

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

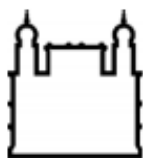
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE CLATRINA NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE
VESÍCULAS EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

LIGIA CRISTINA KALB SOUZA

CURITIBA/PR

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

LIGIA CRISTINA KALB SOUZA

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE CLATRINA NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE
VESÍCULAS EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Biociências e
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurilio José Soares

CURITIBA

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

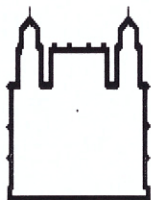
S731 Souza, Ligia Cristina Kalb

Estudo da participação de clatrina no tráfego intracelular de vesículas em *Trypanosoma cruzi* / Ligia Cristina Kalb Souza. – Curitiba, 2015.
viii, 91 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências, 2015.
Bibliografia: f. 62-74

1. Tráfego intracelular de vesículas. 2. Clatrina. 3.
Trypanosoma cruzi. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de **Tese** para obtenção do grau de **Doutor** em Biociências e Biotecnologia.

Aos vinte e três dias do mês de abril de dois mil e quinze, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Daniela Fiori Gradia, Dr. Wanderson Duarte da Rocha e Dra. Narcisa L. da Cunha e Silva, com a finalidade de julgar a **tese** do(a) candidato(a) Ligia Cristina Kalb Souza, intitulada: "**Estudo da participação da clatrina no tráfego intracelular de vesículas em *Trypanosoma cruzi***", sob a orientação de Maurílio José Soares, para obtenção do grau de Doutora em Biociências e Biotecnologia. O(a) candidato(a) teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Daniela Fiori Gradia**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).

Curitiba, 23 de abril de 2015

Profa. Dra. Daniela Fiori Gradia

ICC / FIOCRUZ

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

UFPR

Prof. Dra. Narcisa L. da Cunha e Silva

UFRJ

Candidato(a):

Dedico este trabalho ao meu marido, Adelicio e ao meu filho Arthur.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurílio José Soares pela orientação, paciência e confiança. Pelo exemplo de pesquisador, mas mais que isso pelo exemplo de simplicidade, bom caráter, amizade e respeito. Fica aqui minha eterna admiração e meu mais sincero agradecimento.

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso pela disposição em sempre tirar dúvidas, auxiliar nos protocolos e no final corrigir esta tese.

Ao Dr. Mark Field, Cordula Boehm e todo o pessoal do Laboratório Field da Universidade de Cambridge, por todo apoio, ensinamento e incentivo.

Ao Laboratório de Biologia Celular e aos amigos do ICC pela companhia e alegrias compartilhadas de cada dia, pelas discussões de protocolos e experimentos nos corredores e almoços.

Aos meus pais pela sua ajuda incondicional, pela entrega e amor infinito.

Ao meu marido pela sincronia em cada passo, por sempre acreditar em mim.

Ao meu filho lindo, o maior presente que eu podia ter recebido durante esta tese.

À minha irmã Ana pela agradável companhia, pelo apoio durante este trabalho.

A Deus pela sincronia e pelos sussurros na hora certa.

A todas as pessoas que me apoiaram ou acompanharam de alguma maneira a realizar este trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

O tráfego vesicular mediado por clatrina, mecanismo pelo qual proteínas e lipídeos são transportados entre organelas envolvidas por membrana, é responsável por uma grande proporção de interiorização de membrana plasmática (endocitose) e de transporte a partir da Rede Trans Golgi para o sistema endossomal. Os eventos mediados por clatrina ainda são pouco conhecidos no protozoário *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas na América Latina. Além disso, estudos de sequências genômicas demonstram um extremo grau de divergência entre tripanosomatídeos, animais e fungos, com cerca de 1/3 das proteínas preditas sem função conhecida. Neste estudo, a expressão do gene e a localização das proteínas cadeias pesada (TcCHC) e leve (TcCLC) de clatrina foram investigadas em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas), utilizando anticorpos policlonais e monoclonais produzidos contra as proteínas recombinantes de *T. cruzi*. A localização celular da proteína epsina (TcEpsina), uma importante proteína associada à clatrina, também foi investigada através de sua fusão com GFP e subsequente imunolocalização. Análise por microscopia confocal revelou um acúmulo de TcEpsina, TcCHC e TcCLC na porção anterior das células, onde a bolsa flagelar e complexo de Golgi estão localizados. A TcCLC parcialmente co-localizou com o marcador de Golgi TcRAB7-GFP e com albumina endocitada, mas não co-localizou com transferrina, uma proteína endocitada principalmente via vesículas não revestidas formadas no complexo citóstoma/citofaringe. As cadeias leve e pesada de clatrina tipicamente localizaram-se na porção anterior ao cinetoplasto, região em que encontram-se a bolsa flagelar e o Complexo de Golgi. Nossos dados indicam que em formas epimastigotas de *T. cruzi* a endocitose de albumina mediada por clatrina ocorre na bolsa flagelar, enquanto endocitose de transferrina independente de clatrina ocorre no complexo citóstoma/citofaringe. Para uma análise proteômica dos complexos proteicos associados à clatrina e epsina, a cadeia leve de clatrina foi fusionada às proteínas A e C e a epsina foi fusionada a GFP e ambas as proteínas foram submetidas à criomoagem seguida da imunoprecipitação dos complexos a elas associados. Esta metodologia permitiu a identificação de suas proteínas associadas por espectrometria de massas, tais como os Complexos Adaptadores AP-1 e AP-4, vSNAREs, Rab4, Rab 11, epsina, tepsina, AP180, Sec1, Auxilina e Scamp. Foi demonstrada também a presença de proteínas hipotéticas nesta análise. Esta metodologia nos permitiu sugerir a forma com a qual ocorre o tráfego de vesículas em *T. cruzi* e como ocorre a maturação dos reservossomos, os quais acumulam funções de endossomo inicial, endossomo tardio e lisossomo. Análises futuras são necessárias a fim de comprovar estas hipóteses.

Palavras chave: tráfego intracelular de vesículas, clatrina, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

The vesicular traffic mediated by clathrin - mechanism by which proteins and lipids are transported between membrane bound organelles - is responsible for a large proportion of internalization of plasma membrane (endocytosis) and transport from the Golgi Network Trans to the endosomal system. Clathrin-mediated events are not well known in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease in Latin America. In addition, studies of genome sequences show an extreme degree of divergence between trypanosomatids, animals and fungi, with about 1/3 of the predicted proteins with unknown function. In this study, gene expression and protein localization of the clathrin heavy (TcCHC) and light (TcCLC) chains were investigated in different *T. cruzi* developmental forms (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes), using polyclonal and monoclonal antibodies produced against *T. cruzi* recombinant proteins. Cellular localization of epsin (TcEpsin), an important protein associated with clathrin, was investigated through its fusion with GFP and subsequent immunolocalization. Analysis by confocal microscopy revealed an accumulation of TcEpsin, TcCHC and TcCLC in the anterior portion of the cells, where the flagellar pocket and Golgi complex are located. TcCLC partially co-localized with the Golgi marker TcRAB7-GFP and ingested albumin, but not co-located with transferrin, a protein endocytosed mainly via uncoated vesicles formed in the cytostome/cytopharynx complex. The clathrin light and heavy chains typically located at the anterior region of the kinetoplast and flagellar pocket, close to the Golgi apparatus. Our data indicate that in *T. cruzi* epimastigotes clathrin mediated endocytosis of albumin occurs in the flagellar pocket, while clathrin independent endocytosis of transferrin occurs in the cytostome/cytopharynx complex. For proteomics analysis of protein complexes associated with clathrin and epsin, the clathrin light chain was fused to proteins A and C and epsin was fused to GFP. Both proteins were then subjected to cryogrinding followed by immunoprecipitation of associated complexes. This methodology allowed the identification of associated proteins by mass spectrometry, such Adaptor Complexes AP-1 and AP-4, vSNAREs, Rab4, Rab11, epsin, tepsin, AP180, Auxilin and Scamp. Putative proteins were also demonstrated in this analysis. This methodology allowed us to suggest the way by which the vesicular traffic and the maturation of reservosomes occurs in *T. cruzi*. Reservosomes may accumulate functions of early endosome, late endosome and lysosome. Further analyzes are needed to confirm these hypothesis.

Key Words: intracellular vesicle traffic, clathrin, *Trypanosoma cruzi*.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. TRÁFEGO INTRACELULAR DE VESÍCULAS.....	1
1.2. TRÁFEGO INTRACELULAR DEPENDENTE DE CLATRINA.....	2
1.2.1. Endocitose dependente de clatrina.....	4
1.2.2. Clatrina na Via Biosintética do Complexo de Golgi.....	5
1.2.3. Proteínas acessórias.....	5
1.2. TRÁFEGO INTRACELULAR EM PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	9
1.2.1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.2.2. Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2.3. Via endocítica em <i>T. cruzi</i>	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO 1	16
CAPÍTULO 2	19
3. METODOLOGIA REFERENTE AO CAPÍTULO 2	20
3.1. CULTIVO DE TRIPANOSOMATÍDEOS.....	20
3.2. OBTENÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> EXPRESSANDO TcCLC/AC.....	20
3.3. OBTENÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> EXPRESSANDO TcEPSINA/GFP.....	21
3.4. OBTENÇÃO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE <i>T. BRUCEI</i> EXPRESSANDO TbCAP30/HA.....	22
3.5. TRANSFECCÃO.....	22
3.5.1 Em <i>T. cruzi</i>	22
3.5.1 Em formas sanguíneas de <i>T. brucei</i>	23
3.6. IMUNODETECCÃO DE PROTEÍNAS.....	23
3.6.1. Ensaio de imunofluorescência em <i>T. cruzi</i>	23
3.6.2. Ensaio de imunofluorescência em <i>T. brucei</i>	24
3.6.3. Ensaio de Western Blot.....	24
3.7. LISE CELULAR POR CRIOMOAGEM.....	25
3.8. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcCLC/AC.....	25
3.9. IMUNOPRECIPITAÇÃO TcEPSINA/GFP.....	26
3.10. IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA ANÁLISE POR ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS.....	27
4. RESULTADOS REFERENTES AO CAPÍTULO 2	30
4.1. CRIOMOAGEM E IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CADEIA LEVE DE CLATRINA (TcCLC).....	30
4.2. IMUNOPRECIPITAÇÃO REVERSA (TcEPSINA).....	33
4.2.1. Localização de Epsina em <i>T. cruzi</i>	33
4.2.2. Criomoagem e imunoprecipitação de epsina (TcEpsina).....	34
4.3. ANÁLISE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À CLATRINA.....	38
4.3.1 Proteínas hipotéticas.....	39
APÊNDICE 1	41
APÊNDICE 2	45
5. DISCUSSÃO REFERENTE AO CAPÍTULO 2	48
5.1. EPSINA.....	48

5.2. PROTEÍNAS ASSOCIADAS A CLATRINA E EPSINA.....	49
5.2.1. Complexos Adaptadores.....	49
5.2.2. Outros adaptadores monoméricos associados à clatrina.....	52
5.2.3. Proteínas hipotéticas associadas à clatrina.....	52
5.2.4. SNAREs.....	53
5.2.5 RABs.....	54
5.2.6 Auxilina.....	55
5.2.7 SCAMP.....	55
5.2.8 GLP1.....	56
5.3. TRÁFEGO DE VESÍCULAS E MATURAÇÃO DE RESERVOSSOMOS....	56
6. CONCLUSÕES	61
6.1. CAPÍTULO 1.....	61
6.2. CAPÍTULO 2.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	74

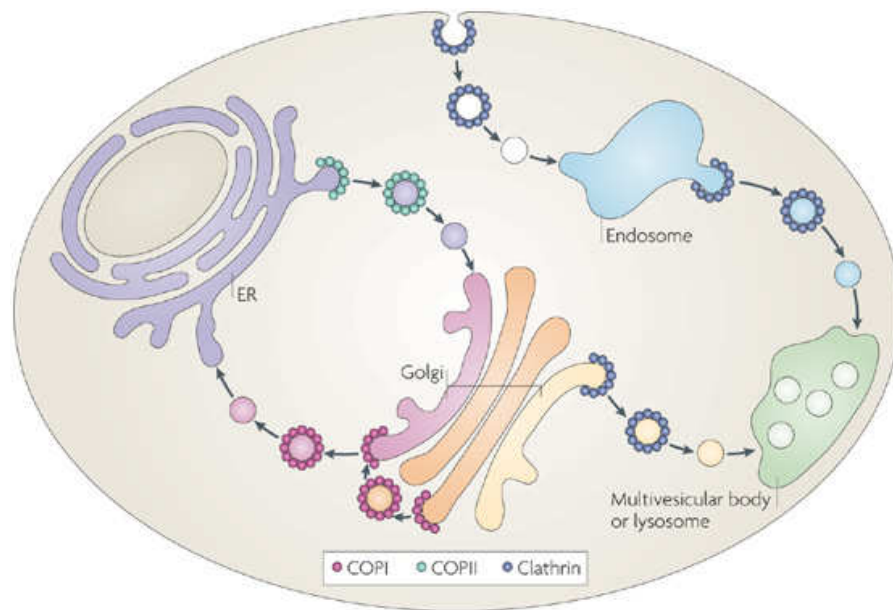
1. INTRODUÇÃO

1.1. TRÁFEGO INTRACELULAR DE VESÍCULAS

Uma característica de vital importância para as células eucarióticas é a habilidade de segregar reações bioquímicas em organelas limitadas por membranas, como o Complexo de Golgi, os lisossomos e os endossomos. Cada um destes compartimentos possui proteínas residentes, as quais os definem de acordo com sua função bioquímica, além de proteínas transientes a caminho do seu destino final. O transporte entre organelas é feito por meio de vesículas que brotam da membrana da organela doadora e seguem para a organela de destino, culminando com sua ancoragem e fusão. Estes eventos estão presentes nas vias de tráfego de vesículas em todas as células, seja para transportar uma proteína do retículo endoplasmático para ser glicosilada no Complexo de Golgi, seja para transportar proteínas de endossomos para a degradação nos lisossomos (Bock et al., 2001).

O tráfego intracelular de vesículas é essencial para diversos processos celulares, como internalização de solutos, transporte de proteínas entre compartimentos, reciclagem de membranas e sinalização celular. Diferentes materiais que entram na célula são classificados e levados a seu destino específico por diferentes rotas (Scott et al., 2014) e para cada via de tráfego vesicular existem tipos diferentes de proteínas carga. Algumas destas proteínas são os receptores de ligantes, tais como os receptores de manose-6-fosfato e de LDL, os quais transportam ligantes de um compartimento doador a um compartimento receptor, e em seguida são recicladas ao compartimento doador (Robinson, 2004). Outras proteínas usam vesículas para viagens só de ida a seu destino final (Robinson, 2004).

Todos os diferentes tipos de proteínas carga devem ser acomodados na mesma vesícula (Robinson, 2004). Este é o trabalho das proteínas de revestimento. Elas são recrutadas para a membrana do compartimento doador e montam um revestimento nas membranas necessário para que a vesícula brote. Após a liberação da vesícula do compartimento doador, este revestimento se desfaz e a vesícula é direcionada para o compartimento receptor, onde as duas membranas se fundem (Robinson, 2004). As proteínas de revestimento mais conhecidas (Figura 1.1) são os complexos formados por clatrina, COP-I e COP-II (Jackson et al., 2012).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.1. Principais vias de transporte vesicular. Proteínas COP-II formam o revestimento de vesículas de transporte do retículo endoplasmático para o Golgi. Proteínas COP-I formam o revestimento de vesículas tanto para o transporte intra-Golgi quanto para o transporte retrógrado do Golgi para o retículo endoplasmático. A clatrina forma complexos múltiplos por associação com diferentes proteínas adaptadoras (Hsu et al., 2009).

1.2. TRÁFEGO INTRACELULAR DEPENDENTE DE CLATRINA

As vias de transporte dependentes de clatrina são as mais amplamente estudadas e estão entre as mais abundantes e versáteis, uma vez que diferentes cargas podem ser incluídas em vesículas revestidas por clatrina, usando uma variedade de proteínas acessórias (Borner et al., 2012).

O tráfego dependente de clatrina tem um papel fundamental na manutenção da viabilidade das células, atuando no *turnover* de proteínas e lipídios da membrana plasmática (Reciclagem), na captação endocítica de nutrientes (Endocitose) e no tráfego de vesículas a partir da rede Trans Golgi (Girard et al., 2005 a,b).

A associação da clatrina à membrana promove o revestimento citoplasmático das vesículas, desencadeando um rápido brotamento da vesícula (Figura 1.2). À medida que a clatrina e suas proteínas acessórias vão se associando à membrana o revestimento formado gera a força necessária para curvar a membrana (Saleem et al., 2015).

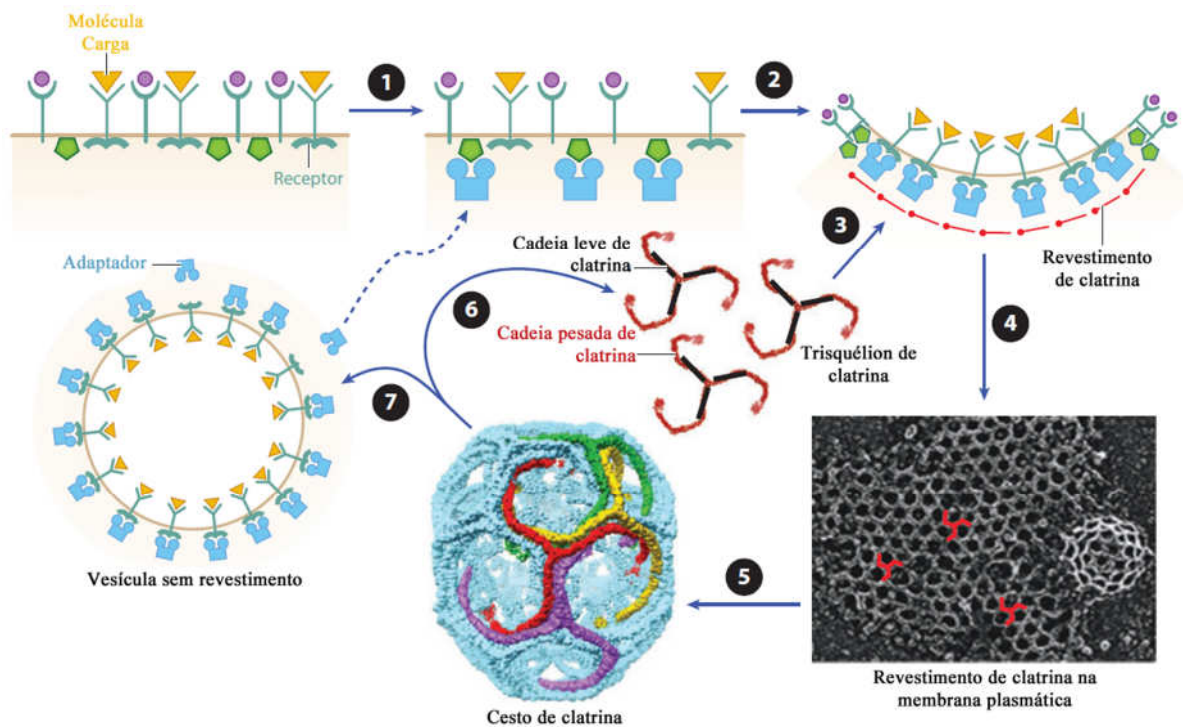


Figura 1.2. Montagem de vesículas revestidas por clatrina. A montagem de vesículas revestidas por clatrina se inicia quando ligantes se acoplam a seus receptores na membrana (1). Após a ligação, os receptores são reconhecidos em suas porções citoplasmáticas por proteínas adaptadoras (2). Essas proteínas adaptadoras (APs) por sua vez se ligam à clatrina e são acompanhadas por componentes acessórios e regulatórios que auxiliam na deformação da membrana (3). Com o crescimento da vesícula (4) ela finalmente se libera da membrana de origem (5) com auxílio da proteína dinamina e por forças geradas na polimerização de componentes do citoesqueleto, sendo impulsionada no citoplasma da célula ao seu destino. Com o desacoplamento do revestimento de clatrina (6) a vesícula segue seu caminho. Alguns ligantes são liberados de seus receptores e os receptores são então reciclados para a superfície celular (7). Adaptado de Brodsky, 2012.

O revestimento de clatrina (Figura 1.3) é construído por uma estrutura poliédrica, formada a partir da união de diversos trisquélions. Estes são formados por três cadeias polipeptídicas pesadas (~192 kDa) e 3 leves (~25 kDa) que juntas formam uma estrutura de 3 pernas, que Pearse e Crowther (1987) chamaram de trisquélion (unidade de montagem da clatrina). Os trisquélions se estruturam em uma rede convexa de hexágonos e pentágonos semelhante a um cesto, para formar um revestimento na superfície citosólica das membranas.

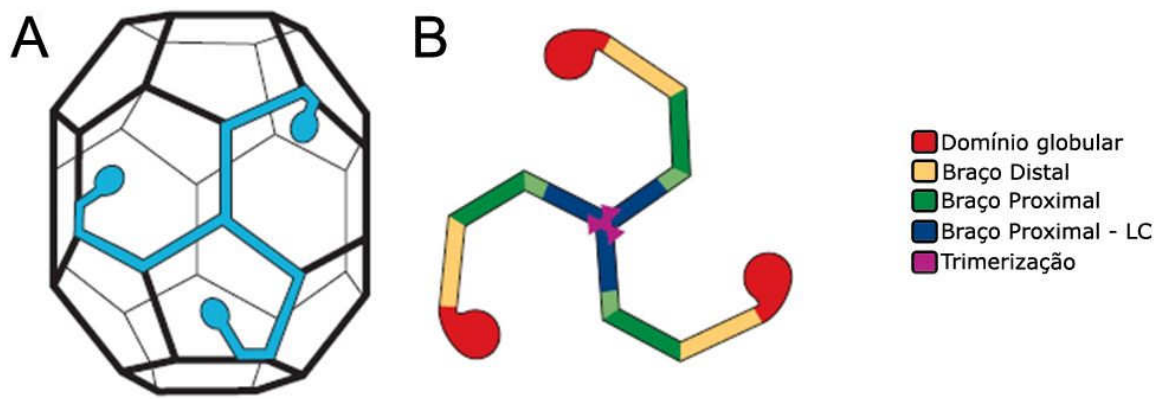


Figura 1.3. A arquitetura de clatrina. (a) Estrutura em forma de barril, mostrando em azul a unidade de formação da clatrina (trisqueção). (b) Arquitetura do trisqueção, formado por 3 cadeias pesadas de clatrina. As cadeias são mantidas juntas por um domínio de trimerização (em roxo), composto por cerca de 100 resíduos da região C-terminal de cada cadeia pesada. Em seguida há o braço proximal (em azul e verde, sendo que a porção em azul é a região de ligação à cadeia leve de clatrina) e o braço distal (em amarelo). Por fim ocorre o domínio globular (em vermelho), separado do braço distal por um linker flexível. Os domínios globulares se dispõem para dentro da gaiola, em direção à membrana (Adaptado de Edeling et al., 2006).

A seqüência nucleotídica da cadeia pesada é altamente conservada entre as espécies. A forte pressão para preservar a estrutura primária da cadeia pesada provavelmente reflete os contatos necessários para a montagem, bem como o grande número de interações com outras proteínas envolvidas na triagem da carga e na regulação da formação do revestimento (Kirchhausen, 2000).

Ybe e colaboradores (1999) propuseram que a montagem da clatrina no meio intracelular é controlada pela ligação da cadeia leve de clatrina, o que impede que o trisqueção seja montado espontaneamente e de forma não desejada no pH fisiológico.

1.2.1. Endocitose dependente de clatrina

Endocitose é o processo pelo qual células internalizam porções da membrana plasmática, incluindo suas proteínas associadas e uma porção do meio extracelular. É uma rota pela qual as células absorvem nutrientes e moléculas sinalizadoras, mas também é uma via que pode participar da remoção de receptores de membrana em resposta a mudanças no meio externo (Baggett e Wendland, 2001). A endocitose mediada por clatrina ocorre em todas as células eucarióticas conhecidas (McMahon e Boucrot, 2011).

Os componentes que foram endocitados são entregues a um endossomo inicial, o qual tem função de estação de triagem da célula. Receptores são reciclados de volta para a membrana plasmática diretamente (via controlada pela Rab4) ou passando por endossomos de reciclagem (via controlada pela Rab11), enquanto as outras moléculas endocitadas são endereçadas aos lisossomos. As Rabs são pequenas GTPases associadas a compartimentos específicos que controlam a função e a identidade intracelular dos compartimentos (Scott et al., 2014).

O endossomo inicial também participa na sinalização celular, através da regulação negativa dos receptores de membrana internalizados (Scott et al., 2014). O endossomo tardio funciona como um segundo eixo do sistema endocítico. Ali o material endocitado pode ser empacotado para degradação no lisossomo, mas também pode ser enviado para outras rotas, como a exocitose e vias autofágicas (Scott et al., 2014).

1.2.2. Clatrina na via biosintética do Complexo de Golgi

Na via biosintética, hidrolases lisosomais produzidas no retículo endoplasmático são endereçadas ao complexo de Golgi por modificação do sacarídeo manose (manose-6-fosfato). No lúmen da rede Trans do Golgi estas enzimas lisosomais são reconhecidas por receptores transmembranares de manose-6-fosfato, se acumulando então em regiões específicas e posteriormente segregadas em vesículas com revestimento de clatrina (Le Borgne e Hoflack, 1997). A rede Trans do Golgi é a região responsável pela triagem e distribuição do material modificado (em geral glicosilação e sulfatação) ao longo das cisternas do Golgi. Glicoproteínas e glicolípídeos modificados são empacotados em vesículas e o destino pode ser o exterior da célula (via regulada), a membrana plasmática (via constitutiva) ou os lisossomos (via biosintética) (Traub e Kornfeld, 1997). As vesículas destinadas à via biosintética brotam de regiões de membranas revestidas por clatrina. Estas vesículas carregam enzimas lisosomais até os endossomos tardios, onde ocorrerá a dissociação do complexo enzima-receptor e os receptores de manose-6-fosfato serão reciclados de volta à rede Trans do Golgi. As enzimas seguirão para os lisossomos, onde com as condições apropriadas, se tornarão ativas (Traub e Kornfeld, 1997).

1.2.2. Proteínas acessórias

Um grande número de fatores citoplasmáticos é necessário para o reconhecimento correto dos vários sinais de endocitose e para conduzir o tráfego

endocítico e da via biossintética até seu destino correto. Determinar a identidade e as funções de cada uma destas proteínas acessórias tem sido o foco de diversos estudos, principalmente aqueles que utilizam como modelos células de animais e fungos, os quais tem revelado uma rede altamente complexa de interações do tipo proteína-proteína e proteína-lípido (Praefcke et al., 2004).

Diversas proteínas interagem com as vesículas revestidas por clatrina, auxiliando na regulação das vias endocítica e biossintética. As interações mais diretas ocorrem com as Proteínas Adaptadoras (APs), cuja principal função é selecionar os complexos receptor-ligante, conectando os segmentos citoplasmáticos dos receptores ao revestimento de clatrina (Robinson, 2004). As proteínas adaptadoras podem ser divididas em dois grandes grupos: multiméricas (clássicas) ou monoméricas (não clássicas). A seleção das diversas proteínas-carga para concentração em uma mesma vesícula revestida por clatrina requer o uso de diversos sinais de classificação e diversos adaptadores podem cumprir este papel. Esta variedade permite plasticidade na seleção de cargas para a inclusão na vesícula (Reider e Wendland, 2011).

Inicialmente eram conhecidos apenas dois complexos adaptadores heterotetraméricos (AP1 e AP2), mas atualmente são conhecidos três complexos adaptadores adicionais AP3, AP4 e AP5 (Hirst et al., 2012 a), além de uma família de adaptadores monoméricos, como as GGAs (do inglês, Golgi-localized, γ -ear-containing, ARF-binding proteins) e a epsina (Robinson, 2004). Estes adaptadores variam grandemente em tamanho e estrutura, mas contém propriedades similares. Muitos deles contém regiões que interagem com alguns ou todos os quatro tipos de ligantes: lipídeos, carga, clatrina ou outras proteínas acessórias (Reider e Wendland, 2011).

Os complexos adaptadores heterotetraméricos (AP1-AP5) localizam-se em diferentes membranas e tem funções distintas (Figura 1.4), mas contém subunidades relacionadas (Figura 1.5) (Robinson, 2004). Eles podem promover a montagem da clatrina *in vitro* e são posicionados entre a clatrina e a membrana provendo uma ponte entre a clatrina e proteínas transmembrana contendo a carga a ser transportada (Hirst et al., 2013).

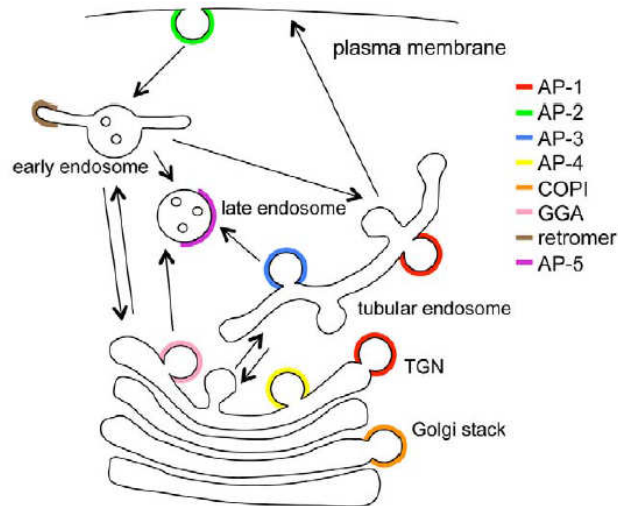


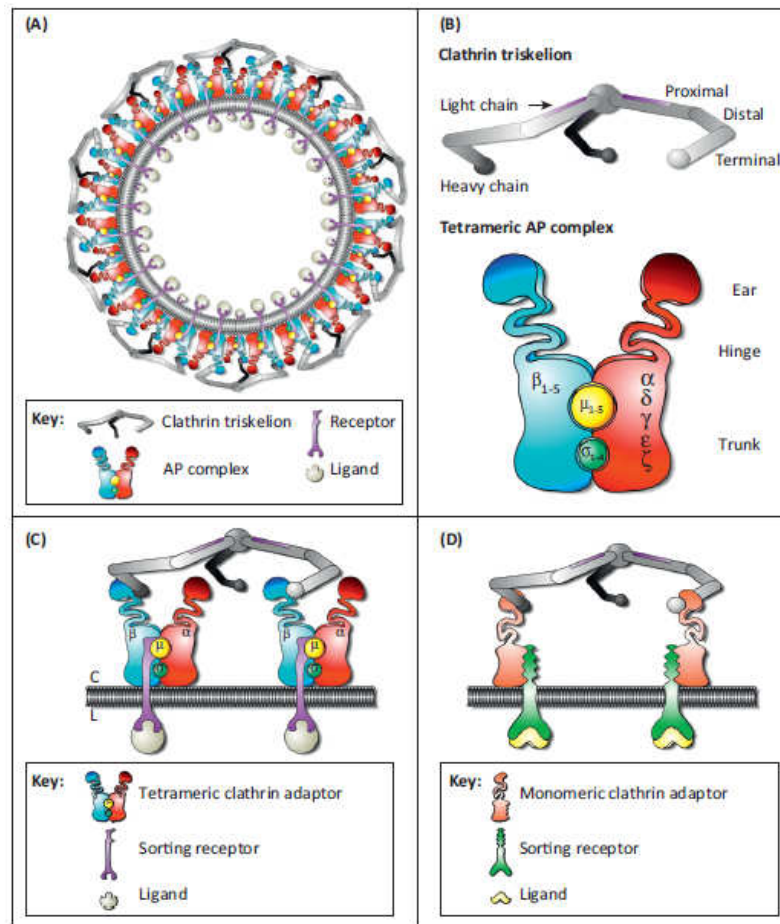
Figura 1.4. Localização dos diferentes complexos adaptadores (AP). AP-1 está localizado na Rede Trans do Golgi e em endossomos, estando envolvido no tráfego entre estas duas organelas. AP-2 facilita a endocitose mediada por clatrina e é o complexo melhor caracterizado. AP-3 está envolvido no tráfego ao endossomo tardio e lisossomos. AP-4 está localizado no Complexo de Golgi e também em endossomos iniciais, onde classifica as proteínas-carga que saem dos endossomos iniciais para os lisossomos, de uma maneira clatrina-dependente. O complexo AP-5 está localizado em endossomos tardios de células HeLa e não está associado com clatrina (Hirst et al., 2012 a).

Outra família de proteínas adaptadoras associadas à clatrina, conhecidas como GGA (Golgi-localized, γ -ear-containing, ARF-binding proteins) é formada por proteínas monoméricas que possuem um domínio C-terminal parecido com aquele da subunidade γ de AP-1. As GGAs são estruturalmente diferentes dos complexos AP, mas seus domínios “ear” tem dobramentos semelhantes, sendo que ambos possuem domínios flexíveis parecidos e contém domínios de ligação à clatrina (Robinson, 2004).

O grupo de adaptadores monoméricos (não-clássicos) inclui AP180/CALM, HIP1/HIP1R e as epsinas. Essas proteínas contém um domínio ENTH/ANTH, capaz de se ligar a fosfolípidos e a proteínas que contribuem na formação do revestimento de clatrina nas membranas. O domínio ENTH também auxilia na curvatura da membrana através do remodelamento de lipídeos durante a formação de vesículas, o que sugere que os domínios E/ANTH são componentes universais da maquinaria do revestimento de clatrina (Traub, 2003). Proteínas que contém o domínio E/ANTH atuam com o Complexo Adaptador AP-1 na Rede Trans do Golgi (Legendre-Guillemain et al., 2004) e também podem ligar e co-localizar com AP-2/clatrina (Traub, 2003).

Uma análise genômica comparativa mostrou que o domínio ENTH é conservado nos genomas de representantes de todos os principais supergrupos eucarióticos (Field et al., 2007).

Outra proteína recentemente descrita que também possui um domínio ENTH, assim como a epsinaR, é a Tepsina, que recruta AP-4 para incorporação em vesículas revestidas. Foi a primeira proteína acessória de AP-4 descrita (Borner et al., 2012).



TRENDS in Plant Science

Figura 1.5. Arquitetura molecular das vesículas revestidas por clatrina. (A) seção transversal de uma vesícula revestida por clatrina típica, mostrando a camada mais externa dos triskelions de clatrina e o complexo adaptador tetramérico (AP). (B) Um típico triskelion e o complexo AP tetramérico. (C) Interação entre uma subunidade de tamanho médio de um complexo AP e um receptor transmembranar. (D) Interação entre um complexo monomérico e um receptor transmembranar. As proteínas adaptadoras, tetraméricas ou monoméricas, têm domínios de ligação a fosfolípidos, além de domínios de ligação de clatrina e de ligação ao receptor (Robinson e Pimpl, 2013).

O citoesqueleto de actina também é um componente vital do processo endocítico, regulando tanto eventos iniciais de endocitose por facilitar a deformação da membrana interna, quanto por participar do transporte de vesículas endocitadas

até os compartimentos intracelulares de destino (Roth, 2007). Recentemente foi mostrada a interação de adaptadores do tipo epsina com fatores que regulam o citoesqueleto de actina, sugerindo um papel importante da epsina neste processo (Repass et al., 2007; Maldonado-Baez et al., 2008).

1.2. TRÁFEGO INTRACELULAR EM PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos (Euglenozoa, Kinetoplastea, Trypanosomatidae) representam uma ameaça significativa para a saúde de humanos, animais e plantas, impactando populações na África e América Latina (Alsford et al., 2013). Para todos esses organismos o tráfego intracelular de vesículas é vital para a manutenção da interação patógeno-hospedeiro, para a modulação e evasão das respostas do sistema imunológico do hospedeiro e para a absorção de nutrientes (Murungi et al., 2013).

Alguns tripanosomatídeos são causadores de principais doenças tropicais negligenciadas: diversas espécies de *Leishmania spp* causam leishmaniose, o *Trypanosoma cruzi* causa a Doença de Chagas na América Latina e o *Trypanosoma brucei* causa a doença do sono na África (Rodrigues et al., 2014). Algumas espécies de tripanosomas são também importantes na medicina veterinária, uma vez que afetam seriamente animais de interesse econômico como eqüinos e bovinos. Doenças causadas por tripanosomatídeos de plantas estão crescendo em importância, devido aos graves problemas que têm causado em plantações de coco e palma na América do Sul (De Souza et al., 2009).

1.2.1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é considerada endêmica em 21 países na América Latina e partes da América do Norte (México e Sul dos EUA). Cerca de 90 milhões de pessoas estão expostas ao parasita e estima-se que 7-8 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* (WHO, 2014).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (Figura 1.6) envolve dois hospedeiros: um inseto triatomíneo (hemípteros da família Reduviidae) e um mamífero que pode ser o homem (Chagas, 1909; revisto por Tyler e Engman, 2001). A transmissão ao mamífero é iniciada quando o inseto vetor se alimenta e libera formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Estas formas acessam a corrente sanguínea por uma descontinuidade da pele e alcançam o interior de células do hospedeiro vertebrado, local onde o parasita sofre total reorganização estrutural e ocorre a diferenciação para formas amastigotas. Estas se dividem e se diferenciam então a

formas tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas no sangue do hospedeiro e que podem eventualmente ser capturadas por um novo inseto vetor. No tubo digestivo do inseto as formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam por fissão binária. Após estresse nutricional no intestino do vetor as epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (processo de metaciclogênese), as quais são capazes de infectar outros mamíferos. O processo de metaciclogênese pode ser obtido *in vitro* utilizando-se meio de cultivo TAU (Triatomine Artificial Urine) que mimetiza a urina do inseto vetor (Contreras et al., 1985).

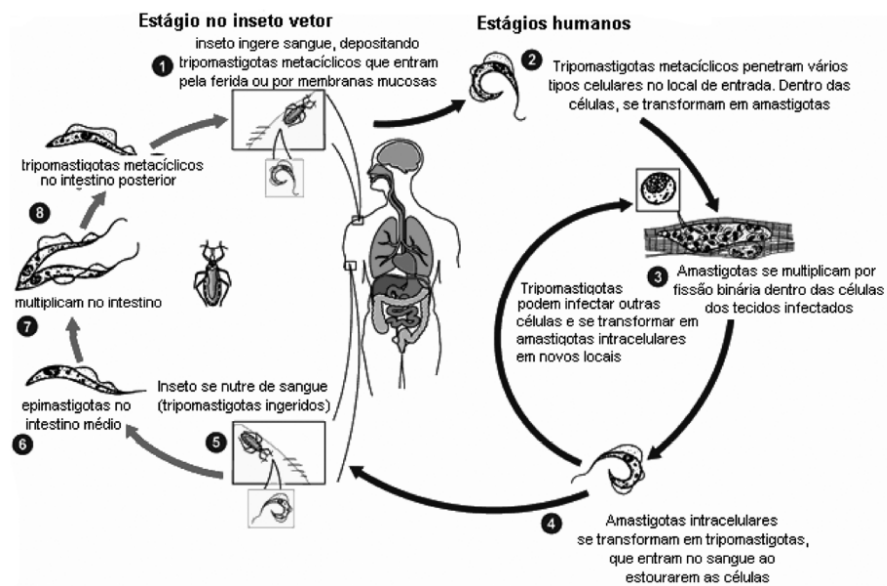


Figura 1.6. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.2.3. Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

Os protozoários tripanosomatídeos são eucariotos que possuem uma organização ultraestrutural clássica, com algumas das principais organelas encontradas também em células do mamífero hospedeiro. Entretanto, eles também possuem organelas especiais que estão ausentes em outros eucariotos, ou tem características encontradas exclusivamente em tripanosomatídeos (Figura 1.7). Essas características exclusivas são interessantes do ponto de vista de biologia celular, pois abrem a possibilidade de novos alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos (Rodrigues et al., 2014).

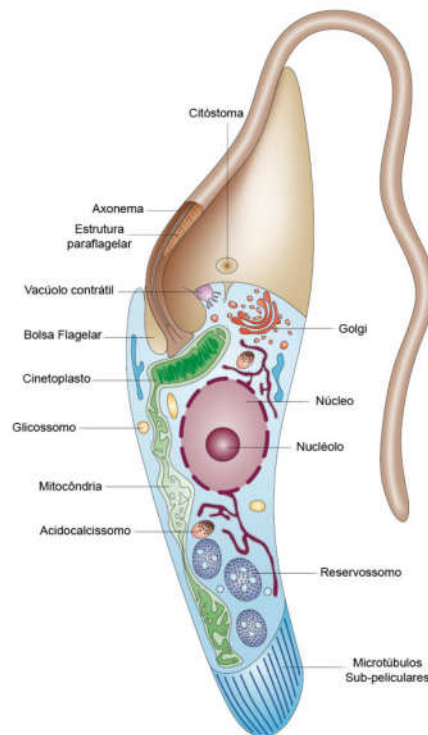


Figura 1.7. Esquema das principais estruturas celulares de *T. cruzi* (Fonte: DO CAMPO et al., 2005).

A superfície celular do *T. cruzi* se caracteriza pela presença de três componentes: membrana plasmática, glicocálix e microtúbulos subpeliculares. A principal função do glicocálix é participar da interação entre os diferentes estágios evolutivos do parasita e a superfície do hospedeiro, seja ele mamífero ou inseto. O glicocálix é composto por diversas proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas, glicolipídeos e mucinas (Rodrigues et al., 2014). Além disso, há um grande número de macromoléculas ligadas à membrana plasmática por meio de âncoras de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (De Souza, 2002).

A membrana plasmática está fortemente associada à microtúbulos subpeliculares. Essa associação é extremamente resistente a efeitos mecânicos e à ação de drogas (De Souza, 2002). Este citoesqueleto mantém o formato do corpo celular em cada estágio evolutivo. Os microtúbulos são formados por monômeros de tubulina e são surpreendentemente mais estáveis do que os de mamíferos. Estes microtúbulos não são encontrados na bolsa flagelar (Rodrigues et al., 2014). Já se mostrou que actina está presente em *T. cruzi*, mas os filamentos típicos, encontrados em eucariotos superiores, não foram observados (Melo et al., 2008; Souza et al., 2013).

O *T. cruzi* apresenta um flagelo anterior, que se origina no corpo basal e passa por uma invaginação da membrana que reveste o corpo celular e forma a bolsa

flagelar. Na forma amastigota o flagelo é muito curto, muitas vezes permanecendo dentro da bolsa flagelar. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas parte do flagelo encontra-se aderida ao corpo, em uma região conhecida com FAZ (flagellar attachment zone), promovendo uma ondulação na membrana plasmática quando ocorre o batimento flagelar. Na saída da bolsa flagelar há um contato íntimo entre a membrana do flagelo e a membrana que reveste a região de transição entre o corpo celular e a bolsa flagelar. Esse contato estabelece uma barreira de comunicação entre o meio extracelular e a bolsa flagelar, promovendo um controle sobre a natureza dos componentes que entram na bolsa flagelar e que poderão ser posteriormente ingeridos por endocitose (De Souza, 2002).

O *T. cruzi* possui uma mitocôndria única e ramificada que se estende por toda a célula. Na porção anterior do parasita a mitocôndria forma uma região conhecida como cinetoplasto, onde se concentra uma matriz complexa de DNA mitocondrial. O DNA do cinetoplasto (kDNA) pode representar até 30% do total de DNA da célula (De Souza, 2002). O kDNA é composto por moléculas circulares, os maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos são similares ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, codificando rRNA e as subunidades do complexo respiratório (Stuart, 1983). Já os minicírculos codificam RNAs guias, que atuam na edição de transcritos do maxicírculo (Aphasizhev e Aphasizheva, 2014; Shapiro e Englund, 1995).

O glicosomo é uma organela característica dos Kinetoplastea e contém praticamente todas as enzimas da via glicolítica, sendo considerado um tipo especializado de peroxisomo. É uma organela envolvida em várias funções, como β -oxidação de ácidos graxos e metabolismo de carboidratos (Oppendoes e Michels, 1991). O Acidocalcissomo é uma organela citoplasmática rica em cálcio e fosfato e de pH ácido (DoCampo e Moreno, 1999). São organelas importantes na regulação osmótica e na homeostase do pH intracelular, colaborando com o vacúolo contrátil.

O *T. cruzi* possui um vacúolo contrátil osmo-regulador localizado em associação com a membrana da bolsa flagelar. Este vacúolo é essencial para a rápida adaptação a diferentes pressões osmóticas. O vacúolo contrátil também contribui para a regulação da homeostase de cálcio e para o transporte de proteínas para a membrana plasmática (Allen e Naitoh, 2002). Alguns estudos sugerem que os acidocalcissomos se fundem aos vacúolos contráteis, contribuindo para a osmoregulação da célula (Rohloff et al., 2004).

O retículo endoplasmático (RE) pode ser encontrado por todo o corpo celular de todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. O complexo de Golgi é único e está sempre

presente, localizado próximo ao cinetoplasto e à bolsa flagelar (Figueiredo e Soares, 1995). Vesículas brotam da face Trans do Golgi, próximo à bolsa flagelar (De Souza, 2002).

1.2.4. Via endocítica em *T. cruzi*

Assim como outras células eucarióticas, protozoários parasitas da família *Trypanosomatidae* são capazes de ingerir macromoléculas do meio extracelular por meio de endocitose. Nestes protozoários o processo de endocitose é extremamente polarizado, com a captação de carga confinada à bolsa flagelar em *Leishmania* e *T. brucei* ou distribuída entre a bolsa flagelar e o citóstoma em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (De Souza et al., 2009).

Em *T. brucei* o processo de endocitose é rápido, seguido de eficiente degradação da carga e reciclagem de receptores de superfície (De Souza et al., 2009). O *T. brucei* possui um sistema endocítico convencional, porém mais simplificado se comparado com eucariotos superiores. Este sistema consiste em endossomos iniciais e tardios, juntamente com um corpo multivesicular e terminando com o lisossomo para degradação. As vesículas que brotam da bolsa flagelar contêm revestimento de clatrina (Allen et al., 2003).

Em *T. cruzi* a endocitose já foi observada em formas epimastigotas (De Souza et al., 2009) e mais recentemente em amastigotas (Cassiano M. Batista, ICC/Fiocruz-PR, comunicação pessoal, manuscrito em preparação) e parece não ocorrer em tripomastigotas (Correa et al, 2002). Em epimastigotas a captação de moléculas-carga ocorre majoritariamente através do complexo citóstoma-citofaringe, mas também pela bolsa flagelar (Porto-Carreiro e al., 2000). O complexo citóstoma-citofaringe é uma invaginação especializada na membrana plasmática que penetra profundamente no citoplasma, terminando na porção posterior da célula após o núcleo (Alcantara et al, 2014; VataruNakamura et al, 2005). A invaginação (citofaringe) apresenta sua abertura para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar e está presente em formas epimastigotas e amastigotas de tripanosomas do subgenero *Schizotrypanum* (Milder e Deane, 1969; De Souza, 2002). O citóstoma é uma região de grande interesse, uma vez que a maior parte da atividade endocítica no *T. cruzi* ocorre a partir desta estrutura, e não via bolsa flagelar (Porto-Carreiro et al., 2000; VataruNakamura et al., 2005).

As moléculas endocitadas pelo citóstoma são rapidamente internalizadas por meio de vesículas endocíticas. Essas vesículas se fundem para formar uma estrutura

tubular, a qual dará origem a estruturas conhecidas como reservossomos (Porto-Carreiro et al., 2000). Entretanto, a presença do endossomo inicial em formas epimastigotas de *T. cruzi* é controversa. Foi proposto que vesículas-carga provenientes da superfície celular (citóstoma e bolsa flagelar) entregam seu conteúdo diretamente aos reservossomos, sem passar por um endossomo inicial (Soares, 1999).

Os reservossomos são estruturas especializadas no acúmulo de macromoléculas externas endocitadas (Soares e De Souza, 1991; Figueiredo e Soares, 2004). O pH no interior da organela é de cerca de 6,0, colocando-o como um compartimento pré-lisosomal, sendo transformados em lisossomos por maturação durante o processo de metaciclogênese. Durante a diferenciação de epimastigota para tripomastigota a organela involui, não sendo encontrada na forma tripomastigota sanguínea (Soares et al., 1992). Assim, os reservossomos são considerados os principais locais de degradação de proteínas. Duas hidrolases de reservossomos são bem caracterizadas em *T. cruzi*: cruzipaina e serino carboxipeptidase. Cruzipaina é considerada um fator fundamental na virulência para o *T. cruzi* durante a invasão da célula hospedeira e para sobrevivência intracelular e é a cisteíno-proteinase mais encontrada na célula. A serino carboxipeptidase catalisa a hidrólise da porção carboxi-terminal de proteínas e peptídeos. A morfologia dos reservossomos é anormal após longos períodos de estarvação (De Souza et al., 2009). Os reservossomos são comparados aos endossomos tardios de mamíferos (Soares et al., 1992).

Foi proposto que a endocitose mediada por clatrina estaria restrita à bolsa flagelar, enquanto que a endocitose independente de clatrina ocorreria majoritariamente pelo citóstoma (Corrêa et al, 2007). Embora existam indicações de endocitose dependente de clatrina em *T. cruzi* (Figueiredo e Soares, 2004; Corrêa et al., 2007; Corrêa et al., 2008), faltam evidências diretas para que esta via e suas características moleculares e importância fisiológica sejam conhecidas. Com base nisso, a presente tese tem como objetivos verificar o papel da clatrina na endocitose de *T. cruzi*, tanto na bolsa flagelar quanto no citóstoma, bem como suas proteínas associadas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão do gene e a localização das proteínas cadeias pesada (TcCHC) e leve (TcCLC) de clatrina em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas) e identificar seus complexos associados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a expressão de TcCHC e TcCLC em diferentes fases evolutivas de *T. cruzi* (formas epimastigotas, formastripomastigotas metacíclicas e amastigotas) por Western blot;
2. Identificar a localização celular de TcCHC e TcCLC em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* por microscopia de fluorescência, bem como a imunolocalização ultra-estrutural de TcCLC;
3. Identificar, por imunofluorescência, a localização de TcCLC fusionada às proteínas A e C;
4. Identificar a localização celular de TcEpsina-GFP em epimastigotas de *T. cruzi*, bem como sua co-localização com TcCHC;
5. Isolar e identificar complexos proteicos associados a TcCLC e TcEpsina, a partir das populações de *T. cruzi* expressando TcCLC/AC e TcEpsina-GFP.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE CLATRINA EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Os dados obtidos nesta parte foram publicados em 2014 na revista BMC Cell Biology (Fator de Impacto: 2,84; Quais B1 na área CB-I)

Titulo: Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*

Autores: Ligia Cristina Kalb, Yohana Camila Antunes Frederico, Cassiano Martin Batista, Iriane Eger, Stênio Perdigão Fragoso e Maurilio José Soares

Revista: BMC Cell Biology 15:23, 2014

RESUMO

O tráfego vesicular mediado por clatrina, mecanismo pelo qual proteínas e lipídeos são transportados entre organelas envolvidas por membrana, é responsável por uma grande proporção da importação da membrana plasmática (endocitose) e transporte a partir da Rede Trans do Golgi para o sistema endossomal. Os eventos mediados por clatrina ainda são pouco conhecidos no protozoário *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas na América Latina. Neste estudo, a expressão e a localização das proteínas cadeias pesada (TcCHC) e leve (TcCLC) de clatrina foram investigadas em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas), utilizando anticorpos policlonais e monoclonais produzidos contra proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Análise por microscopia confocal revelou um acúmulo de TcCHC e TcCLC na porção anterior da célula, onde a bolsa flagelar e complexo de Golgi estão localizados. A TcCLC parcialmente colocalizou com o marcador de Golgi TcRAB7-GFP e com albumina endocitada, mas não colocalizou com transferrina, uma proteína endocitada principalmente através de vesículas não revestidas formadas no complexo citóstoma/citofaringe. As cadeias leve e pesada de clatrina são expressas em *T. cruzi*. Ambas as proteínas são tipicamente localizadas na porção da célula anterior ao cinetoplasto, região onde se encontram a bolsa flagelar e o Complexo de Golgi. Nossos dados indicam que em formas epimastigotas de *T. cruzi* a endocitose de albumina mediada por clatrina, ocorre na bolsa flagelar, enquanto que a endocitose de transferrina, independente de clatrina, ocorre no complexo citóstoma/citofaringe.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*

Ligia Cristina Kalb¹, Yohana Camila Antunes Frederico¹, Cassiano Martin Batista¹, Iriane Eger^{1,3}, Stênio Perdigão Fragoso² and Maurilio José Soares^{1*}

Abstract

Background: Clathrin-mediated vesicular trafficking, the mechanism by which proteins and lipids are transported between membrane-bound organelles, accounts for a large proportion of import from the plasma membrane (endocytosis) and transport from the trans-Golgi network towards the endosomal system. Clathrin-mediated events are still poorly understood in the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease in Latin America. In this study, clathrin heavy (TcCHC) and light (TcCLC) chain gene expression and protein localization were investigated in different developmental forms of *T. cruzi* (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes), using both polyclonal and monoclonal antibodies raised against *T. cruzi* recombinant proteins.

Results: Analysis by confocal microscopy revealed an accumulation of TcCHC and TcCLC at the cell anterior, where the flagellar pocket and Golgi complex are located. TcCLC partially colocalized with the Golgi marker TcRAB7-GFP and with ingested albumin, but did not colocalize with transferrin, a protein mostly ingested via uncoated vesicles at the cytostome/cytopharynx complex.

Conclusion: Clathrin heavy and light chains are expressed in *T. cruzi*. Both proteins typically localize anterior to the kinetoplast, at the flagellar pocket and Golgi complex region. Our data also indicate that in *T. cruzi* epimastigotes clathrin-mediated endocytosis of albumin occurs at the flagellar pocket, while clathrin-independent endocytosis of transferrin occurs at the cytostome/cytopharynx complex.

Keywords: Clathrin, Endocytosis, Immunolocalization, *Trypanosoma cruzi*

Background

Clathrin is a heteromeric protein composed of heavy chain subunits that can self-assemble into a polyhedral array on membranes. The most thoroughly characterized form of clathrin comprises light chain subunits, which are unstructured until bound to heavy chains [1]. Clathrin was described nearly 40 years ago [2] and since then the clathrin heavy chain (CHC) has been identified in all eukaryotes [3], while the clathrin light chain (CLC) subunit has proved more difficult to identify in distant eukaryotic species [1].

Clathrin-mediated vesicular trafficking is the most highly characterized mechanism by which proteins and lipids are transported between membrane-bound organelles, being responsible for a large proportion of import from the plasma membrane (endocytosis) and transport from the trans-Golgi network (TGN) towards the endosomal system [4,5]. The amino acid sequence of CHC is highly conserved

from yeasts to humans, with the majority of variations representing conservative replacements or infrequent gaps, usually of less than three residues. The strong pressure to preserve the primary structure of CHC likely reflects the highly extended interleg contacts required for assembly, as well as the large number of interactions with other proteins involved in cargo sorting and the regulation of membrane coat formation [4,6].

Endocytosis is essential for eukaryotic cell survival as a basic mechanism of ingesting macromolecules and has been thoroughly characterized in mammalian and yeast cells. Internalized molecules are later degraded in the endosomal-lysosomal system and provide important precursors for several key metabolic pathways [7]. Among parasitic protozoa, endocytosis is also important for evading host immune defenses and to support the intense proliferation of specific life cycle stages [8]. A particularly good example of these parasitic protozoa are trypanosomatids, a group that includes pathogenic parasites, such as *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* and different *Leishmania* species, which are all associated with severe diseases in humans.

* Correspondence: maurilio@tecpar.br

¹Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

Except for a previous study demonstrating endocytosis of ferritin via coated vesicles in *Crithidia fasciculata* [9], endocytosis in trypanosomatids has been reported predominantly in *T. brucei* and also in *T. cruzi* and *Leishmania* [8]. In most trypanosomatids endocytic activity is polarized and restricted to the flagellar pocket membrane [8,10]. In *T. brucei*, endocytic activity has also been shown to vary across the different developmental stages of the parasite [11].

Endocytic mechanisms have been studied most extensively in *T. brucei*, where clathrin-mediated endocytosis is the major route for endocytosis [12]. Clathrin was found in *T. brucei* at endocytic vesicles and post-Golgi elements, suggesting that it serves a similar range of functions to those found in higher eukaryotes [13,14]. Suppression of clathrin expression in *T. brucei* using RNA interference results in rapid lethality in the bloodstream stage, the developmental form most active for endocytosis [11]. Nevertheless, the events leading up to endocytosis (regardless of whether it is mediated by clathrin) in *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease in Latin America, are still poorly understood. A major obstacle occurs because these two *Trypanosoma* species exhibit markedly different life cycles, and the developmental forms that can be maintained easily in the laboratory are distinct (*T. brucei* trypomastigotes x *T. cruzi* epimastigotes), making direct comparisons difficult. Furthermore, analysis of endocytic activity in *T. cruzi* is far more complex because the epimastigote form of this parasite exhibits a second endocytic portal, the cytostome/cytopharynx complex [8,15].

Morphological observations by transmission electron microscopy have previously identified coated vesicles budding off from both the flagellar pocket and a region adjacent to the TGN in *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes [16,17]. Subcellular localization of clathrin has been examined in *T. cruzi* epimastigotes by immunofluorescence, however, using a heterologous antibody against bovine clathrin. Immunolabeling was observed clustered at the anterior region of cells, where the flagellar pocket and the single Golgi complex are located [16].

In this study, we have performed a thorough analysis of the CHC and CLC genes of *T. cruzi*, characterizing their expression and localization in different developmental forms of the parasite (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes), using both polyclonal and monoclonal antibodies produced against *T. cruzi* recombinant proteins. Our data indicate that clathrin heavy and light chains are expressed in *T. cruzi* and that they localize to the flagellar pocket and Golgi complex region.

Results

TcCLC and TcCHC: in silico gene identification and domain analysis

A hypothetical gene for *T. cruzi* clathrin light chain was identified in the TritypDB database (Tc00.1047053506211.240).

This gene is 648 bp long, maps between nucleotides 466,358 and 467,005 on chromosome 40 of *T. cruzi* and encodes a hypothetical protein (TcCLC) of 216 amino acids (23.3 kDa). A comparison of amino acid sequence alignments revealed that TcCLC is conserved in trypanosomatids (Table 1), with maximal identities between 37 to 45% (90% for *T. cruzi marinkellei*). The percentage identity was 32–34% for more divergent organisms, such as *H. sapiens* and *S. cerevisiae*, but the length of these alignments was smaller (101 and 56 amino acids, respectively, Table 1).

The *T. cruzi* clathrin heavy chain gene has already been identified in the TritypDB database (Tc00.1047053506167.50). This gene is 5,115 bp long, maps between nucleotides 1,104,521 and 1,109,635 on chromosome 37 of *T. cruzi* and encodes a clathrin heavy chain protein (TcCHC) of 1,704 amino acids (192.891 kDa). A comparison of amino acid sequence alignments revealed that TcCHC is highly conserved in trypanosomatids (Table 1), with maximal identities between 65 and 98%.

Analysis of the TcCLC gene using the pFAM database revealed that the encoded protein contains a clathrin light chain domain located between amino acids 92 and 208, while the TcCHC-encoded protein contains a clathrin heavy chain linker (amino acids 333–356), clathrin-H-link domains (amino acids 358–423) and several repeats found in clathrin and in vacuolar protein sorting-associated (VPS) proteins (amino acids 544–1579, approximately 140 amino acids per repeat).

TcCLC and TcCHC expression in *Trypanosoma cruzi*

A polypeptide of approximately 23.3 kDa, encoded by the entire *T. cruzi* CLC gene, was used to obtain a mouse antiserum. When assessed by western blotting, this antiserum reacted with a polypeptide of approximately 30 kDa in whole cell lysates obtained at different stages of the *T. cruzi* life cycle (Figure 1A).

A polypeptide of approximately 40 kDa, encoded by the N-terminal sequence of the *T. cruzi* CHC gene, was used to obtain polyclonal and monoclonal (IgG1/kappa isotype) antibodies. When lysates obtained at different stages of the *T. cruzi* life cycle were probed with this monoclonal antibody by western blotting, a polypeptide of approximately 190 kDa was detected corresponding to endogenous TcCHC (192 kDa). The antibody also detected the GST-TcCHC fusion protein (approximately 70 kDa) expressed in *E. coli* (data not shown). As expected, the monoclonal antibody did not detect proteins from normal *E. coli* extracts (data not shown).

Differential expression of both TcCHC and TcCLC was observed during the *T. cruzi* life cycle as determined by comparing TcCHC and TcCLC levels at different developmental stages (Figure 1B) with that of the corresponding actin loading control (Figure 1A, middle bands). Both

Table 1 Amino acid sequence comparison of *Trypanosoma cruzi* CLC (Clathrin Light Chain and CHC (Clathrin Heavy Chain), indicating the percentage of sequence identity and similarity (in parenthesis)

<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi marinkellei</i>	<i>T. brucei</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. major</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
CHC	98 (99) sl = 1704	71 (85) ^a sl = 1706	67 (83) sl = 1705	67 (82) sl = 1705	65 (82) ^a sl = 1705	39 (62) ^a sl = 1694	35 (57) sl = 1680
CLC	90 (93) sl = 214	44 (61) sl = 189	40 (56) sl = 291	45 (66) sl = 145	37 (55) sl = 161	32 (55) sl = 101	34 (51) sl = 56

^a[16].

Sequence length (sl): number of amino acids in the aligned sequences.

TcCHC and TcCLC were expressed to a lesser extent in trypomastigotes and to a greater extent in amastigotes.

Subcellular localization of TcCLC and TcCHC in *Trypanosoma cruzi*

Confocal microscopy was used to visualize the cellular distribution of clathrin heavy (TcCHC) and light (TcCLC) chains in *T. cruzi*, using the TcCHC monoclonal antibody (Figure 2) and the TcCLC antiserum (Figure 3). These antibodies recognized the proteins in all developmental forms tested. Intense immunolabeling was detected adjacent to the kinetoplast, in a cell region where the flagellar pocket and Golgi complex are located.

As mentioned above, incubation of *T. cruzi* with an antiserum against TcCLC resulted in positive immunolabeling in a region adjacent to the kinetoplast. Accordingly, this same pattern of localization was observed in TcCLC/AC-transfected *T. cruzi* epimastigotes immunolabeled with an anti-protein A antibody (Figure 4A–D; see Additional file 1). Furthermore, TcCLC colocalized with TcCHC at the anterior region of wild type epimastigotes, where the flagellar pocket and the single Golgi complex are located (Figure 4E–H).

In TcRab7-GFP transfected *T. cruzi* epimastigotes, immunolabeling with antiserum against TcCLC partially colocalized with the Golgi marker TcRab7-GFP [18] indicating that TcCLC may also localize to the flagellar pocket (Figure 4I–L). To confirm this hypothesis, wild-type epimastigotes were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated albumin, a protein that is ingested through the flagellar pocket. As expected, TcCLC colocalized with

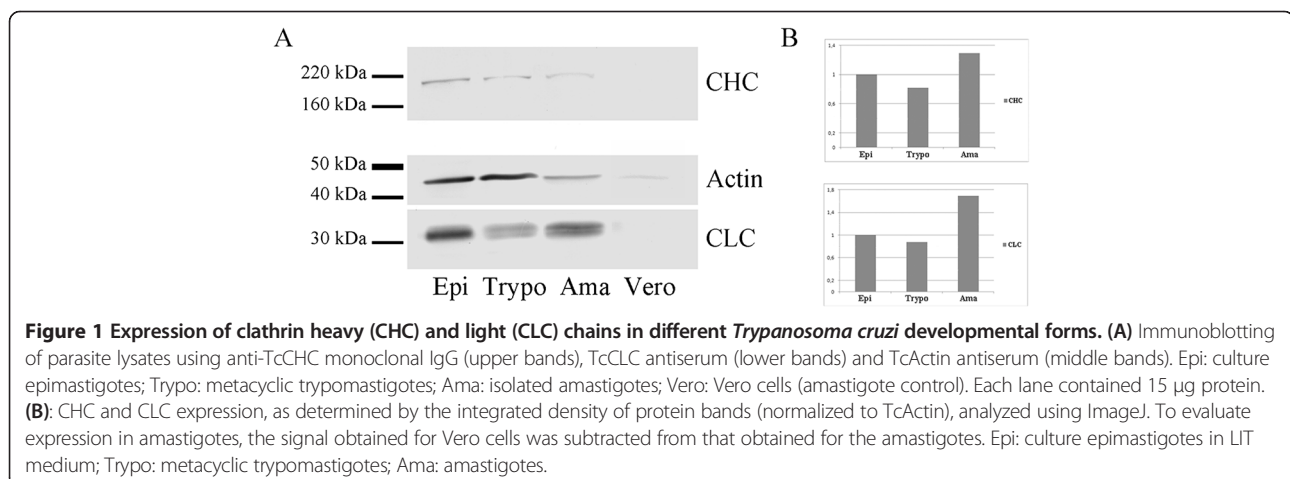
albumin at the flagellar pocket region (Figure 4M–P; see Additional file 2), but not with albumin loaded into endocytic vesicles at the posterior cell region. Finally, TcCHC did not colocalize with Alexa Fluor 633-conjugated transferrin, a protein that is predominantly ingested via uncoated vesicles at the cytotome/cytopharynx complex and which accumulates in reservosomes (Figure 4Q–T).

The TcCLC antiserum was also used to determine the subcellular localization of endogenous TcCLC in wild-type *T. cruzi* epimastigotes by transmission electron microscopy. Ultrastructural analysis revealed immunolabeling at the flagellar pocket membrane (see Additional file 3), further confirming the results obtained by confocal microscopy.

Discussion

Our data represent the first attempt to analyze clathrin expression and subcellular localization in the American trypanosome *T. cruzi* using homologous reagents. An *In silico* search detected a hypothetical clathrin light chain protein (TcCLC) encoded by the *T. cruzi* genome. This protein has a clathrin light chain domain, which mediates interaction with the clathrin heavy chain and regulates stabilization of clathrin coat trimerization in mammalian cells [17,19]. Amino acid sequence alignments revealed that TcCLC is conserved in trypanosomatids.

The presence of a clathrin light chain gene and expression of the encoded protein (TcCLC) have not previously been demonstrated in *T. cruzi*. In this study, we raised an antiserum against TcCLC which has an expected molecular mass of 23.3 kDa (as predicted from the cDNA sequence).



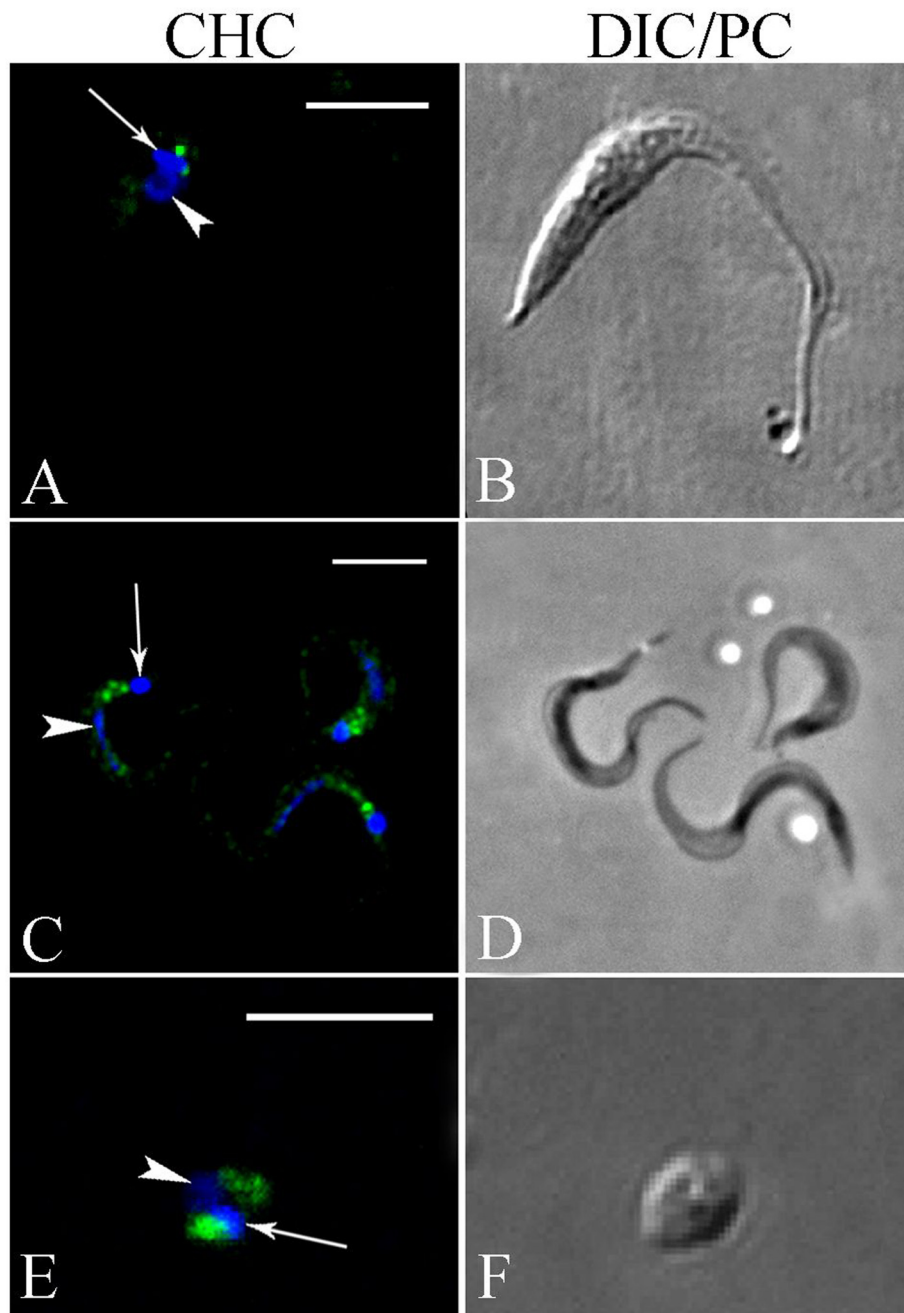


Figure 2 Analysis of TcCHC localization in *Trypanosoma cruzi* using a TcCHC monoclonal antibody. Subcellular localization of TcCHC in the various developmental forms of *T. cruzi*. (A-B): epimastigote. (C-D): metacyclic trypomastigotes. (E-F): isolated amastigote. Note strong immunolabeling in a region adjacent to the kinetoplast (arrow), where the flagellar pocket and Golgi complex are located. Nucleus (arrowhead) and kinetoplast DNA were stained with Hoechst 33342. **A:** rabbit anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 594 (pseudocolored in green); **C & E:** rabbit anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 488; **B & F:** Differential interference contrast (DIC) images of the parasite body; **D:** phase contrast images of the parasite body. Scale bars = 5 μ m.

However, in western blot assays the antiserum recognized a polypeptide of approximately 30 kDa in whole protein extracts of different *T. cruzi* developmental forms. A possible explanation is that the N-terminal 90 residues of TcCLC, which are rich in proline and glycine, account for the

anomalous electrophoretic mobility during SDS-PAGE and consequently result in estimated molecular weights that range from 32 to 36 kDa [4].

A clathrin heavy chain gene is present in the *T. cruzi* genome [20]. Amino acid sequence alignments revealed

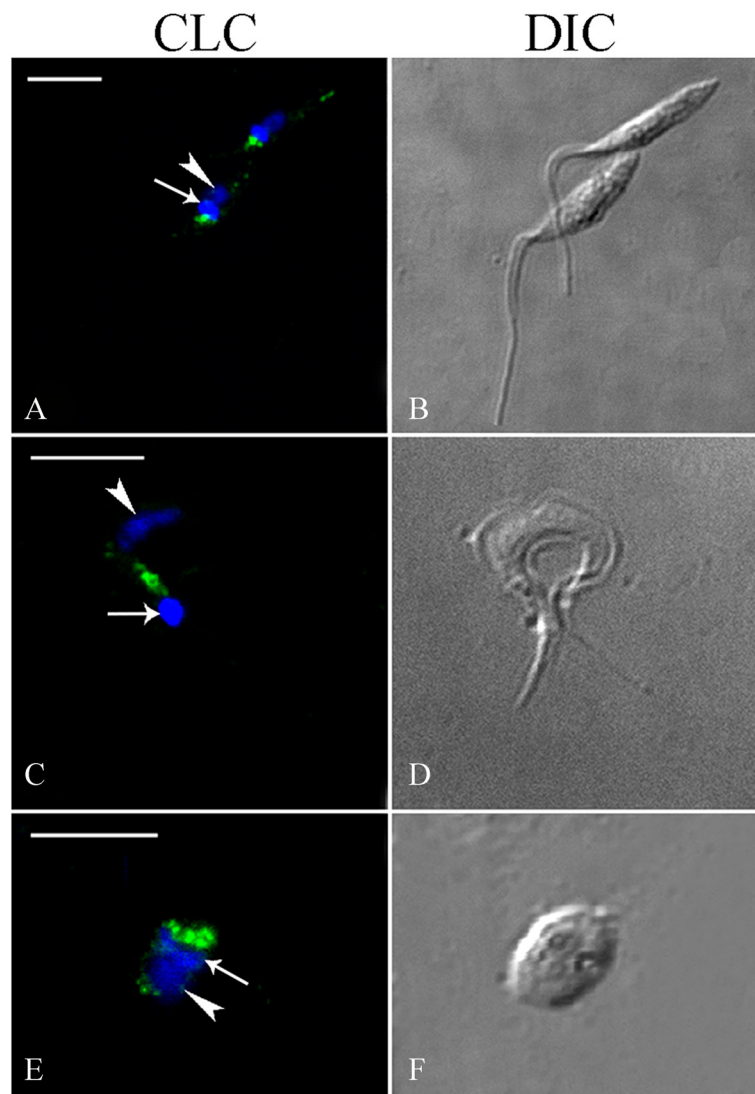


Figure 3 Analysis of TcCLC localization in *Trypanosoma cruzi* using TcCLC antiserum. Subcellular localization of TcCLC in the various developmental forms of *T. cruzi*. (A–B): epimastigotes. (C–D): metacyclic trypomastigote. (E–F): isolated amastigote. Note the strong immunolabeling adjacent to the kinetoplast (arrow). Nucleus (arrowhead) and kinetoplast DNA were stained with Hoechst 33342. B, D & F: DIC images of the parasite body. Scale bars = 5 μ m.

that the encoded protein (TcCHC) is highly conserved in trypanosomatids. TcCHC has a clathrin heavy chain linker domain with an alpha-alpha superhelical structure [21]. The clathrin-H-link domain is short and often appears directly downstream from the clathrin heavy-chain linker [22]. Clathrin and VPS repeat regions are approximately 140 amino acids long, composed of multiple alpha helical repeats and occur in the arm regions of the clathrin heavy chain [23,24], as well as in VPS proteins [25].

Both clathrin light and heavy chains are present in the *T. cruzi* genome and are differentially expressed in the major developmental forms of this parasite. The low expression level observed in *T. cruzi* trypomastigotes may be related to the low endocytic activity observed for this

stage [26], as opposed to the high endocytic activity found in *T. brucei* bloodstream trypomastigotes [27].

We raised monoclonal and polyclonal antibodies against the conserved N-terminal region of *T. cruzi* clathrin heavy chain. These homologous antibodies are more specific than those previously produced using clathrin isolated from bovine brain [16], which may constitute a pool of clathrin heavy and light chains. Our immunofluorescence assays demonstrated colocalization of CLC and CHC in a region adjacent to the kinetoplast of trypanosomatids, at the flagellar pocket/Golgi region. Some of these proteins localized to the Golgi complex, as demonstrated by partial colocalization with TcRab7, a Golgi marker for *T. cruzi* [18]. Accordingly, a previous study showed that *T. brucei*

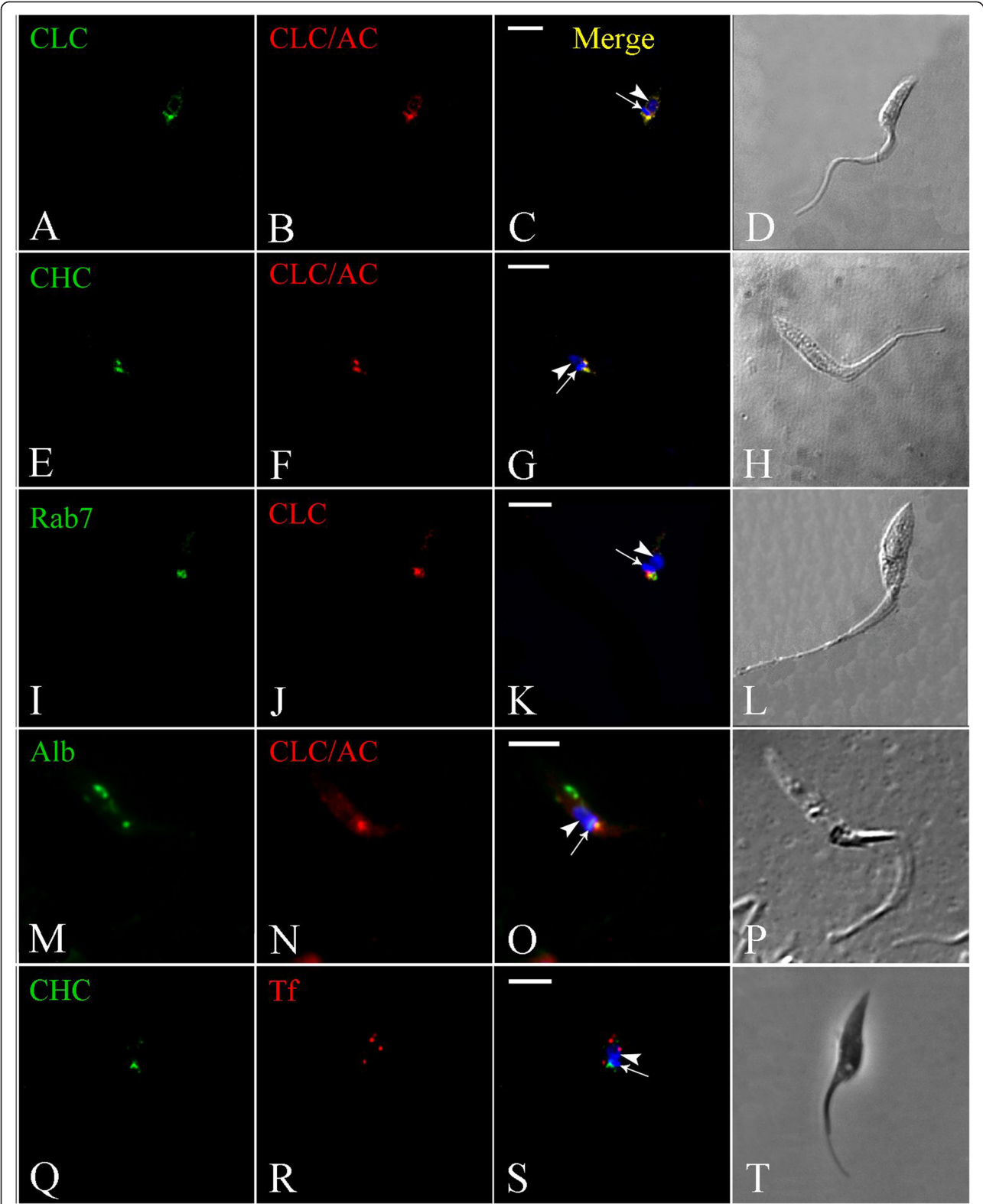


Figure 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 4 Immunocolocalization of clathrin heavy and light chains in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Nucleus (arrowhead) and kinetoplast (arrow) DNA were stained with Hoechst 33342. **(A–D):** Transfected epimastigote expressing CLC-A/C incubated with TcCLC antiserum **(A)** and an antibody against protein A **(B)**. **(E–H):** Transfected epimastigote expressing CLC-A/C incubated with monoclonal antibody against TcCHC **(E)** and an antibody against protein A **(F)**. **(I–L):** Transfected *T. cruzi* epimastigote expressing Rab7-GFP (which localizes to the Golgi complex) **(I)**, incubated with antiserum against TcCLC **(J)**; note partial colocalization of the GFP and TcCLC signals. **(M–P):** CLC-A/C-expressing epimastigote incubated with Alexa Fluor 488-conjugated Albumin **(M)** and immunolabeled with antibody against protein A **(N)**. Note colocalization at the cell anterior, in a region corresponding to the flagellar pocket. **(Q–T):** Wild type *T. cruzi* epimastigote immunolabeled with monoclonal antibody against TcCHC **(Q)** and incubated with Alexa Fluor 633-conjugated transferrin **(R)**; Note absence of colocalization at the cell anterior, indicating that transferrin (red) localizes to the cytostome/cytopharynx and clathrin (green) to the flagellar pocket region. **C, G, K, O & S:** Merged images. **D, H, L, P & T:** Differential interference contrast (DIC) images of the parasite body. Scale bars = 5 μ m.

CLC is present at the flagellar pocket membrane, Golgi complex and endosomal compartments [28].

Evidence for clathrin-mediated endocytosis in *T. cruzi* amastigotes is provided by the positive immunolabeling for clathrin at the cell region where the small flagellum emerges. Immunolabeling was also found at the posterior region of trypomastigote forms, where both the flagellar pocket and Golgi complex are located. A previous study has shown that although transferrin can bind to the flagellar pocket membrane of trypomastigote forms, it is not endocytosed [28]. Therefore, it seems that clathrin in *T. cruzi* trypomastigotes may predominantly be involved in vesicle formation at the TGN.

TcCHC/TcCLC positive immunolabeling at the flagellar pocket region in *T. cruzi* epimastigotes indicates the occurrence of clathrin-mediated endocytosis at this site. It has previously been shown that in *T. cruzi* 80% of transferrin endocytosis occurs through the cytostome [29], while albumin endocytosis occurs at the flagellar pocket via coated vesicles [16]. Accordingly, it has been shown that transferrin uptake in *T. cruzi* is impaired following the disruption of cytostome-associated cytoskeletal elements and the stability of membrane cholesterol, but not by the disruption of clathrin-dependent endocytosis [30]. Taken together, our findings from endocytosis assays, which show colocalization of clathrin (CHC/CLC) with albumin but not with transferrin in *T. cruzi* epimastigotes, strongly suggest that in this developmental form clathrin-mediated endocytosis occurs at the flagellar pocket and that clathrin-independent endocytosis occurs at the cytostome/cytopharynx complex.

Conclusions

Expression of clathrin heavy and light chains was demonstrated in *Trypanosoma cruzi* using homologous antibodies. Both proteins localized to the flagellar pocket and Golgi complex region of different developmental forms of this parasite (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes). Our data also indicate that in *T. cruzi* clathrin-mediated endocytosis occurs at the flagellar pocket, while clathrin-independent endocytosis occurs at the cytostome/cytopharynx complex. Further studies are under way to

identify clathrin-associated proteins and the role these proteins play in the biology of this protozoan.

Methods

Reagents

Holo-transferrin, xrabbit anti-protein A antibody and bovine serum albumin were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594-conjugated rabbit anti-mouse IgGs were purchased from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA). AP-conjugated rabbit anti-mouse IgG was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). SDM79 medium, molecular weight markers (Benchmark Protein Ladder, 10–220 kDa) and the fluorescent dye Hoechst 33342 trihydrochloride were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). Alexa Fluor 488-conjugated albumin and Alexa Fluor 633-conjugated transferrin were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Parasites

Cultured epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c [31], were grown at 28°C with weekly passages in liver infusion tryptose (LIT) medium [32] supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

Epimastigotes were differentiated *in vitro* into metacyclic trypomastigotes under chemically defined conditions in TAU3AAG medium [33]. Briefly, epimastigotes from 5-day-old cultures (mid-log phase of growth) were harvested by centrifugation at 8,500 \times g for 10 min at 10°C. The parasites were then incubated for 2 h at 28°C in triatomine artificial urine (TAU) medium (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM phosphate buffer pH 6.0) at a density of 5 \times 10⁸ cells/ml. This was followed by a further incubation (1:100 cell dilution) of 72 h in TAU3AAG medium (TAU supplemented with 10 mM L-proline, 50 mM L-sodium glutamate, 2 mM L-sodium aspartate, and 10 mM D-glucose). Media in culture flasks never exceeded one centimetre in depth. Metacyclic trypomastigotes were purified from 72-h-old cultures by DEAE-51 cellulose chromatography [33].

To obtain isolated amastigotes, metacyclic trypomastigotes were used to infect Vero cells (ATCC nr. CRL-1586), which were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 5% FBS and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. After 10 days of infection, amastigotes released into the supernatant were harvested by centrifugation at 1,000 × g for 5 min.

In silico analysis

The TritypDB database was searched for *T. cruzi* genes encoding amino acid sequences for clathrin heavy chain (TcCHC) and hypothetical clathrin light chain (TcCLC) proteins. Gene IDs Tc00.1047053506167.50 and Tc00.1047053506211.240 were found for TcCHC and TcCLC respectively. The corresponding amino acid sequences of TcCHC and TcCLC were aligned with the Protein Blast algorithm (Blastp-NCBI, Bethesda, MD, USA). The pFAM software (Sanger Institute, Cambridge, UK) was used for domain analysis.

Cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* TcCHC and TcCLC

A fragment corresponding to the first 1,360 nucleotides of the TcCHC open reading frame (ORF) was amplified by PCR using the forward primer: 5'-ATGAACGGCCCTTGACGACA-3' and reverse primer: 5'-TGACAGACCCACCTTTCGGCACAAC-3'. The amplified product was cloned into the *SalI* and *NotI* sites of the pGEX-4 T1 vector (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA), resulting in the incorporation of a GST (Glutathione-S-Transferase) tag upstream of the insert.

The complete coding sequence of TcCLC was amplified using synthetic primers based on the *T. cruzi* CL Brener sequence, available from the *T. cruzi* genome database (www.genedb.org). The putative 648 bp ORF, encoding a protein of 23.3 kDa, was amplified by PCR using genomic DNA as template and forward and reverse primers (forward primer: 5'-**GGGGGATCCATGGACCCTTTTG**AAGGAAGC-3', reverse primer: 5'-**GGGGTCGACTT**ATTGAGCGGTTTCGCCCT-3') which incorporated flanking *Bam*HI and *Sal*I restriction sites (in bold) into the amplified product for subsequent insertion into the pGEX-4T1 vector.

Positive TcCHC and TcCLC clones were purified with a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and sequencing was performed at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The correct sequence was confirmed with the BLAST algorithm. The amplified fragments were inserted into the pGEX-4 T1 vector and used to transform the *Escherichia coli* TOP10 strain (Invitrogen, USA). Production of recombinant proteins was induced following addition of 0.3 mM IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) to bacterial cultures. Inclusion

bodies containing the TcCHC recombinant protein were isolated from the insoluble fraction and the recombinant protein then purified by electro-elution. TcCLC recombinant protein was purified from the soluble fraction using a GST column.

To generate transfected epimastigotes expressing TcCLC with a protein A and C amino-terminal fusion (TcCLC/AC), TcCLC cDNA was cloned into the pTcGWPTP expression vector. The pTcGWPTP vector encodes proteins A and C and is a modification of the previously described pTcGWGFP vector [34]. The TcCLC gene was used to design forward (5'-ATGGACCCTTTTGAAGGAAGC-3') and reverse (5'-TTATTGAGCGGTTTCGCCCT-3') primers flanked by sequences compatible with the Gateway (Invitrogen, USA) cloning platform to enable subsequent subcloning into the target vector. The resulting pTcGWPTP plasmid encoding the TcCLC gene fused to proteins A and C was used to transfect parasites.

Parasite transfection

T. cruzi epimastigote cultures were grown at 28°C in LIT medium supplemented with 10% FBS to a density of approximately 3 × 10⁷ cells/ml. Parasites were then harvested by centrifugation at 3,000 × g for 5 min at room temperature, washed once in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and resuspended in 0.4 ml of electroporation buffer (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0.74 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) at a density of 1 × 10⁸ cells/ml. Cells were then transferred to a cuvette (0.2 cm gap width) and 10–15 μg DNA added. The mixture was placed on ice for 10 min and then subjected to two pulses of 450 V/500 μF using the Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Following electroporation, cells were cultured in 10 ml LIT medium containing 10% FBS and incubated for 24 h at 28°C. The antibiotic G418 (500 μg/ml) was then added to the culture medium and stable, resistant cells were obtained approximately 20 days after transfection. Stably transfected cells were maintained in cultures containing 250 μg/ml G418.

Antibody (Ab) production

Polyclonal antibodies raised against recombinant TcCHC and TcCLC proteins were produced in albino Balb/c mice. Approximately 50 μg of purified GST-tagged protein was mixed at a ratio of 1:1 with complete Freund's adjuvant and inoculated intra-peritoneally. After 15 days the animals received three consecutive boosts with an additional 20 μg of the antigen and 77 μl of Alu-Gel adjuvant (Serva, Heidelberg, Germany), at 2-week intervals. Antiserum was obtained 5 days after the last booster injection. A monoclonal antibody against TcCHC was produced from spleen cells isolated from a responsive mouse, as described previously [35].

All animals were handled in strict accordance with the recommendations made in the Guide for Animal Use of the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Brazil). The protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation (CEUA/FIOCRUZ), number P-47/12-3.

Western blot analysis

For immunoblotting, total protein extracts of *T. cruzi* epimastigotes, metacyclic trypomastigotes and isolated amastigotes, as well as whole extracts of Vero cells, were obtained by cell lysis by resuspending PBS-washed cells (1×10^6 cells/ μ l) in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer. Proteins (15 μ g/lane) were fractionated by SDS-PAGE in gradient polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) according to standard protocols [36]. Following protein transfer, the membranes were blocked with 5% non-fat milk/0.05% Tween-20 in PBS and incubated for 1 h with blocking buffer containing either the antiserum raised against the TcCLC protein (1:200 dilution) or the monoclonal antibody against TcCHC. A polyclonal anti-TcActin antibody [37] was used as a loading control. After 3 washes with 0.05% Tween-20/PBS, the membranes were incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:10,000 dilution), washed three times with 0.05% Tween-20/PBS and bands then visualized using BCIP-NBT (Promega, USA) solution.

Immunofluorescence assays

Parasites were washed and resuspended at 1×10^7 cells/ml in PBS. The cells were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde at room temperature, washed twice in PBS and then adhered to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips following 20 min incubation at room temperature. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min, washed with PBS, blocked for 1 h with 1.5% bovine serum albumin in PBS and then incubated for 1 h with antiserum (1:150) for TcCLC or TcCHC, or with monoclonal Ab (undiluted) for TcCHC. After washing, samples were incubated with Alexa Fluor 488 or 594-conjugated rabbit anti-mouse IgG at a 1:600 dilution. Nuclear and kinetoplast DNA were stained with Hoechst 33342. After extensive washes, the coverslips were mounted onto glass microscope slides with mounting medium containing N-propylgallate as an anti-fade agent. The samples were examined using a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) at the Microscopy Facility of the Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR. Acquired images were processed to improve contrast using Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, USA).

For colocalization of endogenous TcCLC and TcCHC with exogenously expressed TcCLC/AC in transfected *T. cruzi* epimastigotes, 3-day-old cells were washed twice with PBS, fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde and incubated for 1 h at 37°C with either TcCLC antiserum (1:150), protein A antibody (1:40,000) or TcCHC monoclonal antibody. After three washes in PBS, the samples were incubated under the same conditions with a secondary Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse antibody (1:600) or an Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:600). A negative control was performed by incubating protein A antibody with wild-type epimastigotes (data not shown). Samples were further processed and imaged as described above.

To assess colocalization of endogenous TcCLC with the Golgi complex we used TcRab7-GFP transfected *T. cruzi* epimastigotes. It has been shown that TcRab7 is a Golgi marker for *T. cruzi*. A plasmid vector encoding TcRab7 fused to GFP (kindly provided by Michel Batista, Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-Paraná) was used to obtain TcRab7-GFP transfected *T. cruzi* epimastigotes, as previously described [34]. TcRab7-GFP transfected cells were fixed and incubated with antiserum against TcCLC as described above.

Endocytosis assay

T. cruzi epimastigotes were washed twice with PBS and then subjected to a nutritional stress in PBS for 15 min at 16°C. Epimastigotes were then incubated for 30 min at 16°C with Alexa Fluor 633-conjugated transferrin or Alexa Fluor 488-conjugated albumin (1:20 dilution for both) to allow uptake of the labelled proteins. To assess the colocalization of transferrin with TcCHC or albumin with TcCLC, parasites were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized for 5 min with 0.5% Triton in PBS and incubated with either TcCHC monoclonal antibody or protein A antibody (1:40,000). The samples were washed three times with PBS and then incubated with rabbit anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 (1:600) or Alexa Fluor 594. The samples were washed three times with PBS, incubated for 5 min with Hoechst 33342 and examined using a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope.

Transmission electron microscopy

Five-day-old *T. cruzi* epimastigote cultures were collected by centrifugation and fixed for 1 h with 0.1% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). The cells were then washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), dehydrated in a series of graded ethanol washes and infiltrated overnight with a 1:1 dilution of ethanol 100%: Lowicryl K4M Monostep resin (EMS, Washington, PA, USA). After embedding for 6 h in pure resin, the samples were polymerized for 48 h at -20°C

under UV light. Ultra-thin sections were collected on nickel grids, incubated for 30 min with 50 mM ammonium chloride in PBS (pH 7.2) and then incubated for 1 h with TcCLC antiserum diluted at 1:50 in PBS/1.5% albumin/0.01% Tween 20 (washing buffer). After washing, the grids were incubated for 1 h with a rabbit anti-mouse antibody conjugated to 10-nm gold particles (diluted 1:50 in washing buffer). Additional washes in buffer and distilled water were performed before the grids were stained for 30 min with 5% uranyl acetate and for 2 min with lead citrate. Samples were observed in a JEOL 1200EXII transmission electron microscope at the Electron Microscopy Center, Federal University of Paraná, Curitiba-PR.

Additional files

Additional file 1: Immunofluorescence assay to demonstrate that monoclonal antibodies do not bind protein A in transfected *T. cruzi* epimastigotes expressing TcCLC fused with protein A/C. **A)** As a control, *T. cruzi* transfected epimastigotes were first incubated with Protein A antibody. Positive immunolabeling was observed at the cell anterior, in close proximity to the kinetoplast. **B)** Transfected epimastigotes incubated with a monoclonal antibody against TcCruzipain [38], which specifically recognizes the *T. cruzi* reservosomes at the cell posterior (arrow). **C)** Transfected epimastigotes incubated with a monoclonal antibody against TcNup [39], which specifically recognizes a protein associated to the nuclear membrane of *T. cruzi*. As expected, monoclonal antibodies in B and C were specific for their target proteins, but did not recognize CLC-A/C at the cell anterior. These results show that monoclonal antibodies do not cross react with the protein A/C tag in our transfected epimastigotes. Scale bar = 5 μ m.

Additional file 2: *T. cruzi* epimastigotes incubated for 30 min at 16°C with Alexa Fluor 488-conjugated albumin and subsequently with anti TcCruzipain monoclonal antibody (detected with Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody). Albumin accumulates at the cell anterior, perpendicular to the kinetoplast (k), in a location that corresponds to the flagellar pocket region. Furthermore, albumin also localizes to the cell posterior, behind the nucleus (n). However, at 16°C albumin does not colocalize with TcCruzipain (a reservosomal marker). Therefore, this posterior labeling represents endocytic vesicles en route to reservosomes. Scale bar = 5 μ m.

Additional file 3: Ultrastructural immunolocalization of clathrin light chain in *T. cruzi* epimastigote by transmission electron microscopy. Gold labeling (arrow) is found associated with the flagellar pocket membrane. F: flagellum; K: kinetoplast. Scale bar = 100 nm.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LCK performed the TcCHC experiments, acquired and analyzed the fluorescence and transmission electron microscopy data and drafted the manuscript. YCAF performed the TcCLC experiments. CMB carried out the bioinformatic analysis and helped with the endocytosis assays. IE helped with monoclonal antibody production. SPF participated in study design and helped with cloning and expression of *Trypanosoma cruzi* TcCHC and TcCLC. MJS conceived the study, participated in its design and coordination and edited the final version of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq and Fiocruz. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS)-FIOCRUZ for use of its facilities (RPT07C-Microscopy Facility at Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR, Curitiba-PR, Brazil) and the Centro de Microscopia Eletrônica

at Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil for use of the JEOL 1200EXII transmission electron microscope.

Author details

¹Laboratory of Cell Biology, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader 3775, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil. ²Laboratory of Molecular Biology of Trypanosomatids, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-PR, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil. ³Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil.

Received: 10 April 2014 Accepted: 12 June 2014

Published: 19 June 2014

References

1. Brodsky FM: Diversity of clathrin function: New tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012, **28**:17.1–17.28.
2. Pearse BMF: Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 1975, **97**:93–98.
3. Wakeham DE, Abi-Rached L, Towler MC, Wilbur JD, Parham P, Brodsky FM: Clathrin heavy and light chain isoforms originated by independent mechanisms of gene duplication during chordate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:7209–7214.
4. Kirchhausen T: Clathrin. *Annu Rev Biochem* 2000, **69**:699–727.
5. Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J: Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:409–414.
6. Young A: Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* 2007, **18**:448–458.
7. Otegui M, Reyes FC: Endosomes in plants. *Nat Educ* 2010, **3**:23.
8. De Souza W, Sant'anna C, Cunha-e-Silva NL: Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Prog Histochem Cytochem* 2009, **44**:67–124.
9. Brooker BE: The fine structure of *Crithidia fasciculata* with special reference to the organelles involved in the ingestion and digestion of protein. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1971, **116**:532–563.
10. Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Carrington M, Field MC: The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol* 2002, **18**:491–496.
11. Allen CV, Goulding D, Field MC: Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 2003, **22**:4991–5002.
12. Adung'a VO, Gadelha C, Field MC: Proteomic analysis of clathrin interactions in trypanosomes reveals dynamic evolution of endocytosis. *Traffic* 2013, **14**:440–457.
13. Morgan GW, Allen CL, Jeffries TR, Hollinshead M, Field MC: Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 2001, **114**:2605–2615.
14. Shapiro SZ, Webster P: Coated vesicles from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization. *J Protozool* 1989, **36**:344–349.
15. Soares MJ, De Souza W: Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1991, **77**:461–468.
16. Corrêa JR, Atella GC, Menna-Barreto RS, Soares MJ: Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. *J Euk Microbiol* 2007, **54**:297–302.
17. Wilbur JD, Hwang PK, Ybe JA, Lane M, Sellers BD, Jacobson MP, Fletterick RJ, Brodsky FM: Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell* 2010, **18**:841–848.
18. Araripe JR, Cunha-e-Silva NL, Leal ST, De Souza W, Rondinelli E: *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **321**:397–402.
19. Ybe JA, Perez-Miller S, Niu Q, Coates DA, Drazer MW, Clegg ME: Light chain C-terminal region reinforces the stability of clathrin heavy chain trimers. *Traffic* 2007, **8**:1101–1110.
20. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, et al: The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005, **309**:409–415.

21. Miele AE, Watson PJ, Evans PR, Traub LM, Owen DJ: **Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**:242–248.
22. Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DJ, Lanczycki CJ, Lu F, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH: **CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:384–352.
23. Nathke IS, Heuser J, Lupas A, Stock J, Turck CW, Brodsky FM: **Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub.** *Cell* 1992, **68**:899–910.
24. Kirchhausen T, Harrison SC, Chow EP, Mattaliano RJ, Ramachandran KL, Smart J, Brosius J: **Clathrin heavy chain: molecular cloning and complete primary structure.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**:8805–8809.
25. Takegawa K, Iwaki T, Fujita Y, Morita T, Hosomi A, Tanaka N: **Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Cell Struct Funct* 2003, **5**:399–417.
26. Corrêa AF, Andrade LR, Soares MJ: **Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms.** *Parasitol Res* 2002, **88**:875–880.
27. Field MC, Carrington M: **The trypanosome flagellar pocket.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:775–786.
28. Field MC, Natesan SK, Gabernet-Castello C, Koumandou VL: **Intracellular trafficking in the trypanosomatids.** *Traffic* 2007, **8**:629–639.
29. Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N: ***Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** *Eur J Cell Biol* 2000, **79**:858–869.
30. Corrêa JR, Atella GC, Batista MM, Soares MJ: **Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis.** *Exp Parasitol* 2008, **119**:58–66.
31. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MN, Goldenberg S: **Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988, **83**:123–133.
32. Camargo EP: **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** *Rev Inst Med Trop* 1964, **12**:93–100.
33. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S: ***In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** *Mol Biochem Parasitol* 1985, **16**:315–327.
34. Batista M, Marchini FK, Celedon PA, Fragoso SP, Probst CM, Preti H, Ozaki LS, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA: **A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*.** *BMC Microbiol* 2010, **13**:259.
35. Mazzarotto GA, Raboni SM, Stella V, Carstensen S, de Noronha L, Levis S, Zanluca C, Zanetti CR, Bordignon J, Santos CN D d: **Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*.** *J Virol Methods* 2009, **162**:96–100.
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes.** In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume Volume 3. 2nd edition. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury; 1989. 18.60-18.74.
37. Souza LC, Pinho RE, Lima CV, Fragoso SP, Soares MJ: **Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea).** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, **108**:631–636.
38. Batista CM, Medeiros LC, Eger I, Soares MJ: **mAB CZP-315.D9: an antirecombinant cruzipain monoclonal antibody that specifically labels the reservosomes of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** *Biomed Res Int* 2014, article ID 714749, 9 pages.
39. Picchi GF, Ferreira AM, Souza FS, Lourenço EE, Arauco PR, Lorusso A, Bordignon J, Krieger MA, Goldenberg S, Fragoso SP: ***Trypanosoma cruzi*: identification of DNA targets of the nuclear periphery coiled-coil protein TcNUP-1.** *Exp Parasitol* 2011, **127**:147–152.

doi:10.1186/1471-2121-15-23

Cite this article as: Kalb et al.: Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Cell Biology* 2014 **15**:23.

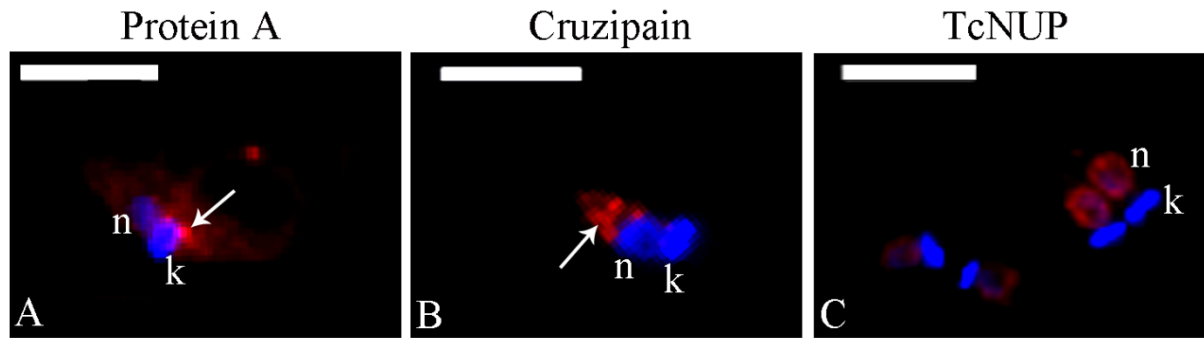
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

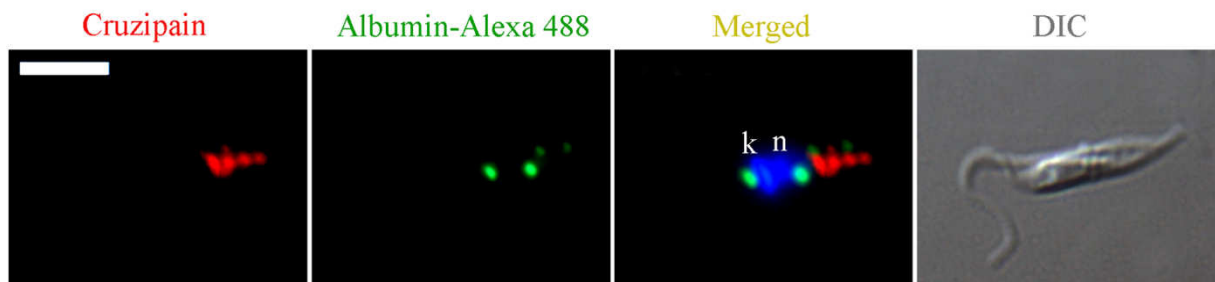


Additional file 1:



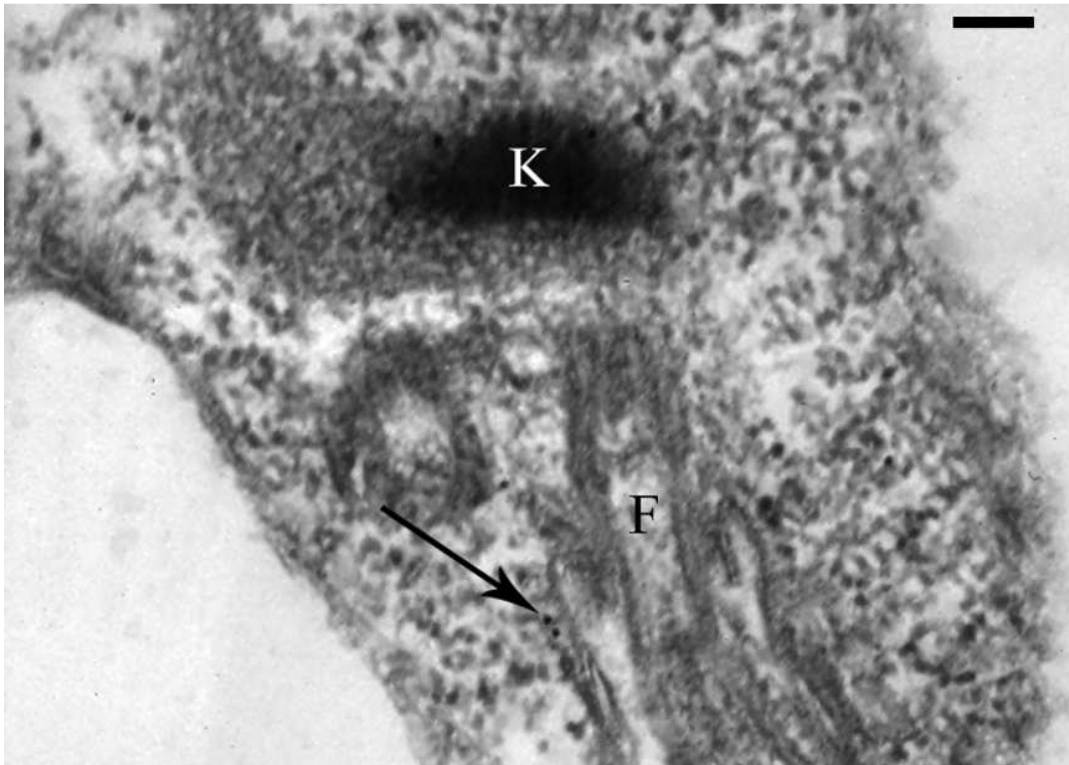
Immunofluorescence assay to demonstrate that monoclonal antibodies do not bind protein A in transfected *T. cruzi* epimastigotes expressing TcCLC fused with protein A/C. **A)** As a control, *T. cruzi* transfected epimastigotes were first incubated with Protein A antibody. Positive immunolabeling was observed at the cell anterior, in close proximity to the kinetoplast. **B)** Transfected epimastigotes incubated with a monoclonal antibody against TcCruzipain [38], which specifically recognizes the *T. cruzi* reservosomes at the cell posterior (arrow). **C)** Transfected epimastigotes incubated with a monoclonal antibody against TcNup [39], which specifically recognizes a protein associated to the nuclear membrane of *T. cruzi*. As expected, monoclonal antibodies in B and C were specific for their target proteins, but did not recognize CLC-A/C at the cell anterior. These results show that monoclonal antibodies do not cross react with the protein A/C tag in our transfected epimastigotes. Scale bar = 5 μm.

Additional file 2:



***T. cruzi* epimastigotes incubated for 30 min at 16°C with Alexa Fluor 488-conjugated albumin and subsequently with anti TcCruzipain monoclonal antibody (detected with Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody).** Albumin accumulates at the cell anterior, perpendicular to the kinetoplast (k), in a location that corresponds to the flagellar pocket region. Furthermore, albumin also localizes to the cell posterior, behind the nucleus (n). However, at 16°C albumin does not colocalize with TcCruzipain (a reservosomal marker). Therefore, this posterior labeling represents endocytic vesicles en route to reservosomes. Scale bar = 5 μm

Additional file 3:



Ultrastructural immunolocalization of clathrin light chain in *T. cruzi* epimastigote by transmission electron microscopy. Gold labeling (arrow) is found associated with the flagellar pocket membrane. F: flagellum; K: kinetoplast. Scale bar = 100 nm.

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADA À CLATRINA EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Esta parte da tese foi realizada em colaboração com Dr. Mark Field, no Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge, Reino Unido, com bolsa sanduíche obtida no âmbito do Convênio Ciências sem Fronteiras/Fiocruz, no período de Agosto a Dezembro de 2013. Um manuscrito está em fase final de preparação para submissão a uma revista de circulação internacional.

RESUMO

Os protozoários tripanosomatídeos são organismos muito divergentes, proporcionando a oportunidade de explorar aspectos únicos de biologia de células eucarióticas. Sendo a endocitose um processo essencial para a sobrevivência das células, diferenças entre moléculas e organelas envolvidas na via endocítica do parasita e de células do hospedeiro vertebrado surgem como excelente fonte de alvos quimioterápicos. A partir de proteínas bem conservadas é possível identificar proteínas menos conservadas após isolamento de complexos proteicos e correspondente análise das proteínas do complexo. Assim, nesta tese utilizamos esta abordagem para identificar proteínas associadas a clatrina (TcCHC: cadeia pesada de clatrina; TcCLC: cadeia leve de clatrina) e epsina (TcEpsina), as quais são proteínas conservadas que compõem o sistema de tráfego de vesículas mediado por clatrina de *T. cruzi*. Análise por microscopia de fluorescência revelou um acúmulo de TcEpsina, TcCHC e TcCLC na porção anterior das células, onde a bolsa flagelar e complexo de Golgi estão localizados. Para uma análise proteômica dos complexos proteicos associados à clatrina e epsina, a TcCLC foi fusionada às proteínas A e C e a epsina foi fusionada a GFP e ambas foram submetidas à criomoagem seguida da imunoprecipitação dos complexos a elas associados. Esta metodologia permitiu identificar proteínas associadas por espectrometria de massas, tais como os Complexos Adaptadores AP-1 e AP-4, SNAREs, Rab4, Rab11, tepsina, AP180, Sec1, Auxilina e Scamp, além de proteínas hipotéticas. Nossos dados permitem propor uma hipótese sobre o tráfego de vesículas em *T. cruzi* e a maturação de reservossomos, os quais acumulam funções de endossomo inicial, endossomo tardio e lisossomo.

3. METODOLOGIA REFERENTE AO CAPÍTULO 2

3.1. CULTIVO DETRIPANOSOMATÍDEOS

Formas epimastigotas cepa DM28c foram cultivadas a 28°C em meio LIT (Camargo, 1964) com passagens semanais e inóculo de $1,0 \times 10^6$ células/ml (Contreras et al., 1985; Contreras et al., 1988). Para os experimentos, formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação a 3000g por 5 min no terceiro dia de cultivo (correspondente à fase logarítmica decrescimento, com base em curva de crescimento realizada nas mesmas condições).

As formas sanguíneas de *T. brucei* cepa 417 foram mantidas em meio HMI-9 (suplementado com soro fetal bovino 10% e β -mercaptoetanol 14 μ L/L). As passagens foram feitas quando a cultura atingisse uma densidade máxima de $2,0 \times 10^6$ células.

3.2. OBTENÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* EXPRESSANDO TcCLC/AC

O gene (TcCLB.506211.240) foi clonado no vetor de expressão pTcGWPTP, um plasmídeo modificado a partir daquele descrito por Batista e colaboradores (2010). A expressão neste vetor leva a produção de uma proteína fusionada a uma etiqueta composta das proteínas A e C na sua porção amino-terminal. Para tanto, o gene *TcCLC* foi amplificado por PCR usando os iniciadores direto (5'-**GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGACCCTTTTGAAGGAAGC-3'**) e reverso (5'-**GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTGAGCGGTTTCGCCCT-3'**) flanqueados por sequências (em negrito) que permitem a inserção na plataforma Gateway de clonagem (Invitrogen, USA). Para as reações foram utilizadas Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), DNA molde (DNA genômico de *T. cruzi*) e oligonucleotídeos iniciadores segundo o protocolo do fabricante da enzima. A entrada da sequência na plataforma Gateway é feita inicialmente com o vetor pDONR™221 (Invitrogen™) mediante reação de Recombinação BP. A reação de recombinação com BP foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase II Enzyme mix*, Invitrogen™). Para isso foram utilizados 30 ng do produto de PCR contendo o sítio attB e 150 ng do plasmídeo pDONR™221, 2 μ l da enzima BP Clonase II em um volume final de 10 μ l em TE. As reações foram incubadas a 25°C por 16 horas. Após essa etapa, foi adicionado 2 μ g de proteinase K e a reação foi incubada por 10 min a 37°C. Bactérias *E. coli* cálcio competentes de linhagem DH5 α foram transformadas com os

plasmídeos recombinados, mediante choque térmico, a fim de propagá-los. Os plasmídeos clonados foram purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.

Após a entrada do gene de interesse em pDONR™221, foi feita recombinação LR para entrada no vetor de destino pTcGWPTP. A reação foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway LR Clonase II Enzyme mix*, Invitrogen™). Para o processo de recombinação foi usado 25 ng do clone de entrada contendo os sítios attL e 30 ng do vetor de destinação, 2 µl da enzima LR Clonase II e o volume final de 10 µl TE. As reações foram incubadas a 25°C por 16h e inativadas com 4 µg de proteinase K por 10 min a 37°C. A recombinação LR foi utilizada para transformar células cálcio-competentes de *E. coli* da linhagem DH5α mediante choque térmico e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante. Para confirmar a clonagem dos plasmídeos recombinantes, as amostras foram enviadas para *Macrogen* Korea (Coreia do Sul, informações disponíveis em <http://www.macrogen.com/>) para sequenciamento. Foi utilizado o sequenciamento do tipo *single primer extension* e o protocolo estabelecido pela empresa.

Plasmídeos resultantes contendo o gene para TcCLC fusionado com proteínas A e C foram usados para transfectar formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após selecionada a cultura resistente à G418, a expressão de TcCLC/AC foi confirmada através de ensaio de imunofluorescência, mostrado anteriormente em Kalb et al., 2014.

3.3. OBTENÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* EXPRESSANDO TcEPSINA/GFP

O gene *TcEpsina* (TcCLB.506925.70) que codifica uma epsinaR foi clonado no vetor pTcGWGFP (Batista et al., 2010), o qual proporciona fusão da proteína com GFP e contém resistência à neomicina. Este gene foi usado como molde para produzir iniciadores direto (**GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCTCATGAGTATTCCAACCTCCATTCA**) e reverso (**GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCCTCAGACTGTCCGCGCT**), flanqueados por sequências que permitem a inserção na plataforma Gateway de clonagem (Invitrogen, USA), conforme descrita no item anterior. O plasmídeo resultante contendo o gene para TcEpsina fusionado com GFP foi purificado através do sistema “QIAprep spin miniprep kit” conforme protocolo recomendado pelo fabricante e usado para transfectar formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após selecionada a cultura resistente à G418, os parasitas foram observados

ao microscópio de fluorescência para confirmar a localização da proteína, bem como co-localização com TcCHC, usando anticorpos monoclonais para cadeia pesada de clatrina (Kalb et al., 2014).

3.4. OBTENÇÃO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE *T. BRUCEI* EXPRESSANDO TbCAP30/HA

O gene correspondente à Tb927.8.7230 (TbCAP30 de 30 kDa) foi usado como molde para o desenho de primers direto (5`GTTGACGTTGACCGTGTTTACGTACCA GGGACGGTGGAGGCCGCTAAGGCGCTCGGCACTTCTGAGAAGCAGGGGTACA ATGCGGTTGTTGGTACCGGGCCCCCCTCGAG3`) e reverso (5'TGCCCATTTCAA CCGCTTTCCTGCTTGCCCTTCCCTTTCCCTTTCTTTCTTTATATATATATATAT ATATCCCCAACCTTCCTCGAAGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGAT3`) conforme metodologia descrita por Oberholzer e colaboradores (2006). Esta metodologia permite a inserção de uma etiqueta (no caso HA) na porção C-terminal da proteína através de recombinação homóloga (*in situ tagging*). Por meio de PCR *one-step* a região 3' UTR do gene em questão foi substituída por uma região intergênica heteróloga, contendo 3 x HA e o gene que confere resistência à puromicina, usando o vetor pMOTag2H (gentilmente cedido por George Cross – Addgene plasmid #26296). Esta PCR foi precipitada com etanol e transfectada em formas sanguíneas de *T. brucei* cepa 417 usando o Kit comercial Amaxa Nucleofactor II.

3.5. TRANSFEÇÃO

3.5.1. Em *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% SFB a 28°C até densidade celular de 3×10^7 células/ml. Os parasitas foram coletados por centrifugação a 3000g por 5 min a temperatura ambiente. O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspenso em solução de eletroporação (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0.74 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) a uma densidade de 1×10^8 células/ml. A suspensão de células (0,4ml) foi transferida para cubeta de eletroporação estéril (0,2 cm de gap) (BioAgency, USA) pré-resfriadas e 10-15 µg de DNA foi adicionado em seguida. Uma cubeta contendo igual quantidade de suspensão celular e sem adição de DNA foi usada como controle. Após 10 minutos no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a dois pulsos de 450 Volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Após a

eletroporação, as células foram transferidas para garrafas de cultura contendo 10 ml de meio LIT (suplementado com 10.000 U penicilina e estreptomicina a 10 µg/ml). As culturas foram então incubadas a 28°C. Após por 24 horas, o antibiótico G418 (500 µg/ml) foi adicionado ao meio de cultivo. Para a seleção dos parasitas transfectantes, as culturas foram mantidas, por passagens semanais, até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

3.5.1. Em formas sanguíneas de *T.brucei*

Para transfecção $3,5 \times 10^7$ células, com densidade entre $1,0 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$, foram centrifugados a 800g por 10 min à 4°C e todo o líquido foi removido. O pellet foi ressuspenso em 100µL de tampão Amaxa (Lonza; Basel, Suíça) e foi adicionado 30 µg de DNA (PCR purificada). Todo o conteúdo foi transferido para uma cubeta e imediatamente transfectado usando o equipamento Amaxa Nucleofector II (Lonza) seguindo as recomendações do fabricante. O conteúdo transfectado foi transferido para uma garrafa de cultura contendo 35 ml de meio HMI-9 suplementado com 14µL/L de β-mercaptoetanol. Após 6-8 horas as células foram diluídas em 3 placas de 24 poços com meio HMI-9 suplementado com 14µL/L de β-mercaptoetanol e 1µg/ml de puromicina. As células foram observadas diariamente até obtenção da cultura resistente, em cerca de 10-12 dias.

3.6. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1. Ensaios de imunofluorescência em *T.cruzi*

Para a colocalização por imunofluorescência de TcEpsina/GFP e TcCHC em formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando TcEpsina/GFP, células em fase exponencial de crescimento (3 dias) foram lavadas 2x em PBS, fixadas por 30 min em paraformaldeído 4% e aderidas por 20 min a lamínulas recobertas com poli-L-lisina a 0,1%. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% diluído em PBS por 5 min a temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS e bloqueadas para reações inespecíficas por 1 h em solução de 1,5% de albumina bovina em PBS. Em seguida as amostras foram incubadas por 1 hora com antisoro anti-GFP de coelho (Sigma) (1:100) e anticorpo monoclonal para TcCHC. Após 3 lavagens em PBS as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 488 (1:600) e anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 594 (1:600) por 45 minutos. O DNA do núcleo e cinetoplasto foi corado por Hoechst 33342. As lâminas foram lavadas em PBS e montadas com Prolong (Life Technologies). O

material foi observado no microscópio Nikon E600(Nikon Instruments, Melville, N.Y. USA) do Centro de Microscopia do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR. As imagens adquiridas foram editadas para melhor contraste usando Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, USA).

3.6.2. Ensaios de imunofluorescência em *T. brucei*

As formas sanguíneas de *T. brucei* foram coletadas e lavadas com vPBS (PBS suplementado com 10 mM glucose e 46 mM sucrose, pH 7.6) e subsequentemente fixadas em paraformaldeído 4% para então serem aderidas a lâminas revestidas de poli-lisina (VWR). Para a coloração e permeabilização de estruturas internas, as células foram incubadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS, lavadas com PBS e bloqueadas com 20% de soro fetal bovino em PBS. Para a localização, as células fixadas foram incubadas com um anti-soro policlonal de coelho anti-TbEpsina (Gabernet-Castello et al, 2009) conjugado com AlexaFluor 488 e um anticorpo de rato contra HA conjugado a AlexaFluor 594. As lâminas foram secas e montadas com uma gota de Vectashield suplementado com 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Vector Laboratories) para corar o DNA. A visualização foi feita em um microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse E600 com uma câmera CCD Hammamatsu ORCA no Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge, Reino Unido. As imagens foram capturadas usando o software Metamorph e o processamento final da imagem (ajuste de brilho e contraste) foi feita usando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

3.6.3. Ensaios de Western Blot

As proteínas de *T. cruzi* ou o extrato proteico de *T. brucei* foram separadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Life Technologies) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) em Tampão de transferência para *Western blot* (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%; Leite em pó desnatado 5%) e os anticorpos primários, incubados por 1 hora, foram diluídos no mesmo tampão nas seguintes concentrações: anti-HA (produzido em rato, 1:1000), anti-TbEpsina (1:250, produzido em coelho – Gabernet-Castello et al., 2009) e anticorpo monoclonal anti-TcCHC (sem diluição, produzido em camundongo – Kalb et al., 2014). A membrana foi então lavada três vezes com PBS contendo Tween 20 0,1%, seguido de incubação

com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho, rato ou camundongo conjugado à peroxidase (Amersham Biosciences) na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37°C.

A detecção de proteínas foi feita por quimioluminescência: 1 ml de luminol e 3 µl H₂O₂ a 30% foram adicionados à membrana por 1 - 2 min. O sinal quimioluminescente foi detectado com a auxílio do sistema de detecção G: BOX Chemi XX6.

3.7. LISE CELULAR POR CRIOMOAGEM

Para identificar as proteínas associados à clatrina em revestimento de vesículas, formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas expressando TcCLC/AC, formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas expressando TcEpsina/GFP e formas epimastigotas selvagens de *T. cruzi* foram submetidas a criomoagem seguida de imunoprecipitação dos seus complexos associados, segundo protocolo definido por Fielde colaboradores (Field et al., 2012).

Para isso, cerca de 5×10^{10} células foram coletadas por centrifugação (3000g/10 minutos) e lavadas em PBS contendo inibidores de proteases (cocktail de proteases (Roche) + PMSF + E64). O material foi centrifugado novamente (3000g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi removido. Com auxílio de micropipeta de 1ml, o *pellet* de células foi aspirado e gotejado em tubo cônico contendo nitrogênio líquido. As gotas de células congeladas imediatamente formam bolinhas (“*popcorns*”). Após o congelamento, o nitrogênio foi removido por evaporação e as amostras foram congeladas a -80°C por período indeterminado.

Os *popcorns* foram moídos em moído de bolas (Planetary Ball Mill PM100, Retsch, Haan, Alemanha) em temperatura criogênica. Para isso, os componentes do moído foram resfriados em nitrogênio líquido e as amostras congeladas foram transferidas para o aparelho. As amostras foram moídas a 300 rpm/3min. Esse procedimento foi repetido cerca de 10 vezes para obtenção de um pó de células. Este pó foi transferido para um tubo cônico pré-resfriado e armazenado a -80°C.

3.8. IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcCLC/AC

Após a moagem, 50 µg do pó de células foram ressuspensos em 1 ml de tampão (descrito abaixo conforme o caso, num total de 8 tampões) suplementado com inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche), sonicada uma vez em potência 1 por 2 segundos e a mistura foi centrifugada a 20.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo, foram

adicionados 50µl da esfera magnética (Dynabeads M280 acopladas a anticorpo de ovelha anti-IgG de coelho (Life Technologies, USA), a fim de permitir a ligação IgG – Proteína A de TcCLC/AC), e a suspensão foi incubada sob agitação constante a 4°C durante duas horas. Após incubação as esferas magnéticas foram lavadas no mesmo tampão e incubadas a 95°C com TA4x (Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%) e DTT para então se verificar o padrão eletroforético em matriz de acrilamida 4-12% (NuPAGE®) em coloração de Comassie (kit Staining with SimplyBlue™ SafeStain (Life technologies)).

Todas as análises provenientes de imunoprecipitação (item 3.7 – 3.9), foi utilizado um sistema comercial de SDS-PAGE e as amostras foram preparadas conforme descrição do fabricante. Assim, foram diluídas em tampão de amostra NuPAGE® LDS Sample Buffer (Life technologies), com adição do agente redutor NuPAGE® Sample Reducing Agent (Life technologies) e utilização de geis de acrilamida de concentração gradiente NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Life technologies) submerso em tampão de corrida NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Life technologies).

Antes das imunoprecipitações, foi realizado um teste para titulação das esferas magnéticas. Foram testados 5 µl, 10 µl e 20 µl de esferas magnéticas, cada um com 50 µg de células em 1 ml de tampão (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂ 10 µM CaCl₂), seguindo-se lavagem e eluição.

3.9. IMUNOPRECIPITAÇÃO TcEPSINA/GFP

Para TcEpsina, utilizamos Dynabeads (microesferas) M270 Epoxy acopladas a anti-GFP produzido em lhama. A fim de acoplar o anticorpo de lhama anti-GFP nas esferas magnéticas, cerca de 30mg de microesferas foram adicionado a 200 µl de tampão fosfato 100 mM pH 7,4 e 300 uL de anti-GFP. Sobre as microesferas foram adicionados, gota a gota, 250 ul de sulfato de amônia 1,5M, com incubação a 30°C por 48h sob agitação. Em seguida, o tubo contendo as microesferas foi colocado em estante magnética e o sobrenadante foi removido. Foram feitas as seguintes lavagens sequencias usando: 1 mL de tampão fosfato 100 mM, 1 ml de glicina pH2,5 100 mM, 1 mL de 10 mM Tris pH8.8, Trietilamina 100 mM e 1 mL PBS, 1 mL PBS + 0.5% Triton x 100, por 15 minutos sob agitação, ressuspensas em 150uL PBS e armazenadas a 4°C.

Para a criomoagem de TcEpsina, 50 µg do pó de células foram ressuspensos em 1 ml de tampão (descrito nas figuras conforme o caso) suplementado com inibidor

de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche), sonicada uma vez em potência 1 por 2 segundos e a mistura foi centrifugada a 20.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo, foram adicionados 5 µl da esfera magnética (Dynabeads M270 Epoxy acopladas a anti-GFP produzido em lhama), e a suspensão foi incubada sob agitação constante a 4°C durante duas horas. Após a incubação as microesferas foram lavadas no mesmo tampão e incubadas a 95°C com TA4x e DTT a fim de verificar o padrão eletroforético em matriz de acrilamida 4-12% em coloração de Comassie. Foram usados 21 tampões diferentes e cada um deles será mencionado junto à sua respectiva figura.

3.10. IMUNOPRECIPITAÇÃO PARA ANÁLISE POR ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS

Para a identificação das proteínas associadas à clatrina (TcCAPs) e epsina foram utilizados 350 µg de pó de células (*T. cruzi* CLC/AC, *T. cruzi* Epsina-GFP e forma selvagem) e procedeu-se como nos testes anteriores até a etapa de lavagem. Para a eluição foram adicionados 50 µl de tampão de eluição (20 mM Tris pH 8 + 2% SDS), com incubação por 30 min a 72°C. Do sobrenadante, 5 µl foram usados para coloração de Comassie e 5 µl para análise de western blot. Ao restante foram adicionados 427 µl de etanol absoluto, seguido da incubação por 16 horas a -20°C e posterior centrifugação a 20.000g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi quase totalmente descartado, deixando no tubo cerca de 20 µl para serem enviados para análise em espectrômetro de massas.

O processamento das amostras e a análise de espectrometria de massas foram realizados pela plataforma de proteômica da Universidade de Dundee (Reino Unido). As amostras foram submetidas a corrida eletroforética de dois centímetros em um gel comercial NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel 10% (Life Technologies). Amostras do gel foram excisadas e lavadas nas seguintes soluções: água, 200 µl de acetonitrila, 200 µl de solução de bicarbonato de amônio a 100 mM, 200 µl de solução contendo 50% acetonitrila e 50% bicarbonato de amônio 100 mM, e 100 µl de acetonitrila 100%. O gel foi seco em SpeedVac (Thermo Scientific) e em seguida foi realizada redução dos peptídeos com 50 µl de DTT a 10 mM (diluído em bicarbonato de amônia a 20 mM) a 56°C durante 1 hora, seguido de iodoacetamida a 50 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos. O gel foi lavado com 200 µl de bicarbonato de amônia a 100 mM, 200 µl de solução contendo 50% acetonitrila e 50% bicarbonato de amônio 100 mM e 100 µl de Acetonitrila 100%. Em seguida, o gel foi seco em SpeedVac (Thermo

Scientific) e a digestão em gel foi realizada com tripsina a 12,5 µg/ml (Modified Sequencing Grade, Roche) durante 18 horas a 30°C sob agitação. Em seguida foi adicionado acetonitrila 100%, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante contendo os peptídeos tripticos foi coletado. Foram acrescentados 50 µl de ácido fórmico a 5%, novamente centrifugou-se e o material foi transferido para frascos de HPLC e analisado previamente no sistema Ultimate 3000 RS LCnano system (Thermo Scientific) acoplado a LTQ Orbitrap XL (Thermo). Assim, os peptídeos tripticos foram inicialmente capturados com o sistema Acclaim PepMap 100 (C18, 100 µM x 2 cm) e fracionados em uma coluna C18 Easy-Spray PepMap RSLC (75 µM x 50 cm) (Thermo Scientific) no cromatógrafo e transferidos para o espectrômetro de massas via fonte Easy-Spray a 50°C e voltagem de 1,3kV.

Após essa primeira verificação da qualidade da amostra, as análises de espectrometria foram realizadas com o sistema Ultimate 3000 RS LCnano system (Thermo Scientific) acoplado a um LTQ OrbiTrap Velos Pro (Thermo Scientific). Esse equipamento utilizou como parâmetros:

FTMS Full AGC Target: 1000000

Ion Trap MSn AGC Target: 5000,00

Fill Time FTMS (ms): 500

Fill Time ITMS (ms): 100

Lock Mass: 445,120024

FT-MS:

Resolution: 60000

Mass Range (m/z): 335-1800

Scan Type: Full

Polarity: Positive

Data Type: Profile

IT-MS/MS:

Data Type: Centroid

Activation Type: CID

Min. Signal Required: 5000

Isolation Width: 2.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Q: 0.250

Activation Time: 10.00

Como resultado das análises de espectrometria de *T. cruzi* foram obtidas 4 listas de proteínas: (1) TcCLC/AC x *T. cruzi* selvagem (WT) e (2) TcEpsina/GFP x *T. cruzi* selvagem (WT). A comparação das listas TcCLC/AC e *T. cruzi* selvagem gerou

o Apêndice 1 e a comparação da lista TcEpsina/GFP e *T. cruzi* selvagem gerou o Apêndice 2.

Nestes apêndices as proteínas marcadas em vermelho são as que estão presentes também na lista *T. cruzi* selvagem (controle negativo) e portanto representam contaminantes, as quais não foram analisadas. As proteínas marcadas em verde são as presentes apenas nas listas TcCLC/AC ou TcEpsina/GFP e são prováveis proteínas associada à clatrina em *T. cruzi*(TcCAPs).

4. RESULTADOS REFERENTES AO CAPÍTULO 2

4.1. CRIOMOAGEM E IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CADEIA LEVE DE CLATRINA (TcCLC)

Para obter as proteínas parceiras de TcCLC, formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando a cadeia leve de clatrina fusionada às proteínas A e C (TcCLC/AC) foram submetidas à técnica de criomoagem, gerando um pó de células. Procedemos à imunoprecipitação de TcCLC/AC incubando este pó de células com esferas magnéticas acopladas a anticorpo anti-IgG de coelho (reconhece proteína A).

Inicialmente foi realizado um teste para titulação das esferas magnéticas acopladas a anticorpo anti-IgG de coelho necessárias para a imunoprecipitação de TcCLC/AC. Foram testados 5 μ l, 10 μ l e 20 μ l de esferas magnéticas, cada um com 50 μ g de pó de células em 1 ml de tampão (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato de sódio, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂, 10 μ M CaCl₂).

A partir dos resultados apresentados na Figura 4.1 observamos que 5 μ l de esferas magnéticas já eram suficientes para proporcionar a imunoprecipitação de um polipeptídeo majoritário, o qual, pela migração no gel de poliacrilamida, deve corresponder à TcCHC (192 kDa). Esta banda foi melhor visualizada com o uso de 20 μ L de esferas magnéticas. Foi também possível observar a presença de outras bandas menos intensas e de menor massa molecular, sugerindo se tratar de outras proteínas que co-precipitam com TcCLC/AC.

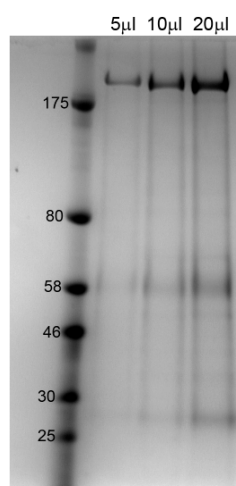


Figura 4.1. Imunoprecipitação de TcCLC, teste de titulação de micro esferas. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das micro esferas. TcCLC-A/C em Tampão (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂ 10 μ M CaCl₂). **5, 10 e 20** correspondem à quantidade de microesferas (em μ l) usada em cada experimento.

Em um teste seguinte procuramos otimizar as condições de extração usando variações do tampão inicialmente usado. Para este teste decidimos usar 50 µl de micro esferas por “pull out”, a fim de aumentar a captação de proteínas do complexo. Foram testados 8 tampões de incubação diferentes, a fim de otimizar as condições de imunoprecipitação (Figura 4.2). Foram usadas duas condições salinas (150 mM NaCl e 250 mM de citrato de sódio) e quatro detergentes diferentes (Tween, Triton, Chaps e Brij58). Um controle negativo foi feito utilizando formas selvagens de *T. cruzi* (WT).

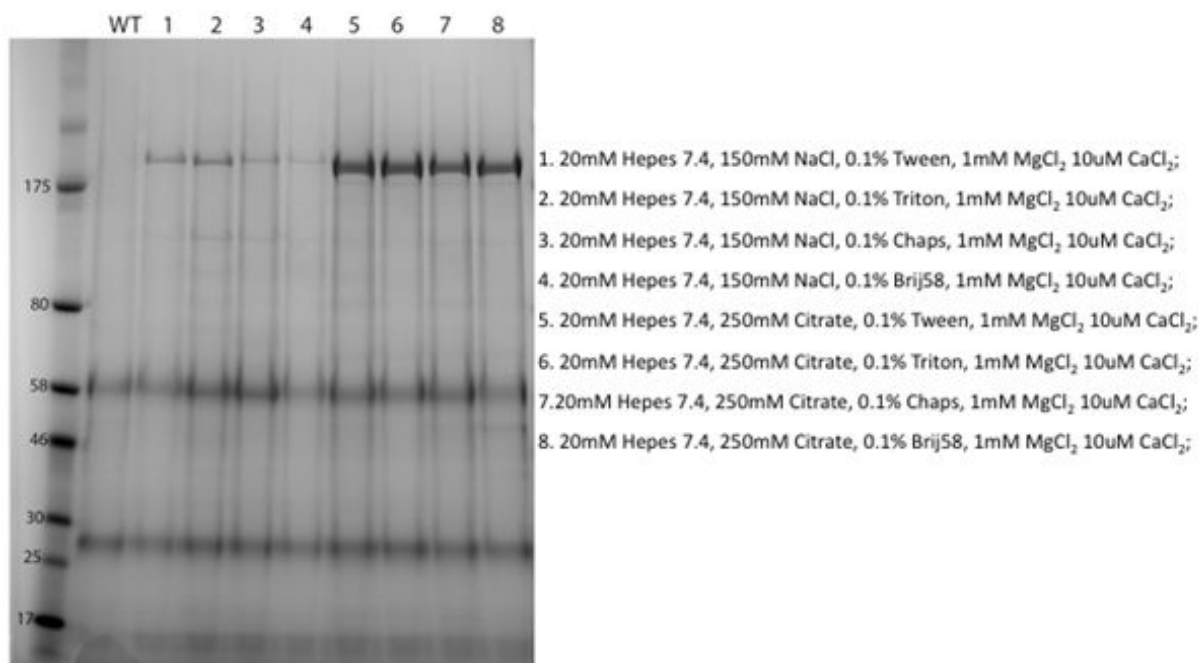


Figura 4.2. Imunoprecipitação de TcCLC, Teste de tampões. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das micro esferas. Os tampões usados estão descritos à direita da imagem. WT: imunoprecipitado de *T. cruzi* selvagem no tampão “7”; 1-8: imunoprecipitado de *T. cruzi* TcCLC/AC.

Os resultados demonstraram que não houve diferença na imunoprecipitação em função dos detergentes usados (Tween, Triton, Chaps e Brij58). Já os tampões com maior concentração de sal (250 mM citrato, tampões 5-8) proporcionaram melhor extração. No controle negativo (WT) não foi observada a banda proeminente em cerca de 190kDa, que provavelmente corresponde a TcCHC. Isso era esperado, já que o *T. cruzi* selvagem (WT) não expressa TcCLC/AC. Consequentemente, TcCHC não está enriquecida nesta fração.

Observamos no gel presença da banda com massa molecular (cerca de 190 kDa) semelhante à cadeia pesada de clatrina (TcCHC) em todos os tampões usados, sugerindo sua co-imunoprecipitação através da TcCLC/AC. Optamos então pelo

tampão "7" (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂, 10 μM CaCl₂) para fazer a imunoprecipitação final de TcCLC para enviar para análise por espectrometria de massas.

A identidade dos polipeptídeos como sendo TcCHC e TcCLC foi confirmada por Western Blot, usando o anticorpo monoclonal anti-TcCHC e anticorpo anti-IgG de coelho, que reconhece a etiqueta de Proteína A presente na TcCLC/AC (Figura 4.3, linha 2). Como esperado, as duas proteínas (TcCHC: 192kDa; TcCLC/AC: 55kDa) não estavam presentes no controle negativo (*T. cruzi* selvagem - WT) (Figura 4.3 linha 1).

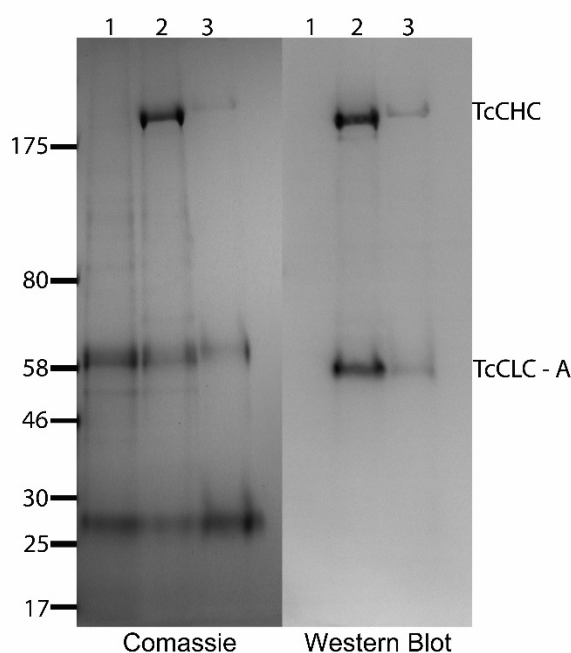


Figura 4.3. Imunoprecipitação de TcCLC. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das microesferas. **1.** *T. cruzi* selvagem em tampão 7; **2.** TcCLC/A-C em Tampão 7. A identidade de TcCHC foi confirmada por meio de western blot utilizando anticorpos monoclonais anti-TcCHC. A visualização de TcCLC/AC (55kDa) foi feita por meio de reação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, que tem afinidade pela proteína A. **3.** Micro esferas após a eluição, este controle é feito a fim de verificar se o material foi eluído satisfatoriamente.

Sabendo-se que a amostra correspondente a linha 2 da Figura 4.3 imunoprecipitou TcCHC e TcCLC, esta amostra foi enviada para análise por espectrometria de massas na Universidade de Dundee, Escócia, juntamente com o controle negativo (*T. cruzi* selvagem). O resultado desta análise se encontra no Apêndice 1.

4.2 IMUNOPRECIPITAÇÃO REVERSA (TcEPSINA)

Para validar as proteínas que interagem com clatrina (TcCAPs) identificadas no Apêndice 1 como parceiras genuínas de clatrina, realizamos uma contra-prova. Para isto selecionamos a TcEpsina, a TcCAP não-hipotética melhor classificada no Apêndice 1. Esta proteína foi então fusionada a GFP. Antes de proceder a imunoprecipitação reversa, nós verificamos se o acoplamento de GFP à epsina não alterou a localização celular desta proteína.

4.2.1. Localização de Epsina em *T. cruzi*

O gene correspondente à TcEpsina foi clonado em vetor que proporciona a fusão com o gene que codifica a proteína GFP e também contém o gene de resistência ao antibiótico G418. Este vetor com o inserto foi transfectado em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após seleção da cultura resistente a G418 os parasitas foram observados por microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que embora a marcação de epsina (fluorescência verde) se distribuisse ao longo do corpo do parasita, houve uma forte concentração na região anterior da célula, próximo a bolsa flagelar (Figura 4.4).

Sabendo-se que a epsina se associa à clatrina, resolvemos verificar se estas proteínas colocalizavam. De fato, marcação da cadeia pesada da clatrina usando anticorpo monoclonal anti-TcCHC coincidiu em grande proporção com a fluorescência da TcEpsina/GFP, principalmente na região próxima da bolsa flagelar (Figura 4.4). Esta co-localização fornece fortes evidências de que TcEpsina interage direta ou indiretamente com clatrina.

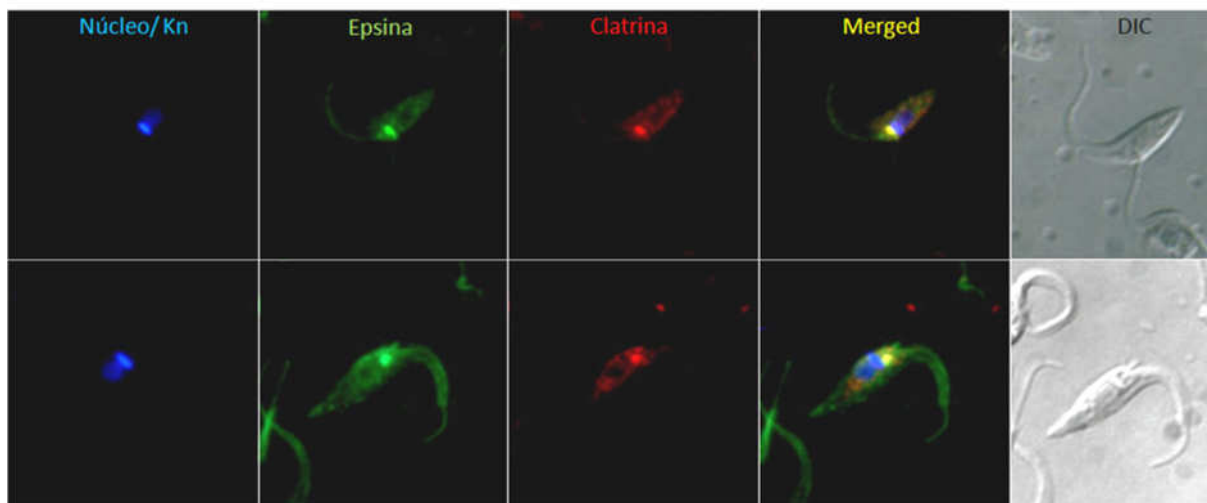


Figura 4.4. Reação do anticorpo monoclonal para cadeia pesada de clatrina (vermelho) em formas epimastigotas de *T. cruzi* contendo TcEpsina fusionada a GFP (verde) por microscopia de fluorescência. Núcleo/Kn – marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342; Epsina – detecção da fluorescência da GFP fusionada à TcEpsina; Clatrina – detecção da TcCHC usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 594. Merged – Sobreposição das imagens de Hoechst, Epsina e Clatrina. DIC – Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial. Notar co-localização das proteínas (amarelo) na porção anterior do parasita.

4.2.2 Criomoagem e imunoprecipitação de epsina (TcEpsina)

As análises para verificar o perfil da imunoprecipitação da TcEpsina/GFP por SDS-PAGE foram feitas com 50µg do pó de células, como descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Foram usados 21 tampões de incubação diferentes, cada um deles mencionado junto à sua respectiva figura.

Inicialmente testamos 2 tampões (RIPA e CHC), os quais possuem diferentes composições, no que se refere a salinidade e detergentes. Nossos resultados (Figura 4.5) mostraram que o tampão CHC (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0,1% Tween) foi capaz de proporcionar imunoprecipitação de TcCHC como demonstrado pela visualização de uma banda proeminente em 190kDa (Figura 4.5 linha 4). Por outro lado o tampão RIPA não proporcionou imunoprecipitação detectável (Figura 4.5 linha 2). Não foi possível visualizar a banda correspondente a TcEpsina (57kDa) possivelmente por esta banda estar mascarada pela fragmentação da IgG de lhama utilizada (gerando dois fragmentos: 58kDa e 27kDa).

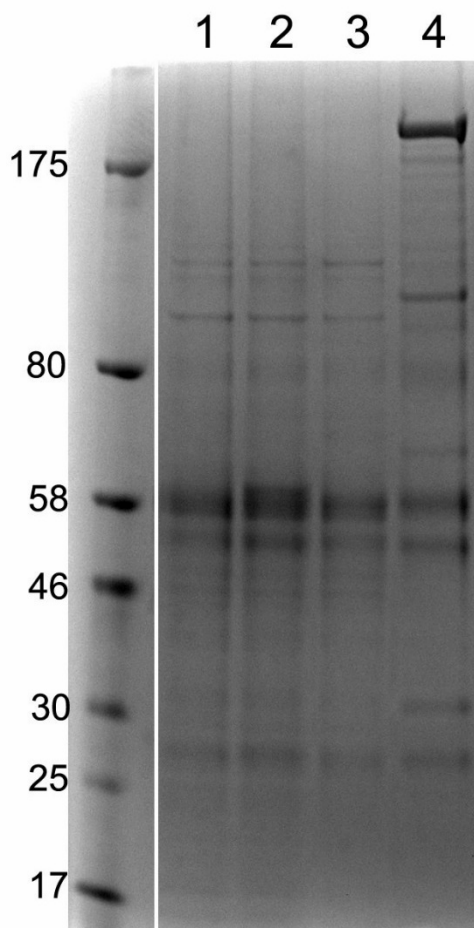


Figura 4.5. Imunoprecipitação de TcEpsina – Teste de tampões 1. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das micro esferas. 1. *T. cruzi* WT em tampão RIPA; 2. TcEpsina-GFP em tampão RIPA; 3. *T. cruzi* WT em CHC; 4. TcEpsina-GFP em CHC. **RIPA:** 25 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5 deoxicolato de sódio, 0.1% SDS; **CHC:** 20 mM Hepses 7.4, 250 mM citrato, 0,1% Tween.

Tendo-se demonstrado que o tampão CHC forneceu melhores resultados, ele foi selecionado para alterações posteriores visando a melhoria em sua performance. Assim, foram feitas alterações como uso de diferentes detergentes (Tween, Triton, Chaps e Brij58) e modificações na concentração de sais. Nossos resultados mostraram que todos os tampões testados foram capazes de proporcionar imunoprecipitação de TcCHC (Figura 4.6).

Verificamos que o uso de tampão contendo apenas 50 mM de NaCl proporcionou baixa eficiência na extração das proteínas (Figura 4.6 linha 2), quando comparado com as outras condições.

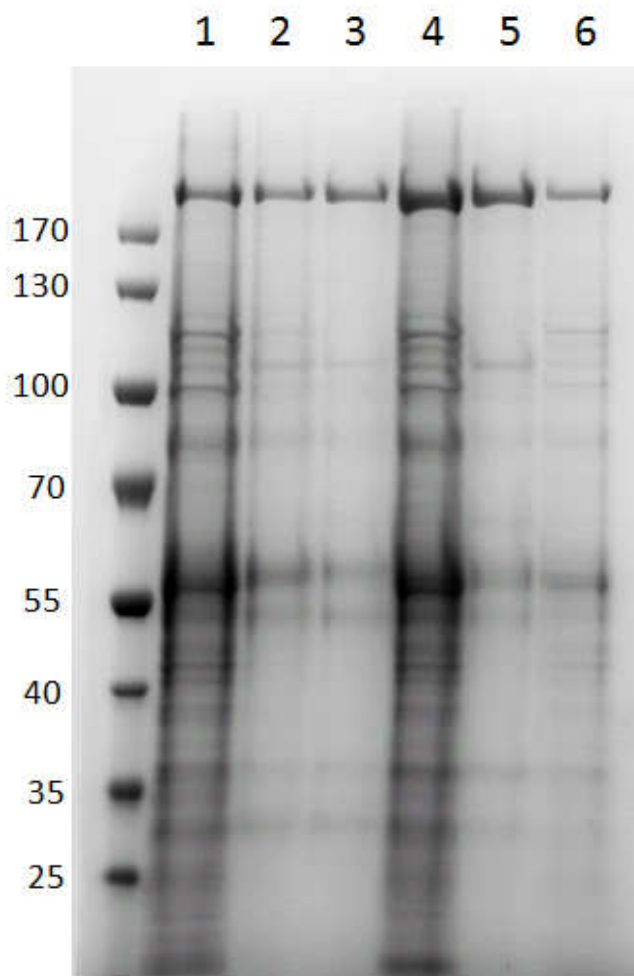


Figura 4.6. Imunoprecipitação de TcEpsina, teste de tampões 2. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das microesferas usando *T. cruzi* expressando TcEpsina fusionada a GFP.

1. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween;
2. 20 mM Hepes 7.4, 50 mM NaCl, 0.1% Tween;
3. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Tween;
4. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Brij58;
5. 20m M Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS;
6. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Triton.

Assim, decidimos testar variações de tampões contendo 150 mM de NaCl ou 250 mM de citrato de sódio com adição de cálcio e magnésio. Nossos dados mostraram que todos os tampões testados foram capazes de proporcionar imunoprecipitação de TcCHC (Figura 4.7). As melhores condições foram obtidas com o tampão 11 (adição de 1 mM $MgCl_2$ e 10 μM $CaCl_2$).

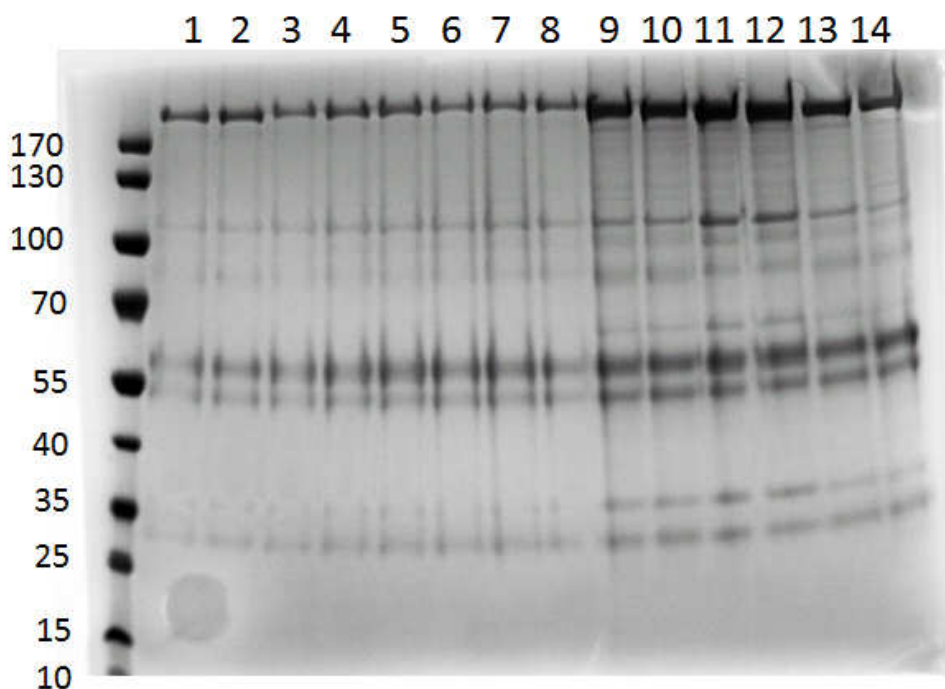


Figura 4.7. Imunoprecipitação de TcEpsina, teste de tampões 3. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das microesferas.

1. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween, 1 mM MgCl₂ 10 μM CaCl₂;
2. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween, 3 mM MgCl₂ 100 μM CaCl₂;
3. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% CHAPS;
4. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂ 10 μM CaCl₂;
5. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 3 mM MgCl₂ 100 μM CaCl₂;
6. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Brij58;
7. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Brij58, 1 mM MgCl₂ 10 μM CaCl₂;
8. 20 mM Hepes 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Brij58, 3 mM MgCl₂ 100 μM CaCl₂;
9. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Tween, 1 mM MgCl₂ 10 μM CaCl₂;
10. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Tween, 3 mM MgCl₂, 100 μM CaCl₂;
11. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂, 10 μM CaCl₂;
12. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 3 mM MgCl₂ 100 μM CaCl₂;
13. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Brij58, 1 mM MgCl₂, 10 μM CaCl₂;
14. 20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% Brij58, 3 mM MgCl₂, 100 μM CaCl₂

Assim o tampão 11 (20 mM Hepes 7.4, 250 mM citrato, 0.1% CHAPS, 1 mM MgCl₂, 10 μM CaCl₂) foi selecionado para imunoprecipitação de TcEpsina/GFP a ser enviada ao espectrômetro de massas. Para este experimento foram utilizados 350 μg de pó de células (*T. cruzi* Epsina/GFP e forma selvagem) e procedeu-se conforme o item 3.9 dos Materiais e Métodos.

Imunoprecipitação de TcEpsina/GFP utilizando o tampão 11 foi confirmada realizando-se uma nova eletroforese contendo amostras de *T. cruzi* selvagem (Figura 4.8 linha 1) e *T. cruzi* expressando TcEpsina/GFP (Figura 4.8 linha 2). Foi possível observar a banda proeminente de cerca de 190kDa, juntamente com outras bandas de menor intensidade, apenas no parasita transfectado. As bandas presentes no *T. cruzi* selvagem provavelmente correspondem à degradação do anticorpo de lhama.

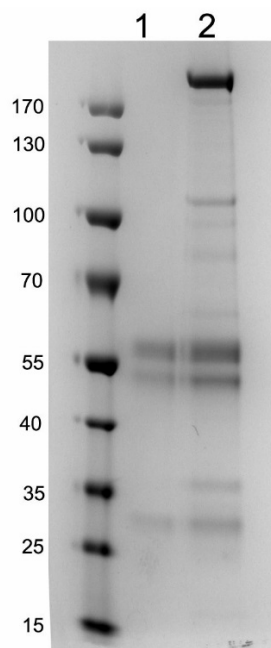


Figura 4.8. Imunoprecipitação de TcEpsina. Padrão eletroforético em matriz de poliacrilamida 4-12% do material eluído das micro esferas. **1.** *T. cruzi* selvagem; **2.** TcEpsina-GFP em Tampão (20mM Hepes 7.4, 250mM citrato, 0.1% CHAPS, 1mM MgCl₂ 10 μM CaCl₂).

Estas duas amostras foram enviadas para análise em espectrômetro de massas na Universidade de Dundee-Escócia e o resultado está descrito no Apêndice 2. Esta abordagem nos permitiu co-precipitar um conjunto de proteínas que também co-precipitou com TcCLC, proporcionando assim evidências de que estas proteínas interagem com clatrina de forma genuína.

4.3. ANÁLISE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À CLATRINA

A análise por espectrometria de massas (Apêndices 1 e 2) permitiu identificar diversas proteínas conservadas associadas à clatrina já relatadas em outros organismos, como os Complexos Adaptadores AP-1 e AP-4, SNAREs, Rab4, Rab 11, epsina, tepsina, AP180, Sec1, Auxilina e Scamp.

Foi observada também a presença de proteínas hipotéticas nesta análise, descritas abaixo.

4.3.1. Proteínas hipotéticas

A fim de identificar proteínas hipotéticas que seriam boas candidatas a proteínas associadas a clatrina em *T. cruzi*, selecionamos nos dois Apêndices (TcCLC e TcEpsina) proteínas citoplasmáticas (que não possuíssem domínios transmembrana) e que seriam exclusivas de tripanosomatídeos, com uso do algoritmo de busca Hmmer.

Na lista da TcEpsina encontramos apenas a proteína hipotética Q4CUV9, que não possui domínios transmembrana e é exclusiva de tripanosomatídeos. Mas no genoma de *T. cruzi* esta proteína parece estar mal anotada, impossibilitando o desenho de oligonucleotídeos iniciadores. Por isso decidimos avaliar esta proteína em *T. brucei* (Tb927.8.7230; 30 kDa: TbCAP30), uma vez que a Epsina já está caracterizada neste parasita (Gabernet-Castello et al., 2009). Além disso, escolhemos as formas sanguíneas de *T. brucei* pois estas formas tem maiores níveis de endocitose, quando comparadas com as formas procíclicas (Allen et al., 2003).

O gene correspondente à TbCAP30 foi clonado em vetor que proporciona a fusão com o gene que codifica a proteína HA e também contém o gene de resistência ao antibiótico puromicina. Este vetor com o inserto foi transfectado em formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei*. Após seleção da cultura resistente a puromicina os parasitas foram testados frente a ensaio de western blot e imunofluorescência.

Análise por western blot com anticorpo anti-HA mostrou que houve reação com um polipeptídeo de massa molecular compatível com aquela deduzida a partir da sequência do gene em *T. brucei* (30 kDa) adicionado à etiqueta de HA (3 kDa), de cerca de 33 kDa total (Figura 4.9).

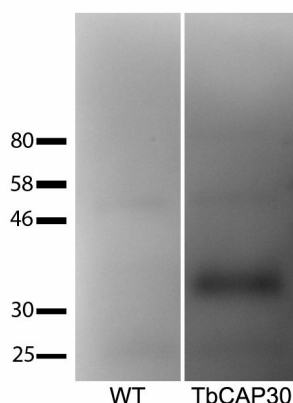


Figura 4.9. Reatividade do anticorpo HA (rato) testado por ensaio de western blot. TbCAP30 = extrato proteico de formas sanguíneas de *T. brucei* expressando TbCAP30 fusionada a HA; WT = formas selvagens de *T. brucei*. TbCAP30: 30 kDa.

Os parasitas expressando TbCAP30-HA foram utilizados em ensaios de imunofluorescência a fim de verificar a co-localização de TbCAP30 com TbEpsina. Os resultados mostraram que TbCAP30 parcialmente co-localizou com TbEpsina na região entre núcleo e cinetoplasto de formas sanguíneas de *T. brucei*, região que corresponde à bolsa flagelar (Figura 4.10).

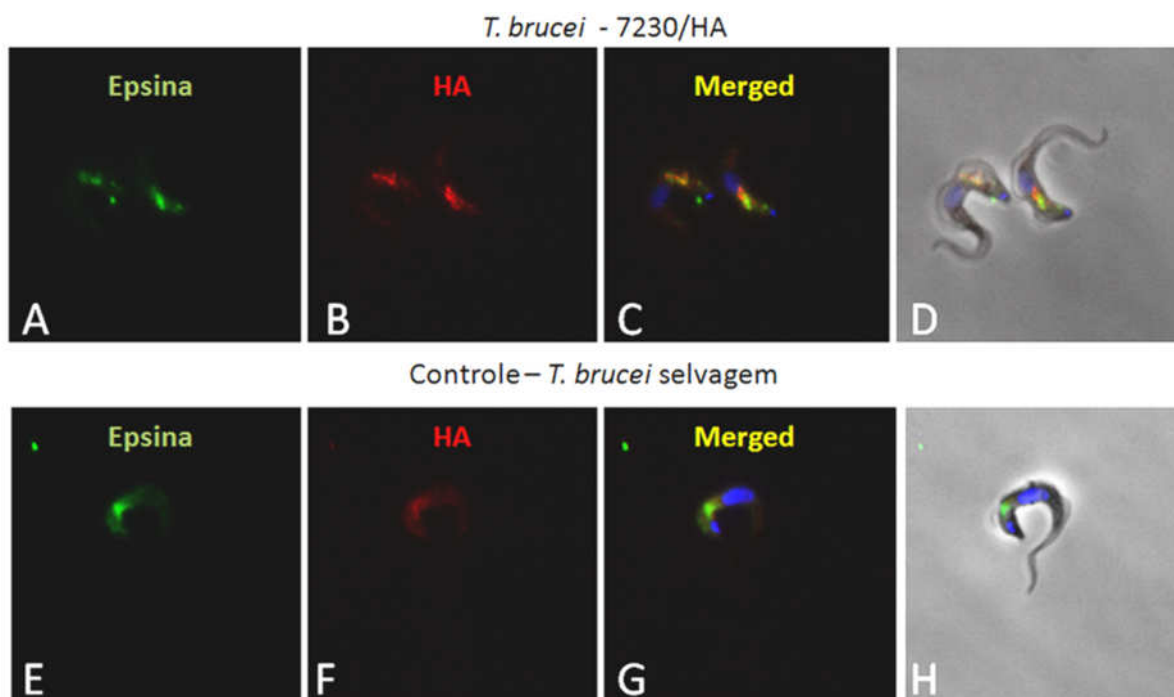


Figura 4.10. Reação do anticorpo policlonal para TbEpsina (coelho) e anti-HA (rato) em formas sanguíneas de *T. brucei* por microscopia de fluorescência. A, E- TbEpsina (anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a AlexaFluor 488; B, F- HA (anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a AlexaFluor 594. C, G- Sobreposição das imagens, e marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto; D, H- Corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC).

APÊNDICE 1

Proteínas associadas à TcCLC em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Neste apêndice as proteínas marcadas em vermelho são as que estão presentes também na lista *T. cruzi* selvagem (controle negativo) e portanto representam contaminantes, as quais não foram analisadas. As proteínas marcadas em verde são as presentes apenas na lista TcCLC/AC e são prováveis proteínas associada à clatrina em *T. cruzi* (TcCAPs).

Sequencia	ID	Descrição	Score
1	Q3ZMB7	Heavy chain clathrin	16943,21
2	Q8STF3	Beta tubulin 1.9	2382,04
3	Q4CLA1	Alpha tubulin, putative	2203,22
4	Q4CPQ7	Uncharacterized protein (Fragment)	1191,69
5	K4DWZ8	Uncharacterized protein	1058,73
6	Q4DYP5	Chaperonin HSP60, mitochondrial	1055,53
7	K4DTU5	Chaperone DNAJ protein, putative	1008,77
8	K4DXI1	Uncharacterized protein	924,20
9	K4E1A2	Uncharacterized protein (Tepsin)	796,71
10	K4DT95	Uncharacterized protein (Epsin)	779,73
11	K4ED78	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	695,39
12	K4DUS5	Uncharacterized protein	673,64
13	P0CH27	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	641,69
14	K4DLS7	Golgi/lysosome glycoprotein, putative	638,22
15	K4DTI6	Uncharacterized protein	604,23
16	Q4E4P1	Epsin, putative	598,04
17	K4E3N1	Gamma-adaptin 1, putative, AP-1	501,21
18	Q4DH96	ATP-dependent RNA helicase, putative	449,12
19	K4E0C9	Uncharacterized protein	434,18
20	Q4D5C2	Glutamate dehydrogenase	416,69
21	K4E6E7	Vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1	392,62
22	K2NXL9	Ribosomal protein L13, putative	390,23
23	K4DUQ8	Protein kinase, putative (Auxilina)	380,19
24	K4DY65	Uncharacterized protein (TcCLC)	367,94
25	K2LZ01	40S ribosomal protein S2, putative (Fragment)	362,30
26	Q4D2R9	40S ribosomal protein S3a-1	349,18
27	Q26936	Heat shock protein (HSP70)	348,60
28	K4DTH5	Calpain-like cysteine peptidase, putative	335,67
29	K4E7J7	Glucose-regulated protein 78, putative	326,89
30	K2MXP0	Hexokinase, putative	325,31
31	K4EB76	Myosin heavy chain, putative	324,00
32	K4DM24	Elongation factor 2, putative	315,69
33	K2MZU9	Heat shock protein 85, putative	308,36
34	K4DPH9	Uncharacterized protein (Provável nova TcCAP)	305,36
35	Q4E0Q3	40S ribosomal protein S5, putative	299,11
36	P33447	Tyrosine aminotransferase	292,53
37	Q4DMK9	40S ribosomal protein S3, putative	288,64
38	Q9GZC6	Tc52 protein	285,61
39	Q9GN79	Pyruvate phosphate dikinase 1	269,46
40	K2NP72	Mu-adaptin 1, putative	267,99
41	K2M741	ATP synthase subunit beta	267,44
42	K4EE85	Uncharacterized protein (CAP141)	266,92
43	K4DRH6	Prostaglandin F2alpha synthase	265,41
44	K4DLB7	Pumilio protein, putative	261,11

45	B5U6T5	Mitochondrial heat shock	247,24
46	K4E5J5	Uncharacterized protein	244,19
47	Q4DD50	60S ribosomal protein L10, putative	239,52
48	K2N0W4	60S ribosomal protein L4, putative	235,27
49	K4DWU9	2-aminoethylphosphonate:pyruvateaminotransferase-likeprotein,putative	234,53
50	K4DZK5	Uncharacterized protein	225,99
51	K4E5G2	Vesicle-associated membrane protein, putative (V-SNARE)	217,54
52	K4DWK0	Alcohol dehydrogenase, putative	217,38
53	Q27335	Poly(A) binding protein	216,00
54	K2N128	60S ribosomal protein L2, putative	202,98
55	K2N9G5	40S ribosomal protein S4, putative	197,89
56	Q4DGX6	Peptidase M20/M25/M40, putative	195,45
57	Q4DIB9	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	194,20
58	K4E470	Chaperonin alpha subunit, putative	193,98
59	K4E0F0	Uncharacterized protein (Fragment)	188,55
60	Q4DED2	Ribosomal protein L21E (60S), putative	181,80
61	K4DV53	Uncharacterized protein	180,53
62	K4DJZ2	Uncharacterized protein	175,41
63	Q4CM72	Uncharacterized protein (Fragment) (CAP80)	174,69
64	K4E532	Epsilon-adaptin, putative,(Epsilon 4)	166,67
65	Q4E1N4	U-rich RNA-binding protein UBP-2	166,36
66	O15637	Proton motive ATPase	165,05
67	K2N1A3	Gim5A protein, putative,glycosomal membrane protein, putative	163,62
68	Q4D5L9	Uncharacterized protein (Fragment)	162,01
69	K4E794	Uncharacterized protein	161,04
70	Q4D4A0	Malate dehydrogenase (Fragment)	156,69
71	K4EDC9	Vacuolar proton translocating ATPase subunit A, putative	156,14
72	K4ECN2	Voltage-dependent anion-selective channel, putative	155,78
73	Q4E4R0	60S ribosomal protein L23, putative	154,46
74	K4E5S2	Uncharacterized protein	153,14
75	Q4E0N6	40S ribosomal protein S15a, putative	152,21
76	Q4DW38	40S ribosomal protein S24	150,59
77	K4DVT6	CDC16, putative	148,47
78	Q4D6I5	40S ribosomal protein S14, putative	146,29
79	K4DT61	Sterol 24-c-methyltransferase, putative	145,20
80	Q4E093	40S ribosomal protein S18, putative	144,25
81	K2M6V0	40S ribosomal protein S6	142,80
82	Q4DQZ8	Uncharacterized protein	141,82
83	K2N523	Clathrin coat assembly protein, putative (AP180/CALM)	141,77
84	Q4DKZ4	60S ribosomal protein L18a	140,03
85	Q4D7A0	60S ribosomal protein L13a, putative	138,48
86	K2MDT7	T-complex protein 1 subunit alpha	135,36
87	K4DKF0	Vesicle-associated membrane protein, putative	135,15
88	K4E4M6	Uncharacterized protein	134,62
89	Q4CU52	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	133,83
90	Q4CXI2	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	133,58
91	Q4CRH9	40S ribosomal protein S11, putative	132,31
92	Q4E2K6	Uncharacterized protein	131,18
93	K4E1C8	Beta-adaptin, putative (ApBETA1)	129,83
94	K4DXI3	Uncharacterized protein	128,83
95	K2NB56	Glycerate kinase, putative	127,52
96	K4EAI2	Fatty acid desaturase, putative	127,12
97	Q4DWG6	Chaperonin containing T-complex protein, putative	125,85
98	K4DYY0	Uncharacterized protein	125,42
99	K4E084	COP-coated vesicle membrane protein	124,68
100	K4DRP0	dTDP-glucose 4,6-dehydratase, putative (Fragment)	124,20
101	Q4CRX5	60S ribosomal protein L17, putative	122,46
102	Q9N619	Enolase (Fragment)	117,14
103	K2NR29	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial, putative,ADP/ATP translocase 1	117,07
104	K4DXS7	Uncharacterized protein	115,98
105	K4EAL9	Lanosterol 14-alpha-demethylase, putative	114,65

106	K4E0U5	Beta-adaptin, putative (ApBeta 4)	113,70
107	K4E4R7	Homoserine kinase, putative	113,41
108	K2NF45	Uncharacterized protein	112,68
109	K4DU68	Glycosomal membrane protein, putative	112,08
110	K4E621	Uncharacterized protein	111,91
111	K4DZA6	Peroxisome targeting signal 1 receptor, putative	111,20
112	Q4DMP4	Uncharacterized protein	110,27
113	K2N304	Cysteine synthase (Fragment)	108,76
114	K4EC22	Uncharacterized protein (Fragment)	107,94
115	K4DS29	Serine carboxypeptidase (CBP1), putative,serine peptidase, Clan SC, Family S10, putative	107,73
116	K4E7X0	40S ribosomal protein S16, putative	107,69
117	K4EA87	Aspartate aminotransferase, mitochondrial, putative	106,28
118	Q4E3M6	Uncharacterized protein	105,21
119	Q4CM56	Tryparedoxin peroxidase, putative	104,36
120	P22513	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	104,26
121	Q4CLP3	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative (Fragment)	103,67
122	K2MA70	Chaperonin containing t-complex protein, putative	102,20
123	K4E6M6	Uncharacterized protein (Fragment)	101,74
124	Q4CXR1	Histone H4 (Fragment)	101,38
125	Q4CR94	Uncharacterized protein (Fragment)	99,75
126	Q26883	Cruzipain	99,69
127	K4E886	Uncharacterized protein (Fragment)	99,65
128	Q4D8Y4	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	98,16
129	K4E3J9	Uncharacterized protein	97,08
130	Q4CTD7	Histone H2B	96,95
131	Q4E661	60S ribosomal protein L13	96,94
132	K4DPP5	NUP-1 protein, putative (Fragment)	96,90
133	K4EAY2	Uncharacterized protein	96,52
134	K4DT76	Membrane-bound acid phosphatase 2, putative	96,18
135	Q26923	Glucose-regulated protein 78 (Fragment)	95,98
136	O61084	Glycosomal malate dehydrogenase, putative	95,08
137	K4DJD7	Syntaxin, putative (Tsnare)	94,80
138	Q4DWK0	AAA ATPase, putative	94,19
139	Q4CU61	60S ribosomal protein L5, putative	93,52
140	Q4D251	Peroxisomal targeting signal type 2 receptor, putative	93,38
141	Q4CY17	Uncharacterized protein	93,32
142	K4DM88	Small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	93,07
143	K2MDD3	Uncharacterized protein	92,57
144	K4E010	Vacuolar protein sorting-associated protein, putative (Sec1)	91,66
145	Q4D6N9	Ribosomal protein S19, putative	91,18
146	Q4DAD0	Uncharacterized protein	90,84
147	K4E8S9	Uncharacterized protein	87,87
148	K2N167	Cystathione gamma lyase, putative	86,41
149	K4DWV6	Protein transport protein Sec13, putative	86,39
150	Q965C7	Aldo/keto reductase	86,29
151	K2N4S5	Uncharacterized protein	86,28
152	K4EAK2	Uncharacterized protein	84,76
153	K4DUX5	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	84,18
154	Q4DTQ1	40S ribosomal protein S23, putative	81,62
155	K4DQZ4	40S ribosomal protein SA	81,59
156	Q4E4R8	T-complex protein 1, eta subunit, putative	81,44
157	K4E2V0	Uncharacterized protein	79,44
158	K2MZ75	Nucleoporin interacting component (NUP93), putative	79,30
159	K4DSM8	Uncharacterized protein	79,03
160	Q4DBR0	Pumilio/PUF RNA binding protein 1, putative	78,84
161	Q4CUC8	Ribosomal protein S7, putative	78,45
162	K4E129	Histidine ammonia-lyase	78,40
163	K4EDG3	Small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	78,32
164	K2NIU9	Sarcoplasmic reticulum glycoprotein, putative	77,57
165	K4E8G6	Nuclear receptor binding factor, putative	77,42

166	K4DRN4	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	77,30
167	K4E1N6	Protein transport protein Sec23A, putative	76,98
168	K4E6C8	Mu-adaptin 4, putative,	74,35
169	K4DKT3	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	73,17
170	Q4D8B1	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	71,91
171	Q4D7A6	Actin, putative (Fragment)	71,79
172	K2PB67	Vacuolar ATP synthase subunit b, putative	70,87
173	K4E9B6	Glutamine synthetase, putative	70,86
174	K4E8W1	Uncharacterized protein	70,28
175	Q4D4T8	Uncharacterized protein (Fragment)	69,17
176	Q4D604	Ribosomal protein L27, putative	68,47
177	K4E5X3	NADH-cytochrome b5 reductase, putative	67,58
178	Q4D8K3	60S ribosomal protein L30, putative	66,70
179	K4DPY7	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	66,52
180	Q4CNF4	60S ribosomal protein L11, putative	65,60
181	Q4D4S1	40S ribosomal protein S9, putative	65,56
182	K2M4Q3	RuvB-like DNA helicase, putative	65,06
183	K2M7J6	Vesicle-associated membrane protein, putative (V-SNARE)	64,91
184	K2NTQ0	Uncharacterized protein	63,52
185	K4DTA4	DnaJ chaperone protein, putative	63,44
186	K4EDW9	Uncharacterized protein	63,01
187	K2NEG6	Uncharacterized protein	62,93
188	Q4CY57	Uncharacterized protein (Fragment)	62,06
189	Q4CRI7	60S ribosomal protein L9, putative	61,54
190	K2MKD6	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase, putative (Fragment)	60,95
191	K2NLQ2	60S ribosomal protein L7, putative	60,84
192	K2MEF1	RuvB-like DNA helicase, putative	60,27
193	Q4DPQ5	Uncharacterized protein	59,28
194	Q4DD81	60S ribosomal protein L22, putative	58,99
195	K4DVU1	Cytochrome c oxidase subunit IV, putative	58,49
196	Q4CS87	Calpain cysteine peptidase, putative (Fragment)	56,84
197	K2MMQ6	Adenosylhomocysteinase	56,45
198	K2MV19	ATP synthase subunit alpha	56,24
199	Q4CW64	Calpain-like cysteine peptidase, putative	53,97
200	K4DWZ0	Uncharacterized protein	53,88
201	Q4E4N7	Dynein light chain, putative	53,26
202	Q4CYH9	Histone H2A (Fragment)	53,03
203	K2ND53	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	48,63
204	K4DWY2	Uncharacterized protein	48,33
205	Q4D927	Uncharacterized protein	47,22
206	Q4DJQ7	Cytochrome b-domain protein, putative	46,30
207	K4E201	Uncharacterized protein	44,70
208	K4DTP2	Uncharacterized protein	43,66
209	K4ECX4	Surface glycoprotein, putative (Fragment)	42,87
210	K4DLR6	Uncharacterized protein	41,23
211	K2MXV9	Tryparedoxin peroxidase, putative	39,50
212	K2M3V7	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein	38,48
213	K2MWY1	Proton motive ATPase, putative	37,44
214	K4DUJ9	Threonyl-tRNA synthetase, putative	36,13
215	K4DX52	Extracellular receptor, putative	32,34

APÊNDICE 2

Proteínas associadas à TcEpsina em formas epimastigostas de *T. cruzi*.

Neste apêndice as proteínas marcadas em vermelho são as que estão presentes também na lista *T. cruzi* selvagem (controle negativo) e portanto representam contaminantes, as quais não foram analisadas. As proteínas marcadas em verde são as presentes apenas na lista TcEpsina e são prováveis proteínas associada à clatrina em *T. cruzi* (TcCAPs).

Sequencia	ID	Descrição	Score
1	Q3ZMB7	Heavy chain clathrin	15392,07
2	Q8STF3	Beta tubulin	1578,28
3	P0CH27	Ubiquitin-60S ribosomal protein	1562,12
4	K4DT95	Uncharacterized protein (Epsin)	1552,42
5	Q4CLA1	Alpha tubulin, putative	1447,03
6	Q4E4P1	Epsin, putative	1195,40
7	K4E3N1	Gamma-adaptin 1, putative	808,20
8	Q4DYP5	Chaperonin HSP60, mitochondrial	656,07
9	K4E1C8	Beta-adaptin, putative (Beta 1)	543,40
10	Q26936	Heat shock protein (HSP70)	354,45
11	K4E1A2	Uncharacterized protein (Tepsin)	342,85
12	Q4D2R9	40S ribosomal protein S3a-1	291,51
13	Q4D5P4	40S ribosomal protein S4, putative	271,95
14	K4EDC9	Vacuolar proton translocating ATPase subunit A, putative	253,66
15	K4DY65	Uncharacterized protein (CLC)	251,83
16	Q4DQU4	Mu-adaptin 1, putative	243,22
17	Q4E0Q3	40S ribosomal protein S5, putative	228,34
18	K2M7J6	Vesicle-associated membrane protein, putative (V-Snare)	206,53
19	K4E0C9	Uncharacterized protein	194,51
20	Q4DJX1	Ribosomal protein L3, putative	177,03
21	K4E7J7	Glucose-regulated protein 78, putative	176,67
22	K4E5G2	Vesicle-associated membrane protein, putative (V-Snare)	170,46
23	K4DTU5	Chaperone DNAJ protein, putative	166,69
24	H9AZG3	Actin	166,28
25	Q4CQJ6	Uncharacterized protein	163,58
26	K4DUQ8	Protein kinase, putative (Auxilin)	160,62
27	K4EE85	Uncharacterized protein (CAP141)	158,05
28	Q4CPQ7	Uncharacterized protein (Fragment)	156,36
29	K4DU64	40S ribosomal protein S3, putative (Fragment)	155,93
30	Q4DKZ4	60S ribosomal protein L18a	152,70
31	Q4DFM4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	143,87
32	Q4CNY1	Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase, putative	138,88
33	Q4DED2	Ribosomal protein L21E (60S), putative	134,84
34	B5U6T5	Mitochondrial heat shock	134,64
35	Q4CUV9	Uncharacterized protein (Fragment)	133,69
36	K2MT82	60S ribosomal protein L10, putative	132,78
37	Q4CM72	Uncharacterized protein (Fragment) (CAP80)	132,21
38	Q4DW38	40S ribosomal protein S24	130,46
39	Q4DC12	Gim5A protein, putative – tem no Vacuolocontratil	125,49

40	K2M6V0	40S ribosomal protein S6	123,58
41	M4H1F5	Proteasome regulatory ATPase subunit 3 (Fragment)	123,34
42	K4E5J5	Uncharacterized protein	115,53
43	K4E2M0	Uncharacterized protein	109,24
44	K2NT82	60S ribosomal protein L2, putative (Fragment)	107,87
45	Q4CM56	Tryparedoxin peroxidase, putative	106,10
46	K4DJD7	Syntaxin, putative (T-SNARE)	105,08
47	K4ECN2	Voltage-dependent anion-selective channel, putative	103,40
48	Q4CRX5	60S ribosomal protein L17, putative	102,51
49	K4DLS7	Golgi/lysosome glycoprotein, putative	101,23
50	K4DJH5	ABC transporter, putative	101,07
51	K4E532	Epsilon-adaptin, putative (Epsilon 4)	99,56
52	Q4CXI2	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	95,52
53	K4ED25	D-alanyl-glycyl endopeptidase-like protein, putative	95,41
54	K4E706	Amastin, putative	91,58
55	K2MDA7	Uncharacterized protein (RAB4)	90,60
56	D3JLB6	Thiol-transferase Tc52 (Fragment)	90,08
57	K2MWY1	Proton motive ATPase, putative	87,09
58	K2N5W3	Vacuolar protein sorting-associated protein, putative (Sec1)	86,86
59	Q4CKJ0	Fatty acid desaturase, putative (Fragment)	83,38
60	K4E470	Chaperonin alpha subunit, putative	82,95
61	Q4CMB6	Sterol 24-c-methyltransferase, putative (Fragment)	81,33
62	K2LZ01	40S ribosomal protein S2, putative (Fragment)	80,65
63	Q4DMT8	Uncharacterized protein	78,93
64	K2N523	Clathrin coat assembly protein, putative (AP180/CALM)	78,40
65	Q4CRH9	40S ribosomal protein S11, putative	77,45
66	Q4D5L9	Uncharacterized protein (Fragment)	77,00
67	Q4CQW2	60S ribosomal protein L4, putative	76,81
68	Q4DD81	60S ribosomal protein L22, putative	75,86
69	C4PD06	Cysteine proteinase (Fragment)	75,47
70	K4E491	Uncharacterized protein	74,11
71	K4DM24	Elongation factor 2, putative	74,01
72	Q4CNF4	60S ribosomal protein L11, putative	73,78
73	K2M741	ATP synthase subunit beta	73,06
74	K2MDT7	T-complex protein 1 subunit alpha	73,06
75	K4DXI3	Uncharacterized protein	71,63
76	Q4E0N6	40S ribosomal protein S15a, putative	69,95
77	Q7Z1E2	Clathrin assembly protein AP19-like protein (Sigma AP1)	69,74
78	K4E3Z1	Uncharacterized protein	69,51
79	Q4D7A0	60S ribosomal protein L13a, putative	69,21
80	Q4E093	40S ribosomal protein S18, putative	68,07
81	K2MW22	Uncharacterized protein (SCAMP)	67,07
82	Q4DGG6	Uncharacterized protein (Fragment)	66,91
83	Q4DWG6	Chaperonin containing T-complex protein, putative	66,28
84	Q4CXY9	Syntaxin, putative (T-SNARE)	65,78
85	Q4E4R0	60S ribosomal protein L23, putative	63,61
86	Q4CXR1	Histone H4 (Fragment)	63,57
87	Q4DH96	ATP-dependent RNA helicase, putative	62,78
88	K2NPK1	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	62,67
89	K4E0U5	Beta-adaptin, putative (BETA4)	60,12
90	Q4D4S1	40S ribosomal protein S9, putative	59,27
91	Q4D6I5	40S ribosomal protein S14, putative	58,62
92	K4DW55	Uncharacterized protein	58,18
93	K2MPX7	60S ribosomal protein L13, putative	58,12

94	K2MKD6	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase, putative (Fragment)	57,85
95	K2MXT6	60S ribosomal protein L19, putative (Fragment)	57,67
96	Q4CTM1	Uncharacterized protein	56,83
97	K4E0U6	Uncharacterized protein	54,84
98	K2NIS5	Lanosterol 14-alpha-demethylase, putative	54,69
99	K4EDU2	ABC transporter, putative	53,74
100	K4E5J3	Calpain-like cysteine peptidase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	53,67
101	K2MZU9	Heat shock protein 85, putative	52,69
102	Q4DYH1	Uncharacterized protein	52,68
103	Q27880	Histone H3	52,07
104	Q4DZQ8	Uncharacterized protein	50,09
105	Q4CYA5	Uncharacterized protein	50,00
106	K2N1E0	Prostaglandin F2alpha synthase	48,61
107	K2MYF8	Vesicle-associated membrane protein, putative (V-SNARE)	45,88
108	Q4CVX9	60S ribosomal protein L9, putative	45,55
109	P27795	Histone H2B	42,61
110	K4E5A9	Uncharacterized protein (YIP1 domain)	39,86
111	K2NR29	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial, putative,ADP/ATP translocase 1, putative	39,53
112	Q4D6N9	Ribosomal protein S19, putative	37,77
113	Q4DN72	60S ribosomal protein L34, putative	33,61
114	K4DU68	Glycosomal membrane protein, putative (integral to peroxissome membrane)	29,28

5. DISCUSSÃO REFERENTE AO CAPÍTULO 2

Os protozoários tripanosomatídeos são organismos muito divergentes na escala evolutiva, proporcionando a oportunidade de explorar aspectos únicos da biologia de células eucariontes. Um desses aspectos refere-se ao sistema endocítico/exocítico e suas diversas funções. Análises *in silico* baseadas apenas na informação de sequências gênicas e protéicas sugerem que várias proteínas importantes da via endocítica de outras espécies estão ausentes em tripanosomatídeos (Field et al., 2012). Uma vez que a endocitose - um processo essencial para a sobrevivência das células - é funcional em tripanosomatídeos, as diferenças entre moléculas envolvidas na via endocítica de tripanosomatídeos em relação a outros eucariontes podem ser devido tanto à divergência na sequência/estrutura proteica de fatores conhecidos quanto à presença de novas proteínas que podem substituir as funções daqueles outros. Como consequência, o sistema endocítico dos tripanosomatídeos patogênicos emerge como excelente fonte de alvos quimioterápicos (De Souza et al., 2009).

Neste trabalho, caracterizamos as principais proteínas conservadas que compõem o sistema endocítico/exocítico mediado por clatrina de *T. cruzi*: as cadeias leve e pesada do trisquélon de clatrina (Capítulo 1) e a epsina (Capítulo 2). A fim de identificar proteínas associadas à clatrina, usamos como estratégia a imunoprecipitação (utilizando cadeia leve de clatrina e epsina como iscas) seguida da análise por espectrometria de massas dos complexos isolados, o que permitiu identificar diversas proteínas associadas à clatrina, algumas delas ainda sem função conhecida (hipotéticas).

A seguir discutiremos apenas as proteínas que a literatura já descreveu como tendo participação efetiva na via mediada por clatrina, bem como as proteínas hipotéticas que tem potencial de estar atuando na via. As proteínas restantes mostradas em verde nos dois apêndices são provavelmente carregadas em vesículas revestidas por clatrina e provavelmente não fazem parte da via.

5.1.EPSINA

Epsinas são adaptadores monoméricos caracterizados por possuir um domínio ENTH N-terminal conservado. Este domínio auxilia na curvatura de membranas durante a formação de vesículas com revestimento de clatrina (Traub, 2003). As epsinas podem operar na formação de vesículas revestidas por clatrina na endocitose,

na Rede Trans do Golgi (TGN) e nos endossomos (Robinson e Pimpl, 2013). Em *Arabidopsis*, proteínas com domínios ENTH também estão envolvidas no tráfego vacuolar (Song et al., 2006) e no transporte a partir do TGN por interagir especificamente com SNAREs, atuando na fusão das vesículas ao TGN, função esta que também é observada em leveduras e mamíferos (Lee et al., 2007; Chidambaram et al., 2004). Estudos em células de mamíferos levaram à classificação da família das epsinas ou proteínas relacionadas à epsina (epsinaR) com base na função, arquitetura do domínio de ligação e localização celular. A função pode ser dividida em endocitose de cargas ubiquitinadas (epsinas) ou triagem/reciclagem de cargas dentro de compartimentos celulares (epsinaR) (Mills et al, 2003; Hawryluk et al, 2006).

Em *T. brucei* a TbEpsina (Tb11.50.0006) possui um domínio ENTH e tem localização celular tanto em regiões de brotamento de vesículas de clatrina na membrana plasmática quanto em compartimentos endossomais, sendo capaz de se associar à clatrina, como demonstrado por ensaios de imunoprecipitação (Gabernet-Castello et al., 2009).

Em nossos ensaios de imunofluorescência verificamos que a epsinaR de *Trypanosoma cruzi* (TcEpsina) co-localiza com clatrina na região da bolsa flagelar (local onde ocorre brotamento de vesículas endocíticas revestidas por clatrina) e no Complexo de Golgi. A TcEpsina está presente na imunoprecipitação de clatrina, o que sugere associação destas proteínas e a participação de TcEpsina como um adaptador de clatrina em *T. cruzi*.

5.2 PROTEÍNAS ASSOCIADAS A CLATRINA E EPSINA

Após obter os resultados de imunoprecipitação de clatrina e epsina, comparamos as proteínas que aparecem nas duas listas (TcCLC:Apêndice 1; TcEpsina:Apêndice 2). A cadeia pesada de clatrina é a proteína mais abundante em ambas as listas, confirmando dados da literatura que demonstram que clatrina é a proteína mais abundante em vesículas com revestimento de clatrina (Bonifacino e Lippincott-Schwartz, 2003).

5.2.1. Complexos Adaptadores

Observamos, em ambas as listas, a presença dos Complexos Adaptadores AP-1 e AP-4 e ausência dos complexos AP-2 e AP-3.

O Complexo Adaptador 1 é expresso em todas as células eucarióticas e está associado principalmente ao transporte da rede Trans do Golgi para o lisossomo (via

endossomos) em células não polarizadas de mamíferos (Gosh et al., 2003). Entretanto, pode assumir funções diversificadas dependendo do tipo celular (Dittie et al., 1996), como a formação do vacúolo contrátil em *Dictyostelium discoideum* (Lefkir et al., 2004) ou o transporte a partir do endossomo inicial ou de reciclagem em células HeLa (Hirst et al., 2012 b). Em *T. brucei* demonstrou-se que este complexo é essencial para o protozoário, mediando o tráfego lisossomal a partir da Rede TransGolgi, embora não esteja envolvido no processo exocítico do parasita (Tazeh et al., 2009).

Em *T. cruzi* já foi relatado que as subunidades do Complexo Adaptador AP-1 são conservadas, sendo possível identificar a expressão de 3 das 4 subunidades (AP1- μ , AP1- β e AP1- γ), demonstrando-se a localização da subunidade AP1- γ no complexo de Golgi em diferentes formas evolutivas deste parasita (Moreira, 2013).

A presença do Complexo Adaptador AP-1 nas imunoprecipitações de clatrina e epsina indica que este complexo participa na formação de vesículas revestidas por clatrina no Complexo de Golgi de *T. cruzi*. Considerando-se a função atribuída em outros organismos, é possível que o Complexo Adaptador AP-1 tenha funções relacionadas neste protozoário, como o envio de enzimas lisossomais como cruzipaína e chagasina (Santos et al., 2005) aos reservossomos.

Um conjunto de proteínas que surpreendentemente não estava presente em nenhuma das listas foi o Complexo Adaptador AP-2. Os genes que codificam as 4 sub-unidades deste complexo de proteínas não estão presentes no genoma de *T. brucei* (Manna et al, 2013), mas estão presentes em *T. cruzi* (Corrêa et al, 2007; Kalb, 2011). Assim, esperávamos observar estas proteínas em nossas análises, uma vez que o Complexo Adaptador AP-2 facilita a endocitose mediada por clatrina (Hirst et al., 2012 a) e esse mecanismo já foi observado em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Corrêa et al, 2007; Kalb et al., 2014).

Aparentemente alguns organismos unicelulares, como leveduras, parecem gerir muito bem a falta de AP-2 (Reider e Wendland, 2011; Baggett and Wendland, 2001). Por outro lado, já mostrou-se que alguns adaptadores específicos de carga podem ser de fato tão bons quanto AP-2 para apoiar a endocitose mediada por clatrina (Robinson, 2004). Assim, o complexo AP-2 parece não ser obrigatório em toda endocitose mediada por clatrina e diversos adaptadores alternativos (ver item 5.2.2) parecem atuar de forma semelhante na classificação das cargas e na montagem de vesículas revestidas por clatrina (Traub, 2003). Porém já foi observada a endocitose mediada por clatrina em *T. cruzi*. Assim um provável substituto para AP-2 poderia ser AP180, como discutido abaixo no item 5.2.2.

Foi surpreendente encontrar o Complexo Adaptador AP-4 em nossas análises. O conhecimento sobre o Complexo Adaptador AP-4 ainda é escasso, se comparado com AP-1 e AP-2 (Hirst et al., 2013). A primeira descrição do complexo AP-4 foi feita em 1999 por Dell'Angelica e colaboradores, mas sua associação com vesículas revestidas por clatrina só foi mostrada em 2005 por Barois e Bakke. Estes autores mostram que o papel do complexo AP-4 é classificar as proteínas-carga que partem dos endossomos iniciais para os lisossomos, de uma maneira dependente de clatrina. Também mostraram a localização de AP-4 no Complexo de Golgi. Alternativamente, AP-4 pode atuar em uma rota direta do Golgi para a membrana plasmática (Simmen et al., 2002). Assim o papel de AP-4 também parece variar entre diferentes tipos de células. Uma das subunidades do Complexo Adaptador AP-4 foi identificada em uma proteômica de vacúolo contrátil de *T. cruzi* (Ulrich et al., 2011).

Em nossas análises encontramos a proteína tepsina (tetra-epsina), um componente central de vesículas contendo o complexo AP-4. Esta proteína é estruturalmente relacionada à EpsinaR. Tepsina foi identificada em análises proteômicas de vesículas enriquecidas com Complexo AP-4 (Borner et al, 2012). A tepsina se liga ao domínio *ear* (orelha) da subunidade beta do Complexo AP-4 e co-localiza com AP-4 em diversas células. Tepsina e AP-4 dependem funcionalmente um do outro, pois em organismos que não possuem AP-4 a tepsina também está ausente no genoma (Hirst et al., 2013). A presença dessa proteína em ambas as listas (Apendices 1 e 2) reforça o fato de que AP-4 em *T. cruzi* pode estar envolvido em uma via dependente de clatrina.

Assim, parece que em *T. cruzi* AP-1 e AP-4 ligam clatrina, enquanto que AP-2 e AP-3 não. Dados de bioinformática permitiram identificar as 4 subunidades de AP-2 no genoma de *T. cruzi* (Corrêa et al., 2007, Kalb, 2011). Deste modo, é possível que neste parasita o Complexo AP-2 não esteja associado à clatrina e sim mediando outro tipo de endocitose, como a endocitose que ocorre via complexo citóstoma/citofaringe. É importante ressaltar que no genoma de *T. brucei* são encontrados apenas os Complexos Adaptadores AP-1, AP-3 e AP-4 (Manna et al, 2013). Assim, se *T. brucei* não possui AP-2 e nem citóstoma, é possível especular que em *T. cruzi* (que tem AP-2 e citóstoma), o AP-2 esteja atuando em uma endocitose independente de clatrina via citóstoma.

5.2.2. Outros adaptadores monoméricos associados à clatrina

Uma proteína encontrada em ambas as listas foi a AP180. Esta proteína promove a montagem do revestimento de clatrina em diversos organismos. Enquanto algumas proteínas adaptadoras reconhecem apenas uma família de receptores, não há evidências de que AP180 reconheça receptores diretamente, mas parece fazer uma ponte entre a clatrina e os fosfolipídios de membrana (Reider e Wendland, 2011).

Em *T. cruzi* a AP180 contém um domínio ANTH conservado (AP180 N-terminal homology) e um motivo “clathrin Box” (LVAVE), o que deve mediar a interação com clatrina. E além disso, esta proteína foi localizada no Complexo do Vacúolo Contrátil (Ulrich et al., 2011). A presença de AP180 em ambas as listas (TcCLC e TcEpsina), juntamente como fato de que AP-2 parece não ligar clatrina em *T. cruzi*, sugere que AP180 esteja auxiliando a montagem de revestimento de clatrina na endocitose na bolsa flagelar, uma vez que já foi demonstrado o brotamento de vesículas com revestimento de clatrina na bolsa flagelar de *T. cruzi* (Corrêa et al., 2007; Kalb et al., 2014).

5.2.3. Proteínas hipotéticas associadas à clatrina

Nossas análises de imunoprecipitação permitiram verificar que as proteínas Cap80 e Cap141 (*cap: clathrin associated protein*) co-precipitam com clatrina e epsina em *T. cruzi*. Estas duas proteínas estão sendo caracterizadas como novos componentes na endocitose mediada por clatrina em *T. brucei* (dados ainda não publicados pelo grupo do Dr. Mark Field, comunicação pessoal). O que sugere que em *T. cruzi* estas proteínas possam também ser novos componentes dos revestimentos de clatrina.

Foram verificadas todas as proteínas hipotéticas da lista de clatrina sobre a presença de domínios transmembranares, os quais poderiam caracterizá-las como cargas e não como parceiras. Selecionamos a proteína hipotética K4DPH9, que está presente apenas em tripanosomatídeos e não possui domínios transmembrana.

Para estas 3 proteínas (Cap80, Cap141 e K4DPH9) foram obtidos oligonucleotídeos que permitem a entrada das proteínas na plataforma Gateway de clonagem e posteriormente recebimento de uma etiqueta que permita a localização destas proteínas em *T. cruzi*. Estudos posteriores serão realizados em detalhes para analisar estas proteínas.

Da lista da TcEpsina avaliamos a proteína Q4CUV9, que não tem domínios conhecidos e parece estar presente apenas em tripanosomatídeos. Em nossos

experimentos de imunolocalização, seu homólogo em *T. brucei* (Tb927.8.7230: TbCAP30) parcialmente co-localizou com TbEpsina na região entre núcleo e cinetoplasto de formas sanguíneas, região que corresponde à bolsa flagelar. Isto sugere que esta proteína pode ser uma nova proteína associada à epsina em tripanosomatídeos.

5.2.4. SNAREs

Em nossas análises identificamos 4 vSNAREs distintas (K2MYF8 na lista da epsina; K4DKF0 na lista CLC; K2M7J6 e K4E5G2 em ambas as listas). Todas elas possuem ortólogos e são expressas em *T. brucei* (Murungi et al., 2013). SNAREs (soluble NSF attachment receptor) são proteínas integrais de membrana responsáveis pela fusão de vesículas com a membrana alvo. As SNAREs estão presentes nas membranas das vesículas (membros das famílias VAMPs ou synaptobrevin) e das organelas alvo (membros das famílias syntaxin e SNAP) e formam complexos muito estáveis. A formação de um complexo SNARE aproxima as membranas da vesícula e do alvo e fornece a energia necessária para a fusão das bicamadas lipídicas. Diferentes membros da família SNARE estão localizados em distintas membranas de compartimentos de células eucarióticas, de modo a formar complexos específicos e aumentar assim a fidelidade do tráfego de vesículas (Bock et al., 2001).

As SNAREs são selecionadas na membrana da vesícula em formação pela interação direta com componentes do revestimento da vesícula. Esta seleção é feita pela epsina, a qual insere as SNAREs em vesículas revestidas por clatrina (Miller et al., 2007). O transporte pós-Golgi de SNAREs é feito majoritariamente por vesículas revestidas por clatrina (Borner et al., 2012).

Um trabalho recente (Murungi et al., 2013) identificou as sequências candidatas a SNAREs em *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Estas sequências parecem ser bem conservadas entre estes organismos. Murungi e colaboradores (2013) investigaram por imunofluorescência a localização sub-celular de TbVamp7c (homólogo a K2M7J6) em *T. brucei*, a qual revelou localização na região entre núcleo e cinetoplasto, compatível com endossomo. Apesar de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* terem estilos de vida altamente distintos, o conjunto de SNAREs é bastante estável entre as três linhagens patogênicas, sugerindo seu estabelecimento no último ancestral comum dos tripanosomas e *Leishmania*, assim como a conservação na localização e possivelmente na função (Murungi et al., 2013). O papel desta proteína em *T. cruzi*

merece ser melhor investigado. A K4E5G2 (VAMP1) foi identificada em uma proteômica de vacúolo contrátil de *T. cruzi* (Ulrich et al., 2011).

5.2.5. RABs

Em nossas análises identificamos a RAB11 na lista da TcCLC (K4DM88, K4EDG3) e a RAB4 na lista da TcEpsina (K2MDA7). As proteínas RABs são um subgrupo da superfamília Ras GTPases e ciclam entre um estado ativo (ligado a GTP) e um estado inativo (ligado a GDP). Diferentes RABs estão localizadas em vesículas e organelas distintas e estão posicionados para demarcar membranas específicas. Assim, por meio de sua localização e estado GTP/GDP, as RABs podem recrutar e/ou ativar seus vários efetores na hora certa e no lugar correto, proporcionando um elemento de regulação para a maquinaria de tráfego vesicular (Bock et al., 2001). As RABs tem um papel fundamental no apoio a pelo menos 3 etapas distintas no processo de tráfego vesicular: brotamento de vesículas, o tráfego de vesículas através do citoplasma e a fusão da vesícula com a membrana alvo (Jeffries et al., 2001).

Em células de mamíferos a RAB11 controla a reciclagem de diversos receptores (Mitchell et al., 2004). Em *T. brucei* a RAB11 co-localiza com a clatrina, o que sugere que possa estar envolvida em um processo dependente de clatrina. A supressão de TbRAB11 por RNAi demonstrou que esta proteína é essencial para as formas sanguíneas (BSF) e procíclicas (PCF) de *T. brucei* (Hall et al., 2005a) e é mais expressa em BSF, fase em que a endocitose é muito mais ativa (Jeffries et al., 2001). Em BSF a ausência de RAB11 não afeta a exocitose de VSG recentemente sintetizadas, nem a endocitose de fase fluida ou a endocitose de transferrina, mas afeta a exportação da transferrina internalizada e está envolvida na regulação dos processos de reciclagem de proteínas de superfície (Hall et al., 2005).

Em *D. discoideum* e *T. cruzi* a Rab11 está localizada no complexo do vacúolo contrátil (CVC). Sabe-se que o vacúolo contrátil, além de regular a osmolaridade da célula e armazenar cálcio, também recicla algumas proteínas de membrana, bem como proteínas ancoradas a GPI, para a membrana plasmática. Esse envio é feito mediante vesículas de clatrina em *D. discoideum*. Foi proposto que o complexo do vacúolo contrátil de *T. cruzi* pode ser um precursor do sistema de reciclagem em outros eucariotos (Niyogi et al., 2014). Estes autores levantam a hipótese de que o envio de proteínas para a membrana seja por intermedio de vesículas revestidas por clatrina. Existem poucos dados na literatura sobre isso, mas a presença de 5 proteínas (AP180, clatrina, AP-4, VAMP1 e RAB11) em nossas análises, relacionadas com

vesículas revestidas por clatrina e que se encontram no CVC, nos leva a pensar que isso possa estar ocorrendo em *T. cruzi*.

Em nossas análises nós identificamos a RAB4 na lista da Epsina (K2MDA7). Em eucariotos superiores a RAB4 atua em diversas vias, incluindo a rápida reciclagem a partir de endossomos iniciais e também o tráfego para degradação no lisossomo (Jovic et al., 2010). Em um estudo proteômico feito em células HeLa a RAB4 está relacionada com AP1 (Borner et al., 2012). Em *T. brucei* a TbRAB4 está envolvida na regulação do tráfego do Golgi para o lisossomo, mas não na endocitose mediada por clatrina ou na reciclagem. Por RNAi mostrou-se que é essencial em BSF e causa a deformação de seus lisossomos (Hall et al., 2004). Em *T. cruzi* não se sabe ainda a função de RAB4.

5.2.6. Auxilina

Em nossas análises encontramos a K4DUQ8 (Auxilina) em ambas as listas. A auxilina é recrutada após o brotamento da vesícula revestida por clatrina, ligando-se aos domínios terminais da cadeia pesada de clatrina (McMahon e Boucrot, 2011) e a uma ATPase da família da HSC70, que também foi encontrada em nossas análises (Q26923 – GRP78) (Jackson et al., 2012). Esta proteína tem um papel fundamental na remoção do revestimento de clatrina após o brotamento da vesícula para que a vesícula possa alcançar seu destino final (Jackson et al., 2012).

Ainda não existem estudos com auxilina em protozoários, mas a presença de auxilina nas nossas análises sugere que em *T. cruzi* a auxilina também atue na remoção do revestimento de clatrina, assim como em outros organismos.

5.2.7. SCAMP

Em nossas análises identificamos uma proteína com um domínio SCAMP na lista da Epsina (K2MW22). SCAMPs (proteínas de membrana das vesículas secretoras) formam uma família de proteínas integrais e são os principais componentes do sistema de reciclagem de superfície da célula eucariótica (Castle e Castle, 2005). Foi mostrado que em células NRK diferentes SCAMPs estão localizadas adjacentes umas às outras na Rede Trans Golgi e nos endossomos de reciclagem (Castle e Castle, 2005). No entanto, não há estudos sobre a localização subcelular e a função das SCAMPs em protozoários. Sua presença em nossas análises sugere que esteja atuando em uma via dependente de clatrina.

5.2.8. GLP1

Em nossas análises encontramos a proteína K4DLS7 (GPL1: Golgi/lysosome glycoprotein) em ambas as imunoprecipitações. Esta proteína é um componente de membrana glicosilada tipo I e abundante no Complexo de Golgi e também em lisossomos de *T. brucei* (Lingnau et al, 1999). Esta proteína também foi localizada no Complexo de Golgi em *Leishmania* e *Toxoplasma*. Esses dados sugerem a conservação da funcionalidade da sequência localizadora (*target sequence*) de Golgi de GLP-1.

Lingnau e colaboradores (1999) sugeriram que GLP-1 é estruturalmente similar às LAMPs (*lysosome associated membrane proteins*) e às LAPs (*lysosomal acid phosphatase*). As proteínas de membrana lisossomais de mamíferos possuem um domínio luminal grande e são altamente glicosiladas, como em GLP-1. Todas estas proteínas de membrana tem um pequeno domínio citosólico, que em LAMPs e LAP foi mostrado ser crítico no endereçamento destas proteínas ao lisossomo através da interação com os complexos adaptadores (Lingnau et al, 1999). Em contraste com estas proteínas lisossomais, GLP-1 é abundante no Complexo de Golgi. Estes autores sugerem que GLP-1 faça a conexão entre a Rede Trans Golgi para os endossomos/lisossomos (Lingnau et al, 1999).

Esta proteína foi identificada em uma proteômica feita nos reservossomos de *T. cruzi* (Sant'Anna et al., 2009). Provavelmente, a GLP-1, assim como a cruzipaína, é modificada no Complexo de Golgi e enviada aos reservossomos em vesículas revestidas por clatrina, para compor a membrana dos reservossomos. Seria interessante ampliar os estudos sobre esta proteína e verificar sua localização em *T. cruzi*, uma vez que as LAMPs não são identificadas neste parasita.

5.3. TRÁFEGO DE VESÍCULAS E MATURAÇÃO DE RESERVOSSOMOS

A presença de um endossomo inicial em *T. cruzi* é controversa, havendo opiniões a favor (Porto-Carreiro et al., 2000) e contra (Soares, 1999). Surgem então duas questões: (1) onde é feita a classificação da carga que vai ser degradada e dos receptores que vão ser reciclados de volta à membrana plasmática (caso voltem), e (2) qual a natureza dos reservossomos?

Já se sabe que proteínas endocitadas por formas epimastigotas de *T. cruzi*, tanto pela bolsa flagelar quanto pelo citóstoma, acumulam-se nos reservossomos (Soares e De Souza, 1991). Além disso, tanto a carga ingerida quanto cruzipaína

(maior hidrolase lisossomal de formas epimastigotas) são encontradas no mesmo reservossomo, o que demonstra que reservossomos também tem função de lisossomo (Soares et al., 1992; Sant'Anna et al., 2008). Por apresentar um pH luminal em torno de pH 6,0 (Soares et al., 1992), os reservossomos também foram comparados aos endossomos tardios de células de mamíferos.

Já foi demonstrado que diversas organelas celulares tem dupla função (organelas híbridas), como no caso do Complexo de Golgi que em plantas também funciona como endossomo inicial (Robinson e Pimpl, 2013). Assim, uma hipótese levantada nesta tese é que o reservossomo pode ser uma organela com características de endossomo inicial, endossomo tardio e lisossomo, sendo, portanto, de difícil comparação com organelas de outros organismos.

Esta hipótese é viável, pois já foi mostrado que reservossomos em uma célula epimastigota não constituem uma população uniforme, tendo sido sugerida a classificação em reservossomos tipo I (matriz com conteúdo denso e vesículas) e tipo II (com matriz vazia) (Soares et al., 1989). Já foi sugerido também que em diferentes reservossomos possa acontecer a classificação, reciclagem ou funções típicas de lisossomos, de acordo com a maturação e posição da organela no corpo celular (Cunha-e-Silva et al., 2006). Já foi observado que dentro da mesma célula podem ser encontrados reservossomos contendo cruzipaina e transferrina (proteína endocitada), somente transferrina e somente cruzipaina (Batista et al., 2014; Figueiredo et al., 2004; Soares et al., 1992).

Nossos resultados de imunoprecipitação de proteínas associadas à clatrina juntamente com dados de literatura nos levam a apresentar uma hipótese sobre o tráfego de vesículas em formas epimastigotas de *T. cruzi*, correlacionando as proteínas encontradas com os distintos compartimentos endocíticos. Esta hipótese engloba uma Teoria da Maturação dos Reservossomos (TMR), incluindo a reciclagem de proteínas e membranas e é descrita abaixo:

Em epimastigotas de *T. cruzi* vesículas endocíticas brotam a partir de dois locais: a bolsa flagelar e o complexo citóstoma/citofaringe (Porto-Carreiro et al., 2000, Soares e DeSouza 1989). A fusão destas vesículas endocíticas daria origem a reservossomos iniciais, os quais desempenhariam o papel de endossomos iniciais, cuja função é receber o material que entra na célula e enviar proteínas para reciclagem na membrana plasmática através de endossomos de reciclagem (Saftig e Klumperman, 2009).

Uma segunda função dos reservossomos iniciais poderia ser enviar proteínas para reciclagem para a membrana da bolsa flagelar através do vacúolo contrátil, que funciona como um endossomo de reciclagem (Niyogi et al., 2014).

Localizada na membrana dos reservossomos há uma H⁺-ATPase do tipo P que promove a acidificação gradual do lúmen da organela (Vieira et al., 2005). Com um abaixamento gradual de pH o reservossomo inicial amadureceria em um reservossomo tardio (pH 6,0), quando começaria a receber enzimas lisossomais recém-sintetizadas do Complexo de Golgi (por exemplo, cruzipaína).

Uma questão interessante ainda em aberto sobre a biologia celular de *T. cruzi* é a enzima lisossomal cruzipaína é direcionada aos reservossomos. Em células eucarióticas as enzimas lisossomais em geral são enviadas ao endossomos tardios por meio de receptor de manose-6-fosfato (Vignon e Rochefort, 1992). Entretanto, a cruzipaína de *T. cruzi* não possui manose-6-fosfato (Cazzulo et al., 1990). Portanto, embora não saibamos como a cruzipaína é sequestrada para envio, é possível que o transporte seja mediado por vesículas revestidas por clatrina/AP1.

Com a contínua redução de pH nos reservossomos tardios as enzimas lisossomais são ativadas, iniciando-se então a degradação de proteínas no lúmen dos reservossomos, que atingem desta maneira um estágio de reservossomo que corresponde a lisossomo.

Após degradação do conteúdo do reservossomo/lissosomo, uma possibilidade é que esta organela seria degradada por autofagia, mantendo-se assim o número de reservossomos por célula. A favor desta hipótese, existem dados na literatura demonstrando a existência de autofagia em *T. cruzi* (Alvarez et al., 2008; Fernandes et al., 2011). Como consequência da degradação dos reservossomos seus componentes seriam reaproveitados pela célula.

À medida em que reservossomos amadureceriam até seu estágio final novos reservossomos iniciais iriam surgindo, mantendo-se assim o número de organelas por célula e a viabilidade da forma epimastigota.

Alternativamente, no ciclo biológico natural que ocorre no tubo digestório do inseto vetor (barbeiro), e em condições artificiais induzidas em laboratório, o stress nutricional -aliado a redução do pH do reservossomo - também é um estímulo que pode transformar reservossomos em lisossomos aptos a degradar proteínas. Durante o processo de metaciclogênese (disparado pelo stress nutricional), o parasita gradualmente deixa de endocitar e assim o conteúdo do reservossomo é consumido, sem reposição do seu conteúdo. Em formas tripomastigotas após a metaciclogênese

resta apenas um reservosomo residual, o qual foi denominado de *lysosome-related organelle* (Sant'Anna et al., 2008).

Como o *T. cruzi* divergiu há muitos milhões de anos atrás (Field et al, 2012), a possibilidade do reservosomo ser uma organela distinta, que acumula funções de endossomo inicial, endossomo tardio e lisossomo é bastante realista. Elucidar o funcionamento desta organela é um dos maiores desafios para estudos futuros e é de extrema importância para o nosso conhecimento sobre a biogênese dos reservossomos e o tráfego intracelular de vesículas em *T. cruzi*.

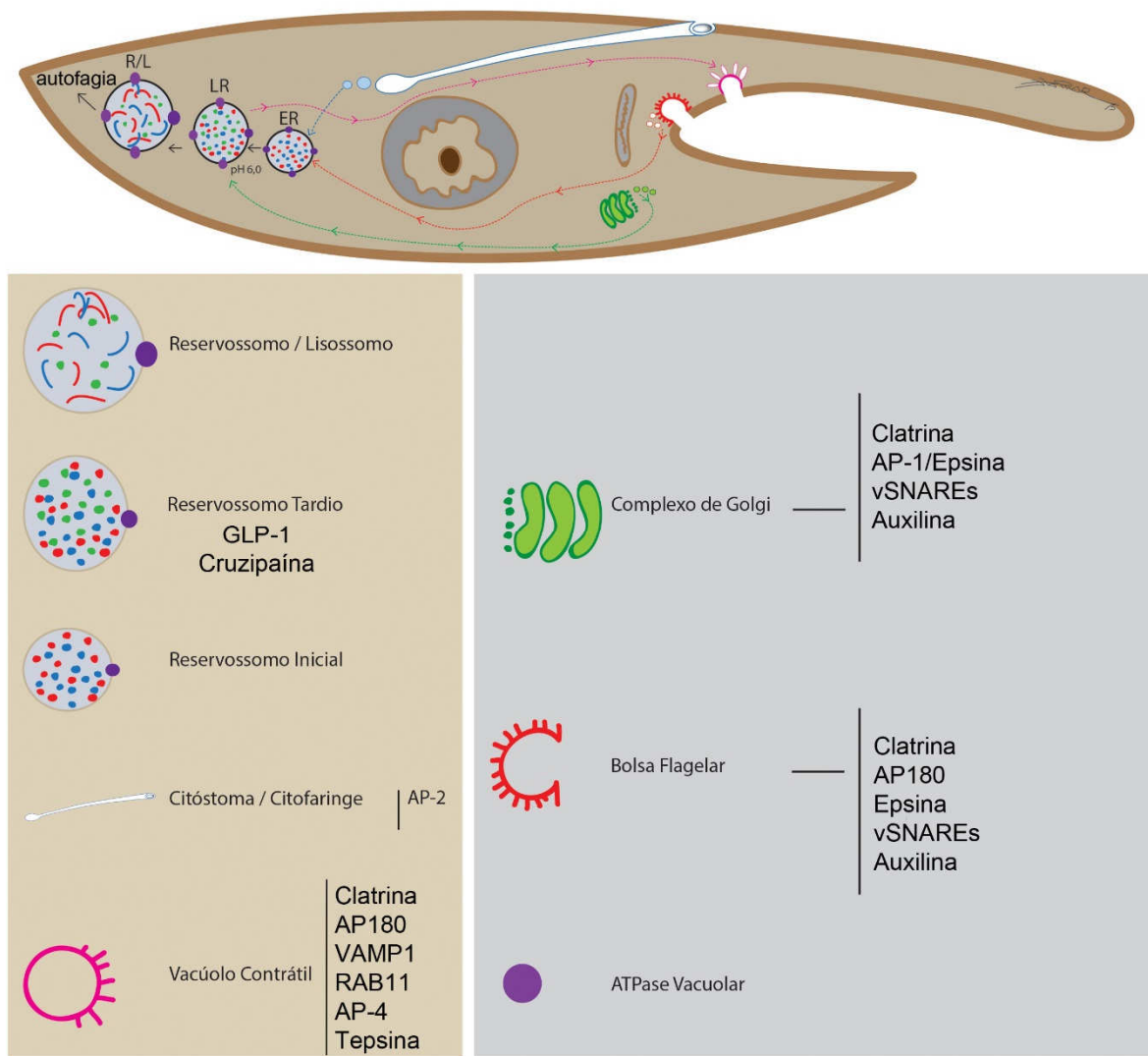


Figura 5.1. Hipótese sobre o tráfego intracelular de vesículas em epimastigotas de *T. cruzi*. Vesículas de endocitose provenientes da bolsa flagelar e do citóstoma/citofaringe fundem-se para formar um reservossomo inicial. Os receptores endocitados que chegam ao reservossomo inicial retornam para a membrana da bolsa flagelar via vacúolo contrátil, o qual funciona como um endossomo de reciclagem. Com a acidificação gradual do lúmen do reservossomo inicial pela ação de uma ATPase vacuolar (com consequente redução do pH), este amadurece a reservossomo tardio e assim começa a receber enzimas lisossomais provenientes do Complexo de Golgi. Com a contínua redução de pH nos reservossomos tardios as enzimas lisossomais são ativadas, iniciando-se então a degradação de proteínas no lúmen dos reservossomos, que atingem desta maneira um estágio de lisossomo, ou LRO (*lysosome related organelle*) como denominado por Sant’Anna et al. (2008). Após degradação do conteúdo do reservossomo/lissosomo esta organela é degradada por autofagia, mantendo-se assim o número de reservossomos por célula. À medida em que reservossomos amadurecem até seu estágio final novos reservossomos iniciais surgem, mantendo-se assim o número de organelas por célula e a viabilidade da forma epimastigota.

6. CONCLUSÕES

6.1 CAPÍTULO 1

- A expressão das cadeias leve e pesada de clatrina é demonstrada em *Trypanosoma cruzi* usando anticorpos homólogos.
- Ambas as proteínas foram localizadas na região da bolsa flagelar e do Complexo de Golgi em diferentes formas evolutivas deste parasita (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas).
- Nossos dados indicam que em *T. cruzi* a endocitose mediada por clatrina ocorre na bolsa flagelar, enquanto que endocitose independente de clatrina ocorre no complexo citóstoma/citofaringe

6.2 CAPÍTULO 2

- Foi possível demonstrar a associação de diversas proteínas à cadeia leve de clatrina em *T. cruzi*, como epsina, AP180, Rab4, Rab11, vSNAREs, Scamps, auxilina, Complexo adaptador 1 e Complexo Adaptador 4.
- Foi possível demonstrar a presença de proteínas hipotéticas com potencial para serem novos atores na montagem de vesículas revestidas por clatrina em tripanosomatídeos, como CAP80, CAP141, K4DPH9 e Q4CUV9.
- AP-1 e AP-4 ligam clatrina em *T. cruzi*. É possível que o Complexo AP-2 esteja atuando em uma endocitose independente de clatrina no citóstoma.
- AP180 pode estar auxiliando a montagem de revestimento de clatrina na endocitose na bolsa flagelar de *T. cruzi*.
- Rab11 atua no vacúolo contrátil de *T. cruzi*, podendo auxiliar na reciclagem de proteínas para a membrana plasmática de um modo dependente de clatrina.
- Propomos que o reservossomo seria uma organela distinta, que acumularia funções de endossomo inicial, endossomo tardio e lisossomo, passando por cada uma dessas fases por maturação.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA CL, VIDAL JC, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA NL. **The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** J Cell Sci 15:2227-2237, 2014.

ALLEN RD, NAITOH Y. **Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa.** Int Rev Cytol 215:351-394, 2002.

ALLEN CL, GOULDING D, FIELD MC. **Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*.** EMBO J 22: 4991–5002, 2003.

ALSFORD S, KELLY JM, BAKER N, HORN D. **Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes.** Parasitology 140:1478-1491, 2013.

ALVAREZ VE, KOSEC G, SANT'ANNA C, TURK V, CAZZULO JJ, TURK B. **Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*.** J Biol Chem 6:3454-3464, 2008.

APHASIZHEV R, APHASIZHEVA I. **Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control.** Biochimie 100: 125-131, 2014.

BAGGETT JJ, WENDLAND B. **Clathrin Function in Yeast Endocytosis** Traffic 2: 297–302, 2001.

BAROIS N, BAKKE O. **The adaptor protein AP-4 as a component of the clathrin coat machinery: a morphological study.** Biochem J. 385:503-10. 2005.

BATISTA M, MARCHINI FK, CELEDON PA, FRAGOSO SP, PROBST CM, PRETI H, OZAKI LS, BUCK GA, GOLDENBERG S, KRIEGER MA: **A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*.** BMC Microbiol 13:259, 2010.

BATISTA CM, MEDEIROS LC, EGER I, SOARES MJ. **mAb CZP-315.D9: an anti recombinant cruzipain monoclonal antibody that specifically labels the**

reservosomes of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biomed Res Int. 2014:714749, 2014.

BOCK JB, MATERN HT, PEDEN AA, SCHELLER RH. **A genomic perspective on membrane compartment organization.** Nature 409: 839-841, 2001.

BONIFACINO JS, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. **Coat proteins: shaping membrane transport.** Nat Rev Mol Cell Biol 4: 409-414, 2003.

BORNER GH, ANTROBUS R, HIRST J, BHUMBRA GS, KOZIK P, JACKSON LP, SAHLENDER DA, ROBINSON MS. **Multivariate proteomic profiling identifies novel accessory proteins of coated vesicles.** J Cell Biol 197: 141-60, 2012.

BRODSKY FM. **Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein.** Annu Rev Cell Dev Biol 28: 309-336, 2012.

CAMARGO EP. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** Rev Inst Med Trop 12: 93-100, 1964.

CASTLE A, CASTLE D. **Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface.** J Cell Sci 118: 3769-3780, 2005.

CAZZULO JJ, HELLMAN U, COUSO R, PARODI AJ. **Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues.** Mol Biochem Parasitol 38:41-8, 1990.

CHAGAS C. **Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159-218, 1909.

CHIDAMBARAM S, MULLERS N, WIEDERHOLD K, HAUCKE V, VON MOLLARD GF. **Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH)**

domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport.

J Biol Chem 279:4175-4179, 2004.

CONTRERAS VT, SALLES JM, THOMAS N, MOREL CM, GOLDENBERG S. ***Invitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol

Biochem Parasitol 16: 315-327, 1985.

CONTRERAS VT, ARAUJO-JORGE TC, BONALDO MC, THOMAZ N, BARBOSA HS, MEIRELLES MN, GOLDENBERG S. **Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem

Inst Oswaldo Cruz 83: 123-133, 1988.

CORRÊA AF, ANDRADE LR, SOARES MJ. **Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms.**

Parasitol Res 88:875-80, 2002.

CORRÊA JR, ATELLA GC, MENNA-BARRETO RS, SOARES MJ. **Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites.** J Euk Microbiol 54: 297-302, 2007.

CORRÊA JR, ATELLA GC, BATISTA MM, SOARES MJ: **Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis.** Exp Parasitol 119: 58–66, 2008.

CUNHA-E-SILVA N, SANT'ANNA C, PEREIRA MG, PORTO-CARREIRO I, JEOVANO AL, DE SOUZA W. **Reservosomes: multipurpose organelles?** Parasitol Res 99:325-327, 2006.

DE SOUZA W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Curr Pharm Des 8: 269-285, 2002.

DE SOUZA W, SANT'ANNA C, CUNHA-E-SILVA NL. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** Progress Histochem Cytochem 44: 67-124, 2009.

DELL'ANGELICA EC, MULLINS C, BONIFACINO JS. **AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors.** J Biol Chem 274:7278-7285, 1999.

DITTIE AS, HAJIBAGHERI N, TOOZE SA. **The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor.** J Cell Biol 132: 523-536, 1996.

DOCAMPO R, MORENO SNJ. **Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites.** Parasitol Today 15: 443-448, 1999.

DOCAMPO R, MORENO SN. **Acidocalcisomes.** Cell Calcium 50:113-119, 2011.

EDELING MA, SMITH C, OWEN D. **Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures.** Nat Rev Mol Cell Biol 7: 32-44, 2006.

FERNANDES MC, DA SILVA EN, PINTO AV, DE CASTRO SL, MENNA-BARRETO RF. **A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol 139: 26-36, 2011.

FIELD MC, NATESAN SK, GABERNET-CASTELLO C, KOUMANDOU VL: **Intracellular trafficking in the trypanosomatids.** Traffic 8:629–639, 2007.

FIELD MC, ADUNG'A V, OBADO S, CHAIT BT, ROUT MP. **Proteomics on the rims: insights into the biology of the nuclear envelope and flagellar pocket of trypanosomes.** Parasitology 139:1158-1167, 2012.

FIGUEIREDO RC, SOARES MJ. **The complex de Golgi of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms.** J Submicrosc Cyt Pathol 27: 209-215, 1995.

FIGUEIREDO RC, ROSA DS, GOMES YM, NAKASAWA M, SOARES MJ. **Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation**

between endocytosis of nutrients and cell differentiation. Parasitol 129:431-8, 2004.

GABERNET-CASTELLO C, DACKS JB, FIELD MF. **The Single ENTH-Domain Protein of Trypanosomes; Endocytic Functions and Evolutionary Relationship with Epsin.** Traffic 10: 894-911, 2009.

GIRARD M, ALLAIRE PD, BLONDEAU F, MCPHERSON PS. **Isolation of clathrin-coated vesicles by differential and density gradient centrifugation.** Curr Protoc Cell Biol 3:3.13, 2005 a.

GIRARD M, ALLAIRE PD, MCPHERSON PS, BLONDEAU F. **Non-stoichiometric relationship between clathrin heavy and light chains revealed by quantitative comparative proteomics of clathrin-coated vesicles from brain and liver.** Mol Cell Proteomics48:1145-1154, 2005 b.

GHOSH P, DAHMS NM, KORNFELD S. **Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the table.** Nat Rev Mol Cell Biol 4: 202-212, 2003.

HALL BS, PAL A, GOULDING D, FIELD MC. **Rab4 is an essential regulator of lysosomal trafficking in trypanosomes.** J Biol Chem 279:45047–45056, 2004.

HALL BS, SMITH E, LANGER W, JACOBS LA, GOULDING D, FIELD MC. **Developmental variation in Rab11-dependent trafficking in *Trypanosoma brucei*.** Eukaryot Cell 4:971–980, 2005.

HAWRYLUK MJ, KEYEL PA, MISHRA SK, WATKINS SC, HEUSER JE, TRAUB LM. **Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein.** Traffic 7:262-281, 2006.

HIRST J, BARLOW LD, FRANCISCO GC, SAHLENDER DA, SEAMAN MN, DACKS JB, ROBINSON MS. **The fifth adaptor protein complex.** PLoS Biol 10:3, 2012.

HIRST J, BORNER GHH, ANTROBUS R, PEDEN AA, HODSON NA, SAHLENDER DA, ROBINSON MS. **Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the “knocksideways” System.** *Cur Biol* 22: 1711-1716, 2012.

HIRST J, IRVING C, BORNER GH. **Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia.** *Traffic*14:153-164, 2013.

HSU VW, LEE SY, YANG JS. **The evolving understanding of COPI vesicle formation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:360-364, 2009.

JACKSON LP, KÜMMEL D, REINISCH KM, OWEN DJ. **Structures and mechanisms of vesicle coat components and multisubunit tethering complexes.** *Curr Opin Cell Biol* 24:475-483, 2012.

JEFFRIES TR, MORGAN GW, FIELD MC. **A developmentally regulated rab11 homologue in *Trypanosoma brucei* is involved in recycling processes.** *J Cell Sci* 114:2617–2626, 2001.

JOVIC M, SHARMA M, RAHAJENG J, CAPLAN S. **The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads.** *Histol Histopathol* 25:99-112, 2010.

KALB, L. **Clatrina em *Trypanosoma cruzi*: identificação do gene e localização celular.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR- PR, 2011.

KALB LC, FREDERICO YC, BATISTA CM, EGER I, FRAGOSO SP, SOARES MJ. **Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*.** *BMC Cell Biol*19:15-23, 2014.

KIRCHHAUSEN T. **Clathrin.** *Annu Rev Biochem* 69: 699-727, 2000.

LE BORGNE R, HOFLACK B. **Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN.** *J Cell Biol* 137:335-345, 1997.

LEE GJ, KIM H, KANG H, JANG M, LEE DW, LEE S, HWANG I. **EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVTI12, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells.** *Plant Physiol* 143:1561-1575, 2007.

LEFKIR Y, MALBOUYRES M, GOTTHARDT D, OZINSKY A, CORNILLON S, BRUCKERT F, ADEREM AA, SOLDATI T, COSSON P, LETOURNEUR F. **Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis.** *Mol Biol Cell* 15: 861-869, 2004.

LEGENDRE-GUILLEMIN V, WASIAK S, HUSSAIN NK, ANGERS A, MCPHERSON PS. **ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding.** *J Cell Sci* 117: 9-18, 2004.

LINGNAU A, ZUFFEREY R, LINGNAU M, RUSSELL DG. **Characterization of tGLP-1, a Golgi and lysosome-associated, transmembrane glycoprotein of African trypanosomes.** *J Cell Sci* 18:3061-3070, 1999.

MALDONADO-BAEZ L, DORES MR, PERKINS EM, DRIVAS TG, HICKE L, WENDLAND B. **Interaction between Epsin/Yap180 adaptors and the scaffolds Ede1/Pan1 is required for endocytosis.** *Mol Biol Cell* 19:2936-2948, 2008.

MANNA PT, KELLY S, FIELD MC. **Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids.** *Mol Phylogenet Evol* 67:123-128, 2013.

MCPMAHON HT, BOUCROT E. **Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22:517-33. 2011;

MELO LDB, SANT'ANNA C, REIS SA, LOURENÇO D, DE SOUZA W, LOPES UG, CUNHA-E-SILVA NL. **Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue.** *Parasitol* 135: 955-965, 2008.

MILDER R, DEANE MP. **The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*.** J Protozool 16: 730-737, 1969.

MILLER SE, COLLINS BM, MCCOY AJ, ROBINSON MS, OWEN DJ. **A SNARE-adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles.** Nature 22:570-574, 2007.

MILLS IG, PRAEFCKE GJ, VALLIS Y, PETER BJ, OLESEN LE, GALLOP JL, BUTLER PJ, EVANS PR, MCMAHON HT. **EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking.** J Cell Biol 160:213-222, 2003.

MITCHELL, H., A. CHOUDHURY, R. E. PAGANO, AND E. B. LEOF. **Ligand dependent and independent transforming growth factor-receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11.** Mol Biol Cell 15:4166–4178, 2004.

MOREIRA CMN. **Identificação dos genes, expressão e localização celular do complexo adaptador 1 em *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR, 2013.

MURUNGI E, BARLOW LD, VENKATESH D, ADUNG'A VO, DACKS JB, FIELD MC, Christoffels A. **A comparative analysis of trypanosomatid SNARE proteins.** Parasitol Int 63:341-348, 2013.

NIYOGI S, MUCCI J, CAMPETELLA O, DOCAMPO R. **Rab11 regulates trafficking of trans-sialidase to the plasma membrane through the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*.** PLoS Pathog 26:e1004224, 2014.

OBERHOLZER O, MORAND S, KUNZ S, SEEBECK T. **A vector series for rapid PCR-mediated C-terminal in situ tagging of *Trypanosoma brucei*.** Mol Biochem Parasitol 145:117–120, 2006.

OPPERDOES FR, MICHELS PAM. **The evolutionary origin of glycosomes.** Parasitol Today 7:150-109, 1991.

PEARSE BM, CROWTHER RA. **Structure and assembly of coated vesicles.** Annu Rev Biochem Biophys Com 16: 49-68, 1987.

PORTO-CARREIRO I, ATTIAS M, MIRANDA K, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA N: ***Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** Eur J Cell Biol 79:858–869, 2000.

PRAEFCKE GJ, FORD MG, SCHMID EM, OLESEN LE, GALLOP JL, PEAK-CHEW SY, VALLIS Y, BABU MM, MILLS IG, MCMAHON HT. **Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis.** EMBO J 23:4371-4383, 2004.

PREKERIS R, YANG B, OORSCHOT V, KLUMPERMAN J, SCHELLER RH. **Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking.** Mol Biol Cell 10:3891-908, 1999.

REIDER A, WENDLAND B. **Endocytic adaptors - social networking at the plasma membrane.** J Cell Sci 124:1613-22, 2011.

REPASS SL, BRADY RJ, O'HALLORAN TJ. ***Dictyostelium* Hip1r contributes to spore shape and requires epsin for phosphorylation and localization.** J Cell Sci 120:3977-3988, 2007.

ROTH MG. **Integrating actin assembly and endocytosis.** Dev Cell 13:3-4, 2007.

ROBINSON DG, PIMPLP. **Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue.** Trends Plant Sci. 19:134-139. 2013.

ROBINSON MS. **Adaptable adaptors for coated vesicles.** Trends Cell Biol 14:167-174, 2004.

RODRIGUES JC, GODINHO JL, DE SOUZA W. **Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure.** Subcell Biochem 74:1-42. 2014.

ROHLOFF P, MONTALVETTI A, DOCAMPO R. **Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*.** J Biol Chem 279: 52270-52281, 2004.

SAFTIG P, KLUMPERMAN J. **Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function.** Nat Rev Mol Cell Biol 10:623-635, 2009.

SALEEM M, MORLOT S, HOHENDAHL A, MANZI J, LENZ M, ROUXA. **A balance between membrane elasticity and polymerization energy sets the shape of spherical clathrin coats.** Nat Commun 19:6249, 2015.

SANTOS CC, SANT'ANNA C, TERRES A, CUNHA-E-SILVA NL, SCHARFSTEIN J, LIMA APC. **Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells.** J Cell Sci 118: 901-915, 2005.

SANT'ANNA C, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA N. **Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*.** Microsc Microanal 10:637-646, 2004.

SANT'ANNA C, PARUSSINI F, LOURENÇO D, DE SOUZA W, CAZZULO JJ, CUNHA-E-SILVA NL. **All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles.** Histochem Cell Biol 6:1187-1198, 2008.

SANT'ANNA C, NAKAYASU ES, PEREIRA MG, LOURENÇO D, DE SOUZA W, ALMEIDA IC, CUNHA-E-SILVA NL. **Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes.** Proteomics 9:1782-1794, 2009.

SIMMEN T, HONING S, ICKING A, TIKKANEN R, HUNZIKER W. **AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells.** Nat Cell Biol 4:154–159, 2002.

SCOTT CC, VACCA F, GRUENBERG J. **Endosome maturation, transport and functions.** Semin Cell Dev Biol 4:1084-9521, 2014.

SHAPIRO TA, ENGLUND PT. **The structure and replication of kinetoplast DNA.** Annu Rev Microbiol 49: 117-143, 1995.

SOARES MJ. **The reservosome of Trypanosoma cruzi epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1:139-141, 1999.

SOARES MJ, DE SOUZA W. **Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by Trypanosoma cruzi.** Parasitol Res 77:461-468, 1991.

SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, BONALDO MC, GOLDENBERG S, DE SOUZA W. **A stereological study of the differentiation process in Trypanosoma cruzi.** Parasitol Res 75: 522-527, 1989.

SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. **Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoon Trypanosoma cruzi.** J CellSci 102: 157–167, 1992.

SONG J, LEE MH, LEE GJ, YOO CM, HWANG I. **Arabidopsis EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VTI11, and VSR1.** Plant Cell 18: 2258-2274, 2006.

SOUZA LC, PINHO RE, LIMA CV, FRAGOSO SP, SOARES MJ. **Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea).** Mem Inst Oswaldo Cruz 108:631-636, 2013.

STUART K. **Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference.** Mol Biochem Parasitol 9:93-104, 1983.

TAZEH NN, SILVERMAN JS, SCHWARTZ KJ, SEVOVA ES, SUTTERWALASS, BANGS JD. **Role of AP-1 in developmentally regulated lysosomal trafficking in Trypanosoma brucei.** Eukaryotic Cell 8: 1352-1361, 2009.

TYLER KM, ENGMAN DM. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** Internat J arasit 31: 472-481, 2001.

TRAUB LM. **Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection.** J Cell Biol. 163:203-208, 2003.

TRAUB LM, KORNFELD S. **The trans-Golgi network: a late secretory sorting station.** Cur Opin Cell Biol9: 527-533, 1997.

ULRICH PN, JIMENEZ V, PARK M, MARTINS VP, ATWOOD J 3RD, MOLES K, COLLINS D, ROHLOFF P, TARLETON R, MORENO SN, ORLANDO R, DOCAMPO R. **Identification of contractile vacuole proteins in *Trypanosoma cruzi*.** PLoS One 18: 18013, 2011.

VATARUNAKAMURA C, UEDA-NAKAMURA T, DE SOUZA W. **Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanningelectron microscopy using secondary and backscattered electron imaging.** FEMS Microbiol Lett 242: 227-230, 2005.

VIEIRA M, ROHLOFF P, LUO S, CUNHA-e-SILVA N, DE SOUZA W, DOCAMPO R. **Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*.** Biochem J 392:467-474, 2005.

VIGNON F, ROCHEFORT H. **Interactions of pro-cathepsin D and IGF-II on the mannose-6-phosphate/IGF-II receptor.**Breast Cancer Res Treat 22:47-57, 1992.

World Health Organization (2014) Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (updated Março 2014). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em 01.12.2014

YBE JA, BRODSKY FM, HOFMANN K, LIN K, LIU SH, CHEN L. **Clathrin selfassembly is mediated by a tandemly repeated superhelix.** Nature 399: 371–375, 1999

ANEXO

CARACTERIZAÇÃO DE ACTINA EM TRYPANOSSOMATÍDEOS

Durante o período desta tese, foram obtidos dados referentes a Actina em tripanossomatídeos e publicados nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Título: Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea)

Autores: Ligia Cristina Kalb Souza, Rosana Elisa Gonçalves Gonçalves Pinho, Carla Vanessa de Paula Lima, Stênio Perdigão Fragoso e Maurilio José Soares

Revista: Mem Inst Oswaldo Cruz, 108: 631-636, 2013.

RESUMO

A presença de actina em tripanossomatídeos heteroxenicos e monoxenicos foi observada utilizando um anticorpo policlonal produzido contra toda a sequência do produto do gene da *actina* de *Trypanosoma cruzi*, que codifica uma proteína de 41,9 kDa. A análise por western blot mostrou que este anticorpo reage com um polipeptídeo de aproximadamente 42 kDa nos lisados totais de células de parasitas que tem como alvo mamíferos (*T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*), insetos (*Angomonas deanei*, *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Strigomonas culicis*) e plantas (*Phytomonas serpens*). Um único polipeptídeo de aproximadamente 42 kDa foi detectado nos lisados totais de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* em níveis de expressão semelhantes. Microscopia confocal mostrou que a actina foi expressa por todo o citoplasma de todos os tripanossomatídeos testados. Estes dados demonstram que a expressão de actina é generalizada em tripanossomatídeos.

Palavras-chave: actina - microscopia confocal - tripanossomatídeos - *Trypanosoma cruzi*.

Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea)

Ligia Cristina Kalb Souza, Rosana Elisa Gonçalves Gonçalves Pinho,
Carla Vanessa de Paula Lima, Stênio Perdigão Fragoso, Maurilio José Soares/+

Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Curitiba, PR, Brasil

Heteroxenic and monoxenic trypanosomatids were screened for the presence of actin using a mouse polyclonal antibody produced against the entire sequence of the Trypanosoma cruzi actin gene, encoding a 41.9 kDa protein. Western blot analysis showed that this antibody reacted with a polypeptide of approximately 42 kDa in the whole-cell lysates of parasites targeting mammals (T. cruzi, Trypanosoma brucei and Leishmania major), insects (Angomonas deanei, Crithidia fasciculata, Herpetomonas samuelpessoai and Strigomonas culicis) and plants (Phytomonas serpens). A single polypeptide of approximately 42 kDa was detected in the whole-cell lysates of T. cruzi cultured epimastigotes, metacyclic trypomastigotes and amastigotes at similar protein expression levels. Confocal microscopy showed that actin was expressed throughout the cytoplasm of all the tested trypanosomatids. These data demonstrate that actin expression is widespread in trypanosomatids.

Key words: actin - confocal microscopy - trypanosomatids - *Trypanosoma cruzi*

Actin is a conserved filamentous protein that plays a major role in diverse eukaryotic cell processes, including cytokinesis and motility. These processes depend on the interactions of actin monomers and filaments with numerous other proteins and are driven by a dynamic remodeling of the actin cytoskeleton, including the assembly of G-actin (a monomeric form) into F-actin (a filamentous form) and the reverse disassembly (Pollard & Cooper 2009, Lee & Dominguez 2010). Furthermore, there is increasing evidence, from studies involving a number of cell types, demonstrating the importance of actin during endocytosis (Robertson et al. 2009, Galleta et al. 2010).

Although actin is abundant and well characterised in higher eukaryotic cells, until recently, very little information existed on its expression and distribution in protozoa of the Trypanosomatidae family (Kohl & Gull 1998). Actin filaments have been only poorly visualised in trypanosomatids through transmission electron microscopy (Sahasrabudhe et al. 2004). However, their presence has been demonstrated by immunofluorescence in the cytoplasm of the pathogenic species *Trypanosoma brucei* (García-Salcedo et al. 2004), *Trypanosoma cruzi* (de Souza et al. 1983, Mortara 1989, Melo et al. 2008, Cevallos et al. 2010) and *Leishmania major* (Sahasrabudhe et al. 2004). Interestingly, the immunogenic and filament-forming properties of *Leishmania* actin differ significantly from those of actin in other eukaryotes, particularly plasmodia, yeast and mammalian actins (Sahasrabudhe et al. 2004).

The first studies describing the sub-cellular localisation of actin in trypanosomatids were performed using heterologous antibodies against actin from other organisms. Antibodies raised against rabbit actin detected a 43 kDa protein in *T. cruzi* and *Leishmania mexicana* (Mortara 1989) and antibodies raised against *Entamoeba histolytica* actin showed a positive reaction in the flagellum of *T. cruzi* (de Souza et al. 1983). More recently, the sub-cellular localisation of *T. cruzi* actin was evaluated using a homologous antibody and an immunofluorescence analysis of the different developmental forms of this parasite (epimastigotes, bloodstream trypomastigotes and amastigotes). This assay revealed many rounded and punctuated structures, resembling patches, distributed throughout the cytoplasm, which had no association with subpellicular microtubules or with the nuclear or kinetoplast DNA (Melo et al. 2008). Actin-like filaments were also demonstrated in *L. major* using a homologous antibody and actin was present in the promastigote form as granules, as short filaments or bundles and as patches (Sahasrabudhe et al. 2004).

Here, we have screened pathogenic and non-pathogenic species of trypanosomatids for the presence of actin by western blotting using a homologous antibody coded with the entire sequence of the *T. cruzi* actin gene (TcActin). Furthermore, we have analysed the expression of this protein in different developmental forms of *T. cruzi* (cultured epimastigotes, in vitro-derived trypomastigotes and cell culture-derived amastigotes) and studied its subcellular localisation by confocal microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Reagents - Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG) was purchased from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

doi: 10.1590/0074-0276108052013015

Financial support: CNPq, FIOCRUZ

MJS and SPF receive research fellowships from CNPq.

+ Corresponding author: maurilio@tecpa.br

Received 12 December 2012

Accepted 26 February 2013

Molecular weight markers (Benchmark Protein Ladder, 10-220 kDa) and the fluorescent dye Hoechst 33342 trihydrochloride were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA). A polyclonal mouse antibody against *T. cruzi* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was kindly provided by F Morini [Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), state of Paraná, Brazil].

Parasites - *T. cruzi* clone Dm28c (Contreras et al. 1988) epimastigote forms were grown at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo 1964) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), with weekly passages. Epimastigotes were differentiated in vitro into metacyclic trypomastigotes in triatomine artificial urine (TAU)3AAG medium (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ and 8 mM phosphate buffered saline (PBS) at pH 6.0 supplemented with 10 mM L-proline, 50 mM L-sodium glutamate, 2 mM L-sodium aspartate and 10 mM D-glucose) (Contreras et al. 1985). Briefly, five-day-old cultured epimastigotes were harvested by centrifugation for 10 min at 8,500 g. The parasites were then incubated at a density of 5 x 10⁸ cells/mL for 2 h at 28°C in TAU medium. Cells (at a 1:100 dilution) were further incubated for 96 h at 28°C in culture flasks that contained no more than 1 cm deep of TAU3AAG medium. The number of living epimastigotes and metacyclic trypomastigotes was then determined by cell counting via a Neubauer chamber after 24 h, 48 h and 72 h. The metacyclic trypomastigotes were purified from the 72 h-old cultures by DEAE-51 cellulose chromatography (Contreras et al. 1985).

To obtain amastigote forms, metacyclic trypomastigotes derived in vitro were used to infect Vero cells (ATCC CRL-1586), which were then cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 5% FBS and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. After 10 days of infection, the amastigotes released into the supernatant were harvested by centrifugation at 1,000 g for 5 min.

L. major promastigotes were grown at 28°C in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS and 10 mg/L haemin. Procyclic trypomastigote forms of *T. brucei* were cultivated at 28°C in SDM79 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 10 mg/L haemin (Brun & Schonenberger 1979). *Strigomonas culicis* (formerly *Blastocrithidia culicis*) (Teixeira et al. 2011), *Angomonas deanei* (formerly *Crithidia deanei*) (Teixeira et al. 2011) with its bacterial endosymbiont, *Crithidia fasciculata* and *Herpetomonas samuelpessoai* were grown at 28°C in LIT medium supplemented with 10% FBS with daily passages. *Phytomonas serpens* was grown at 28°C in GYPMY medium (Itow-Jankevicius et al. 1993) with passages every three days.

Cloning and expression of TcActin - The complete coding sequence of TcActin (Dm28c clone) was amplified using synthetic primers that were based on the *T. cruzi* CL Brener sequence (accession Tc00.1047053510571.30) available from the *T. cruzi* genome database (genedb.org). The putative open reading frame of 1,131 bp, encoding a protein of 41.9 kDa, was amplified by poly-

merase chain reaction (PCR) using forward primer 5'CGGAATTCATGTCTGACGAAGAACAGTCCGC-TATT3', reverse primer 5'ATTCGTCGACTCATTGT TGTGCACAATGCTTGGGCCTGCCTCGTC3' and the genomic DNA as a template. The PCR products, flanked by EcoRI and Sall sites, were inserted into a vector (pGEX-4T₁, Invitrogen) containing glutathione-S-transferase (GST). Positive clones were purified with a QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and sequencing was performed at Macrogen Inc (Seoul, Korea). The correct sequence was confirmed by the BLAST algorithm. The amplified fragments inserted into the pGEX-4T₁ vector (Invitrogen) were used to transform *Escherichia coli* strain Top 10. Production of the recombinant protein was induced by adding 0.3 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside. Inclusion bodies containing the recombinant protein were isolated and the recombinant protein was purified by electro-elution.

Polyclonal antiserum - A polyclonal antiserum against the expressed recombinant TcActin was produced in albino Swiss mice. Approximately 50 µg of purified, GST-tagged TcActin was mixed 1:1 with complete Freund's adjuvant and inoculated intraperitoneally in mice. After 15 days, the animals received three consecutive boosts at two-week intervals, each containing an additional 20 µg of the antigen and 77 µL of Alu-Gel (Serva, Heidelberg, Germany) as adjuvant. The antiserum was harvested five days after the last booster injection. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the guide for animal use of the Fiocruz and the protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation (P-0434/07).

Western blot analysis - For immunoblotting analysis, all of the parasites' total protein extracts were prepared by resuspending the PBS-washed parasites (10⁶ cells/µL) in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer to lyse the cells (10⁷ cells/lane). The proteins were fractionated in 13% polyacrylamide gels by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond C, Amersham Biosciences, England), according to standard protocols (Sambrook et al. 1989). Following the transfer of the proteins to nitrocellulose, the membranes were blocked with 5% non-fat milk and 0.05% Tween-20 in PBS. The membranes were then incubated for 2 h with a blocking buffer containing the polyclonal antiserum raised against recombinant protein TcActin (1:200 dilution). After three washings with 0.05% Tween-20 in PBS, the nitrocellulose was incubated for 1 h with HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:10,000 dilution). The membrane was again washed three times with 0.05% Tween-20 in PBS and the reactive bands were visualised using the BCIP-NBT solution, as described by the manufacturer.

Furthermore, 15 µg of the total proteins obtained from the *T. cruzi* cultured epimastigotes, metacyclic trypomastigotes and cell culture-derived amastigotes, as well as those from the Vero cells, were resolved on SDS-PAGE (13%) gels. Following the transfer of the proteins to nitrocellulose, the membrane was incubated for 2 h with a blocking buffer containing both the polyclonal

antiserum raised against recombinant protein TcActin (1:200 dilution) and a polyclonal antiserum against *T. cruzi* GAPDH. After three washings with 0.05% Tween-20 in PBS, the membranes were incubated as described above. The relative amount of actin and GAPDH (1:250 dilution) expressed by each developmental stage was estimated using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Immunofluorescence assays - All of the parasites (including *T. cruzi* epimastigotes, amastigotes and metacyclic trypomastigotes) were washed and resuspended at a density of 10^7 cells/mL in PBS. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT), washed twice in PBS and then adhered to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips, which were themselves incubated for 20 min at RT. The cells were made permeable by 2 min of incubation with 0.1% Triton X-100 in PBS; next, they were washed with PBS, blocked by incubation overnight with 1% BSA in PBS and incubated for 1 h with the polyclonal antiserum against TcActin (1:150 dilution). After another washing, the samples were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG at a 1:800 dilution. The nuclear and kinetoplast DNA were stained by incubation with Hoechst 33342. After extensive washing, the coverslips were mounted onto glass microscope slides using N-propyl-gallate for anti-fading. The samples were examined using a Leica SP5 confocal laser microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) and the images were processed for better contrast using Adobe Photoshop CS3 software.

RESULTS

A polypeptide of approximately 41.9 kDa, encoded by the entire sequence of the *TcActin*, was used to obtain a polyclonal TcActin antibody prepared in mice. When used in western blotting to probe for the presence of actin in trypanosomatids, this antibody reacted with a peptide of approximately 42 kDa in the whole-cell lysates of multiple species (Fig. 1A), including parasites targeting mammals (*T. cruzi* epimastigotes, *T. brucei* procyclic forms and *L. major* promastigotes), insects (*A. deanei*, *C. fasciculata* and *S. culicis*) and plants (*P. serpens*). Interestingly, two close weak bands near that weight were recognised in the *P. serpens* blot.

The expression of actin was also analysed by western blotting in different life stages of *T. cruzi*, as well as in Vero cells, using the TcActin antibody (Fig. 1B). This procedure identified a single peptide of approximately 42 kDa (Fig. 1B, upper bands) in the whole-cell lysates of all tested *T. cruzi* stages (culture epimastigotes, metacyclic trypomastigotes and cell-derived amastigotes). A similar actin expression level was observed in all of the developmental forms, as confirmed by band densitometry analysis conducted using ImageJ software (Fig. 1C). The GAPDH banding pattern (Fig. 1B, lower bands) was used as a loading control.

Confocal microscopy and the TcActin antibody were used to visualise the cellular distribution of actin in different trypanosomatids, both monoxenic (*A. deanei* with its bacterial endosymbiont, *C. fasciculata*, *H.*

samuelpessoai and *S. culicis*) and heteroxenic (*P. serpens*). In the tested parasites, this antibody recognised the protein in all of the cells in the population (data not shown). The positive reaction was homogeneously dispersed throughout the cytoplasm of all the cells (Fig. 2). No reaction was observed in the flagellum. In *A. deanei*, the labelling was more intense at the bacterial endosymbionts, which are located at the posterior cell region.

In *T. cruzi*, punctate labelling for TcActin was found throughout the cytoplasm of epimastigotes, metacyclic trypomastigotes and amastigotes. No reaction was observed in microtubule-containing structures such as the flagellum and the plasma membrane (Fig. 3). In the trypomastigotes, the positive granules were arranged in linear arrays (Fig. 3H). In the epimastigotes and amastigotes, positive reactions were occasionally found in elongated structures that may represent the cytostome/cytopharynx (Fig. 3B).

DISCUSSION

In the present study, a mouse TcActin polyclonal antibody was cross-reacted with different trypanosomatids, including some monoxenic species found in insects (*A. deanei*, *C. fasciculata*, *H. samuelpessoai* and *S. culicis*) as well as a plant species (*P. serpens*). Both the presence of actin genes and the expression of the encoded protein have previously been demonstrated in some pathogenic heteroxenic trypanosomatids, such as *T. brucei* (García-Salcedo et al. 2004), *T. evansi* (Li et al. 2009), *T. cruzi* (de Souza et al. 1983, Mortara 1989, Melo et al. 2008), *T. rangeli* (Toaldo et al. 2001) and *L. major* (Sahasrabudhe et al. 2004). The cross-reaction of our TcActin polyclonal antibody with *T. brucei* procyclic forms and *L. major* promastigotes, both of which are parasites known to ex-

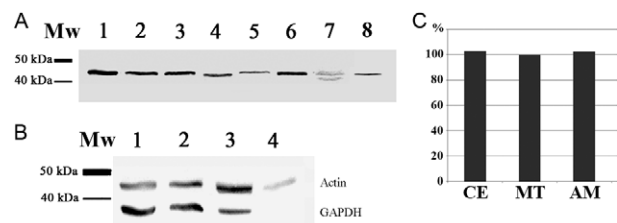


Fig. 1: western blot using the *Trypanosoma cruzi* actin gene (TcActin) antibody. A: different trypanosomatids were probed with detection of a single band of about 42 kDa, except for *Phytomonas serpens* (Lane 7) where two close faint bands could be observed. Lanes 1-8 contained 10^7 cells (1: *T. cruzi*; 2: *Trypanosoma brucei*; 3: *Leishmania major*; 4: *Strigomonas culicis*; 5: *Crithidia fasciculata*; 6: *Angomonas deanei* with symbiont; 7: *Phytomonas serpens*; 8: *Herpetomonas samuelpessoai*); B: different *T. cruzi* stages probed against the anti-TcActin antibody (upper bands) and an anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase antibody (lower bands) [1: culture epimastigote (CE) in liver infusion tryptose (LIT) medium; 2: metacyclic trypomastigote (MT); 3: amastigote (AM); 4: Vero cells (actin control); 1-4 contained 15 μ g protein/lane]; C: actin expression level as evaluated by integrated density of protein bands (using GAPDH band as normaliser) analysed by the ImageJ software (n = 3). To evaluate the actin expression in AM, the Vero cell band signal was subtracted from the AM band signal; MW: molecular weight markers.

press actin (García-Salcedo et al. 2004, Sahasrabudde et al. 2004), validated our polyclonal antiserum. Taken together, these data indicate that actin is present and conserved throughout the Trypanosomatidae family.

In a previous work, an antiserum raised against the entire actin from *T. cruzi* recognised a single band in one-dimensional electrophoresis. However, five actin isoforms were identified by this antiserum in two-dimensional electrophoresis (Cevallos et al. 2010). Therefore, it seems plausible that our polyclonal antibody (produced against the entire actin sequence) also recognised multiple actin isoforms within a single band generated by one-dimensional electrophoresis. The presence of two reacting bands in the *P. serpens* lysate suggests that this parasite possesses actin isoforms of different sizes.

In a previous study, an anti-*Leishmania* actin antibody was cross-reacted with cell lysates of various *Leishmania* species as well as of *T. cruzi*. However, that antibody failed to recognise the actin bands in the whole-cell lysates of *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, BHK21 cells and human erythrocytes, in-

dicating that the actin of trypanosomatids is divergent from that of other eukaryotic cells (Sahasrabudde et al. 2004). Accordingly, a rabbit anti-human α -actin polyclonal antibody readily recognised the actin band in whole-cell lysates of *P. falciparum*, *S. cerevisiae*, BHK21 cells and human erythrocytes, but did not cross-react with *Leishmania* or *Trypanosoma* actin (Sahasrabudde et al. 2004). A polyclonal antibody against a conserved C-terminal peptide of rabbit actin only poorly recognised *T. cruzi* actin. However, an antibody against *T. cruzi* actin was not species-specific, as proteins of a similar size were also detected in lysates from *L. mexicana* procyclics, *Toxoplasma gondii* sporozoites and *Trichomonas vaginalis* trophozoites (Cevallos et al. 2010).

The homology levels of *T. cruzi* actin compared with the eukaryotic actins of *L. major*, *T. brucei*, *P. falciparum*, *Dictyostelium discoideum* and *Homo sapiens* are 95%, 99%, 71%, 69% and 86%, respectively (Melo et al. 2008). Thus, the properties of trypanosomatid actin differ from those of the yeast, *Plasmodium* and human actins. The major differences were confined to the amino acids located on the surfaces of the yeast and mammalian actins, including amino acid residues 42-46, which constitute the major self-association sites for actin filament formation (Sahasrabudde et al. 2004). F-actin has not yet been clearly identified in trypanosomatids, which might be due to filament instability, deficient assembly or accentuated severing, events that are not yet understood (Melo et al. 2008).

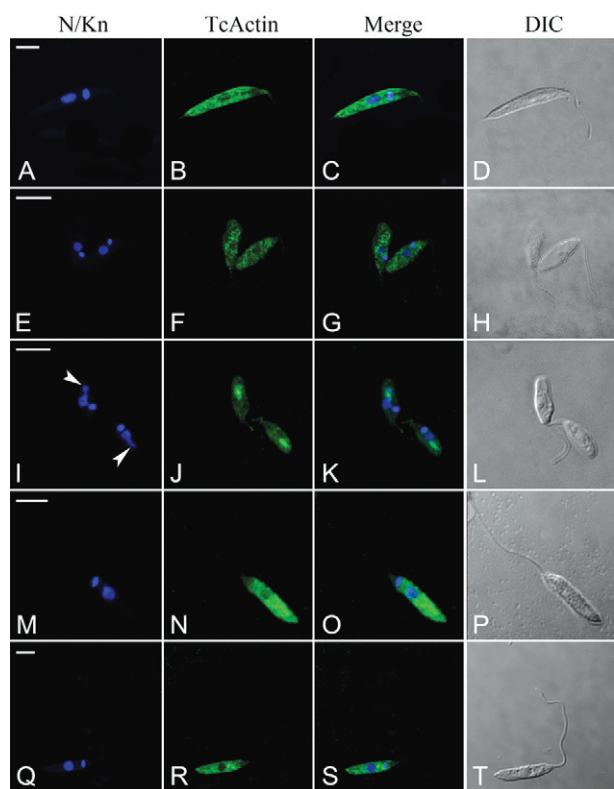


Fig. 2: actin localisation in different trypanosomatids by confocal microscopy by using the *Trypanosoma cruzi* actin gene (TcActin) antibody (actin detection with TcActin mouse polyclonal antibody plus Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G; note the staining throughout the cell body). A-D: *Strigomonas culicis*; DIC: differential interference contrast images of the parasite body; E-H: *Crithidia fasciculata*; I-L: *Angomonas deanei* with symbiont; Merge: merged Hoechst and actin images; M-P: *Phytomonas serpens*; N/Kn: staining of nuclear (N) and kinetoplast (Kn) DNA with Hoechst 33342; Q-T: *Herpetomonas samuelpessoai*. Arrowheads in I indicate staining of the bacterial endosymbiont. Bar = 5 μ m.

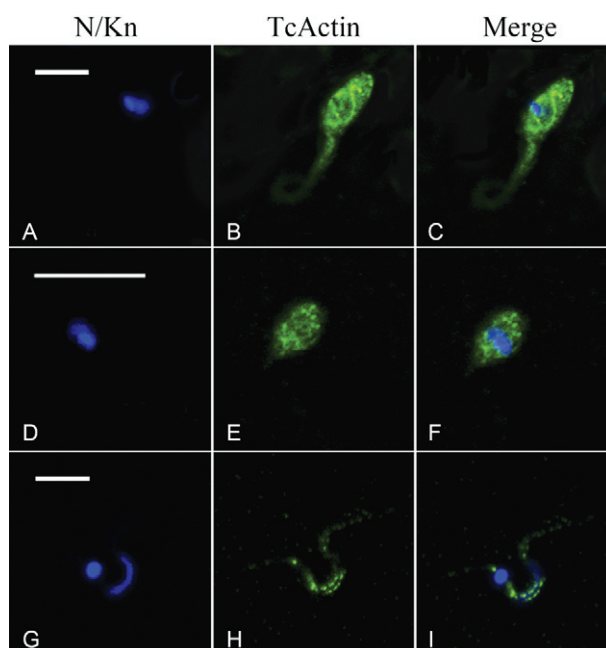


Fig. 3: actin localisation in *Trypanosoma cruzi* by using the *T. cruzi* actin gene (TcActin) antibody (actin detection with TcActin mouse polyclonal antibody plus Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G). A-C: epimastigote form (note the positive labelling at an elongated structure that may represent the cytopharynx); D-F: amastigote form; G-I: trypomastigote form; N/Kn: staining of nuclear (N) and kinetoplast (Kn) DNA with Hoechst 33342; Merge: merged Hoechst and actin images. Bar = 5 μ m.

With confocal microscopy, we found positive reactions for actin dispersed throughout the cytoplasm of all the tested trypanosomatids. This cytoplasmic pattern has also been observed in *Leishmania* sp. (Sahasrabudhe et al. 2004), *T. cruzi* (de Souza et al. 1983, Mortara 1989, Melo et al. 2008, Cevallos et al. 2010) and *T. brucei* (García-Salcedo et al. 2004). A previous study described the subcellular localisation of actin in *T. cruzi* by using an antibody produced against an actin fragment containing the conserved N-terminal region (SKKLFVG-DEAQAKR), which is present in all three *T. cruzi* actin alleles available from GenBank (Melo et al. 2008). This experiment resulted in actin labelling throughout the parasite cell body. In the present work, we have confirmed the cellular localisation of actin in *T. cruzi* epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes by using an antibody produced against the entire actin coding region. Furthermore, our data indicate that actin is expressed at similar levels in these developmental stages. It has previously been shown that actin is equally expressed in different evolutive forms of *T. brucei* (García-Salcedo et al. 2004). Thus, actin can act as an optional normaliser for protein expression studies investigating the *T. cruzi* differentiation process.

This is the first study to describe actin localisation in *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes, as previous works have analysed actin distribution only in cell-derived trypomastigotes (Cevallos et al. 2010) or bloodstream trypomastigotes (Melo et al. 2008). Although similar in their distribution of cellular organelles, these forms constitute different stages of the parasite. Thus, the linear array of actin granules observed in metacyclic trypomastigotes is interesting and may represent a distinct actin arrangement.

An increased signal was detected near the bacterial endosymbionts located at the posterior cell end of *A. deanei*, suggesting that some type of actin-based cytoskeleton might be related to the symbionts' positioning in this region. It has been previously speculated that such an actin-based cytoskeleton might also be related to anchoring RNA granule components in *T. cruzi*, as granules that remain motionless were associated with actin filaments, whereas those that moved in the cytoplasm remained associated with microtubules (Holetz et al. 2010).

Some studies of trypanosomes showed that actin participates in endocytosis and intracellular transport in these organisms (García-Salcedo et al. 2004). Thus, a repression of actin expression by iRNA in the bloodstream forms of the African trypanosome *T. brucei* resulted in the cessation of growth, loss of the endocytic activity and termination of vesicular traffic from the flagellar pocket membrane (García-Salcedo et al. 2004). Whereas in procyclic forms, actin was uniformly distributed in the cytoplasm, in bloodstream forms, actin was primarily located at the posterior end of the cell, clearly concentrated between the nucleus and the kinetoplast, a site of highly active endocytic activity (García-Salcedo et al. 2004). A proteomic analysis of the American trypanosome *T. cruzi* indicated the presence of actin in the reservosome, an end organelle of the endocytic pathway (Sant'Anna et al. 2009). Accordingly, thus far, the only demonstrated func-

tional role of actin in *T. cruzi* has been related to endocytosis (Bogitsh et al. 1995, García-Salcedo et al. 2004). These data reinforce evidence from other eukaryotic cells indicating the importance of an actin cytoskeleton during endocytosis (Robertson et al. 2009, Galletta et al. 2010). The possible localisation of actin at the cytostome/cytopharynx of *T. cruzi* epimastigotes would imply the presence of a contractile cytoskeleton at this region. Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Nilson Fidêncio, Vanessa Stella and Crisciele Kuligowski, for technical assistance.

REFERENCES

- Bogitsh BJ, Ribeiro-Rodrigues R, Carter CE 1995. In vitro effects of mannan and cytochalasin B on the uptake of horseradish peroxidase and [¹⁴C]sucrose by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Parasitol* 81: 144-148.
- Brun R, Schonenberger M 1979. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop* 36: 289-292.
- Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12: 93-100.
- Cevallos AM, Segura-Kato YX, Merchant-Larios H, Manning-Cela R, Alberto Hernández-Osorio L, Márquez-Dueñas C, Ambrosio JR, Reynoso-Ducoin O, Hernández R 2010. *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. *Exp Parasitol* 127: 249-259.
- Contreras VT, Araújo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MNSL, Goldenberg S 1988. Biological aspects of the DM 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 123-133.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 16: 315-327.
- de Souza W, Meza I, Martínez-Palomo A, Sabanero M, Souto-Padrón T, Meirelles MN 1983. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *J Parasitol* 69: 138-142.
- Galletta BJ, Mooren OL, Cooper JA 2010. Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr Opin Biotechnol* 21: 604-610.
- García-Salcedo JA, Pérez-Morga D, Gijón P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 23: 780-789.
- Holetz FB, Alves LR, Probst CM, Dallagiovanna B, Marchini FK, Manque P, Buck G, Krieger MA, Correa A, Goldenberg S 2010. Protein and mRNA content of TcDHH1 containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J* 277: 3415-3426.
- Itoz-Jankevicius S, Almeida ML, Jankevicius JV, Cavazzana Jr M, Attias M, de Souza W 1993. Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* - Coreidae) and their experimental transmission. *J Eukaryot Microbiol* 40: 576-581.
- Kohl L, Gull K 1998. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol* 93: 1-9.
- Lee SH, Dominguez R 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 29: 311-325.
- Li SQ, Yang WB, Ma LJ, Xi SM, Chen QL, Song XW, Kang J, Yang LZ 2009. Immunization with recombinant actin from *Trypanosoma*

- evansi* induces protective immunity against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection. *Parasitol Res* 104: 429-435.
- Melo LDB, Sant'anna C, Reis SA, Lourenço D, de Souza W, Lopes UG, Cunha-e-Silva NL 2008. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology* 135: 955-965.
- Mortara RA 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool* 36: 8-13.
- Pollard TD, Cooper JA 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208-1212.
- Robertson AS, Smythe E, Ayscough KR 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 66: 2049-2065.
- Sahasrabudde AA, Bajpai VK, Gupta CM 2004. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterization, subcellular localization and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol* 134: 105-114.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. In J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, p. 18.60-18.74.
- Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, de Souza W, Almeida IC, Cunha-e-Silva NL 2009. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 7: 1782-1794.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP 2011. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist* 162: 503-524.
- Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC 2001. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding β -tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 113-121.