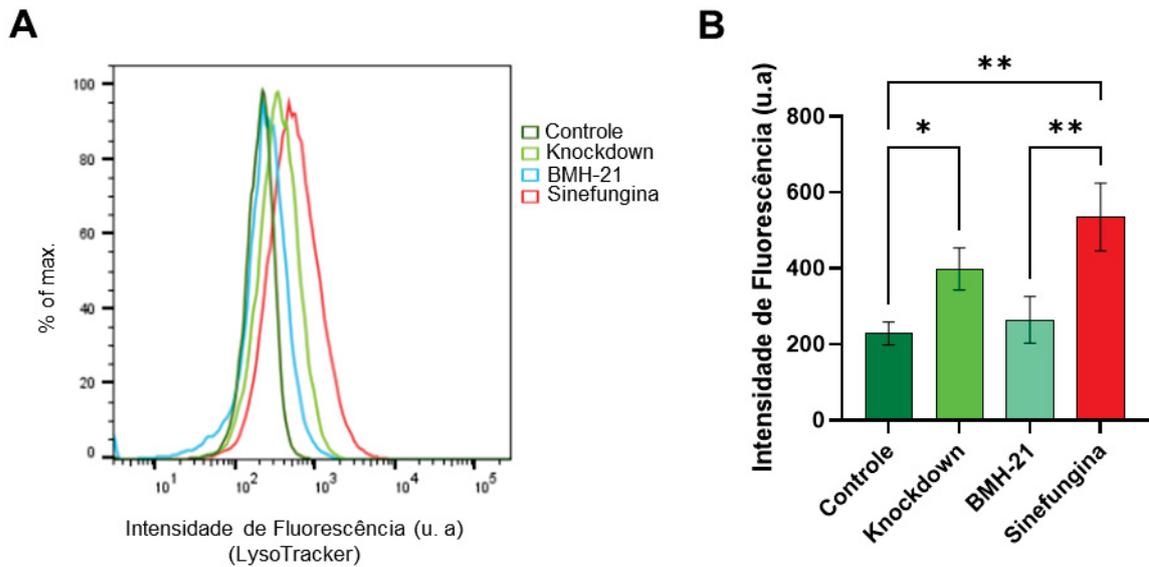


Figura 61 - Análise, por citometria, da fluorescência das amostras marcadas com LysoTracker. O gráfico da esquerda representa o perfil de emissão de um dos experimentos da triplicata das células tratadas com BMH-21 e sinefungina, além do controle e das células induzidas por 72 horas. As curvas representam a % da população analisada (eixo Y), cada curva normalizada por sua moda, em função da intensidade de fluorescência emitida (unidades arbitrárias). No gráfico da direita são mostradas as intensidades de emissão considerando a média das medianas das distribuições observadas nos 3 experimentos. \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ .

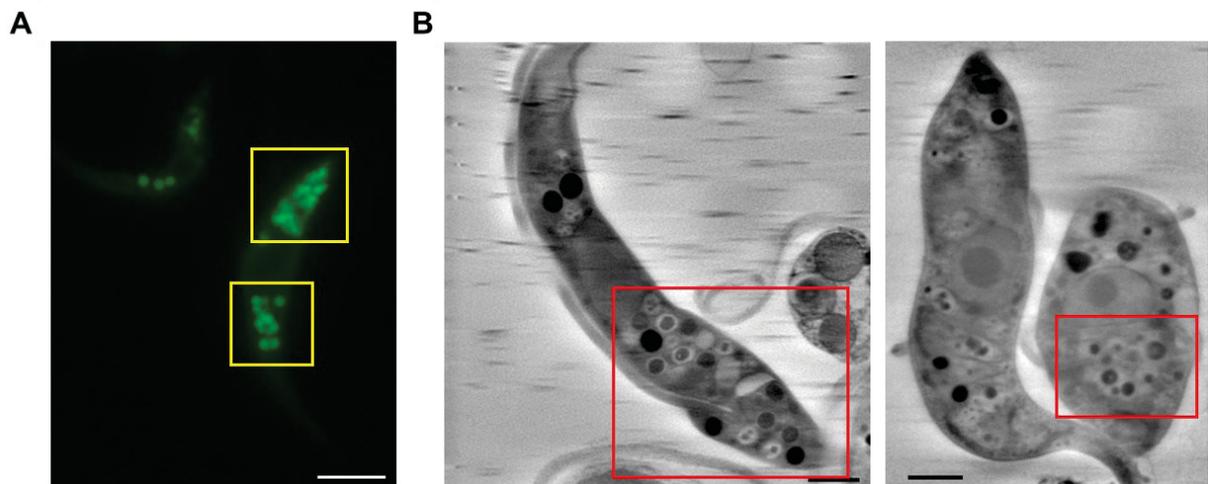


Figura 62 - Semelhança entre vesículas observadas nas células *knockdown* nas análises de microscopia de fluorescência e tomografia de raios X moles. A: Células *knockdown* com 72 horas de indução marcadas com LysoTracker com destaque para as vesículas circulares (quadros amarelos). Escala 5  $\mu\text{M}$ . B: Imagens das células *knockdown* com 72 horas de indução a partir de slices das tomografias com destaque para os acidocalcisomos (quadros vermelhos). Escala 1,5  $\mu\text{M}$ .

A análise do ciclo celular mostra que, quando comparadas ao controle, as células *knockdown* para TbRRP44 e as células tratadas com sinefungina possuem

uma porcentagem maior de células na fase G1 (figura 63). Já na fase S, há diminuição da porcentagem das células correspondentes ao *knockdown* e tratamentos em comparação ao controle. Nas fases G2/M não há diferença estatística entre as porcentagens das células controle, *knockdown* e dos demais tratamentos. Estas análises revelaram que há um pequeno aumento do número de células na fase G1 e uma pequena redução do número de células na fase S para as células deficientes em TbRRP44 e os tratamentos com BMH-21 e sinefungina.

Levando em consideração os resultados obtidos durante o mestrado (CESARO, 2018), mostrando que a depleção da TbRRP44 leva ao bloqueio da proliferação celular (figura 63, C), juntamente com os resultados aqui apresentados, nós acreditamos que as células *knockdown* para TbRRP44 completam o ciclo celular, mas não iniciam um novo.

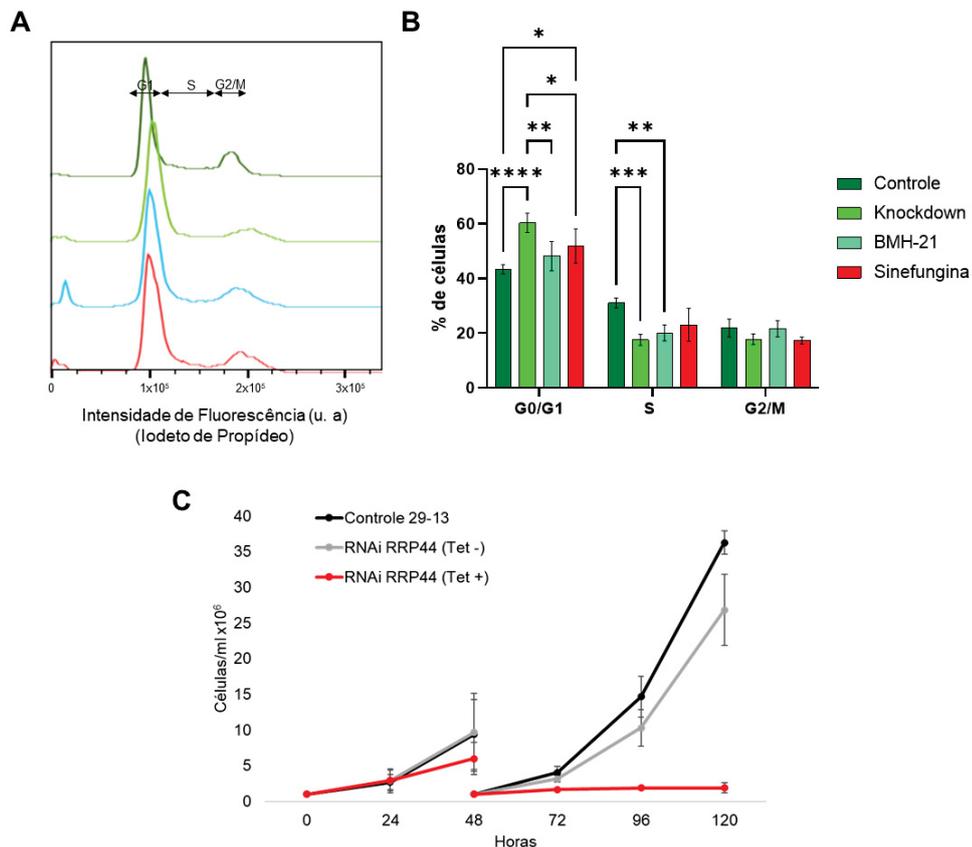


Figura 63 – Análise do ciclo celular por citometria utilizando marcação com iodeto de propídeo. A: O gráfico mostra o perfil de emissão das células tratadas com BMH-21 e sinefungina, além do controle e das células *knockdown* para TbRRP44 induzidas por 72 horas. Os perfis foram normalizados pela moda de cada curva. B: O gráfico representa a distribuição das populações nas fases do ciclo celular. As porcentagens de células nos intervalos definidos para as respectivas fases foram calculadas a partir das distribuições mostradas em A. Os experimentos foram realizados em triplicada. \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ , \*\*\* =  $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $P \leq 0,0001$ . C: Curva de proliferação celular ao longo de 120 horas (CESARO, 2018). Em preto são mostradas as células sem transfecção do vetor para indução do RNAi, em cinza são mostradas as células sem a indução do RNAi (Tet-) e em vermelho as células que foram induzidas com tetraciclina.

A comparação do fenótipo resultante do tratamento com BMH-21, inibidor de RNA polimerase I, com o fenótipo decorrente da depleção de TbRRP44 que também atua na via de síntese de ribossomos nos mostra que em ambos os casos, há uma diminuição da atividade mitocondrial e o aumento de vesículas acídicas, sugerindo que alguns dos fenótipos observados podem ser em decorrência de falhas na biogênese do ribossomo. Considerando que a TbRRP44 pode atuar na maturação de outros RNAs, como na remoção das sequências excisadas dos pre-mRNAs durante a reação de *trans-splicing*, parte dos fenótipos das células deficientes em TbRRP44 pode ser decorrente de defeitos no processamento/degradação de mRNA. Assim, ao compararmos com o tratamento com sinefungina, que inibe *trans-splicing* notamos que no caso da sinefungina há um aumento da atividade mitocondrial e a diminuição desta atividade nas células *knockdown*, enquanto que o aumento da fluorescência em decorrência da marcação das vesículas acídicas é observado em ambos os casos quando comparados ao controle. No caso de PAC-1, que é um ativador de procaspase, servindo como um controle para ativação de morte celular via ativação de apoptose, não observamos semelhanças entre as células tratadas e as células *knockdown*, apenas o aumento da fluorescência, mas ao comparamos as imagens de microscopia, as vesículas de formato arredondado, que acreditamos ser os acidocalcissomos, não aparecem claramente nas células tratadas com PAC-1.

Portanto, os fenótipos observados nas células com a depleção da TbRRP44 parecem ser mais próximos dos observados nas células com tratamento com BMH-21 e sinefungina, sugerindo que as alterações celulares nas células *knockdown*, sejam por efeito combinado entre defeitos no processamento do rRNA e mRNA.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho descrevem a caracterização estrutural do módulo exonucleolítico da proteína RRP44 de *T. brucei*, a análise de sua atividade *in vitro* frente a diferentes tipos de RNA, bem como a caracterização de sua função na maturação do RNA ribossomal. Além disso, realizamos a caracterização de alterações celulares causadas pela depleção de TbRRP44.

A TbRRP44, assim como variantes apresentando mutações nos domínios catalíticos e um mutante de deleção, foram purificadas de maneira satisfatória, sendo possível cristalizar uma variante (TbRRP44- $\Delta$ NPIN) contendo toda a região exonucleolítica comum às proteínas da família RNase II. Sua estrutura, em complexo com um oligonucleotídeo de RNA foi refinada a 2,23 Å.

As análises estruturais mostraram que o módulo exonucleolítico da TbRRP44 é conservada em relação a família RNase II/RNB, principalmente em relação a região exonucleolítica de Rrp44 de *S. cerevisiae*. Como esperado, o sítio catalítico também apresenta os resíduos conservados, bem como o mecanismo de clivagem. Graças à cristalização da proteína em sua forma ativa, foi possível capturar um estado pós-clivagem, mas anterior à liberação do produto, fato que permitiu descrever aspectos não antes observados em estruturas desta família de RNases. Notamos também que a presença do substrato no sítio catalítico estabiliza a estrutura, principalmente os loops contendo os resíduos que interagem com o RNA.

Ensaio *in vitro* de degradação de RNA mostraram que a TbRRP44 apresenta preferência por substratos ricos em uracila, sendo também é capaz de degradar RNAs estruturados mesmo sem a presença de uma sequência de RNA de fita simples na extremidade 3'. Apesar da atividade catalítica ser quase exclusivamente da porção exonucleolítica, o domínio PIN parece cooperar com esta atividade tanto do ponto de vista estrutural quanto por sua atividade catalítica. Além disso, as análises de interação entre proteína e RNA indicaram que o domínio endonucleolítico possui papel importante na interação com o substrato, em especial com RNAs estruturados.

As análises de intermediários do processamento do rRNA por Northern blot confirmaram a atuação na TbRRP44 no processamento do rRNA 5.8S, como já havia sido observado na literatura. Além disso, descrevemos o acúmulo do precursor completo que contém os rRNAs da subunidade maior do ribossomo, indicando que a ausência da TbRRP44 causa um bloqueio da maturação do rRNA em um estágio

inicial. Alguns dos intermediários observados podem ter acumulado em decorrência de um efeito indireto da deleção da TbRRP44, como por exemplo o não processamento de snoRNAs específicos que podem participar do processamento do rRNA.

As imagens obtidas através da técnica de tomografia de raios X moles mostram que na ausência da TbRRP44, as células sofrem várias modificações, como o aparecimento dos vacúolos de baixa absorção que ocupam grande volume no citoplasma, além de alterações nas estruturas da bolsa flagelar e do núcleo, que sofrem deformações. Também foi possível identificar as organelas ricas em cálcio, os chamados acidocalcissomos, que em razão da ausência da TbRRP44 aumentam de volume quando comparados aos controles. Além dos acidocalcissomos, as gotas lipídicas também aumentaram em volume e quantidade com a depleção da TbRRP44.

Análises celulares mostraram que as células *knockdown* apresentam grande quantidade de vesículas acídicas quando comparadas ao controle. Também se observa uma diminuição da atividade mitocondrial nessas células. Comparações com drogas que inibem a síntese de ribossomos (BMH-21) e processamento do mRNA (sinefungina) sugerem que os fenótipos observados em decorrência da depleção da TbRRP44 são causados por um acúmulo de deficiências nas vias de processamento do rRNA e mRNA.

Em conclusão, este trabalho contribuiu para uma maior compreensão das funções da Rrp44 em *T. brucei*, e os efeitos de sua depleção. Como perspectivas de desenvolvimento, estão a caracterização de sua função no processamento dos outros tipos de RNA, como o mRNA e snoRNA. Além da identificação de proteínas que podem interagir com TbRRP44 durante as diferentes etapas de processamento dos RNAs alvos.

O presente trabalho gerou as seguintes publicações ou manuscritos principais:

- Cesaro et al. "*Trypanosoma brucei* RRP44 is involved in an early stage of large ribosomal subunit RNA maturation", publicado na RNA Biology, em 2019 (DOI: 10.1080/15476286.2018.1564463). Neste trabalho apresentamos a estrutura cristalográfica do domínio endonucleolítico da TbRRP44 e sugerimos as bases moleculares para a não associação de TbRRP44 com o exossomo (resultados obtidos no mestrado). Além disso, apresentamos a caracterização do acúmulo de

precursores do rRNA em células *knockdown* para a TbRRP44, em particular o acúmulo do precursor intacto da LSU, assim como o precursor 7S do rRNA do 5.8S

- Cesaro et al. “Downregulation of the essential Rrp44 ribonuclease causes extensive ultra-structure cell modifications in *Trypanosoma brucei*”, publicado no bioRxiv, em 2020 (doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971424>). Neste trabalho mostramos, através de análises por tomografia de raios X moles, que a depleção de TbRRP44 causa extensas alterações celulares, como o aparecimento de grandes vacúolos de origem lisossomal e o aumento de tamanho e número dos acidocalcissomos. Pretendemos complementar este trabalho com as análises comparativas dos fenótipos gerados pelo *knockdown* de TbRRP44 e tratamento com inibidores de vias específicas para submetê-lo à publicação com avaliação por pares.
- Cesaro et al. “*Trypanosoma brucei* RRP44: a versatile enzyme for processing structured and non-structured RNA substrates”, submetido para publicação em Nucleic Acids Research. Neste trabalho apresentamos a estrutura cristalográfica do módulo exonucleolítico de TbRRP44 em complexo com um oligoribonucleotídeo, bem como sua atividade catalítica e interação *in vitro* com diferentes tipos de substratos.

Adicionalmente, as análises do processamento do RNA ribossomal iniciadas neste projeto foram completadas e aprofundadas gerando o trabalho:

- Guerra-Slompo et al. “Dissecting *Trypanosoma brucei* RRP44 Function in the Maturation of Segmented Ribosomal RNA Using a Regulated Genetic Complementation System”, submetido para publicação em Nucleic Acids Research. Neste trabalho apresentamos uma análise detalhada da maturação do RNA ribossomal em *T. brucei* e o papel de RRP44 e de seus domínios endo e exonucleolítico neste processamento.

## REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with imageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–41, 2004.
- ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2021.
- AGRAWAL, V.; KISHAN, K. OB-fold: Growing Bigger with Functional Consistency. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 195–206, 2005.
- AGULLEIRO, J. I.; FERNANDEZ, J. J. Tomo3D 2.0 - exploitation of advanced vector eXtensions (AVX) for 3D reconstruction. **Journal of Structural Biology**, v. 189, n. 2, p. 147–152, 2015.
- ALLMANG, C. et al. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. **EMBO Journal**, v. 18, n. 19, p. 5399–5410, 1999.
- ARRAIANO, C. M.; MATOS, R. G.; BARBAS, A. RNase II: The finer details of the modus operandi of a molecular killer. **RNA Biology**, v. 7, n. 3, 2010.
- BARBAS, A. et al. New insights into the mechanism of RNA degradation by ribonuclease II: Identification of the residue responsible for setting the RNase II end product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 19, p. 13070–13076, 2008.
- BARBAS, A. et al. Determination of key residues for catalysis and RNA cleavage specificity. One mutation turns RNase II Into a “super-enzyme”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20486–20498, 2009.
- BARTH, S. et al. Elucidating the role of C/D snoRNA in rRNA processing and modification in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 86–101, 2008.
- BASSLER, J.; HURT, E. Eukaryotic Ribosome Assembly. **Annual Review of Biochemistry**, v. 88, n. 1, p. 281–306, 2019.
- BELEVICH, I. et al. Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. **PLoS Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.
- BETAT, H. et al. From end to end: TRNA editing at 5'-and 3'-terminal positions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 23975–23998, 2014.
- BLEICHERT, F. et al. The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 9464–9469, 2006.
- 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.

BRIGGS, M. W.; BURKARD, K. T. D.; BUTLER, J. S. Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13255–13263, 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.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, v. 2018, 2018.

CESARO, G. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA RIBONUCLEASE RRP44 DE Trypanosoma brucei CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DA RIBONUCLEASE RRP44 DE**, 2018.

CESARO, G. et al. Trypanosoma brucei RRP44 is involved in an early stage of large ribosomal subunit RNA maturation. **RNA Biology**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2019.

CESARO, G. et al. Downregulation of the essential Rrp44 ribonuclease causes extensive ultra-structure cell modifications in <em>Trypanosoma brucei</em>. **bioRxiv**, p. 2020.02.29.971424, 1 jan. 2020.

CHANFREAU, G.; LEGRAIN, P.; JACQUIER, A. Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. **Journal of Molecular Biology**, v. 284, n. 4, p. 975–988, 1998.

CHEN, C. Y. et al. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 451–464, 2001.

CHEN, C. Y. A.; SHYU, A. BIN. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 465–470, 1995.

CHEN, J.; WAGNER, E. J. snRNA 3' end formation: The dawn of the Integrator complex. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 4, p. 1082–1087, 2010.

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.

CHU, L. Y. et al. Structural insights into RNA unwinding and degradation by RNase R. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 20, p. 12015–12024, 2017.

CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.

CLAYTON, C.; ESTEVEZ, A. The exosomes of trypanosomes and other protists. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 702, p. 39–49, 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.

CUI, D. et al. The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 33, n. 17, p. 2225–2235, 2014.

DA SOLER, H. T. da. **Estabelecimento de Ensaios de Atividade para a Ribonuclease RRP44 de *Trypanosoma brucei***. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Instituto Carlos Chagas, Curitiba (PR), 2022.

DE CASTRO, E. et al. Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **Apoptosis**, v. 22, n. 12, p. 1564–1577, 2017.

DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays In Biochemistry**, v. 51, p. 31–46, 2011.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. U.; BARRIAS, E. S. **Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

DELANO, W. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 700, 2002.

DRAŹKOWSKA, K. et al. The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities in vivo and in vitro. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3845–3858, 2013.

DZIEMBOWSKI, A. et al. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 15–22, 2007.

EGLOFF, S.; O'REILLY, D.; MURPHY, S. Expression of human snRNA genes from beginning to end. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 4, p. 590–594, 2008.

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.

FAEHNLE, C. R.; WALLESHAUSER, J.; JOSHUA-TOR, L. Mechanism of Dis3l2 substrate recognition in the Lin28-let-7 pathway. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 252–256, 2014.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 775–786, 2009.

FLEMMING, D. et al. Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

FRAZÃO, C. et al. Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. **Nature**, v. 443, n. 7107, p. 110–114, 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.

GERLACH, P. et al. Distinct and evolutionary conserved structural features of the human nuclear exosome complex. **eLife**, v. 7, p. 1–22, 2018.

GOLOMB, L.; VOLAREVIC, S.; OREN, M. P53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2571–2579, 2014.

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.; ESTEVEZ, A. M.; CLAYTON, C. A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 12, p. 1491–1501, 2003.

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.

HALLIDAY, C. et al. Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. **Trends in Parasitology**, p. 1–13, 2020.

HARKIOLAKI, M. et al. Cryo-soft X-ray tomography : using soft X-rays to explore the ultrastructure of whole cells. v. 0, p. 1–12, 2018.

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.

HAYNE, C. K. et al. Reconstitution of the human tRNA splicing endonuclease complex: Insight into the regulation of pre-tRNA cleavage. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 14, p. 7609–7622, 2020.

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 production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 34082–34087, 2011b.

HURY, A. et al. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 1, p. 56–68, 2009.

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. Species specificity in ribosome biogenesis: A nonconserved phosphoprotein is required for formation of the large ribosomal subunit in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 30–35, 2005.

JERABEK-WILLEMSEN, M. et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p. 101–113, 2014.

JOHNSON, I. D. **Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies**. [s.l.] Life Technologies Corporation, 2010.

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.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KERRY, L. E. et al. Selective inhibition of RNA polymerase I transcription as a potential approach to treat African trypanosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–24, 2017.

KILCHERT, C.; WITTMANN, S.; VASILJEVA, L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 227–239, 2016.

KOLEV, N. G. et al. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. 1–15, 2010.

KOS-BRAUN, I. C.; JUNG, I.; KOŠ, M. Tor1 and CK2 kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner. **PLoS Biology**, v. 15, n. 3, 2017.

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

KRAMER, S. et al. Polycistronic trypanosome mRNAs are a target for the exosome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 1–5, 2016.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71–6, 1996.

LACAVA, J. et al. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 713–724, 2005.

LAU, B. et al. Structure of the Maturing 90S Pre-ribosome in Association with the RNA Exosome. **Molecular Cell**, v. 81, n. 2, p. 293–303.e4, 2021.

LEBRETON, A. et al. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. **Nature**, v. 456, n. 7224, p. 993–996, 2008.

LEE, G. et al. Elastic coupling between RNA degradation and unwinding by an exoribonuclease. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1726–1729, 2012.

LI, F. J.; HE, C. Y. Acidocalcisome is required for autophagy in *Trypanosoma brucei*. **Autophagy**, v. 10, n. 11, p. 1978–1988, 2014.

LI, J.; LIU, C. Coding or noncoding, the converging concepts of RNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, p. 1–10, 2019.

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.

LINDSTRÖM, M. S.; NISTÉR, M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

LIU, Q.; GREIMANN, J. C.; LIMA, C. D. Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1223–1237, 2006.

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.

LUBAS, M. et al. Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. **EMBO Journal**, v. 32, n. 13, p. 1855–1868, 2013.

LUKEŠ, J. et al. Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 466–480, 2018.

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, 2015a.

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

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.

MALECKI, M. et al. The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. **EMBO Journal**, v. 32, n. 13, p. 1842–1854, 2013.

MCNALLY, K. P.; AGABIAN, N. Trypanosoma brucei spliced-leader RNA methylations are required for trans splicing in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 11, p. 4844–4851, 1992.

MESSAOUDII, C. et al. TomoJ: Tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–9, 2007.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, 2011.

MICHAELI, S. et al. RNA-seq analysis of small RNPs in Trypanosoma brucei reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 3, p. 1282–1298, 2012.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1463–1477, 2006.

MIRANDA, K. et al. Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2005.

NIEMIROWICZ, G. T. et al. Simplified inducible system for Trypanosoma brucei. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 2018.

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2018.

OTSUKA, H. et al. Emerging evidence of translational control by AU-rich element-binding proteins. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, p. 1–10, 2019.

PAL, S. Chapter 10 - RNA processing. In: PAL, S. (Ed.). **Fundamentals of Molecular Structural Biology**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 277–309.

PAN, T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA. **Cell Research**, v. 28, n. 4, p. 395–404, 2018.

PIROUZ, M. et al. Dis3l2-Mediated Decay Is a Quality Control Pathway for Noncoding RNAs. **Cell Reports**, v. 16, n. 7, p. 1861–1873, 2016.

PRIEST, J. W.; HAJDUK, S. L. Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 179–191, 1994.

QU, L.-H. et al. Seven Novel Methylation Guide Small Nucleolar RNAs Are Processed from a Common Polycistronic Transcript by Rat1p and RNase III in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 1144–1158, 1999.

QUIÑONES, W. et al. Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–11, 2020.

RAJAN, K. S. et al. Unique Aspects of rRNA Biogenesis in Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 10, p. 778–794, 2019.

SCHAEFFER, D. et al. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 56–62, 2009.

SCHAEFFER, D. et al. Functions of the Cytoplasmic Exosome. In: JENSEN, T. H. (Ed.). **RNA Exosome**. New York, NY: Springer US, 2010. p. 79–90.

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.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 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, 2009a.

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 Acid Research**, v. 37, n. 4, p. 1127–1140, 2009b.

SEO, M.; LEI, L.; EGLI, M. Label-Free Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Measuring Dissociation Constants of Protein-RNA Complexes. **Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 1–12, 2019.

SHIKHA, S. et al. TRNA biology in trypanosomes. **Chimia**, v. 73, n. 5, p. 395–405, 2019.

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.

SLOMOVIC, S. et al. Addition of poly(A) and poly(A)-rich tails during RNA degradation in the cytoplasm of human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 16, p. 7407–7412, 2010.

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.

STAALS, R. H. J. et al. Dis3-like 1: A novel exoribonuclease associated with the human exosome. **EMBO Journal**, v. 29, n. 14, p. 2358–2367, 2010.

STEDMAN, A. et al. Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-mediated apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 11, p. 1865–1876, 2015.

STEITZ, T. A.; STEITZ, J. A. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6498–6502, 1993.

TOMECKI, R. et al. The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: HDIS3 and hDIS3L. **EMBO Journal**, v. 29, n. 14, p. 2342–2357, 2010.

TSCHUDI, C.; ULLU, E. Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids. **Gene Expression**, v. 10, n. 1–2, p. 3–16, 2002.

USTIANENKO, D. et al. TUT-DIS3L2 is a mammalian surveillance pathway for aberrant structured non-coding RNAs. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 20, p. 2179–2191, 2016.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010.

VINCENT, H. A.; DEUTSCHER, M. P. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29769–29775, 2006.

VUKOVIĆ, 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.

WASMUTH, E. V.; LIMA, C. D. Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and Central Channel. **Molecular Cell**, v. 48, n. 1, p. 133–144, 2012.

WEICK, E. M. et al. Helicase-Dependent RNA Decay Illuminated by a Cryo-EM Structure of a Human Nuclear RNA Exosome-MTR4 Complex. **Cell**, v. 173, n. 7, p. 1663–1677.e21, 2018.

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.

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.

ZHANG, E. et al. A specialised SKI complex assists the cytoplasmic RNA exosome in the absence of direct association with ribosomes. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 14, p. 1–15, 2019.

ZHOU, Q.; HU, H.; LI, Z. **New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in trypanosomes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 308