



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAYO SCHEMIKO ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA Tc $\alpha$ PH1 E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM  
TcXRNA EM *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2021



Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular



KAYO SCHEMIKO ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcALPH1 E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM  
TcXRNA EM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção de grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz

Co-orientadora: Dra. Fabíola Barbieri Holetz

Curitiba

2021

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

Almeida, Kayo Schemiko

Caracterização da proteína TcALPH1 e sua possível relação com TcXRNA em *Trypanosoma cruzi* / Kayo Schemiko Almeida. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Dra. Fabíola Barbieri Holetz.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. RNA. I. Holetz, Fabíola Barbiéri. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **KAYO SCHEMIKO ALMEIDA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcALPH1 E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM TcXRNA EM *Trypanosoma cruzi***, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO DALLAGIOVANNA MUNIZ, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 13:09:31.0

BRUNO DALLAGIOVANNA MUNIZ

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/09/2021 09:49:17.0

ALEJANDRO CORREA DOMINGUEZ

Avaliador Interno

Assinatura Eletrônica

03/11/2021 11:03:54.0

LYSANGELA RONALTE ALVES

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: [pgbiocel@ufpr.br](mailto:pgbiocel@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: 114842

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 114842

## RESUMO

Os tripanosomatídeos apresentam particularidades biológicas, como a ausência de promotores canônicos para a RNA polimerase II e a transcrição policistrônica dos genes, sugerindo que a regulação da expressão gênica ocorra majoritariamente pelo controle de eventos pós-transcricionais. Dentre estes eventos, o controle da degradação e do acesso dos RNA mensageiros (RNAm) à maquinaria de tradução estão diretamente relacionados à adaptação destes parasitas durante o ciclo de vida. Em eucariotos, a degradação dos RNAm é iniciada pela remoção da cauda poliA seguida pela degradação do RNAm tanto no sentido 3'-5', assim como no sentido 5'-3'. A via de decaimento no sentido 5'-3' é iniciada pela remoção do *cap* do RNAm promovida por uma proteína de *decapping*, seguida da degradação exonucleotídica no sentido 5'-3' pela exonuclease Xrn1. Em *T. brucei*, a proteína TbALPH1, co-localiza com TbXRNA em grânulos de estresse celular, e exclusivamente, em um grânulo específico no polo posterior da célula. Portanto, este trabalho de dissertação de mestrado tem como objetivo identificar e caracterizar a proteína TcALPH1 e sua possível relação com TcXRNA em *T. cruzi*. Para investigar a localização dessas proteínas, e seus possíveis parceiros funcionais, foram realizados ensaios de imunoprecipitação e imunofluorescência em formas epimastigotas de *T. cruzi*, sob condições normais e sob estresse nutricional. Como resultados, foi verificado que TcALPH1 e TcXRNA co-imunoprecipitaram em condições normais de cultivo, e em uma menor abundância sob condições de estresse celular. Esse resultado pode ser um indício de que estas proteínas compartilham de um mesmo complexo proteico. Além disso, outras proteínas envolvidas no metabolismo de RNAm, algumas das quais são marcadoras de *P-bodies* e grânulos de estresse, também co-imunoprecipitaram com TcALPH1 e TcXRNA. Dentre essas proteínas, vale destacar a C4B63\_46g53, uma proteína que contém um domínio com 95.7% de confiança com o domínio WD40 da proteína Ge-1 de eucariotos. Ge-1 é responsável pelo recrutamento de Dcp1/Dcp2 até os *P-bodies* em células eucarióticas, que até então, não havia sido identificada em tripanosomatídeos. As localizações subcelulares de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em parasitas transfectantes, apresentaram um perfil difuso citoplasmático em condições normais. Já sob estresse nutricional, estas proteínas adotaram um perfil granular, embora o controle TcGFP-FLAG tenha apresentado um perfil similar. Também foram realizados ensaios de bloqueio da expressão de TcALPH1 e TcXRNA por CRISPR-Cas 9, objetivando identificar possíveis fenótipos relacionados a ausência da expressão destes genes. Entretanto, foram obtidos somente possíveis clones heminocautes para ambos os genes. Como perspectivas, será realizado um sequenciamento dos RNAs associados aos complexos imunoprecipitados, assim como uma avaliação da localização de TcALPH1 e TcXRNA em diferentes estágios de vida do *T. cruzi*, além da repetição do ensaio de estresse nutricional e de pH em epimastigotas, utilizando anticorpos policlonais específicos contra estas proteínas. Os clones heminocautes para os genes TcALPH1 e TcXRNA serão sequenciados, e passarão por novas tentativas de bloqueio da expressão, para possíveis avaliações de fenótipos associados a ausência da expressão destes genes.

**Palavras-chave:** degradação de RNAm, ALPH1, XRNA, grânulos de RNAs.



## ABSTRACT

Trypanosomatids present biological particularities, such as the absence of canonical promoters for RNA polymerase II and polycistronic transcription of genes, suggesting that the regulation of gene expression occurs mostly by the control of post-transcriptional events. Among these events, the control of degradation and access of messenger RNA (mRNA) to the translation machinery are directly related to the adaptation of these parasites during their life cycle. In eukaryotes, mRNA degradation is initiated by the removal of the polyA tail followed by mRNA degradation in both the 3'-5' and 5'-3' directions. The decay pathway in the 5'-3' direction is initiated by the removal of the mRNA cap promoted by a decapping protein, followed by exonucleotide degradation in the 5'-3' direction by the exonuclease Xrn1. The TbALPH1 protein, co-localizes with TbXRNA in cellular stress granules, and exclusively, in a specific granule at the posterior pole of the cell. Therefore, this work aims to identify and characterize the TcALPH1 protein and its possible interaction with TcXRNA. To investigate the localization of these proteins, and their possible functional partners, immunoprecipitation and immunofluorescence assays were performed on *T. cruzi* epimastigotes under normal conditions and under nutritional and pH stress. As results, TcALPH1 and TcXRNA were found to co-immunoprecipitate under normal culture conditions, and in a lower abundance under cellular stress conditions. This result may be an indication that these proteins share the same protein complex. In addition, other proteins involved in mRNA metabolism, some of which are markers of P-bodies and stress granules, also co-immunoprecipitated with TcALPH1 and TcXRNA. Among these proteins, it is worth noting C4B63\_46g53, a protein that contains a domain with 95.7% confidences with the WD40 domain of the Ge-1 protein of eukaryotes. Ge-1 is responsible for the recruitment of Dcp1/Dcp2 to P-bodies in eukaryotic cells, which until now, had not been identified in trypanosomatids. The subcellular localization of TcALPH1-GFP and TcXRNA-GFP in transfecting parasites showed a diffuse cytoplasmic profile under normal conditions, with a higher concentration around the nucleus. On the other hand, under nutritional stress, these proteins adopted a granular profile, although the TcGFP-FLAG control showed a similar profile. TcALPH1 and TcXRNA were also blocked by CRISPR-Cas 9, aiming to identify possible phenotypes related to the absence of expression of these genes. However, only possible hemi knockout clones for both genes were obtained. The sequencing of the RNAs associated with the immunoprecipitated complexes will be performed, as well as an evaluation of the localization of TcALPH1 and TcXRNA in different life stages of *T. cruzi*, and the repetition of the nutritional and pH stress assay in epimastigotes, using specific polyclonal antibodies against these proteins. The possible hemi knockout clones for TcALPH1 and TcXRNA genes will be sequenced, and will undergo new attempts to block expression, from which possible phenotypes associated with the absence of expression of these genes will be evaluated.

**Keywords:** mRNA degradation, ALPH1, XRNA, RNA granules.

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Número estimado de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> que vivem em países não endêmicos. ....	10
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e os diferentes tipos de estresse extracelulares durante o mesmo .....	14
Figura 3 – Imagem de Imunofluorescência de P-bodies .....	20
Figura 4 - As vias gerais e complexos de nuclease para degradação de RNAm eucarióticos .....	25
Figura 5 – Co-localização das proteínas TbXRNA e TbDHH1 com TbALPH1 em <i>T. brucei</i> sob condições de estresse nutricional e por choque térmico .....	27
Figura 6 – Desenho esquemático dos domínios de ALPH1 e conservação entre os diferentes ortólogos kinetoplastida .....	29
Figura 7. Regiões de anelamento dos <i>primers</i> utilizado para as construções de TcALPH1 e TcXRNA. ....	37
Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para as clonagens.....	38
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para construção dos RNAg para CRISPR-Cas9 dos genes TcALPH1 e TcXRNA em <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	50
Figura 8. Sequência oligonucleotídica dos DONORS para os RNAg TcXRNA 528 e TcALPH1 34 transfectados nos parasitas transfectantes Cas9-GFP. ....	52
Figura 9. Representação do local de clivagem de TcALPH1 e TcXRNA pela Cas9, e a região de inserção do DONOR correspondente de cada gene. ....	52
Figura 10 – Alinhamento de sequência de aminoácidos de ALPH1 entre <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>L. major</i> e <i>L. Infantum</i> . ....	55
Figura 11 – Alinhamento de sequência de aminoácidos de XRNA entre <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>L. major</i> e <i>L. Infantum</i> . ....	56
Figura 12. Eletroforese das PCR de colônias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com TcALPH1+ pTcGWGFP-C terminal em agarose 1% usando os <i>primers</i> M13 e TcALPH1 R1 interno. ....	58

Figura 13. Eletroforese das PCR de colónias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com TcALPH1+ pTcGWGFP-N terminal em agarose 1% usando os <i>primers</i> M13 e TcALPH1 R1 interno. ....	58
Figura 14. Citometria de Fluxo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectados com as construções pTcGWGFP-N e pTcGWGFP-C contendo o inserto TcALPH1.....	59
Figura 15. Análise de expressão da proteína TcALPH1 fusionada a <i>tag</i> GFP de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por <i>western blot</i> . ....	60
Grafico 1. Curva de crescimento de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectadas com as construções pTcGFGFP-C+ALPH1 e pTcGWGFP+XRNA ...	61
Figura 16. Eletroforese das PCR de colónias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com a construção 1 de TcALPH1+ pDONR221 em agarose 1% usando os <i>primers</i> M13 e TcALPH1 R1 interno .....	62
Figura 17. Eletroforese das PCR de colónias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com a construção 2 de TcALPH1+ pDONR221 em agarose 1% usando os <i>primers</i> M13 e TcALPH1 R2 .....	63
Figura 18. Eletroforese das PCR de colónias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com a construção 1 de TcALPH1+ pDEST17 em agarose 1% usando os <i>primers</i> T7 e TcALPH1 R1 interno .....	64
Figura 19. Eletroforese das PCR de colónias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com a construção 2 de TcALPH1+ pDEST17 em agarose 1% usando os <i>primers</i> T7 e TcALPH1 R2 .....	64
Figura 20. Gel SDS-PAGE da expressão e solubilização de TcALPH1 recombinante. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado.....	66
Figura 21. Gel SDS-PAGE da purificação de TcALPH1 recombinante. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado.....	67
Figura 22. Gel SDS-PAGE da quantificação de TcALPH1 recombinante por curva de BSA. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado .....	68



Figura 23. Gel SDS-PAGE da expressão e solubilização de TcXRNA recombinante. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado.....	69
Figura 24. Gel SDS-PAGE da purificação de TcXRNA recombinante. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado.....	70
Figura 25. Gel SDS-PAGE da quantificação de TcXRNA recombinante por curva de BSA. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado .....	71
Figura 26. Avaliação da especificidade do soro de camundongo $\alpha$ -TcALPH1 em extratos de parasitas transfectantes e selvagens.....	72
Figura 27. Avaliação da especificidade do soro de camundongo $\alpha$ -TcXRNA em extratos de parasitas transfectantes e selvagens.....	73
Figura 28. Avaliação da especificidade do soro de coelho $\alpha$ -TcXRNA em extratos de parasitas selvagens sob condições normais e estresse nutricional .....	74
Figura 29. Localização das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em parasitas transfectantes sob condições normais e de estresse nutricional.....	76
Figura 30. <i>Western blot</i> das resinas incubadas com os extratos dos parasitas transfectantes expressando TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP .....	78
Figura 31. Comparação do perfil de bandas proteicas dos transfectantes TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG por gel SDS corado com nitrato de prata .....	79
Tabela 3. Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcALPH1-GFP sob condições normais.....	81
Gráfico 2. Volcano Plot da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcALPH1-GFP sob condições normais de nutrientes .....	81
Tabela 4. Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcXRNA-GFP sob condições normais .....	83
Gráfico 3. Volcano Plot da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcXRNA-GFP sob condições normais de nutrientes.....	83

Tabela 5. Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcALPH1-GFP sob condições de estresse nutricional.....	85
Gráfico 4. Volcano Plot da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcALPH1-GFP sob condições normais de estresse nutricional .....	85
Tabela 6. Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional .....	86
Gráfico 5. Volcano Plot da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcXRNA-GFP sob condições normais de estresse nutricional.....	87
Figura 32. Análise de sequência da proteína C4B63_46g53 pelo <i>software</i> Pfam e Phyre2.....	89
Figura 33. Análise de possíveis clones nocautes/heminocautes para os genes TcALPH1 e TcXRNA. ....	90
Figura 34. Dinâmica das proteínas TcALPH1 e TcXRNA nos grânulos de RNAs, durante condições normais e de estresse nutricional .....	94

## SUMÁRIO

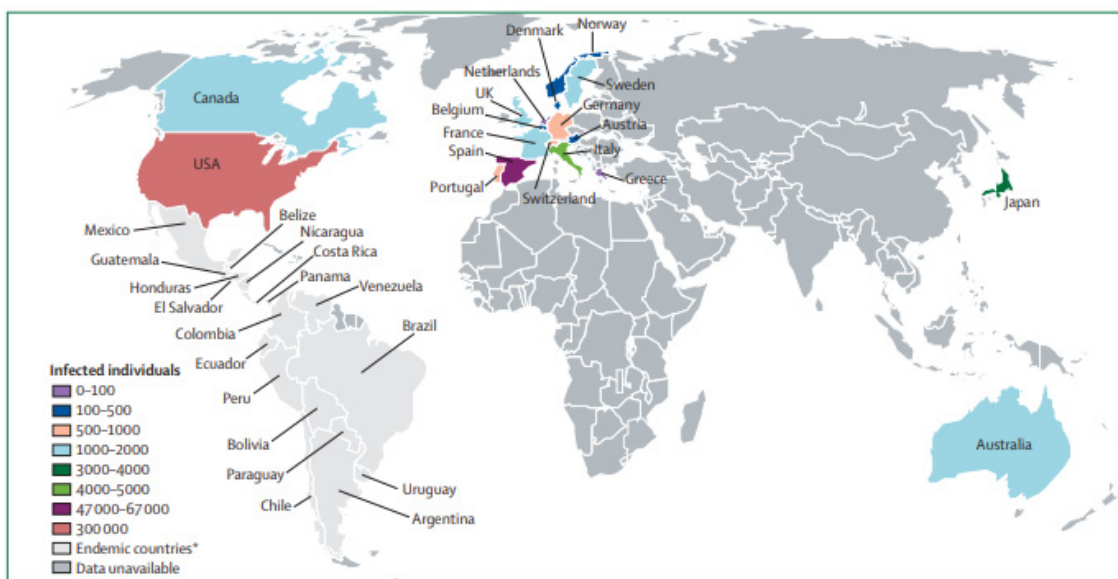
1.	INTRODUÇÃO	10
1.1	A DOENÇA DE CHAGAS .....	10
1.2	O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	12
1.3	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	15
1.4	GRÂNULOS DE RNAs EM EUCARIOTOS .....	17
1.4.1	GRÂNULOS DE RNAs EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	20
1.5	DEGRADAÇÃO DE RNAm GERAL .....	22
1.7	DEGRADAÇÃO DE RNA EM TRIPANOSOMATÍDEOS .....	25
1.8	A ALPH1 .....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1	Objetivo geral .....	31
2.2	Objetivos específicos .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	Soluções e tampões.....	31
3.2	Meios de cultivo .....	33
3.3	Cultivo de parasitas selvagens e transfectantes .....	33
3.4	Construção de vetores para expressão das proteínas fusionadas à GFP ...	34
3.5	Caracterização do crescimento celular de parasitas transfectantes e selvagens .....	36
3.6	Clonagem da versão truncada do gene TcALPH1 em pDONR221.....	36
3.7	Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes para produção de anticorpos policlonais .....	38
3.8	Inoculação das proteínas recombinantes purificadas em camundongos e coelhos para produção de anticorpos policlonais.....	41
3.9	Análise da expressão das proteínas de interesse em parasitas selvagens e transfectantes por ensaios de Western blot .....	42
3.10	Avaliação da localização subcelular de TcALPH1 e TcXRNA em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
3.11	Identificação dos parceiros de TcALPH1 e TcXRNA por ensaios de imunoprecipitação .....	44
3.11.1	Expressão e Purificação dos <i>nanobodies</i> recombinantes .....	44
3.11.2	Conjugação de Dynabeads com os <i>nanobodies</i> recombinantes.....	45
3.11.3	Imunoprecipitação das proteínas TcALPH1 e TcXRNA em epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse nutricional .....	46

3.12	Nocaut de genes TcALPH1 e TcXRNA .....	48
3.12.1	Transcrição <i>in vitro</i> para obtenção dos RNAs.....	50
3.12.2	Transfecção dos RNAs em parasitas transfectantes Cas9-GFP .....	51
3.12.3	Seleção dos clones nocautes e heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA ..	53
4	RESULTADOS .....	54
4.1	Identificação dos genes de interesse .....	54
4.2	Clonagem de TcALPH1 em vetor pTcGWGFP e transfecção em <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	57
4.3	Caracterização dos parasitas transfectantes .....	58
4.4	Clonagem dos fragmentos gênicos de TcALPH1 em pDONR221 e pDEST17 ..	61
4.5	Expressão das versões truncadas das proteínas TcALPH1 e TcXRNA.....	65
4.6	Validação dos soros $\alpha$ -TcALPH1 e $\alpha$ -TcXRNA de camundongos.....	71
4.7	Localização subcelular das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP de parasitas transfectantes .....	75
4.8	Avaliação de possíveis parceiros funcionais de TcALPH1 e TcXRNA por ensaios de imunoprecipitação (IP) .....	77
4.9	Obtenção dos clones nocautes e heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA ..	89
5	DISCUSSÃO .....	91
6	CONCLUSÃO .....	96
7	PERSPECTIVAS .....	97
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98
9	ANEXOS .....	108

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase americana, é causada pelo protozoário homoflagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo uma enfermidade que afeta atualmente entre 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, apresentando uma maior incidência de casos na América Latina, região endêmica da doença (OMS, 2020). Entretanto, devido ao aumento do movimento populacional nas últimas décadas, a doença acometeu centros urbanos e se espalhou para outros continentes (Figura 1) (Rassi et al., 2010). A doença de Chagas foi descrita pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas que identificou o inseto hematófago *Triatoma infestans* como o agente transmissor, assim como o ciclo de vida do *T. cruzi* (Chagas, 1909).



**Figura 1** - Número estimado de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* que vivem em países não endêmicos.

**Fonte:** Adaptado de Rassi et al. 2010.

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas, uma delas a aguda e outra a crônica. A fase aguda ocorre dias após a infecção pelo parasita, sendo caracterizada por uma elevada parasitemia, onde é possível detectar a presença do protozoário no



sangue. Entretanto, na maioria dos casos os sintomas são ausentes, brandos ou inespecíficos, dificultando o diagnóstico da doença logo no início da infecção. Os pacientes que desenvolvem os sintomas característicos da fase aguda (representando menos de 50% dos infectados), podem apresentar pálpebras inchadas (sinal de Romaña), lesões na pele (se transmitido pelo inseto vetor), dor de cabeça e muscular, inchaço das glândulas linfáticas, inchaço e dor abdominal ou torácica, dificuldade de respirar e febre (OMS, 2020).

Aproximadamente 2 meses após a fase aguda inicial, ocorre a diminuição da parasitemia e o protozoário permanece em um estado de latência em tecidos, podendo ser encontrados principalmente dentro das células do coração e dos músculos digestivos, dando início a fase crônica, onde grande parte dos pacientes são assintomáticos. No entanto, ao longo dos anos, uma parcela dos pacientes (entre 10% - 30%), desenvolvem cardiomiopatia chagásica, problemas gastrointestinais e em uma frequência menor, alterações no sistema nervoso periférico (Boscardin et al., 2010; OMS, 2020).

Atualmente, existem duas drogas nitroheterocíclicas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas, sendo elas o nifurtimox (medicamento proibido no Brasil, devido aos efeitos colaterais exacerbados), e o benzonidazol. Entretanto, tais medicamentos só apresentam eficácia na fase aguda, ou em casos de infecções congênitas e reativadas, sendo ineficaz na fase crônica (Urbina, 2010). Além da ineficácia destes medicamentos no estágio avançado da doença, os efeitos colaterais são diversos. O uso de nifurtimox está associado com problemas gastrointestinais, neuropsiquiátricos e sintomas respiratórios, já o benzonidazol está associado principalmente a problemas mucocutâneos (Jackson et al. 2019). Além disso, algumas cepas de *T. cruzi* possuem resistência a esses medicamentos, tornando o tratamento ineficaz (Campos, et al., 2014).

Até o momento, não existem vacinas para a doença de Chagas, tornando a prevenção e o controle da transmissão, fatores cruciais para reduzir a quantidade de novos casos. Cabe ressaltar, que diversos movimentos objetivando a redução do inseto vetor foram realizadas nas últimas décadas no Brasil, dos quais culminaram na redução da transmissão pelo hematófago (Silva et al. 2011). No entanto, o parasita pode ser transmitido por diferentes formas, tais como transfusão de sangue,

transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e por alimentos contaminados principalmente por fezes do inseto vetor (Molina, 2018).

Diante das diversas formas não vetoriais de transmissão anteriormente descritas, dos atuais tratamentos pouco eficazes para a doença de Chagas, pela inexistência de uma vacina, assim como a dispersão da doença em outros continentes não endêmicos, é de suma importância uma busca por novos alvos terapêuticos no parasita, e conseqüentemente novos inibidores, mais específicos e menos tóxicos para a cura da Doença de Chagas. Para isso, é fundamental aprofundar o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação e sobrevivência do parasita, como, por exemplo, a regulação da expressão gênica estágio específica. Vale enfatizar, que o *T. cruzi* possui diferentes peculiaridades biológicas, pois são organismos que divergiram evolutivamente dos demais eucariotos, tornando-se um importante modelo de estudo, como descrito a seguir.

## 1.2 O *TRYPANOSOMA CRUZI*

O protozoário *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, e família Tripanosomatidae, classificação dada a um grupo de parasitas que possuem de um a dois flagelos originados da bolsa flagelar, sendo localizados na região anterior ou posterior, dependendo do estágio do ciclo de vida. A família Tripanosomatidae é composta por parasitas monoaxênicos (possuem apenas um hospedeiro vertebrado), e heteroaxênicos (alternam entre dois hospedeiros) (Votýpka, 2015). Além disso, os protozoários que pertencem a essa classificação, possuem uma estrutura morfológica peculiar denominada cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (De Souza, 2009). Dentre os vários membros dessa família, vale destacar, além do *T. cruzi*, o *T. brucei*, causador da tripanossomíase africana, e várias espécies do gênero *Leishmania* causadoras das variadas formas de Leishmanioses (Votýpka, 2015).

O *T. cruzi* é um protozoário heteroaxênico, ou seja, durante o seu ciclo de vida o parasita alterna entre um hospedeiro invertebrado (inseto vetor) e um hospedeiro vertebrado (mamíferos). O inseto transmissor da doença é um hematófago triatomíneo da família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, cujos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma*

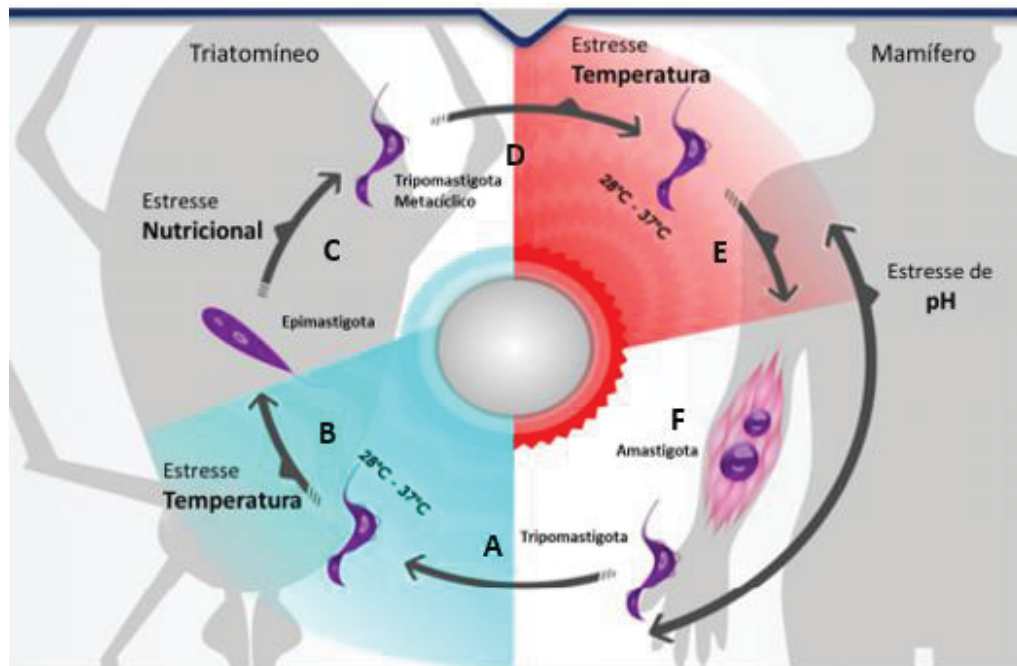
e *Rhodnius* possuem maior relevância epidemiológica (Chagas, 1909; Bern et al., 2011).

Ao se alimentar do sangue infectado do hospedeiro vertebrado, o inseto triatomíneo se contamina com formas tripomastigotas sanguíneas do parasita (Figura 2 A), que posteriormente sofrerão um processo de diferenciação celular em formas replicativas epimastigotas no estômago do hematófago, dando início ao ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. As formas epimastigotas migram para o intestino do inseto através do trato digestivo, ambiente onde possui as condições de nutrientes e temperatura necessários para o processo de replicação e fissão binária (Figura 2 B). Conforme o parasita avança no intestino, as condições nutricionais e de pH se tornam desfavoráveis, promovendo um estresse no protozoário, desencadeando tanto um processo de adesão celular na parede do intestino, assim como a diferenciação celular em formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 2 C), fenômeno denominado metaciclogênese. A metaciclogênese promove alterações metabólicas e morfológicas no parasita, culminando no reposicionamento do cinetoplasto e do flagelo na região posterior ao núcleo. Formas metacíclicas deste protozoário são altamente infectivas, podendo ser localizados na porção final do intestino, e por conseguinte, nas fezes do inseto (Epting et al., 2012).

Protozoários tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes do Triatomíneo, podem entrar em contato com a circulação sanguínea do mamífero se o indivíduo coçar o local da picada, ou se o parasita entrar em contato com a mucosa (Figura 2 D). Logo após o contágio inicial, células presentes no local da infecção primária, tais como macrófagos locais, assim como fibroblastos e demais tecidos mesenquimais, são invadidos pelo protozoário. Conforme a infecção progride, o parasita migra para outros tecidos do organismo, podendo variar o tropismo específico de tecidos entre as cepas de *T. cruzi*. Após a invasão da célula hospedeira, o parasita sofre um processo de diferenciação celular em formas replicativas intracelulares denominadas amastigotas (processo conhecido como amastigogênese) (Figura 2 F), onde o parasita assume um formato arredondado e perde grande parte da estrutura flagelar (Epting et al., 2012).

Após consecutivas replicações no meio intracelular, o parasita passa a se diferenciar em formas tripomastigotas. Devido à alta quantidade de parasitas em

movimento dentro da célula hospedeira, ocorre a lise da membrana da mesma, liberando mais protozoários com capacidade infectiva no meio extracelular. Como consequência, ocorre a invasão de novas células. Se caso o inseto triatomíneo se alimentar do sangue infectado do hospedeiro mamífero, o ciclo se completa (Epting et al., 2012).



**Figura 2** – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e os diferentes tipos de estresse extracelulares durante o mesmo. (A) Hematófago se alimenta do sangue infectado com formas tripomastigotas, gerando estresse no parasita devido à queda de temperatura de 37° para 28°C ocasionado pela alteração do hospedeiro. (B) No estômago do hematófago, o parasita sofre diferenciação celular para formas epimastigotas, devido a condições nutricionais favoráveis. (C) Ao se aproximar da porção final do intestino do Triatomíneo, as condições nutricionais se tornam desfavoráveis, culminando na diferenciação celular do parasita em formas tripomastigotas metacíclicas, podendo ser encontrado nas fezes do hematófago. (D) Formas tripomastigotas metacíclicas encontradas nas fezes do barbeiro, infectam o hospedeiro vertebrado após a picada do inseto, sofrendo estresse por aumento de temperatura de 28°C para 37°C. (E) Formas metacíclicas infectam células do hospedeiro vertebrado. No meio intracelular, a variação de pH dentro do vacúolo parasitóforo ocasiona estresse no parasita, promovendo um processo de diferenciação em formas amastigotas. (F) Amastigotas passam a se replicar no meio intracelular, causando a lise da membrana da célula hospedeira, liberando formas tripomastigotas celulares infectivas.

Fonte: Adaptado de Alves & Goldenberg, 2016.

As alterações morfológicas que o *T. cruzi* apresenta durante os distintos estágios do seu ciclo de vida (Figura 2), são respostas adaptativas geradas pelas variações nas condições ambientais fornecidas pelo hospedeiro, permitindo que o parasita alterne entre formas replicativas e infectivas conforme a disponibilidade de nutrientes, assim como condições físicas (pH e temperatura). A rápida adaptação deste parasita em diferentes condições, é promovida pela regulação da expressão de diferentes genes, capazes de mudar o metabolismo deste parasita (Alves & Goldenberg, 2016), como será descrito a seguir.

### 1.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Como anteriormente descrito, o *T. cruzi* sofre mudanças morfológicas ao longo do seu ciclo de vida, promovidas pelas alterações físicas e nutricionais do ambiente do hospedeiro. A resposta adaptativa deste organismo se deve a regulação da expressão gênica, capaz de não somente promover a mudança na estrutura morfológica do parasita, mas também no padrão de expressão de proteínas, principalmente de superfície celular, responsáveis tanto pela interação com células hospedeiras, assim como na captação de diferentes nutrientes. Alterações no metabolismo de açúcares, lipídeos e proteínas também são processos altamente regulados durante a resposta ao estresse (Barisón et. al, 2017).

A regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos é semelhante ao demais eucariotos, entretanto, existem algumas peculiaridades características desses organismos. Dentre essas características, vale enfatizar a ausência de sequências promotoras canônicas para a RNA polimerase II, e a transcrição indiscriminada de vários genes não relacionados por função em uma unidade policistrônica (pré-RNA<sub>m</sub> policistrônico). Este último processo, é denominado de transcrição policistrônica, e gera transcritos que passarão por *trans-splicing*, mecanismo que consiste na adição de uma sequência de 39 nucleotídeos na extremidade 5' do pré-RNA<sub>m</sub>, conhecida como mini-exon ou *spliced leader* (SL) (Kramer, 2011). Além disso, a estrutura do *cap* do RNA<sub>m</sub> dos tripanosomatídeos é única onde o resíduo m<sup>7</sup>GTP adicionado é seguido por quatro nucleotídeos metilados formando a estrutura cap4 (Perry et. al.,



1987). Simultaneamente a adição do mini-exon, ocorre a adição de adeninas na extremidade 3' do pré-RNA, processo conhecido como poliadenilação (Clayton, 2019; Kramer, 2017). O processo de *trans-splicing* e poliadenilação geram unidades monocistrônicas de RNA com a sequência do mini-exon na extremidade 5', assim como a cauda poli A na extremidade 3', permitindo que o RNA maduro seja exportado do núcleo para o citoplasma (Clayton, 2019).

Embora muitas evidências apontem que a RNA polimerase II realize em uma taxa muito semelhante a transcrição de diferentes genes codificantes para proteínas, o nível de expressão desses genes difere entre si. Além disso, um mesmo gene pode diferir em seu nível de expressão conforme as condições ambientais as quais o parasita é submetido (Kramer, 2011).

Portanto, fatores como a ausência de promotores canônicos para a RNA Polimerase II, a transcrição policistrônica de genes não relacionados em função, o processamento do RNA por *trans-splicing* e a variação na taxa de expressão de genes nos diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, evidenciam que regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos ocorra majoritariamente em nível pós-transcricional (Kramer, 2011).

O controle da expressão dos genes após a etapa de transcrição pode ocorrer em várias etapas, entre elas se destacam: transporte do RNA presente no núcleo para o citoplasma; tradução do RNA para proteínas; estocagem ou degradação de RNA; manutenção/estabilidade proteica e modificações pós-traducionais (Clayton, 2007).

Nesse contexto, o controle da estabilidade dos RNA atua como evento central na regulação pós transcricional. Logo no início da síntese dos pré-RNA, diferentes fatores regulatórios denominados *trans-acting* (RNAs ou proteínas) se associam a regiões não traduzíveis (*untranslated region - UTR*) nas extremidades 3' e 5' do transcrito (elemento *cis-acting*), podendo atuar tanto positivamente como negativamente na estabilidade do RNA (Gaudenzi et. al, 2005). As proteínas com domínio de ligação ao RNA (RBPs) são um exemplo desses fatores, que de maneira coordenada atuam no direcionamento de RNA alvos a complexos de tradução, estocagem e/ou degradação, permitindo que a célula responda rapidamente a variações ambientais (Keene & Lager, 2005, Keene, 2007;).

Esta coordenação, principalmente em nível de estabilidade e tradução do RNAm, fornece a base para a teoria dos “RNA *Regulons*” proposta por Jack Keenes em 2007. Essa teoria sugere que elementos *trans-acting* atuem de maneira combinatória, associando-se a transcritos através dos elementos *cis-acting* e regulando de maneira coordenada o metabolismo de RNAm traduzíveis em proteínas funcionalmente relacionadas (Keene, 2007; Keene & Lager, 2005).

Portanto, o metabolismo de RNAm em tripanosomatídeos é altamente regulado por estruturas organizadas que podem recrutar transcritos específicos, e direcioná-los tanto para complexos de tradução nos polissomos, como para complexos de estocagem e degradação no citoplasma. Estes eventos são regulados por estruturas granulares altamente dinâmicas, que modulam o ciclo dos RNAs presentes nas células (Anderson & Kedersha, 2006).

#### 1.4 GRÂNULOS DE RNAs EM EUCARIOTOS

O controle da tradução, degradação e localização subcelular dos RNAm maduros são aspectos chaves para a regulação da expressão gênica. O equilíbrio dinâmico destes eventos é dependente da localização subcelular dos RNAm citosólicos. Os RNAm que estão sendo traduzidos são encontrados em polissomos, já uma parcela dos RNAm não traduzidos podem se encontrar em estruturas granulares responsáveis pela sua estocagem e degradação (Anderson & Kedersha, 2006). Os grânulos de RNAs são estruturas constituídas por ribonucleoproteínas (RNPs), sendo formados na resposta a variações das condições ambientais, ou na presença de RNAm não traduzidos. Proteínas que medeiam o processo de *splicing*, transcrição, sinalização e adesão, estão integradas na montagem destes grânulos. Em eucariotos tais como leveduras e mamíferos, os complexos granulares mais bem compreendidos são os *Processing-bodies* (*P-bodies*) e os grânulos de estresse (GEs) (Anderson & Kedersha, 2006).

*P-bodies* são estruturas constitutivamente presentes nas células, e o número e tamanho destas estruturas se correlacionam diretamente com os níveis citoplasmáticos de RNAm não polissômicos, ou seja, se há muitos RNAm nos polissomos estes grânulos diminuem, se há muitos RNAm dissociados dos

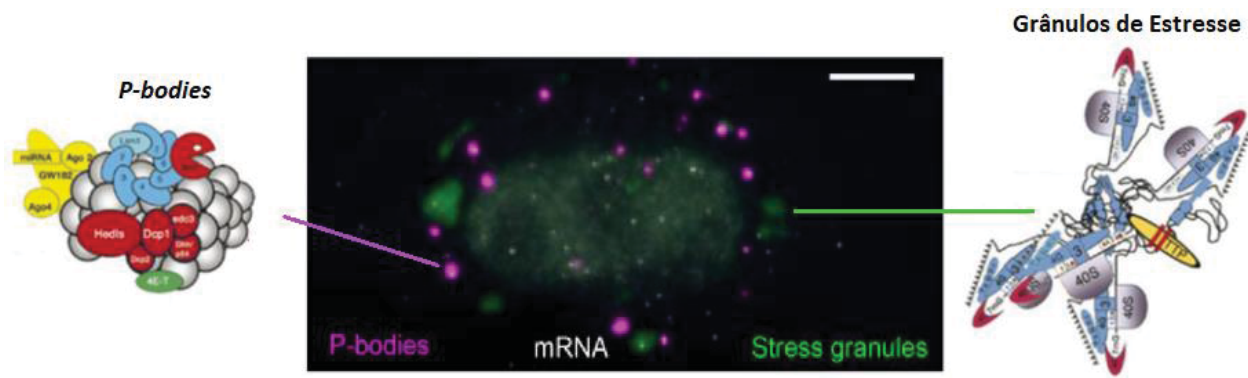
polissomos estes grânulos aumentam. Os *P-bodies* parecem estar relacionados à degradação de RNAm. Estes grânulos são enriquecidos com proteínas envolvidas no processo de decaimento de RNAs, tais como Edcp3, Edcp4/Ge-1, DHH1/RCK, Xrn1, DCP1 e DCP2, Pat1, SCD6, Lsm1-7. (Fritz et al., 2015).

A montagem e desmontagem de *P-bodies* são dependentes inicialmente do recrutamento de RNAm não traduzíveis, pela associação de mRNPs que se agregam entre si. Ling e colaboradores (2008) mostram que em *Drosophila*, Edcp3 é responsável pela formação do complexo, através do domínio conservado Yjef-N que promove essa auto-agregação entre mRNPs, embora sua depleção não iniba a formação de *P-bodies* (Ling et al., 2008). Yu (2005) por outro lado, mostra através do *knock down* e superexpressão das porções C e N terminal de Edcp4/Ge-1, que a montagem de *P-bodies* é dependente do domínio  $\psi$  (X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>) presente nesta proteína, auxiliando no recrutamento das proteínas *decapping* DCP1 e DCP2 (descritas na seção 1.6) em mamíferos para o complexo granular (Yu, 2005).

Já os grânulos de estresse (GEs), que estão relacionados com uma resposta a variações das condições ambientais, são formados quando há uma situação de estresse celular, podendo ser físico (pH e temperatura) ou nutricional. A função deste grânulo é armazenar RNAm durante o estresse celular. Em GEs, são encontrados complexos de início de tradução e subunidades ribossomais, tais como PABP1, eIF2 $\alpha$ , eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G (Decker & Parker, 2012; Fritz et al., 2015). Além disso, proteínas envolvidas com o silenciamento do RNAm, também são encontradas em GEs. Dentre elas, vale destacar a TIA-1 (associada a regulação do *splicing* alternativo), STAU1 (RBP envolvida na regulação da tradução), Rap55/Lsm14 (transportador de RNAm entre *P-bodies* e SGs), Pumilio 2/ PUM (associado com a inibição traducional) e CPEB (regulador traducional). Pelo fato dos GEs possuírem como principal função o armazenamento de RNAm, muitas proteínas envolvidas com a estabilidade destas moléculas, também são encontradas nestes grânulos. Neste grupo, a RNA helicase RCK, HuR (RBP envolvida no processo de diferenciação celular), ZBP1, PMR1 (regulador de decaimento de RNA), TTP (*zinc finger* envolvido no processo de desadenilação) e FBP (regulador transcricional) podem estar presentes são componentes que participam da regulação da estabilidade de RNAs (Anderson & Kerdesha, 2007).

Em mamíferos, a formação de GEs se dá inicialmente pela fosforilação do fator eIF2 $\alpha$ , impedindo que o complexo de tradução seja formado, permitindo que transcritos se associem a subunidades ribossomais 48S, formando RNPs livres. Os RNPs por sua vez, agregam-se entre si através de proteínas com domínios de ligação à RNAs (RRM, da sigla em inglês *RNA Recognition Motif*) tais como G3BP, TTP, FMRP e TIA-1, cada qual se liga preferencialmente a transcritos específicos, dependendo do tipo de estímulo externo que promoveu o estresse celular. Dessa forma, a célula consegue gerar uma resposta precisa para diferentes condições ambientais adversas, armazenando RNAm específicos em grânulos de estresse (Anderson & Kerdesha, 2007).

Os *P-bodies* e GEs podem interagir entre si e compartilharem as mesmas espécies de RNAm, proteínas, substratos e outros componentes celulares de forma coordenada e dinâmica. Em leveduras, por exemplo, ambos os complexos granulares se sobrepõem parcialmente, enquanto em mamíferos são encontrados um ao lado do outro. O compartilhamento de mRNPs são uma das principais características das interações entre grânulos. Os RNAm que estão presentes em *P-bodies*, podem retornar à tradução ou serem direcionados para grânulos de estresse celular, através da remodelagem e posterior compartilhamento de mRNPs entre estes complexos. Da mesma forma, RNAm presentes em grânulos de estresse podem ser direcionados para a tradução em polissomos, ou serem conduzidos para os *P-bodies*. Esse mecanismo, determina se um RNAm será estocado, degradado ou traduzido. Um dos fatores que sustentam essa hipótese, é que muitas proteínas que são classicamente encontradas em *P-bodies*, passam a ser localizadas em GEs após estresse celular, como é o caso do repressor traducional RCK humano (homólogo de DHH1 de leveduras) (Buchan & Parker. 2009; Buchan et al., 2008). Além disso, mutações que geram a diminuição de *P-bodies* em leveduras ocasionam a inibição da formação de GEs sob condições de privatização de glicose (Buchan & Parker. 2009). A Figura 3, mostra uma imunofluorescência das interações entre grânulos de estresse e *P-bodies* de uma célula eucariótica.



**Figura 3** – Imagem de imunofluorescência de *P-bodies* (magenta, marcado por DDX6 fundido com TagRFP) interagindo com grânulos de estresse (verde, marcado por G3BP1 fundido com GFP) de uma célula U2OS durante estresse. Barra: 5  $\mu$ m.

Fonte: Adaptado de Tian et al., 2020.

#### 1.4.1 GRÂNULOS DE RNAs EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Nosso grupo foi pioneiro em identificar grânulos de RNA semelhantes aos *P-bodies* em *T. cruzi* [Holetz et al., 2007; Dallagiovanna et al., 2008]. A partir de então, vários trabalhos têm descrito a presença de diferentes grânulos de mRNP em *T. cruzi* e *T. brucei*. Em *T. cruzi* por exemplo, já foi realizada a caracterização da DEAD-box helicase TcDHH1 e do ortólogo da proteína Xrn1 (TcXRNA), onde foi identificada a presença destas proteínas em *foci* citoplasmáticos semelhante a estruturas de PBs (Holetz et al., 2007; Cassola et al. 2007; Costa et al., 2018). Além disso, os grânulos *P-bodies like* de *T. cruzi* contém proteínas envolvidas tanto na desestabilização de RNAm, como é o caso da TcPUF6, assim como na estabilização de RNAm alvos, tais como a TcUBP1 (Dallagiovanna, et al., 2008; Cassola, 2011). Já os GEs de tripanosomatídeos são semelhantes aos de mamíferos, sendo constituídos por subunidades ribossomais 40S, proteínas de ligação a poli (A) como é o caso da PABP1 e PABP2, SCD6 isoformas do fator de tradução eIF2, eIF3, eIF4E e eIF4G, eIF2 $\alpha$  e eIF3B, e a helicase DHH1 (Holetz et al., 2007; Kramer, 2008; Holetz et al., 2010; Fritz et al., 2015).

Os PBs e GEs podem ser contemplados entre pelo menos seis tipos diferentes de grânulos de mRNP em tripanosomatídeos (Kramer, 2014). Este vasto repertório de grânulos pode ser justificado como uma adaptação à perda do controle transcricional.



Os grânulos perinucleares (GPNs) são estruturas localizadas na periferia do núcleo celular, e são compostos por proteínas envolvidas no processo de degradação de RNAm e da iniciação da tradução. Sua formação está relacionada com a inibição do mecanismo de *trans-splicing*, que resulta no acúmulo de precursores de RNAm policistrônicos. Estas estruturas se encontram associadas a poros nucleares, sugerindo uma possível função na regulação da exportação, no controle de qualidade e no possível endereçamento de RNAm (Sheth, 2010).

A proteína TcXRNA é um dos principais componentes presentes nos GPNs, sendo encontrada especialmente em epimastigotas replicativos de *T. cruzi*, apesar de também ser encontrada, porém em uma menor quantidade, em tripomastigotas metacíclicos (Costa, 2018). A proteína TcDHH1, além de ser uma proteína encontrada em *P-bodies*, também está presente em GPNs, e co-localiza parcialmente com TcXRNA em *T. cruzi* sob condições normais e de estresse nutricional, sugerindo um possível compartimento regulatório envolvendo a atividade dos grânulos de mRNP na periferia nuclear (Holetz, 2007; Costa, et al., 2018). Em *T. brucei*, além de XRNA e DHH1, também é encontrado outras proteínas em GPNs, tais como CAF1, SCD6, UPF1, eIF4E1, VASA, eIF4E3 e PABP2 (Holetz, 2007; Revisado por Kramer, 2012; Costa, et al., 2018).

Os grânulos de estresse nutricional (GENs) estão presentes em *T. cruzi* e *T. brucei* em condições de baixa disponibilidade de nutrientes. Estas estruturas são formadas para o armazenamento de RNAm, evitando dessa maneira sua degradação durante o período de estresse. Esse mecanismo mantém um armazenamento basal de transcritos, permitindo o crescimento do parasita quando as condições nutricionais forem adequadas. Proteínas ligadoras de RNA tais como DHH1, DRBD3, SCD6, XRNA, eIF4E1-3, PABP1 e PABP2, são encontradas em GENs (Cassola et al., 2007; Kramer, 2013).

Os grânulos de choque térmico são formados em resposta a uma variação brusca de temperatura. Em formas procíclicas de *T. brucei*, a alteração de temperatura induz a dissociação rápida e reversível dos polissomos, culminando no aumento de RNAm citoplasmáticos e seu direcionamento para grânulos semelhantes a *P-bodies*. Entretanto, nestes grânulos é encontrado tanto proteínas marcadoras de *P-bodies* tais como XRNA e DHH1, assim como proteínas de início de tradução. A função deste tipo

de grânulo ainda não é compreendida, entretanto, estudos vêm estabelecendo sua relação com grânulos de polo posterior (Kramer et al., 2008).

Os grânulos de polo posterior estão intimamente relacionados com o choque térmico na célula. Em *T. brucei* por exemplo, há um acréscimo significativo de tamanho deste grânulo quando há uma variação brusca de temperatura. Já é sabido que neste grânulo são encontradas proteínas relacionadas a degradação de RNAm, tais como XRNA (Kramer, 2008). Até então, a função deste grânulo permanecia incompreendida. Entretanto, Kramer (2017) identificou que esta estrutura esteja possivelmente regulando globalmente a estabilidade de RNAm em *T. brucei*, armazenando proteínas que participam ativamente da degradação de RNAm (Kramer, 2017).

Embora fique evidente a importância do controle da tradução e do controle da estabilidade dos mRNAs na regulação da expressão gênica, a conexão entre os grânulos de mRNP e a regulação durante o ciclo de vida permanece desconhecida nestes parasitas. Dessa maneira, a identificação das proteínas e RNAs que constituem estas estruturas é a chave para elucidar os diferentes mecanismos que regulam o armazenamento e estabilidade dos RNAm.

Visto que a degradação de RNAm é um dos mecanismos chaves para a adaptação do *T. cruzi* nos diferentes estágios do seu ciclo de vida, será descrito a seguir como ocorre o decaimento de RNAs nestes parasitas, e quais são as principais proteínas envolvidas neste processo.

## 1.5 DEGRADAÇÃO DE RNAm GERAL

A degradação de RNAm é um mecanismo essencial para o controle do ciclo do RNA, pois é um processo responsável pelo tempo de meia vida de RNAm (*turnover*). Tal evento, permite que a célula regule a estabilidade de transcritos incorretos, assim como a permanência e o acúmulo de RNAm presentes no citoplasma, refletindo diretamente no perfil de expressão proteica, o que possibilita uma rápida resposta celular a variações ambientais (Tourrière, 2002).

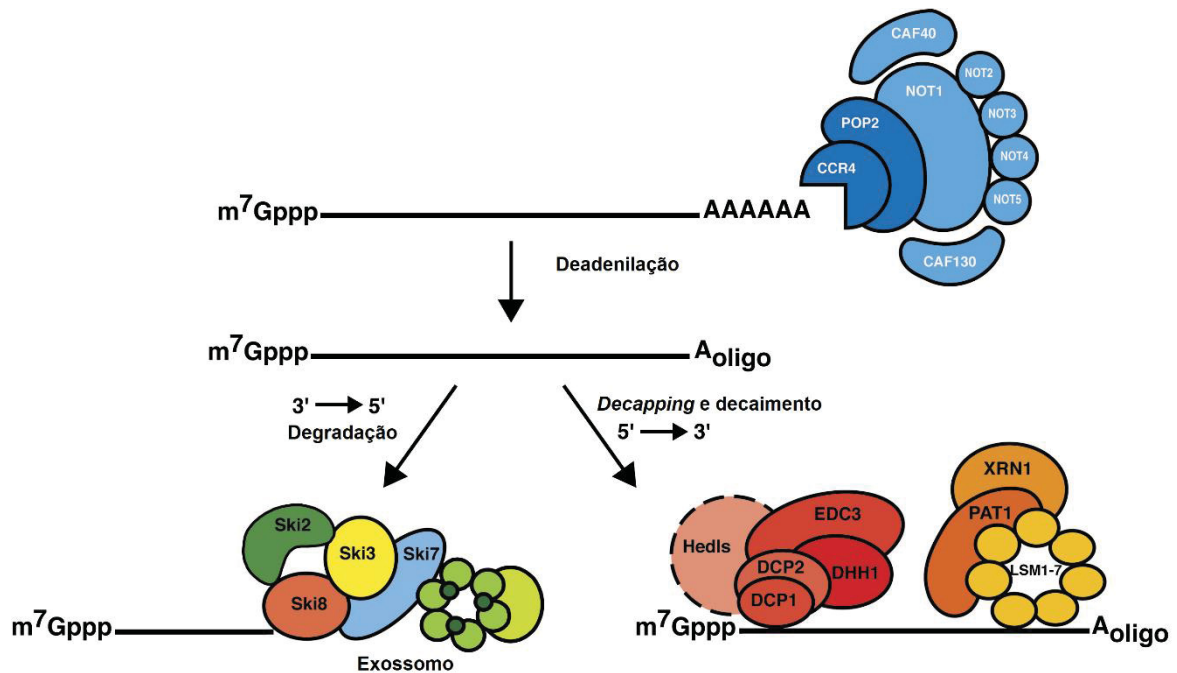
A degradação de RNAm em eucariotos ocorre no citoplasma e no núcleo, sendo neste último em menor proporção. A degradação no núcleo se dá pelo complexo de poliadenilação TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p), que desestabiliza a cauda poli-A, culminando na aceleração do decaimento de vários RNAm e RNAr mediado pelo exossomo nuclear. De acordo com Nagarajan e colaboradores (2013), em leveduras, a degradação de RNAm nucleares se dá pela exonuclease XRN2 (Rat1), após a remoção do *cap* do RNA promovido pelo complexo LSM2-8. Vale ressaltar que várias proteínas da família XRN estão envolvidas ativamente com o metabolismo de RNAs, tanto na degradação de RNAm, assim como terminação da transcrição, na maturação de RNAr e no silenciamento de RNAm (Nagarajan et al., 2013).

Já no citoplasma, a degradação de RNAs ocorre majoritariamente pela via dependente de desadenilação, tanto em mamíferos como em leveduras. Nesta via, o processo de desadenilação é o fator limitante para que ocorra a degradação de RNAm, e consiste na remoção progressiva de adeninas da cauda poli-A presente na extremidade 3' no RNAm promovida pelo complexo de deadenilases CCR4-CAF1-NOT, PAN2/PAN3 ou PARN (ribonuclease específica de poli-A) (Erben et al., 2014; Nagarajan et al., 2013).

A remoção da cauda poli A do RNA permite seu direcionamento para a degradação tanto no sentido 5'→3' através da remoção inicial do *cap* presente na extremidade 5', assim como no sentido 3'→5' promovida pelo exossomo. A Figura 4 mostra uma representação das duas vias de degradação, com suas respectivas proteínas envolvidas ao longo do processamento do RNAm. A via de degradação 3'→5' envolve a digestão ribonucleolítica da região 3' do RNAm deadenilado pelo exossomo, um complexo macromolecular em forma de barril, constituído por seis subunidades (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp4 e Mtr3) que possuem atividade catalítica inativa de exoribonuclease 3'→5'. Para que o complexo de degradação seja formado, o núcleo do exossomo pode se associar a outras subunidades com atividade cataliticamente ativa, tais como o complexo multiproteico Ski (Ski2, Ski3, Ski8 e Ski7), a endonuclease DIS3/Rrp44 na região inferior do barril, ou a exoribonuclease Rrp6 na região da tampa do barril, promovendo variações na sua localização subcelular. Por fim, após a formação do complexo exossômico e posterior degradação do RNAm, ocorre a hidrólise do *cap* pela enzima DCPS, do tipo *decapping*. Vale ressaltar, que existem outras proteínas de *decapping* envolvidas no decaimento do RNAm no

sentido 3'→5', tendo como exemplo a SOV, uma proteína de *Arabidopsis*, membro da mesma família de DIS3/Rrp44, que não possui o domínio PIN (domínio necessário para interação com o exossomo), porém contém um domínio de RNase II. Já foram identificados homólogos de SOV (DIS3L2) em *Schizosaccharomyces pombe* e humanos, os quais degradam o substrato de forma independente do exossomo, evidenciando que existem rotas alternativas para a degradação de RNAm em diferentes organismos (Nargarajan et al., 2013; Kilchert et al., 2016).

A via de degradação no sentido 5'→3' (via dominante em células eucarióticas) ocorre inicialmente pelo recrutamento dos RNAsm até o complexo de *decapping* (DCP1 e DCP2) realizada pelo complexo proteico LSM1-7 que se liga a região 3' do RNAm. LSM1-7 também é responsável pelo recrutamento da helicase DHH1, uma DEAD box que participa da modulação do decapeamento. Em seguida, a proteína *decapping* DCP2 com o auxílio de cofatores, realiza a hidrólise do *cap* 5' entre os grupamentos fosfatos  $\alpha$  e  $\beta$ , gerando um resíduo  $^7\text{GDP}$ , expondo a extremidade 5' do RNA monofosforilado à XRN1, uma exoribonuclease que hidrolisa o RNA (Sweet et al., 2012; Kramer et al., 2009; Nagarajan et al., 2013). Vale enfatizar, que em eucariotos existem proteínas que modulam este processo de degradação, como é o caso das proteínas Edc3 e Pat1, que possuem a função de intensificar a atividade do complexo de decapeamento DCP1/DCP2, através do recrutamento do complexo LSM1-7. Enquanto Edc3 e Pat1 recrutam DCP2, Pat1 se liga ao complexo LSM1-7, por onde é mediada a ligação de RNAm desadenilados (Nissan et al., 2010; Kramer, 2017).



**Figura 4** - As vias gerais e complexos de nuclease para degradação de RNAm eucarióticos, sendo elucidado pelo complexo de desadenilação CAF1-NOT (CCR4, POP2, NOT1, NOT2, NOT3, NOT4, NOT5, CAF40, CAF130), seguida do direcionamento dos RNAm para o decaimento exonucleolítico no sentido 3'-5' promovido pelo exossomo e complexo Ski (Ski2, Ski3, Ski7, Ski8), e no sentido 5'-3' realizado pelo complexo de *decapping* (DCP1/DCP2), ativadores de *decapping* (LSM1-7, PAT1, DHH1 e EDC3) e degradação (XRN1).

Fonte: Adaptado de Parker & Seth, 2007.

## 1.7 DEGRADAÇÃO DE RNA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanossomatídeos apresentam os 3 complexos de desadenilases presentes em mamíferos, possuindo 3 proteínas homólogas de PARN, e os complexos CAF1-NOT e PAN2 participando ativamente do processo de desadenilação (Erben et al., 2014; Clayton., 2008; Nagarajan et al., 2013). Além disso, a composição do complexo do exossomo de tripanossomatídeos é semelhante ao de mamíferos e leveduras, possuindo pelo menos oito subunidades homólogas de exossomo (Estévez et al., 2001). Estes protozoários possuem grande parte das proteínas envolvidas no decaimento de RNAm via 5'→3', possuindo 6 exoribonucleases 5'→3' similares a XRN1 e XRN2 (XRNA, XRNB, XRNC, XRND e XRNF), assim como a helicase DHH1 e SCD6. A proteína XRNA possui a maior similaridade de sequência com XRN1 de leveduras, humanos e *Arabidopsis*, e a

depleção de XRNA em *T. brucei* por RNAi ocasiona a inibição do crescimento de formas procíclicas, além de um aumento do tempo de meia vida de RNAm (Li et al., 2006).

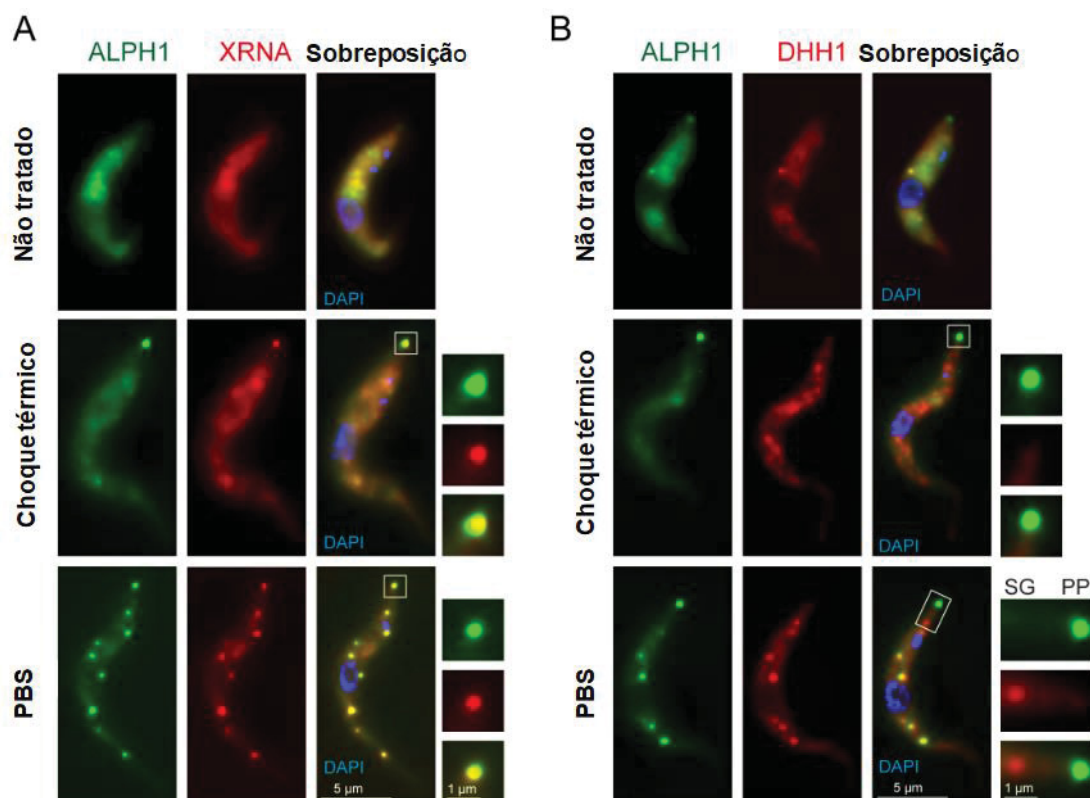
TcXRNA é constitutivamente expressa ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, apresenta localização citoplasmática granular, acumula-se ao redor do núcleo e co-localiza parcialmente com DHH1 (Costa et al., 2018). Já a enzima DCP2, embora seja amplamente distribuída pelo reino eucariótico, tais como leveduras, mamíferos e plantas, não possui homólogos em Kinetoplastidas. Além disso, em tripanosomatídeos, também não foram encontrados homólogos para as principais proteínas intensificadoras do complexo de *decapping*, tais como LSM1-7, Edc3 e Pat1, permanecendo incompreendido até o momento, como ocorre o processo de *decapping* nestes parasitas (Kramer, 2017). Apesar da ausência do complexo de *decapping*, a liberação de m<sup>7</sup>GDP de RNAm é detectável *in vitro* em tripanosomatídeos, evidenciando que há alguma via alternativa de *decapping* (Milone, 2002).

Uma das principais razões da divergência evolutiva do mecanismo de *decapping* entre Kinetoplastidas e os demais eucariotos, pode estar relacionada com a diferença na estrutura *cap* do RNAm. O *cap* do RNAm em tripanosomatídeos é do tipo 4 fortemente metilado, ou seja, os quatro primeiros nucleotídeos transcritos (AACU) possuem uma ribose 2'-O com metilações, além de metilações adicionais nas bases da primeira (m<sup>6</sup><sub>2</sub>A) e quarta (m<sup>3</sup>U) posição, necessitando dessa maneira, de uma enzima distinta do complexo de *decapping* DCP1/DCP2 (Bangs et al., 2021; Kramer, 2017). A estrutura *cap4* está presente em diferentes parasitas, tais como em *T. cruzi*, *T. brucei*, *Cristhidia faciculata*, *Leptomonas collosoma* e *Leishmania*, porém apresentam o mesmo padrão de metilações entre estes organismos. A conservação do *cap4* entre organismos de gêneros tão divergentes sugere que ele é comum entre todos os kinetoplastida (Bangs, 1992).

Em 2015, Fritz e colaboradores padronizaram um método de purificação de grânulos de estresse em *T. brucei* (Fritz et al., 2015). A partir das análises proteômicas destes grânulos, foi identificada a proteína TbALPH1 (ApaH-like phosphatase) como uma possível enzima que realiza a retirada do *cap4* de tripanosomatídeos. Em um outro trabalho do grupo, a depleção por RNAi (RNA de interferência) de TbALPH1 foi



letal para o parasita, causando um aumento massivo de RNAm deadenilados, mas que ainda não sofreram o processo de degradação. Vale destacar, que TbALPH1 co-localiza exclusivamente com TbXRNA em um grânulo no pólo posterior da célula sob condições de choque térmico e estresse nutricional, evidenciando uma conexão entre estas duas enzimas. Em contra partida, TbALPH1 co-localiza apenas parcialmente com DHH1. As duas proteínas se localizam em *P-bodies* e em grânulos de estresse nutricional, porém DHH1 não é encontrada no grânulo de polo posterior. A Figura 5 mostra a localização de TbALPH1, TbXRNA e TbDHH1 em *T. brucei*, sob condições de estresse nutricional e por choque térmico. Apesar do grânulo de polo posterior possuir duas enzimas (TbALPH1 e TbXRNA) envolvidas diretamente no decaimento de RNAm, não foram encontrados fragmentos intermediários de RNAm provenientes de degradação. Assim, a hipótese é que este grânulo mantenha as enzimas de degradação separadas do *pool* de RNAm no citoplasma, regulando globalmente a estabilidade dos RNAm na célula. Estes dados indicam que TbALPH1 atua a jusante da desadenilação e a montante da degradação de RNAm, caracterizando dessa maneira, a função de *decapping* desta enzima (Kramer, 2017).



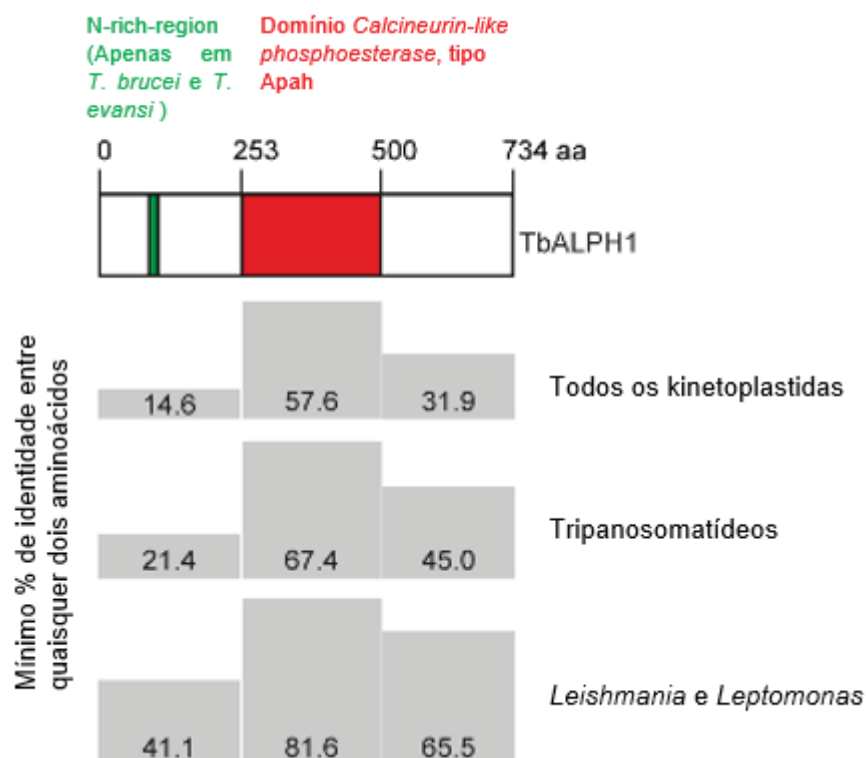
**Figura 5** – Co-localização das proteínas TbXRNA e TbDHH1 com TbALPH1 em *T. brucei* sob condições de estresse nutricional e por choque térmico. (A) As células que co-expressam XRNA-

mChFP e ALPH1-eYFP a partir de *loci* endógenos foram submetidas a choque térmico (41°C) ou estresse nutricional (PBS). O grânulo do pólo posterior é mostrado ampliado. (B) Células que coexpressam mChFP-DHH1 e ALPH1-eYFP de loci endógenos foram submetidas a choque térmico ou estresse nutricional (PBS). O grânulo do pólo posterior (PP) é mostrado ampliado; para as células tratadas com PBS, o aumento também inclui o grânulo de estresse mais posterior (GE) para mostrar a ausência de ALPH1.

Fonte: Kramer, 2017.

## 1.8 A ALPH1

ALPH1 é uma fosfoproteína fosfatase (*ApaH-like phosphatase*) específica de cinetoplastídeos de acordo com o banco de dados TriTrypDB. Esta proteína possui características semelhantes às fosfatases pertencentes ao subgrupo da família PPP denominado ApaH (Alph), que evoluíram a partir da enzima bacteriana ApaH, da qual possui como substrato um tetrafosfato de diadenosina, uma molécula que se assemelha ao *cap* do RNAm eucariótico. Uma das principais características que a classificam neste subgrupo (Alph), está nas modificações de sequência de aminoácidos de ALPH1 em *T. brucei*, onde há a presença de duas modificações no motivo PPP conservado GDXDRG, no qual o segundo aspartato é substituído por uma asparagina, e arginina é substituída por lisina (Kramer, 2017; Andreeva & Kutuzov, 2004). Inclusive, foi demonstrado *in vitro* que Apah bacteriano possui uma função análoga a TbALPH1 no processo de *decapping* de mRNAs bacterianos, a partir da clivagem de tetrafosfato de diadenosina em duas moléculas de ADP (Koonin, 1993). Além disso, o domínio *Calcinerium-like phosphoesterase*, responsável pela atividade de *decapping* de TbALPH1, possui uma identidade de 67.4 % entre tripanosomatídeos e 57.6 % dentre todos os Kinetoplastidas. Quando todas as sequências de ALPH1 de kinetoplastidas são alinhadas, há uma identidade mínima de 14,6%, 57,6% e 31,9% entre quaisquer duas sequências na região C-terminal, domínio catalítico e N terminal da proteína, respectivamente. A Figura 6 mostra a região onde está localizado o domínio catalítico da TbALPH1, assim como sua conservação entre os diferentes ortólogos kinetoplastidas (Kramer, 2017).



**Figura 6** – Desenho esquemático dos domínios de ALPH1 e conservação entre os diferentes ortólogos cinetoplastídeo. Todos os cinetoplastídeos ortólogos disponíveis para TbALPH1, (13 seqüências de tripanossomas, 1 de *Leptomonas* e 6 de cepas de *Leishmania*) foram alinhados por ClustalW usando parâmetros padrão. A porcentagem de identidade mínima entre quaisquer duas seqüências é indicada para os dois domínios ALPH diferentes.

Fonte: Adaptado de Kramer, 2017.

Análises filogenéticas identificaram 441 tipos de ALPHs em 332, dos 827 proteomas de organismos eucarióticos, entretanto, a maioria das proteínas são compostas exclusivamente pelo domínio catalítico, e que uma grande parcela possui regiões transmembranares previstas ou peptídeos de sinal de localização não citoplasmática, indicando funções distintas de *decapping* (Londoño, 2021). Além de *T. brucei*, a proteína ALPH1 foi caracterizada funcionalmente somente em *S. cerevisiae*, denominada YNL217W, sendo uma endopolifosfatase dependente de  $Zn^{+2}$  que possui como principal função a clivagem da poli (P) vacuolar (Andreeva et. al, 2019).

Visto que a principal divergência no decaimento de RNAm entre tripanosomatídeos e os demais eucariotos se restringe ao complexo de *decapping*, e diante das evidências de que TbALPH1 é a enzima que remove o *cap4* em *T. brucei*,

torna-se evidente a importância do estudo desta proteína para a definição do mecanismo de degradação de RNAm no sentido 5'→3', e os impactos na regulação da expressão gênica em *T. cruzi*, bem como, um possível alvo para o desenvolvimento de drogas eficazes contra a doença de Chagas. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a proteína TcALPH1 e sua possível relação com TcXRNA em diferentes condições nutricionais, o que poderá ajudar a elucidar como ocorre a regulação da degradação de RNAm em *T. cruzi*, etapa essencial para a adaptação deste parasita nos diferentes estágios do ciclo de vida.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a proteína TcALPH1 e sua possível interação com TcXRNA no metabolismo de RNAm em *T. cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão e a localização subcelular de TcALPH1 e TcXRNA em *T. cruzi*;
- Identificar os parceiros funcionais de TcALPH1 e de TcXRNA por ensaios de imunoprecipitação em parasitas em fase logarítmica de crescimento e em parasitas submetidos a estresse nutricional;
- Verificar a essencialidade de TcALPH1 e de TcXRNA através de nocaute gênico pelo método de CRISPR-CAs9 em *T. cruzi*.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Soluções e tampões

**Tampão de Amostra de Proteínas:** Glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl 625 mM, pH 6,8.

**Tampão A:** Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, metamercepto etanol 10 mM, 1 tablet de inibidor de protease (EDTA-Free, EasyPack, Roche), pH 8

**Tampão B:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  115 mM, Ureia 8 M, Tris-base 10 mM, pH 8

**Tampão C:** 10 mM Tris-base 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  115 mM, pH 6,3

**Tampão D:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 100 mM, pH 5,9

**Tampão E:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 250 mM, pH 5,9

**Tampão F:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 500 mM, pH 4,5

**Solução de PBS – Concentração de uso:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4,3 mM.

**Tampão PBS - Tween 20:** PBS (Concentração de uso descrita acima) Tween 20 0,05%.

**Solução de Brometo de Etídeo:** 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Brometo de etídeo diluído em água destilada.

**Solução de Comassie (coloração de géis SDS PAGE):** 40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck, GER) .

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

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

**Tampão de transferência para *Western blot* no molhado:** Metanol 20%, Tris-HCl 37 mM pH 8,4, Glicina 192 mM pH 8,4.

**Tampão de transferência para *Western blot* no *semi-dry*:** Tris base 48 mM, pH 8,4, glicina 39 Mm, metanol 20%.

**Solução de bloqueio para *Western blot*:** PBS, Leite em pó desnatado 5%, Tween 20 0,005%

**Tampão TBE:** Ácido bórico 89 mM, Tris-base 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.

**Tampão TES:** 200 mM de Tris-HCl pH 8, 0.5 mM de EDTA pH 8 e 500 mM de sacarose.

**Tampão de lise para Imunoprecipitação:** HEPES 20 mM pH 7,4;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  50 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM; Glicerol 10%; Triton X-100 0,5%;  $\text{MgCl}_2$  1 mM

**Tampão de Conjugação:** Tampão fosfato 100 mM pH 7,4,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  3 M.

**Solução de Sensibilização:**  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1,26 mM.

**Solução de Fixação:** Etanol absoluto 50%, Ácido acético 12%; de formaldeído 0,01%.

**Solução de Nitrato de Prata:**  $\text{AgNO}_3$  11,77 mM, formaldeído 0,005%.



**Solução de Revelação:** Na<sub>3</sub>CO<sub>3</sub> 232,55 mM, formaldeído 0,01%, 2 mL da solução de sensibilização em 100 mL da solução de revelação.

### 3.2 Meios de cultivo

**Meio LB (Luria-Bertani):** Extrato de levedura 5,0 g/L, bacto-triptona 10,0 g/L, NaCl 5,0 g/L. LB-ágar – Adição de 1,5% de agar-ágar.

**Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*):** KCl 17 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Tampão fosfato 80 mM pH 6,0, NaCl 190 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

**Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*):** Soro Fetal Bovino 10%, Glicose 2,2 g/L, Tryptose 5,0 g/L, NaCl 4,4 g/L, Infusão de fígado 5,0 g/L, KCl 0,4 g/L, Fosfato básico de sódio 11,56 g/L, Penicilina 10.000 U pH 7,2, Estreptomicina/gentamicina 50 mg/L.

### 3.3 Cultivo de parasitas selvagens e transfectantes

Para todos os experimentos realizados neste trabalho, foram utilizadas formas epimastigotas do clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1988; Goldenberg *et al.*, 1984) Os parasitas transfectantes foram cultivados em meio LIT suplementado com neomicina (G418) em uma concentração de 250 ng/mL, a uma temperatura de 28°C e os parasitas selvagens foram cultivados apenas em meio LIT, na mesma temperatura descrita anteriormente. Os parasitas foram repicados a cada 3 dias, em uma concentração inicial de 1x10<sup>6</sup> parasitas/mL, (Camargo, 1964).

Para a realização de ensaios de estresse nutricional 5x10<sup>7</sup> epimastigotas de 3 dias de cultivo foram centrifugados a 7.000 g por 5 minutos a 4°C. As células foram suspensas em meio TAU em uma densidade de 5x10<sup>8</sup> células/mL, e mantidas em estufa a 28°C por duas horas.

### 3.4 Construção de vetores para expressão das proteínas fusionadas à GFP

A sequência correspondente ao gene TcALPH1 (TcCLB.506863.80) foi obtida por análise de homologia com TbALPH1 e LbALPH1, e a sequência referente a TcXRNA (TcCLB.507817.80) foi obtida por análise de homologia com TbXRNA e LbXRNA no banco de dados Tritypdb (tritypdb.org, Reino Unido).

Para a obtenção de parasitas transfectantes que expressem o gene de interesse fusionado à etiqueta de GFP, foi obtido o gene inteiro sintético (GeneScript, EUA) de TcALPH1 recombinado em vetor pDONR221 da plataforma Gateway® (Thermo Fisher Scientific, EUA). O produto purificado e liofilizado (4 µg) foi diluído em 20 µL de água miliQ 18.2, obtendo uma concentração final de 200 ng/µL. Para completa solubilização, a amostra foi aquecida quinze minutos a 60°C. Para a obtenção do gene em vetor de transfecção de *T. cruzi*, procedeu-se a recombinação de 150 ng do vetor pDONR221 contendo o inserto TcALPH1 com 150 ng dos vetores pTcGWGFP C terminal e pTcGWGFP N terminal, versão 1.1, que expressam a etiqueta *Green Fluorescent Protein* (GFP) ao C e N terminal da proteína de interesse, produzido pelo Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná (Batista et al., 2015) com 1 µl de LR clonase II, num volume final de 10 µl ajustado com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). A reação de recombinação foi incubada a 25°C *overnight*. A transformação foi realizada em *E. coli* TOP10 cálcio competentes por choque térmico, deixando células no gelo por 30 minutos, seguido de aquecimento em termomixer a 42°C por dois minutos, voltando ao banho de gelo logo em seguida. Após uma hora de ambientalização em *shaker* a 37°C, as células foram plaqueadas em meio LB *broth* (Merck, Alemanha) contendo o antibiótico ampicilina (25 mg/mL). Os clones positivos foram confirmados por PCR de colônia utilizando 10 p mol/ µL dos *primers* M13 *forward* e TcALPH1 *reverse* (Tabela 1), Taq IBMP e H2O 18.2. Os clones positivos passaram por uma extração plasmidial utilizando o kit Qiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

As construções do vetor pTcGWGFP C e N terminal contendo o inserto TcALPH1 foram transfectadas em formas epimastigotas *T. cruzi*, utilizando Amaxa Cell Line, Nucleofector (Lonza Bioscience) programa X-014, e selecionadas com antibiótico G418 (neomicina) na concentração final de 500 ng/mL. Após a seleção dos parasitas

transfectantes, foi realizada uma análise da intensidade de fluorescência das culturas transfectantes utilizando o citômetro de fluxo FACS Aria II, onde as populações com maior intensidade de fluorescência GFP, foram enriquecidas e expandidas em meio *Liver Infusion-Tryptose* LIT suplementado com G418. Após as culturas atingirem a uma densidade de  $3 \times 10^7$  células/mL, foi avaliada a expressão da proteína fusionada à etiqueta GFP por *western blot*. Para tanto, foi realizado um extrato das culturas transfectantes, do qual  $2,5 \times 10^8$  células foram centrifugadas a 3.000g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensado em 10 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS, 0.137 M NaCl<sub>2</sub>, 0.0027 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O, pH 7.4) e centrifugado nas mesmas condições, e as células foram ressuspensas em 250 µL de tampão de amostra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8) e fervidas a 95°C por 5 minutos. A concentração final de extrato foi  $1 \times 10^6$  células/µL. Por fim, o extrato dos parasitas transfectantes correspondendo a  $2 \times 10^7$  células foram separados em eletroforese de proteína SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose utilizando o método *semi-dry* (Kurien & Scofield, 2006) conforme protocolo descrito no item 3.4, e avaliada a expressão da proteína fusionada à etiqueta GFP por *western blot*, seguindo protocolo descrito no item 3.8.

Para a TcXRNA, já foram obtidos, em um trabalho anterior do grupo, parasitas transfectantes que expressam essa proteína fusionada à etiqueta GFP na porção N-terminal do produto da expressão gênica (Costa et al, 2018). Estes transfectantes foram descongelados inicialmente deixando os criotubos em banho maria a 28°C. Em seguida, 1 mL da cultura descongelada foi adicionada em 4 mL de LIT, e centrifugado a 3.000 g, 5 minutos. Em seguida, foi removido o sobrenadante e a cultura por fim foi ressuspensa em 5 mL de LIT suplementado com G418 (250 ng/ mL), e deixada em estufa a 28°C. Após um período de 3 dias,  $5 \times 10^6$  células foram transferidas para 5 mL de meio LIT (repique de  $1 \times 10^6$  células/ mL) novo, suplementado com G418 (50 ng/ mL). Somente as culturas repicadas posteriormente, foram utilizadas para os experimentos realizados neste trabalho.

### 3.5 Caracterização do crescimento celular de parasitas transfectantes e selvagens

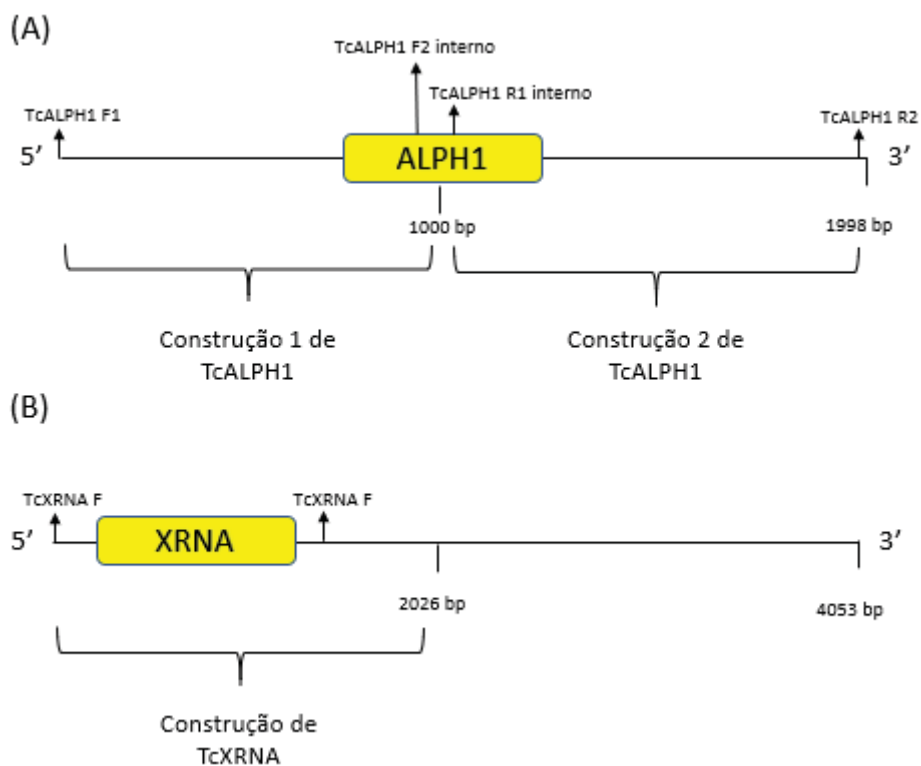
Para a caracterização dos parasitas transfectantes, foi realizada uma curva de crescimento celular em formas epimastigotas durante um período de 7 dias sob condições de cultivo já descritos no item 3.3. As contagens foram realizadas em triplicata utilizando um contador, sendo a média das triplicatas definida como os pontos da curva. O parasita transfectante TcGFP-FLAG e o selvagem (Dm28c), foram utilizados como controle do experimento, objetivando comparar se há uma diferença de crescimento destas culturas com os transfectantes obtidos por este trabalho.

### 3.6 Clonagem da versão truncada do gene TcALPH1 em pDONR221

Como o objetivo da clonagem da proteína TcALPH1 é a expressão da proteína recombinante para imunização de coelhos e camundongos, optamos em clonar partes do gene desta proteína no intuito de otimizar a expressão da proteína recombinante. Para tanto, foram desenhados dois pares de primers que amplificam o fragmento correspondente aos nucleotídeos 1 a 1028 (construção 1), e o fragmento correspondente aos nucleotídeos 981 a 1991 (construção 2), respectivamente (Tabela 1 e Figura 7). Assim, foi realizada uma PCR com 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* (Dm28c), 0.2 mM de dNTP, 0.5 U/  $\mu$ L DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen, EUA), 2 mM de  $MgSO_4$ , e 10 p mol/  $\mu$ L dos *primers* TcALPH1 F1 e TcALPH1 R1 (construção 1) ou 10 p mol/  $\mu$ L dos *primers* TcALPH1 F2 e TcALPH1 R2 para a obtenção da construção 2 (Tabela 1). A Figura 7 mostra as regiões de anelamento de cada *primer* para a obtenção das construções 1 e 2. Os produtos de PCR destas construções foram purificados e recombinados em pDONR221 (Plataforma Gateway, Invitrogen). Para isso, 150 ng do vetor de entrada pDONR221, juntamente com 33 ng (150 fmol) de cada um dos produtos de PCR e 1  $\mu$ l de BP clonase II, num volume final de 10  $\mu$ l ajustado com tris-EDTA pH 8.0 (TE), foram incubados a 25°C *overnight*. Os produtos destas recombinações foram transformados por choque térmico em células cálcio competentes *E. coli* TOP10 como descrito no item 3.4. Em seguida, as células foram ambientadas incubando 1 mL de LB, a 37°C por uma hora em um *shaker* a 200 rpm, com posterior plaqueamento em meio LB suplementado com canamicina (25 mg / mL) a 37°C, *overnight*. As colônias crescentes em placa, foram triadas por PCR de

colônia utilizando a taq mix IBMP, junto com 10 p mol/  $\mu$ L do conjunto de *primers* M13 *forward* (anela com o vetor) e TcALPH1 R1 interno para a construção 1, e 10 p mol/  $\mu$ L dos *primers* M13 *forward* e TcALPH1 R2 para a construção 2 (Tabela 1). Os clones positivos foram incubados em meio LB suplementado com antibiótico canamicina (25 mg / mL) em um shaker a 200 rpm, 37°C *overnight*, e o DNA plasmidial foi extraído por minipreparação pelo kit Qiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit, Alemanha) e enviado para sequenciamento na plataforma GoGenetic da UFPR

Em um trabalho anterior do grupo, já foi obtida a construção truncada da proteína TcXRNA (nucleotídeos 4 a 795) subclonada em pDONR221 e em pDEST17 (Costa, 2015). Assim, para esta proteína, partimos diretamente para a obtenção da proteína recombinante trucada.



**Figura 7.** Desenho esquemático mostrando as estratégias utilizadas para obtenção das proteínas truncadas TcALPH1 e TcXRNA. (A) Regiões de anelamento dos *primers* para as construções truncadas da proteína TcALPH1. (B) Regiões de anelamento dos *primers* para a construção truncada da proteína TcXRNA, já realizado por Da Costa (2018). A região em amarelo corresponde a seqüência que codifica o domínio de cada proteína.

Primer	Sequência 5'→3'
TcALPH1 F1	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGA</b> TACGCAGAGCGCCGTTC
TcALPH1 R1 interno	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</b> ACTGCG CATTCCAAAATATAATGTTATCGT
TcALPH1 F2 interno	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</b> CATGT GTGGGAGCGAACGC
TcALPH1 R2	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</b> CCTGCTG CGTCATCGTGATGAGG
TcALPH1 R guia	GGGAGGTGGTCGCTCAACTTT
TcXRNA F	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</b> GGAG TTCCAAAGTTTTTCGGTG
TcXRNA R	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</b> TACAAA TTCATCGGCTTTACGGT
TcXRNA R guia	GTAGTGGCTACGAGTTGATGGTGG
M13	GTAAAACGACGGCCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados para as clonagens. As sequências em negrito correspondem ao sítio attB de recombinação com pDONR221, adicionada à extremidade 5' dos *primers* TcALPH1 e TcXRNA; O *primer* M13 anela com o vetor pDONR 221 e pTcGWGFP; o *primer* T7 *forward* se anela com o vetor pDEST17. Todas as sequências estão no sentido 5'→3'.

### 3.7 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes para produção de anticorpos policlonais

O vetor pDEST17 (Gateway® Life Technologies, EUA), que expressa a proteína de interesse fusionada à uma etiqueta de seis histidinas em sua extremidade N-terminal, foi escolhido como vetor de expressão por ser apropriado para a expressão heteróloga das proteínas TcALPH1 e TcXRNA em *E. coli*.

Foi realizada a clonagem de TcALPH1 truncada no vetor de expressão (Construção 1). Para isso, 150 ng do vetor de entrada pDONR221 contendo a construção, juntamente com 150 ng do vetor pDEST17 e 1 µl de LR clonase II, num volume final de 10 µl ajustado com tris-EDTA pH 8.0 (TE), foram incubados a 25°C *overnight*. A transformação foi realizada em *E. coli* TOP10 cálcio competentes por choque térmico, conforme já descrito. Após incubação das células em meio LB líquido por 1 hora a 37°C a cultura foi plaqueada em meio LB contendo o antibiótico ampicilina (25 mg/mL) para a seleção dos clones. As colônias foram triadas por PCR de colônia utilizando a taq mix IBMP, junto com 10 p mol/ µL do conjunto de *primers* T7 *forward*



e TcALPH1 R1 interno para a construção 1, e 10 p mol/  $\mu$ L dos *primers* T7 *forward* e TcALPH1 R2 para a construção 2 (Tabela 1). A extração dos plasmídeos foi realizada da mesma maneira como descrito anteriormente para clonagem no vetor pTcGWGFP.

Em um trabalho anterior, já foi obtida a recombinação do gene TcXRNA truncado em pDEST17 (gene truncado obtido vide esquema Figura 1), que expressa uma proteína recombinante de 30 kDa (Da Costa, 2018).

Para indução das proteínas recombinantes, foi realizada a transformação, em separado, do vetor pDEST17 com o inserto TcALPH1 e TcXRNA em bactérias de expressão cálcio competentes *E. coli*  $\Delta$ Sly D pRARE 2 (plasmídeo constituído por uma sequência de resistência a cloranfenicol, e por genes de tRNAs raros em *E. coli*), cepa utilizada devido sua capacidade de expressar proteínas que contenham códons raros em suas sequências nucleotídicas traduzíveis (presença de dois códons raros, na posição 294° e 1929° do gene TcALPH1). A transformação foi feita por choque térmico, como descrito acima. Para cada construção de TcALPH1 e TcXRNA, foi selecionado um clone, do qual foi congelado a -80°C com glicerol 30%+ 700 $\mu$ L de Lb *broth* suplementado com ampicilina (25 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL).

Para a expressão das construções de TcALPH1 e TcXRNA, os plasmídeos contendo os insertos foram transformados na bactéria de expressão *E. coli*  $\Delta$ Sly D pRARE 2, que possui resistência à ampicilina e à cloranfenicol. Colônias crescentes em placas com LB ágar contendo ampicilina (25 mg/mL) e cloranfenicol (34 mg/m) foram utilizadas nas etapas posteriores. Para a otimização da indução das construções, foram testadas diferentes temperaturas de indução (18°C, 25°C, 30°C), tempos (4 h, 6 h, *overnight*) e concentrações de IPTG (0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM). Após a confirmação da indução por eletroforese em gel SDS-PAGE, e padronizadas as condições ideais de expressão, foi realizada a indução das construções proteicas de TcALPH1 e TcXRNA em uma escala maior, em 500 mL de meio LB suplementado com ampicilina 25 mg/mL e cloranfenicol 34 mg/mL. Após a indução, as células foram centrifugadas a 6.000g, 4°C durante 10 min, e o sobrenadante de cada uma das induções foi descartado. Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de tampão A (50 mM de Tris HCl, 100 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -metamercapto etanol e de inibidor de protease (EDTA-Free, EasyPack, Roche, pH 8)). Em seguida, as células foram lisadas em sonicador (QSonica, Q700, sonda de 0.5 mm de diâmetro), em 10

ciclos de 15 segundos na potência 4, e o lisado bacteriano foi centrifugado a 20.000 g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) das duas frações foi separado dos *pellets* (fração insolúvel), e aliquotados para posterior avaliação de solubilidade por ensaios de WB (conforme descrito no item 3.9). As frações insolúveis (frações que obtiveram as maiores concentrações das proteínas recombinantes) foram ressuspendidos em tampão B (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 115 mM, Ureia 8 M, Tris-base 10 mM, pH 8), seguido de um período de 2 horas de incubação, a 4°C em orbital, para solubilizar os extratos proteicos. Após a solubilização, os extratos foram centrifugados a 20.000 g, 4°C por 20 minutos, e o sobrenadante (fração insolúvel solubilizada) das duas frações foram separados dos *pellets*. Para todas as etapas descritas anteriormente, foram recolhidas alíquotas, visando avaliar a eficiência do processo de lise celular e solubilização proteica em SDS-PAGE.

Para a purificação das frações contendo as construções proteicas de TcXRNA e TcALPH1, o sobrenadante 3 foi incubado com 500 µL de resina de níquel (Ni-NTA Agarose, Invitrogen), por 1 hora em orbital a 4°C. Vale ressaltar, que a resina de níquel foi utilizada devido a sua afinidade pela cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes. Em seguida, as frações proteicas com a resina foram adicionadas em uma coluna de purificação previamente ambientada com tampão B (composição já descrita anteriormente), da qual foi separado o conteúdo não ligado (*Flow through*). Em seguida, foi adicionado 5 mL de tampão C (10 mM Tris-base 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 115 mM, pH 6,3) para lavagem das resinas, objetivando a remoção de contaminantes. Após a lavagem, foram adicionados tampões com concentrações crescentes de imidazol para a eluição da proteína de interesse. Para tanto, inicialmente foi adicionado 5 mL de tampão D (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 100 mM, pH 5,9) nas colunas, seguido de 5 mL de tampão E (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 250 mM, pH 5,9), e por fim mais 5 mL de tampão F (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM, Tris base 10 mM, Imidazol 500 mM, pH 4,5). Cada tampão foi adicionado somente quando toda solução adicionada anteriormente tenha passado por completo na coluna de purificação. As frações de TcALPH1 eluídas nos tampões D, E e F, foram concentradas em uma coluna Amicon® Ultra-15, seguindo as instruções do fabricante. Por fim, foi diluído o concentrado (100 µL) em 400 µL de PBS (*Phosphate Buffer Saline* constituído por NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4.) estéril (volume de 500 µL necessário para a inoculação em camundongos)

e quantificado em gel SDS-PAGE através de uma curva de BSA. Para todas as etapas descritas anteriormente, foram recolhidas alíquotas, visando avaliar a eficiência da purificação e concentração proteica em SDS-PAGE.

Para a construção da proteína TcXRNA truncada, devido à sua elevada afinidade pela resina, a proteína não foi eluída, ficando adsorvida na resina de níquel. Portanto, foi corrido um gel preparativo (gel de poliacrilamida 12%, com capacidade para 4 mL de amostras, sendo ideal para purificar proteínas diretamente da banda do gel), no qual 500 µL da resina utilizada na purificação foram separados, que posteriormente, foi corado com KCl 100 mM e a banda correspondente ao tamanho esperado da proteína, foi cortada do gel, adicionada em tubo falcon e incubada *overnight* com 1 mL de PBS estéril. Após o período de incubação, foi realizada uma centrifugação a 6.000 g, 5 minutos, 4°C, e o sobrenadante foi quantificado por comparação com uma curva padrão de BSA. Todas as frações purificadas de TcXRNA foram alíquotadas, objetivando avaliar a eficiência da purificação e concentração em SDS-PAGE.

### 3.8 Inoculação das proteínas recombinantes purificadas em camundongos e coelhos para produção de anticorpos policlonais

Após o processo de purificação e controle de qualidade das frações/eluições obtidas, as proteínas foram enviadas para inoculação em camundongos da linhagem BALB/c, de acordo com o protocolo CEUA-Fiocruz (27\18-3) ) no biotério do Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR. Para tanto, foram realizadas 5 imunizações, contendo em cada dose 100 µL de antígeno (50 µg da proteína recombinante) em PBS estéril como excipiente + 100 µL de adjuvante a base de hidróxido de alumínio a 1.3%, durante um intervalo de duas semanas entre cada dose.

Para inoculação em coelhos, as proteínas recombinantes foram enviadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para tanto, 1 mg das proteínas TcALPH1 e TcXRNA purificadas, foram corridas em gel preparativo, o qual foi corado com azul de comassie R 250 (Sigma Aldrich, EUA), e a banda correspondente a proteína, foi recortada e adicionada em tubos eppendorfs. Estes tubos, foram enviados para a UFRGS, seguindo protocolo estabelecido pelo setor responsável pelas imunizações.

Os anticorpos policlonais de coelhos, quando obtidos, foram purificados através da incubação simultânea do soro com a proteína recombinante previamente transferida para membrana de nitrocelulose. Após 16 horas de incubação a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado e a membrana lavada três vezes por imersão em PBS /Tween 0,1%. Os anticorpos ligados à proteína recombinante foram eluídos com glicina 0,2 M, pH 2,5. Em seguida, o pH da solução contendo o anticorpo purificado foi ajustado para 7,5 com tampão 1 M Tris-HCl pH 9,5. A eficiência da purificação foi avaliada através de ensaios de *Western blot* utilizando extrato de parasitas selvagem e dos parasitas transfectantes TcXRNA-GFP e TcALPH1-GFP. Os anticorpos policlonais de TcXRNA e TALPH1 de camundongos, não tiveram a necessidade de serem purificados, sendo utilizados diretamente o soro dos animais para os experimentos.

### 3.9 Análise da expressão das proteínas de interesse em parasitas selvagens e transfectantes por ensaios de Western blot

A expressão da proteína TcALPH1 e TcXRNA de parasitas selvagens, assim como as fusionadas a GFP em parasitas transfectados com os vetores produzidos neste trabalho, foram analisadas por *western blot* conforme descrito por (Towbin, 1979). Para tanto, extratos proteicos de  $2 \times 10^7$  parasitas selvagens e transfectantes, foram separados por SDS-PAGE, sendo corridos em gel de poliacrilamida utilizando um tampão de SDS-PAGE (Tris Base 250 mM, glicina 2,5 M pH 8,3, SDS 1%) a 25 mA por uma hora e meia. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por *semi-dry* a 25V por uma hora, em tampão de *semi-dry* (Tris-base 48 mM, pH 8,4, glicina 39 mM, metanol 20%). Em seguida, foi realizado o bloqueio da membrana com PBS/ Tween suplementado com leite (Tween 20 0,05%; Leite em pó desnatado 2,5%) durante 1 hora. A presença das proteínas nativas foi avaliada utilizando anticorpos policlonais de coelhos e camundongos diluídos 1:500 em PBS. Já para a avaliação da expressão das proteínas TcALPH1 e TcXRNA fusionadas à GFP foi utilizado o anti-GFP monoclonal (clone 2mAvP66B3H2012) de camundongo diluído 1:500 em PBS. Após a incubação com os anticorpos primários e lavagens, a membrana foi incubada por uma hora com os anticorpos IRdye 680RD (LI-COR, EUA)  $\alpha$ -mouse ou IRdye 800RD (LI-COR, EUA)  $\alpha$ -rabbit diluídos em 1:15000

em PBS. Após lavagens, a membrana foi analisada pelo equipamento Odyssey Infrared Image System, (LI-COR Biosciences, EUA).

### 3.10 Avaliação da localização subcelular de TcALPH1 e TcXRNA em *Trypanosoma cruzi*

A localização das proteínas TcALPH1 e TcXRNA, foi verificada por ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) nos parasitas transfectados com as construções plasmidiais (culturas expressando TcALPH1-GFP-C e TcXRNA-GFP-N), utilizando os anticorpos monoclonais anti-GFP (clone 2mAvP66B3H2012) fornecido pelo Laboratório de Virologia Molecular (ICC/FIOCRUZ-PR). Como controle positivo, foi utilizado o transfectante TcGFP-Flag. Inicialmente, foi realizada a fixação de formas epimastigotas sob condições normais de temperatura e nutrientes, e sob condições de estresse nutricional (descrito em detalhes no item 3.1). Para tanto, 500 µL de culturas de 3 dias de cultivo, foram centrifugadas a 3.000 g, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, as culturas foram ressuspensas em paraformaldeído 4%/PBS durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e ressuspensas em PBS em uma densidade de 10<sup>6</sup> parasitas por poço. Em seguida, os parasitas fixados foram incubados durante 20 minutos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina, em temperatura ambiente. Após o período de aderência dos parasitas nas lâminas, foi realizada uma lavagem das lâminas em PBS. Para a permeabilização das células, Triton X-100 0,5% foi incubado em cada poço, durante um período de 5 minutos em temperatura ambiente. Após a permeabilização, as células foram lavadas em PBS, seguida de bloqueio com a adição de 1,5% de PBS/BSA por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a solução foi removida, seguido da adição de anticorpos primários previamente diluídos em PBS/BSA 1,5%. Para a localização da proteína nos parasitas transfectantes, foi utilizado os anticorpos primários monoclonais anti-GFP mouse em uma diluição 1:100 durante um período de uma hora, a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, seguida de adição dos anticorpos secundários anti-IgG, diluídos em PBS/BSA 1,5%, e incubados durante 1 hora, a 37°C com anti-camudongo IgG conjugado ao Alexa Fluor 488, diluído 1:600.

Após o período de incubação com os anticorpos secundários, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e uma vez com água, seguido de adição de ProLong /DAPI (Invitrogen, EUA) para marcação do material genético, contido no núcleo e no cinetoplasto. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas (0,13 mm de espessura), seladas com esmalte e analisadas em microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B, em uma objetiva de 100x e as imagens foram processadas por deconvolução utilizando o software LAS AF - Leica (Leica Microsystems, Alemanha).

Para todos os experimentos, foi adicionado um controle negativo, que consiste na adição apenas do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 para avaliar possíveis reações inespecíficas, sendo exposto na mesma intensidade de fluorescência das demais amostras. As imagens obtidas foram editadas no Software Adobe Photoshop (modelo CS6), onde todas as figuras receberam os mesmos tratamentos de brilho e contraste, sendo enquadradas em tamanho fixo de 6 cm de largura, por 6 cm de altura.

### 3.11 Identificação dos parceiros de TcALPH1 e TcXRNA por ensaios de imunoprecipitação

Objetivando identificar as proteínas parceiras de TcALPH1 e TcXRNA, foram realizados ensaios de imunoprecipitação, utilizando parasitas transfectantes que expressam estas proteínas fusionadas a etiqueta GFP em vetor episomal, e como controle foi utilizado parasitas transfectantes expressando apenas GFP fusionada à FLAG. Nesse contexto, microesferas magnéticas acopladas a *nanobodies* recombinantes anti-GFP foram utilizadas neste experimento.

#### 3.11.1 Expressão e Purificação dos *nanobodies* recombinantes

Inicialmente, foi realizada a expressão e a purificação dos *nanobodies* recombinantes anti-GFP seguindo um protocolo da literatura (Fridy et al., 2014). Para tanto, *E. coli* ArticExpress (DE3) competentes passaram por um processo de transformação utilizando o plasmídeo pET21b-peIB, que possui em sua sequência codificante para o clone LaG-16-G<sub>4</sub> S-LaG2, um dímero de *nanobodies* de lhama que possui uma alta afinidade e especificidade pela proteína GFP (Kd: 0,036 nM). Após realizado o cultivo das células em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100



µg/mL) durante 16 horas a 37°C, foi realizado o pré-inóculo de uma das colônias crescentes da placa em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL) durante um período de 16 horas a 37°C em *shaker* a 200 rpm. No dia seguinte, foi adicionado mais 1 L de meio LB + ampicilina (100 µg/mL) no pré-inóculo (1:1000) e foi incubado no *shaker* sob agitação de 200 rpm a 37°C até a cultura alcançar a densidade ótica de 0.6. Em seguida, foi realizada a indução da proteína adicionando IPTG a uma concentração final de 0.1 mM, e a cultura foi mantida sob agitação em *shaker* a 200 rpm, 12°C por 18 - 24 horas.

Após o período de indução dos *nanobodies* recombinantes, foi realizada a obtenção da fração periplasmática bacteriana. Para tanto, foi realizada uma centrifugação à 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 10 mL de tampão TES (0.2 M de Tris-HCl pH 8, 0.5 mM de EDTA pH 8 e 0.5 M de sacarose). Em seguida, foi adicionado mais 15 mL de tampão TES (1:4) gelado diluído em H<sub>2</sub>O 18.2 Ω, e o conteúdo celular foi mantido em gelo por 30 minutos. Após a incubação em tampão TES, foi realizada uma centrifugação a 6.000g x 10 minutos a 4°C, da qual o sobrenadante foi separado e centrifugado a 48.000 g por 10 minutos a 4 °C. Após as duas centrifugações, foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) a uma concentração final de 0.150 mM no sobrenadante obtido. Posteriormente, a fração periplasmática foi transferida para uma coluna de afinidade à níquel (Ni-NTA Qiagen Agarose), para a purificação dos *nanobodies* que contém a cauda de histidina localizada na extremidade C terminal. Em todas as etapas descritas, foram recolhidas alíquotas para identificar a eficiência da expressão e purificação dos *nanobodies*, e posterior quantificação por comparação com curva padrão de BSA.

### 3.11.2 Conjugação de Dynabeads com os *nanobodies* recombinantes

Para realizar o processo de conjugação, foi utilizado o protocolo descrito na literatura (Obado et. al, 2016). Inicialmente, 30 mg de microesferas magnéticas (Dynabeads M-270 Epoxy, Invitrogen, EUA) foram lavadas com 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), homogeneizada em vórtex por 30 segundos. Uma segunda lavagem foi realizada utilizando o mesmo tampão, homogeneizado suavemente durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada novamente uma lavagem, seguindo o

mesmo protocolo descrito inicialmente. Durante todas as etapas de lavagem, foi utilizada uma estante magnética para separar as microesferas do sobrenadante. Em seguida, as microesferas foram adicionadas em 600 µL de solução de conjugação (300 µg de *nanobodies* recombinantes; tampão fosfato 100 mM pH 7,4; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M), e mantidas a 30°C sob agitação por 72 horas.

Após transcorrido o tempo de incubação, as microesferas foram separadas do sobrenadante e passaram sequencialmente pelas seguintes etapas de lavagem: 1º - 1 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,4; 2º - 1 mL de glicina 100 mM, pH 2,5 (lavado rapidamente); 3º - 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,8; 4º - 1 mL de trietilamina 100 mM (lavado rapidamente); 5º - 1 mL de PBS (duas lavagens) 6º - 1 mL de PBS + Triton X-100 0,5% por 15 minutos sob agitação; 7º - 1 mL de PBS. Vale ressaltar, que em todas as etapas de lavagem, as microesferas foram ressuspensas no respectivo tampão de lavagem, e foram separadas do sobrenadante utilizando uma estante magnética. Após realizadas todas as etapas de lavagem, as microesferas contendo os *nanobodies* recombinantes acoplados foram ressuspensas em 200 µL de PBS 1x e armazenados a 4°C.

### 3.11.3 Imunoprecipitação das proteínas TcALPH1 e TcXRNA em epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse nutricional

Para realizar o ensaio de imunoprecipitação, foi utilizado um protocolo previamente padronizado pelo grupo (Costa, 2018), com algumas adaptações. Buscando estabelecer critérios estatísticos para determinação de interações proteicas, foram realizadas triplicatas técnicas das imunoprecipitações de TcALPH1 e TcXRNA fusionadas a proteína GFP. Inicialmente, 1,5 x 10<sup>9</sup> parasitas transfectantes (epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse nutricional, conforme protocolo descrito no item 3.3) de 3 dias de cultivo, foram centrifugados a 3.000 g, por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado uma vez em PBS estéril. Em seguida, a cultura foi lisada com 3 mL de tampão de lise (HEPES 20 mM pH 7,4; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Glicerol 10%; Triton X-100 0,5%; MgCl<sub>2</sub> 1 mM) contendo coquetel de inibidor de protease (EDTA-Free, EasyPack, Roche, CH). Em seguida, o lisado foi dividido em 3 tubos com 1 mL em cada (5 x 10<sup>8</sup> parasitas lisados para cada réplica da imunoprecipitação), e foram centrifugados a 10.000 g por 10 min,

4°C. Terminado o período de centrifugação, o sobrenadante de cada réplica foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 3 µL de resina acoplada a *nanobodies* recombinantes anti GFP. Os tubos foram mantidos em orbital por 1 hora a 4°C. Após o fim da incubação, as amostras foram transferidas para uma estante magnética, que foram utilizadas para separar as microesferas contendo os complexos proteicos da fração não ligada. Após a remoção da fração não ligada, as microesferas foram lavadas 3 vezes com 1 ml de tampão de lise, sendo utilizada a estante magnética em todas as etapas de lavagem para separar a resina do sobrenadante. Por fim, a resina foi ressuspensa em 20 µl de tampão de amostra e fervida a 95°C por 5 minutos.

A diferença no perfil de proteínas dos imunocomplexos foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE, utilizando um gel de poliacrilamida 8%, corrido a 25 mA por uma hora. Em seguida, este gel foi corado com nitrato de prata. Para a coloração por nitrato de prata, inicialmente o gel foi incubado em solução de fixação (50% de etanol absoluto; 12% de ácido acético; 0.01% de formaldeído) por 30 minutos a 4°C sob agitação *shaker* (80 rpm). Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50%, sendo a primeira lavagem por 5 minutos, a segunda em 10 minutos, e a terceira em 15 minutos, todas sob agitação (80 rpm) em *shaker* em temperatura ambiente. Após as lavagens, o gel foi incubado em solução de sensibilização (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1,26 mM) durante 2 minutos, e lavado 3 vezes com água destilada nas mesmas condições de lavagem descritas anteriormente. Posteriormente, o gel foi incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente com solução de prata (AgNO<sub>3</sub> 11,77 mM; 0,005% de formaldeído), seguida de 3 lavagens de um minuto cada com água destilada, nas mesmas condições de lavagens já descritas. Após as lavagens, o gel foi incubado com solução de revelação (Na<sub>3</sub>CO<sub>3</sub> 232,55 mM; 0.01% de formaldeído; 2 mL da solução de sensibilização em 100 mL da solução de revelação) até o aparecimento do perfil eletroforético no gel. Por fim, a reação foi parada adicionando 50 mL da solução de fixação sem etanol.

A presença das proteínas de interesse fusionadas à etiqueta nos imunocomplexos foram confirmadas por *Western blot*, utilizando anti-GFP conforme descrito no item 3.9. Após confirmada a diferença no padrão de bandas das amostras em relação ao controle, as imunoprecipitações foram enviadas para análise no espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Fisher Scientific, EUA) da

espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL ETD, visando identificar os parceiros funcionais de TcALPH1 e TcXRNA.

Para a análise dos resultados de espectrometria de massas, foi realizada uma análise dos dados de proteômica a partir dos valores de intensidade livre de marcação (LFQ), presentes nos dados brutos obtidos, conforme protocolo estabelecido na literatura (Zoltner et al., 2020). Esta é uma forma de analisar as imunoprecipitações que usam de duas variáveis, a diferença do teste “*t*” de Student (*Fold Change*) e o valor “*p*” (Significância), tornando assim a estatística mais estrigente e separando com mais confiança os parceiros de interação dos contaminantes. Para tanto, as tabelas contendo os dados brutos da proteômica foram analisados de forma quantitativa pelo MaxQuant (versão 1.5.12). A base de dados TryTripDB, contendo o genoma do *T. cruzi* Dm28c 2018 (Berná et al., 2018) foi utilizada para pesquisar os peptídeos identificados pelo espectrômetro de massa. Os dados foram avaliados e as estatísticas foram calculadas usando o *software* Perseus (versão 1.4.3, GER). No Perseus, as proteínas classificadas como falso-positivas ou contaminantes, foram desconsideradas da análise. As intensidades médias do LFQ, bem como o desvio padrão desse valor, foram calculados para todos os grupos experimentais (TcALPH1-GFP, TcXRNA-GFP, TcGFP-FLAG em condições normais e sob estresse nutricional). As alterações no nível de proteínas foram avaliadas comparando as intensidades médias dos valores de LFQ entre todos os grupos experimentais. O valor de significância do teste (valor *p*) deve ser <0.01, ou >2, quando convertido a -Log 10. Proteínas com valores de *Fold Change* igual ou superior a 2, foram consideradas potenciais parceiros. Os dados obtidos foram plotados em uma tabela e no gráfico de vulcão (Volcano plot), utilizando a ferramenta VolcanoR disponível no site Huygens (<https://huygens.science.uva.nl/VolcanoR/>).

### 3.12 Nocaute dos genes TcALPH1 e TcXRNA

Para inibir a expressão dos genes TcALPH1 e TcXRNA, foi utilizada uma variação da metodologia de CRISPR-Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014) padronizada para *T. cruzi* (Romagnoli et al, 2018). Inicialmente, foram escolhidas três sequências oligonucleotídicas de RNAs para cada um dos genes, utilizando o software EuPatGDT (Peng et al., 2015). Para a seleção das sequências de RNA guias (RNAg), foram utilizados os seguintes critérios: sequências próximas a extremidade 5’ (N

terminal do produto da expressão gênica), que podem causar um melhor efeito de truncagem da expressão do produto gênico; ausência de sequências *off-targets* (*matches* fora do gene) e apenas um *on-target* (apenas um *match* sendo o próprio gene de interesse). Após estabelecida as sequências, foram adicionados aos RNAs guias a região T7 *promoter* e *Scaffold R in silico*. O *primer Scaffold R*, que compõe a estrutura reconhecida pela Cas-9, também foi obtido *in silico*, seguindo o molde descrito na Tabela 2.

Após obtidas as sequências oligonucleotídicas e diluí-las para a solução estoque de 100 pmol/ $\mu$ L, foram realizadas as diluições para uso em 10 pmol/ $\mu$ L, as quais foram utilizadas para realizar ensaios de PCR para obter os DNAs. Para estas reações de PCRs, foi utilizada Taq IBMP mix 3X (33,3  $\mu$ L) + 20 pmol do oligonucleotídeo DNA guia F (2  $\mu$ L) + 20 pmol do *primer Scaffold R* (2 $\mu$ L) + 62,7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O 18.2, resultando num volume final de 100  $\mu$ L, o qual foi dividido em dois microtubos contendo 50  $\mu$ L/microtubo. Após confirmado o produto das PCRs (entre 200-300 pb) por eletroforese em gel de agarose 3%, foram realizadas as purificações do material genético utilizando o kit QIAquick PCR *Purification* (QIAGEN, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, foi realizada uma transcrição *in vitro* (descrita abaixo) do produto purificado, para a obtenção dos RNAs.

RNA	Sequência 5'→3'
TcALPH1 267	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGC TCCACCAGCGAGTTGAAATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC AAG
TcALPH1 775	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGC GGGGGATTTAGTCAATAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC AAG
TcALPH1 1692	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGA GCCTCCGATATATGAAGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AG
TcXRNA 309	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGA GTAGTGGCTACGAGTTGATGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TcXRNA 528	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGA GCGAGGGGGAACATAAGATTG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TcXRNA 717	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGA GGCCCGTGAGCAACGAGAGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
RNAg - Scaffold - R	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para construção dos RNAg para os genes TcALPH1 e TcXRNA em *Trypanosoma cruzi*. Sequências em verde correspondem ao promotor T7; Sequências em vermelho correspondem ao Scaffold F; Sequências em preto correspondem as regiões específicas dos genes TcALPH1 e TcXRNA, as quais a Cas9 irá reconhecer.

### 3.12.1 Transcrição *in vitro* para obtenção dos RNAg

Para a transcrição *in vitro*, foi utilizado o kit MEGAscript® T7 (ThermoFisher, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Para este protocolo, 500 ng do produto de PCR foi incubado com a reação de transcrição em estufa a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a precipitação com 500 mM de acetato de amônio de acordo com as instruções do fabricante, onde a reação foi mantida por 48h-72h, a -20°C. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12.000 g, 4°C durante uma hora. Após o período de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado uma vez com a adição de 1 mL de etanol 75%. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 g, 4°C por 10 minutos, onde o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi deixado secando em temperatura ambiente. Por fim, os RNAg foram ressuspensos em 10 µL de água RNase free.

### 3.12.2 Transfecção dos RNAg em parasitas transfectantes Cas9-GFP

Objetivando selecionar o melhor RNAg para o nocaute de TcALPH1 e TcXRNA, foi realizada uma primeira transfecção de 30 µg dos RNAg, separadamente, em epimastigotas de *T. cruzi* contendo o plasmídeo que expressa a Cas9-GFP produzido por Romagnoli e colaboradores (2018, previamente cultivada ( $10^6$  parasitas/mL) utilizando o programa U33 Amaxa Cell Line, Nucleofector (Lonza Bioscience). Transcorridas 24 horas após a transfecção, foi adicionado G418 250 µg/mL para a manutenção do plasmídeo contendo a Cas9-GFP. Em seguida, as culturas foram observadas por uma semana, visando identificar alterações no crescimento celular, fenótipos aberrantes e a proporção entre parasitas aberrantes e selvagens. O melhor RNAg foi selecionado com base na cultura que foi mais afetada de acordo com os critérios descritos anteriormente.

Após a seleção do melhor RNAg para o gene TcALPH1 e TcXRNA, foi realizada uma transfecção em epimastigotas de *T. cruzi* contendo a Cas9-GFP, utilizando 30 µg dos RNAg, junto com 30 µg do DONOR (sequência nucleotídica constituída por stop códon, M13 e braços de homologia correspondente a região específica de clivagem de cada gene, especificado na Figura 8), utilizando o programa U-33 do equipamento Amaxa Cell Line, Nucleofector (Lonza Bioscience). A inserção do DONOR permite o melhor direcionamento para o reparo do DNA clivado pela Cas9, além de inserir três stop códons, o que assegura a parada da tradução do gene, facilita a triagem e o sequenciamento dos clones para confirmação dos parasitas nocautes ou hemi-nocautes (Burle-caldas et al, 2018). A inserção do DONOR, assim como o local de clivagem de cada gene é representado na Figura 9. Após a transfecção, os parasitas foram cultivados em meio LIT, a 28°C por 3 dias, seguido de uma segunda transfecção utilizando os mesmos RNAg correspondentes de cada gene e seus DONORS, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Transcorridas 24 horas após a segunda transfecção, foi realizado um *single cell sorting* utilizando o equipamento FACSARIA II, onde um parasita foi isolado em cada poço, numa placa de 96 poços, com o objetivo de identificar a presença de possíveis clones nocautes.

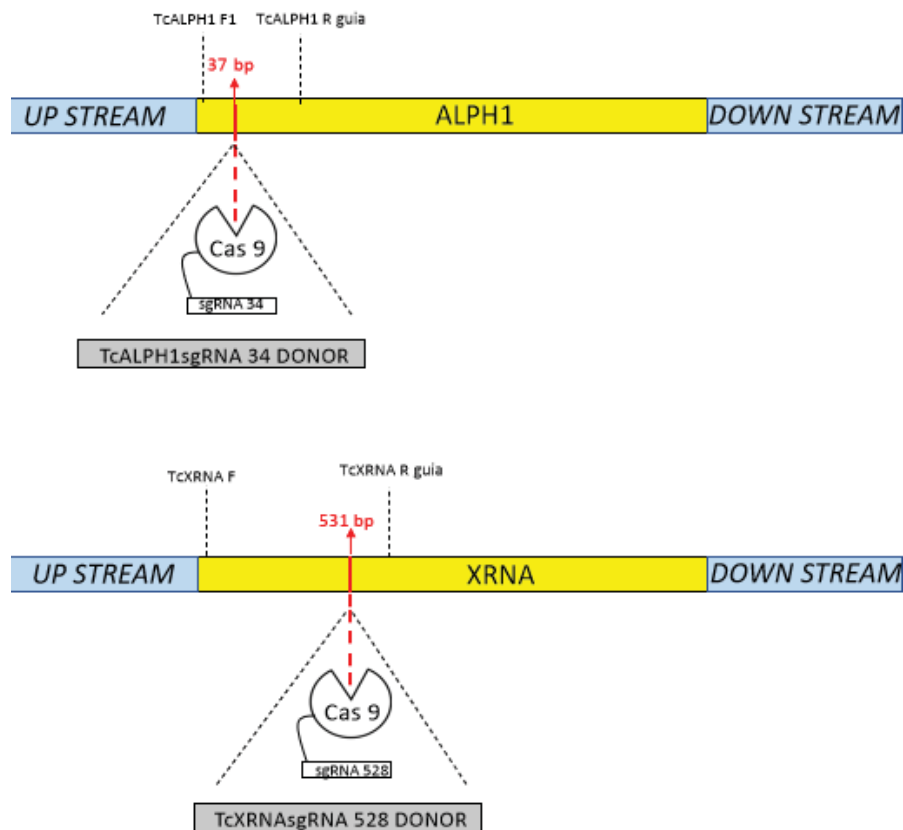


DONOR: (braço de homologia + stop códons + m13 (F ou R) + braço de homologia):

TcXRNASgRNA528 DONOR: CTGCATCTTTCGACGGCGAATGAAGTCCAC CTATCTATCTA  
GTAAAACGACGGCCAGT AATCTTATGTTCCCCCTCGCCCGGGTTATC

TcALPH1sgRNA34 DONOR: CTGGACCGAGTCGACAACACGTGCCCCGTT CTATCTATCTA  
GTAAAACGACGGCCAGT GCTCAGCTTCAGTAGTCGCAGTTGCGAGAG

**Figura 8.** Sequência oligonucleotídica dos DONORS para os RNAsg TcXRNA 528 e TcALPH1 34 transfectados nos parasitas transfectantes Cas9-GFP.



**Figura 9.** Representação do local de clivagem de TcALPH1 e TcXRNA pela Cas9, e a região de inserção do DONOR correspondente de cada gene. Também na figura, é indicada as regiões de anelamento dos *primers* utilizados para a PCR dos clones triados.

### 3.12.3 Seleção dos clones nocautes e heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA

Após um período de duas semanas, os clones que apresentaram turbidez nas placas foram triados por PCR de cultura. Inicialmente, 10 µL da cultura de cada clone foi homogeneizado com 10 µL de H<sub>2</sub>O 18.2, seguido de aquecimento a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, 1 µL de cada clone foi adicionado em uma reação de PCR contendo os *primers* TcALPH1 F1 e TcALPH1 guia R (Tabela 1), para avaliação de possíveis clones nocautes e/ou heminocautes para o gene TcALPH1, e os *primers* TcXRNA F (Tabela 1) e TcXRNA guia R (Tabela1) para a avaliação de nocautes e/ou heminocautes para o gene TcXRNA. Em todas as reações, foi utilizada a Taq Mix IBMP e H<sub>2</sub>O 18.2. Em seguida, os produtos destas PCRs foram analisados em gel de agarose 2%, e os possíveis clones de interesse foram expandidos. Posteriormente, foi coletado o material genético para sequenciamento, confirmando ou não a inserção do DONOR.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos genes de interesse

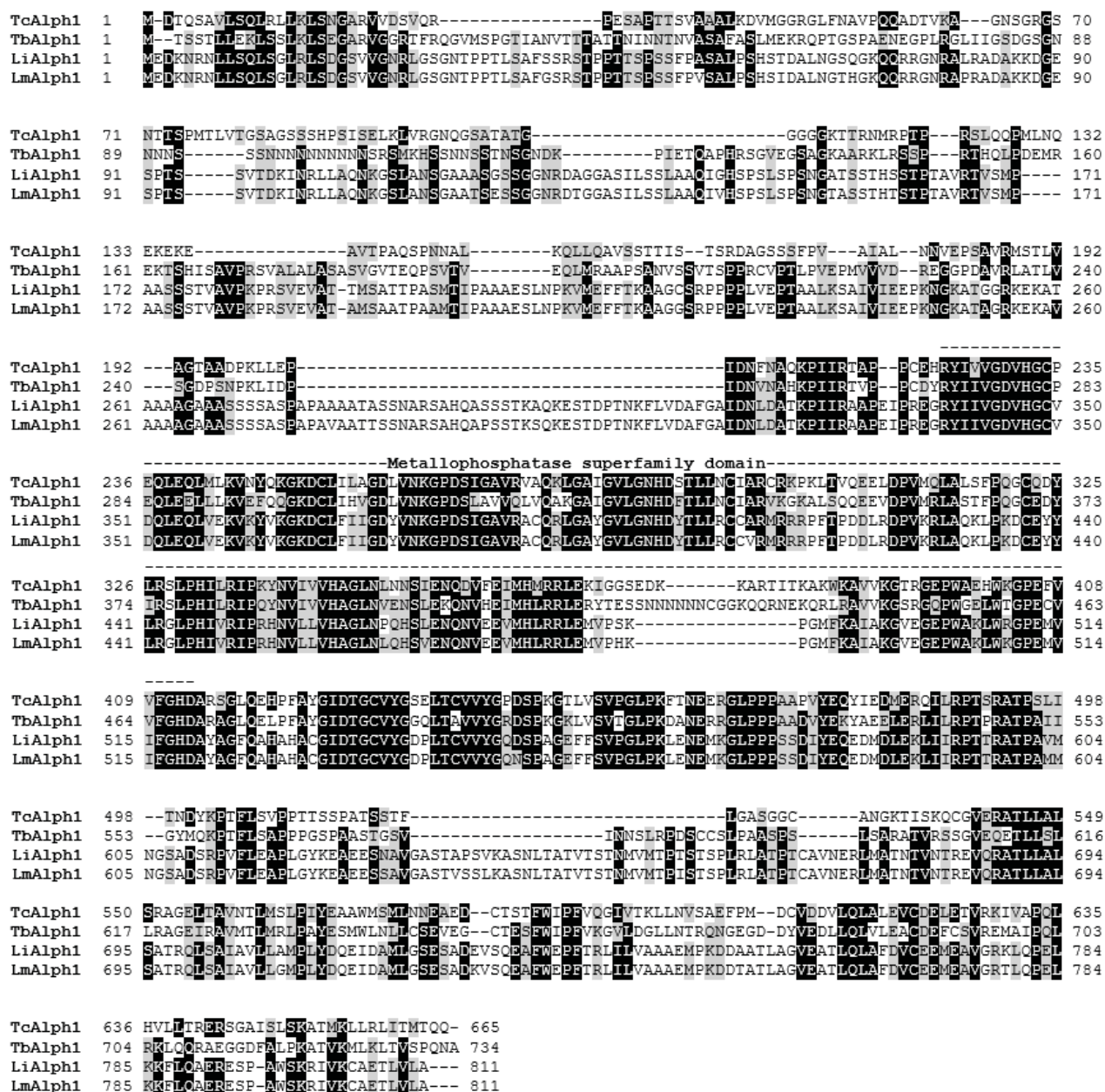
Os genes que codificam os homólogos de ALPH1 e XRNA de *T. cruzi* foram identificados por análises de bioinformática tendo como base as sequências dos genes codificantes dos respectivos homólogos em *T. brucei* e *Leishmania* como descrito no item 3.4, utilizando a cepa Dm28c. TcALPH1 e TcXRNA possuem maior identidade com os homólogos de *T. brucei* 53.36% e 61%, respectivamente. A análise *in silico* permitiu identificar o tamanho predito dos homólogos de TcALPH1 e TcXRNA, a localização cromossômica e a massa molecular de cada proteína (Quadro 1).

Gene	ID <i>T. cruzi</i> Dm28c	Cromossomo	Tamanho do gene	Massa Molecular (kDa)	Massa Molecular + GFP (kDa)	Identidade entre sequência proteica		
						<i>T. brucei</i> TbALPH1	<i>L. Major</i> LbALPH1	<i>L. Infantum</i> LiALPH1
TcALPH1	BCY84_07017	TcChr13-S	2001 pb	71.51	95	53.36%	47.43%	47.23 %
TcXRNA	BCY84_17883	TcChr30-S	4332 pb	162.15	178	61%	54.43%	54.21%

**Quadro 1** – Homólogos de ALPH1 e XRNA de *T. cruzi*. Análise de homologia de ALPH1 e XRNA de *T. cruzi*, com as características gerais de cada gene, massa molecular proteica, e as respectivas porcentagens de identidade entre as proteínas de *T. cruzi* com *T. brucei*, *L. major* e *L. Infantum*.

Em seguida foi realizada a análise comparativa das sequências dos genes de interesse com o auxílio do programa de alinhamento Mafft e Bioedit. Os resultados dos alinhamentos de ALPH1 e XRNA são apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. O alinhamento da sequência de aminoácidos de ALPH1 mostra que o domínio fosfatase (indicado na Figura 10 com uma linha tracejada, nomeada de *Metallophosphatase superfamily domain*) é altamente conservado entre *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *L. Infantum* (sequências conservadas são representadas em preto), seguido de uma região C e N terminal com baixa conservação. Já a análise de alinhamento de aminoácidos de XRNA, mostra que o domínio responsável pela atividade de exonuclease presente na região amino terminal (indicado na Figura 11 com uma linha tracejada, nomeada de *XRN 5'-3' exonuclease N-terminus*), é bem conservado entre *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *L. Infantum*, seguido de outros dois

domínios (*Xrn1* helical domain e *Exoribonuclease Xrn1 D1* domain) também conservados. Já a região carboxi terminal da proteína apresentou uma baixa conservação entre seqüências.



**Figura 10** – Alinhamento de seqüência de aminoácidos de ALPH1 entre *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *L. Infantum*. TcALPH1 – seqüência de aminoácidos da proteína ALPH1 (BCY84\_07017) de *T. cruzi*; TbALPH1 - seqüência de aminoácidos da proteína ALPH1 (Tb927.6.640) de *T. brucei*; LiALPH1 – seqüência de aminoácidos da proteína ALPH1 (LINF\_220022300) de *L. infantum*; LmALPH1 – seqüência de aminoácidos da proteína ALPH1 (LMJLV39\_220022000) de *L. major*; Sequências em preto: Seqüência de aminoácidos

conservada entre os 4 organismos; Sequências em cinza: Sequência de aminoácidos parcialmente conservadas.

		-----XRN 5'-3' exonuclease N-terminus-----																																										
TcXRNA	1	MGVPKFFRWVAERCP	ITPFRDSPPVDNLYLDMNGI	IHNCTHPNDV	DATOKSPTEKAMVEMAFYLEKLFNVIQPRKYEFLAVDGVAP	90																																						
TbXRNA	1	MGVPKFFRWVAERPS	WITPFRD	PPVVDNLYLDMNGI	IHNCTHPNDADATHKAPTEKAMVEMAFYLEKLFNVIQPRKYEFLAVDGVAP	90																																						
LiXRNA	1	MGVPKFFRWVAERFPS	ITPFRDSPPVDNLYLDMNGI	IHNCTHPNDV	DATRRSPTEKEMI	CAMFYLEKLFNAIQPRKYEFLAVDGVAP	90																																					
LmXRNA	1	MGVPKFFRWVAERFPS	ITPFRDSPPVDNLYLDMNGI	IHNCTHPNDV	DATRRSPTEKEMI	CAMFYLEKLFNAIQPRKYEFLAVDGVAP	90																																					
-----																																												
TcXRNA	91	RAKMNQORQRRYRSGYELMWARQEA	LAQGEVPEDEKDVFD	SNCITPGT	FMVVRVSECFQYFITMKLATDPAWONCVVYSGHDNPGEGEH	180																																						
TbXRNA	91	RAKMNQORQRRYRSGYEMMAREEALSR	GEEPEEADVFD	SNCITPGT	FMVVRVSEHFQYFITMKLATDPAWONCVVYSGHDNPGEGEH	180																																						
LiXRNA	91	RAKMNQORQRRYRAGYEMMAREEALAM	GEEVPEEKDVFD	SNCITPGT	FMVVRVSECFQYFITMKLATDPAWONCVVYSGHDNPGEGEH	180																																						
LmXRNA	91	RAKMNQORQRRYRAGYEMMAREEALAM	GEEVPEEKDVFD	SNCITPGT	FMVVRVSECFQYFITMKLATDPAWONCVVYSGHDNPGEGEH	180																																						
-----																																												
TcXRNA	181	KIVDFIRRRKMQFQYSP	NEETHCMYGLDADL	VMLALATHEPHFVLL	REVVTFGGQESRRAREQREDEANGI	LADKSYRKADEVFLRHVN	270																																					
TbXRNA	181	KIVDFIRRRKMQFQYSP	NEETHCMYGLDADL	VMLALATHEPHFVLL	REVVTFGGQESRRAREQREDEANGI	LADKSYRKADEVFLRHVN	270																																					
LiXRNA	181	KIVDFIRRRKMQFQYSP	NEETHCMYGLDADL	VMLALATHEPHFVLL	REVVTFGGQESRRAREQREDEANGI	LADKSYRKADEVFLRHVN	268																																					
LmXRNA	181	KIVDFIRRRKMQFQYSP	NEETHCMYGLDADL	VMLALATHEPHFVLL	REVVTFGGQESRRAREQREDEANGI	LADKSYRKADEVFLRHVN	268																																					
-----																																												
TcXRNA	271	VRDYLDLVRDKLGAKMPAC	YDLRVLDDFVLMCF	FIGNDFLPTLPTL	LGIDGSLLOMLDLYCKCILVEGMVLT	NQGOINWRRAVEFWL	359																																					
TbXRNA	271	VRDYLDLVRERLGGDKLPT	NYDLERVDDFVLMCF	FIGNDFLPTLPTL	LGIDGSLVQMLDLYAQRVLLAHTY	LTDMGRI	DWRAVEGWL	359																																				
LiXRNA	269	VRDYLDLVRERLGGDKLPT	NYDLERVDDFVLMCF	FIGNDFLPTLPTL	LGIDGSLVQMLDLYAQRVLLAHTY	LTDMGRI	DWRAVEGWL	358																																				
LmXRNA	269	VRDYLDLVRERLGGDKLPT	NYDLERVDDFVLMCF	FIGNDFLPTLPTL	LGIDGSLVQMLDLYAQRVLLAHTY	LTDMGRI	DWRAVEGWL	358																																				
-----																																												
		-----Xrn1 helical domain-----																																										
TcXRNA	360	QGIGLELTIKARQQE	EEYQKVAR	RDDTHE	TAATISAPTESIREM	KREBYREKHGFDNGWD	POGKEMADLRLHYVEGLT	WVMGYGY	449																																			
TbXRNA	360	QGLADLEFTTIKARQQE	EEYQKVAR	RDDTHE	TAATISAPTESIREM	KREBYREKHGFDNGWD	POGKEMADLRLHYVEGLT	WVMGYGY	449																																			
LiXRNA	359	NEVGKLEFETLRRRQ	EEYQKVAR	RDDTHE	YDTASV	IPITISILEKOR	YEGEKHGFAGWDAN	SEDMORLREHYVEGLM	WVMHYGY	448																																		
LmXRNA	359	NEVGKLEFETLRRRQ	EEYQKVAR	RDDTHE	YDTASV	IPITISILEKOR	YEGEKHGFAGWDAN	SEDMORLREHYVEGLM	WVMHYGY	448																																		
-----																																												
TcXRNA	450	GPPSNKWFPPH	YAPMASDMVN	LPAIAARV	FDPSKPLPHQ	QLLAVLPPMSYR	SMPRAYWPLMLSDK	SPLKRFPEILK	TDREGARAPW	539																																		
TbXRNA	450	GPPSNKWFPPH	YAPMASDMVN	LPAIAARV	FDPSKPLPHQ	QLLAVLPPMSYR	SMPRAYWPLMLSDK	SPLKRFPEILK	TDREGARAPW	539																																		
LiXRNA	449	GPPSNKWFPPH	YAPMASDMVN	LPAIAARV	FDPSKPLPHQ	QLLAVLPPMSYR	SMPRAYWPLMLSDK	SPLKRFPEILK	TDREGARAPW	538																																		
LmXRNA	449	GPPSNKWFPPH	YAPMASDMVN	LPAIAARV	FDPSKPLPHQ	QLLAVLPPMSYR	SMPRAYWPLMLSDK	SPLKRFPEILK	TDREGARAPW	538																																		
-----																																												
TcXRNA	540	EGIVLIPFIERVLLAAY	QSVQNKLGPE	DEVHNR	LGPATL	FAVDSDMAPC	VPNSIFGELRN	VRRVRRV	VEFFPEIKT	FVPELCPGVA	629																																	
TbXRNA	540	EGIVLIPFIERVLLAAY	QSVQNKLGPE	DEVHNR	LGPATL	FAVDSDMAPC	VPNSIFGELRN	VRRVRRV	VEFFPEIKT	FVPELCPGVA	629																																	
LiXRNA	539	EGIVLIPFIERVLLAAY	QSVQNKLGPE	DEVHNR	LGPATL	FAVDSDMAPC	VPNSIFGELRN	VRRVRRV	VEFFPEIKT	FVPELCPGVA	628																																	
LmXRNA	539	EGIVLIPFIERVLLAAY	QSVQNKLGPE	DEVHNR	LGPATL	FAVDSDMAPC	VPNSIFGELRN	VRRVRRV	VEFFPEIKT	FVPELCPGVA	628																																	
-----																																												
		-----Exoribonuclease Xrn1 D1 domain-----																																										
TcXRNA	630	KQLEGFATILRSN	WDCDLRRET	GVVTF	FGMPTRKESH	LALRNS	INYSATE	EAVSLVGC	EVLVGFP	PHYRRARV	TSISDKRI	SVRAVMTQD	719																															
TbXRNA	630	KQLEGFATILRSN	WDCDLRRET	GVVTF	FGMPTRKESH	LALRNS	INYSATE	EAVSLVGC	EVLVGFP	PHYRRARV	TSISDKRI	SVRAVMTQD	719																															
LiXRNA	629	KQLEGFATILRSN	WDCDLRRET	GVVTF	FGMPTRKESH	LALRNS	INYSATE	EAVSLVGC	EVLVGFP	PHYRRARV	TSISDKRI	SVRAVMTQD	718																															
LmXRNA	629	KQLEGFATILRSN	WDCDLRRET	GVVTF	FGMPTRKESH	LALRNS	INYSATE	EAVSLVGC	EVLVGFP	PHYRRARV	TSISDKRI	SVRAVMTQD	718																															
-----																																												
TcXRNA	720	GAFCGTETKELNR	DDSLNETKE	CDTHIQ	YMKERL	GLIAVD	GGTQLLVYV	NLFST	MRITR	KGRITV	RSFSK	DEVCYAMQ	LVARLQ	DVDM	IEDLR	809																												
TbXRNA	720	GAFCGTETKELNR	DDSLNETKE	CDTHIQ	YMKERL	GLIAVD	GGTQLLVYV	NLFST	MRITR	KGRITV	RSFSK	DEVCYAMQ	LVARLQ	DVDM	IEDLR	809																												
LiXRNA	719	GAFSGTEEHKNNR	DESAAEYKE	ADTHARE	FMKSL	GLLAVE	QVEVLVYV	HREFM	QVTR	KGHI	ERHFA	TWTTCY	PIOLICT	DNI	DMQEDSR	808																												
LmXRNA	719	GAFSGTEEHKNNR	DESAAEYKE	ADTHARE	FMKSL	GLLAVE	QVEVLVYV	HREFM	QVTR	KGHI	ERHFA	TWTTCY	PIOLICT	DNI	DMQEDSR	808																												
-----																																												
TcXRNA	810	YVERDRVEGEM	SLGNKVV	IGP	EPKMK	KSPMDVY	GSAGLVF	-----	ESASNS	TIYAV	AVR	LYQ	EP	LVIP	PPS	LLSFAA	PRN	WMA	LHEVA	893																								
TbXRNA	810	YVERDRVEGEM	SLGNKVV	IGP	EPKMK	KSPMDVY	GSAGLVF	-----	ESASNS	TIYAV	AVR	LYQ	EP	LVIP	PPS	LLSFAA	PRN	WMA	LHEVA	894																								
LiXRNA	809	YVERDRSEG	SDFGAR	CVYIG	PKSK	SMQVY	GSAGLVF	-----	ESASNS	TIYAV	AVR	LYQ	EP	LVIP	PPS	LLSFAA	PRN	WMA	LHEVA	897																								
LmXRNA	809	YVERDRSEG	SDFGAR	CVYIG	PKSK	SMQVY	GSAGLVF	-----	ESASNS	TIYAV	AVR	LYQ	EP	LVIP	PPS	LLSFAA	PRN	WMA	LHEVA	897																								
-----																																												
TcXRNA	894	TEL	SVGSLALRL	LVG	SRIT	IPQ	GSREL	GLGLI	YARNH	LARI	GYAKLV	PRQ	INAW	-----	IPYSE	DV	FAR	LQNA	PAAHY	LDSA	973																							
TbXRNA	895	NEVRVGLAL	KHLVGS	VRTP	SPQ	GC	RELGLGLI	YARNH	LARI	GYAKLV	PRQ	INAW	-----	IPYSE	DV	FAR	LQNA	PAAHY	LDSA	984																								
LiXRNA	898	ISLDLIPHTL	ITICSS	HVT	SPQ	GSREL	GLGLI	YARNH	LARI	GYAKLV	PRQ	INAW	-----	IPYSE	DV	FAR	LQNA	PAAHY	LDSA	977																								
LmXRNA	898	ISLDLIPHTL	ITICSS	HVT	SPQ	GSREL	GLGLI	YARNH	LARI	GYAKLV	PRQ	INAW	-----	IPYSE	DV	FAR	LQNA	PAAHY	LDSA	977																								
-----																																												
TcXRNA	974	GKGD	LGRSS	---RTP	QYTI	WFS	REAV	ALIR	RCVQ	EFQ	PL	VKR	LES	GTAA	PQALE	PP	OF	MT	GK	WQ	EME	V	D	V	L	T	E	M	E	A	F	I	D	A	S	G	I	R	D	V	A	L	I	1061
TbXRNA	985	OKGES	RPRSS	---RPM	QYTI	WFS	REAV	ALIR	RCVQ	EFQ	PL	VKR	LES	GTAA	PQALE	PP	OF	MT	GK	WQ	EME	V	D	V	L	T	E	M	E	A	F	I	D	A	S	G	I	R	D	V	A	L	I	1072
LiXRNA	978	OKGD	LGRSS	---RTP	QYTI	WFS	REAV	ALIR	RCVQ	EFQ	PL	VKR	LES	GTAA	PQALE	PP	OF	MT	GK	WQ	EME	V	D	V	L	T	E	M	E	A	F	I	D	A	S	G	I	R	D	V	A	L	I	1067
LmXRNA	978	OKGD	LGRSS	---RTP	QYTI	WFS	REAV	ALIR	RCVQ	EFQ	PL	VKR	LES	GTAA	PQALE	PP	OF	MT	GK	WQ	EME	V	D	V	L	T	E	M	E	A	F	I	D	A	S	G	I	R	D	V	A	L	I	1067



```

TcXRNA 1062 AASDDAFTRDHRELEDELDRQQPRPTKELILNPFVVKRHLVYFPHHSSSGGHITQLPLPQDCIFRIGARVVVNCRAWGSVVFFGAVGTIVRLL 1151
TbXRNA 1073 AAQDDAFPRREHVRLMLEEEDRQGPRLPLEDRMLSSVARRCLYFPVTRCAGGHISQLPLPQEQTVLGGSRVVVNCRACGAAFFGATGTIVRLL 1162
LiXRNA 1068 TATEBAFPQQLLEOLEASLQEQQRNSFKELSLRQVSRNQLYFPVTRSSCGHLVLELPLPQEQTFVLLGSRVANCRAATGIVVFFGTQGTIVRLL 1157
LmXRNA 1068 TATEBAFPQQLLEOLEASLQEQQRNSFKELSLRQVSRNQLYFPVTRSSCGHLVLELPLPQEQTFVLLGSRVANCRAATGIVVFFGTQGTIVRLL 1157

TcXRNA 1215 -----ALMOKSKSQQQQQQQQQKRG---SVPMA--ENVSVIEMPRSATEDASVSKTA-----TGMA 1266
TbXRNA 1225 -----SICKKLOQKEDDDHQQQHGRGVGIPST--EGTFSIPKPRSAMGETSASGIA-----AGRN 1279
LiXRNA 1248 KSTVSPFSLPAAAFQSPTSAARAAPADSCASHSSTAGAGASVVPFRPSAAATEQTPAPATLGGKRAPASATAHLSSTSSVTPITRETHSS 1337
LmXRNA 1248 KSTVSPFSLPAAAFQSPTIAAARTAPADSCASHSSTAGAGTSSVVPFRPSAVATEQTSAPATLGGKRAPASATAHLSSTSSVTPITRETHSS 1337

TcXRNA 1267 PAS-AAVTISGCGGGTFLSDLVGKLRASPEHSDAASIT-----EET-----VPEEQKDKARHFLFH---- 1320
TbXRNA 1280 VVSPSSLTVSGSGGTVQVAELMGKLASKATSPDAGLNICGATYAPIVASNKLPVAPRSVTTTAAAPGSGTFSVPE----- 1353
LiXRNA 1338 PAS-LKITAAPGSSGISTODLAKHLPASTSQRSPATVA-----SPA--GHAPASGAVAATTAALSGITIPAPKSAQQQHCHPMQPASPP 1418
LmXRNA 1338 PAS-LKITAAPGSSGISTODLAKHLPASTSQRSPATVA-----SPA--SHAPSAAVAATTAAPSGITIPAPKSVQQQHCHPWHP---- 1414

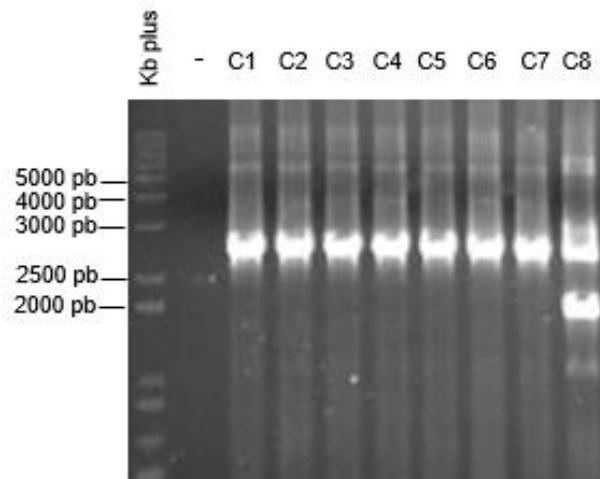
TcXRNA 1320 -----LPRITSGNANRINNSGDGEGDKGCRKPGFSFTVSEVLNCEFFQIRPGEGALLKRMISQHLSGDRKR----- 1320
TbXRNA 1353 -----LPRTSGNANRINNSGDGEGDKGCRKPGFSFTVSEVLNCEFFQIRPGEGALLKRMISQHLSGDRKR----- 1418
LiXRNA 1419 ATTAVASPSQSNESNETSPGSNTR---RKSRLHVIHDDFVSGREFKIKYNTNGSLFRSWLDTFTAFAVRKTLAELEAEGNANPL 1499
LmXRNA 1414 -----ALPSCSNESNETSPGSNTR---RKSRLHVIHDDFVSGREFKIKYNTNGSLFRSWLDTFTAFAVRKTLAELEAEGNANPV 1490

```

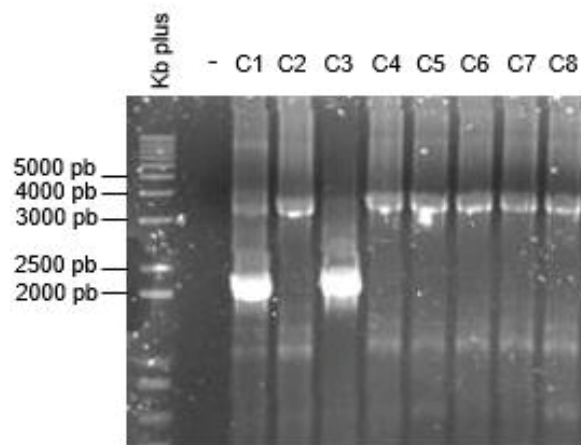
**Figura 11** – Alinhamento de sequência de aminoácidos de XRNA entre *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *L. infantum*. TcXRNA – sequência de aminoácidos da proteína XRNA (BCY84\_17883) de *T. cruzi*; TbXRNA – sequência de aminoácidos da proteína XRNA (Tb927.7.4900) de *T. brucei*; LiXRNA – sequência de aminoácidos da proteína XRNA (LINF\_360024300) de *L. infantum*; LmXRNA – sequência de aminoácidos da proteína XRNA (LmjF.06.0260) de *L. major*; Sequências em preto: Sequência de aminoácidos conservada entre os 4 organismos; Sequências em cinza: Sequência de aminoácidos parcialmente conservadas.

#### 4.2 Clonagem de TcALPH1 em vetor pTcGWGFP e transfecção em *Trypanosoma cruzi*

O gene inteiro sintético liofilizado (TcALPH1 em pDONR 221) foi inicialmente diluído em H<sub>2</sub>O 18.2 e recombinado nos vetores pTcGWGFP N e C terminais. O produto da recombinação foi transformado em *E. coli* TOP 10, e esta cultura foi suplementada em meio LB com ampicilina (25 mg/mL). A PCR das colônias foi realizada utilizando os *primers* M13 *forward* (se anela no vetor pTcGFGFP) com o *primer* TcALPH1 R2 (Tabela 1), gerando produtos com o tamanho esperado de 2861 e 3720 pb respectivamente (Figuras 12 e 13), sendo o tamanho predito *in silico* feito no software SnapGene. Houve uma amplificação de banda não específica de aproximadamente 2000 pb no clone C8 (pTcGWGFP C) e para os clones 1, 3 e 9 (pTcGWGFP N). Estes clones não foram considerados para os passos seguintes.



**Figura 12.** Eletroforese das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com TcALPH1+ pTcGWGFP-C terminal em agarose 1% usando os *primers* M13 e TcALPH1 R2. Kb Plus: Marcador de base 1 Kb Plus; - - Controlo negativo de colônias não transformadas; C1-C8- clones obtidos.



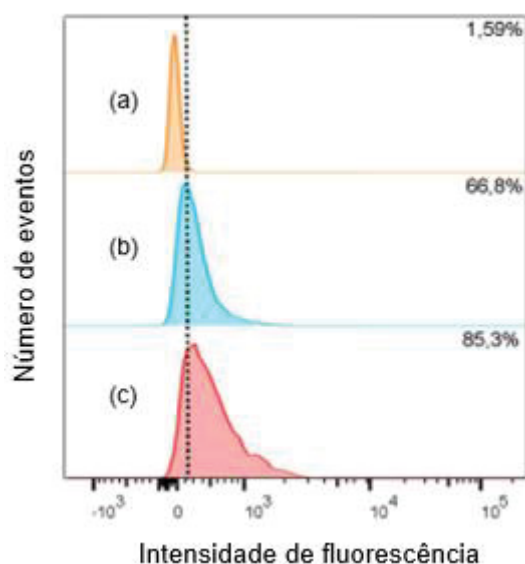
**Figura 13.** Eletroforese das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com TcALPH1+ pTcGWGFP-N terminal em agarose 1% usando os *primers* M13 e TcALPH1 R2. Kb Plus: Marcador de base 1 Kb Plus; - - Controlo negativo de colônias não transformadas; C1-C8- clones obtidos.

#### 4.3 Caracterização dos parasitas transfectantes

Após a PCR das colônias, realizou-se a purificação plasmidial dos vetores através de uma miniprep dos clones 1 (pTcGWGFP C) e 4 (pTcGWGFP N), contendo o inserto. Para confirmar as construções, os plasmídeos pTcGWGFP C e N contendo o inserto, foram enviados para sequenciamento utilizando todos os *primers* TcALPH1 R2 e M13 (Tabela 1). Após a realização e confirmação dos clones no sequenciamento,



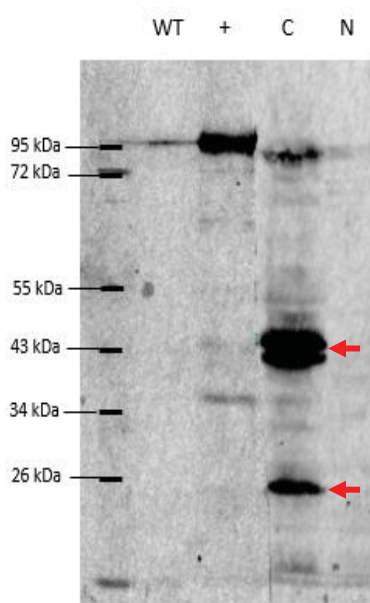
as construções foram transfectadas em epimastigotas *T. cruzi* Dm28c. Após a seleção dos transfectantes com o antibiótico específico, as populações transfectadas com os vetores contendo o gene da proteína TcALPH1 fusionado a etiqueta GFP nas porções amino e carboxi terminais, foram avaliadas por citometria de fluxo (Figura 14), onde é possível identificar que cerca de 66,8% e 85,3% dos parasitas transfectados com as construções pTcGWGFP-TcALPH1 N e pTcGWGFP-TcALPH1 C, respectivamente, apresentaram uma intensidade de fluorescência maior, se comparado ao controle *Wild Type*.



**Figura 14.** Citometria de Fluxo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* transfectados com as construções pTcGWGFP-TcALPH1 N e pTcGWGFP-TcALPH1 C. (a) Controle: Parasitas selvagens; (b) Parasitas expressando a proteína TcALPH1 fusionada a proteína GFP na porção amino terminal; (c) Parasitas expressando a proteína TcALPH1 fusionada a proteína GFP na porção carboxi terminal. Linha pontilhada: Intensidade de fluorescência mínima estabelecida, diferenciando a fluorescência dos parasitas transfectantes em relação ao controle.

Os transfectantes mostraram uma intensidade de fluorescência heterogênea, portanto, um enriquecimento das culturas foi realizado a fim de selecionar os parasitas que têm maior intensidade de fluorescência GFP, por serem os que mais expressam a proteína de interesse. Estes resultados são confirmados pela análise de *Western blot* (Figura 15) do extrato de parasitas transfectados com TcALPH1 GFP C, onde é possível identificar um reconhecimento de banda no tamanho esperado de aproximadamente 95 kDa, e uma possível clivagem da proteína recombinante, sendo

evidenciadas pelas regiões de reconhecimento em torno de 43 kDa e em 23kDa. A cultura transfectada com pTcGWGFP-TcALPH1 N não obteve, ou pouco teve, um reconhecimento de banda expressivo no tamanho esperado, indicando que existe uma expressão menor da proteína TcALPH1 fusionada à GFP na porção N-terminal, o que é evidenciado pela menor intensidade de fluorescência desta população no resultado da citometria de fluxo. Existe também a possibilidade de extravasamento do extrato do controle positivo entre os poços, sendo evidenciado por um baixo reconhecimento da banda no controle WT.

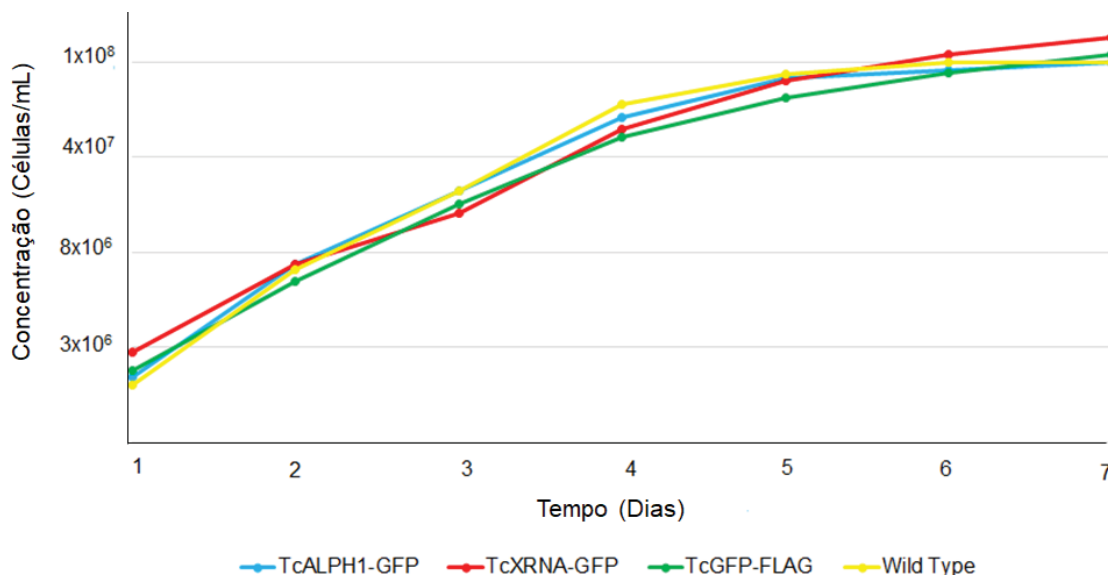


**Figura 15.** Análise de expressão da proteína TcALPH1 fusionada a *tag* GFP de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por *western blot*. revelado com anticorpo primário anti-GFP (1:500) e anticorpo secundário IRdye 680RD  $\alpha$ -mouse (1:15000) no equipamento Odyssey. WT: extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas selvagens; +: Controle positivo, utilizando extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas expressando a proteína TcEIF4G5 fusionada a proteína GFP na porção amino terminal; pTcGWGFP-ALPH1-C: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas expressando a proteína TcALPH1 fusionada a proteína GFP na porção carboxi terminal; pTcGWGFP-ALPH1-N: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas expressando a proteína TcALPH1 fusionada a proteína GFP na porção amino terminal; Seta vermelha: Possível degradação da proteína TcALPH1.



Após avaliada a expressão das proteínas fusionadas a GFP, assim como a intensidade de fluorescência por citometria de fluxo, foi realizada uma curva de crescimento das culturas transfectantes (TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP) comparando-as com os controles TcGFP-FLAG e o parasita selvagem. Quando analisado o Gráfico 1, é possível identificar que as culturas TcALPH1-GFP e TcXRNA-

GFP obtiveram um perfil de crescimento semelhante ao das culturas controles, evidenciando que a expressão das proteínas TcALPH1 e TcXRNA fusionadas a *tags* GFP não afetam o crescimento celular.

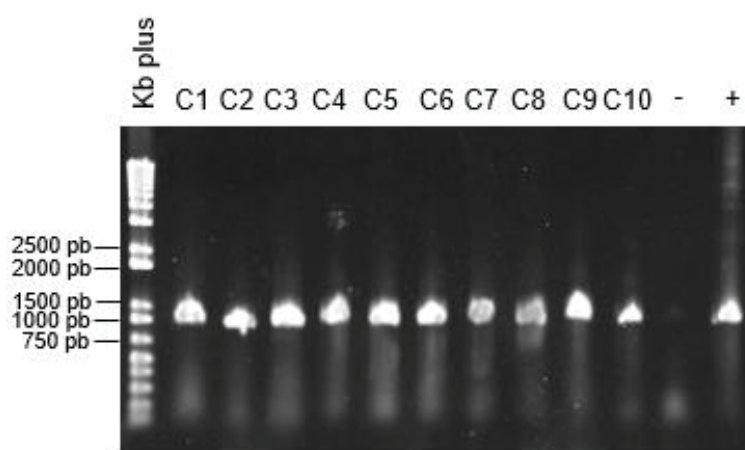


**Gráfico 1.** Curva de crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* transfectadas com as construções pTcGFGFP-ALPH1 C e pTcGWGFP-XRNA N. Eixo X: Tempo de cultivo da cultura representado em dias. Eixo Y: Concentração de parasitas por mL de meio de cultura. TcALPH1-GFP: parasitas expressando a proteína TcALPH1 fusionada a proteína GFP na porção carboxi terminal; TcXRNA-GFP: parasitas expressando a proteína TcXRNA fusionada a proteína GFP na porção amino terminal; TcGFP-FLAG: parasitas expressando GFP fusionada a proteína FLAG; Wild Type: parasitas selvagens.

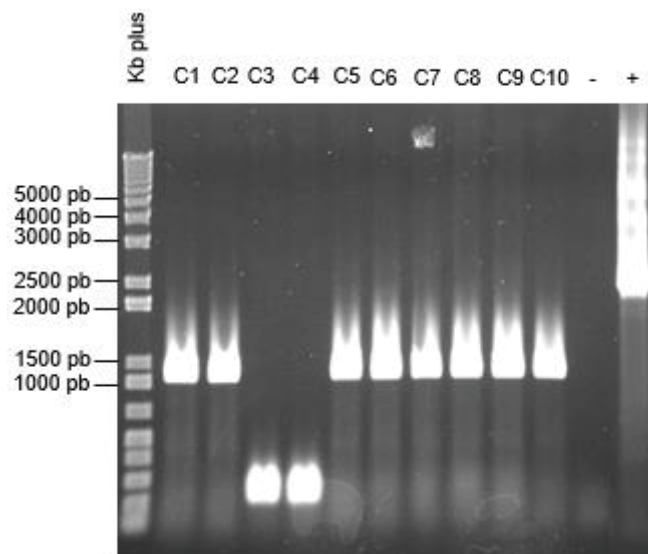
#### 4.4 Clonagem dos fragmentos gênicos de TcALPH1 em pDONR221 e pDEST17

Os produtos de TcALPH1 obtidos por PCR a partir do DNA genômico de *T. cruzi* utilizando os *primers* para obtenção da proteína truncada (estratégia 1 e 2) foram recombinados em pDONR221. As figuras 16 e 17 mostram a PCR de colônia dos clones crescentes em placa, gerando ampliações de 1057 pb e pb para as estratégias 1 e 2, respectivamente, o que foi condizente com o tamanho esperado *in silico* predito no Snapgene. Como controle negativo, foi realizada uma PCR com uma colônia não transformada. Como controle positivo, foi feita uma PCR utilizando o vetor pDONR221 contendo o gene inteiro sintético TcALPH1 e os *primers* M13 *foward*, e o

primer reverso correspondente a cada estratégia, gerando uma amplificação de 1057 pb para o controle positivo da PCR do fragmento gênico 1, e 2028 pb para o controle positivo da PCR do fragmento 2. Estes resultados também corroboraram as análises *in silico* realizadas no Snapgene. Houve uma amplificação de banda não específica de aproximadamente 300 pb no clone C3 e C4 nas PCRs da estratégia 2. Estes clones não foram considerados para os passos seguintes.

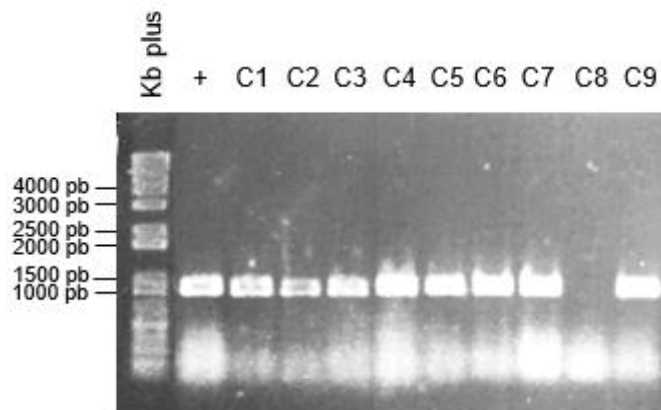


**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose 1% das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com a os fragmentos gênicos da estratégia 1 de TcALPH1+ pDONR221 usando os *primers* M13 e TcALPH1 R1 interno. Kb Plus: Marcador 1 Kb Plus; (-) Controle negativo de colônias não transformadas; (+) Controle positivo utilizando o próprio vetor TcALPH1 (gene sintético, correspondendo a sequência inteira de TcALPH1) + pDONR221; C1-C10- clones obtidos.

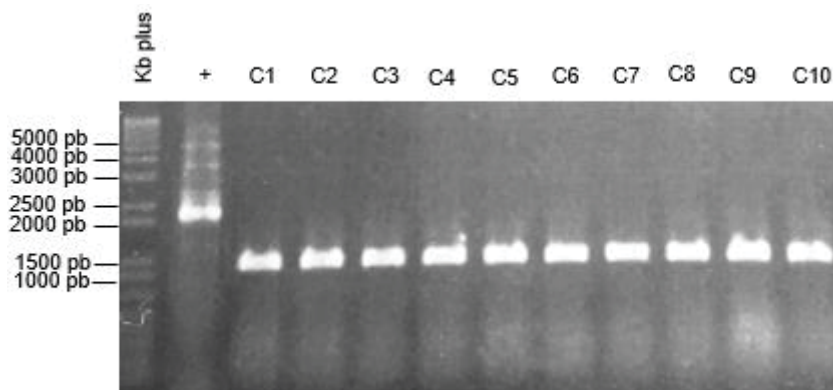


**Figura 17.** Eletroforese em gel de agarose 1% das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com a os fragmentos gênicos da estratégia 2 de TcALPH1+ pDONR221 usando os *primers* M13 e TcALPH1 R2. Kb Plus: Marcador 1 Kb Plus; (-) Controle negativo de colônias não transformadas; (+) Controle positivo utilizando o próprio vetor TcALPH1 (gene sintético, correspondendo a sequência inteira de TcALPH1) + pDONR221; C1-C10- clones obtidos.

Após a confirmação dos clones positivos contendo o vetor pDONR221 com o inserto das estratégias 1 e 2 de TcALPH1, foi realizada uma extração plasmidial do clone C1 para a estratégia 1, e do clone C1 para a estratégia 2. Os plasmídeos contendo os insertos foram recombinados com o vetor pDEST17, e foram transformados em *E. coli* TOP10. Em seguida foi realizado uma nova PCR de colônia dos clones crescentes em placa. As Figuras 18 e 19 mostram uma amplificação em 1178 e 1147 pb, para as estratégias 1 e 2, respectivamente, sendo os resultados esperados, tendo em vista as análises *in silico* realizadas pelo *software* SnapGene. O clone C8 da estratégia 1 de TcALPH1, não obteve amplificação, portanto, não foi considerado nas etapas seguintes. Como controle positivo, foi realizada uma PCR utilizando o vetor pDEST17 contendo o gene inteiro sintético TcALPH1 e os *primers* T7 *forward*, e o *reverse* correspondente a cada estratégia, gerando uma amplificação de 1178 para o controle positivo da PCR da construção 1, e 2148 pb para o controle positivo da PCR da construção 2. Estes resultados também corroboraram as análises *in silico* realizadas no Snapgene.



**Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose 1% das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com os fragmentos gênicos da estratégia 1 de TcALPH1+ pDEST17 usando os *primers* T7 e TcALPH1 R1 interno. Kb Plus: Marcador 1 Kb Plus; (+) Controle positivo utilizando o próprio vetor TcALPH1 (gene sintético, correspondendo a sequência inteira de TcALPH1) + pDEST17; C1-C9- clones obtidos.



**Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose 1% das PCR de colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com os fragmentos gênicos da estratégia 2 de TcALPH1+ pDEST17 usando os *primers* T7 e TcALPH1 R2. Kb Plus: Marcador 1 Kb Plus; (+) Controle positivo utilizando o próprio vetor TcALPH1 (gene sintético, correspondendo a sequência inteira de TcALPH1) + pDEST17; C1-C9- clones obtidos.

Após a confirmação dos clones positivos contendo as construções de TcALPH1 truncadas recombinados em pDEST17 (dados não mostrados), foi realizada a extração plasmidial dos clones C1 da construção 1 e da construção 2 e os respectivos plasmídeos foram transformados em *E. coli*  $\Delta$ Sly D pRARE 2, com posterior triagem dos clones por PCR de colônia. Após a triagem dos clones positivos por PCR de colônia, foram selecionados os clones C1 de ambas as construções de TcALPH1, assim como o clone C1 da construção de TcXRNA (a construção truncada

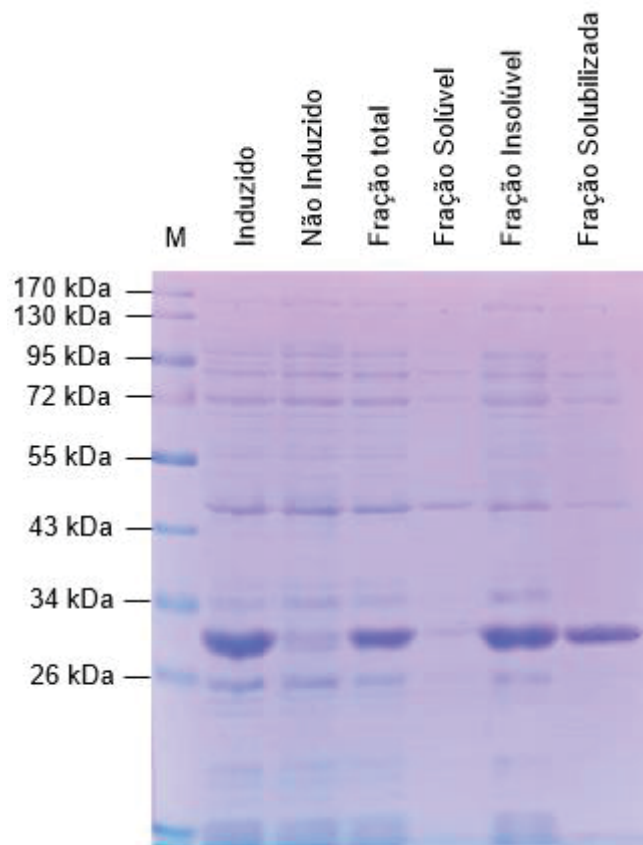
de TcXRNA clonada em pDEST17, já foi obtida em um trabalho anterior (Costa, 2015), para a expressão das proteínas recombinantes.

#### 4.5 Expressão das versões truncadas das proteínas TcALPH1 e TcXRNA.

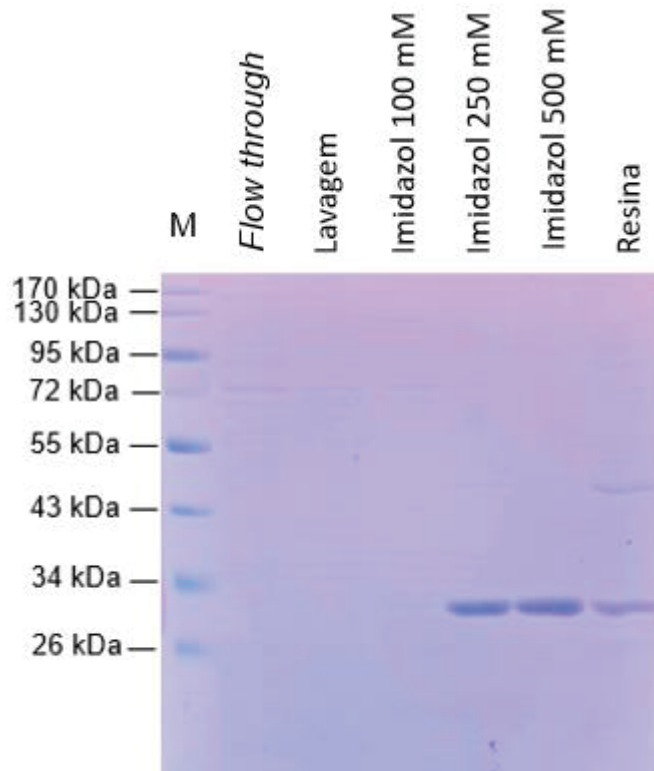
Para obter proteínas em quantidades para a inoculação em camundongos e coelhos, foi realizada uma otimização dos processos de indução das proteínas recombinantes truncadas TcALPH1 (estratégias 1 e 2) e TcXRNA, testando diferentes parâmetros de indução tais como temperatura (18°C, 25°C, 30°C), concentração de IPTG (0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM) e tempo de indução (4, 6 horas e *overnight*).

Para expressão de TcALPH1, foi observado que a indução da proteína truncada 2 teve um rendimento muito baixo em todas as condições testadas, portanto, a estratégia 2 foi desconsiderada para as próximas etapas. Por outro lado, a proteína truncada 1 de TcALPH1 teve considerável rendimento de expressão, sendo otimizado os parâmetros de indução para 18°C, em uma concentração de 0.1 mM de IPTG, durante 4 horas. Após a otimização do processo de indução da proteína truncada, foi verificado que a maior quantidade da proteína TcALPH1 se encontrava na fração insolúvel, portanto, foi realizada a solubilização da proteína com ureia e posteriormente, realizada a purificação de TcALPH1 por coluna de afinidade. Embora pequenas quantidades da proteína TcALPH1 tenham sido perdidas durante a purificação (*Flow through*), foi possível eluir quantidades consideráveis da proteína nos tampões D, E e F. As Figuras 20 e 21 mostram todas as etapas de indução, solubilização e purificação de TcALPH1 descritas anteriormente, sendo possível identificar a banda correspondente a proteína no tamanho esperado de 33 kDa.



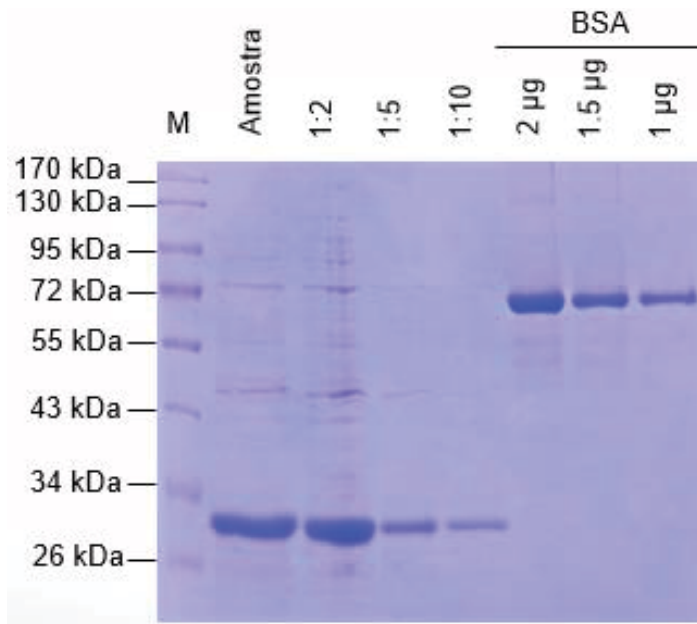


**Figura 20.** Análise da da expressão e solubilização de TcALPH1 em gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. M: Marcador de proteínas (Page Ruler, Thermo Fisher Scientific) (kDa) pré corado. Induzido: Fração celular que expressou a proteína TcALPH1; Não induzido: Controle negativo do experimento, onde não houve a adição de IPTG para a expressão da proteína recombinante; Fração total: Fração celular que corresponde a todo o volume da indução da proteína recombinante ; Fração solúvel: Fração de proteínas que solubilizaram após a lise celular; Fração insolúvel: Fração de proteínas que não solubilizaram após a lise celular; Fração solubilizada: Fração de proteínas insolúveis que foram solubilizadas com ureia.



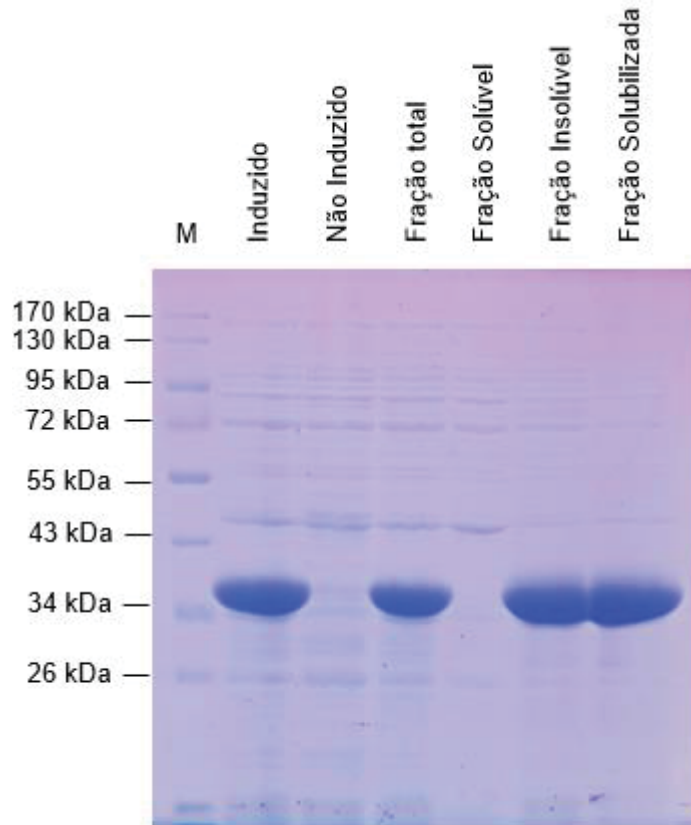
**Figura 21.** Análise da purificação de TcALPH1 em gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. M: Marcador de proteínas (Page Ruler, Thermo Fisher Scientific) (kDa) pré corado. *Flow through*: Fração proteica que não se ligou a resina de níquel; *Lavagem*: Fração proteica eluída no tampão de lavagem; *Imidazol 100 mM*: Fração proteica que eluiu em 100 mM de imidazol; *Imidazol 250 mM*: Fração proteica que eluiu em 250 mM de imidazol; *Imidazol 500 mM*: Fração proteica que eluiu em 500 mM de imidazol.

Após concentrar a proteína em coluna Amicon® Ultra-15, e ressuspender em PBS estéril, foi realizada a quantificação proteica por comparação com curva de BSA (Figura 22), onde foi possível estimar que a concentração aproximada de TcALPH1 em 500  $\mu$ L de PBS era de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Vale ressaltar, que este protocolo de indução e purificação foi realizado duas vezes, objetivando obter a quantidade necessária de proteína para inoculação em camundongos e coelhos.

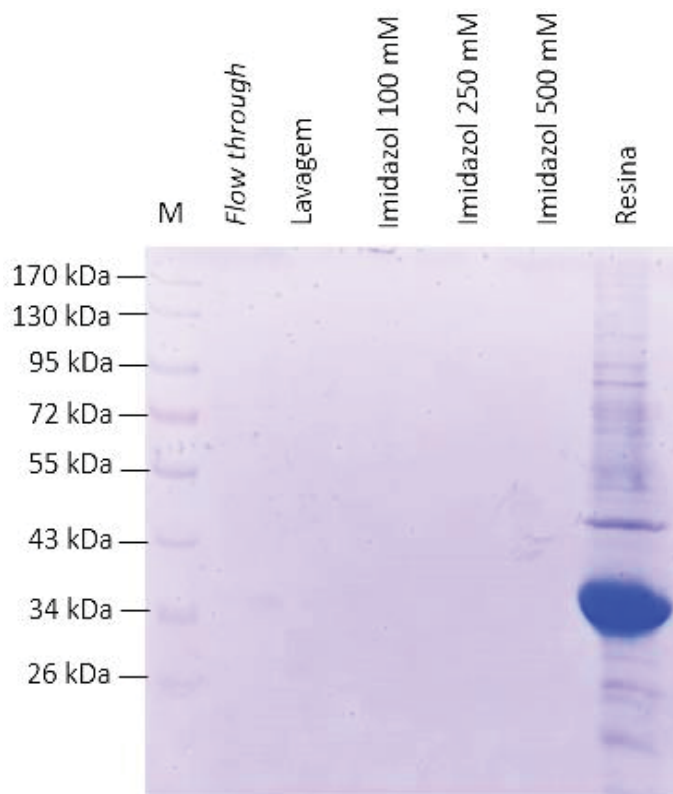


**Figura 22.** Gel SDS-PAGE da quantificação de TcALPH1 recombinante por comparação com curva de BSA. M: Marcador de proteínas (Page Ruler, Thermo Fisher Scientific) (kDa) pré corado. Amostra: TcALPH1 concentrada em PBS; 1:2: TcALPH1 diluída em uma proporção 1:2; 1:5: TcALPH1 diluída em uma proporção 1:5; 1:10: TcALPH1 diluída em uma proporção 1:10; BSA: curva de BSA em diferentes concentrações (2 µg, 1 µg, 0,5 µg).

Para a expressão da construção truncada da proteína TcXRNA, foram padronizadas as condições de indução em 30°C, durante um período de 4 horas, com a adição de 0.1 mM de IPTG. Após a padronização, foi realizada a lise celular por sonicação, onde foi possível observar que a maior concentração de TcXRNA estava na fração insolúvel, portanto, foi realizada a solubilização desta fração com ureia. Após solubilizada, a proteína foi purificada utilizando coluna de afinidade (resina de níquel), seguida de adição de tampões de eluição contendo concentrações crescentes de imidazol (tampão C, D, E e F). Entretanto, a proteína ficou retida na resina, não eluindo nos tampões de eluição, logo, foi necessário correr a resina contendo a proteína em um gel preparativo, e a banda correspondente a proteína recombinante foi cortada do gel e incubada em PBS estéril durante três dias. Todas as frações proteicas obtidas em todas as etapas de indução, solubilização e purificação, são mostradas na Figura 23 e 24, onde é possível identificar a proteína no tamanho esperado de 34 kDa.

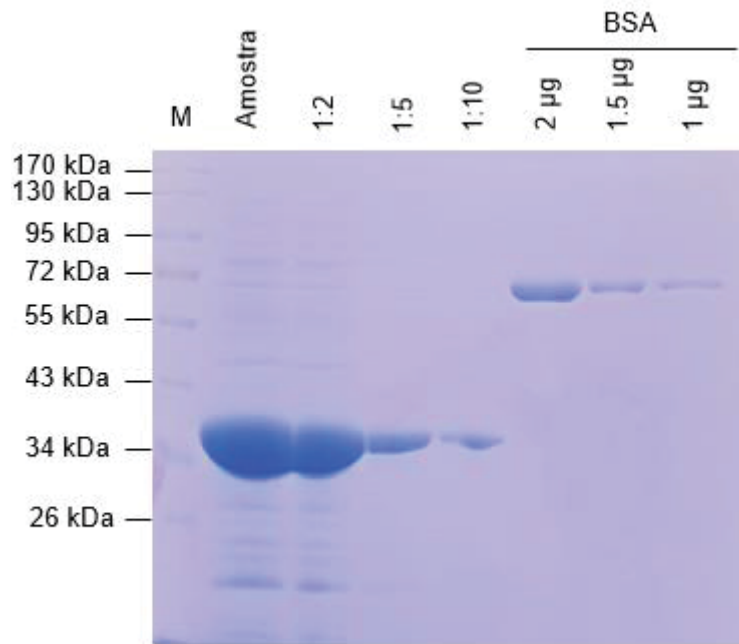


**Figura 23.** Análise da expressão e solubilização de TcXRNA em gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. M: Marcador de proteínas (Page Ruler, Thermo Fisher Scientific) (kDa) pré corado. Induzido: Fração celular que expressou a proteína TcXRNA; Não induzido: Controle negativo do experimento, onde não houve a adição de IPTG para a expressão da proteína recombinante; Fração total: Fração celular que corresponde a todo o volume da indução da proteína recombinante ; Fração solúvel: Fração de proteínas que solubilizaram após a lise celular; Fração insolúvel: Fração de proteínas que não solubilizaram após a lise celular; Fração Solubilizada: Fração de proteínas insolúveis que foram solubilizadas com ureia.



**Figura 24.** Análise da purificação de TcXRNA em gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. M: Marcador de proteínas (Page Ruler, Thermo Fisher Scientific) (kDa) pré corado. *Flow through*: Fração proteica que não se ligou a resina de níquel; *Lavagem*: Fração proteica eluida no tampão de lavagem; *Imidazol 100 mM*: Fração proteica que eluiu em 100 mM de imidazol; *Imidazol 250 mM*: Fração proteica que eluiu em 250 mM de imidazol; *Imidazol 500 mM*: fração proteica que eluiu em 500 mM de imidazol.

Após o período de incubação do gel em PBS, foi realizada a quantificação de XRNA eluida por comparação com uma curva de BSA (Figura 25), onde foi possível estimar que a concentração da proteína em 500  $\mu$ L de PBS era de aproximadamente 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ L. Este protocolo também foi repedido duas vezes, objetivando obter quantidades proteicas suficientes para inoculação em camundongos e coelhos.



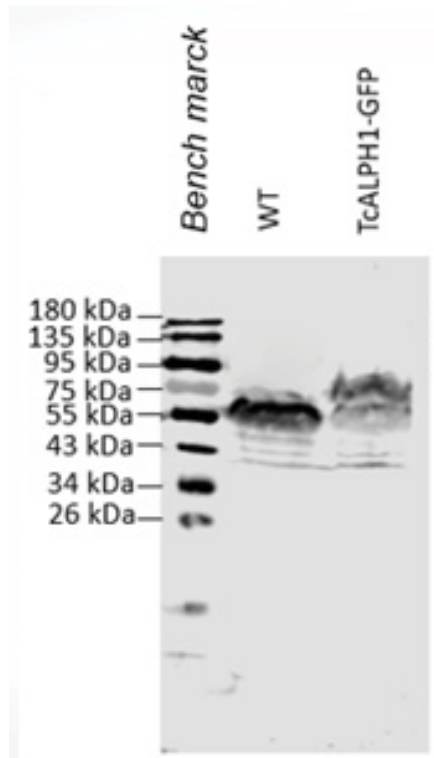
**Figura 25.** Gel SDS-PAGE da quantificação de TcXRNA recombinante por comparação com curva de BSA. M: Marcador de proteínas (kDa) pré corado. Amostra: TcXRNA concentrada em PBS; 1:2: TcALPH1 diluída em uma proporção 1:2; 1:5: TcXRNA diluída em uma proporção 1:5; 1:10: TcALPH1 diluída em uma proporção 1:10; BSA: curva de BSA em diferentes concentrações (2 µg, 1.5 µg, 1 µg).

#### 4.6 Validação dos soros $\alpha$ -TcALPH1 e $\alpha$ -TcXRNA de camundongos.

Após a obtenção dos soros de camundongos, foi avaliada a especificidade dos anticorpos  $\alpha$ -TcALPH1 e  $\alpha$ -TcXRNA através da técnica de *Western blot*, utilizando extratos de parasitas selvagens e parasitas transfectados com os vetores que expressam as proteínas TcALPH1 e TcXRNA fusionadas a GFP. A especificidade do soro  $\alpha$ -TcALPH1 é mostrada na Figura 26, onde observamos o reconhecimento da proteína nativa nos extratos de parasitas selvagens (WT) e transfectantes (TcALPH1-GFP) no tamanho esperado de 71 kDa, assim como o da proteína fusionada a tag GFP presente nos parasitas transfectantes, no tamanho de 91 kDa. O reconhecimento de TcALPH1-GFP utilizando o anticorpo  $\alpha$ -TcALPH1, corrobora os resultados obtidos no *Western blot* (Figura 15) do extrato do transfectante TcALPH1-GFP-C incubado com o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -GFP.

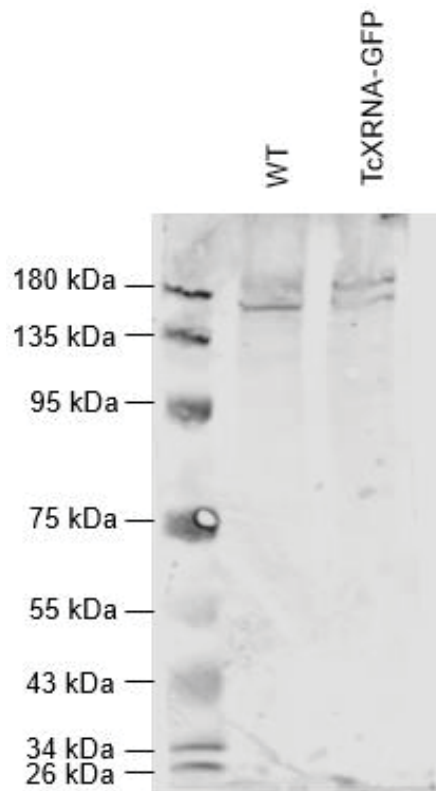
A Figura 27 mostra a especificidade do anticorpo  $\alpha$ -TcXRNA, onde é possível identificar o reconhecimento da proteína nativa no tamanho de 151 kDa presente no extrato do parasita selvagem, assim como o reconhecimento de uma banda em torno

de 151 kDa e outra em 178 kDa no extrato do parasita transfectante, que correspondem a proteína nativa (TcXRNA) e a fusionada a GFP (TcXRNA-GFP), respectivamente.



**Figura 26.** Avaliação da especificidade do soro de camundongo  $\alpha$ -TcALPH1 (diluição 1:500) em extratos de parasitas transfectantes e selvagens. *Bench mark*: WT: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas selvagens; TcALPH1-GFP: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas transfectados com a construção pTcGWGFP-C +TcALPH1.

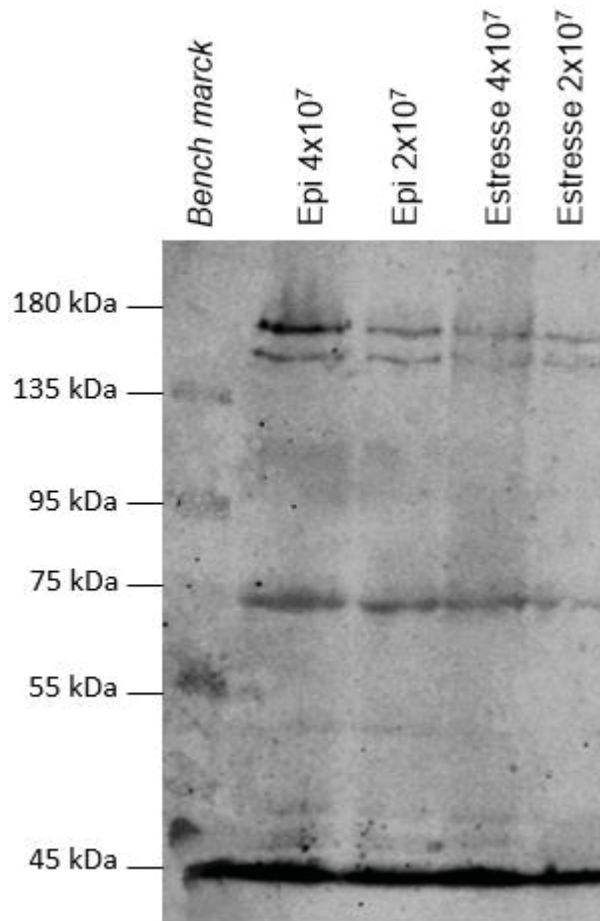




**Figura 27.** Avaliação da especificidade do soro de camundongo  $\alpha$ -TcXRNA (diluição 1:250) em extratos de parasitas transfectantes e selvagens. WT: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas selvagens; TcXRNA-GFP: Extrato de  $2 \times 10^7$  parasitas transfectados com a construção pTcGWGFP-N +TcXRNA.

Os soros de coelhos obtidos passaram por um processo de purificação de anticorpos. A necessidade da purificação se deve ao reconhecimento inespecífico de várias bandas observadas por ensaio de *Western blot* dos extratos de parasitas selvagens e transfectantes tanto nos soros obtidos contra a proteína TcALPH1, como para a proteína TcXRNA (dados não mostrados). Após o processo de purificação os anticorpos policlonais  $\alpha$ -TcALPH1 e  $\alpha$ -TcXRNA foram avaliados quanto a especificidade dos mesmos. Os anticorpos  $\alpha$ -TcALPH1 mesmo após a purificação, não reconheceram a proteína nativa no extrato de parasitas selvagens em diferentes diluições (1:250, 1:500 e 1:1000). Já os anticorpos  $\alpha$ -TcXRNA foram diluídos em uma proporção 1:250 em PBS, sendo específicos para a proteína nativa presente nos extratos dos parasitas selvagens sob condições normais e em parasitas sob estresse nutricional. A Figura 28 mostra a especificidade do anticorpo  $\alpha$ -TcXRNA de coelho, evidenciando que sob condições normais, a proteína TcXRNA é mais expressa em relação a condições de estresse nutricional. Como controle de carga, foi utilizado

anticorpos policlonais de camundongo específicos para a proteína TcEIF4A1, sendo possível identificar pelo reconhecimento de uma banda em torno de 45.5 kDa.



**Figura 28.** Avaliação da especificidade do soro de coelho  $\alpha$ -TcXRNA em extratos de parasitas selvagens sob condições normais de nutrientes e sob estresse nutricional. Epi:  $4 \times 10^7$  - Extrato de  $4 \times 10^7$  epimastigotas sob condições normais de nutrientes; Epi:  $2 \times 10^7$  - Extrato de  $2 \times 10^7$  epimastigotas sob condições normais de nutrientes; Epi:  $4 \times 10^7$  - Extrato de  $4 \times 10^7$  epimastigotas sob condições normais de nutrientes; Estresse:  $4 \times 10^7$  - Extrato de  $4 \times 10^7$  epimastigotas sob condições de estresse nutricional; Estresse:  $2 \times 10^7$  - Extrato de  $2 \times 10^7$  epimastigotas sob condições de estresse nutricional;

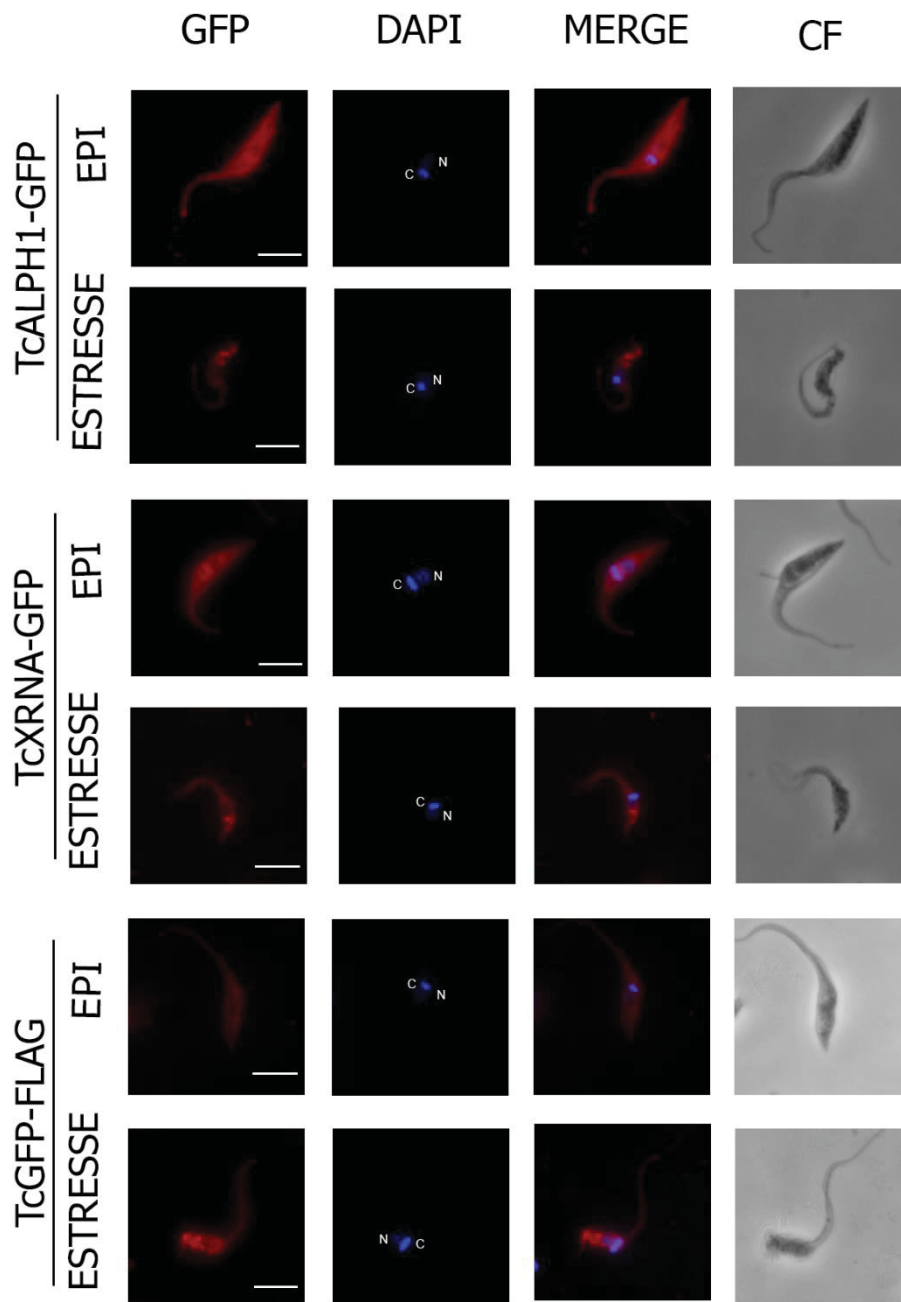
A avaliação da expressão de TcALPH1 sob diferentes condições nutricionais em parasitas selvagens utilizando anticorpos policlonais, será realizada futuramente, assim que otimizado a diluição dos anticorpos de coelho e camundongos para ensaios de *Western blot*.

#### 4.7 Localização subcelular das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP de parasitas transfectantes

A localização das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP foram avaliadas por ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) em parasitas transfectantes, objetivando não somente identificar se estas proteínas alteram sua localização de acordo com a variação das condições nutricionais, mas também para determinar se a etiqueta GFP pode alterar a localização celular das mesmas, e conseguinte, interferir nos demais experimentos, como nos ensaios de imunoprecipitação, por exemplo (Weill et al., 2019).

Em condições normais de nutrientes, a localização das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP (Figura 29) apresentam um perfil difuso pelo citoplasma, entretanto, TcXRNA-GFP apresenta uma concentração maior ao redor do núcleo. Já o controle TcGFP-FLAG, sob condições normais, apresentou o mesmo perfil difuso pelo citoplasma, embora sua fluorescência tenha sido inferior ao dos transfectantes.

Quando analisada a localização destas proteínas em parasitas transfectantes submetidos a condições de estresse nutricional, é possível identificar um perfil granular na parte posterior das células, tanto de TcALPH1-GFP como de TcXRNA-GFP. Entretanto, quando observado o controle TcGFP-FLAG, foi observado um perfil similar. Dessa forma, não foi possível concluir se o perfil granular observado para as proteínas em estudo corresponde de fato a real distribuição das mesmas. Para resolver esta questão, a localização das proteínas fusionadas a GFP em parasitas transfectantes será comparada com a localização das mesmas proteínas em parasitas selvagens através de ensaios de IFI com os anticorpos obtidos em camundongos e coelhos (estes experimentos estão em andamento).



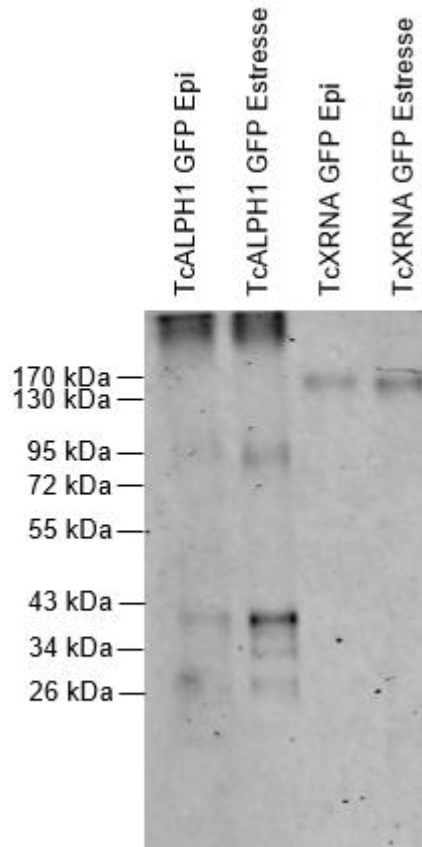
**Figura 29.** Localização das proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em parasitas transfectantes sob condições normais e de estresse nutricional. EPI: formas epimastigotas de parasitas transfectantes; ESTRESSE: parasitas submetidos a estresse nutricional; GFP: marcação da proteína utilizando anticorpo  $\alpha$ -GFP (1:100); DAPI: marcação do núcleo e cinetoplasto; MERGE: sobreposição das imagens marcadas com  $\alpha$ -GFP e DAPI; CF: Contraste de frase. Barra: 5  $\mu$ m; N: Núcleo; C: Cinetoplasto.

#### 4.8 Avaliação de possíveis parceiros funcionais de TcALPH1 e TcXRNA por ensaios de imunoprecipitação (IP)

Para avaliar as possíveis proteínas associadas a TcALPH1 e TcXRNA, foi utilizada a técnica de imunoprecipitação (IPs), seguida de análises em espectrometro de massas. Vale ressaltar, que para esta técnica foram utilizados parasitas transfectados com as construções TcALPH1-GFP C terminal, e TcXRNA-GFP N terminal. Também foram utilizados os *nanobodies*  $\alpha$ -GFP acoplados a microesferas magnéticas.

Inicialmente, foi avaliado se estas proteínas (TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP) foram imunoprecipitadas em formas epimastigotas, sob condições normais e de estresse nutricional (protocolo descrito no item 3.3). Para tanto,  $1,5 \times 10^9$  parasitas ( $5 \times 10^8$  por réplica, em um total de três réplicas) foram peletados e lisados com tampão de lise. A eficiência da lise foi confirmada por visualização em microscópio ótico, e a resina (*nanobodies*  $\alpha$ -GFP acoplados a microesferas) foi incubada com os extratos proteicos, e lavada com o mesmo tampão de lise.

Tanto a proteína TcALPH1-GFP, assim como a proteína TcXRNA-GFP, foram imunoprecipitadas em epimastigotas, e epimastigotas sob estresse nutricional (Figura 30), sendo possível observar o reconhecimento das bandas destas proteínas no tamanho esperado de 91 e 178 kDa, respectivamente. Vale ressaltar, que houve um reconhecimento de banda em torno de 40 kDa nas IPs da ALPH1 em ambas as condições. Este resultado se assemelha a mesma degradação verificada na Figura 14, o que pode influenciar no enriquecimento desta proteína nas IPs, visto que possivelmente a *tag* GFP esteja sendo degradada.

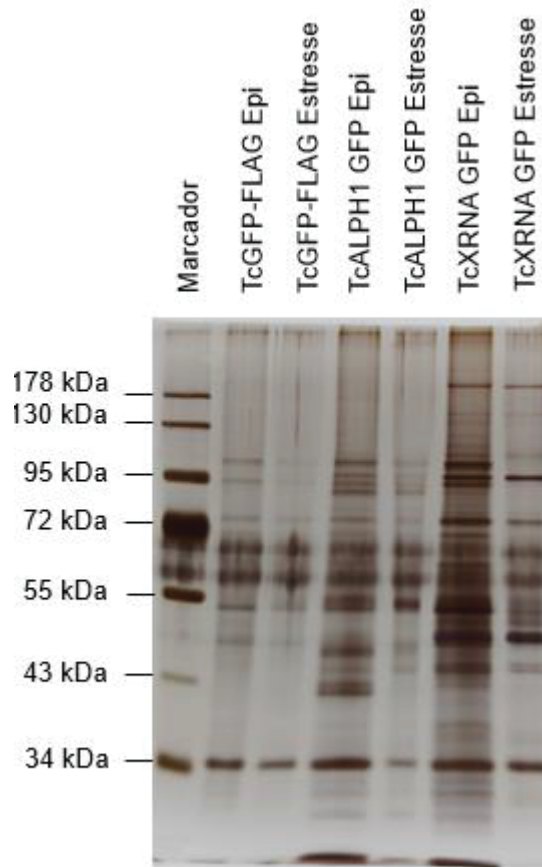


**Figura 30.** *Western blot* das resinas incubadas com os extratos dos parasitas transfectantes expressando TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP. A membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -GFP. TcALPH1 GFP Epi: Resina incubada com extrato do transfectante TcALPH1-GFP sob condições normais de nutrientes; TcALPH1 GFP Estresse: Resina incubada com extrato do transfectante TcALPH1-GFP sob condições de estresse nutricional; TcXRNA GFP Epi: Resina incubada com extrato do transfectante TcXRNA-GFP sob condições normais de nutrientes; TcXRNA GFP Estresse: Resina incubada com extrato do transfectante TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional.

Após a confirmação por *Western blot* da presença das proteínas recombinantes nas IPs em ambas as condições, foi comparado o perfil de eluição das proteínas co-imunoprecipitadas com TcXRNA-GFP e TcALPH1-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG por gel SDS-PAGE 8% corado com nitrato de prata.

A Figura 31 mostra uma clara diferença entre o padrão de bandas dos imunocomplexos obtidos pela imunoprecipitação de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP sob condições normais e de estresse nutricional em relação ao controle TcGFP-FLAG. Entretanto, também é observado uma discreta semelhança entre as amostras, como por exemplo o aparecimento de uma proteína de 30 kDa abundante em todas as IPs,

sendo possivelmente o *nanobody* (30,79 kDa) LaG-16-G4 S-LaG2 (Wien & Vienna, 2018). Esses dados podem indicar que as proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP possam compartilhar um mesmo complexo proteico, o que não exclui a possibilidade da *tag* GFP contribuir com interações inespecíficas.



**Figura 31.** Comparação do perfil de bandas proteicas entre os imunocomplexos obtidos pela imunoprecipitação das proteínas TcALPH1-GFP, TcXRNA-GFP e TcGFP-FLAG em parasitas transfectantes por Eeletroforese em gel SDS-PAGE X% corado com nitrato de prata. Marcador: Marcador de proteínas (kDa) pré corado. TcGFP-FLAG Epi: imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcGFP-FLAG sob condições normais de nutrientes; TcGFP-FLAG Estresse: imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcGFP-FLAG sob condições de estresse nutricional; TcALPH1-GFP Epi: imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcALPH1-GFP sob condições normais de nutrientes; TcALPH1-GFP Estresse: imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcALPH1-GFP sob condições de estresse nutricional; TcXRNA-GFP Epi: imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcXRNA-GFP sob condições normais de nutrientes; TcXRNA-GFP Estresse: Fração proteica que co-imunoprecipitou com a proteína imunocomplexo obtido com nanobodies em parasitas transfectantes que expressam TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional;

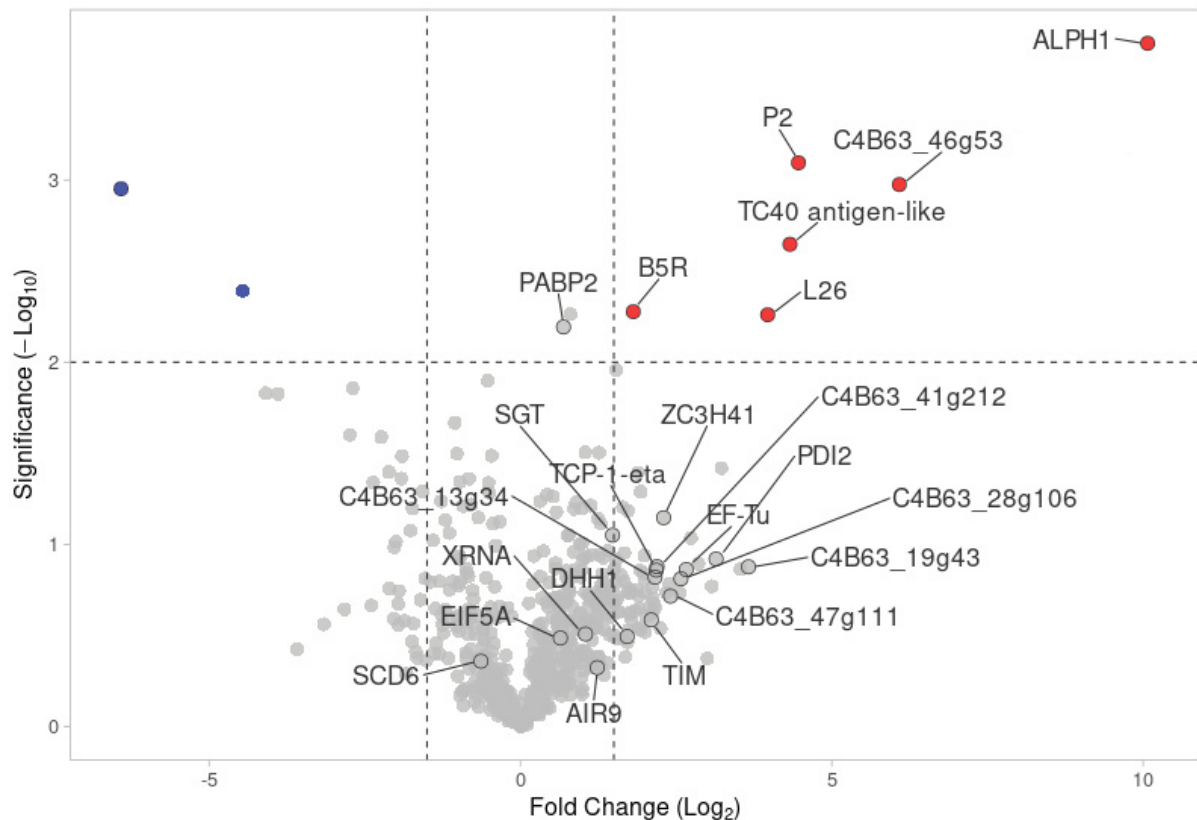


Após avaliada a diferença no perfil proteico entre os imunocomplexos, as amostras foram enviadas para a plataforma de espectrometria de massas para identificação das proteínas parceiras de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP, e os resultados brutos obtidos para as IPs de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em condições normais (Tabela 7 e 9, respectivamente) e estresse nutricional (Tabela 8 e 10, respectivamente), são apresentados no item Anexos. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Perseus através dos valores de intensidade LFQ das IPs de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG, mensurando duas variáveis: a variável *Fold Change* (*t-test* – (Log 2)), que corresponde à comparação de enriquecimento de uma determinada proteína presente na IP em relação ao controle TcGFP-FLAG, e a Significância (*p value* - (- Log 10)). As proteínas consideradas potenciais parceiras são mostradas nas tabelas a seguir, e o resultado completo da análise é mostrada em gráficos de vulcão.

As análises de TcALPH1 - GFP sob condições normais de nutrientes, quando plotadas na Tabela 3, e no gráfico de vulcão (Gráfico 2), evidenciaram que a proteína TALPH1, foi a mais abundante e com maior diferença de intensidade em relação ao controle TcGFP-FLAG. Além disso, as proteínas C4B63\_46g53 e tc40 *antigen-like*, também foram enriquecidas, o que as classificam como potenciais parceiras funcionais, visto que estes alvos foram classificados como 2º e 4º maior *hit* na IP de TcALPH1-GFP (Tabela 3). Também foi observado que proteínas envolvidas no metabolismo de RNAm, também co-imunoprecipitaram com TcALPH1-GFP, como por exemplo TcDHH1 (C4B63\_54g24 – *DEAD-box* RNA Helicase), com uma diferença de enriquecimento significativa em relação ao controle TcGFP-FLAG, muito embora tenha demonstrado uma baixa significância (*Fold Change* = 1.72; Significância = 0.4).

ID da proteína	Nome da proteína	<i>p</i> - value	<i>Fold Change</i>
C4B63_49g176	ALPH1	3,750380124	10,07176654
C4B63_46g53	C4B63_46g53	2,975096428	6,084687551
C4B63_26g1318c	P2	3,094423325	4,46473821
C4B63_52g40	TC40 antigen-like	2,647173059	4,328128179
C4B63_32g1132c	L26	2,260122443	3,97045962

**Tabela 3.** Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcALPH1-GPF sob condições normais. ID da proteína: Código correspondente a proteína na base de dados TryTripDB; Nome da Proteína: Identificação da proteína na base de dados TryTripDB; *p*-value: Significância estatística da amostra analisada. *Fold Change*: Diferença de enriquecimento da amostra em relação ao controle TcGFP-FLAG.



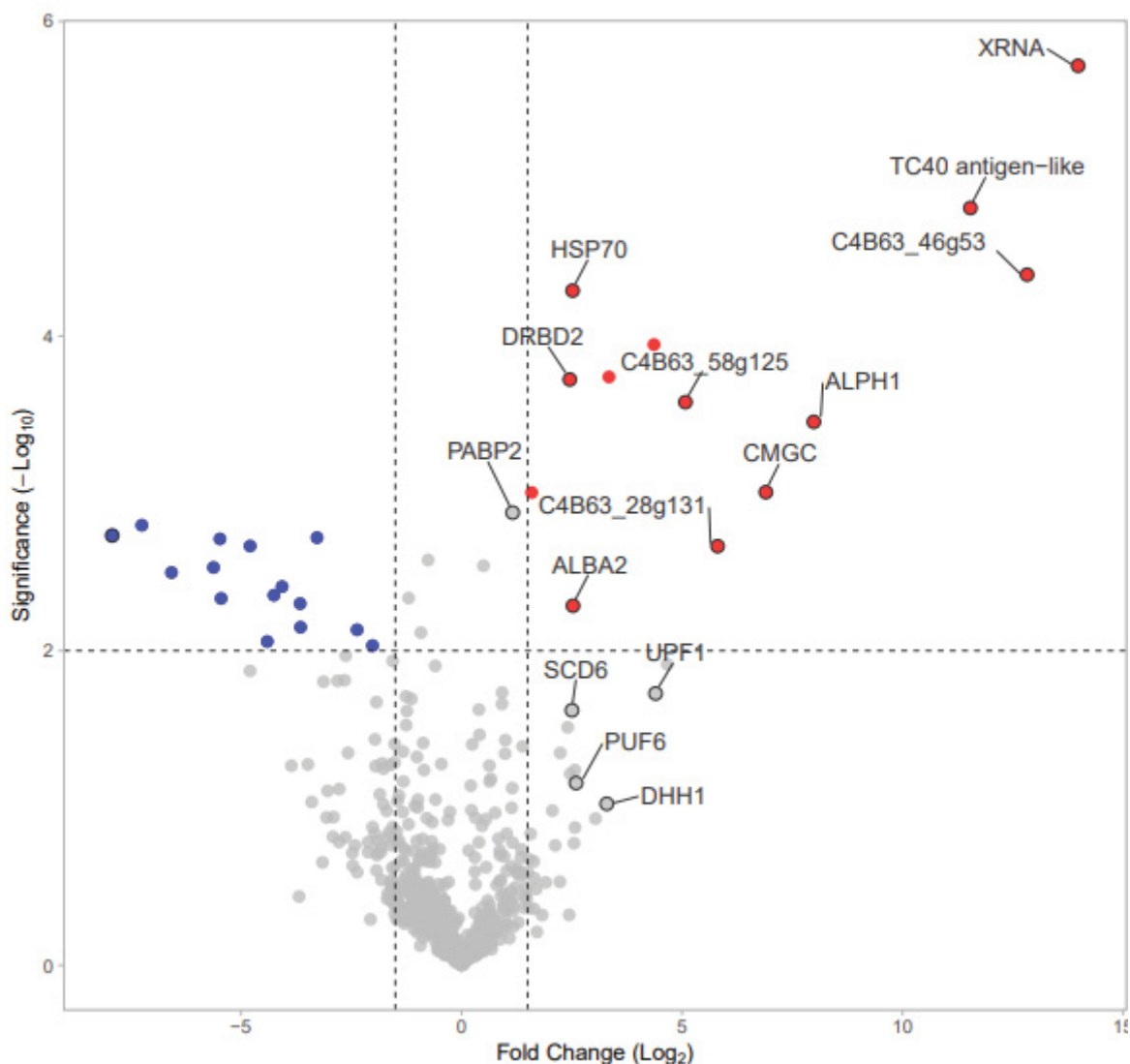
**Gráfico 2.** Gráfico de vulcão da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcALPH1-GFP em parasitas cultivados sob condições normais de nutrientes. No eixo X estão representados os valores do *fold change* ( $\text{Log}_2$ ); No eixo Y estão representados os valores de Significância p ( $-\text{Log}_{10}$ ); Linha de corte para o *fold change* ( $\text{Log}_2$ )  $\geq 2$ ; Linha de corte para p ( $-\text{Log}_{10}$ )  $\geq 2$ ; Pontos em vermelho: Proteínas

enriquecidas na IP de TCALPH1-GFP consideradas potenciais alvos; Pontos em azul: Proteínas enriquecidas na IP do controle TcGFP-FLAG. Pontos em cinza: Proteínas abaixo da linha de corte.

Já nas análises da IP de TcXRNA-GFP em condições normais de nutrientes (Tabela 4 e Gráfico 3), foi verificado que a proteína TcXRNA foi a mais enriquecida, e a que mais apresentou diferença de intensidade em relação ao controle TcGFP-FLAG. Junto com esta proteína, foi observado um elevado enriquecimento das proteínas C4B63\_46g53, tc40 *antigen-like*, ALPH1, HSP70, DRBD2, ALBA2, CMGC, C4B63\_58g125, C4B63\_28g131, o que pode indicar que estas proteínas sejam potenciais alvos e que compartilhem o mesmo complexo proteico com TcXRNA. Nesta IP, também foi observada a presença de TcDHH1 em uma considerável diferença de enriquecimento em relação ao controle TcGFP-FLAG, muito embora com um baixo nível de significância (*Fold Change* = 3.3; Significância = 1). Além de TcDHH1, outras proteínas envolvidas na desestabilização/estabilização de RNAs também obtiveram elevadas diferenças em relação ao controle, porém, com baixa significância, tais como uma RBP com domínio pumílio (C4B63\_13g295-TcPUF6), e uma proteína do complexo LSM1-4 (C4B63\_19g91-TcSCD6).

ID da proteína	Nome da proteína	<i>p-value</i>	<i>Fold Change</i>
C4B63_6g572	XRNA	5,718170247	13,98172887
C4B63_46g53	C4B63_46g53	4,390058365	12,82477506
C4B63_52g40	TC40 antigen-like	4,814011487	11,53979874
C4B63_49g176	ALPH1	3,454634581	7,989208221
C4B63_113g35	CMGC	3,007656843	6,901533127
C4B63_28g131	C4B63_28g131	2,664327441	5,807302475
C4B63_58g125	C4B63_58g125	3,579835863	5,077177048
C4B63_2g748	C4B63_2g748	3,945562559	4,363962173
C4B63_6g317	HSP70	3,740016814	3,343570073
C4B63_51g842c	ALBA2	2,285549079	2,528383891
C4B63_2g50	DRBD2	3,724089706	2,455034892

**Tabela 4.** Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcXRNA-GFP sob condições normais. ID da proteína: Código correspondente a proteína na base de dados TryTripDB. Descrição: Classificação funcional da proteína; Nome da Proteína: Identificação da proteína na base de dados TryTripDB; Intensidade: Divisão da média das intensidades da proteína detectada nas IPs de TcXRNA-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG.



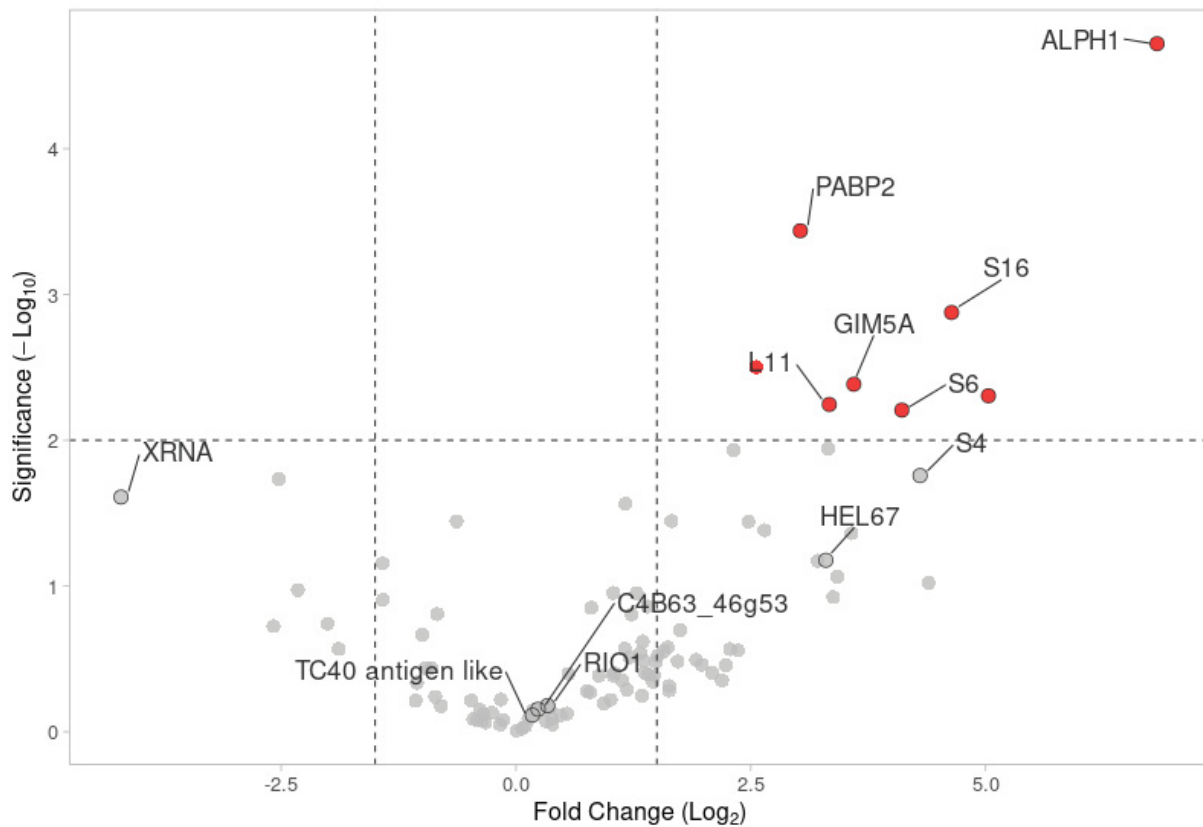
**Gráfico 3.** Gráfico de vulcão da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcXRNA-GFP sob condições normais de nutrientes. No eixo X estão representados os valores do *Fold change* ( $\text{Log}_2$ ); No eixo Y estão representados os valores de Significância p ( $-\text{Log}_{10}$ ); Linha de corte para o *fold change* ( $\text{Log}_2$ )  $\geq 2$ ; Linha de corte para p ( $-\text{Log}_{10}$ )  $\geq 2$ ; Pontos em vermelho: Proteínas enriquecidas na IP de TcXRNA-GFP consideradas potenciais alvos; Pontos em azul: Proteínas enriquecidas na IP do controle TcGFP-FLAG. Pontos em cinza: Proteínas abaixo da linha de corte.

Embora TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP tenham sido enriquecidas em suas respectivas IPs, observamos que a proteína TcALPH1 está presente nos imunocomplexos obtidos em parasitas transfectantes TcXRNA-GFP. Entretanto, o inverso não foi observado, ou seja, não observamos a presença de TcXRNA nos imunocomplexos obtidos em parasitas transfectantes para TcALPH1-GFP. Alguns fatores podem ter influenciado para esse resultado, dentre eles, a diferença de abundância de ambas as proteínas tanto nos parasitas selvagens, assim como nos transfectantes. Outro fator que pode ter influenciado, é a degradação da *tag* GFP nos transfectantes TcALPH1-GFP, o que pode ter afetado, em parte, o enriquecimento desta proteína e por consequência, o enriquecimento de outros parceiros funcionais.

Quando analisado o perfil de proteínas enriquecidas em parasitas sob estresse nutricional, é notável a presença de complexos ribossomais tanto nas IPs de TcALPH1-GFP, como de TcXRNA-GFP. A Tabela 5 e Gráfico 4 demonstram que TcALPH1-GFP foi enriquecida na sua respectiva IP, obtendo a maior intensidade e diferença de enriquecimento em relação ao controle TcGFP-FLAG. Como mencionado anteriormente, há uma prevalência de proteínas ribossomais, tais como 3 proteínas da subunidade 40S (C4B63\_46g77- S4; C4B63\_32g235 - S8; C4B63\_2g691 - S11) e duas subunidades 60S (C4B63\_43g4 – L9; C4B63\_17g70 – L40). Além das proteínas ribossomais, foi enriquecida uma proteína de membrana do peroxissomo (C4B63\_2g708 – Gim5A) e a PABP2. Surpreendentemente, as proteínas C4B63\_46g53 e *tc40 antigen-like*, presentes nas IPs de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em condições normais, não foram enriquecidas nesta IP, o que pode indicar que em uma situação de estresse, estas duas proteínas não pertençam ao mesmo complexo de TcALPH. Inclusive, TcXRNA teve uma maior presença no controle TcGFP-FLAG, do que na própria IP de TcALPH1-GFP, sendo possível verificar a presença da proteína com um *Fold Change* < -2.5.

ID da proteína	Nome da proteína	<i>p</i> -value	Fold Change
C4B63_49g176	ALPH1	4,720343772	6,825406392
C4B63_32g234	S8	2,304881222	5,029883385
C4B63_8g476	S16	2,876294934	4,63803641
C4B63_75g59	S6	2,20693981	4,108193715
C4B63_2g708	GIM5A	2,384317508	3,596400579
C4B63_38g164	L11	2,245592752	3,335516294
C4B63_2g174	PABP2	3,436860472	3,027383804
C4B63_93g76	S11	2,502528721	2,558455149

**Tabela 5.** Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcALPH1-GFP sob condições de estresse nutricional. ID da proteína: Código correspondente a proteína na base de dados TryTripDB. Descrição: Classificação funcional da proteína; Nome da Proteína: Identificação da proteína na base de dados TryTripDB; Intensidade: Divisão da média das intensidades da proteína detectada nas IPs de TcALPH1-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG.



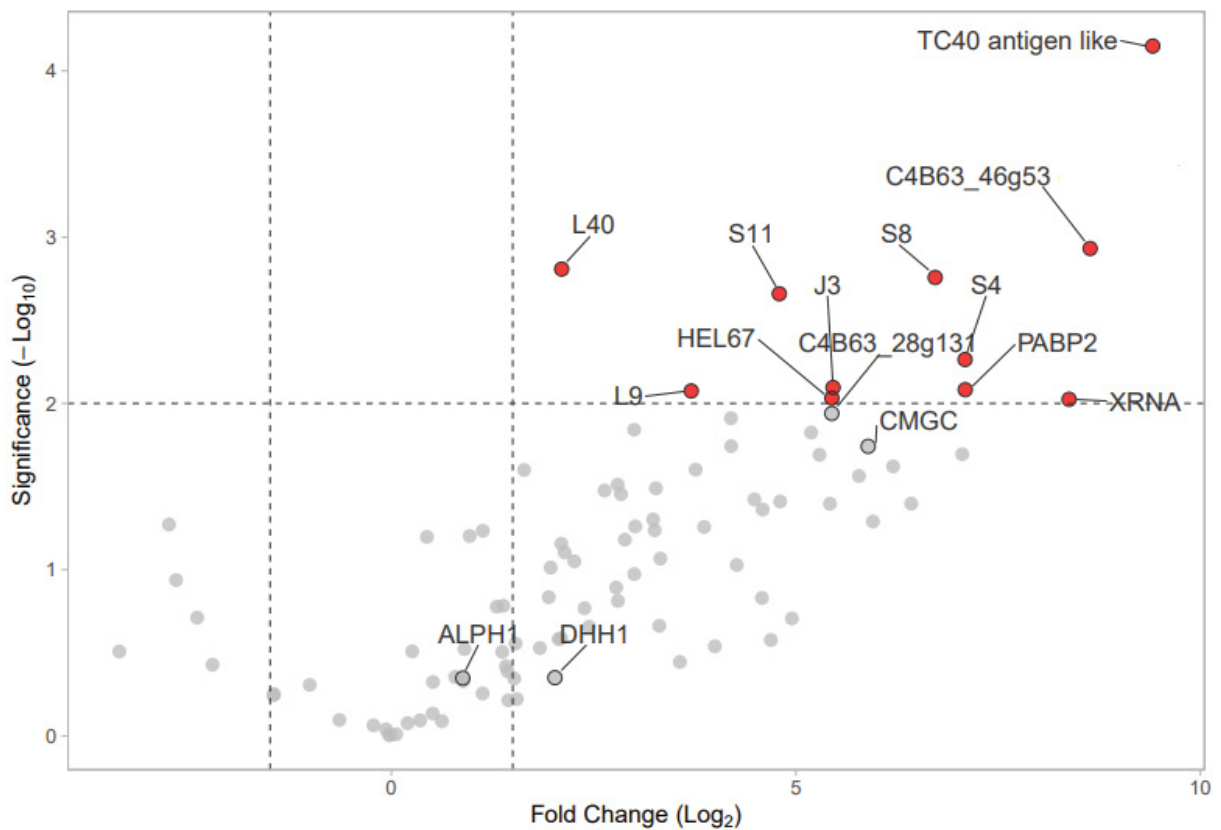
**Gráfico 4.** Gráfico de vulcão da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcALPH1-GFP sob condições normais de estresse nutricional. No eixo X estão representados os valores do *fold change* ( $\text{Log}_2$ ); No eixo Y estão representados os valores de Significância p ( $-\text{Log}_{10}$ ); Linha de corte para o *fold change* ( $\text{Log}_2$ )  $\geq 2$ ; Linha de corte para p ( $-\text{Log}_{10}$ )  $\geq 2$ ; Pontos em vermelho: Proteínas enriquecidas na IP de TcALPH1-GFP consideradas potenciais alvos; Pontos em cinza: Proteínas abaixo da linha de corte.

A IP de TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional (Tabela 6 e Gráfico 5), apresentou uma baixa significância para a proteína TcXRNA, mas ainda sim cumpriu o critério para inclusão. Por outro lado, a diferença em relação ao controle TcGFP-FLAG foi significativa, possuindo um *Fold Change* superior a 5. Além disso, o perfil de proteínas co-imunoprecipitadas foi semelhante ao obtido pela análise da IP de TcALPH1-GFP sob condição de estresse (Gráfico 4), prevalecendo a presença de proteínas ribossomais. Dentre essas proteínas, se encontram 3 proteínas da subunidade 40S (C4B63\_46g77 – S4; C4B63\_32g235 – S8; C4B63\_93g76 – S11) e 2 proteínas da subunidade 60S (C4B63\_43g4 – L9; C4B63\_93g76 – L11). Além disso, a PABP2 também foi enriquecida nesta IP (Fold Change > 5; Significância > 2), indicando que em situações de estresse nutricional, possivelmente esta RBP esteja presente em complexos que contenham proteínas (TcALPH1 e TcXRNA) envolvidas na degradação/e ou estabilidade de RNAm. Ao contrário do que foi observado na IP de TcALPH1-GFP em condições de estresse, as proteínas C4B63\_46g53 e TC40 *antigen like* foram as proteínas mais enriquecidas na IP de TcXRNA-GFP sob condições de estresse. Dentre outras proteínas que foram consideradas enriquecidas nesta IP, vale destacar uma RNA helicase associada a inibição da degradação de RNAs ribossomais (C4B63\_4g90 – HEL67)



Nome da proteína	<i>p-value</i>	<i>Fold Change</i>
TC40 antigen like	4,149391474	9,411772728
C4B63_46g53	2,931832098	8,638168335
XRNA	2,02482301	8,377276421
PABP2	2,082533193	7,093518257
S4	2,264107214	7,091401577
S8	2,757348972	6,722294331
J3	2,095650958	5,459733009
HEL67	2,032133546	5,444783688
S11	2,659574998	4,795094013
L9	2,07492785	3,706874847
L40	2,808092413	2,105295181

**Tabela 6.** Relação de proteínas enriquecidas nas imunoprecipitações da proteína TcXRNA-GPF sob condições de estresse nutricional. ID da proteína: Código correspondente a proteína na base de dados TryTripDB. Descrição: Classificação funcional da proteína; Nome da Proteína: Identificação da proteína na base de dados TryTripDB; Intensidade: Divisão da média das intensidades da proteína detectada nas IPs de TcXRNA-GFP em relação ao controle TcGFP-FLAG.



**Gráfico 5.** Gráfico de vulcão da distribuição de proteínas co-imunoprecipitadas com TcXRNA-GFP sob condições normais de estresse nutricional. No eixo X estão representados os valores do *Fold change* ( $\text{Log}_2$ ); No eixo Y estão representados os valores de Significância p ( $-\text{Log}_{10}$ ); Linha de corte para o *fold change* ( $\text{Log}_2$ )  $\geq 2$ ; Linha de corte para p ( $-\text{Log}_{10}$ )  $\geq 2$ ; Pontos em vermelho: Proteínas enriquecidas na IP de TcXRNA-GFP consideradas potenciais alvos; Pontos em cinza: Proteínas abaixo da linha de corte.

Após avaliado o perfil de proteínas coimunoprecipitadas nas IPs de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em condições normais e sob estresse nutricional, foi observado que houve um elevado de duas proteínas hipotéticas, sendo elas a Tc40 *antigen-like* e a C4B63\_46g53. Em condições normais de nutrientes, estas proteínas foram enriquecidas tanto na IP de TcALPH1-GFP assim como na de TcXRNA-GFP, mas em condições de estresse nutricional, estas proteínas foram enriquecidas exclusivamente na IP de TcXRNA-GFP. Quando avaliado a sequência de aminoácidos da proteína C4B63\_46g53 no site Pfam (Figura 32A) e no Phyre 2 (Figura 32B), foi identificada a presença de um domínio denominado “região WD40 de Ge-1”, descrita como “aprimorador da proteína *decapping* do RNAm”. Este domínio possui 95.7% de

confidência com o domínio da proteína Ge-1 de mamíferos de acordo com análises no Phyre 2.

A

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length
				Start	End	Start	End	From	To	
<a href="#">Ge1_WD40</a>	WD40 region of Ge1, enhancer of mRNA-decapping protein ( <a href="#">shorten</a> )	Domain	<a href="#">CL0186</a>	189	292	202	263	<b>229</b>	<b>292</b>	329
<a href="#">Med11</a>	Mediator complex protein	Domain	n/a	438	640	440	517	<b>6</b>	<b>61</b>	137
<a href="#">Pup</a>	Pup-like protein	Domain	n/a	472	539	489	535	<b>14</b>	<b>60</b>	68
<a href="#">Pup</a>	Pup-like protein	Domain	n/a	590	636	605	634	<b>20</b>	<b>49</b>	68
<a href="#">Lin0512_fam</a>	Conserved hypothetical protein (Lin0512_...)	Domain	n/a	331	428	335	410	<b>19</b>	<b>97</b>	114
<a href="#">DHHA1</a>	DHHA1 domain	Domain	n/a	501	608	508	591	<b>8</b>	<b>92</b>	138
<a href="#">DHHA1</a>	DHHA1 domain	Domain	n/a	619	693	620	678	<b>3</b>	<b>69</b>	138

B

Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
Alignment		95.7	22	<p><b>PDB header:</b>gene regulation  <b>Chain:</b> B; <b>PDB Molecule:</b>cg6181-pa, isoform a;  <b>PDBTitle:</b> crystal structure of the conserved c-terminal region of ge-2 1</p> 

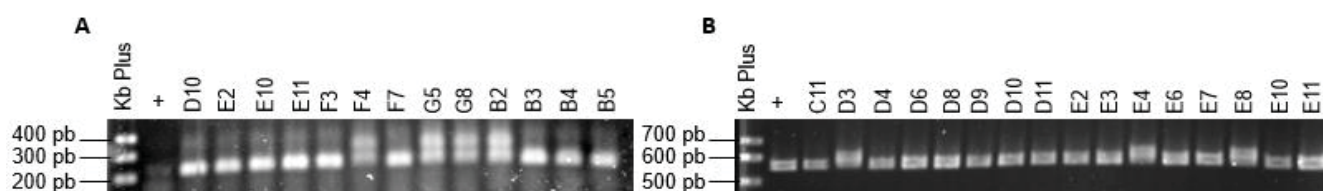
**Figura 32** – Análise de sequência da proteína C4B63\_46g53 pelo *software* Pfam e Phyre2. A – Análise de sequência proteica de C4B63\_46g53 realizada no Pfam; B - Análise de sequência proteica de C4B63\_46g53 realizada no Phyre2.

#### 4.9 Obtenção dos clones nocautes e heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA

A primeira etapa para o sucesso da técnica de CRISPR-Cas9 é identificar um RNA guia que afete os parasitas (em relação à crescimento; surgimento de fenótipo aberrante; proporção de fenótipo aberrante em relação ao fenótipo selvagem). Assim, três RNA guias para cada gene (Tabela 2), TcALPH1 e TcXRNA, foram selecionados e transfectados individualmente em parasitas transfectantes que expressam a proteína Cas9 fusionada à proteína GFP. Após a transfecção e acompanhamento dos parasitas durante uma semana, foi definido que os RNAg TcALPH1 34 e TcXRNA 309 foram os que mais afetaram o crescimento e o fenótipo dos parasitas. Em seguida, foram realizadas duas transfecções (com intervalo de 3 dias entre cada transfecção)

de RNAg TcALPH1 34 e TcXRNA 309 juntamente com a respectiva molécula doadora *DONOR* (sequência nucleotídica constituída por stop códon, M13 e braços de homologia correspondente a região específica de clivagem de cada gene) para auxiliar a recombinação homóloga durante o processo de reparo da quebra de DNA, bem como inserir sequências conhecidas para facilitar a seleção dos parasitas nocaute e/ou heminocaute por reações de PCR. Após o processo de *cell sorting* das culturas transfectadas, e posterior turbidez dos poços contendo os clones, a presença de parasitas nocautes e heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA foi avaliada por PCR utilizando *primers* que se anelam na parte intacta do gene selvagem e na região de clivagem do gene pela Cas9. Se a clivagem do gene ocorre e o *DONOR* é inserido, um dos *primers* não irá se anelar e a PCR não ocorrerá. Entretanto, quando foram realizadas as PCRs dos clones crescentes em placa, os *primers* desenhados acabaram se anelando em uma região adjacente ao local da clivagem dos genes de TcALPH1 e TcXRNA, gerando uma diferença de 30 pb entre os produtos de PCRs do gene selvagem em relação ao mutado. Essa diferença de 30 pb, se deve a inserção do *DONOR* no local da clivagem do gene.

Após a análise das PCR, foi possível observar que obtivemos apenas clones heminocautes para o gene TcALPH1 (Figura 33A), sendo caracterizado pela presença de uma banda de 285 pb que representa o alelo selvagem, juntamente com uma banda de 315 pb, representada pelo alelo nocauteado para o gene. A amplificação destas duas bandas foi identificada em 13 possíveis clones, sendo 4 deles (F4, G5, G8, B2) representados na Figura 28A. Já para o gene TcXRNA, também foram obtidos somente clones heminocautes (Figura 33B), onde é possível ver a banda de 554 pb que corresponde ao alelo selvagem, e uma banda de 584 pb correspondente ao alelo nocauteado para o gene. Foram obtidos um total de 5 possíveis clones heminocautes para TcXRNA, 3 deles (D3, E4, E8) são mostrados abaixo.



**Figura 33.** Análise de possíveis clones nocautes/heminocautes para os genes TcALPH1 e TcXRNA. Kb Plus: Marcador de base 1 Kb Plus; + - Controle positivo utilizando DNA genômico do parasita transfectante TcCas9-GFP; A - Análise de PCR do DNA genômico dos possíveis clones (D10, E2, E10,

E11, F3, F4, F7, G5, G8, B2, B3, B4, B5) nocautes/heminocautes para TcALPH1; B - Análise de PCR do DNA genômico dos possíveis clones (C11, D3, D4, D6, D8, D9, D10, D11, E2, E3, E4, E6, E7, E8, E10, E11) nocautes/heminocautes para TcXRNA.

Após a obtenção dos clones heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA, o material genético de 4 clones de cada um dos genes foi extraído e enviado para sequenciamento. Quando analisados os resultados obtidos, foi observada uma baixa resolução a partir do local da inserção do *DONOR* (dados não mostrados), sendo um resultado já esperado pois a presença da inserção do *DONOR* em um dos alelos e no outro não, gera dois picos no local de leitura. O fato de não termos obtido clones nocautes pode sugerir que estes genes sejam essenciais ao parasita. Para confirmar esta hipótese, pelo menos mais três transfecções serão realizadas com os RNAg selecionados.

## 5 DISCUSSÃO

A degradação de RNAm é um mecanismo essencial para o controle do ciclo do RNA, pois é um processo responsável pelo tempo de meia vida de RNAm (*turnover*). Tal evento, permite que a célula regule a estabilidade de transcritos incorretos, assim como a permanência e o acúmulo de RNAm presentes no citoplasma, refletindo diretamente no perfil de expressão proteica, o que possibilita uma rápida resposta celular a variações ambientais (Tourrière, 2002).

Em tripanosomatídeos, as proteínas de decapeamento ALPH1 e a exonuclease XRNA atuam como elementos centrais no metabolismo de RNA (Kramer, 2017). Nesse sentido, a caracterização de TcALPH1 e sua possível relação com TcXRNA são de grande relevância para a compreensão da dinâmica dos RNAm no *T. cruzi*.

Nessa dissertação, foi mostrado que TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP apresentaram um perfil de localização difuso pelo citoplasma, com maior concentração ao redor do núcleo, perfil semelhante ao de grânulos perinucleares já descrito para XRNA em *T. cruzi* (Costa et al., 2018). Estes dados podem evidenciar um possível controle do destino dos RNAm recém exportados do núcleo para o

citoplasma. Em *T. brucei* por exemplo, também foi observada a presença de proteínas de *P-bodies* tais como DHH1 e SCD6 em grânulos perinucleares, e sua formação é dependente da integridade de complexo de poros nucleares (Kramer, 2012). Quando estes parasitas transfectantes foram submetidos a condições de estresse nutricional, as proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP apresentaram um perfil mais granular concentradas na parte posterior da célula. Essa mudança no perfil de localização pode evidenciar que estas proteínas estejam sendo direcionadas para grânulos de estresse, muito embora não tenha sido possível observar a presença de um grânulo no polo posterior da célula, onde apenas as proteínas ALPH1 e XRNA estão presentes, como já descrito em *T. brucei* (Kramer, 2017). Entretanto, o estresse submetido em *T. brucei* foi por PBS durante um período de duas horas, diferente do realizado em *T. cruzi*, onde o parasita foi submetido a um estresse em TAU por duas horas, o que pode ter influenciado no perfil de localização proteica. Contudo, o parasita controle TcGFP-FLAG apresentou um perfil granular similar sob situações de estresse celular, não sendo possível concluir se as proteínas TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP tiveram a localização subcelular alterada pela *tag* GFP. Dessa maneira, será necessário, em um novo experimento, utilizar os anticorpos policlonais ( $\alpha$ -TcALPH1 e  $\alpha$ -TcXRNA) já purificados, para avaliar o perfil de distribuição destas proteínas em parasitas selvagens.

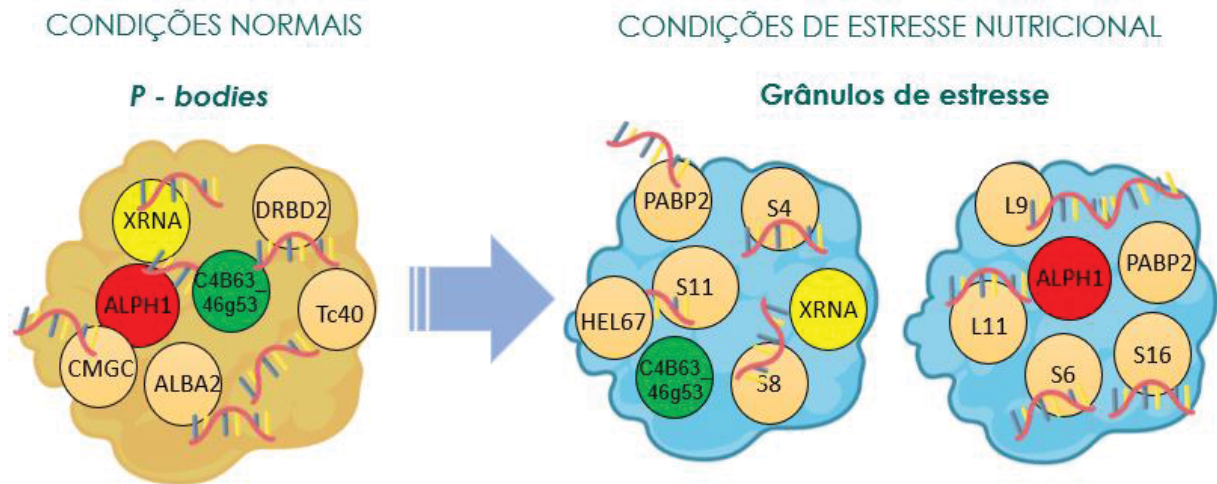
Quando realizada a IP de TcALPH1-GFP em parasitas mutantes sob condições normais de cultivo, foi observado que a proteína TcXRNA e TcDHH1 não estavam presentes no imunocomplexo de TcALPH1. Em contrapartida, na imunoprecipitação de TcXRNA-GFP nas mesmas condições, foi observado um elevado enriquecimento de TcALPH1, o que pode possivelmente indicar, que TcALPH1 seja mais abundante que TcXRNA na célula, porém somente uma análise de expressão por *western blot* destas proteínas em parasitas transfectantes e selvagens, poderia esclarecer esse achado. Outro fator que vale a pena destacar, é que duas proteínas foram enriquecidas tanto na IP de TcALPH1-GFP quanto TcXRNA-GFP em epimastigotas cultivados sob condições ótimas de nutrientes, sendo elas a Tc40 *antigen-like* e a C4B63\_46g53 (proteína hipotética de acordo com a plataforma de dados do TrypDB). Quando analisada a sequência de aminoácidos de C4B63\_46g53, foi identificada a presença de um domínio denominado “região WD40 de Ge-1”, descrita como “aprimrador da proteína *decapping* do RNAm”. Este

domínio possui 95.7% de confiança com o domínio da proteína Ge-1 de mamíferos, sendo responsável pelo recrutamento de Dcp1 e Dcp2 nestes organismos. Além desse domínio, a proteína Ge-1 também possui domínios de repetições  $\psi$  ( $X_{2-3}$ ), responsáveis pelo direcionamento de Ge-1 até os *P-bodies* (Yu et al., 2005). Portanto, nós hipotetizamos que em *T. cruzi*, esta proteína possa recrutar TcALPH1 para grânulos *P-bodies like*, visto que C4B63\_46g53 foi enriquecida não somente com TcALPH1, mas também com uma proteína classicamente encontrada em *P-bodies*, a TcXRNA.

Por outro lado, sob condições de estresse nutricional, houve uma prevalência de proteínas de subunidades ribossomais enriquecidas nas imunoprecipitações tanto de TcALPH1 quanto de TcXRNA, o que pode ser um indicio que estas proteínas estejam presentes em grânulos de estresse, visto que nesse tipo de grânulo é encontrado proteínas ribossomais e fatores de início de tradução (Kerdesha, 2002). Além disso, na IP de TcXRNA-GFP em condições de estresse nutricional, a proteína TcALPH1 foi excluída do imunocomplexo, embora tenha sido observado o enriquecimento da proteína C4B63\_46g53 com TcXRNA. Em contraste, na IP de TcALPH1-GFP não foi observado o enriquecimento de C4B63\_46g53. Uma possível explicação para esse resultado, é que em situações de estresse, C4B63\_46g53 não recruta TcALPH1 para grânulos de RNAm que contenham TcXRNA, e por consequência, TcALPH1 e TcXRNA passam a não partilharem o mesmo complexo ribonucleoprotéico. Um fator que pode influenciar na mudança dos elementos deste complexo, é a diminuição na expressão de TcXRNA quando o parasita está sob condições de estresse nutricional (Figura 29). Outro achado que reforça esses dados, é o enriquecimento da proteína HEL67 na IP de TcXRNA sob condições de estresse, uma helicase que inibe a degradação de RNAs ribossomais específicos, o que pode atuar de maneira conjunta com C4B63\_46g53 na regulação da formação do complexo de degradação de RNAs sob condições de estresse. A Figura 34 representa o modelo da hipótese levantada sobre a dinâmica dessas proteínas quando o parasita está submetido a condições normais e de estresse nutricional. Esses resultados divergem dos achados em *T. brucei*, onde foi observado a co-localização de TbALPH1 e TbXRNA em condições de estresse nutricional (Kramer, 2017). Entretanto, TcXRNA-GFP não foi a proteína mais enriquecida em sua imunoprecipitação, o que pode influenciar diretamente no enriquecimento dos seus parceiros proteicos e interferir nas análises. Para resolver



esta questão, será necessário repetir os experimentos de IP em condições de lise menos estridentes, como por exemplo, utilizando tampão sem detergente e lisando os parasitas pelo método de cavitação.



**Figura 34** – Dinâmica das proteínas TcALPH1 e TcXRNA nos grânulos de RNAs, durante condições normais e de estresse nutricional.

Fonte: Autor, 2021.

Contudo, os resultados de imunoprecipitações e imunofluorescência indicam que TcALPH1 e TcXRNA sob condições normais, apresentam um perfil difuso pelo citoplasma com uma concentração maior ao redor do núcleo, possivelmente pertencendo a um mesmo complexo proteico. Estas proteínas podem estar localizadas em grânulos de RNAs semelhante a *P-bodies like*, e suas localizações possivelmente sejam mediadas por proteínas ainda não caracterizadas, como por exemplo a proteína C4B63\_46g53. Sob situações de estresse nutricional, TcALPH1 e TcXRNA parecem adotar um perfil mais granular, e pertencerem a complexos constituídos majoritariamente por proteínas ribossomais, o que pode indicar que estes grânulos sejam de estresse nutricional. Entretanto, TcALPH1 e TcXRNA parecem não pertencerem ao mesmo complexo proteico sob condições de estresse nutricional, embora mais análises de proteômica utilizando os anticorpos policlonais poderiam reforçar essa hipótese.

Para determinar a relevância funcional das proteínas TcXRNA e TcALHP1 em *T. cruzi*, utilizamos a técnica de CRISPR-Cas9 para inserir mutações nos genes de

forma que o parasite deixe de expressar as proteínas de interesse. Com esta abordagem seria possível avaliar o papel das proteínas em estudo na formação dos complexos ribonucleoproteicos. Vários clones obtidos após a transfecção dos respectivos RNAg e da molécula DONOR para os genes de TcXRNA e TcALPH1 foram analisados. Apenas parasitas heminocautes para ambos os genes (individualmente) foram obtidos. O fato de não termos obtido clones nocautes pode sugerir que estes genes sejam essenciais ao *T. cruzi*. De fato, Li et. al., (2006) e Kramer (2017) demonstraram que a depleção de TcXRNA e TbALPH1, respectivamente, causa a parada do crescimento celular, indicando a essencialidade destas proteínas ao parasita e um importante papel no metabolismo de RNA. Os fenótipos obtidos após a indução do RNAi são semelhantes em alguns aspectos: além da parada no crescimento celular, é observado um acúmulo de RNAm desadenilados, indicando que ambas as enzimas atuam após o processo de desadenilação (Li, et. a., 2006; Manful et. al., 2011; Kramer 2017). Entretanto, enquanto a depleção de TbXRNA causa um aumento nos níveis de RNAm intactos e de intermediários de degradação (5'-3'), a depleção de TbALHP1 causa apenas um aumento nos níveis de RNAm intactos, condizente com o papel de ambas no metabolismo de RNAm: TbALPH1 atua no processo de decapeamento, enquanto a TbXRNA atua no processo de degradação (Kramer 2017).

Nocautes de genes envolvidos no decaimento de RNAs já foram realizados em outros organismos. Em diferentes bactérias tais como *E. coli*, *S. entérica*, *P. fluorescens*, o nocautes do gene ApaH ocasionou um aumento acentuado nas concentrações de tetrafosfato de nucleosídeo (Np4A), ocasionando no capeamento massivo de RNAm bacterianos (Imail, T. M et. al, 2003; Farr S. B, 1989; Mondes, 2010), gerando diferentes fenótipos nestes organismos, o que evidencia a dificuldade na obtenção de clones nocautes para proteínas envolvidas diretamente na degradação de RNAs. Portanto, para confirmar se de fato estas proteínas são essenciais e qual o papel das mesmas no metabolismo de RNA no *T. cruzi*, realizaremos mais três transfecções dos RNAg e moléculas DONOR para cada gene. É válido ressaltar que, embora a funcionalidade destas proteínas tenha sido demonstrada em *T. brucei*, o fato de não ter sido observada a presença de grânulo de polo posterior em *T. cruzi* após condições de estresse celular (Costa et. al, 2018; e

esta dissertação) pode ser um indicativo de que neste parasita estas proteínas possam ter funções diferenciadas.

## **6 CONCLUSÃO**

Foram obtidos parasitas transfectantes que expressam TcALPH1 fusionada a uma tag GFP na sua porção carboxi e amino terminal. A cultura transfectante que expressa a proteína TcALPH1 - GFP na porção carboxi terminal, assim como a cultura TcXRNA - GFP na porção amino terminal, não tiveram seu crescimento celular afetado quando comparadas com os parasitas selvagens.

A imunolocalização de TcALPH1-GFP e TcXRNA-GFP em parasitas transfectantes, apresentaram um perfil difuso pelo citoplasma quando as condições nutricionais foram favoráveis, com uma concentração maior ao redor do núcleo. Quando os transfectantes foram submetidos a condições de estresse nutricional, foi observado que a localização destas proteínas teve um perfil mais granular, embora a cultura controle TcGFP-Flag tenha apresentado uma localização similar. Esta questão será resolvida com a realização dos ensaios de IFI utilizando anticorpos específicos contra as proteínas em parasitas selvagens.

A imunoprecipitação de TcXRNA-GFP mostrou que em condições normais de nutrientes, a proteína TcALPH1 está presente no imunocomplexo. Além disso, nas imunoprecipitações de TcXRNA-GFP e TcALPH1-GFP nas mesmas condições descritas, foram enriquecidas proteínas regulatórias que possivelmente atuem no metabolismo de RNAs. Entretanto, em condições de estresse, TcALPH1 e TcXRNA parecem não compartilhar o mesmo imunocomplexo, e proteínas de início de tradução, assim como proteínas ribossomais são enriquecidas.

A tentativa de nocaute dos genes TcALPH1 e TcXRNA pela técnica de CRISPR-Cas9 resultou na obtenção de clones heminocautes para TcALPH1 e TcXRNA.

## 7 PERSPECTIVAS

Para a avaliação da co-localização de TcALPH1 e TcXRNA, será realizado uma IFI utilizando anticorpos já purificados em parasitas selvagens sob condições normais e de estresse nutricional. Os resultados destas análises, serão comparados com a localização destas proteínas em parasitas transfectantes, buscando identificar se a *tag* GFP está de fato influenciando o endereçamento destas proteínas.

Será repetida a IP de TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional, devido ao baixo enriquecimento desta proteína, que possivelmente esteja influenciando na análise do resultado. Adicionalmente, todas as IPs de TcXRNA-GFP e TcALPH1-GFP sob condições normais e de estresse nutricional serão repetidas, objetivando extrair os RNAs associados aos complexos proteicos e enviá-los para sequenciamento. Além disso, serão realizadas as IPs de TcALPH1 e TcXRNA utilizando parasitas selvagens, através dos soros policlonais obtidos, objetivando comparar o perfil de proteínas co-imunoprecipitadas com os resultados já obtidos.

Será realizada uma PCR utilizando o DNA genômico dos clones heminocautes obtidos para TcALPH1 e TcXRNA por CRISPR-Cas9, objetivando amplificar a região de inserção do DONOR e clonar o produto destas PCRs (das bandas que correspondem tanto ao do gene nocauteado, assim como do gene selvagem) em pGEM. Por fim, estes vetores serão enviados para sequenciamento para confirmação dos clones heminocautes obtidos, e se confirmados, será realizada uma nova tentativa de nocaute utilizando os mesmos clones. Adicionalmente, será realizada a fenotipagem dos clones hemi-nocautes obtidos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson P, Kedersha N. Stress granules the Tao of RNA triage (2018). *Trends Biochem Sci.* 33(3):141-50.

ALMEIDA K. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para o estudo da proteína ALPH1 de *Trypanosoma cruzi*. Instituto Carlos Chagas, PIBIC, Curitiba, Jan. 2018.

Andreeva N, Ledova L, Ryazanova L, Tomashevsky A, Kulakovskaya T, Eldarov M (2019). Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases. *Biochimie, Pushchino.* v. 163, p 101 - 107.

Bashkirov V.I, Scherthan H., Solinger J.A., Buerstedde J.M & Heyer W.D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *Journal of Cell Biology, Nova Iorque.* v. 136, p. 761 - 773.

Batista M., Kugetatski F., Inoue A., Ramos B., Krieger B., Marchini. (2015). pTcGW plasmid vectors 1.1 version: a versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterisation. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Curitiba,* v. 110, p. 687-690.

Barisón M. J., Rapado L. N., Merino E. F., Furusho Pral E. M., Mantilla B.S., Marchese L, Cassera M.B. (2017). Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Biological Chemistry, 292(21),* p. 8964–8977.

Bangs J.D, Crain P.F, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem, California,* 15;267(14):9805-15.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. (2011). Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*, Atlanta, 2011;24(4):655-681.

Boscardin S, Torrecilhas A, Manarin R, Revelli S, Rey E.G, Tonelli R.R, Silber A.M. (2010). Chagas disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. São Paulo, 14(6b): 1373–1384.

Buchan J.R, Muhlrad D, Parker R. (2018). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. Arizona, 183(3):441-455. Nov, 2018.

Cassola A, De Gaudenzi, J. G, & Frasch, A. C. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Molecular Microbiology*. San Martín, 65(3), 655–670.

Cassola A. (2011). RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes Case. *Curr Chem Biol*. San Martín, 5 (2): 108-117.

Castañeda Londoño, P.A., Banholzer, N., Bannermann, N. (2021). Is mRNA *decapping* by ApaH like phosphatases present in eukaryotes beyond the Kinetoplastida? *BMC Ecol Evo*.

Camargo E. P. (1964). Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop*. Sao Paulo, v. 6, p.93-100.

Campos M. C, Leon L. L, Taylor M. C, Kelly J. M. (2014). Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert [published correction appears in *Mol Biochem Parasitol*. *Mol Biochem Parasitol*. v. 193(1), p.17-19.

Chagas, C. (1909). Nova Tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 1, p.159-218.

Clayton C, Shapira M. (2007). (Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Neuenheimer Feld, v. 156(2), p.93-101.

Clayton, C, Schwede, A, Stewart, M, Robles, A, Benz, C, Po, J., Archer, S. (2008). Control of mRNA degradation in trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, v. 36(3), p.520–521.

Costa J, HOLETZ F. **A exonuclease XRNA e o metabolismo de mRNA em *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) Instituto Oswaldo Cruz. Curitiba, p. 21-27. Fev. 2015.

Costa, J. F, Ferrarini M. G, Nardeli S. C, Goldenberg S, Ávila A. R, Holetz F.B. (2018). *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.113, n.6.

Contreras V. T, Ana R. L, Zorrila G. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in Culture Modify Gene and Antigenic Expression of Metacyclic Trypomastigotes. (1998). *Mem. Ist. Oswaldo Cruz*. Valencia, 93(6).

Dallagiovanna B, Correa A, Probst C. M, Holetz F, Smircich P, de Aguiar A. M, Mansur F, da Silva C. V, Mortara R. A, Garat B, Buck G. A, Goldenberg S, Krieger M. A. Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. (2018). *J Biol Chem*. Curitiba, 283(13):8266-73.



De Gaudenzi, J., Frasch, A. C., & Clayton, C. (2005). RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. *Eukaryotic Cell*. Buenos Aires, v. 4(12), p. 2106–2114.

Decker C. J, Parker R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;4(9):012286.

De SOUZA, W. (2012). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, Rio de Janeiro, v. 8, p. 269-285.

Epting CL, Coates BM, Engman DM. (2011) Mecanismos moleculares de invasão de células hospedeiras por *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, v. 126 (3): p. 283-291.

Estevez A. M, Kempf T, Clayton C. E. (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal*, v. 20, p. 3831–9.

Fritz M, Vanselow J, Sauer N, Lamer S, Goos C, Siegel T. N, Subota I, Schlosser A, Carrington M, Kramer S. (2015). Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic Acids Research*. Wutzburgo, v. 18;43(16), p. 8013-32.

Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ, Ames BN (1989). An apaH mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci. Berkeley*. v. (13):5010-4.

Goldenberg S, Contreras V. T, Salles J. M, Bonaldo M. C, Franco M. P, Linss J, Lafaille J, Valle D, Morel C. M. (1984). Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 79: p. 39-44.

Haile, S., & Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10(6), p. 569–577

Holetz, F. B., Correa, A, Ávila, A. R, Nakamura, C. V, Krieger, M. A, & Goldenberg, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 356(4), p. 1062–1067.

Holetz, F. B., Alves, L. R., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Manque, P., Buck, G., Krieger, M., Correa, A., Goldenberg, S. (2010). Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *The FEBS Journal*, 277(16), 3415–26.

Ismail, T. M., Hart, C. A., & McLennan, A. G. (2003). Regulation of Dinucleoside Polyphosphate Pools by the YgdP and ApaH Hydrolases Is Essential for the Ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to Invade Cultured Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278(35), p. 32602–32607.

Jackson, Y., Wyssa, B., & Chappuis, F. (2019). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Keene, J. D., & Lager, P. J. (2005). Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression. *Chromosome Research*. Durham, v. 13(3), p. 327–337.

Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics*. v. 8(7), p. 533–543.

Kedersha, N, & Anderson, P. (2009). Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies. *Translational Control in Health and Disease*. Boston, p. 155–185.

Kilchert, C., Wittmann, S. & Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. South Park Road v. 17, p. 227–239.

Kramer S, Queiroz R., Ellis L., Webb H., Hoheisel J. D, Clayton C. & Carrington. (2008). Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 (alpha) phosphorylation at Thr169. *Journal of Cell Science*. Cambridge, v. 121(Pt 18), p. 3002–14.

Kramer, S., & Carrington, M. (2011). Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends in Parasitology*. Cambridge, v. 27(1), p. 23–30.

Kramer, S. (2013) RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. Wuzburg, v. 5(2), p. 263–284.

KRAMER S. (2016). Simultaneous detection of mRNA Transcription and decay intermediates by dual colour single mRNA FISH. *PLoS Pathogens*. Wutzburgo. v. 10. p. 1093-1245.

Kramer, S., Marnef, A., Standart, N., & Carrington, M. (2012) Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. *Journal of Cell Science*. v. 125(12), p. 2896–2909.

KRAMER, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Cambridge, v.181 (2), n. 61–72.

Kramer, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(2), 263–84.

KRAMER, S. (2017). The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathogens*.

Koonin, E V. (1993). Bacterial and bacteriophage protein phosphatases. *Mol Microbiol*.

Li CH, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D. (2006). Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'->3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA*. 2006; v.12(12): p. 2171-2186.

Ling SH, Decker CJ, Walsh MA, She M, Parker R, Song H. (2008) Crystal structure of human Edc3 and its functional implications. *Mol Cell Biol*. v. 28(19), p. 5965-76.

Manful T, Fadda A, Clayton C. (2011). The role of the 5'-3' exoribonuclease XRNA in transcriptome-wide mRNA degradation. *RNA*. Heidelberg, v.17, p. 2039-2047.

Milone J, Wilusz J, Bellofatto V. (2002). Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Nucleic Acids Res*. Nova Jersey, v. 30(18), p. 4040-4050.

Monds RD, Newell PD, Wagner JC, Schwartzman JA, Lu W, Rabinowitz JD, O'Toole GA (2010). Di-adenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) metabolism impacts biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* via modulation of c-di-GMP-dependent pathways. *J Bacteriol.* v.192(12):3011-23.

Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F., & Green, P. J. (2013). XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* v. 1829(6-7), p. 590–603.

Nissan T, Rajyaguru P, She M, Song H, Parker R. (2010). Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol Cell.* Umea, v. 39(5): p. 773-83.

OMS, Organização Mundial da Saúde, 2020. Chagas Disease (also known as American trypanosomiasis).

Parker, R. & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Natural Structural & Molecular Biology.* Arizona, v. 11, p. 121 - 127.

Parker R, Sheth U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* Arizona, 9;25(5):635-46.

Perry, K. L, Watkins K. P, Agabian N. (1987). Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Berkeley, 84(23) :8190-4.

Peny D, Kurup S P, Yao P. Y, Minning T. A, Tarlenton R. L. (2015). CRISPR-Cas9 Mediated Single Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio.* v6.

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*. 391(10115), p. 82–94.

Rassi J. R., Marin-Neto. (2010). Chagas disease. *Lancet infect. Dis.*, New York, v. 375.

Romagnoli B. A. A, Picchi G. F. A, Hiraiwa P. M, Borges B. S, Alves L. R, Goldenberg S. (2018). Improvements in the CRISPR\Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v.178. p.190-195.

Sheth, U., Pitt, J., Dennis, S., & Priess, J. R. (2010). Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development*, v.137(8), p. 1305–1314.

SILVA, E. O. (2020). Programa de Controle da Doença de Chagas no estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, supl. 2, p. 74-84.

SOUZA S, RAMPAZZO R, MANHAES L. (2010). Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: Effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Curitiba, v. 172. p. 90-98.

SOUZA, W. (2010). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 89-100.

Sweet T, Kovalak C, & Collier J. (2012). The DEAD-Box Protein Dhh1 Promotes Decapping by Slowing Ribosome Movement. *PLoS Biology*, v.10(6), e1001342.

TOWBIN H, STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, v.76. p. 4350-4354.

Tian S, Curnutte HA, Trcek T. (2020) RNA Granules: A View from the RNA Perspective. *Molecules*. 25(14):3130.

Tourrière, H., Chebli, K., & Tazi, J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, v.84(8), p. 821–837.

Urbina, J. A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, v. 115(1-2), p. 55–68.

Votýpka, J., d' Avila-Levy, C. M., Grellier, P., Maslov, D. A., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2015). New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, v. 31(10), p. 460–469.

YU, J. H. (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA*, 11(12).



## 9 ANEXOS

**Tabela 7.** Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação de TcALPH1-GFP sob condições normais de nutrientes.

Identificação no TritypDB	Função	Proteína	(Média da intensidade na IP de TcALPH1 / Média da intensidade na IP de TcGFP-Flag)
C4B63_49g176	serine/threonine protein phosphatase	ALPH1	48966666667
C4B63_46g53	conserved hypothetical protein	C4B63_46g53	1710140000
C4B63_52g40	immunodominant antigen	tc40 antigen-like	680676666,7
C4B63_19g43	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	C4B63_19g43	472166676,3
C4B63_28g106	malic enzyme	C4B63_28g106	362806666,8
C4B63_4g188	Elongation factor Tu, mitochondrial	EF-Tu	332393333,4
C4B63_47g111	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	C4B63_47g111	273710035
C4B63_2g690	chaperonin alpha subunit	TCP-1-eta	239336666,7
C4B63_41g212	cytochrome oxidase subunit IV	C4B63_41g212	239313333,4
C4B63_2g507	zinc-finger protein	ZC3H41	215046673,2
C4B63_20g137	leucine-rich repeat protein (LRRP)	AIR9	205733333,4
C4B63_28g114	triosephosphate isomerase	TIM	187126671
C4B63_63g12	protein disulfide isomerase 2	PDI2	183120001,6
C4B63_13g34	21 kDa cyclophilin	C4B63_13g34	181040000,1
C4B63_18g260	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein	SGT	169126666,8
C4B63_17g90	T-complex protein 1, beta subunit	TCP-1-epsilon	160253333,4
C4B63_48g168	AAA ATPase	VCP	152610000,1
C4B63_10g490	Hsc70-interacting protein (Hip)	C4B63_10g490	126730005,3
C4B63_69g57	UMP-CMP kinase, mitochondrial	C4B63_69g57	123803335,3
C4B63_10g439	heat shock protein 90	LPG3	121393336,2
C4B63_21g261	isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	IDH	119930333,4
C4B63_2g30	rieske iron-sulfur protein, mitochondrial precursor	RISP	118093335,9
C4B63_69g74	cysteine peptidase	COXV	102809666,7
C4B63_54g62	proteasome activator protein pa26	PA26	101367666,8
C4B63_72g97	conserved hypothetical protein	C4B63_72g97	90733333,37
C4B63_57g66	short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	C4B63_57g66	90186666,73
C4B63_38g167	spermidine synthase	SpSyn	89926672,05
C4B63_49g192	cysteine peptidase C (CPC)	catB	81933334,46
C4B63_58g38	conserved hypothetical protein	C4B63_58g38	78760001,94
C4B63_6g396	X-pro, dipeptidyl-peptidase, serine peptidase, Clan SC, family S15	C4B63_6g396	76053000,06
C4B63_2g752	-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	gnD	75537666,7

C4B63_55g287c	cytochrome c	C4B63_55g287c	73548666,88
C4B63_18g164	S-adenosylmethionine synthetase	METK1	73396668,95
C4B63_12g225	conserved hypothetical protein	C4B63_12g225	67269000,11
C4B63_2g445	Metallocoxy-peptidase 1	MCP1	65586690,41
C4B63_89g69	cysteine peptidase	CP	60967666,68
C4B63_63g46	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	PGAM	60292333,43
C4B63_18g239	aldehyde dehydrogenase	ALDH	60006666,69
C4B63_76g16	NADH-cytochrome b5 reductase	B5R	56365000,16
C4B63_48g132	universal minicircle sequence binding protein	UMSBP2	55950003,37
C4B63_42g203	aspartyl-tRNA synthetase	C4B63_42g203	55330333,41
C4B63_9g387	conserved hypothetical protein	C4B63_9g387	54506333,33
C4B63_9g494	cytochrome-b5 reductase	B5R	53816669,52
C4B63_2g485	T-complex protein 1, beta subunit	C4B63_2g485	53173338,58
C4B63_18g156	protein mkt1	MKT1	52945333,41
C4B63_9g263	trypanothione synthetase	TRYS	50286333,39
C4B63_51g842c	Uncharacterized protein At2g34160 (BINDING PROTEIN)	ALBA2	50041004,55
C4B63_46g74	aminopeptidase	C4B63_46g74	47415333,39
C4B63_15g18	NADH-dependent fumarate reductase	FRDg	47176666,69
C4B63_54g176	prohibitin	C4B63_54g176	44443334,81
C4B63_79g37	methionyl-tRNA synthetase	MetRS	40071333,41
C4B63_46g107	NADH-cytochrome b5 reductase	B5R	39009000,16
C4B63_7g212	ruvB-like DNA helicase	RUVBL	37050333,33
C4B63_3g1104	threonyl-tRNA synthetase	C4B63_3g1104	35873666,71
C4B63_21g68	small GTP-binding protein Rab11	RAB11	34353000,19
C4B63_47g23	ascorbate peroxidase	C4B63_47g23	28056000,05
C4B63_98g4	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	24268671,19
C4B63_19g91	Protein LSM14 homolog A-B	SCD6	21893333,33
C4B63_9g376	Present in the outer mitochondrial membrane proteome 22	POMP22-1	20205333,38
C4B63_348g21	ADP-ribosylation factor-like protein 3	ARL3A	16041334,35
C4B63_43g6	T-complex protein 1, delta subunit	TCP-1-delta	38,28560894
C4B63_20g172	chaperonin alpha subunit	TCP-1-alpha	31,77921984
C4B63_12g232	Lanosterol 14-alpha demethylase	CYP51	28,75296951
C4B63_23g204	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, glycosomal	PFK	22,70224739
C4B63_56g86	methylthioadenosine phosphorylase	MTAP	21,46815548
C4B63_63g16	chaperonin alpha subunit	C4B63_63g16	14,46875198
C4B63_46g11	chaperonin TCP20	TCP-1-zeta	14,38304414
C4B63_20g319	25 kDa translation elongation factor 1-beta	C4B63_20g319	14,0603756
C4B63_43g161	ATP-dependent RNA helicase SUB2	SUB2	12,20437422
C4B63_295g26	glutamate dehydrogenase	GDH	12,18791775
C4B63_20g153	pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein	C4B63_20g153	9,066389341
C4B63_4g324	aconitase	ACO	7,654959684
C4B63_31g181	mitochondrial DNA polymerase beta	C4B63_31g181	7,009767084

C4B63_2g446	Metalloprotease 1	MCP1	6,932981456
C4B63_4g77	conserved hypothetical protein	C4B63_4g77	6,388388213
C4B63_20g178	dihydrolipoyl dehydrogenase	GCVL-2	6,151863612
C4B63_3g1101	mitochondrial processing peptidase, beta subunit	C4B63_3g1101	5,998041025
C4B63_6g321	receptor for activated C kinase 1	RACK1	5,748322398
C4B63_2g430	heat shock protein	HSP?	5,35539888
C4B63_22g312	phosphoglycerate kinase	PGKC	5,201676185
C4B63_12g195	conserved hypothetical protein	C4B63_12g195	5,128515214
C4B63_46g14	squalene monooxygenase	SQE	4,955948765
C4B63_7g233	ribosomal protein S19	C4B63_7g233	4,896642859
C4B63_28g64	aspartate aminotransferase	mASAT	4,63556071
C4B63_41g205	alanine aminotransferase	ALAT	4,572547247
C4B63_97g18	heat shock protein 110	HSP110	4,474695066
C4B63_59g115	stress-inducible protein STI1-like(fragment)	STI1	4,02219096
C4B63_26g286	arginine kinase	AK3	3,99376472
C4B63_13g271	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal	ALD	3,989847828
C4B63_81g63	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	GAP	3,940924785
C4B63_2g765	cystathione gamma lyase	C4B63_2g765	3,607525072
C4B63_4g486	glycosomal malate dehydrogenase	Gmdh	3,499604965
C4B63_2g708	Gim5A protein	gim5A	3,433639455
C4B63_25g294	Thioredoxin-like	C4B63_25g294	3,396309406
C4B63_128g41	ADP-ribosylation factor	SAR1	3,221850595
C4B63_39g336	S-adenosylhomocysteine hydrolase	C4B63_39g336	3,183676453
C4B63_6g256	oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	C4B63_6g256	3,177898565
C4B63_14g241	trypanothione reductase	C4B63_14g241	3,147350558
C4B63_8g2656c	10 kDa heat shock protein	HSP10	2,99871027
C4B63_32g225	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase	HMGS	2,968991785
C4B63_8g508	protein disulfide isomerase	C4B63_8g508	2,944585679
C4B63_11g8	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	C4B63_11g8	2,941909026
C4B63_4g189	alcohol dehydrogenase	C4B63_4g189	2,923827301
C4B63_12g330	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB	2,775269417
C4B63_23g196	60S ribosomal protein L13	C4B63_23g196	2,70075072
C4B63_10g120	60S ribosomal protein L4	C4B63_10g120	2,575582316
C4B63_32g214	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	AKCT	2,569052579
C4B63_6g220	glycosomal membrane protein	PEX11	2,512273589
C4B63_13g242	40S ribosomal protein S10	C4B63_13g242	2,462729183
C4B63_63g68	ATP-dependent protease binding subunit(fragment)	C4B63_63g68	2,308777249
C4B63_47g72	enolase	C4B63_47g72	2,294177893
C4B63_42g42	co-chaperone GrpE	C4B63_42g42	2,187689908
C4B63_57g98	succinyl-CoA ligase	C4B63_57g98	2,185066567
C4B63_63g35	histidine ammonia-lyase	C4B63_63g35	2,154958076
C4B63_81g68	tyrosine aminotransferase	C4B63_81g68	2,144999138
C4B63_58g70	hexokinase	HK2	2,062799283

C4B63_11g93	mitochondrial RNA binding complex 1 subunit	MRB1590	1,967433338
C4B63_7g173	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	C4B63_7g173	1,944866303
C4B63_39g344	14-3-3 protein 1	14-3-3-I	1,923022678
C4B63_20g170	glucosamine-6-phosphate isomerase	C4B63_20g170	1,909146676
C4B63_7g72	conserved hypothetical protein	C4B63_7g72	1,773798914
C4B63_43g9	serine carboxypeptidase (CBP1)	CBP1	1,758369693
C4B63_2g50	RNA-binding protein	DRBD2	1,691044792
C4B63_84g89	heat shock protein 85	HSP ?	1,639773393
C4B63_19g167	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1,630960561
C4B63_4g64	Mitochondrial ADP/ATP carrier protein 5	MCP5c	1,611248887
C4B63_18g233	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	1,604907064
C4B63_19g183	cyclophilin a	CYPA	1,588444999
C4B63_9g416	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 104 (HSP104)	C4B63_9g416	1,564121393
C4B63_6g572	5-3 exoribonuclease A	XRNA	1,282182745
C4B63_142g9	heat shock protein DNAJ	HSP?	1,035347477

**Tabela 8.** Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação de TcALPH1-GFP sob condições de estresse nutricional.

Identificação no TritypDB	Função	Proteína	(Média da intensidade na IP de TcALPH1 / Média da intensidade na IP de TcGFP-Flag)
C4B63_46g77	40S ribosomal protein S4	S4	2701166668
C4B63_32g235	40S ribosomal protein S8	S8	1275666673
C4B63_8g476	40S ribosomal protein S16	S16	1109400009
C4B63_75g59	40S ribosomal protein S6	S6	1047023335
C4B63_54g30	40S ribosomal protein S3A	S3A	888266670,6
C4B63_34g299	Mitochondrial outer membrane protein porin	VDAC1	829506667,2
C4B63_12g1348c	60S ribosomal protein L28	L28	803300003,6
C4B63_2g708	Gim5A protein	Gim5A	784536666,7
C4B63_4g90	ATP-dependent RNA helicase HEL67	HEL67	754300000,5
C4B63_43g4	60S ribosomal protein L9	L9	553983333,3
C4B63_128g301c	histone H4	H4	520180001,2
C4B63_43g20c	40S ribosomal protein S23	RPS23	487866667,6
C4B63_13g236	40S ribosomal protein S18	S18	384033334,3
C4B63_40g129	40S ribosomal protein SA	AS	130336667,3
C4B63_49g176	serine/threonine protein phosphatase	ALPH1	121,1861103
C4B63_47g109	U2 splicing auxiliary factor	U2	6,965457987
C4B63_58g101	elongation factor 1-alpha	EEF1A	6,956454929
C4B63_51g126	alpha tubulin	C4B63_51g126	3,456431642

C4B63_18g293	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor	HSP70	3,427508222
C4B63_6g136	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	2,897760987
C4B63_48g18	40S ribosomal protein S3	S3	2,50475332
C4B63_51g127	beta tubulin	C4B63_51g127	2,263843488
C4B63_10g495	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIO1	1,466721857
C4B63_46g53	conserved hypothetical protein	C4B63_46g53	1,355814163
C4B63_292g27	polyubiquitin(fragment)	C4B63_292g27	1,324547097
C4B63_52g40	immunodominant antigen	TC40	1,295926724

**Tabela 9.** Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação de TcXRNA-GFP sob condições normais de nutrientes.

Identificação no TritypDB	Função	Proteína	(Média da intensidade na IP de TcXRNA / Média da intensidade na IP de TcGFP-Flag)
C4B63_46g53	conserved hypothetical protein	C4B63_46g53	1,77143E+12
C4B63_52g40	immunodominant antigen	C4B63_52g40	1,21182E+12
C4B63_49g176	serine/threonine protein phosphatase	ALPH1	1,1566E+11
C4B63_113g35	mitogen activated protein kinase	CMGC	20172000000
C4B63_28g131	conserved hypothetical protein	C4B63_28g131	17280666667
C4B63_2g748	conserved hypothetical protein	C4B63_2g748	5789633333
C4B63_25g105	ATP-dependent helicase(fragment)	UPF1	5156766667
C4B63_20g181	B-box zinc-finger containing protein	C4B63_20g181	1324863333
C4B63_2g66	helicase	C4B63_2g66	638316666,7
C4B63_1g57	AAA ATPase	C4B63_1g57	517473000
C4B63_9g382	conserved hypothetical protein	C4B63_9g382	130449333,3
C4B63_6g572	5-3 exoribonuclease A	XRNA	2086,32554
C4B63_51g842c	Uncharacterized protein At2g34160	ALBA2	71,53387742
C4B63_4g77	conserved hypothetical protein	C4B63_4g77	10,10588867
C4B63_4g429	RNA-binding protein	ZC3H40	8,869949042
C4B63_19g91	Protein LSM14 homolog A-B	SCD6	8,251179851
C4B63_2g50	RNA-binding protein	DRBD2	7,17461213
C4B63_8g61	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	6,951574225
C4B63_58g125	conserved hypothetical protein	C4B63_58g125	4,102287986
C4B63_2g795	chaperone DNAJ protein	J50	3,699439046
C4B63_6g317	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70.4	3,618549366
C4B63_51g844c	conserved hypothetical protein	C4B63_51g844c	2,859919054
C4B63_54g24	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	DHH1	2,288417375
C4B63_13g295	pumilio/PUF RNA binding protein 6	PUF6	1,91466709
C4B63_6g136	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	1,91304261



C4B63_9g319	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F	HNRNPH/F	1,703992223
C4B63_175g9	heat shock protein DNAJ	C4B63_142g9	1,689388209
C4B63_2g174	polyadenylate-binding protein 1	PABP2	1,617144996
C4B63_58g135	heat shock protein DNAJ	J3	1,61467054
C4B63_47g109	U2 splicing auxiliary factor	U2AF35	1,41589515
C4B63_9g332	conserved hypothetical protein	TFIIS2-2	1,347344691
C4B63_142g9	heat shock protein DNAJ	C4B63_142g9	1,330274759
C4B63_4g90	ATP-dependent RNA helicase HEL67	HEL67	1,108910891
C4B63_7g210	Ribonuclease P protein subunit p25-like protein	ALBA3	1,052440617
C4B63_22g162	cysteine peptidase, Clan CA, family C2	CALP1.2	1,014292464

**Tabela 10.** Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação de TcXRNA-GFP sob condições de estresse nutricional.

Identificação no TritrypDB	Função	Proteína	(Média da intensidade na IP de TcXRNA / Média da intensidade na IP de TcGFP-Flag)
C4B63_2g174	polyadenylate-binding protein 1	PABP2	10787700000
C4B63_2g50	RNA-binding protein	DRBD2	4207500000
C4B63_113g35	mitogen activated protein kinase	CMGC	2982350000
C4B63_28g131	conserved hypothetical protein	C4B63_28g131	2601300000
C4B63_58g135	heat shock protein DNAJ	J3	2391650000
C4B63_4g77	conserved hypothetical protein	C4B63_4g77	2307050000
C4B63_43g4	60S ribosomal protein L9	L9	873515000
C4B63_13g157	elongation factor 2	C4B63_13g157	786505000
C4B63_52g40	immunodominant antigen	TC40	409,883864
C4B63_46g53	conserved hypothetical protein	C4B63_46g53	235,0714954
C4B63_75g59	40S ribosomal protein S6	S6	109,5414072
C4B63_6g572	5-3 exoribonuclease A	XRNA	97,23731817
C4B63_32g235	40S ribosomal protein S8	S8	87,87314355
C4B63_84g89	heat shock protein 85	HSP85	71,29030104
C4B63_6g136	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	64,57903064
C4B63_54g30	40S ribosomal protein S3A	S3A	32,85467402
C4B63_46g77	40S ribosomal protein S4	S4	25,98213635
C4B63_85g45-t42	ribosomal protein S7	S7	23,52411096
C4B63_12g221	pyruvate phosphate dikinase	PPDK	21,88953483
C4B63_8g61	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	18,86506194
C4B63_34g299	Mitochondrial outer membrane protein porin	VDAC1	16,39354781

C4B63_4g90	ATP-dependent RNA helicase HEL67	HEL67	14,28222396
C4B63_133g581	heat shock protein 70 (hsp70)	HSP70	12,91530812
C4B63_40g129	40S ribosomal protein SA	SA	11,55096184
C4B63_396g6	prostaglandin F2alpha synthase	TcPGFS	10,46044072
C4B63_18g293	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor	HSP70	7,645858246
C4B63_47g109	U2 splicing auxiliary factor	U2	6,314322453
C4B63_51g127	beta tubulin	C4B63_51g127	4,629183347
C4B63_51g126	alpha tubulin	C4B63_51g126	3,513330529
C4B63_292g27	polyubiquitin(fragment)	C4B63_292g27	2,953136192
C4B63_81g103	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	HSP60	2,85640466
C4B63_58g101	elongation factor 1-alpha	EEF1A	2,63072917
C4B63_49g176	serine/threonine protein phosphatase	ALPH1	1,852986169
C4B63_48g18	40S ribosomal protein S3	S3	1,130366196
C4B63_2g427	Nucleoporin	NUP59	0,851375668
C4B63_4g84	40S ribosomal protein S2	S2	0,616408816