

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI**

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA COM O DOMÍNIO  
DEDO DE ZINCO ZFP29 E ZFPTTP EM *Trypanosoma cruzi***

**CURITIBA/PR**

**2016**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**BRUNO ACCIOLY ALVES ROMAGNOLI**

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA COM O DOMÍNIO DEDO  
DE ZINCO ZFP29 E ZFPTTP EM Trypanosoma cruzi**

Dissertação apresentada ao Instituto  
Carlos Chagas como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biociências e  
Biotecnologia

**Orientadores:**

**Dra. Lysangela Ronalte Alves**

**Dr. Samuel Goldenberg**

**CURITIBA/PR**

**2016**

Ao meu eu futuro, que ele possa ver de onde  
veio, para onde foi e até onde poderá chegar.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus orientadores, Dra. Lysangela Ronalte Alves e Dr. Samuel Goldenberg pela orientação, incentivo, confiança e paciência. Tenho muita admiração, respeito e carinho por vocês;

Aos membros da banca, Dra. Gisele Picchi, Dr. Marcelo Müller e Dr. Bruno Dallagiovanna, por aceitarem participar desse momento e contribuir com o meu trabalho;

Aos meus avaliadores da jornada da pós-graduação, Maurílio Soares e Nilson Zanchin pelas discussões e sugestões, sempre muito benéficas;

Aos doutores Fabrício Marchini e Michel Batista, da plataforma de espectrometria de massas do ICC, pela colaboração nas análises de proteômica e auxílios prestados;

À tecnologista Priscila Mazzochi Hiraiwa, da plataforma de citometria do ICC, por toda a ajuda no experimento de *cell sorting*;

À doutora Eloise Guerra, pela ajuda nos experimentos de qPCR e por todas as discussões filosóficas relacionadas à ciência ou não;

À doutora Salô Bispo, por colaborar com os dados do *Ribosome Profiling*;

Ao Dr. Stênio Fragoso, por todo o conhecimento compartilhado e pelas conversas descontraídas na sala de cultivo de parasitas;

Ao Dr. Alexandre Haruo Inoue, pela amizade e inúmeros momentos de reflexão. Nós ainda iremos bolar alguma ideia inovadora, meu amigo;

Ao pessoal da pós graduação e da secretaria do ICC, por estarem sempre dispostos a ajudar;

Ao corpo docente da pós graduação, pelas disciplinas ministradas e pelo conhecimento ofertado;

À toda equipe do preparo, composta por pessoas dedicadas e fantásticas. Vocês têm minha gratidão e reconhecimento;

À CAPES e à Fiocruz, pelo auxílio financeiro;

Aos membros do laboratório de regulação da expressão gênica. Considero vocês como uma família. Obrigado por todos os momentos de alegria e confraternização.

A todos os amigos que fiz no Instituto Carlos Chagas, por estarem sempre dispostos a trocar ideias, discutir protocolos ou assuntos diversos.

À minha família, que sempre me apoiou e a qual amo muito. Agradeço em especial à minha mãe e à minha avó que são fontes de inspiração para mim. Admiro e amo muito vocês, obrigado por tudo.

À minha amada Beatriz Santana Borges pelo auxílio na captura de imagens na microscopia e por ser a melhor companheira que uma pessoa pode ter. Você vibrou comigo nas minhas conquistas e partilhou do meu choro nas minhas tristezas. Obrigado por ser a pessoa maravilhosa que você é e por contagiar a mim e ao mundo com a sua alegria.

À todos vocês, o meu sincero muito obrigado!

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.1. Representação do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
Figura 1.2. Transcrição policistrônica e o <i>trans-splicing</i> .....	20
Figura 1.3. Etapas de controle pós-transcricionais.....	21
Figura 1.4. Etapas da regulação da expressão gênica nas quais as proteínas de ligação ao RNA (RBPs) podem atuar.....	22
Figura 1.5. Domínios das proteínas ZFP29 e ZFPTTP..	31
Figura 4.1. Análise de expressão de ZFP29 ao longo da metaciclo gênese.....	51
Figura 4.2. Análise de expressão de ZFPTTP ao longo da metaciclo gênese..	52
Figura 4.3. Clonagem dos genes de ZFP29 e ZFPTTP em vetor pTCNEO3xFLAG.....	54
Figura 4.4. Obtenção de parasitos transfectantes expressando ZFP29 ou ZFPTTP fusionados a etiqueta comercial <i>FLAG</i> ..	54
Figura 4.5. Expressão da proteína ZFP29-FLAG na metaciclo gênese..	56
Figura 4.6. Expressão da proteína ZFPTTP-FLAG na metaciclo gênese. ....	58
Figura 4.7. Análise da expressão das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG nos parasitos recuperados da metaciclo gênese. ....	59
Figura 4.8. Testes dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para realizar a quantificação por qPCR..	61
Figura 4.9. Quantificação relativa do mRNA de ZFP29 ao longo da metaciclo gênese..	62
Figura 4.10. Quantificação relativa do mRNA de ZFPTTP ao longo da metaciclo gênese..	63
Figura 4.11. O perfil de expressão do transcrito de ZFP29 em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. ....	64
Figura 4.12. O perfil de expressão do transcrito de ZFPTTP em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. ....	64
Figura 4.13. Imunolocalização da proteína ZFP29 em estágios da metaciclo gênese. ....	66
Figura 4.14. Imunolocalização da proteína ZFPTTP em estágios da metaciclo gênese..	67
Figura 4.15. Controle da especificidade do anticorpo $\alpha$ -FLAG.....	68

Figura 4.16 Imunolocalização da proteína ZFP29-FLAG em estágios da metaciclogênese. ....	70
Figura 4.17. Imunolocalização da proteína ZFPTTP-FLAG em estágios da metaciclogênese.. ....	72
Figura 4.18. Comparação da localização da proteína ZFPTTP-FLAG com a proteína ZFPTTP em parasitas submetidos ao estresse nutricional (S). ....	73
Figura 4.19. Western blot com amostras da imunoprecipitação de ZFP29-FLAG.....	82
Figura 4.20. Western blot com amostras da imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG.....	82
Figura 4.21. Western blot com o controle do experimento de imunoprecipitação. M: .....	83
Figura 4.22. Avaliação do perfil de bandas das frações eluídas dos parasitas transfectantes e do selvagem através da coloração de gel com prata.....	84
Quadro 1. Lista de RBPs caracterizadas nos tripanossomatídeos.....	29
Quadro 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores para ZFP29 e ZFPTTP. ....	38
Quadro 3.2. Oligonucleotídeos inicializadores utilizados para amplificação do gene de resistência a neomicina. ....	41
Quadro 3.3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA de ZFP29 e ZFPTTP.....	43
Quadro 3.4. Parâmetros utilizados para o mapeamento no programa CLC Genomics Workbench .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 4.1. Curva de crescimento dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG.....	74
Gráfico 4.2. Curva de crescimento dos parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG.....	75
Gráfico 4.3. Análise do número de parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG presentes no sobrenadante ao longo da metaciclo gênese.....	76
Gráfico 4.4. Análise da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG.....	77
Gráfico 4.5. Análise do número de parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG presentes no sobrenadante ao longo da metaciclo gênese... ..	78
Gráfico 4.6. Análise da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG. ....	79
Gráfico 4.7. Análise de PCA das réplicas de ZFP29-FLAG (epimastigota e estresse) em relação ao controle (WT).. ..	91
Gráfico 4.8. Análise de PCA das réplicas de ZFPTTP-FLAG (epimastigota e estresse) em relação ao controle (WT).. ..	92
Gráfico 4.9. <i>Volcano Plot</i> com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFP29-FLAG (Epimastigotas) depois de aplicado o teste de Baggerly.....	93
Gráfico 4.10. <i>Volcano Plot</i> com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFP29-FLAG (Estresse) depois de aplicado o teste de Baggerly. ....	93
Gráfico 4.11. <i>Volcano Plot</i> com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFPTTP-FLAG (Epimastigotas) depois de aplicado o teste de Baggerly. ....	94
Gráfico 4.12. <i>Volcano Plot</i> com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFPTTP-FLAG (Estresse) depois de aplicado o teste de Baggerly..	94
Gráfico 4.13. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFP29-FLAG (epimastigotas) em termos de GO. ....	96
Gráfico 4.14. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFP29-FLAG (estresse) em termos de GO.....	97
Gráfico 4.15. Diagrama de <i>Venn</i> com os transcritos associados a ZFP29-FLAG.....	98



Gráfico 4.16. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFPTTP-FLAG (epimastigotas) em termos de GO. . . . .	100
Gráfico 4.17. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFPTTP-FLAG (epimastigotas) em termos de GO.. . . .	101
Gráfico 4.18. Diagrama de <i>Venn</i> com os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG.....	102
Tabela 4.1. Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação da proteína ZFP29-FLAG.....	89
Tabela 4.2. Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação da proteína ZFPTTP-FLAG.....	89
Tabela 4.3. Quantificação dos RNAs extraídos em cada réplica.....	89
Tabela 4.4. Quantificação das bibliotecas de cDNA.....	90
Tabela 4.5. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG em epimastigotas.. . . .	136
Tabela 4.6. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG em estresse.....	155
Tabela 4.7. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG em epimastigota. . . . .	175
Tabela 4.8. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG em estresse.....	182
Tabela 4.9. Proteínas identificadas nas amostras imunoprecipitadas de ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG e controle (WT) .....	189

## RESUMO

A regulação da expressão gênica é essencial para que o *Trypanosoma cruzi* se adapte às diferentes condições impostas pelos seus hospedeiros durante seu ciclo de vida. Nos tripanossomatídeos esse controle é mediado principalmente por mecanismos pós-transcricionais, os quais atuam no metabolismo dos mRNAs e das proteínas. Nesse contexto, as proteínas de ligação ao RNA (RBPs) são componentes-chave, uma vez que interagem com os mRNAs durante todas as etapas de controle coordenando seus destinos na célula. São também capazes de se ligar a outras proteínas, formando complexos ribonucleoproteicos (mRNPs). Existem diferentes grupos de proteínas que compõem o repertório de RBPs no *T. cruzi*, entre elas as que apresentam o domínio dedo de zinco CCCH. Estudos anteriores com as proteínas ZFP29 e ZFPTTP s que apresentam esse domínio demonstraram que ambas têm sua expressão regulada ao longo do ciclo de vida do parasita, não sendo expressas nas formas tripomastigotas metacíclicas. Esse trabalho visou então analisar a regulação das proteínas ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese e sua participação em complexos mRNPs. As proteínas ZFP29 e ZFPTTP são reguladas a partir das formas aderidas, tendo sido observado que ZFP29 não é detectada, enquanto na ZFPTTP a expressão é drasticamente reduzida. As proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG não apresentaram o mesmo controle observado para as proteínas nativas nas formas aderidas, no entanto, também foram reguladas negativamente no estágio metacíclico. Ao analisar a expressão dos mRNAs das proteínas ZFP29 e ZFPTTP por qPCR na metaciclogênese, foi observado que o transcrito de ZFPTTP é constantemente expresso, enquanto que o de ZFP29 foi reduzido apenas nas formas metacíclicas. Esses resultados indicam a possibilidade de haver diferentes mecanismos regulatórios atuando no nível de transcrito e/ou proteína para controlar a expressão de ZFP29 e ZFPTTP em diversos estágios da metaciclogênese. Essas duas proteínas são citoplasmáticas em epimastigotas e, enquanto ZFP29 mantém essa localização nos parasitas estressados, ZFPTTP aparenta localizar-se também no núcleo durante o estresse. Os parasitas expressando ZFP29-FLAG apresentaram alterações na diferenciação, mas não no crescimento. Já a expressão de ZFPTTP-FLAG provocou mudanças tanto na diferenciação quanto no crescimento.

Ensaio de imunoprecipitação dos complexos mRNPs associados a ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG foram realizados em epimastigotas e nos parasitas submetidos ao estresse. No caso da proteína ZFP29-FLAG, foram encontrados mRNAs que codificam para proteínas de superfície, proteínas motoras e proteínas hipotéticas. A diferença entre as populações em epimastigotas e nos parasitas em estresse aponta que ZFP29 forma diferentes complexos mRNPs em cada uma dessas duas condições. Para a proteína ZFPTTP-FLAG mais de 40% dos transcritos codificam proteínas ribossomais, sugerindo uma função de ZFPTTP relacionada à tradução. Esse estudo reforça a teoria dos RNA regulons atuando no controle da expressão gênica em *T. cruzi*, aprofundando o conhecimento para a formação de redes de regulação pós-transcricionais nesse parasita.

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma cruzi*. Proteínas de ligação ao RNA. Dedo de zinco. Domínio CCCH. Regulons.

## ABSTRACT

The regulation of gene expression is essential to adapt *Trypanosoma cruzi* to different conditions imposed by their hosts during their life cycle. In trypanosomatids, this control is mainly mediated by post-transcriptional mechanisms which act on the metabolism of the mRNAs and proteins. In this context, the RNA binding proteins (RBPs) are key players since they interact with the mRNA during all control stages, by coordinating their destinations in the cell. They are also capable of binding to other proteins, forming ribonucleoproteic complex (mRNPs). The RBPs repertoire in *T. cruzi* comprises different groups of proteins, including those with the CCCH zinc finger domain. Earlier studies with two proteins which exhibit this domain - ZFP29 and ZFPTTP - demonstrated that both of them have their expression regulated during the parasite life cycle, not being expressed in the metacyclic trypomastigotes forms. Thus, this study aimed to analyze the regulation of ZFP29 and ZFPTTP proteins in metacyclogenesis and their participation in mRNPs complex. The ZFP29 and ZFPTTP proteins are regulated by the adhered forms, having been observed that ZFP29 is not detected, while in ZFPTTP the expression is dramatically reduced. The ZFP29-FLAG and ZFPTTP-FLAG proteins did not have the same control observed for the native proteins in the adhered forms, however, they were also negatively regulated in metacyclic stage. By analyzing the mRNAs expression of ZFP29 and ZFPTTP proteins by qPCR in metacyclogenesis, it was observed that the ZFPTTP transcript is constantly expressed, while the ZFP29 was reduced only in the metacyclic forms. These results indicate the possibility of different regulatory mechanisms acting on the transcript and/or protein level to control the expression of ZFP29 and ZFPTTP at different metacyclogenesis stages. These two proteins are cytoplasmic epimastigotes and while ZFP29 keeps this location in stressed parasites, ZFPTTP appears to be located also at the nucleus during stress. Parasites that expressed ZFP29-FLAG, showed changes in differentiation, but not in the growth. On the other hand, ZFPTTP-FLAG expression resulted in changes both in differentiation and growth. Immunoprecipitation assays of mRNPs complex associated with ZFP29-FLAG and ZFPTTP-FLAG were performed in epimastigotes and also in parasites subjected to stress. In the case of ZFP29 -FLAG protein, there were found mRNAs that encode surface proteins, motor proteins and hypothetical proteins. The difference between populations in epimastigotes and stressed parasites indicates that ZFP29 forms different mRNPs complex in each of these two conditions. For ZFPTTP-FLAG, more than 40% of the transcripts encode ribosomal proteins, suggesting a ZFPTTP function related to the translation. This study reinforces the theory of RNA regulons acting in the control of gene expression in *T. cruzi*, having deepened the knowledge about the formation of post transcriptional regulatory networks in this parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. RNA Binding Proteins. Zinc Finger. CCCH domain. Regulons

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 . Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas .....	14
1.2 .Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	15
1.3 . Metaciclogênese .....	17
1.4 . Regulação da Expressão Gênica.....	18
1.5 . Proteínas de Ligação ao RNA (RBPs) .....	23
1.6 . RBPs nos tripanossomatídeos .....	27
1.7 . As proteínas ZFP29 e ZFPTTP de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
2. OBJETIVOS .....	32
2.1 .OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Soluções e tampões.....	33
3.2. Meios de cultura .....	34
3.3. Microrganismos.....	34
3.4. Ensaio de metaciclogênese in vitro .....	34
3.5. Preparação de extrato proteico de <i>T. cruzi</i> Dm28c e análise por Western blot.....	35
3.6. Obtenção de parasitos recombinantes expressando as proteínas ZFPTTP e ZFP29 fusionadas à etiqueta FLAG .....	36
3.6.1. Obtenção dos plasmídeos pTcNEO3xFLAG-ZFP29 e pTcNEOxFLAG-ZFPTTP.....	36
3.6.2. Transfecção de <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção de parasitas transfectantes. ....	39
3.7. Clonagem Populacional .....	39
3.7.1. Diluição seriada .....	40
3.7.2. <i>Cell sorting</i> .....	40
3.8. PCR de cultura .....	41
3.9. Análise da expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP ao longo da metaciclogênese por qPCR. ....	42
3.10. Ensaios de imunolocalização.....	43

3.11. Análise de crescimento e da diferenciação dos parasitas transfectantes.....	44
3.11.1. Curva de crescimento.....	44
3.11.2. Análise da diferenciação .....	45
3.12. Imunoprecipitação de proteínas e mRNAs associados a ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG .....	46
3.12.1. Imunoprecipitação - Proteínas.....	46
3.12.2. Imunoprecipitação – mRNAs.....	47
4. RESULTADOS.....	50
4.1. A expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP é regulada ao longo da metaciclogênese.....	50
4.2. Obtenção de parasitas transfectantes expressando as proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas à etiqueta comercial FLAG®.....	53
4.3. Análise da expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas a etiqueta comercial FLAG®.....	55
4.4. Análise da expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese.....	60
4.5. Imunolocalização das proteínas ZFP29 e ZFPTTP durante a metaciclogênese.....	65
4.6. Imunolocalização das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG durante a metaciclogênese.....	68
4.7. Análise do crescimento e da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.....	74
4.8. Análise dos complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) associados às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.....	80
4.8.1. Análise de proteínas parceiras associadas às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.....	81
4.8.2. Análise dos mRNAs associados às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.....	89
5. DISCUSSÃO .....	104
6. CONCLUSÃO .....	116
7. REFERÊNCIAS.....	118
8. ANEXOS .....	136

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 . *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao filo Euglenozoa, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 1981). Foi primeiramente descrito por Carlos Chagas, no início do século XX, que o detectou nos insetos hematófagos transmissores da doença de Chagas, patologia causada por este parasita (Chagas 1909). Estima-se que o número de pessoas infectadas no mundo seja entre 6 e 7 milhões de indivíduos, dos quais a grande maioria está localizada na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica (WHO 2015).

A doença de Chagas apresenta duas fases, uma aguda e outra crônica. Na fase aguda ocorre uma elevada parasitemia, no entanto na maioria dos casos os sintomas são brandos ou ausentes. Nos poucos indivíduos infectados que apresentam sintomas, esses podem incluir: febre, dor de cabeça, inchaço nos linfonodos, palidez, dores musculares, dificuldades respiratórias, dores no peito e no abdômen, além da lesão na pele, quando a transmissão ocorre pelo inseto vetor, e o sinal de Romana, caso essa lesão ocorra nas proximidades da mucosa ocular. Após a fase aguda, os indivíduos evoluem para a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. A maioria das pessoas permanece com a infecção assintomática nessa fase, no entanto, estima-se que de 20 a 30% dos infectados progridem ao longo dos anos, para a cardiomiopatia chagásica crônica e/ou para a forma gastrointestinal da doença, quando geralmente o indivíduo infectado vem a óbito (Longo & Bern 2015; WHO 2015).

Atualmente existem dois medicamentos utilizados para o combate à infecção pelo parasita, o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos são eficientes no combate à doença nos estágios iniciais, ou seja, na fase aguda. A baixa eficiência dessas duas drogas no estágio crônico da patologia, bem como os efeitos colaterais que elas acarretam constituem um problema (Longo & Bern 2015). Até o momento não há vacina para a doença de Chagas, o que torna o

controle e a prevenção da doença medidas importantes para reduzir o número de casos. De fato, cabe mencionar que no Brasil houve uma campanha para diminuir a população de vetores, o que acarretou numa diminuição nas infecções relacionadas com a transmissão vetorial (Dias et al. 2002). No entanto, existem outras formas de transmissão desse parasita, como transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes laboratoriais e o consumo de alimentos contaminados com o parasita, principalmente a partir do inseto vetor ou de suas fezes (Rassi et al. 2010). Essas outras formas de transmissão descritas, que não a vetorial, são de grande relevância, sobretudo quando se analisa o potencial de dispersão da doença no mundo (OPAS 2009).

Tendo em vista o endemismo da doença de Chagas na América Latina, o impacto da patologia na população de infectados, a expansão na dispersão global dos casos e o fato de não existir uma vacina contra a doença, é de grande importância investir no estudo acerca não só da patologia em si, mas também da biologia de seu agente etiológico. Nesse sentido, o estudo do *T. cruzi* é relevante pela gravidade da doença por ele causada e pelas peculiaridades que esse organismo apresenta na sua biologia celular e molecular, as quais são abordadas a seguir.

## **1.2 . Ciclo de vida do *T. cruzi*.**

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico envolvendo dois hospedeiros distintos na natureza - um inseto vetor e um vertebrado mamífero, incluindo o homem - e formas evolutivas que diferem morfológica e funcionalmente entre si de acordo com o hospedeiro (Chagas 1909; De Souza 2002). O inseto vetor do *T. cruzi* é um inseto hematófago da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, cujos gêneros de maior importância epidemiológica no Brasil são: *Panstrongylus* e *Triatoma* (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde 2015). No país, esses triatomíneos são popularmente chamados de barbeiros devido ao seu hábito de realizar o repasto sanguíneo preferencialmente na região facial dos seres humanos.

Ao realizar o repasto de sangue infectado, o triatomíneo ingere as formas circulantes tripomastigotas sanguíneas, que sofrerão um processo de diferenciação em formas replicativas no estômago do inseto, denominadas de epimastigotas. Essas formas replicativas, à medida que avançam no trato digestório do barbeiro, sofrem sucessivas divisões por fissão binária até alcançarem a porção final do intestino do vetor onde a disponibilidade de nutrientes é baixa. Esse ambiente pobre em nutrientes promove um estresse para o parasita que, em conjunto com sua adesão à membrana do intestino, desencadeia o processo de diferenciação celular denominado metaciclogênese, através do qual as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, que não são replicativas, porém são altamente infectivas (Tyler & Engman 2001; Kollien & Schaub 2000).

Essas formas infectivas são eliminadas com as fezes do barbeiro quando esse realiza o repasto sanguíneo, podendo entrar no sistema circulatório do mamífero. Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas metacíclicas rapidamente iniciam o processo de invasão em diferentes tipos celulares do hospedeiro. Completada a invasão, esses parasitos iniciam o processo de diferenciação em amastigotas (amastigogênese), que são formas intracelulares replicativas do *T. cruzi* que apresentam o flagelo reduzido e um formato celular arredondado. Após sucessivas etapas de replicação, os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota sanguíneo. Devido ao grande número de parasitas dentro da célula, a mesma se rompe e os libera para o ambiente extracelular onde são capazes de infectar novas células ou serem capturados pelo triatomíneo caso esse se alimente do sangue infectado com formas tripomastigotas, fechando assim o ciclo (Kollien & Schaub 2000; De Souza 2002). A figura 1.1 representa de maneira esquemática o ciclo de vida do *T. cruzi*.



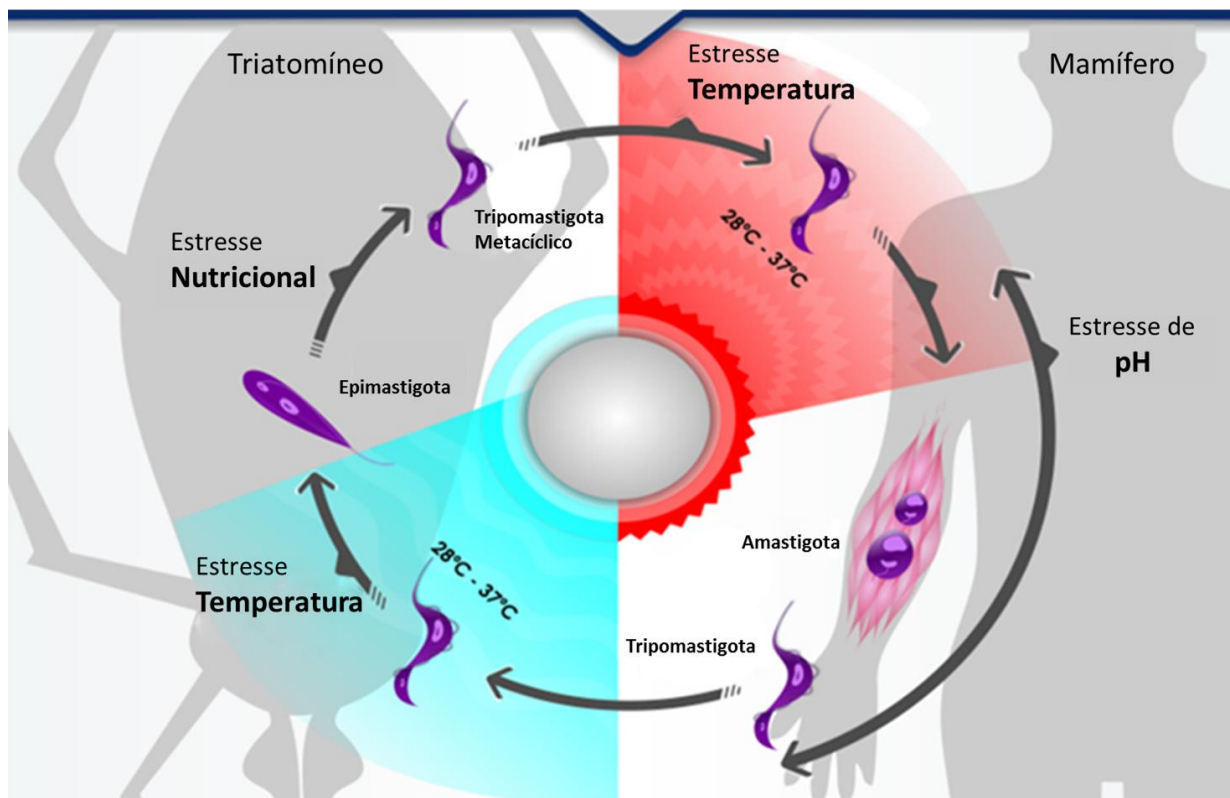


Figura 1.1. Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Extraído de (Alves & Goldenberg *in press.*)

### 1.3 . Metaciclogênese

Conforme mencionado anteriormente, o processo de diferenciação de formas replicativas - epimastigotas - em formas que não se replicam e possuem uma alta infectividade - tripomastigotas metacíclicos - ocorre na porção final do intestino do barbeiro. Esse ambiente é caracterizado como sendo pobre na disponibilidade de nutrientes como glicose e aminoácidos, o que acaba por estressar os parasitas ao chegar nesse local (Kollien & Schaub 2000). Quando submetidos a essa condição de estresse nutricional, as formas epimastigotas começam a aderir ao epitélio do intestino do triatomíneo e iniciar o processo de diferenciação, no qual posteriormente são liberadas como formas tripomastigotas metacíclicas (Kollien & Schaub 2000; Bonaldo et al. 1988; Contreras, et al. 1985).

Existe um grande interesse em compreender os mecanismos envolvidos na transformação de formas incapazes de infectar vertebrados - epimastigotas - nas formas que adquirem uma capacidade infectiva

significativa - tripomastigotas metacíclicos. Para que fosse possível investigar os aspectos biológicos inerentes a essa etapa de diferenciação, na década de 80, padronizou-se um protocolo que mimetiza a metaciclogênese *in vitro* (Contreras et al. 1985; Contreras et al. 1988; Bonaldo et al. 1988).

Muitos fatores têm sido identificados como possíveis estimuladores da metaciclogênese, dentre eles o estresse nutricional e a adesão ao substrato (Heath et al. 1990; Fraidenraich et al. 1993; Figueiredo et al. 2000; Kollien & Schaub 2000). Em ambos os casos são desencadeados eventos de reprogramação gênica que resultam em alterações morfológicas e bioquímicas observadas nas formas epimastigotas antes da diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas (Contreras et al. 1988; Kleffmann & Schaub 1998). De fato, estudos anteriores demonstraram que formas epimastigotas submetidas à metaciclogênese apresentam características das formas metacíclicas antes de ocorrer a diferenciação. Entre essas características observou-se alterações na composição da superfície celular, resistência a lise pelo sistema complemento (inerente às formas tripomastigotas) e a expressão de genes estágio-específico das formas metacíclicas, o que demonstra que a expressão diferencial de genes precede as alterações morfológicas durante a metaciclogênese (Nogueira et al. 1975; Contreras, Morel, et al. 1985).

Dessa forma, é de grande relevância utilizar esse modelo de estudo para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na metaciclogênese, sobretudo a respeito da regulação da expressão gênica (Ávila et al. 2003).

#### **1.4 . Regulação da Expressão Gênica**

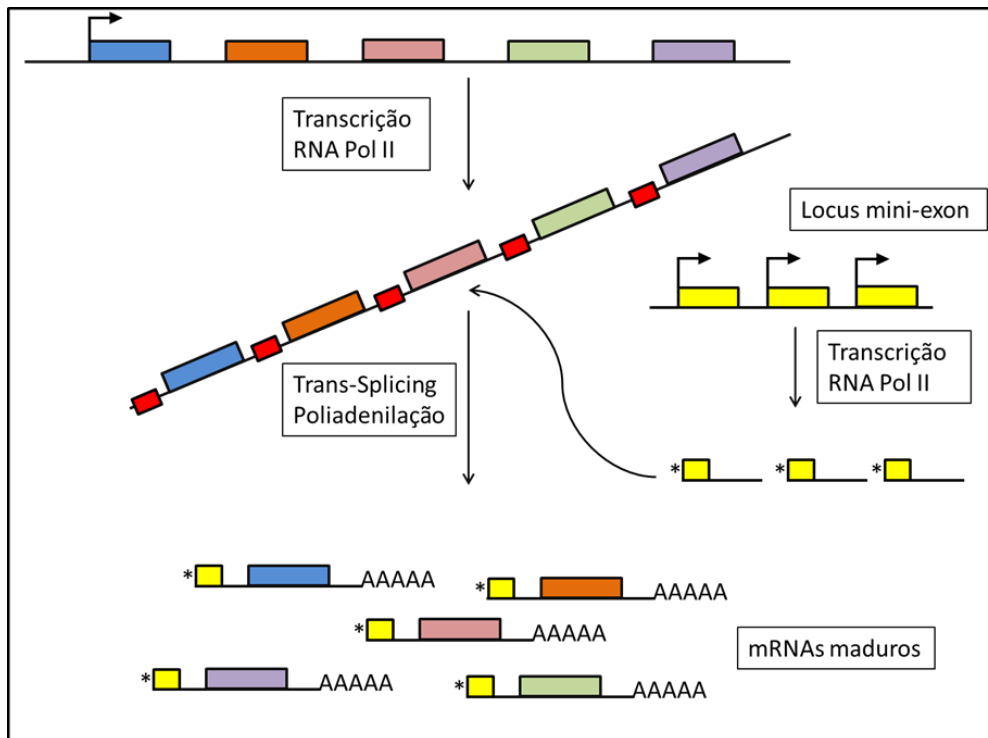
Como visto no ciclo de vida do *T. cruzi* a passagem entre diferentes ambientes dentro de um hospedeiro e até mesmo entre hospedeiros diferentes requer que o parasita seja capaz de se adaptar às condições impostas em cada situação. Os processos de adaptação estão relacionados com as transformações pelas quais o *T. cruzi* passa e são consequências de alterações na expressão de seus genes..

A regulação da expressão gênica nesses organismos é exercida essencialmente a nível pós-transcricional, sendo a etapa de controle

transcricional pouco expressiva (Clayton & Shapira 2007). Essa constatação decorre de algumas características pertinentes a esse organismo, entre as principais destacam-se: a organização do genoma; a inexistência de regiões promotoras clássicas para RNA polimerase II; a transcrição ser policistrônica, com o posterior processamento dos transcritos primários por “*trans-splicing*” e o fato dos genes presentes na mesma unidade policistrônica apresentarem níveis de mRNA processado distintos (Clayton & Shapira 2007).

A organização do genoma do *T. cruzi* é bem particular quando comparada aos demais eucariotos. Os genes codificadores de proteínas organizam-se em longos agrupamentos (*clusters*) unidirecionais de 10 a 100 genes, os quais são co-transcritos pela RNA polimerase II. De modo geral, não há uma relação funcional aparente entre os genes vizinhos ou pertencentes a um mesmo *cluster*. Esse tipo de transcrição é denominado de transcrição policistrônica, justamente por resultar na síntese de um pré-mRNA contendo várias unidades monocistrônicas, cada qual correspondente ao seu respectivo gene (Kramer 2011; Kolev et al. 2014).

Para que seja obtido o mRNA maduro, - capaz de ser transportado para o citoplasma e traduzido, o pre-mRNA é processado por *trans-splicing*. O processamento do pre-mRNA policistrônico em unidades monocistrônicas ocorre através da adição de uma sequência de 39 nucleotídeos - denominada de mini-éxon ou sequência líder (SL) - na extremidade 5', contendo um cap hipermetilado - conhecido como "cap4" (Bangs et al. 1992; Zamudio et al. 2009). Concomitantemente à adição do mini-éxon, ocorre a poliadenilação na extremidade 3', dando origem às unidades monocistrônicas, cada qual com o mini-éxon e a cauda de adeninas poli(A) adicionados nas devidas extremidades (Clayton 2002; Liang et al. 2003; Preußner et al. 2012). A figura 1.2 traz uma representação da transcrição policistrônica e do mecanismo de *trans-splicing* que ocorre nos tripanossomatídeos.



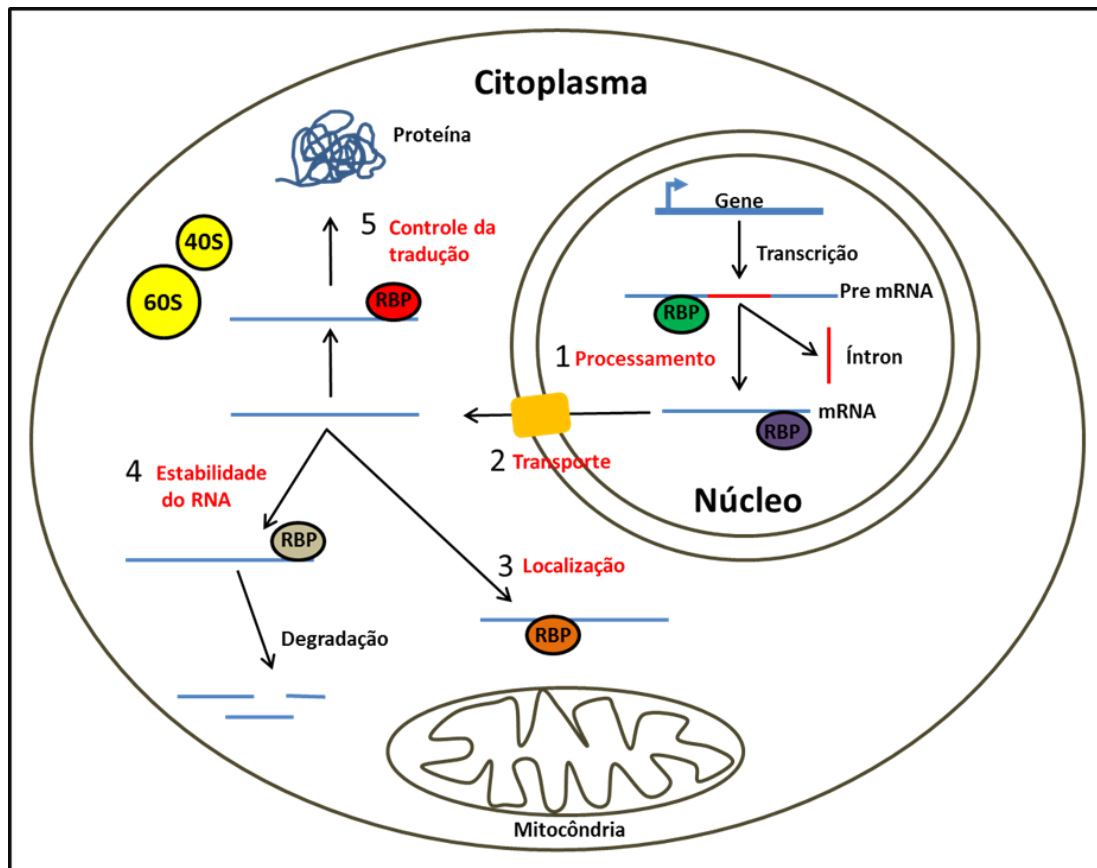
**Figura 1.2. Transcrição policistrônica e o *trans-splicing*.** Esquema adaptado e simplificado de Calvillo *et al* 2010.

Ao se analisar os níveis de mRNAs maduros e proteínas observa-se grandes variações entre os genes de um *cluster* e até mesmo entre genes adjacentes, evidenciando a ação de mecanismos pós-transcricionais na regulação da expressão gênica dos tripanossomatídeos (Kramer 2011; Kolev et al. 2014).

Os mecanismos pós-transcricionais são, portanto, aqueles envolvidos na regulação da expressão gênica mediada pelo controle dos mRNAs e das proteínas da célula, e podem atuar em diversas etapas, das quais destacam-se: o processamento do pre-mRNA; o transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma e sua localização subcelular; a estabilidade dos mRNAs; a tradução dos mRNAs; a estabilidade das proteínas e a modificações pós-traducionais (Glisovic et al. 2008; Kolev et al. 2014). Essas etapas estão ilustradas na figura 1.3.

Dessa forma, a partir do momento que o pre-mRNA começa a ser sintetizado, fatores proteicos passam a interagir com esse transcrito imaturo de modo a regulá-lo positiva ou negativamente nos diferentes processos do metabolismo do RNA. Por essa razão raramente a molécula de RNA se

encontra sempre associada com proteínas na célula (Lunde et al. 2007; Keene 2007; Glisovic et al. 2008).



**Figura 1.3. Etapas de controle pós-transcricionais.** Adaptado de Mittal *et al*, 2009. A figura mostra as principais etapas no controle pós-transcricional, indicadas pelos números de 1 a 5 sendo: 1 – Processamento do RNA (Splicing); 2- Transporte do núcleo para o citoplasma; 3- Localização subcelular dos transcritos; 4- Estabilidade do RNA e 5- Controle da tradução dos mRNAs.

Nesse contexto, os pre-mRNA e mRNAs apresentam elementos *cis-acting* regulatórios nas suas porções não traduzidas 3' e 5' (3' e 5'UTR - *untranslated region*) bem como nas regiões codificadoras (CDS - *coding sequence*), que são reconhecidos por fatores *trans-acting* (proteínas ou pequenos RNAs), os quais são responsáveis pela regulação desses transcritos nas diferentes etapas já citadas (figura 1.4).

Dentre os elementos *trans* encontram-se as proteínas de ligação ao RNA (RBPs - *RNA Binding Proteins*), que se apresentam como os principais elementos envolvidos no controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos

(Fernández-Moya & Estévez 2010; Kramer & Carrington 2011; Kolev et al. 2014).

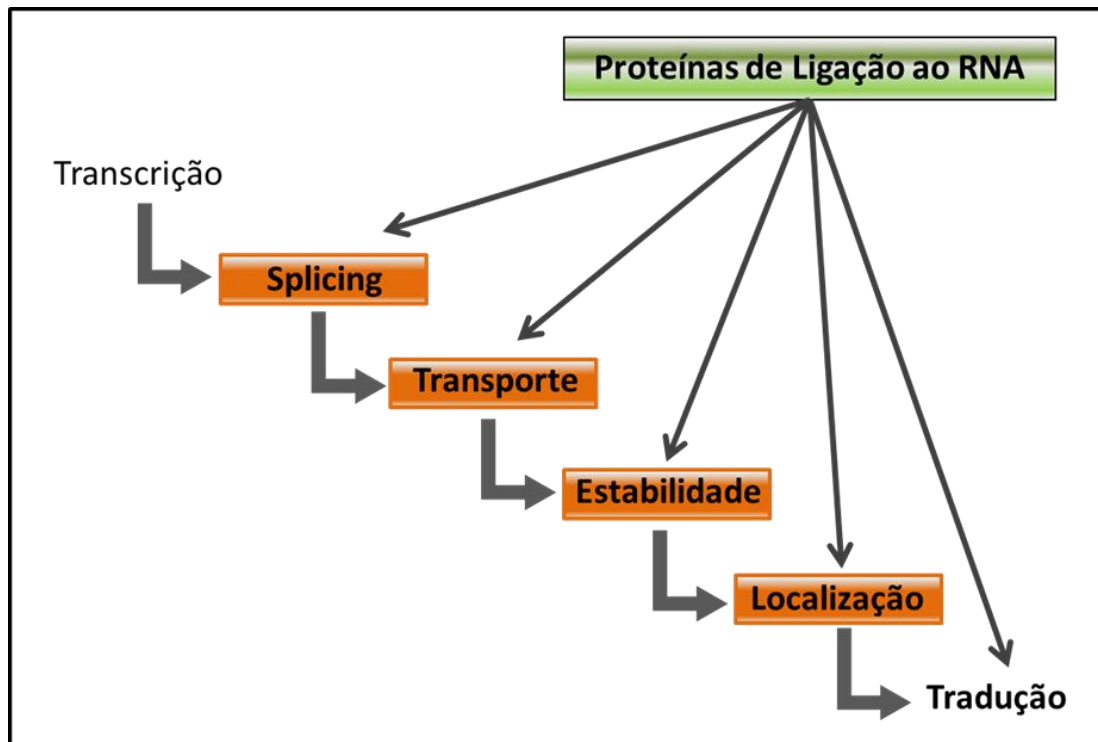


Figura 1.4. Etapas da regulação da expressão gênica nas quais as proteínas de ligação ao RNA (RBPs) podem atuar. Adaptado de Keene (2007).

Em 2007, Jack Keene propôs a teoria dos "RNA *regulons*". Segundo essa teoria, a regulação da expressão gênica é exercida por elementos *trans-acting*, que atuam em subconjuntos de transcritos que codificam para proteínas funcionalmente relacionadas (Keene 2007). Nesse cenário, ocorre a formação de complexos ribonucleoproteicos (mRNP - *messenger ribonucleoprotein*), nos quais fatores *trans* interagem com os mRNAs em seus diferentes elementos *cis*, de modo combinatório, determinando o destino dos transcritos na célula.

Já foram obtidas evidências que a regulação pós-transcricional pelos "RNA *regulons*" ocorre nos tripanossomatídeos (Queiroz et al. 2009; De Gaudenzi et al. 2013; Ouellette & Papadopoulou 2009). De fato, existem diversos estudos mostrando que fatores *trans* atuam sobre um conjunto de mRNAs que codificam para proteínas com funções relacionadas, como o caso das proteínas TcRBP3 e TcUBP1 que se associam com transcritos referentes a proteínas ribossomais e metabólicas, respectivamente. No entanto, apesar

dessas duas proteínas apresentarem alvos específicos, elas também compartilham alguns de seus alvos (Noé et al. 2008). Outro exemplo diz respeito à proteína TcZC3H39, que interage com mRNAs que codificam proteínas ribossomais nas formas epimastigotas, e quando o parasita é submetido ao estresse nutricional, passa a se associar com transcritos correspondentes a proteínas da citocromo C oxidase (Alves et al. 2014). Esses dois exemplos introduzem o conceito de que os complexos mRNPs existentes no *T. cruzi* são plásticos, dinâmicos e estão intimamente relacionados com a regulação da expressão gênica do parasita, e reforçam o papel fundamental das proteínas de ligação ao RNA.

### **1.5 . Proteínas de Ligação ao RNA (RBPs)**

As proteínas de ligação ao RNA encontram-se em grande número e diversidade na natureza e, conforme mencionado anteriormente, estão envolvidas no controle da expressão gênica em todas as etapas do metabolismo de RNA. Uma das características das RBPs é a presença de domínios de ligação ao RNA (RBD - RNA *Binding Domain*) que permitem o reconhecimento e a interação com porções dos RNAs alvos, através de sequências e/ou estruturas específicas presentes nos transcritos, sobretudo na região 3'-UTR (Glisovic et al. 2008; Kramer & Carrington 2011; Noé et al. 2008; Myung et al. 2002). A associação de RBPs na porção 3'-UTR de transcritos regulados costuma promover alterações na estabilidade, tradução e localização dos mRNAs alvos (Fernández-Moya & Estévez 2010).

Existe uma grande variedade de RBDs encontrados entre as proteínas de ligação de RNA, sendo que essas podem inclusive apresentar mais de um domínio em sua estrutura. A presença de domínios múltiplos e diversos, bem como a combinação de RBDs, permite que as RBPs reconheçam seus transcritos alvos de várias formas para exercer suas funções na célula (Lunde et al. 2007; Chen & Varani 2005; Glisovic et al. 2008). Dentre os domínios de ligação ao RNA encontrado nas RBPs, destacam-se, entre outros, os domínios RRM, PUF, ALBA e dedo de zinco.

O domínio RRM (RNA *Recognition Motif*) é o mais encontrado dentre

as proteínas de ligação ao RNA. Ele é composto por cerca de 90 resíduos de aminoácidos que compreendem duas sequências curtas - denominadas de RNP1 e RNP2 - espaçadas por outros aminoácidos conservados formando uma estrutura composta por quatro folhas- $\beta$  antiparalelas entremeadas por duas  $\alpha$ -hélices (Burd & Dreyfuss 1994; Lunde et al. 2007). Esse domínio é capaz de reconhecer e se ligar a sequências de 2 a 8 nucleotídeos nos RNA alvos e também possui afinidade por DNA e proteínas além de RNA simples fita. As proteínas que possuem esse domínio estão envolvidas em todas as vias do ciclo do RNA, do processamento até a tradução e/ou degradação do mRNA. O domínio RRM normalmente apresenta-se em múltiplas cópias nas proteínas, o que permite uma especificidade maior aos seus alvos (Cléry et al. 2008).

O domínio PUF está presente nas proteínas Pumílio - encontradas desde protozoários até humanos (Spasov & Jurecic 2003) - e é caracterizado pela alta conservação na porção carboxi-terminal, que apresenta oito repetições em sequências compostas por 40 aminoácidos, sendo que cada repetição assume a estrutura de uma tripla  $\alpha$ -hélice. De modo geral, cada repetição atua reconhecendo uma única base do RNA, cuja especificidade é controlada pelas sequências flanqueadoras (Edwards et al. 2001; Wang et al. 2001; Wickens et al. 2002). As proteínas PUF reconhecem elementos na região 3'-UTR de seus transcritos alvos e reduzem sua expressão por meio da repressão da tradução ou alteram a estabilidade dos mRNAs, além de interagir com outras proteínas (Caro et al. 2006; Thomson et al. 2007; Miller & Olivas 2011).

O domínio ALBA (*Acetylation Lowers Binding Affinity*) é altamente conservado em proteínas presentes desde arqueas até eucariotos, como plantas, trypanosomas e possivelmente vertebrados e é composto por quatro folhas- $\beta$  e duas  $\alpha$ -hélices (Bell et al. 2002; Wardleworth et al. 2002). Nas arqueas, as proteínas como esse domínio se ligam principalmente a DNA dupla fita, estando associadas à cromatina, embora existam evidências da interação com o RNA *in vivo* (Guo et al. 2003; Subota et al. 2011). Já nos eucariotos, em especial nos tripanossomatídeos, as proteínas ALBAs possuem além desse domínio uma região rica em repetições da sequência RGG (Arg-Gly-Gly) na



porção carboxi-terminal, o que permite que elas apresentem atividades de ligação a RNA e DNA (Aravind et al. 2003; McBride et al. 2005).

O domínio dedo de zinco corresponde a uma estrutura proteica estabilizada pela ligação coordenada a um íon zinco de cerca de 30 aminoácidos (Miller et al. 1985; Brayer & Segal 2008). Existe cerca de 20 tipos diferentes de domínios dedo de zinco, sendo esses classificados de acordo com os resíduos de aminoácidos estruturais envolvidos na estabilização do íon zinco, que são, de modo geral, combinações de cisteínas e histidinas (Krishna 2003; Matthews & Sunde 2002). O tipo mais comum é o Cys2-His2 (C2H2), considerado o domínio dedo de zinco “clássico”, presente em um grande grupo de proteínas contendo a sequência consenso (F/Y)-X-C-X<sub>2-5</sub>-C-X<sub>3</sub>-(F/Y)-X<sub>5</sub>-ψ-X<sub>2</sub>-H-X<sub>3-4</sub>-H (onde X é qualquer aminoácido e ψ é qualquer resíduo hidrofóbico). Esse domínio forma uma estrutura composta por duas folhas-β e uma α-hélice (ββ $\alpha$ ), que, na presença do zinco se dobra de modo a conectar as cisteínas e histidinas ao zinco, fazendo com que os resíduos centrais do domínio formem uma estrutura de alça, semelhante a um dedo (Miller et al. 1985; Frankel et al. 1987; Pavletich & Pabo 1991). O domínio C2H2 foi o primeiro domínio dedo de zinco identificado em uma proteína, dando origem ao grupo das proteínas dedo de zinco (ZFPs – *Zinc Finger Proteins*) (Klug & Schwabe 1995; Laity et al. 2001; Wolfe et al. 2000).

A primeira proteína dedo de zinco identificada foi o fator de transcrição geral IIIA (FTIIIA) em 1983 a partir de oócitos imaturos da espécie *Xenopus* (Hanas et al. 1983). Essa proteína apresenta 9 domínios C2H2 em sequência, cada um coordenando um íon de zinco de maneira independente, e, através da interação com o DNA, ativa a transcrição do RNA 5S (Hanas et al. 1983; Miller et al. 1985). A partir dessa descoberta, muitas outras ZFPs com domínio C2H2 foram caracterizadas e esse domínio dedo de zinco passou a representar uma das maiores e mais importante famílias de proteínas de ligação ao DNA na transcrição de eucariotos (Brayer & Segal 2008; Wei et al. 2013). Além disso, foi estimado que no genoma humano aproximadamente 3% dos genes codificam para ZFPs com domínios C2H2, tornando esse o segundo domínio proteico mais prevalente (Matthews & Sunde 2002; Kersey 2004; Brayer & Segal 2008).

Apesar do domínio C2H2 estar associado com a ligação ao DNA, ZFPs com esse domínio – como a própria FTIII A - tem apresentado a capacidade de interagir também com RNA e outras proteínas (Mackay & Crossley 1998; Dominski et al. 2002; Lee et al. 2006; Hall 2005; Brown 2005). Posteriormente, foram identificadas ZFPs com atividade de ligação ao RNA que apresentassem outros domínios dedo de zinco que não o C2H2. Entre eles destacou-se o domínio C3H (CCCH) que foi encontrado em proteínas de mamíferos (e.g. TTP), plantas (e. g. *Arabidopsis* HUA1) e de parasitas como os tripanosomatídeos (ex: TcZFP1) (Mörking et al. 2004; Brewer et al. 2004; Cheng et al. 2003).

O domínio dedo de zinco C3H foi inicialmente caracterizado na pequena família de proteínas denominada de TTP (tristetraprolina), também conhecida por Nup475, G0S24 e TIS11, e que nos mamíferos é composta por três membros: ZFP36 (TIS11), ZFP36L1 (TIS11b) e ZFP36L2 (TIS11d) (Blackshear 2002; Brooks & Blackshear 2013).

A pesquisa com a família TTP começou com a análise fenotípica de camundongos TTP-KO (nocaute para TTP), que mostrou que esses animais apresentavam uma síndrome severa de retardo no crescimento, caquexia, artrite, inflamação e autoimunidade (Taylor et al. 1996). Ainda, nesse artigo foi estabelecida a primeira conexão entre TTP e a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor* alfa). Em estudos subsequentes verificou-se que essa conexão ocorria através da interação da proteína dedo de zinco TTP com o mRNA de TNF- $\alpha$  (Carballo et al. 1997; Carballo et al. 1998).

A caracterização do sítio de ligação de TTP nesse transcrito alvo revelou que essa proteína dedo de zinco reconhecia elementos ricos em adenina-uracila (ARE – *AU-rich elements*) na porção 3'-UTR do mRNA de TNF- $\alpha$ , promovendo a sua desestabilização via exossomos (Chen et al. 2001; Blackshear et al. 2003). Posteriormente, demonstrou-se que outros membros da família TTP também reconheciam elementos ARE na região 3'-UTR de seus alvos, promovendo a redução nos níveis desses mRNAs (Lai et al. 2000). Em 2004, Hudson e colaboradores analisaram a estrutura do domínio C3H presente na proteína ZFP36L2 no reconhecimento do RNA. Os resultados

demonstraram que essa interação não depende de uma estrutura secundária no RNA, podendo essa inclusive interferir na ligação, e que o RNA ocupa uma única “face” do domínio dedo de zinco, possibilitando que outras proteínas ou pequenas moléculas interajam com a ZFP (Brooks & Blackshear 2013; Hudson et al. 2004).

A família TTP é amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em diversos organismos eucarióticos dentre fungos, insetos e vertebrados. Foram encontrados membros dessa família também em vírus e alguns protozoários (Blackshear & Perera 2014). Embora essa família seja o exemplo clássico do domínio C3H, ela não é a única a apresentar esse domínio dedo de zinco. Análises *in silico* têm mostrado uma grande variedade de ZFPs com domínios C3H diversos e distintos em relação ao encontrado na família TTP, como é o caso das 68 e 67 proteínas, que foram separadas em 11 e 8 subfamílias de proteínas dedo de zinco C3H, encontradas em *Arabidopsis* e *Oryza sativa*, respectivamente. (Wang et al. 2008). Com base na identificação dessas diversas subfamílias o domínio C3H passou a compreender sequências com a seguinte configuração: C-X<sub>4-15</sub>-C-X<sub>4-6</sub>-C-X<sub>3</sub>-H (Wang et al. 2008)

Esses quatro domínios apresentados – RRM, PUF, ALBA e dedo de zinco (C2H2 e C3H) – compartilham algumas características importantes, como ampla distribuição na natureza e a capacidade de interação principalmente com moléculas de RNA, mas também outras proteínas e possivelmente DNA, o que faz com que sejam interessantes alvos de estudos em organismos como o *T. cruzi* devido à importância que a regulação da expressão gênica pós-transcricional apresenta nesse táxon (Clayton 2013; Kolev et al. 2014).

## 1.6 . RBPs nos tripanossomatídeos

A identificação de proteínas de ligação ao RNA com os domínios RRM, PUF, ALBA e dedo de zinco C3H mostrou que proteínas com esses domínios estão presentes genomas de tripanossomatídeos, como no caso do *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* (Gaudenzi et al. 2005b; Kramer et al. 2010; Mani et al. 2011; Caro et al. 2006).

Gaudenzi e colaboradores (2005) realizaram análises de sequência *in silico* no genoma desses três tripanossomatídeos buscando proteínas com domínio RRM. Essa busca resultou na identificação de 139 proteínas RRM no *T. cruzi*, 75 em *T. brucei* e 80 em *L. major* (Gaudenzi et al. 2005b).

Em relação às proteínas da família PUF, foram identificadas até o momento 10 membros nesses três tripanossomatídeos (Caro et al. 2006; Luu et al. 2006). Já para o domínio ALBA encontrou-se quatro proteínas no *T. cruzi* e *T. brucei* e duas proteínas ALBA em *L. major* (Subota et al. 2011).

Outra análise *in silico* realizada por Kramer e colaboradores (2010) identificou 51 genes que codificam para ZFPs C3H no *T. cruzi*, 48 no *T. brucei* e 54 em *L. major*. Uma grande parte dessas proteínas identificadas possui mais de um domínio C3H ou outros domínios além desse. Ainda, esse estudo revelou que a vasta maioria das proteínas C3H é exclusiva aos Kinetoplastida (Kramer et al. 2010),

A identificação desse grande número de RBPs nos tripanossomatídeos permitiu que houvesse avanços na caracterização das proteínas com esses domínios nesses organismos. O quadro 1 traz algumas dessas proteínas que foram caracterizadas até o momento nos tripanossomatídeos (revisado por Alves & Goldenberg, *in press*).

De modo geral, conforme mostra o quadro, foram identificadas RBPs associadas a diversos processos celulares que envolvem o metabolismo do RNA, desde o seu processamento até a sua tradução e/ou degradação. Além disso, dentre as proteínas identificadas, uma grande parte atua regulando conjuntos de mRNAs alvos específicos, como o caso das proteínas PTB2 (Stern et al. 2009), RBP3 (Noé et al. 2008), RBP10 (Wurst et al. 2012), RBP40 (Guerra-Slompo et al. 2012), ZC3H20 (Ling et al. 2011) e ZC3H39 (Alves et al. 2014), fornecendo maiores indícios de que a teoria dos “RNAs *regulons*” é válida para os tripanossomatídeos.

Ainda, muitas proteínas caracterizadas mostraram-se envolvidas nos processos de diferenciação, tanto no *T. brucei* (ALBA3, ALBA4, RBP6, RBP10, PUF9, TbZFP1, TbZFP2, TbZFP3 e ZC3H18), quanto no *T. cruzi* (RBP19, TcZFP1, TcZFP2, TcZFP3), de modo a influenciá-lo, indicando que as RBPs são elementos importantes na regulação da expressão gênica envolvida no ciclo de vida desses parasitas (Alves et al. 2014; Subota et al. 2011; Kolev et

al. 2012; Wurst et al. 2012; Archer et al. 2009; Mörking et al. 2004; Caro et al. 2005; Mörking et al. 2012; Hendriks et al. 2001; Walrad et al. 2012)

**Quadro 1. Lista de RBPs caracterizadas nos tripanossomatídeos (adaptado de Alves & Goldenberg, *in press*)**

Proteína	Função	Organismo	Domínio
Alba 1	Translation control	<i>T. brucei</i>	Alba
Alba 2	Translation control	<i>T. brucei</i>	Alba
Alba 3	Involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	Alba
Alba 4	Involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	Alba
LiAlba20	mRNA stability	<i>L. infantum</i>	Alba
DRBD18	Methylated form stabilizes mRNAs	<i>T. brucei</i>	RRM
PTB2 (DRBD4)	Regulator of a specific subset of mRNAs	<i>T. brucei</i>	RRM
RBP3	Regulator of a specific subset of mRNAs	<i>T. cruzi</i>	RRM
RBP6	Involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	RRM
RBP10	Regulator of stage-specific mRNAs, involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	RRM
RBP19	Involved in differentiation	<i>T. cruzi</i>	RRM
RBP40	Regulator of a specific subset of mRNAs	<i>T. cruzi</i>	RRM
RBP42	Polysome-associated	<i>T. brucei</i>	RRM
RRM1	Modulator of chromatin structure	<i>T. brucei</i>	RRM
UBP1	mRNA destabilizing factor	<i>T. cruzi, T. brucei</i>	RRM
PUF1/PUF6	mRNA destabilizing factor	<i>T. cruzi</i>	Pumilio
PUF7	Ribosomal RNA maturation	<i>T. brucei</i>	Pumilio
PUF8	rRNA processing	<i>T. brucei</i>	Pumilio
PUF9	Involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	Pumilio
PUF10	rRNA processing	<i>T. brucei</i>	Pumilio
PUF2	mRNA-destabilizing factor	<i>T. brucei</i>	Pumilio
ZFP1	Involved in differentiation	<i>T. cruzi, T. brucei</i>	CCCH
ZFP2	Involved in differentiation	<i>T. cruzi, T. brucei</i>	CCCH
ZFP3	Involved in differentiation, translation regulator	<i>T. cruzi, T. brucei</i>	CCCH
ZC3H11	Stabilizing factor of chaperone mRNAs	<i>T. brucei</i>	CCCH
ZC3H12	Involved in procyclic growth	<i>T. brucei</i>	CCCH
ZC3H13	Involved in procyclic growth	<i>T. brucei</i>	CCCH
ZC3H18	Involved in differentiation	<i>T. brucei</i>	CCCH
ZC3H20	Stabilizing factor of stage-specific mRNAs	<i>T. brucei</i>	CCCH
ZC3H39	Regulator of a specific subset of mRNAs	<i>T. cruzi</i>	CCCH

Apesar dos estudos de caracterização dessas proteínas apresentarem resultados relevantes, muitas proteínas permanecem apenas parcialmente caracterizadas, deixando em aberto informações como funções, mecanismos de ação e o envolvimento em outros processos celulares, que não necessariamente envolvam a associação com RNA. Outro fato consiste na grande quantidade de RBPs identificadas pelas análises *in silico* que ainda não foram caracterizadas nesses organismos.

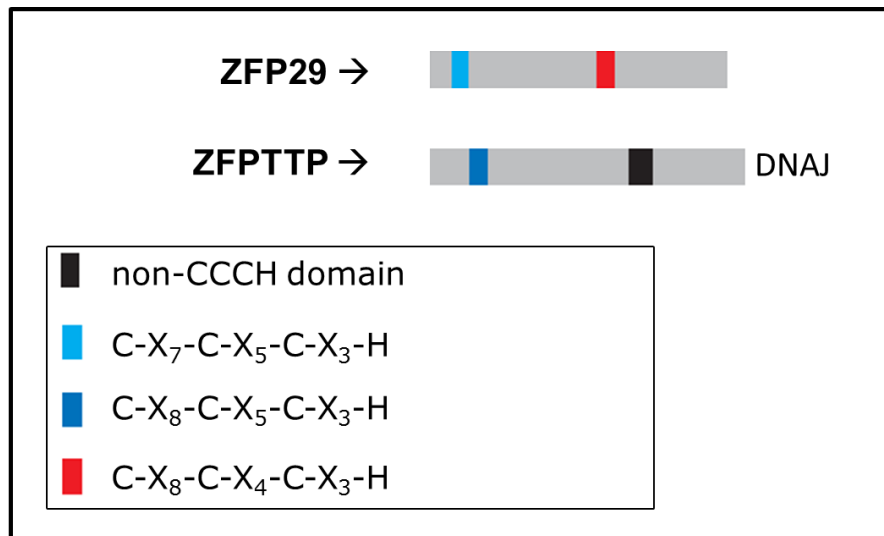
Dessa forma, com base nos resultados encontrados para as RBPs caracterizadas até o momento, mostrando sua relevância nos tripanossomatídeos, torna-se essencial investir na caracterização de proteínas RBPs visando elucidar os seus papéis na biologia desses organismos.

### **1.7 . As proteínas ZFP29 e ZFPTTP de *Trypanosoma cruzi***

As proteínas ZFP29 (TcCLB.506885.204) e ZFPTTP (TcCLB.503453.20) são proteínas com domínio dedo de zinco do tipo C3H. Elas foram identificadas na análise *in silico* feita por Kramer e colaboradores (2010), a qual mostrou que ZFP29 possui dois domínios C3H (C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-H e C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>3</sub>-H), enquanto que ZFPTTP contém um domínio C3H (C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>5</sub>-CX<sub>3</sub>-H ) e um DNAJ (Kramer et al. 2010). Uma ilustração da posição desses domínios encontra-se na figura 1.5

As proteínas ZFP29 e ZFPTTP foram alvo de um estudo anterior que visou à obtenção de anticorpos policlonais específicos para elas e uma caracterização funcional prévia (Romagnoli 2013).

Nesse estudo, através da utilização dos anticorpos policlonais obtidos, foi observada a localização celular nas formas epimastigotas e o perfil de expressão ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. Constatou-se que ambas as proteínas localizam-se dispersas por todo o citoplasma nas formas epimastigotas num padrão granular e são expressas somente nas formas epimastigotas, o que levantou a hipótese de que ZFP29 e ZFPTTP estivessem sofrendo algum tipo de regulação negativa no decorrer do ciclo de vida do *T. cruzi*.



**Figura 1.5. Domínios das proteínas ZFP29 e ZFPTTP.** Adaptado de Kramer et al. 2010).

Tendo em vista a suas localizações e a aparente ausência da expressão de ZFP29 e ZFPTTP nas formas tripomastigotas metacíclicas, tornou-se interessante aprofundar o estudo acerca dessas duas proteínas. Para tanto, essa dissertação se propôs a investigar a regulação de ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese, além de avaliar as suas funções no *T. cruzi*, analisando a participação delas em complexos mRNPs.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 . OBJETIVO GERAL**

Caracterização das proteínas ZFP29 e ZFPTTP de *Trypanosoma cruzi* que possuem domínios de ligação a RNA tipo dedo de zinco CCCH.

### **2.2 . OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Avaliar o perfil de expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP ao longo da metaciclogênese.

Analisar o perfil de expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP ao longo da metaciclogênese.

Avaliar o papel das proteínas ZFP29 e ZFPTTP no crescimento e na metaciclogênese.

Determinar a imunolocalização das proteínas ZFP29 e ZFPTTP durante a metaciclogênese.

Identificar os complexos mRNP envolvendo as proteínas ZFP29 e ZFPTTP.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 . Soluções e tampões

**Solução de bloqueio para *Western blot*:** Tampão PBS, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5%.

**Solução de Brometo de Etídio:** 5,0 µg/mL de brometo de etídio em água destilada.

**Solução de coloração por prata:** Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%

**Solução de fixação:** Etanol 50%; Ácido acético 12%; Formaldeído 0,02%

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

**Solução de revelação de prata:** para 100 mL: Carbonato de sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 mL da solução de sensibilização.

**Solução de sensibilização:** Tiosulfato de sódio 0,02%

**Solução de término de revelação de prata:** Etanol 50%; Ácido acético 12%.

**Solução PSG:** Fosfato de sódio 75 mM pH 8,0; NaCl 65 mM, Glicose 1,5%.

**Solução TBE para eletroforese de DNA (Tris- Ácido Bórico – EDTA):** Tris-base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0.

**Solução TE (Tris-EDTA):** Tris-HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM.

**Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x:** Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

**Tampão de amostra para proteínas 4x:** Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, β-Mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

**Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,74 mM.

**Tampão de transferência para *Western blot*:** Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%.

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

**Tampão IMP1:** NaCl 150 mM, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, NP-40 0,5%;

**Tampão PBS - TWEEN 20:** PBS -Tween 20 0,05%.

**Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*):** KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4,3 mM; NaCl 137 mM.

**Tampão SSC 20X:** NaCl 3M e Citratotrisódico 2-hidrato 0,3M.

### 3.2 . Meios de cultura

**Meio LB (Luria-Bertani):** Bacto-triptona 10,0 g/l, NaCl 5,0 g/l, Extrato de levedura 5,0 g/l, (LB-ágar): adição de 1,5% de agar-ágar.

**Meio LIT:** Infusão de fígado 5,0 g/l, NaCl 4,4 g/l, KCl 0,4 g/l, Glicose 2,2 g/l, Triptose 5,0 g/l, Fosfato básico de sódio 11,56 g/l, Extrato de levedura 15,0 g/l, Hemina 0,02 g/l, Soro fetal bovino 10%, Penicilina 10.000 U pH 7,2.

**Meio TAU (Triatomine Artificial Urine):** NaCl 190,0 mM, KCl 17,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, Tampão fosfato pH 6,0 8,0 mM.

**Meio TAU 3AAG pH 6,0 mM:** Meio TAU suplementado com: Glicose 10,0 mM, Ácido L-aspartico 2,0 mM, Ácido L-glutâmico 50,0 mM, L-Prolina 10,0 mM.

### 3.3 . Microrganismos

***Escherichia coli:*** As bactérias de genótipo DH5<sup>TM</sup>: {F- *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*} foram utilizadas nas etapas de clonagem e propagação de vetores de clonagem.

***T. cruzi* clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*):** Para a realização deste trabalho foram utilizados parasitas sob a forma epimastigota mantidos em meio de cultura LIT (Camargo 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias com inóculos de 10<sup>6</sup> parasitas/mL em 5 mL. Para obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas foi realizado o ensaio de metaciclogênese *in vitro*, descrito por Contreras e colaboradores (Contreras et al., 1985).

### 3.4 . Ensaio de metaciclogênese *in vitro*

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas, as formas epimastigotas em densidade celular de aproximadamente 5x10<sup>7</sup> células/ml foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 25°C. As células foram suspensas em meio TAU em densidade de 5,0 x 10<sup>8</sup> células/ml e incubadas a 28 °C durante 2 horas (Contreras et al., 1985). Neste período os parasitas encontraram-se sob estresse nutricional e ao final do período de 2 horas, os

parasitas foram incubados na concentração final de  $5,0 \times 10^6$  células/mL em meio TAU3AAG a 28 °C durante 72 horas. Neste processo os parasitas aderiram às paredes das garrafas de cultivo e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, sendo liberadas no sobrenadante do meio de cultura.

Para obtenção das células epimastigotas aderidas após 24, 48 ou 72 horas de cultivo no meio de diferenciação, o sobrenadante da cultura foi desprezado, adicionado tampão NKM e as formas aderidas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura com este tampão (Bonaldo et al. 1988).

Após 72 horas o sobrenadante das garrafas de cultivo foram coletados e centrifugados a 7000 x g por 10 minutos. Em seguida os parasitas foram ressuspendidos em tampão PSG e submetidos a cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) para que as formas tripomastigotas metacíclicas fossem purificadas (Kleffmann & Schaub 1998). A purificação foi observada através da visualização em microscópio óptico .

### **3.5 . Preparação de extrato proteico de T. cruzi Dm28c e análise por Western blot**

Os extratos proteicos dos parasitas nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional, epimastigotas aderidos por 24, 48 e 72 horas, e tripomastigotas metacíclicos produzidos neste trabalho foram obtidos a partir de  $1 \times 10^8$  células, que foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 4°C e, lavadas três vezes com tampão PBS. A cada lavagem os parasitas foram centrifugados nas mesmas condições e o sobrenadante removido. Após a última lavagem os parasitas foram suspensos em 55 µL de tampão PBS, seguida da adição de 20 µL de inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets* - Roche) e 25 µL de tampão de amostra para proteínas 4x para que ocorresse a lise celular. O extrato foi homogeneizado em gelo por 5 minutos seguido de aquecimento a 95 °C por 5 minutos e centrifugação por 1 minuto a 16.000 x g. Após o preparo dos extratos, esses foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Foram utilizadas as concentrações de 13% para o gel de corrida e 6 % para o gel de empilhamento.

A eletroforese foi realizada no tampão de corrida para SDS-PAGE por uma hora e meia a 30 mA em cuba de eletroforese vertical.

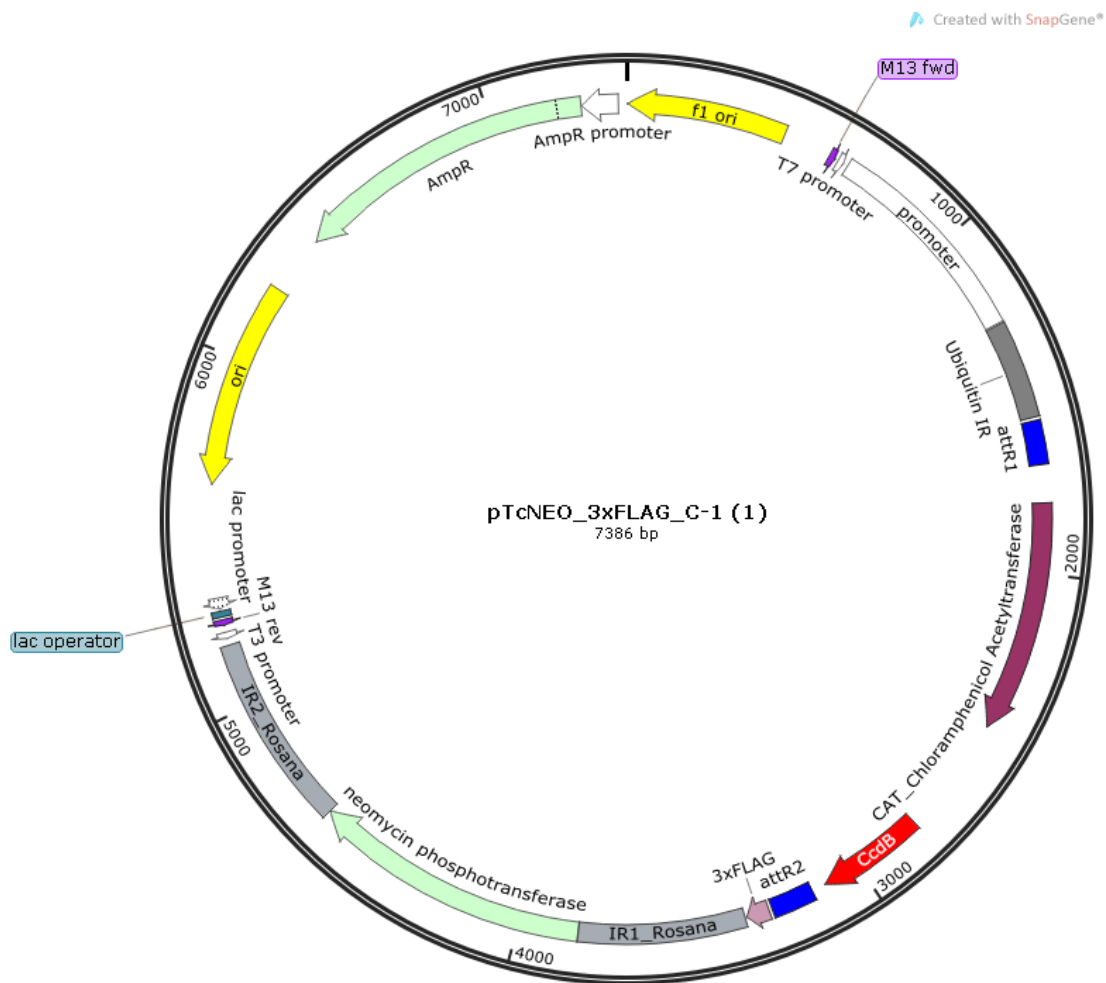
A técnica de *Western blot* foi realizada de acordo com (Towbin et al. 1979). Sendo assim, após a separação das proteínas por SDS-PAGE seguiu-se com a transferência para membrana de nitrocelulose por 16 horas a 20 V no tampão de transferência para *Western blot*. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S para verificar a eficiência da transferência e incubada em solução de bloqueio por 16 horas a 4°C. Posteriormente à incubação, a membrana foi colocada em solução de PBS/Tween 20 0,05% contendo o anticorpo primário por uma hora em temperatura ambiente e, em seguida, lavada três vezes em PBS/Tween 0,05% por 5 minutos cada lavagem. A membrana foi incubada com PBS/Tween 0,05% contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado ao fluoróforo IRDye®680LT (LI-COR) para detecção por fluorescência. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário por uma hora em temperatura ambiente seguida de lavagens conforme descrito acima. A detecção foi feita por fluorescência utilizando o scanner *Odyssey® Li-Cor Biosciences*.

### **3.6 . Obtenção de parasitos recombinantes expressando as proteínas ZFPTTP e ZFP29 fusionadas à etiqueta FLAG**

#### **3.6.1 . Obtenção dos plasmídeos pTcNEO3xFLAG-ZFP29 e pTcNEOxFLAG-ZFPTTP.**

Como os genes de ZFP29 e ZFPTTP já haviam sido clonados em vetor pDONR 221™ (Romagnoli 2013), a obtenção dos parasitos transfectantes expressando as proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas a etiqueta *FLAG* teve início na etapa de recombinação do vetor pDONR 221™ com o vetor pTcNEO3xFLAG (Batista et al. 2010) (Figura 3.1). Esse vetor segue o mesmo princípio adotado pela plataforma *Gateway®*, apresentando as regiões necessárias (attR1 e attR2) para que seja feita a recombinação, mediada pela enzima LR clonasse, com o vetor pDONR 221™. Essa reação de

recombinação foi feita de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catalog nos. 12535-019 e 12535-027 ).



**Figura 3.1** Esquema do vetor pTcNEO3xFLAG produzido no Instituto Carlos Chagas.O sítio de recombinação para inserção do gene a ser clonado está entre as regiões destacadas em azul (attR1 e attR2).Esse vetor possui o gene neomicina fosfotransferase que confere resistência à droga de seleção G418.

Depois de feita a recombinação os vetores pTcNEOxFLAG-ZFP29 e pTcNEOxFLAG-ZFPTTP foram transformados em bactérias DH5 $\alpha$  competentes. Para isso, as reações de recombinação foram incubadas com 100  $\mu$ L das bactérias no gelo por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi aquecida a 42°C durante 2 minutos seguidos de 2 minutos novamente no gelo. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de meio LB nos tubos e as células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação. Em seguida as bactérias

transformadas foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura seletivo (Meio LB, ágar 1,5% e Ampicilina 100 µg/ml) por 16 horas.

As culturas que apresentaram crescimento foram coletadas para extração e purificação dos plasmídeos recombinantes utilizando o kit QIAprep® Miniprep (QIAGEN) conforme descrito no protocolo padrão do fabricante.

Para confirmação dos clones foi realizada uma etapa de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos previamente desenhados para ZFP29 e ZFPTTP (Romagnoli 2013) (Quadro 3.1).

**Quadro 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores para ZFP29 e ZFPTTP.**

ZFP29	Primer Forward	5' ATGACACAGATCATCACTGAGAAT 3'
	Primer Reverse	5' TTACCATTCACATCCTGTACA 3'
ZFPTTP	Primer Forward	5' ATGTCGCTTTCATTTATCGAGT 3'
	Primer Reverse	5' TCACCAGATGCTGTCCTCAG 3'

As reações de PCR foram feitas utilizando uma enzima *Taq* DNA polimerase recombinante produzida e fornecida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) além de 2,5 mM de dNTP, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão específico para a enzima utilizada, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e água ultrapura suficiente para completar o volume da reação de 20 µL. Os ciclos de amplificação foram montados da seguinte forma: 94° C por 3 minutos iniciais seguidos de 30 ciclos (desnaturação, anelamento e extensão) de 30 segundos a 94° C, 30 segundos de anelamento a 55° C e 1 minuto a 72° C para extensão.

Para análise da amplificação alíquotas de 5 µl dos *amplicons* purificados foram misturadas com o tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de Tampão TBE, a fim de se verificar seu perfil eletroforético. O marcador de peso molecular utilizado como referência foi o 1kb *Plus* (Invitrogen).

Na eletroforese de DNA o gel foi submetido a uma corrente constante de 100v, e posteriormente corado em uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos. Após o tratamento com este intercalante o DNA pode ser observado sob luz UV (comprimento de onda na

faixa de 260nm), e fotografado através do sistema de captação de imagens *UV White Darkroom* (*UVP Bioimaging Systems*).

Depois de visualizada a amplificação dos genes de interesse foi feita a quantificação desses plasmídeos no espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>®</sup> ND-1000 (*Thermo Scientific*) e esses foram utilizados para a transfecção do *T. cruzi*.

### **3.6.2. Transfecção de *T. cruzi* por eletroporação e seleção de parasitas transfectantes.**

A transfecção dos parasitas foi feita utilizando  $1 \times 10^8$  epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Esses parasitas foram centrifugados por 5 minutos a  $7.000 \times g$ , lavados com PBS (solução de uso) estéril e suspensos em 1 mL de tampão de eletroporação. Em seguida foram coletados 0,4 mL desta suspensão (equivalente a  $4 \times 10^7$  células) e transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mm previamente resfriada em gelo. Os vetores pTcNEO3xFLAGZFPTTP e pTcNEO3xFLAGZFP29 foram adicionados às células em uma concentração de 15-30  $\mu\text{g}$  e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. Como controle da seleção, formas epimastigotas selvagens foram eletroporadas sem a presença dos vetores. A mistura foi submetida à eletroporação com 2 pulsos de 450 V e 500  $\mu\text{F}$  em eletroporador Gene PulserXcell<sup>™</sup> Electroporation System (Bio-Rad) e mantida por 10 minutos no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25  $\text{cm}^3$  contendo 10 mL de meio LIT adicionado de penicilina (100 U) e incubadas a 28 °C durante 24 horas. Após este período de recuperação, adicionou-se 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 no meio LIT para realizar o processo de seleção dos parasitas.

Aproximadamente 72 horas após a adição da droga foi feita uma diluição 1:4 dos parasitas em meio contendo 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418. As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que fosse observada a ausência de crescimento celular na cultura controle, que foi eletroporada sem plasmídeos. As células resistentes à droga foram selecionadas em intervalo de 15 a 30 dias.

### 3.7 . Clonagem Populacional

Para realizar o enriquecimento da população de parasitas transfectantes expressando as proteínas ZFP29 ou ZFP2TP fusionadas à etiqueta *FLAG*<sup>®</sup> foram utilizadas dois métodos: o de diluição seriada e o *cell sorting*. Em ambos os casos após a execução das etapas os extratos das populações foram obtidos e analisados por *Western blot* conforme descrito no tópico 3.5.

#### 3.7.1 . Diluição seriada

A diluição seriada das culturas dos parasitas transfectantes ocorreu a partir de repiques sucessivos onde a quantidade de inóculo foi gradativamente diminuindo, enquanto que a concentração de G418 (marcador de seleção) aumentava. Dessa forma, partindo de um repique inicial com inóculo de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL em 5mL de meio LIT contendo 50  $\mu$ l de G418 (concentração final de 500  $\mu$ g), chegou-se a uma quantidade de  $1 \times 10^5$  parasitas/mL inoculados em 5 mL de LIT adicionando-se 100  $\mu$ l do antibiótico (concentração final de 1mg). Após o crescimento, essas culturas foram submetidas ao teste de expressão para avaliar se houve o enriquecimento populacional

#### 3.7.2 . Cell sorting

Para realização do *cell sorting* foram coletados o equivalente a  $1 \times 10^6$  parasitas de cada cultura transfectante e mantidos em um tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação de 2 minutos a 3000 g descartou-se o sobrenadante e os parasitas foram ressuspensos em 2mL de PBS (solução de uso) estéril. Essas amostras foram analisadas na plataforma de citometria do Instituto Carlos Chagas (RPT08L) no citômetro FACS Aria II. Após identificar a população celular foi realizado o *sorting* dos parasitas utilizando o parâmetro “*single cell sorting*”, coletando uma célula por poço em placa de 96 poços (fundo chato) contendo 100  $\mu$ L de LIT, penicilina/streptomicina (1X), ampicilina (100  $\mu$ g/mL), gentamicina (10  $\mu$ g/mL) e G418 (500  $\mu$ g concentração final).



Posteriormente os parasitas foram incubados a 28°C, 5% CO<sub>2</sub> e umidade por cerca de 3 semanas. Passado esse período, os poços que apresentaram crescimento tiveram seus parasitas coletados e repicados (volume de 10 µL) em placas de 24 poços contendo 1mL de meio LIT mais 10 µL de G418 (500 µg), mantendo o cultivo a 28°C e 5% CO<sub>2</sub>. Depois de apresentar crescimento, foram selecionadas algumas culturas para repique em placa de 6 poços contendo 5 mL de LIT e 500 µg de G418, novamente mantidos a 28°C e 5% CO<sub>2</sub> e umidade. Dessas culturas foram feitos os testes de expressão para avaliar se houve a clonagem populacional.

### 3.8 . PCR de cultura

Para avaliar a presença do plasmídeo pTcNEO3xFLAG contendo os genes *zfp29*, *zfp2tp* ou *gfp* nas formas tripomastigotas metacíclicas, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do sobrenadante das culturas transfectantes e selvagem (*Wild – Type*) após 72 horas induzida a diferenciação. Esse procedimento foi feito de acordo com o protocolo descrito e estabelecido por Alcantara e colaboradores (2014). Para a sua realização utilizou-se 50 µL das culturas que foram misturados numa proporção de 1:1 com água ultra pura e posteriormente aquecidos a 98 °C por 15 minutos. Após esse processo de desnaturação os debris celulares foram separados através de uma etapa de centrifugação de 1 minuto na velocidade máxima (~20000 g). O sobrenadante foi coletado e 1 µL foi utilizado para cada reação de PCR (Alcantara et al. 2014).

Os oligonucleotídeos utilizados nessa reação foram os correspondentes ao gene que confere resistência a neomicina (neomicina fosfotransferase) e estão representados abaixo (Quadro 3.2)

**Quadro 3.2 Oligonucleotídeos inicializadores utilizados para amplificação do gene de resistência a neomicina.**

NeoF	5'- GGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG-3'
NeoR	5'- GGGGGAATTCAGAAGAAGACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA-3'
Tamanho do amplicon: 801pb	

A reação de PCR e a análise da amplificação foram feitas conforme descrito anteriormente (item 3.6.1).

### **3.9 . Análise da expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP ao longo da metaciclogênese por qPCR.**

A análise da expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese foi feita por PCR quantitativo (qPCR) de acordo com critérios MIQE (Bustin et al. 2009). Para isso, seguindo o protocolo descrito previamente (3.4), foram obtidos os parasitas nas formas epimastigotas na fase de crescimento exponencial (três dias) e no final do crescimento exponencial (cinco dias); submetidos ao estresse; aderidos à garrafa de cultivo (24 horas) e tripomastigotas metacíclicos (72 horas) em triplicata biológica. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração foi feita uma digestão com 1 U da enzima DNase RQ1 (Promega) por 1 µg de RNA por 1 hora a 37°C. Depois desse tratamento os RNAs foram quantificados por fluorometria no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) através do kit RNA BR (Broad Range). Posteriormente, a reação de transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA, *random primer* (300 ng por reação) e o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo o protocolo do fabricante com alterações, foi aumentado o tempo de extensão da reação de transcrição reversa de 1 para 2 horas a 42°C. O cDNA obtido foi utilizado para as reações de qPCR realizadas em termociclador LightCycler® 96 (ROCHE). Dessa forma, as reações foram realizadas contendo 50 ng de cDNA (concentração de 10ng/µL), 5 pmol de cada oligonucleotídeo específico para cada gene (Quadro 3.3) e 10 µL do Fast SYBR® Green Mix (Applied Biosystem), em um volume final de 20 µL. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando a ferramenta *online* Primer-BLAST (Ye et al. 2012). Para determinação da eficiência dos oligonucleotídeos utilizados foi construída uma curva padrão com 5 pontos (em triplicata técnica) a partir de 50ng de cDNA (obtido de epimastigotas e com concentração igual a 10 ng/µL), usando uma diluição seriada com razão 1:10.

Posteriormente o experimento foi feito em triplicata técnica e biológica dos cDNAs das diferentes formas obtidas.

A reação foi incubada a 95°C por 10 minutos seguidos de 60 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. A aquisição da fluorescência foi feita nas etapas de extensão. Após os ciclos de amplificação foi feita uma curva de dissociação que permitiu analisar aspectos como a formação de dímeros entre os oligonucleotídeos iniciadores.

A análise dos dados foi feita a partir de um modelo matemático (Pfaffl 2001) que comparou a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores e o Cq (*Quantification cycle*) de ZFP29 e ZFPTTP com o gene de referência H2B (TcCLB.511635.10) para determinação dos níveis relativos dessas duas proteínas. Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação do gene H2B foram os mesmo utilizados em trabalho publicado (Nardelli et al. 2007).

**Quadro 3.3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA de ZFP29 e ZFPTTP.**

Genes		Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon
ZFP29	Forward	TCGGTGACAAAAACGCACAC	<u>196 pb</u>
	Reverse	CACCACCCACATGAAGGAA	
ZFPTTP	Forward	GGGCACGGTGAGAAGGAGA	<u>157pb</u>
	Reverse	CGTGTACGCTGCCGAGAAG	

### 3.10 . Ensaios de imunolocalização

Os ensaios de imunolocalização realizados neste trabalho fizeram uso da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos policlonais  $\alpha$ -ZFPTTP e  $\alpha$ -ZFP29 produzidos e testados em trabalho anterior (Romagnoli 2013).

Os parasitas, nas diferentes formas de diferenciação celular foram centrifugados a 2.000 x g por 5 minutos, lavados três vezes com tampão PBS ou PSG (soluções de uso) e suspensos em paraformaldeído 4% para fixação, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células/ $\mu$ l. As células foram aderidas em lâminas de oito campos delimitados por teflon previamente tratadas com Poli-L-lisina. Em cada campo foram aderidos  $10^6$  parasitas e as lâminas foram incubadas

em câmara úmida por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 em PBS durante 2 minutos. Após a permeabilização as células foram lavadas quatro vezes com PBS e bloqueadas com BSA 1% diluído em PBS por 16 horas a 4°C. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS contendo BSA 1% e incubados com os parasitas durante uma hora em temperatura ambiente. Após incubação os parasitas foram lavados três vezes com PBS. O anticorpo secundário, conjugado ao fluoróforo Alexa 488 foi adicionado e as etapas de incubação e lavagens repetidas. Para detectar o núcleo e cinetoplasto, as células foram incubadas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroclorato) diluído em 1:2000 em PBS (concentração final de 1 µg/µl).. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e sobre cada campo foram adicionados 5 µl de *ProLong® Gold Antifade* (ThermoFisher Scientific) na concentração de 200 µg/ml. As lâminas foram seladas com lamínula e observadas no microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B, sendo que as imagens foram processadas por deconvolução utilizando o *software* LAS AF - Leica (Leica-microsystems).

### **3.11 . Análise de crescimento e da diferenciação dos parasitas transfectantes.**

#### **3.11.1 . Curva de crescimento**

Para realizar a análise da curva de crescimento as culturas transfectantes (ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG ou GFP-FLAG) e selvagem foram separadas em três culturas cada e mantidas por três repiques isolados. Após o último repique, as culturas (12 ao total) foram expandidas e o experimento foi lançado com um inóculo de  $10^6$  parasitas/mL em 10 mL de meio LIT. Essa concentração de parasitas foi, portanto, a contagem do dia zero. Nos três dias ímpares seguintes coletou-se parte dessas culturas para contagem manual dos parasitas em câmara de Neubauer. A concentração das culturas foi determinada pela seguinte equação: [Cultura]= N° de parasitas contados × Diluição × Fator de diluição da câmara ( $10^4$ ).

As diluições utilizadas nos dias foram as seguintes: 1:2 no primeiro dia; 1:30 no terceiro; 1:60 no quinto e 1:60 no sétimo. Todas as diluições foram feitas a partir de 100 µL das culturas após brevemente agitadas. Após o estabelecimento das concentrações nesses dias os dados foram processados pelo programa Graphpad Prism (6.0) que gerou os gráficos com as curvas. Os dados plotados correspondem as médias das triplicatas de cada ponto. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método two-way Anova (análise de variância). Foram considerados valores significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

### **3.11.2 . Análise da diferenciação**

Esse experimento foi feito utilizando as mesmas culturas que estavam tendo seu crescimento avaliado. No quinto dia do experimento de análise do crescimento foram coletados das culturas o volume correspondente a  $5 \times 10^8$  parasitas. Esses parasitas foram centrifugados a 3000 g por 5 minutos para remoção do meio LIT e foram ressuspensos em 1 mL de meio TAU pH 6,0 onde permaneceram por um período de 2 horas. Após esse período 100 µL dessa suspensão (equivalente a  $5 \times 10^7$  parasitas) foram adicionados a garrafas de cultivo de 25cm<sup>3</sup> contendo 9,9 mL do meio de diferenciação TAU3AAG pH 6,0. Em seguida essas garrafas foram incubadas a 28°C. Nos períodos de 24, 48 e 72 horas foram coletados das garrafas (sem agitação) 100 µL de cada garrafa para contagem manual e diferencial do número de parasitas no sobrenadante, feita em câmara de Neubauer. Novamente os dados foram processados pelo programa *Graphpad Prism* (6.0) que gerou os gráficos de barra a partir das médias das triplicatas de cada dia da diferenciação. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método *two-way Anova* (análise de variância) e foram considerados valores significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

### **3.12 . Imunoprecipitação de proteínas e mRNAs associados a ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG**

Os ensaios de imunoprecipitação foram feitos utilizando formas epimastigotas transfectantes expressando ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG. Foram utilizados  $10^9$  epimastigotas em fase logarítmica de crescimento bem como epimastigotas submetidos a estresse nutricional. As culturas foram centrifugadas a  $5.000 \times g$ , 5 minutos a temperatura ambiente para coleta dos parasitas. Após a centrifugação foram realizadas três etapas de lavagem com tampão PSG para as formas epimastigotas e tampão TAU pH 6,0 para os parasitas submetidos ao estresses, intercaladas com etapas de centrifugação ( $5.000 \times g$ , 5 minutos a temperatura ambiente). Após a última lavagem os parasitas foram incubados com 1 mL de tampão de lise IMP1 (NaCl 150 mM; 20 mM Tris-HCl pH 7,4; NP-40 0,5%) e mantidos a 4°C sob moderada agitação. A lise dos parasitas foi monitorada em microscópio óptico. Após a lise das células, o extrato celular foi obtido após a centrifugação a 10000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e utilizado para a imunoprecipitação das proteínas e RNAs.

#### **3.12.1 . Imunoprecipitação - Proteínas**

A imunoprecipitação das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG foi feita através da utilização de esferas magnéticas conjugadas ao anticorpo ANTI-FLAG® M2 (Sigma Aldrich número de catálogo M8823). A preparação dessas esferas magnéticas, bem como o protocolo de imunoprecipitação foi conforme as instruções do fabricante. Após a execução dessa etapa, as amostras coletadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de análise por *Western blot* (conforme descrito no item 3.5) e por coloração de prata.

A coloração de prata foi feita da seguinte forma. Posteriormente à eletroforese o gel foi incubado em solução de fixação (Etanol 50%; Ácido acético 12%; Formaldeído 0,02%) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas três etapas de lavagem com solução de Etanol

50% de 5, 10 e 15 minutos respectivamente. Após essa etapa o gel foi incubado com solução de sensibilização para coloração por prata (Tiosulfato de sódio 0,02% em água ultrapura) por 2 minutos, seguidos de três etapas de lavagem com água ultrapura. Em seguida foi feita a incubação com solução de coloração por prata (Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%) por 30 minutos. Depois desse período realizaram-se mais três etapas de lavagens e a revelação foi feita utilizando a solução de revelação de prata (para 100 mL: Carbonato de sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 mL da solução de sensibilização). A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (Etanol 50%; Ácido acético 12%).

A partir do gel corado com prata, as canaletas do gel correspondentes às frações eluídas foram excisadas e encaminhadas para plataforma de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas (RPT02H – PR) que processou essas amostras e realizou a análise de identificação e quantificação no espectrômetro LTQ ORBITRAP XL™ ETD associado ao cromatógrafo líquido UPLC NanoLC-Ultra 1D Plus.

### **3.12.2 . Imunoprecipitação – mRNAs.**

Os mRNAs associados as proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG foram obtidos a partir da imunoprecipitação feita com extratos de epimastigotas em fase exponencial de crescimento e parasitas submetidos ao estresse em triplicata biológica para os parasitas transfectantes e duplicata para o controle (selvagem). Os extratos foram obtidos conforme descrito no item 3.13 e o procedimento de imunoprecipitação seguiu o mesmo protocolo relatado no item 3.13.1. Após a obtenção das frações eluídas os RNAs foram extraídos utilizando o kit miRCURY™ RNA Isolation Kit Cell & Plant conforme instruções do fabricante. Posteriormente a extração os RNAs foram quantificados no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

Após a dosagem dos RNAs, esses foram utilizados para a construção das bibliotecas de cDNA que foi feita utilizando o kit Truseq™ RNA Sample Preparation (Illumina®) de acordo com as instruções do fabricante. Depois de obtidas, as bibliotecas foram analisadas quanto ao tamanho e a integridade dos

cDNAs por meio do equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 utilizando o kit Agilent DNA 1000 kit (Agilent) e quantificadas novamente por Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Em seguida as bibliotecas foram agrupadas e quantificadas por PCR quantitativo através do kit KAPA Library Quantification Kit Illumina® platforms para posteriormente serem sequenciadas. O sequenciamento foi feito na plataforma Illumina® utilizando o equipamento Illumina MiSeq que sequenciou 150 nucleotídeos (2x75) pareados (paired ended).

Depois de concluída essa etapa as sequências obtidas foram mapeadas no genoma do *T. cruzi* (cepa CL-Brener depositada no banco de dados do NCBI AAHK01) através do programa CLC Genomics Workbench v.7.5.5 utilizando os parâmetros do quadro abaixo (Quadro 3.4).

**Quadro 3.4. Parâmetros utilizados para o mapeamento no programa CLC Genomics Workbench**

Alinhamento de leitura	2
Custo de incompatibilidade	3
Custo de inserção	3
Custo de deleção	0,6
Fração de comprimento	0,8
✓ Auto-detectar distâncias pareadas	
Fita específica	ambas
Máximo número de hits para uma read	2

Posteriormente foi feita a análise de componentes principais (PCA) para verificar a correlação entre as réplicas biológicas. Para a seleção dos possíveis mRNAs associados foi aplicado um teste estatístico beta-binomial (Baggerly et al. 2003) e utilizada uma linha de corte com os seguintes critérios: RPKM > 50; Fold change > 4; FDR < 0,01. O RPKM (*Reads per kilobase per million mapped reads*) é um parâmetro utilizado para mensurar a expressão de genes a partir do número total de reads mapeadas num transcrito e levando em conta o seu tamanho, permitindo a comparação entre transcritos de tamanhos diferentes (Mortazavi et al. 2008). O fold change corresponde ao número de vezes em que um gene difere em nível de expressão entre duas amostras em comparação. Já o FDR é um método estatístico que mede a proporção esperada de resultados falso-positivos em um universo de amostras (Benjamini



& Yekutieli 2001). Com os candidatos que passaram por esse filtro foram feitas análises de GO (*Gene Ontology*) para avaliar o enriquecimento de termos. Para isso foi utilizado o programa BLAST2GO. Os parâmetros utilizados para fazer o *blast*, o mapeamento e a anotação das sequências foram os padrões do programa.

## 4. RESULTADOS

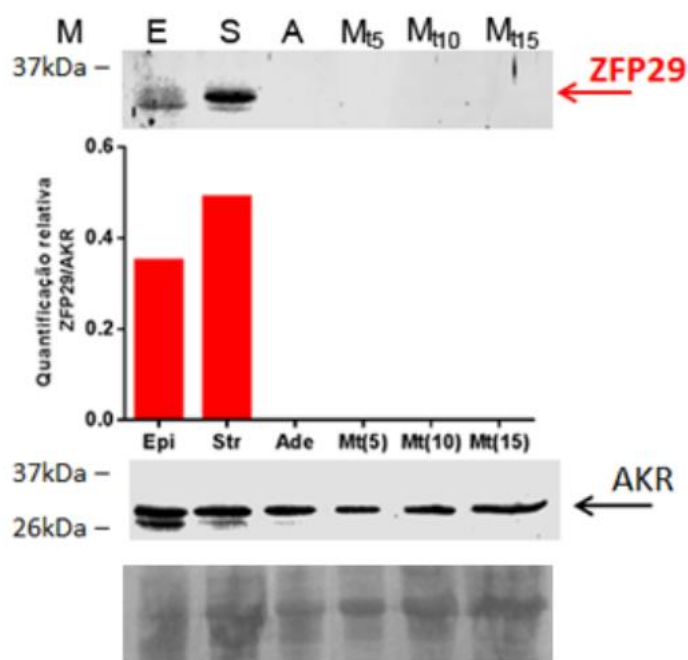
### 4.1. A expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP é regulada ao longo da metaciclogênese.

Como mencionado anteriormente, ZFP29 (TcCLB.506885.204) e ZFPTTP (TcCLB.503453.20) são proteínas com domínio dedo de zinco CCCH que apresentam um padrão de expressão diferenciado ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo ambas expressas apenas nas formas epimastigotas. O fato de haver algum tipo de regulação da expressão desses dois genes ao longo do processo de diferenciação entre as formas replicativas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas motivou o aprofundamento do estudo sobre essas duas proteínas. Inicialmente foram analisados os níveis dessas proteínas durante o processo de metaciclogênese *in vitro*.

Para isso foi mimetizada a metaciclogênese *in vitro*. Os parasitas em diferentes estágios desse processo de diferenciação foram coletados para análise da expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP. A fim de ter um controle da quantidade de extrato proteico aplicado para cada uma das formas, utilizou-se um anticorpo específico para a proteína AKR (aldo-ceto-redutase) de *T. cruzi* (TcCLB.511287.49) que é constitutivamente expressa ao longo de toda a metaciclogênese (Alves 2010). A proteína AKR também serviu com o propósito de permitir a quantificação relativa das intensidades das bandas referentes às proteínas ZFP29 e ZFPTTP por densitometria óptica (Figuras 4.1 e 4.2).

A proteína ZFP29 está presente nas formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (E) e após esses parasitas serem submetidos ao estresse nutricional (S) (Figura 4.1). No entanto, nas demais etapas da diferenciação, que consistem na adesão dos parasitas ao substrato (A) e nos tripomastigotas metacíclicos (Mt) a proteína ZFP29 não foi detectada (Figura 4.1). Esse dado indica que essa proteína não está sendo expressa nesses dois últimos estágios (A e M), pois, mesmo quando utilizado maiores quantidades de extrato de tripomastigotas metacíclicos a proteína não foi detectada (Mt<sub>10</sub> e Mt<sub>15</sub>) (Figura 4.1).

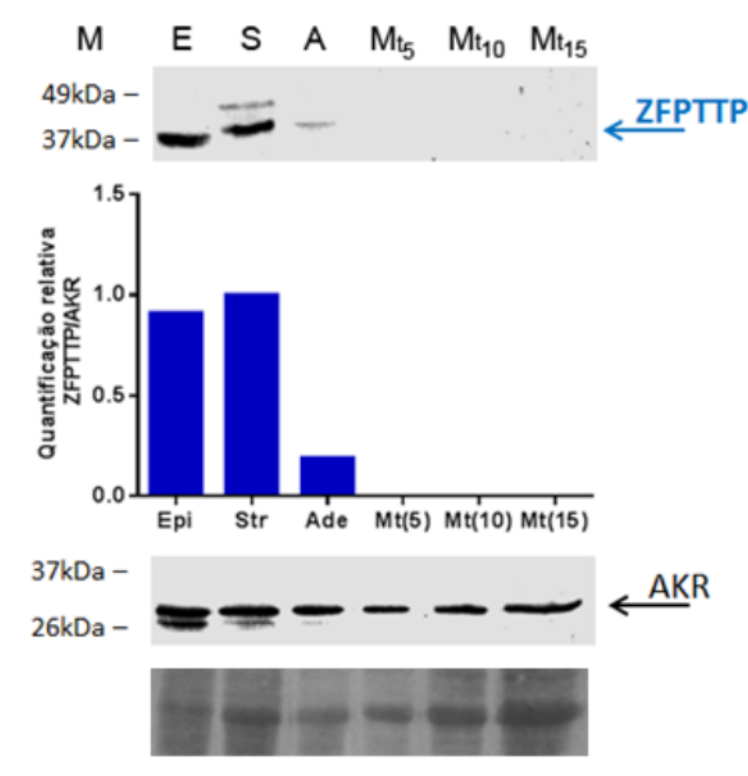
Pode-se observar a presença de duas bandas muito próximas na região de peso molecular esperado para ZFP29 (~35 kDa). Além disso, as bandas superior e inferior alternam em intensidade entre os estágios de epimastigota (E) e do parasita submetido ao estresse (S) (Figura 4.1). Essa observação pode ser decorrente de modificações pós-traducionais que estejam ocorrendo na proteína ZFP29 nessas etapas.



**Figura 4.1. Análise de expressão de ZFP29 ao longo da metaciclogênese.** M: Marcador BenchMark™; E: Epimastigotas 3 dias; S: estresse; A: aderido 24 horas; Mt: Metacíclico. Os números 5, 10 e 15 subscritos indicam diferentes concentrações de extrato de tripomastigota metacíclicos aplicados sendo  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1,5 \times 10^7$  parasitas respectivamente. Os extratos foram incubados com  $\alpha$ -ZFP29 (1:500) e com  $\alpha$ -AKR (1:500). O gráfico representa a quantificação relativa das intensidades das bandas (mensurada por densitometria óptica) correspondentes à proteína ZFP29 em relação à proteína AKR em cada um dos estágios. Os pesos moleculares esperados são 35kDa para ZFP29 e 32,5kDa para AKR. Na parte inferior está a membrana corada com Ponceau S demonstrando a quantidade de extrato aplicada.

Os dados de expressão mostram que a proteína ZFP29 é expressa nas formas epimastigotas (E), submetidas ao estresse (S) e aderidas ao substrato (A), mas está ausente nas formas metacíclicas (Mt) (Figura 4.2). Além da proteína não ser expressa em tripomastigotas metacíclicos (Mt), mesmo quando utilizado três vezes maior quantidade de extrato (Mt<sub>15</sub>), foi possível observar que na transição das formas estressadas (S) para as formas aderidas (A) houve uma drástica redução dos níveis de ZFP29. Os dados da quantificação relativa (gráfico na figura 4.2) evidenciam essa drástica redução

da proteína ZFPTTP nas formas aderidas e a sua ausência no estágio infectivo (Mt). Ainda na figura 4.2 verificou-se a presença de bandas com peso molecular ligeiramente superior ao correspondente para a proteína ZFPTTP (~39 kDa) nos parasitas submetidos ao estresse (S). Essa marcação pode se tratar de modificações pós-traducionais.



**Figura 4.2. Análise de expressão de ZFPTTP ao longo da metaciclologênese.** M: Marcador BenchMark™; E: Epimastigotas 3 dias; S: estresse; A: aderido 24 horas; Mt: Metacíclico. Os números 5, 10 e 15 subscritos indicam diferentes concentrações de extrato de tripomastigota metacíclicos aplicados sendo  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1,5 \times 10^7$  parasitas respectivamente. Os extratos foram incubados com  $\alpha$ -ZFPTTP (1:1000) e com  $\alpha$ -AKR (1:500).. O gráfico representa a quantificação relativa das intensidades das bandas (mensurada por densitometria óptica) correspondentes à proteína ZFPTTP em relação à proteína AKR em cada um dos estágios. Os pesos moleculares esperados são 39 kDa para ZFPTTP e 32,5 kDa para AKR. Na parte inferior está a membrana corada com Ponceau S demonstrando a quantidade de extrato aplicada.

Com esses resultados obtidos é possível afirmar que tanto a proteína ZFP29 quanto ZFPTTP apresentam um padrão de expressão não constitutivo na metaciclologênese e, conforme os dados indicam, são reguladas negativamente durante o processo não sendo expressas nas formas infectivas tripomastigotas metacíclicas. Cabe notar que os pontos nos quais a proteínas ZFP29 e ZFPTTP sofrem essa regulação são após o estresse nutricional (S) e durante e após a adesão ao substrato (A), respectivamente, e constituem

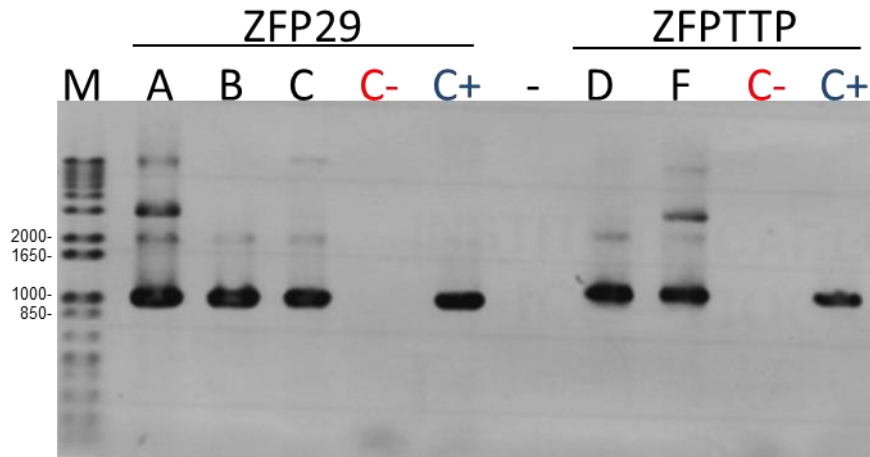
etapas importantes para o desenvolvimento do processo de diferenciação, conforme explicado anteriormente no item 1.3.

#### **4.2. Obtenção de parasitas transfectantes expressando as proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas à etiqueta comercial FLAG®.**

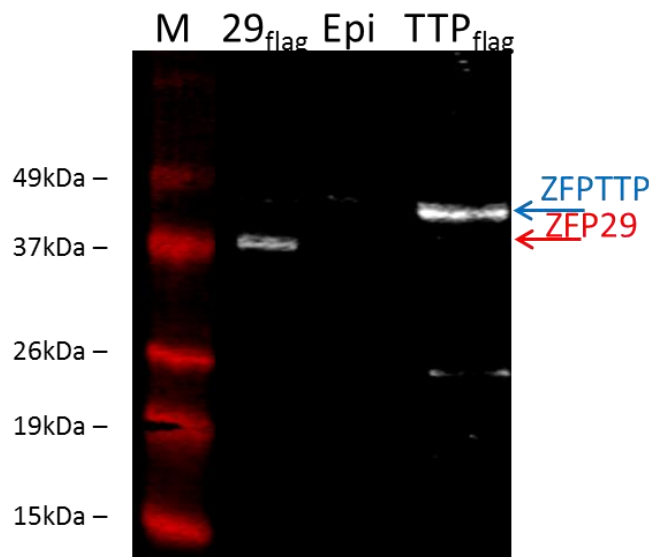
Com o intuito de obter uma ferramenta que permitisse estudar os mecanismos de regulação sofridas por ZFT29 e ZFPTTP os genes codificadores para as proteínas de estudo foram clonados em vetor pTCNEO3XFLAG. Nesse vetor foi clonado apenas a CDS de cada gene, sem as regiões 3' e 5'-UTR que são importantes alvos de regulação via elementos trans.

Esse vetor adiciona uma etiqueta constituída de três peptídeos FLAG® em sequência na porção carboxi-terminal da proteína, pelo fato dos domínios CCCH de ambas as proteínas, se situarem na porção amino-terminal. Ainda, a etiqueta *FLAG* adicionada é constituída de poucos aminoácidos, minimizando a interferência na função da proteína; a disponibilidade de anticorpos monoclonais comerciais; a possibilidade de clonagem (sem necessidade do uso de enzimas de restrições).

A clonagem nesse vetor foi realizada através da plataforma *gateway*, permitindo recombinar o gene previamente clonado no vetor pDONR 221™ (Figura 4.3). Os clones obtidos foram utilizados para transfectar formas epimastigotas do *T. cruzi*, que em seguida foram selecionadas através da presença do gene de resistência, a droga G418, presente apenas no vetor pTCNEO3XFLAG. Como controle da transfecção parasitas foram submetidos a eletroporação na ausência do vetor, e por essa razão, foram selecionados negativamente (Figura 4.4).



**Figura 4.3.** Clonagem dos genes de ZFP29 e ZFPTTP em vetor pTCNEO3xFLAG. Os genes foram amplificados a partir dos plasmídeos obtidos da minipreparação plasmidial das colônias selecionadas. M: Marcador 1Kb Plus; A,B e C são plasmídeos provenientes de clones diferentes transformados com plasmídeo-ZFP29; D e F são plasmídeos oriundos de clones distintos transformados com plasmídeo-ZFPTTP; C- e C+ correspondem aos controles negativos (ausência de DNA molde) e positivos (presença de DNA genômico de Dm28c) respectivamente. O gene que codifica para ZFP29 apresenta 948pb, enquanto que ZFPTTP possui 1080pb.



**Figura 4.4.** Obtenção de parasitos transfectantes expressando ZFP29 ou ZFPTTP fusionados a etiqueta comercial **FLAG**. M: Marcador BenchMark™. Epi – Epimastigota 3 dias selvagem ( $5 \times 10^7$  parasitos); 29<sub>flag</sub>: Epimastigota 3 dias transfectante ZFP29-FLAG ( $5 \times 10^7$  parasitos); TTP<sub>flag</sub>: Epimastigota 3 dias transfectantes ZFPTTP-FLAG ( $5 \times 10^7$  parasitos). O anticorpo utilizado foi o comercial anti-FLAG® M2 na titulação de 1:1000. As proteínas nativas ZFP29 e ZFPTTP possuem 35 e 39kDa, respectivamente.

Na tentativa de criar uma população mais homogênea, com mais parasitas expressando as proteínas ZFP29 e ZFPTTP recombinantes, foram realizadas duas abordagens: uma que consistiu em realizar uma diluição seriada da cultura com a manutenção de 500 µg de G418 (marcador de

seleção), e a outra por meio de *cell sorting* (o protocolo detalhado de ambas as abordagens está descrito no item 3.7).

O resultado observado foi que o método de diluição seriada apresentou melhores resultados em relação às culturas clonais obtidas por meio do *cell sorting* (dados não mostrados). De qualquer forma, a quantidade necessária para detectar as proteínas ZFP29 e ZFPTTP recombinantes tornou-se menor (em torno de 1 a  $2 \times 10^7$  parasitas), como demonstram os demais experimentos realizados com os extratos proteicos dos parasitas transfectantes.

Como forma de facilitar a distinção entre as proteínas nativas e as proteínas contendo a fusão, a partir desse momento as nativas serão denominadas apenas ZFP29 e ZFPTTP, enquanto que as recombinantes estarão identificadas como ZFP29-Flag e ZFPTTP-Flag.

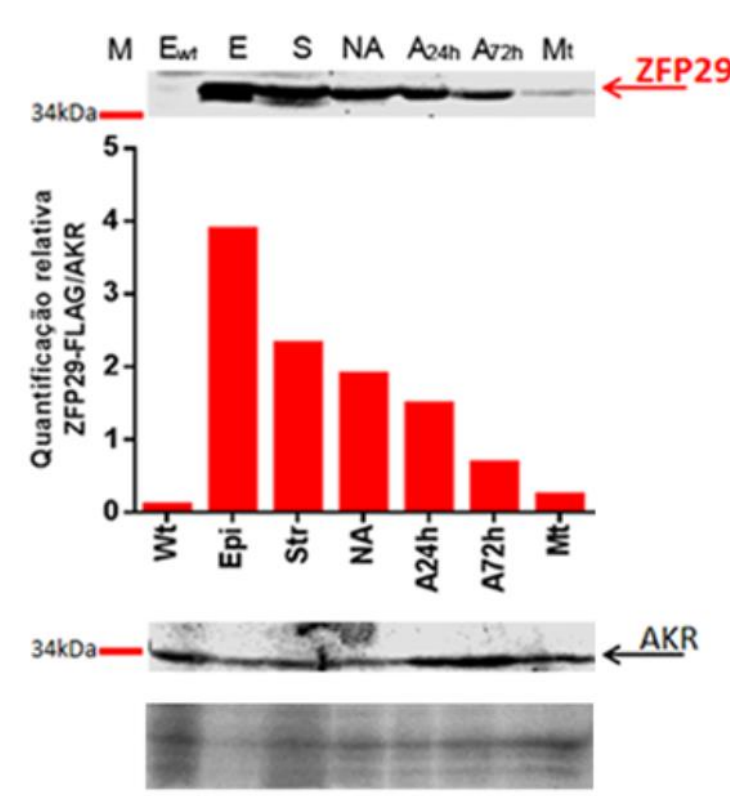
#### **4.3. Análise da expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas a etiqueta comercial FLAG®.**

Com a obtenção de parasitas transfectantes expressando as proteínas ZFP29-Flag ou ZFPTTP-Flag, avaliou-se a expressão das proteínas recombinantes ao longo da metacicloênese. Para isso, os extratos proteicos dos parasitas transfectantes submetidos ao processo de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos *in vitro* foram coletados nos mesmos estágios descritos no item 4.1. Como para as proteínas nativas ZFP29 e ZFPTTP foi observado uma mudança drástica na expressão na etapa de estresse para aderido (S → A) e de aderido para metacíclico (A → Mt), respectivamente (Figura 4.1 e 4.2).

A análise da expressão seguiu o mesmo protocolo (previamente detalhado no item 3.5), porém com a seguinte modificação: os extratos proteicos obtidos de cada estágio foram aplicados em maior quantidade, utilizando  $4 \times 10^7$  parasitas para as formas tripomastigotas metacíclicos e  $2 \times 10^7$  parasitas para os demais estágios. Foram preparados também extratos de parasitas selvagens ( $E_{wt}$ – epimastigotas *wild-type*) e parasitas transfectantes expressando a proteína GFP fusionada a etiqueta FLAG® (GFP) como

controles negativo e positivo, respectivamente, da especificidade do anticorpo anti-FLAG utilizado.

A expressão da proteína ZFP29-FLAG foi identificada em todos os estágios testados, apresentando, portanto, uma expressão diferenciada em relação à proteína nativa (Figura 4.5 e Figura 4.2, respectivamente). No entanto, apesar dos níveis proteicos da proteína recombinante serem detectáveis por todo o processo de diferenciação, ainda é possível visualizar que a proteína ZFP29-FLAG está sendo regulada gradativamente das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas. O gráfico na figura 4.5 reforça esse dado com base na quantificação da intensidade das bandas correspondentes à ZFP29-FLAG em relação à proteína AKR, novamente utilizada como normalizadora e controle da quantidade de extrato aplicado do experimento. Esse resultado aponta que, assim como a proteína ZFP29, a proteína recombinante também está sendo regulada negativamente nesse processo, porém de maneira distinta.

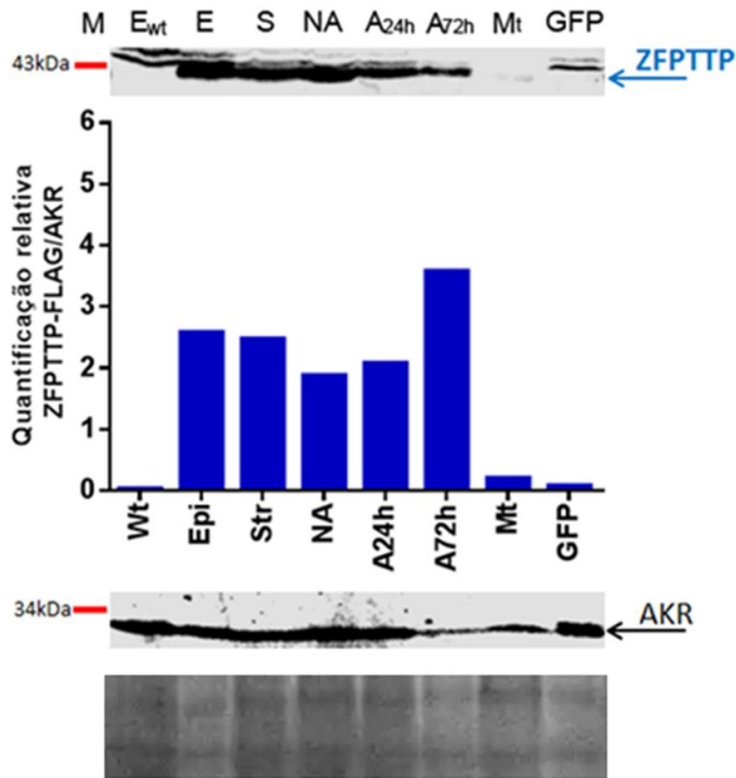


**Figura 4.5. Expressão da proteína ZFP29-FLAG na metaciclogênese.** M: Marcador PageRuler™; E<sub>wt</sub>: Epimastigota selvagem; E: Epimastigota três dias; S: Estresse; NA: Não aderido; A<sub>24</sub>: Aderido 24 horas; A<sub>72</sub>: Aderido 72 horas; M<sub>t</sub>: Metacíclico. Utilizou-se o anticorpo comercial anti-FLAG® M2 (1:1500) e o anticorpo  $\alpha$ -AKR (1:500). A quantidade de extrato aplicada foi correspondente a  $2 \times 10^7$  parasitas/poço para todos os poços, exceto para M<sub>t</sub> que foi



de  $4 \times 10^7$  parasitas. O gráfico representa a quantificação relativa das intensidades das bandas (mensurada por densitometria óptica) correspondentes à proteína ZFP29-FLAG em relação à proteína AKR em cada um dos estágios. Os pesos moleculares esperados são 35kDa para ZFP29 e 32,5 kDa para AKR. Na parte inferior está a membrana corada com Ponceau S demonstrando a quantidade de extrato aplicada.

Ao analisar a expressão da proteína ZFPTTP-FLAG (Figura 4.6), notou-se que o padrão de expressão observado para a proteína recombinante foi semelhante ao encontrado para a proteína nativa (Figura 4.6 e Figura 4.2). A proteína recombinante foi expressa até as formas aderidas obtidas após 72 horas de diferenciação, mas não foi detectada nas formas infectivas, repetindo o resultado observado para a proteína ZFPTTP. Quando analisada a quantificação relativa da proteína recombinante (gráfico na figura 4.6) constatou-se que a expressão da proteína ZFPTTP-FLAG na metaciclogênese foi relativamente constante, lembrando que como referência foi utilizada a proteína AKR. A proteína ZFPTTP-FLAG apresentou então um comportamento distinto em relação à proteína nativa, visto que ZFPTTP apresentou uma redução significativa nos níveis de proteína entre as formas submetidas ao estresse e as formas aderidas, corroborada pela quantificação relativa à proteína AKR (gráfico na figura 4.2).



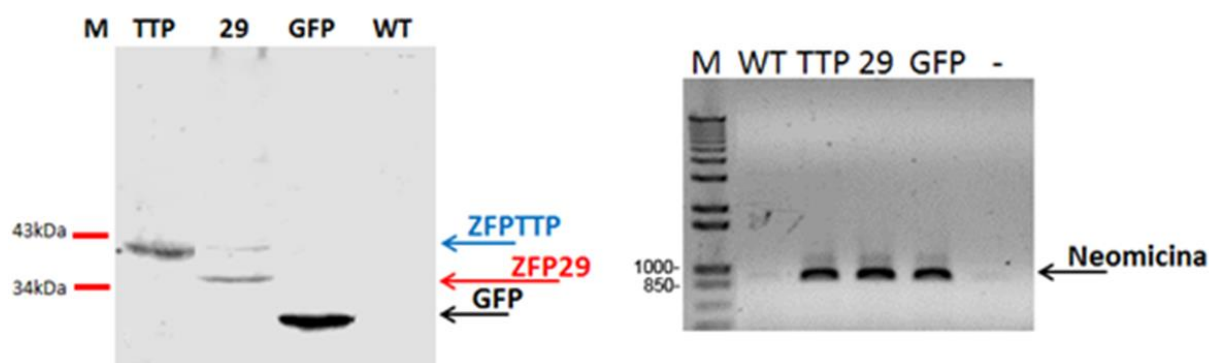
**Figura 4.6. Expressão da proteína ZFP29-FLAG na metaciclogênese.** M: Marcador PageRuler™; E<sub>w</sub>t: Epimastigota selvagem; E: Epimastigota três dias; S: Estresse; NA: Não aderido; A<sub>24</sub>: Aderido 24 horas; A<sub>72</sub>: Aderido 72 horas; M<sub>t</sub>: Metacíclico; GFP: epimastigota transfectante com GFP-FLAG. Utilizou-se o anticorpo comercial anti-FLAG® M2 (1:1500) e o anticorpo  $\alpha$ -AKR (1:500). A quantidade de extrato aplicada foi correspondente a  $2 \times 10^7$  parasitas/poço para todos os poços, exceto para M<sub>t</sub> e GFP que foi de  $4 \times 10^7$  e  $10^7$  parasitas, respectivamente. O gráfico representa a quantificação relativa das intensidades das bandas (mensurada por densitometria óptica) correspondentes à proteína ZFP29-FLAG em relação à proteína AKR em cada um dos estágios. Os pesos moleculares esperados são 39kDa para ZFP29 e 32,5 kDa para AKR. Na parte inferior está a membrana corada com Ponceau S demonstrando a quantidade de extrato aplicada

Com base nos dados obtidos quanto à expressão das proteínas ZFP29 e ZFP29-FLAG fusionadas à etiqueta FLAG na metaciclogênese observou-se que as proteínas recombinantes permaneceram sendo reguladas, porém de maneira distinta em comparação com as proteínas nativas. Diante da ausência de expressão das proteínas fusionadas à etiqueta *FLAG*® nas formas tripomastigotas metacíclicas, indagou-se sobre a possibilidade de nesse estágio estar ocorrendo a perda do plasmídeo pTcNEO3XFLAG contendo o gene *zfp29* ou *zfp29*, e por isso os níveis das proteínas recombinantes estariam reduzidos.

Para testar essa hipótese o sobrenadante do terceiro dia de diferenciação (72 horas após a indução da metaciclogênese) das culturas

ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG, GFP-FLAG e selvagem (WT – *Wild Type*) foi coletado e transferido para garrafas de cultivo contendo meio LIT. Após as culturas terem recuperado o seu crescimento nesse meio, os parasitas foram coletados e os extratos obtidos para realizar a imunodetecção das proteínas recombinantes por *Western blot*. A partir dessas culturas foi retirada uma alíquota para realização de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da neomicina (mais detalhes no item 3.8) (Figura 4.7).

Pôde-se observar que as proteínas recombinantes foram detectadas após a recuperação desses parasitas e o gene que confere resistência à neomicina foi amplificado a partir da cultura dos parasitas transfectantes, indicando a presença do plasmídeo (Figura 4.7).



**Figura 4.7. Análise da expressão das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG nos parasitas recuperados da metacicloênese.** À esquerda *Western blot* utilizando  $\alpha$ -FLAG como anticorpo primário. Na direita eletroforese de DNA em gel de agarose 1% com as reações de PCR realizadas utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da neomicina (801pb). M – marcadores (BenchMark™ → esquerda / 1Kb Plus → direita); WT – parasita selvagem (*Wild-Type*); TTP – parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG; 29 – parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG; GFP – parasitas transfectantes expressando GFP-FLAG. A última canaleta do gel de agarose (indicada por – na figura a direita) corresponde ao controle negativo (ausência de DNA molde) dos oligonucleotídeos utilizados.

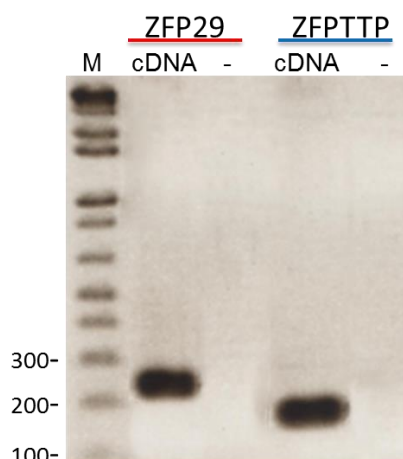
Dessa forma, os resultados da expressão das proteínas transfectantes na metacicloênese apresentaram informações pertinentes a respeito de como as proteínas ZFP29 e ZFPTTP podem estar sendo reguladas ao longo desse processo de diferenciação. Se essa regulação observada para essas duas proteínas acontece por meio do controle se seus transcritos, de suas proteínas ou de ambos permanece não definido, mas os dados apontam a existência de mais de um tipo de controle.

#### **4.4. Análise da expressão dos mRNAs de ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese.**

Como as proteínas ZFP29 e ZFPTTP são reguladas no decorrer da metaciclogênese, não sendo expressas nas formas tripomastigotas metacíclicas existe a hipótese que elas poderiam estar sendo reguladas negativamente por algum sinal contido em seus transcritos.

Sendo assim, com a intenção de avaliar se a regulação observada ocorre por meio da modulação dos níveis dos mRNAs correspondentes às proteínas ZFP29 e ZFPTTP, realizou-se a quantificação dos transcritos dessas duas proteínas por PCR em tempo real (qPCR) na metaciclogênese. Para isso a diferenciação *in vitro* foi realizada em triplicata biológica e o RNA total dos parasitas, em diferentes estágios da metaciclogênese, foi extraído e convertido em cDNA. Nesse experimento os estágios analisados foram: epimastigota em fase logarítmica de crescimento (Epimastigota 3d); em final de fase logarítmica de crescimento (Epimastigota 5d); submetido ao estresse nutricional (Estresse); aderido à garrafa de cultura por 24 horas (Aderido 24h) e tripomastigotas metacíclicos (Metacíclico). Os experimentos foram executados em triplicata técnica para cada réplica biológica e as médias foram utilizadas para a quantificação, que foi relativa à expressão do mRNA do gene que codifica para a proteína H2B (TcCLB.511635.10).

A eficiência de amplificação foi testada com as amostras de cDNA, a especificidade em produzir os amplicons de tamanho esperado e a ausência de contaminação (Figura 4.8). Conforme observado, o produto gerado foi específico e o controle negativo não apresentou amplificação, indicando ausência de contaminação.

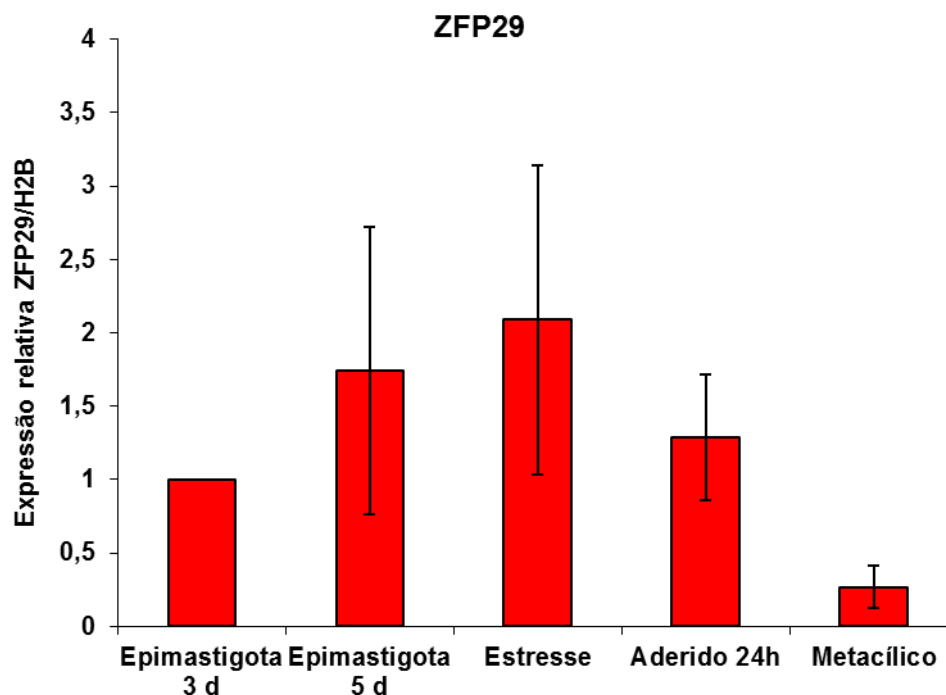


**Figura 4.8. Testes dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para realizar a quantificação por qPCR.** Gel de agarose 2% com amostras de PCR realizada utilizando os oligos específicos para ZFP29 (abaixo da linha vermelha) e ZFPTTP (abaixo da linha azul). M - Marcador 1 Kb Plus; cDNA - PCR realizada com a presença de DNA complementar obtido de formas epimastigotas. O sinal (-) refere-se à reação de PCR na ausência de um DNA molde (controle negativo). Tamanhos esperados: ZFP29 (196pb); ZFPTTP (157pb).

O resultado para a expressão do mRNA de ZFP29 revela que a mesma não é constante pois nas formas tripomastigotas metacíclicas ocorreu uma drástica redução na quantidade desse transcrito (Figura 4.9).

A análise da expressão ZFP29 evidencia que a ausência da respectiva proteína nas formas tripomastigotas metacíclicas (visualizada na figura 4.1) ocorre porque nesse estágio os níveis de mRNA estão significativamente reduzidos (Figura 4.9).

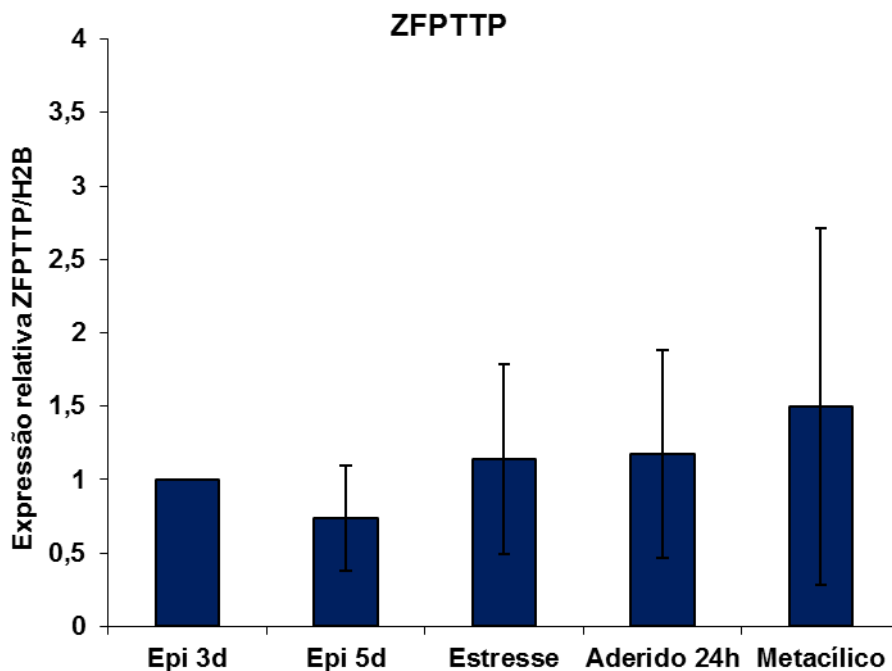
Outro ponto foi o dos níveis de mRNA detectados na forma aderida (Aderido 24h) terem sido equivalentes ao encontrado nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epimastigotas 3d), sendo que a proteína ZFP29 é expressa nas formas epimastigotas, mas não nas aderidas (figura 4.1). Isso leva a crer que a regulação negativa observada para a proteína ZFP29 nessa etapa da diferenciação não estaria sendo modulada pelos níveis de seu mRNA.



**Figura 4.9. Quantificação relativa do mRNA de ZFP29 ao longo da metaciclogênese.** No eixo X estão os diferentes estágios analisados. O eixo y indica a quantificação reativa de ZFP29 comparada a H2b. Os valores são provenientes das médias das triplicatas técnicas de cada réplica biológica e os desvios padrões correspondentes.

Para o transcrito de ZFPTTP a análise do seu perfil de expressão no processo de diferenciação mostrou que os níveis de mRNA não se alteram entre os diferentes estágios analisados (Figura 4.10).

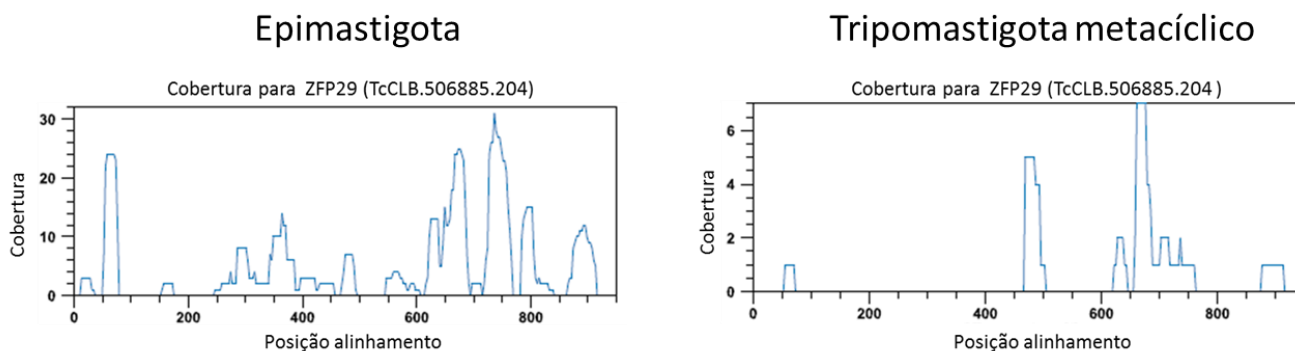
A manutenção dos níveis de mRNA de ZFPTTP na metaciclogênese confronta os dados de expressão da proteína ZFPTTP, uma vez que, a expressão da proteína é regulada negativamente nas formas aderidas e tripomastigotas metacíclicas, estando inclusive, ausente nesse último estágio (Figura 4.2). Esse resultado aponta que a regulação observada para a proteína ZFPTTP não é decorrente da diminuição dos níveis de seu transcrito, ou mesmo da ausência dele nas formas metacíclicas. Dessa forma, o controle dos níveis proteicos de ZFPTTP pode estar atrelado a mecanismos regulatórios que atuem na própria proteína desestabilizando-a, ou ainda através da inibição da tradução de seu mRNA.



**Figura 4.10. Quantificação relativa do mRNA de ZFPTTP ao longo da metaciclogênese.** No eixo X estão os diferentes estágios analisados. O eixo y indica a quantificação reativa de ZFP29 comparada a H2b. Os valores são provenientes das médias das triplicatas técnicas de cada réplica biológica e os desvios padrões correspondentes.

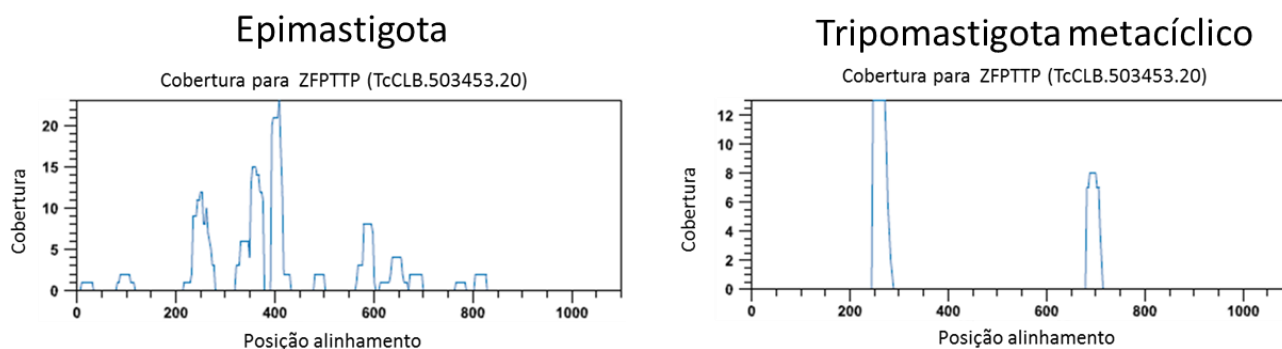
De fato Smircich e colaboradores realizaram análises de *Ribosome Profiling* avaliando quais mRNAs estão presentes nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, e desses quais estão associados à maquinaria de tradução (Smircich et al. 2015). Nessas análises os transcritos de ZFP29 e ZFPTTP foram identificados em ambos os estágios, inclusive entre os mRNAs associados a polissomos [Bispo, 2014 (comunicação pessoal); Smircich et al., 2015].

O transcrito de ZFP29 apresentou uma maior identificação (definida pela cobertura que equivale a soma de todos as leituras mapeadas no transcrito) nas formas epimastigotas em relação às tripomastigotas metacíclicas, indicando que existe uma diferença na abundância do mRNA associado a maquinaria de tradução entre esses dois estágios (Figura 4.11). Esse dado corrobora com a menor quantidade observada para o transcrito de ZFP29 nas formas tripomastigotas metacíclicas (figura 4.9).



**Figura 4.11. O perfil de expressão do transcrito de ZFP29 em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.** Essa figura mostra o mapeamento das leituras ao longo do gene de ZFP29 obtidas pela técnica de *Ribosome Profiling* tratadas com cicloheximida. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, enquanto que, o eixo Y corresponde ao número de leituras obtidas para cada posição do gene. A esquerda os dados obtidos em epimastigotas e a direita para tripomastigotas metacíclicos. O tratamento com cicloheximida foi feito para estabilizar os polissomos antes de seu isolamento e purificação. (Bispo, 2014, dados não publicados)

O resultado da análise de *Ribosome Profiling* nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas corrobora o dado de expressão do mRNA de ZFPTTP (4.10), mostrando que este está presente ao longo de toda a metaciclogênese (figura 4.12).



**Figura 4.12. O perfil de expressão do transcrito de ZFPTTP em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.** Essa figura mostra o mapeamento das leituras ao longo do gene de ZFPTTP obtidas pela técnica de *Ribosome Profiling* tratadas com cicloheximida. O eixo X representa o posicionamento das leituras mapeadas ao longo do gene, enquanto que, o eixo Y corresponde ao número de leituras obtidas para cada posição do gene. A esquerda os dados obtidos em epimastigotas e a direita para tripomastigotas metacíclicos. O tratamento com cicloheximida foi feito para estabilizar os polissomos antes de seu isolamento e purificação. Esses resultados pertencem a (Bispo, 2014, dados não publicados)

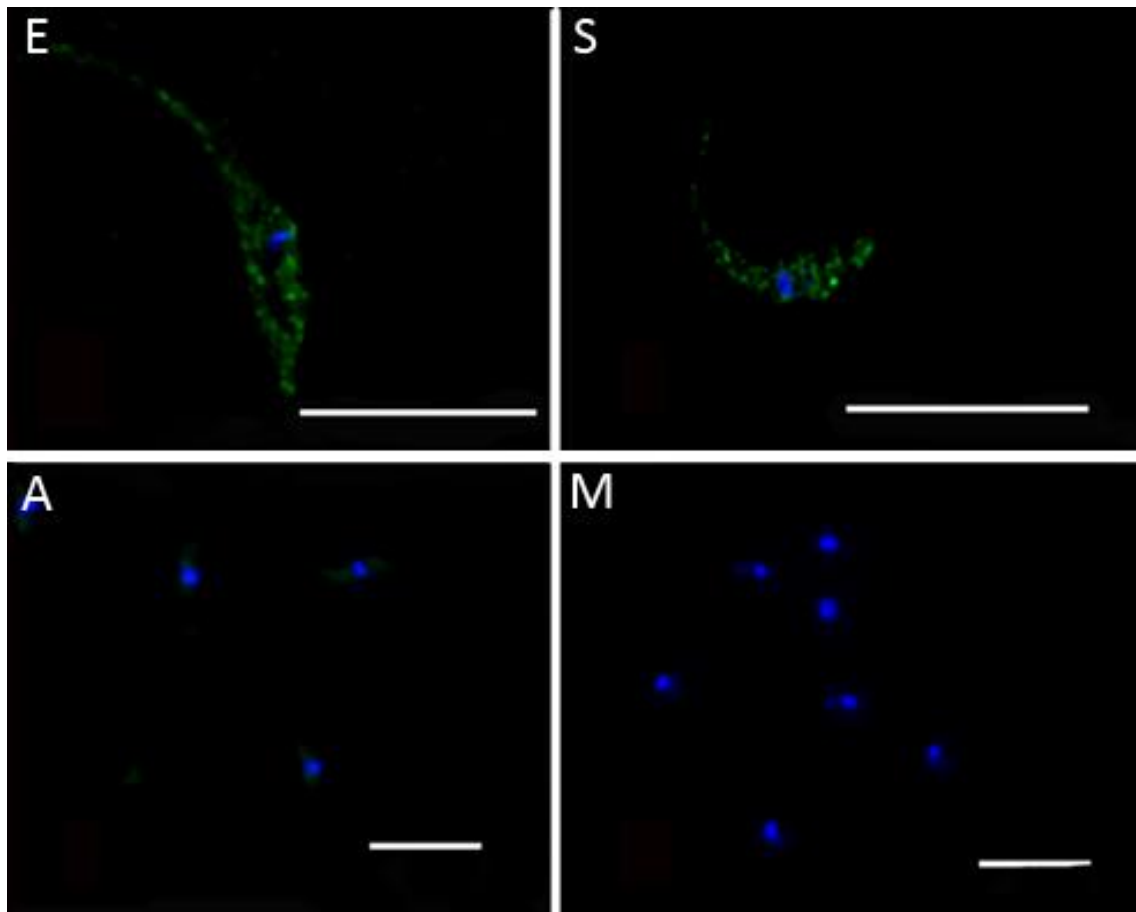
Os resultados encontrados quanto aos os níveis de mRNA de ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese forneceram informações pertinentes sobre como essas proteínas podem estar sendo reguladas na diferenciação.



Com os dados obtidos da expressão dos mRNAs de ZFP29 constatou-se que a regulação dessa proteína nas formas tripomastigotas metacíclicas deva ser uma consequência de mecanismos de controle atuando na expressão de seu mRNA. Já para ZFPTTP foi visto que a expressão de seus transcritos permanece em níveis semelhantes ao dos outros estágios de diferenciação, indicando que a quantidade de mRNA não seria responsável pela diminuição dos níveis da proteína.

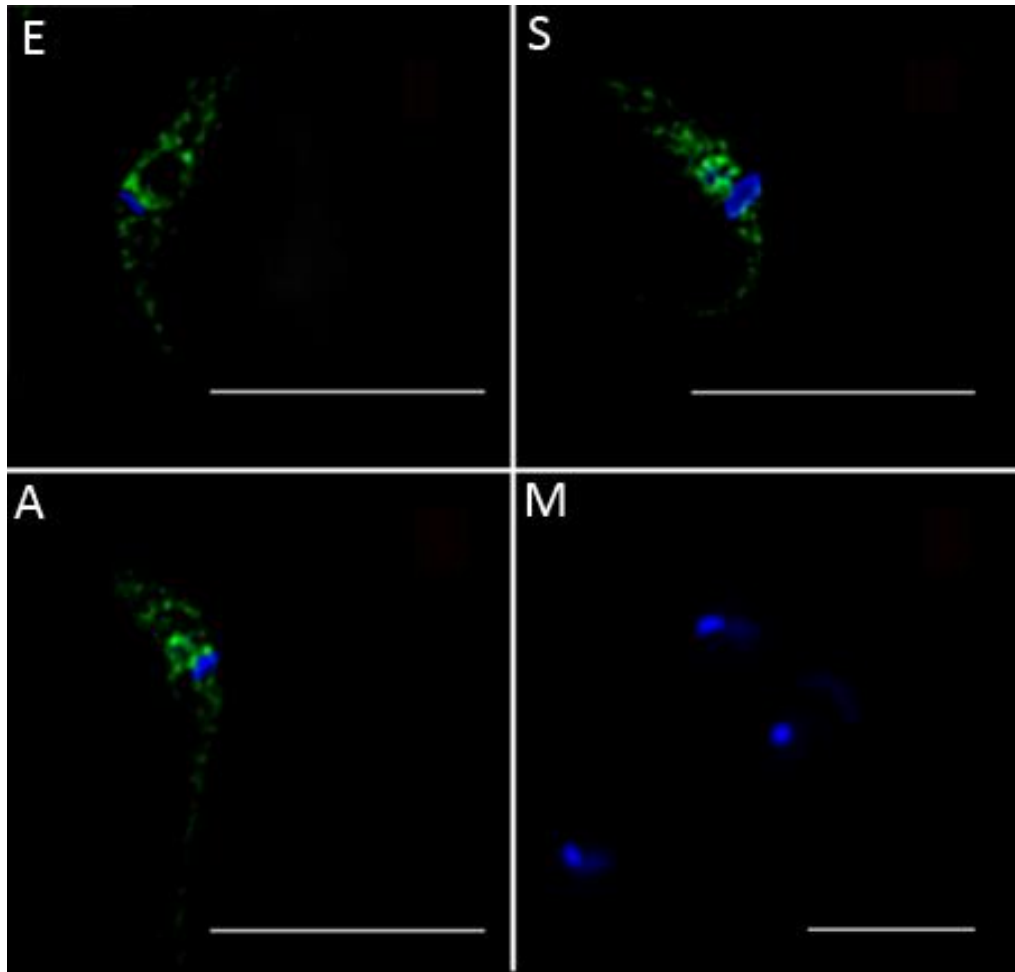
#### **4.5. Imunolocalização das proteínas ZFP29 e ZFPTTP durante a metaciclogênese.**

Ensaio de imunolocalização por imunofluorescência indireta durante a metaciclogênese demonstraram que a proteína ZFP29 apresenta uma localização citoplasmática num padrão granular disperso nas formas epimastigotas (E) e no parasita estressado (S) (quadrantes superiores esquerdo e direito, respectivamente). Já para as formas aderidas (A) e tripomastigotas metacíclicas (M) (inferiores esquerdo e direito, respectivamente) não houve marcação (Figura 4.13).



**Figura 4.13. Imunolocalização da proteína ZFP29 em estágios da metacirclogênese.** E: epimastigotas em fase logarítmica; S: epimastigota sob estresse nutricional; A: epimastigotas aderidos 24 horas; M: tripomastigotas metacíclicos. Em todas as situações os parasitos foram incubados com  $\alpha$ -ZFP29 (1:500). As figuras C e D são imagens de campo aberto para mostrar a ausência de marcação. A barra representa 10  $\mu$ m.

O padrão de marcação encontrado para ZFP29 apresenta alterações ao longo da metacirclogênese, uma vez que nas formas epimastigotas (E) a proteína ZFP29 possui uma localização citoplasmática num padrão granular mais concentrado ao redor do núcleo e, quando o parasita é submetido ao estresse nutricional (S) e em parasitas aderidos à garrafa de cultivo (A), parte dessa marcação passa a ser nuclear (quadrantes superior esquerdo, direito e inferior esquerdo, respectivamente) (Figura 4.14). Nas formas tripomastigotas metacíclicas a proteína ZFP29 não apresentou marcação, conforme mostra a figura no quadrante inferior direito. Note que para ambas as proteínas, foram utilizados campos ampliados em certos estágios para evidenciar que de fato não havia parasitas com marcação, corroborando os dados de *Western blot* (Figuras 4.1 e 4.2).



**Figura 4.14. Imunolocalização da proteína ZFPTTP em estágios da metaciclogênese.** A: epimastigotas em fase logarítmica; B: epimastigota sob estresse nutricional; C: epimastigotas aderidos 24 horas; D: tripomastigotas metacíclicos. Em todas as situações os parasitos foram incubados com  $\alpha$ -ZFPTTP (1:1000). As figuras C e D são imagens de campo aberto para mostrar a ausência de marcação. A barra representa 10  $\mu$ m.

Os resultados mostram que a marcação observada em epimastigotas foi compatível com aquela encontrada em 2013 (Romagnoli 2013) corroborando esse dado. Além disso, verificou-se uma congruência entre a marcação encontrada na metaciclogênese por imunofluorescência com o resultado da expressão das proteínas ZFP29 e ZFPTTP ao longo do processo de diferenciação (figura 4.1 e 4.2). Ainda, o padrão de marcação granular observado no citoplasma converge com a ideia de que essas duas proteínas dedo de zinco estejam associadas a grânulos de RNA (complexos ribonucleoproteicos).

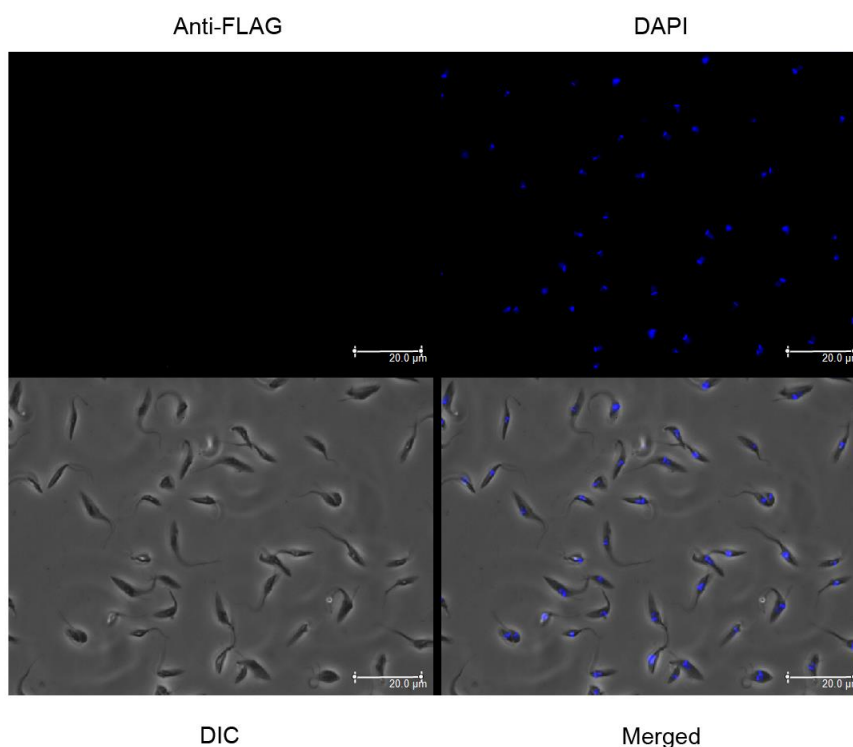
A alteração na localização da proteína ZFPTTP ao longo da metaciclogênese evidenciou que no decorrer desse processo a proteína muda sua localização, migrando para o núcleo ou ao redor dele nos parasitas

submetidos ao estresse (S) e nos parasitas aderidos (A) (Figura 4.14 de S para A).

#### 4.6. Imunolocalização das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG durante a metaciclogênese.

Sabendo que as proteínas recombinantes apresentaram mudanças no perfil de expressão ao longo da metaciclogênese, foi indagado se as mudanças observadas seriam decorrentes ou teriam influência na localização das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG no parasita.

Foram realizados ensaios de imunolocalização por imunofluorescência indireta utilizando anticorpo monoclonal comercial contra a etiqueta FLAG, cuja especificidade foi testada em parasitas selvagens (figura 4.15).

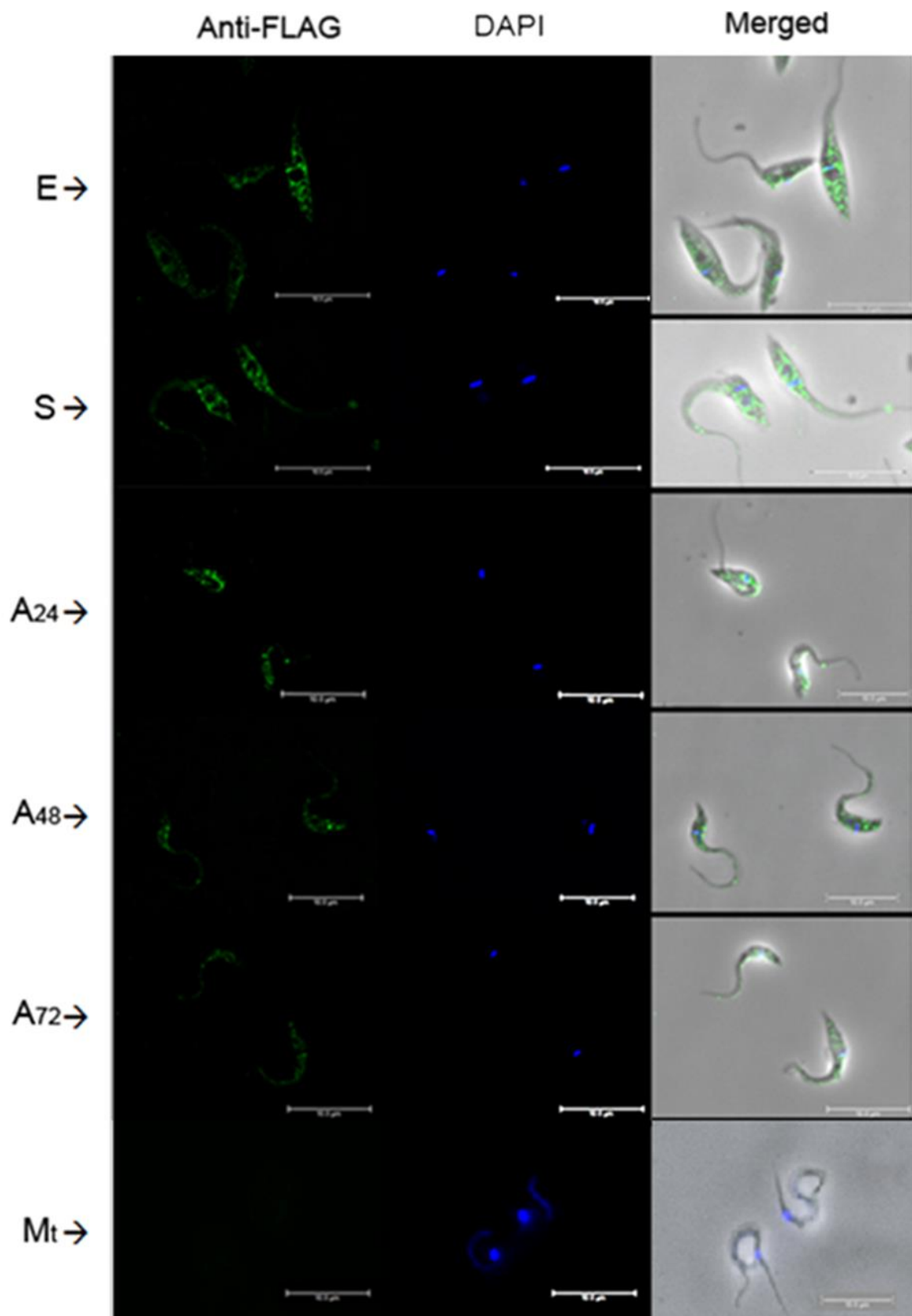


**Figura 4.15. Controle da especificidade do anticorpo  $\alpha$ -FLAG.** Parasitas selvagens foram incubados com o anticorpo primário  $\alpha$ -FLAG e secundário (anti-mouse) conjugado ao fluoróforo Alexa 488. O DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com DAPI e as imagens obtidas foram sobrepostas com o contraste de fase (merged). A barra representa 20  $\mu$ m.

Ao analisar a localização da proteína ZFP29-FLAG no decorrer da metaciclogênese verificou-se que essa apresenta um padrão de marcação semelhante ao da proteína nativa, granular e disperso por todo o citoplasma do parasita nas formas epimastigotas (E), submetidas ao estresse (S) e aderidas ( $A_{24}$ ,  $A_{48}$  e  $A_{72}$ ), ao passo que, no estágio de tripomastigotas metacíclicos (Mt) não foi detectada marcação alguma (Figura 4.16).

O fato de não ter sido possível visualizar a localização da proteína ZFP-29 no estágio tripomastigota metacíclico (Mt) pode ser explicado pelos baixos níveis de expressão da proteína recombinante nessa forma, pois para observar sua expressão nas formas metacíclicas, foi necessário aplicar uma quantidade de extrato correspondente a  $4 \times 10^7$  parasitas (figura 4.5).

O padrão de marcação encontrado nos estágios de epimastigota (E) e estresse (S) para a proteína ZFP29-FLAG foi condizente com o observado para a proteína nativa nesses mesmos estágios, indicando que a etiqueta FLAG<sup>®</sup> aparentemente não interferiu na localização da proteína ZFP29 fusionada a ela.



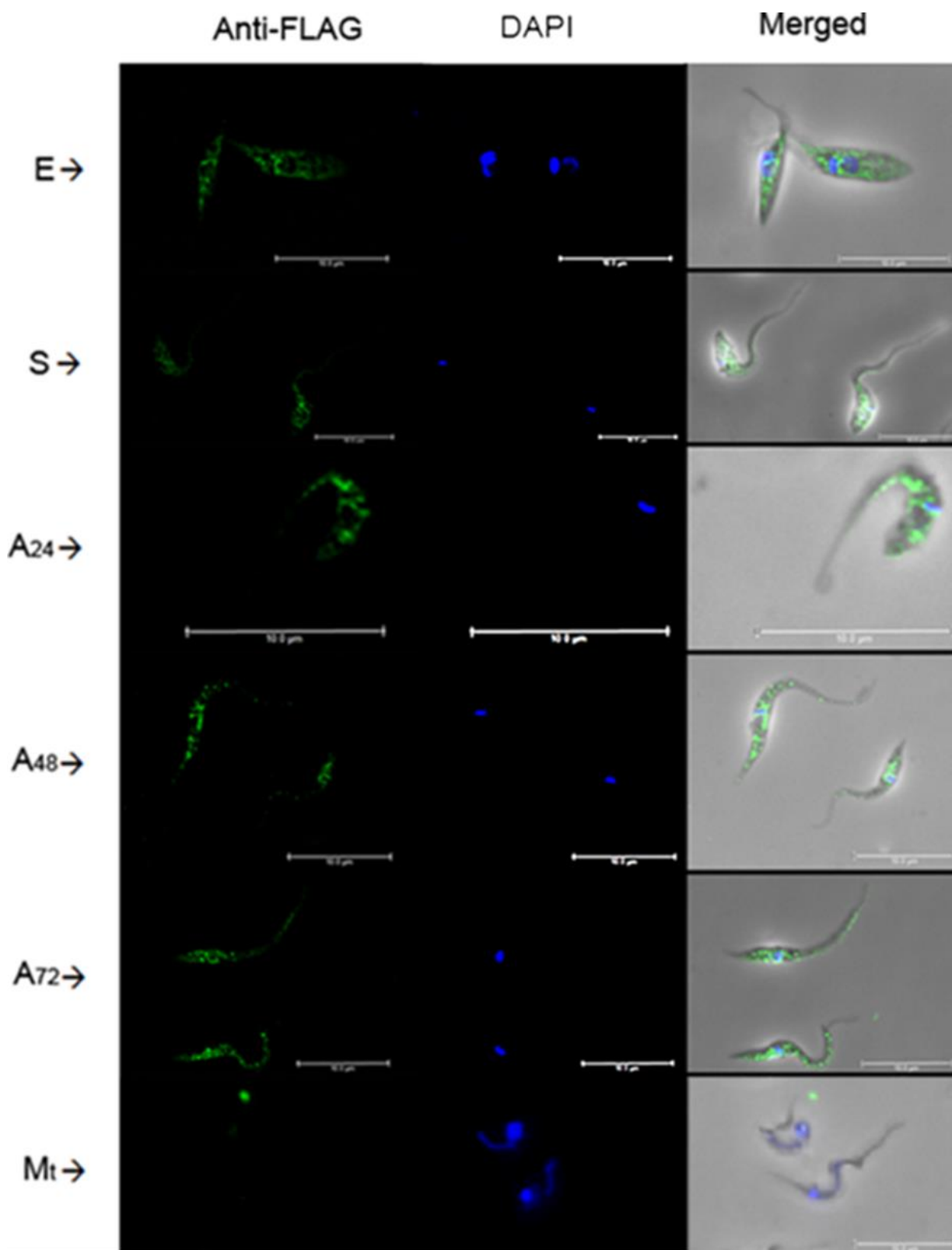
**Figura 4.16** Imunolocalização da proteína ZFP29-FLAG em estágios da metaciclologênese. E - epimastigotas; S – estresse; A<sub>24</sub> – aderidos 24 horas; A<sub>48</sub> – aderidos 48 horas; A<sub>72</sub> – aderidos 72 horas e Mt: metacíclicos. Para todos os estágios utilizou-se o anticorpo comercial monoclonal  $\alpha$ -FLAG® (1:1000) como anticorpo primário e um anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado ao fluoróforo Alexa 488. O DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com

DAPI e as imagens obtidas foram sobrepostas com o contraste de fase (merged). A barra representa 10 µm.

Para a proteína ZFPTTP-FLAG (figura 4.17) a localização se apresenta majoritariamente no citoplasma num padrão granular disperso nas formas epimastigotas (E), estressadas (S) e aderidas (A<sub>24</sub>, A<sub>48</sub> e A<sub>72</sub>) (Figura 4.17). Já nas formas metacíclicas (Mt) não houve marcação passível de detecção (Figura 4.17).

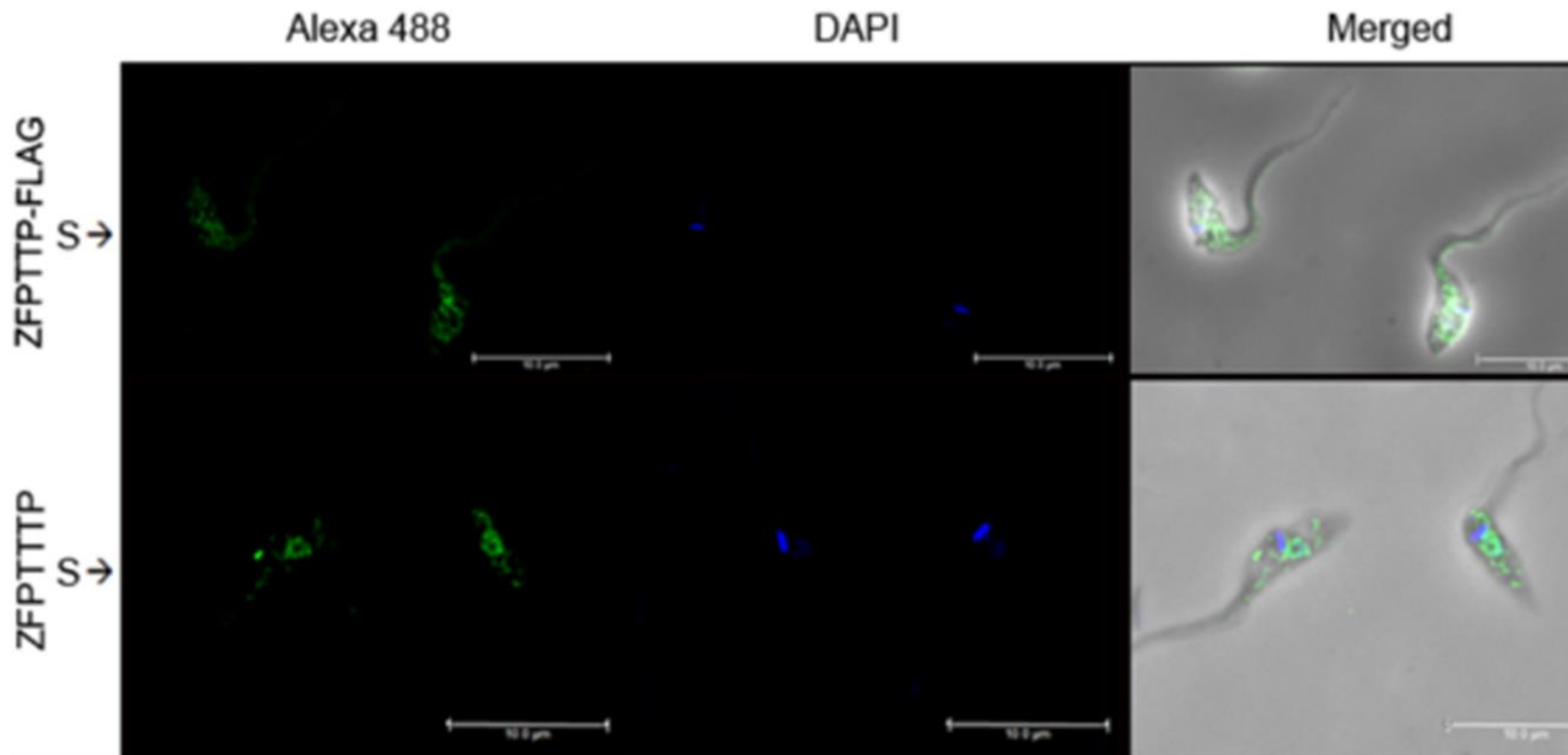
Porém, ao comparar a localização obtida para proteína recombinante com a da proteína nativa, nota-se que há diferenças. Nas formas epimastigotas (E) a localização encontrada para a proteína ZFPTTP-FLAG assemelha-se à da proteína nativa, pois é citoplasmática, granular e dispersa. No entanto, nas formas submetidas ao estresse (S) e aderidas 24 horas (A<sub>24</sub>) a proteína recombinante, ao contrário do observado para a proteína ZFPTTP, não apresentou a marcação nitidamente sobreposta ao núcleo, estando a proteína ZFPTTP-FLAG localizada no citoplasma. A figura 4.18 traz uma comparação do padrão de marcação da proteína recombinante em relação à endógena nas formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional (S).

Somente nos parasitas aderidos por 48 horas (A<sub>48</sub>) e 72 horas (A<sub>72</sub>) foi possível visualizar que a proteína fusionada a etiqueta FLAG<sup>®</sup> passou a localizar-se não somente no citoplasma, mas aparentemente, por todo o corpo do parasita, o que incluiria o núcleo. De qualquer forma, esse padrão observado para a proteína ZFPTTP-FLAG é diferente do que foi visto para a proteína nativa, tendo em vista que a proteína ZFPTTP apresenta-se com maior intensidade na região perinuclear e sobreposta ao núcleo, ao passo que, a proteína ZFPTTP-FLAG possui uma marcação igualmente distribuída por todo o parasita.



**Figura 4.17. Imunolocalização da proteína ZFPTTP-FLAG em estágios da metaciclo gênese.** E - epimastigotas; S – estresse; A<sub>24</sub> – aderidos 24 horas; A<sub>48</sub> – aderidos 48 horas; A<sub>72</sub> – aderidos 72 horas e Mt: metacíclicos. Para todos os estágios utilizou-se o anticorpo comercial monoclonal  $\alpha$ -FLAG® (1:1000) como anticorpo primário e um anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado ao fluoróforo Alexa 488. O DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com DAPI e as imagens obtidas foram sobrepostas com o contraste de fase (merged). A barra representa 10  $\mu$ m.



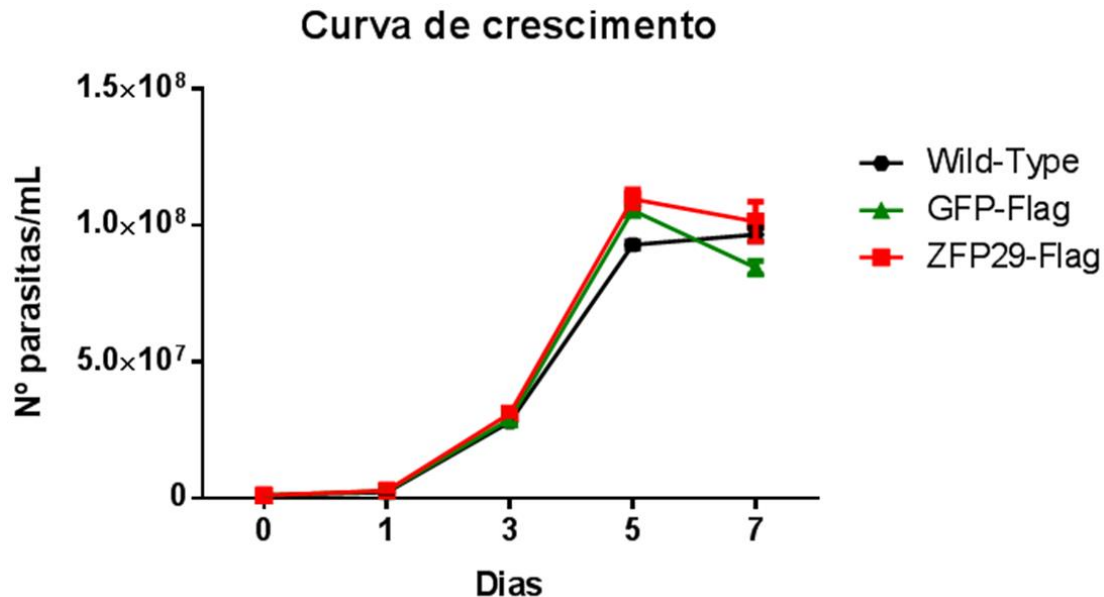


**Figura 4.18. Comparação da localização da proteína ZFPTTP-FLAG com a proteína ZFPTTP em parasitas submetidos ao estresse nutricional (S).** Na linha superior utilizou-se o anticorpo monoclonal comercial  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup> (1:1000) e na linha inferior o anticorpo  $\alpha$ -ZFPTTP (1:750). O DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com DAPI e as imagens obtidas foram sobrepostas com o contraste de fase (merged). A barra representa 10  $\mu$ m.

#### 4.7. Análise do crescimento e da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.

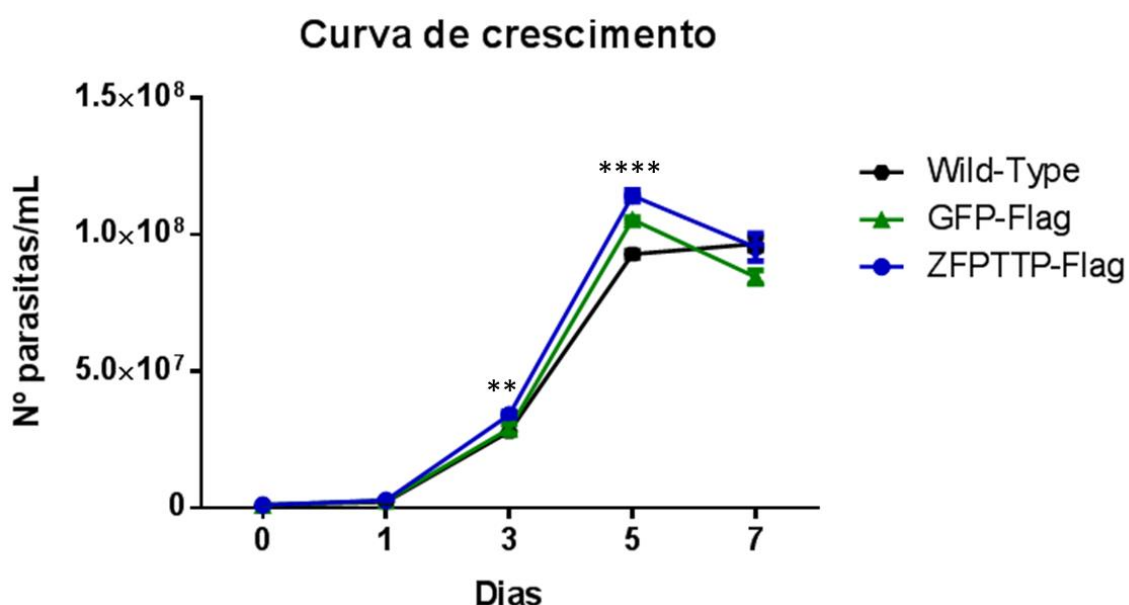
As diferenças observadas na expressão e na localização das proteínas recombinantes em relação às proteínas endógenas tornou pertinente avaliar se a presença das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG estavam alterando o crescimento e o processo de diferenciação dos parasitas. Para isso foi realizado um experimento comparando o crescimento e a diferenciação das culturas de parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG com os parasitas selvagens (WT – Wild-Type) bem como parasitas expressando a proteína GFP fusionada à etiqueta FLAG® (Gráficos 4.1 e 4.2).

Os parasitas transfectantes expressando a proteína ZFP29-FLAG não apresentaram alterações estatisticamente significativas no crescimento quando comparado aos dois controles utilizados, os parasitas selvagens e os parasitas expressando GFP-FLAG (Gráfico 4.1).



**Gráfico 4.1. Curva de crescimento dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG.** No eixo y está a densidade celular determinada por contagem em câmara de Neubauer. O eixo x representa o tempo em dias. Wild-Type – parasita selvagem; GFP-FLAG – parasita expressando a proteína GFP fusionada à etiqueta FLAG®; ZFP29-FLAG – parasita expressando a proteína ZFP29 fusionada à etiqueta FLAG®. Os pontos plotados no gráfico correspondem à média da contagem entre as triplicatas biológicas. Os dados estatísticos só foram considerados significativos se a significância existisse entre ZFP29-FLAG e os dois controles. No caso não houve significância estatística ( $p > 0,05$ ).

O resultado dos parasitas transfectantes expressando a proteína ZFPTTP-FLAG mostra que esses apresentaram um maior crescimento frente aos controles nos terceiro e quinto dias (Gráfico 4.2). Esse aumento foi estatisticamente significativo em ambos os dias mencionados (terceiro dia  $p < 0,005$ ; quinto dia  $p < 0,0001$ ) e indica que a presença da proteína ZFPTTP-FLAG interferiu de modo positivo no metabolismo do parasita, estimulando seu crescimento.



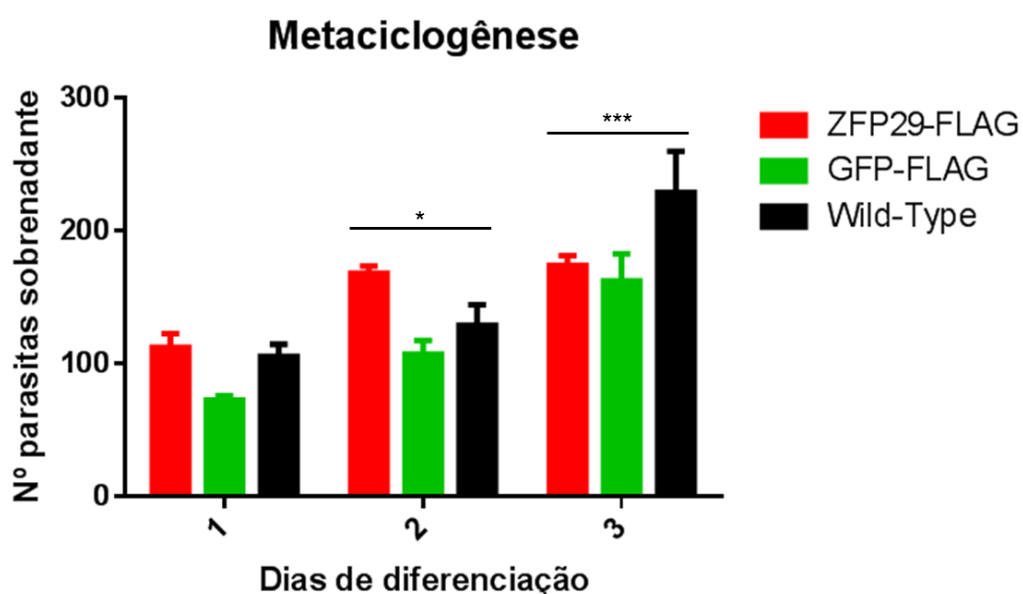
**Gráfico 4.2. Curva de crescimento dos parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG.** No eixo y está a densidade celular determinada por contagem em câmara de Neubauer. O eixo x representa o tempo em dias. Wild-Type – parasita selvagem; GFP-FLAG – parasita expressando a proteína GFP fusionada à etiqueta FLAG®; ZFPTTP-FLAG – parasita expressando a proteína ZFPTTP fusionada à etiqueta FLAG®. Os pontos plotados no gráfico correspondem à média da contagem entre as triplicatas biológicas. Os dados estatísticos só foram considerados significativos se a significância existisse entre ZFPTTP-FLAG e os dois controles. \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Paralelamente ao experimento da curva de crescimento, foi realizada a metaciclogênese para investigar se os parasitas transfectantes apresentam alterações em relação aos controles no processo de diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas. Essa análise foi feita através da contagem diferencial e total (câmara de Neubauer) das formas

contidas no sobrenadante das garrafas de cultivo no decorrer dos três dias de diferenciação, totalizando 72 horas após os parasitas submetidos ao estresse nutricional terem sido colocados para adesão às garrafas de cultivo. Esse experimento também foi realizado em triplicata biológica.

Para os transfectantes expressando ZFP29-FLAG observou-se que o número de parasitas presentes no sobrenadante foi significativamente maior ( $p > 0,05$ ) no segundo dia do processo de diferenciação, enquanto que no terceiro esse número foi menor em relação ao parasita selvagem ( $p < 0,001$ ) (gráfico 4.3).

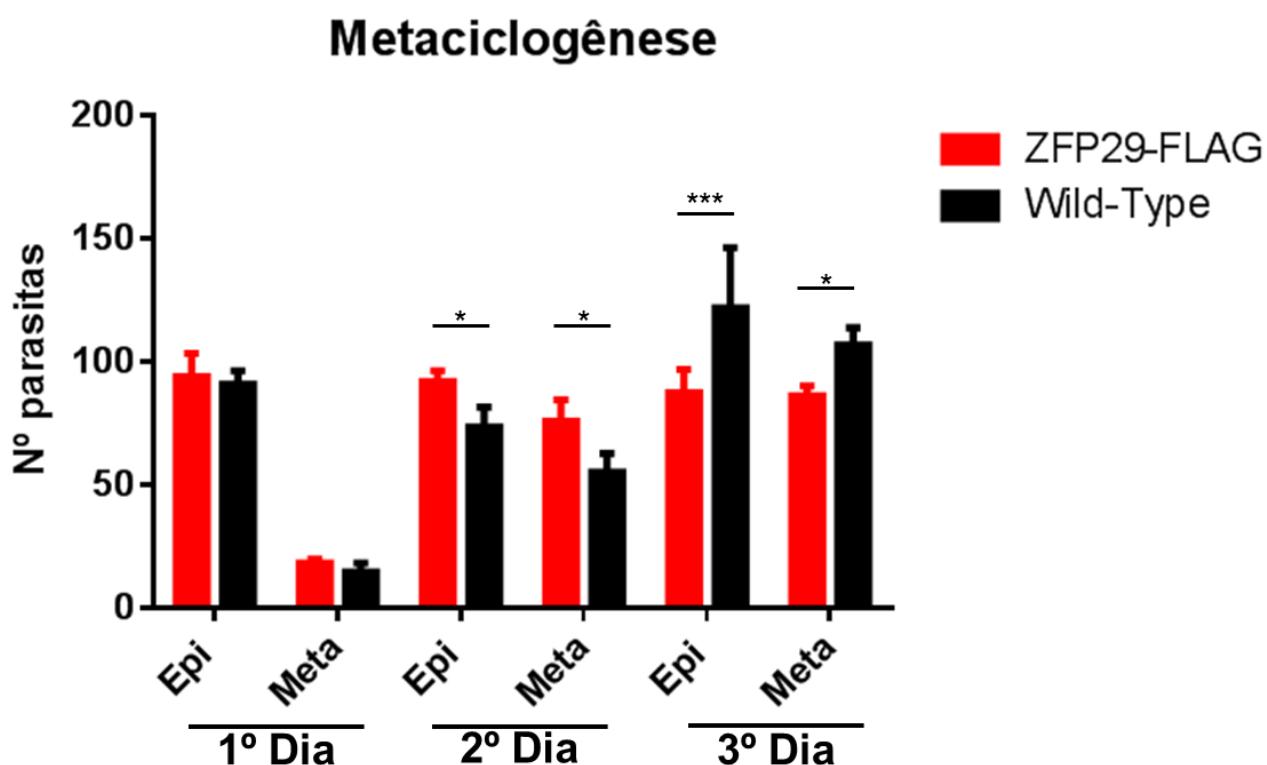
Ainda, observando o número total de parasitas (gráfico 4.3) é possível visualizar um padrão distinto encontrado para o parasita ZFP29-FLAG comparado ao selvagem (Wt) e ao parasita GFP-FLAG. Enquanto a quantidade de parasitas no sobrenadante aumenta com o tempo da metaciclogênese (gráfico 4.3; ver barras pretas e verdes do dia primeiro ao terceiro) para as culturas controle, os parasitas ZFP29-FLAG apresentam uma tendência em manter esse número (gráfico 4.3 barras vermelhas). Essa tendência torna-se mais evidente ao analisar o segundo e terceiro dias da diferenciação.



**Gráfico 4.3. Análise do número de parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG presentes no sobrenadante ao longo da metaciclogênese.** As barras correspondem ao número de parasitas contados do sobrenadante das culturas no 1º, 2º e 3º dia da metaciclogênese. As barras vermelhas correspondem aos parasitas ZFP29-FLAG; as verdes aos parasitas GFP-FLAG e as pretas ao parasita selvagem (*Wild-Type*). O número apresentado corresponde à média da contagem das três culturas para cada parasita e em cada ponto. As

análises estatísticas foram feitas utilizando o método *two-way* ANOVA através do programa Graphpad 6.0. \*  $p < 0,05$ .

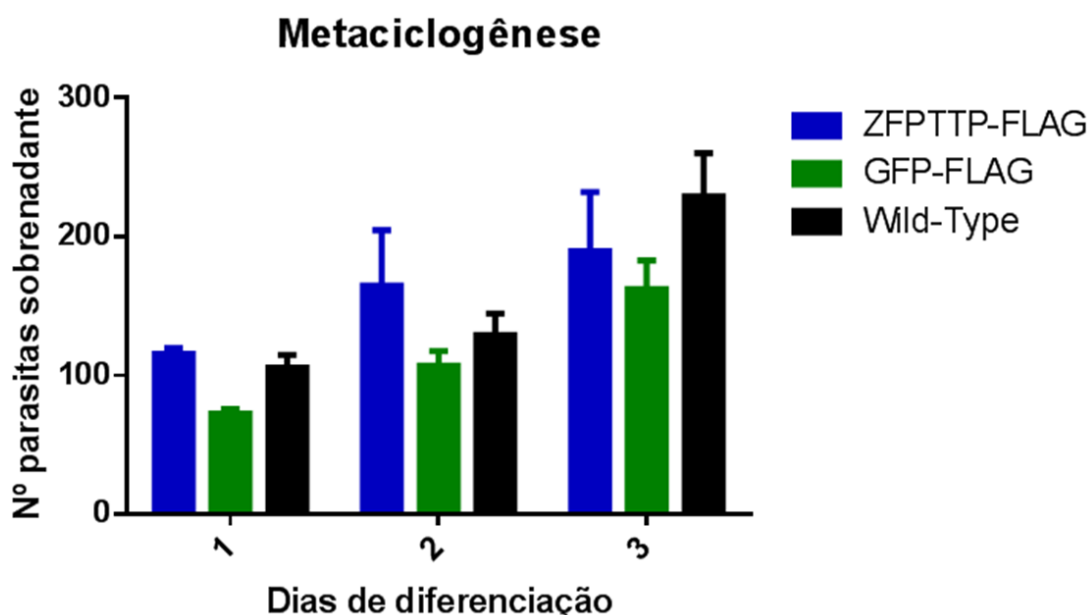
Quando feita a discriminação dos parasitas obtidos no sobrenadante em epimastigotas e tripomastigotas, observa-se que há essa diferença entre o parasita ZFP29-FLAG e selvagem no segundo e terceiro dia da diferenciação (gráfico 4.4). Após 24 horas induzida a metaciclogênese, o sobrenadante da cultura dos parasitas ZFP29-FLAG apresentou uma maior quantidade de ambas as formas (epimastigotas e metacíclicos -  $p < 0,05$ ). Já no terceiro dia da diferenciação o número de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos foi menor do que a cultura selvagem ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e similar ao observado no dia anterior.



**Gráfico 4.4. Análise da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG.** As barras correspondem ao número de parasitas contados no sobrenadante das culturas e discriminados em epimastigotas (Epi) e tripomastigotas metacíclicos (Meta) no 1º, 2º e 3º dia da metaciclogênese. As barras vermelhas correspondem aos parasitas ZFP29-FLAG e as pretas ao parasita selvagem (*Wild-Type*). O número apresentado corresponde à média da contagem das três culturas para cada parasita e em cada ponto. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método *two-way* ANOVA através do programa Graphpad 6.0. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Essas observações indicam que a presença da proteína ZFP29-FLAG pode estar de alguma forma interferindo no processo de diferenciação., possivelmente na etapa de adesão dos parasitas, já que o número de parasitas no sobrenadante foi alterado. Aliado a isso, o fato de tanto as formas epimastigotas quanto as formas tripomastigotas metacíclicas estarem alterados em quantidade no segundo e no terceiro diada metaciclogênese, estando menores e maiores em relação ao controle, respectivamente, mais ainda sim em níveis equiparados corrobora com a ideia de que a proteína ZFP29-FLAG não estaria interferindo na diferenciação entre essas formas em si, mas possivelmente no processo de adesão. De qualquer forma esse resultado sugere que a presença da proteína ZFP29 recombinante interfere na metaciclogênese.

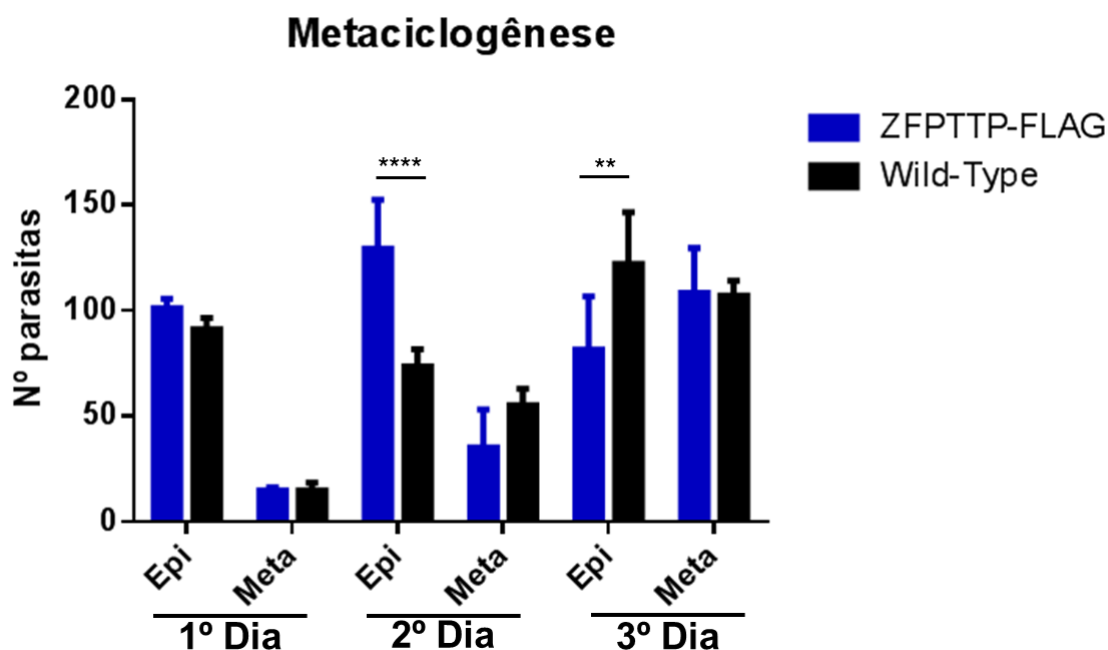
Ao ser analisado o número de parasitas ZFPTTP-FLAG presentes nos sobrenadantes o resultado encontrado não apresentou diferenças significativas no decorrer da metaciclogênese (gráfico 4.5).



**Gráfico 4.5. Análise do número de parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG presentes no sobrenadante ao longo da metaciclogênese.** As barras correspondem ao número de parasitas contados no sobrenadante das culturas no 1º, 2º e 3º dia da metaciclogênese. As barras azuis correspondem aos parasitas ZFPTTP-FLAG; as verdes aos parasitas GFP-FLAG e as pretas ao parasita selvagem (*Wild-Type*). O número apresentado corresponde à média da contagem das três culturas para cada parasita e em cada ponto. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método *two-way* ANOVA através do programa Graphpad 6.0. No caso não foi encontrada significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Agora, quando os parasitas no sobrenadante foram discriminados como sendo formas epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicas evidenciou-se uma grande diferença encontrada no segundo e terceiro dia da diferenciação entre os parasitas ZFPTTP-FLAG e selvagem (gráfico 4.6). Nesses pontos de 48 e 72 horas o número de epimastigotas no sobrenadante dos transfectantes ZFPTTP-FLAG foi significativamente maior que o encontrado no controle ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) (gráfico 4.6).

Apesar da quantidade de tripomastigotas metacíclicas não ter sido estatisticamente Já o número de tripomastigotas metacíclicas no segundo dia não demonstrou alterações estatisticamente significativas, embora seja possível visualizar uma tendência desse número ser menor em relação ao controle. De qualquer forma, 48 horas após a indução da metaciclogênese, a proporção de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas foi alterada nos parasitas transfectantes ZFPTTP-FLAG, porém isso aparentemente não está relacionado com o número total (epimastigotas + tripomastigotas metacíclicas) de parasitas no sobrenadante. Esses dados apontam que a proteína ZFPTTP-FLAG poderia estar atuando inibindo de certa forma a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas.



**Gráfico 4.6. Análise da diferenciação dos parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG.** As barras correspondem ao número de parasitas contados no sobrenadante e discriminados em epimastigotas (Epi) e tripomastigotas metacíclicas (Meta) no 1º, 2º e 3º dia da metaciclogênese. As barras azuis correspondem aos parasitas ZFPTTP-FLAG e as pretas

ao parasita selvagem (*Wild-Type*). O número apresentado corresponde à média da contagem das três culturas para cada parasita e em cada ponto. As análises estatísticas foram feitas utilizando o método *two-way* ANOVA através do programa Graphpad 6.0. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Os resultados obtidos levam a crer que as proteínas recombinantes parecem estar promovendo alterações na biologia do parasita. Isso porque foram detectadas alterações no crescimento e na diferenciação dos parasitas transfectantes ZFPTTP-FLAG (gráfico 4.2 e 4.6) e modificações na metaciclogênese para os transfectantes expressando a proteína recombinante ZFP29-FLAG (gráficos 4.3 e 4.4). Com base nessas observações, levantou-se a possibilidade da proteína ZFP29-FLAG estar interferindo no processo de adesão do parasita, enquanto que a proteína ZFPTTP-FLAG estaria modulando positivamente o crescimento do parasita e alterando o processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas.

No entanto, é importante ressaltar que para ambos os parasitas transfectantes analisados no experimento de diferenciação, as mudanças visualizadas e atribuídas às proteínas recombinantes não podem ser diretamente extrapoladas às respectivas nativas. Isso se deve ao fato das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG representarem uma condição artificial, na qual a proteína ZFP29 não está presente (figura 4.1) e a proteína ZFPTTP está sendo pouco expressa (figura 4.2). Levando isso em consideração, os resultados apontam que a presença dessas duas proteínas dedo de zinco interfere na metaciclogênese e isso explicaria o porquê das proteínas nativas serem reguladas negativamente pelo parasita no decorrer desse processo de diferenciação.

#### **4.8. Análise dos complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) associados às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.**

Para caracterizar as proteínas parceiras associadas a ZFP29 e ZFPTTP utilizou-se a técnica de imunoprecipitação para capturar as proteínas e RNAs associadas a elas seguidas de espectrometria de massas.



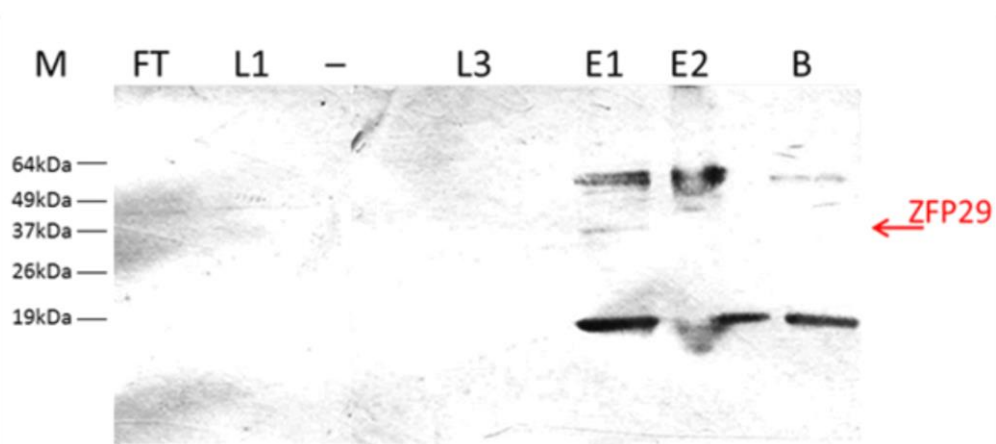
A imunoprecipitação foi feita, portanto, com extratos de parasitas transfectantes epimastigotas e epimastigotas submetidas ao estresse nutricional, que foram incubados com uma solução contendo esferas magnéticas revestidas de anticorpos  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup>. Assim, as proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG puderam ser capturadas juntamente com os complexos ribonucleoproteicos associados. Os dados obtidos para as proteínas e os mRNAs serão tratados separadamente nos tópicos a seguir.

#### **4.8.1. Análise de proteínas parceiras associadas às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.**

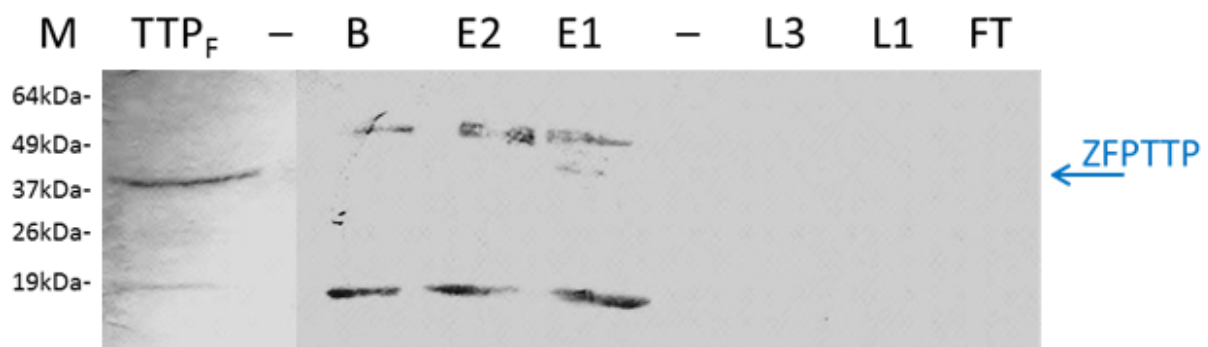
Os parasitas transfectantes expressando ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG e selvagem (controle) foram cultivados até o terceiro dia (fase exponencial) onde o equivalente a  $10^9$  células foram lisadas. Após a lise, o conteúdo proteico foi incubado com as esferas magnéticas ligadas aos anticorpos  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup> e as frações coletadas foram analisadas por *Western blot* e coloração com prata (Figuras 4.19 a 4.22).

Para ambas as proteínas foi observado que houve a sua imunoprecipitação, tendo em vista que elas foram visualizadas nas frações eluídas (Figuras 4.19 e 4.20). No entanto, notou-se que tanto ZFP29-FLAG quanto ZFPTTP-FLAG foram detectadas em quantidades discretas, e apenas nas frações eluídas, o que sugere que essas proteínas estariam pouco representadas no conteúdo proteico total. De qualquer forma foi possível capturar as proteínas de interesse e enriquecê-las na fração eluída de modo específico indicando que o protocolo utilizado foi promissor.

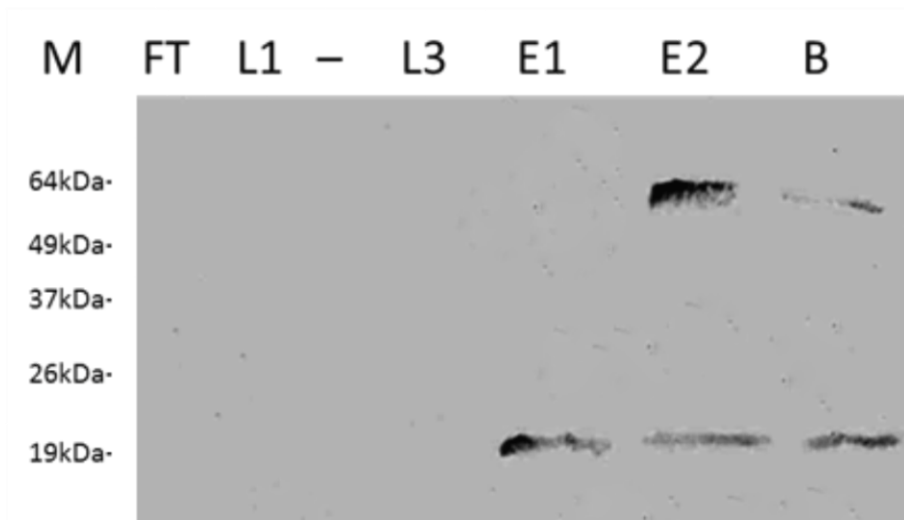
O controle negativo do experimento, o anticorpo  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup>, não apresentou reconhecimento inespecífico no extrato proteico proveniente do parasita selvagem, com exceção de duas bandas observadas (Figura 4.21). Essas bandas de maior e menor peso molecular (~50 kDa e ~25 kDa) correspondem às cadeias pesadas e leves da imunoglobulina respectivamente.



**Figura 4.19. Western blot com amostras da imunoprecipitação de ZFP29-FLAG.** M: Marcador BenchMark™; FT: *Flow-through* (não se ligou às esferas magnéticas); L1: Primeira lavagem; L3: Terceira lavagem; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; B: *beads* (o que permanece ligada à esfera magnética). O anticorpo utilizado foi anti-FLAG® M2 (1:1000). A imunoprecipitação foi realizada com o lisado de 10<sup>9</sup>parasitas, utilizando o tampão IMP'. ZFP29: 35kDa.



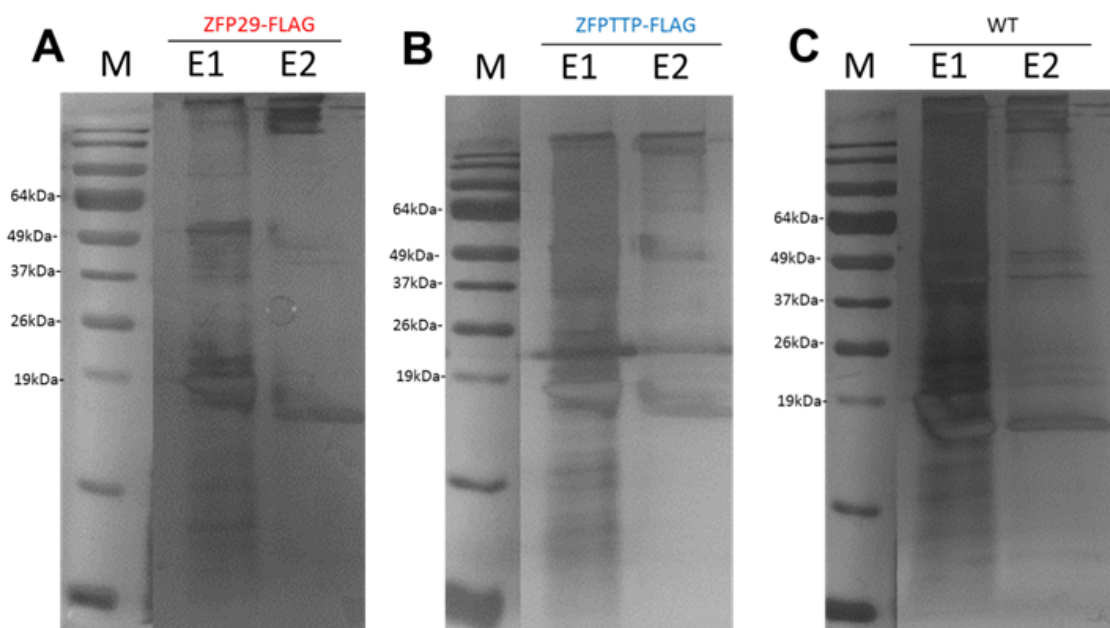
**Figura 4.20. Western blot com amostras da imunoprecipitação de ZFP29-FLAG.** M: Marcador BenchMark™; TTP<sub>F</sub>: extrato de parasita transfectante expressando ZFP29-FLAG (controle positivo do anticorpo utilizado); B: *beads* (o que permanece ligada à esfera magnética); E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; L3: Terceira lavagem; L1: Primeira lavagem; FT: *Flow-through* (não se ligou às esferas magnéticas). O anticorpo utilizado foi anti-FLAG® M2 (1:1000). A imunoprecipitação foi realizada com o lisado de 10<sup>9</sup>parasitas, utilizando o tampão IMP1. ZFP29: 39 kDa.



**Figura 4.21. Western blot com o controle do experimento de imunoprecipitação.** M: Marcador BenchMark™; FT: *Flow-through* (não se ligou as beads); L1: Lavado1; L3: Lavado 3; E1: Eluído 1; E2: Eluído 2; B: *beads* (o que permaneceu ligada a esfera magnética). O anticorpo utilizado foi anti-FLAG® M2 (1:1000). A imunoprecipitação foi realizada com o lisado de 10<sup>9</sup>parasitas selvagens.

Além da análise por *Western blot* as frações obtidas na imunoprecipitação foram investigadas por eletroforese de proteína seguida de coloração com prata para avaliar o perfil de bandas nas frações eluídas de ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG e do parasita selvagem (Figura 4.22).

Os perfis de bandas observados nas frações eluídas foram bem semelhantes entre os parasitas transfectantes e o parasita selvagem (WT), apresentando poucas e discretas diferenças entre si. Esse dado indica que houve uma grande quantidade de proteínas abundantes (dada a intensidade de suas bandas) comuns aos imunoprecipitados dos parasitas transfectantes e do controle, o que não exclui a possibilidade da existência de proteínas distintas ou diferencialmente representadas entre as amostras, apenas não evidencia essas possíveis diferenças.



**Figura 4.22. Avaliação do perfil de bandas das frações eluídas dos parasitas transfectantes e do selvagem através da coloração de gel com prata.** Gel de poliacrilamida corado com prata comparando as frações eluídas das imunoprecipitações dos parasitas transfectantes (expressando ZFPTTP-FLAG e ZFP29-FLAG) com o parasita selvagem. M: Marcador BenchMark™; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição. A, B e C correspondem às frações obtidas dos parasitas transfectantes expressando ZFPTTP-FLAG; B: Imunoprecipitação com lisado de parasitos transfectantes expressando ZFP29-FLAG; C: Imunoprecipitação com lisado de parasitos selvagens (controle).

As frações eluídas (E1) da imunoprecipitação de ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG e do controle WT foram então processadas e analisadas por espectrometria de massas e o resultado da identificação e quantificação das proteínas encontradas nas três amostras foi condensado em uma única tabela (Anexo tabela 4.9).

Ao todo foram identificadas 886 proteínas presentes nas amostras provenientes das frações eluídas de ZFP29-FLAG, ZFPTTP-FLAG e do parasita selvagem, dentre as quais as próprias proteínas ZFP29 e ZFPTTP. Para avaliar a representatividade e o enriquecimento das proteínas ZFP29 e ZFPTTP, além das outras 884 identificadas, nas amostras provenientes dos parasitas transfectantes em relação ao controle classificou-se essas proteínas de acordo com a intensidade em que foram quantificadas e o quanto estavam aumentadas ou diminuídas em relação ao controle.

Observou-se que as proteínas ZFP29 e ZFPTTP apresentaram o maior enriquecimento em suas respectivas amostras em relação ao controle, muito embora não tenham sido as que apresentaram maior quantificação.

Para identificar os possíveis parceiros proteicos de ZFP29 e ZFPTTP e tendo em vista que esse experimento resulta de apenas uma réplica, foram utilizados critérios arbitrários para estipular uma linha de corte confiável. Esses critérios levaram em conta o enriquecimento das proteínas nas amostras em relação ao controle (definido pela diferença em intensidades) e à posição que passaram a ocupar nas amostras de ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG em relação ao parasita selvagem. Dessa forma foi possível eliminar da análise as proteínas mais abundantes que não apresentaram alterações significativas entre as amostras e prevalecer proteínas menos representadas, mas que sofreram enriquecimento nas amostras de ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG (Tabelas 4.1 e 4.2).

As proteínas ZFP29 e ZFPTTP foram enriquecidas em suas amostras e constam correspondentes na tabela (destacadas em vermelho e azul, nessa ordem). Além delas foram encontradas outras 17 proteínas enriquecidas, das quais 2 foram exclusivamente na imunoprecipitação da proteína ZFP29-FLAG (verde), 6 somente nas amostras de ZFPTTP-FLAG (amarelo) e as 9 restantes foram enriquecidas em ambos os casos (roxo) (Tabelas 4.1 e 4.2).

Na amostra de ZFP29-FLAG apresentaram-se enriquecidas as proteínas KMP-11 (TcCLB.508413.68 – *Kinetoplastid membrane protein-11*) e a cadeia pesada de dineína (TcCLB.506679.110), enquanto que na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG seis proteínas foram diferencialmente quantificadas: uma proteína RHS (TcCLB.505609.30 – *Retro transposon hot spot*), tirosina aminotransferase (TcCLB.510187.20); duas proteínas não caracterizadas (TcCLB.506505.30 e TcCLB.505193.100); uma serina hidroximetiltransferase (TcCLB.509937.150) e a subunidade beta 3 do proteossomo (TcCLB.506779.50). Entre essas proteínas exclusivas da imunoprecipitação de ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG não foram encontradas correlações funcionais.

A proteína ZFP29 não foi enriquecida na amostra de ZFPTTP-FLAG, ao passo que ZFPTTP sequer foi identificada na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG. Por conta disso, o fato da maioria dos candidatos ter apresentado enriquecimento em ambas as amostras foi inesperado. Como nas duas situações as proteínas apresentam a etiqueta *FLAG* em comum, seria possível que esse enriquecimento tenha ocorrido por conta da interação com a etiqueta.

Tabela 4.1. Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação da proteína ZFP29-FLAG.

Uniprot	TriTrypDB (ID)	Descrição	ZFP29-FLAG		WT		E	↑ Pos	Score
			Intensidade	Pos	Intensidade	Pos			
Q4DXF7	Tc00.1047053510355.269	Cytochrome b5, putative (Fragment)	2,0E+06	274	6,0E+03	841	2,53	567	4,0326
<b>Q4E4I0</b>	<b>Tc00.1047053506885.204</b>	<b>Uncharacterized protein</b>	<b>5,5E+06</b>	<b>127</b>	<b>2,1E+04</b>	<b>829</b>	<b>2,41</b>	<b>702</b>	<b>14,779</b>
Q4D3A7	Tc00.1047053508413.68	<b>Kinetoplastid membrane protein KMP-11</b>	1,5E+06	313	6,0E+03	842	<b>2,41</b>	529	3,0038
Q4DU62	Tc00.1047053511391.120	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	1,5E+06	327	6,0E+03	843	2,39	516	1,4778
Q4D9D2	Tc00.1047053506627.20	Uncharacterized protein	6,3E+05	492	6,0E+03	844	2,02	352	1,7054
Q4DNU8	Tc00.1047053511003.10	Phospholipid-transporting ATPase (Fragm	5,8E+05	505	6,0E+03	845	1,99	340	-2
Q4D5I2	Tc00.1047053510131.40	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, pu	5,7E+05	507	6,0E+03	846	1,98	339	2,0186
Q4D7Y1	Tc00.1047053510755.120	RNA-binding protein, putative	5,7E+05	509	6,0E+03	847	1,98	338	3,9185
Q4E2R8	Tc00.1047053504153.150	Kinesin-like protein	4,2E+05	570	6,0E+03	848	1,84	278	-2
Q4E092	Tc00.1047053506679.110	<b>Dynein heavy chain, putative</b>	2,7E+05	644	6,0E+03	849	<b>1,65</b>	205	-2
Q4DS18	Tc00.1047053507949.4	Cytidine triphosphate synthase, putative	2,6E+05	645	6,0E+03	850	1,63	205	1,6584
Q4E5E9	Tc00.1047053511277.460	Uncharacterized protein	2,6E+05	646	6,0E+03	851	1,63	205	1,5944



ZFP29.






Proteínas encontradas enriquecidas exclusivamente com ZFP29-FLAG.



Proteínas enriquecidas com ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.

Tabela 4.2. Proteínas enriquecidas na imunoprecipitação da proteína ZFPTTP-FLAG.

Uniprot	TriTrypDB	Descrição	ZFPTTP		WT		E	↑Pos	Score
			Intensidade	Pos	Intensidade	Pos			
Q4D2G0	Tc00.1047053505609.30	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	9,3E+07	12	6,0E+03	873	<b>4,19</b>	<b>861</b>	-2
<b>Q4D8K5</b>	<b>Tc00.1047053503453.20</b>	<b>Uncharacterized protein</b>	<b>1,3E+07</b>	<b>71</b>	<b>1,3E+04</b>	<b>835</b>	<b>3,00</b>	<b>764</b>	<b>15,21</b>
Q4E4E9	Tc00.1047053510187.20	Tyrosine aminotransferase, putative	1,9E+09	2	2,0E+06	274	<b>2,99</b>	<b>272</b>	9,1196
Q4DU62	Tc00.1047053511391.120	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	1,6E+06	351	6,0E+03	843	2,44	492	1,4778
Q4DIC7	Tc00.1047053506959.140	Uncharacterized protein (Fragment)	1,2E+06	408	6,0E+03	857	2,30	449	1,0567
Q4DNU8	Tc00.1047053511003.10	Phospholipid-transporting ATPase (Fragment)	8,1E+05	495	6,0E+03	845	2,13	350	-2
Q4D7Y1	Tc00.1047053510755.120	RNA-binding protein, putative	6,9E+05	531	6,0E+03	847	2,06	316	3,9185
Q4D3I2	Tc00.1047053506505.30	<b>Uncharacterized protein</b>	6,3E+05	548	6,0E+03	874	<b>2,02</b>	<b>326</b>	1,4152
Q4DXF7	Tc00.1047053510355.269	Cytochrome b5, putative (Fragment)	5,6E+05	568	6,0E+03	841	1,97	273	4,0326
Q4DQ97	Tc00.1047053508387.20	Methylthioadenosine phosphorylase, putative	5,1E+05	591	6,0E+03	855	1,93	264	2,8331
Q4D5I2	Tc00.1047053510131.40	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	4,1E+05	623	6,0E+03	846	1,83	223	2,0186
Q4D9D2	Tc00.1047053506627.20	Uncharacterized protein	3,1E+05	668	6,0E+03	844	1,72	176	1,7054
Q4DDB3	Tc00.1047053505193.100	<b>Uncharacterized protein</b>	2,3E+06	300	4,4E+04	808	<b>1,72</b>	<b>508</b>	1,6614
Q4DHA9	Tc00.1047053506779.50	<b>Proteasome beta 3 subunit, putative</b>	3,0E+05	678	6,0E+03	875	<b>1,69</b>	<b>197</b>	2,3865
Q4DSP9	Tc00.1047053509937.150	<b>Serine hydroxymethyltransferase</b>	2,9E+05	682	6,0E+03	876	<b>1,69</b>	<b>194</b>	1,2963
Q4DTF4	Tc00.1047053510311.90	Quinone oxidoreductase, putative	2,6E+05	703	6,0E+03	859	1,63	156	2,4893

	ZFPTTP.
	Proteínas encontradas enriquecidas exclusivamente com ZFPTTP-FLAG.
	Proteínas enriquecidas com ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.

Uniprot – banco de dados de proteínas (The UniProt Consortium, 2014).

TriTrypDB – banco de dados de tripanossomatídeos (Asleet *et al.*, 2010).

Descrição – anotação de acordo com o TriTrypDB.

Intensidade – quantificação calculada a partir dos picos de massa/carga dos peptídeos identificados

Pos – posição no ranking por intensidade (1º - maior; 886º - menor).

E – enriquecimento da proteína baseado na diferença da sua intensidade na amostra ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG em relação ao controle [ $\log(\text{intensidade na amostra ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG}) - \log(\text{intensidade no controle})$ ].

↑Pos – quantas posições a proteína subiu no ranking por intensidade na amostra ZFP29-FLAG ou ZFPTTP-FLAG em relação ao controle.

Score – score de identificação (valores maiores apresentam maior confiança na identificação).



#### 4.8.2. Análise dos mRNAs associados às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG.

A identificação dos transcritos associadas às proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG foi feita em formas epimastigotas e parasitas submetidos ao estresse, através do sequenciamento (plataforma Illumina®) dos mRNAs imunoprecipitados com as proteínas recombinantes. Os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica para os parasitas transfectantes e em duplicata para selvagem (controle do experimento e das análises) para as duas condições (epimastigotas e estresse), totalizando 16 amostras.

A tabela 4.3 mostra a quantificação dos RNAs obtidos para cada amostra após a extração das frações imunoprecipitadas.

**Tabela 4.3. Quantificação dos RNAs extraídos em cada réplica.**

Quantificação dos RNAs extraídos das imunoprecipitações		
Amostra	Réplica	Dosagem
ZFP29 Epi	1	2,92 ng/ $\mu$ L
	2	2,72 ng/ $\mu$ L
	3	3,18 ng/ $\mu$ L
ZFP29 Str	1	2,68 ng/ $\mu$ L
	2	2,62 ng/ $\mu$ L
	3	2,12 ng/ $\mu$ L
ZFPTTP Epi	1	2,56 ng/ $\mu$ L
	2	2,80 ng/ $\mu$ L
	3	2,60 ng/ $\mu$ L
ZFPTTP Str	1	2,26 ng/ $\mu$ L
	2	2,12 ng/ $\mu$ L
	3	3,10 ng/ $\mu$ L
Controle (WT) Epi	1	2,40 ng/ $\mu$ L
	2	2,86 ng/ $\mu$ L
Controle (WT) Str	1	2,01 ng/ $\mu$ L
	2	2,70 ng/ $\mu$ L
Epi: Epimastigota		
Str: Epimastigotas submetidos ao estresse nutricional		
Quantificação feita por fluorometria (Qubit® 2.0)		

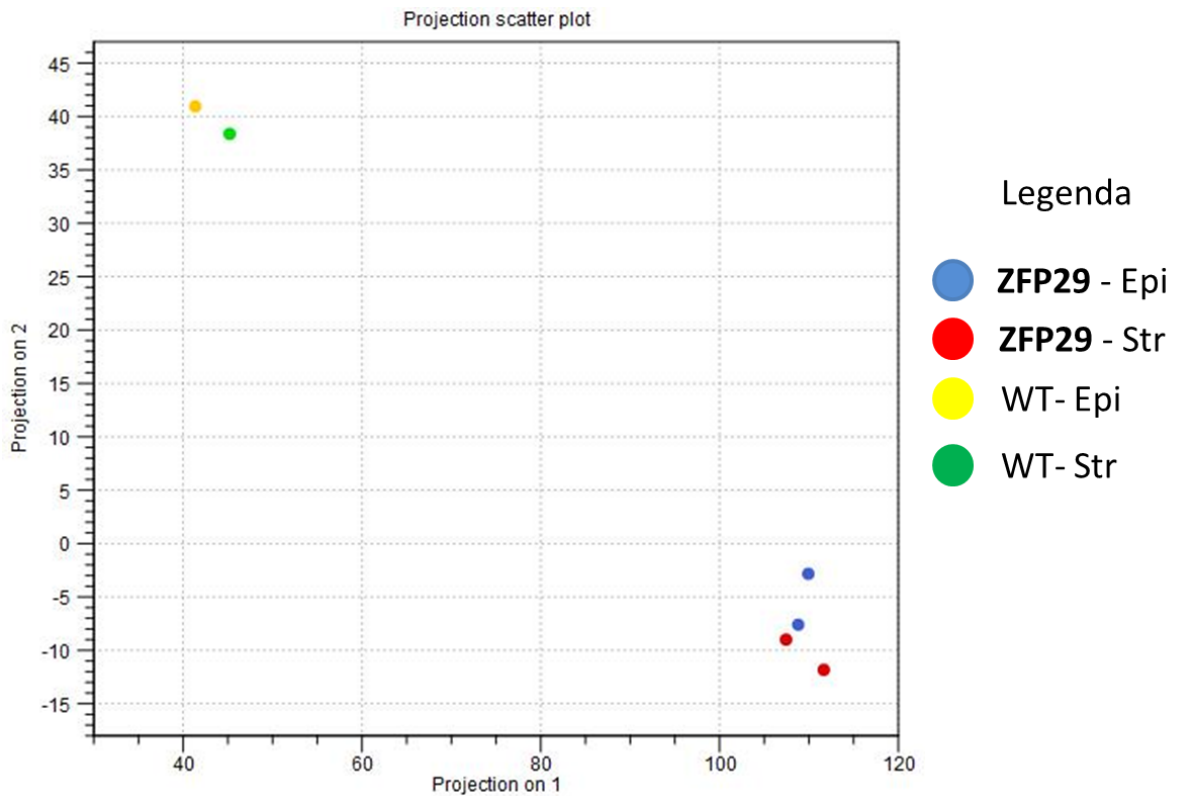
A partir desses RNAs foram então preparadas as bibliotecas de cada réplica de modo a obter os cDNAs enriquecidos. As bibliotecas foram

isoladamente quantificadas (tabela 4.4) para então serem agrupadas em um pool de 500 pM, o qual foi utilizado para o sequenciamento.

**Tabela 4.4. Quantificação das bibliotecas de cDNA.**

Amostras	Réplicas	Dosagem (ng/ $\mu$ L)
ZFP29 Epi	1	63,4
	2	17,8
	3	18,8
ZFP29 Str	1	41,6
	2	6,2
	3	7,5
ZFPTTP Epi	1	54,8
	2	65.2
	3	55.6
ZFPTTP Str	1	41
	2	63.8
	3	71.8
WT Epi	1	53,2
	2	11
WT Str	1	42,8
	2	12
Epi: Epimastigota		
Str: Epimastigota estressado nutricionalmente		
WT: Parasita selvagem (controle)		

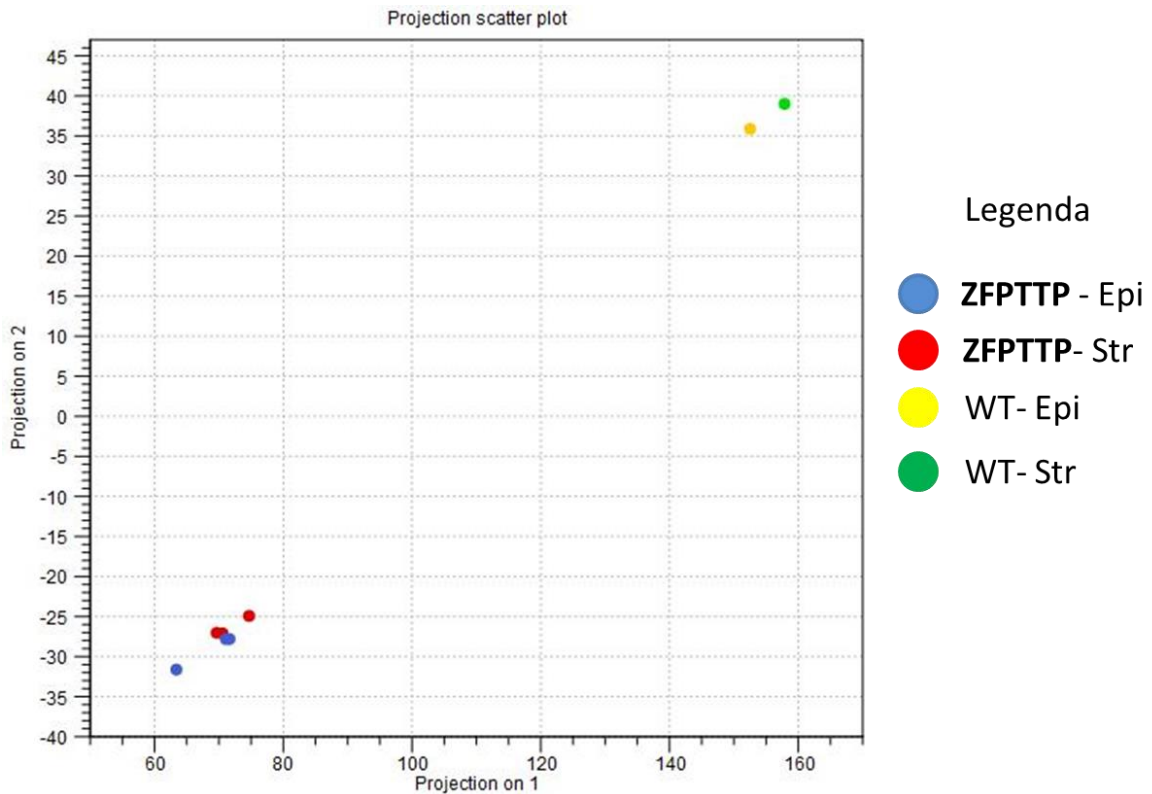
Após o sequenciamento foi feita uma análise de componentes principais (PCA) para verificar o agrupamento das réplicas. Dessa análise constatou-se que uma réplica de ZFP29-FLAG e outra do controle (tanto de epimastigotas quanto de estresse) estavam muito distantes e por isso foram descartadas. As outras réplicas de ZFP29-FLAG, no entanto, apresentaram-se próximas entre si e distantes em relação ao controle nas duas condições (epi e estresse) (Gráfico 4.7).



**Gráfico 4.7. Análise de PCA das réplicas de ZFP29-FLAG (epimastigota e estresse) em relação ao controle (WT).** Cada círculo corresponde a uma réplica conforme indicado na legenda.

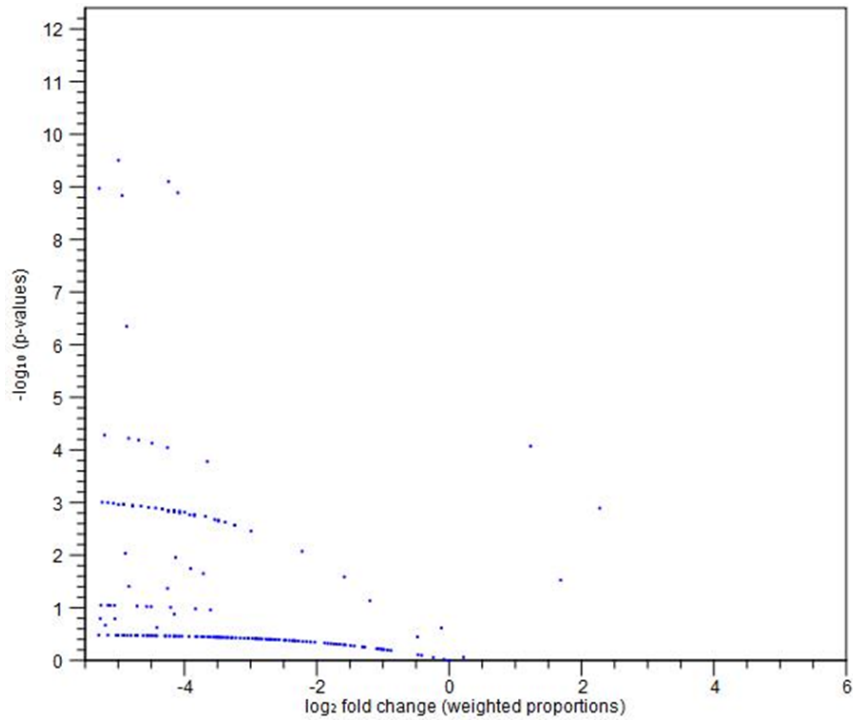
Já a análise de componentes principais (PCA) para ZFPTTP-FLAG mostrou que houve a correlação entre as três réplicas em epimastigotas e no estresse, as quais permaneceram distantes dos controles (Gráfico 4.8).

Nessas análises as réplicas do controle de epimastigota e estresse também apresentaram correlação entre si (Gráfico 4.7 e Gráfico 4.8).

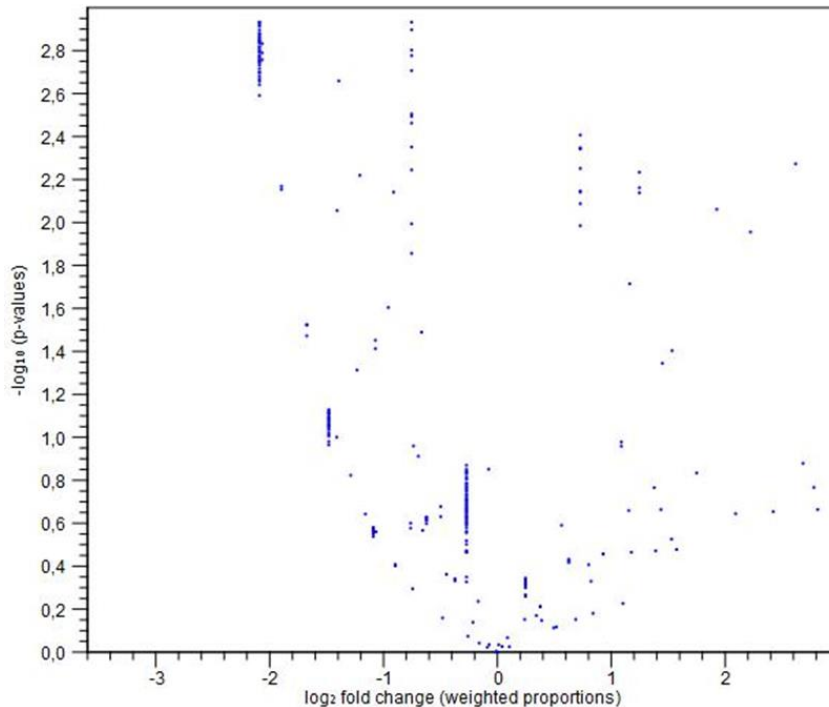


**Gráfico 4.8. Análise de PCA das réplicas de ZFP29-FLAG (epimastigota e estresse) em relação ao controle (WT).** Cada círculo corresponde a uma réplica conforme indicado na legenda.

Dessa forma, as réplicas foram agrupadas e o teste beta-binomial de Baggerly foi aplicado (Baggerly et al. 2003). Os gráficos 4.9 e 4.10 mostram a distribuição dos transcritos encontrados no grupo de ZFP29-FLAG (epimastigota e estresse, respectivamente) de acordo com o fold change e o p-value.

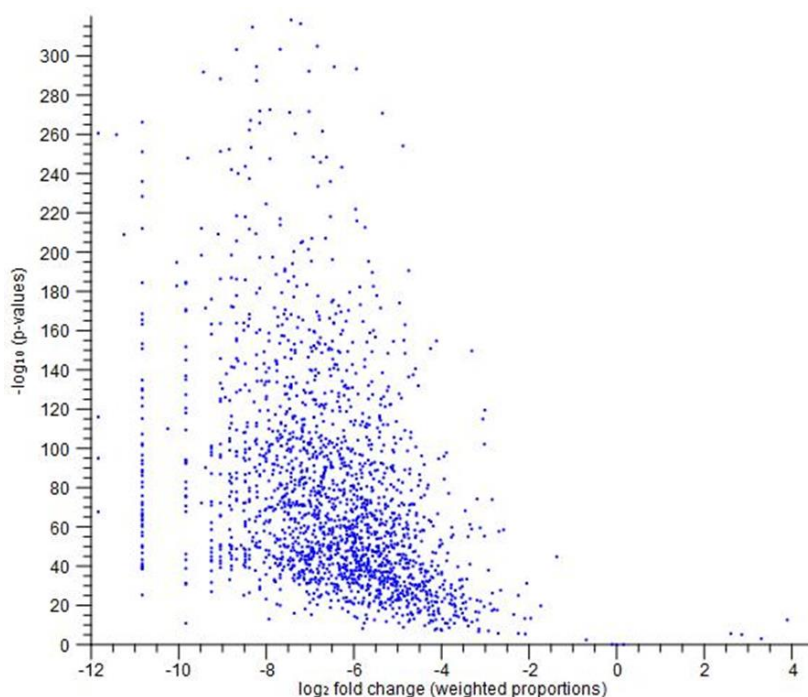


**Gráfico 4.9. Volcano Plot com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFP29-FLAG (Epimastigotas) depois de aplicado o teste de Baggerly.** No eixo X estão os valores do fold change ( $\log_2$ ), enquanto que no eixo Y estão os valores de p ( $-\log_{10}$ ). A linha de corte considerou os transcritos com valores de fold change ( $\log_2$ ) > -4 e p ( $-\log_{10}$ ) > 2.

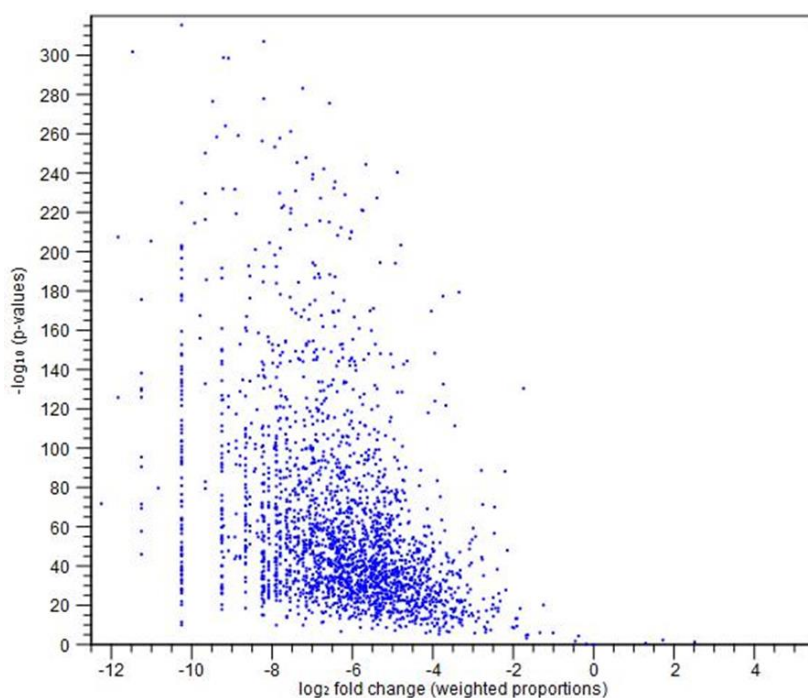


**Gráfico 4.10. Volcano Plot com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFP29-FLAG (Estresse) depois de aplicado o teste de Baggerly.** No eixo X estão os valores do fold change ( $\log_2$ ), enquanto que no eixo Y estão os valores de p ( $-\log_{10}$ ). A linha de corte considerou os transcritos com valores de fold change ( $\log_2$ ) > -4 e p ( $-\log_{10}$ ) > 2.

Já os gráficos 4.11 e 4.12 mostram a mesma análise de distribuição dos transcritos para o grupo ZFPTTP-FLAG de epimastigota e estresse, nessa ordem.



**Gráfico 4.11. Volcano Plot com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFPTTP-FLAG (Epimastigotas) depois de aplicado o teste de Baggerly.** No eixo X estão os valores do fold change ( $\log_2$ ), enquanto que no eixo Y estão os valores de p ( $-\log_{10}$ ). A linha de corte considerou os transcritos com valores de fold change ( $\log_2$ ) > -4 e p ( $-\log_{10}$ ) > 2.



**Gráfico 4.12. Volcano Plot com a distribuição dos transcritos presentes no grupo de ZFPTTP-FLAG (Estresse) depois de aplicado o teste de Baggerly.** No eixo X estão os valores do fold change ( $\log_2$ ), enquanto que no eixo Y estão os valores de p ( $-\log_{10}$ ). A linha de corte considerou os transcritos com valores de fold change ( $\log_2$ ) > -4 e p ( $-\log_{10}$ ) > 2.

Após a aplicação do teste estatístico foram utilizados os seguintes critérios para definir os RNAs candidatos a se associarem as proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG: RPKM > 50; Fold change > 4; FDR < 0,01.

Depois dessa seleção, os números de RNAs encontrados enriquecidos nas amostras de ZFP29-FLAG em relação ao controle foram de 260 e 296 em epimastigotas e estresse, respectivamente (Tabelas 4.5 e 4.6 em anexo).

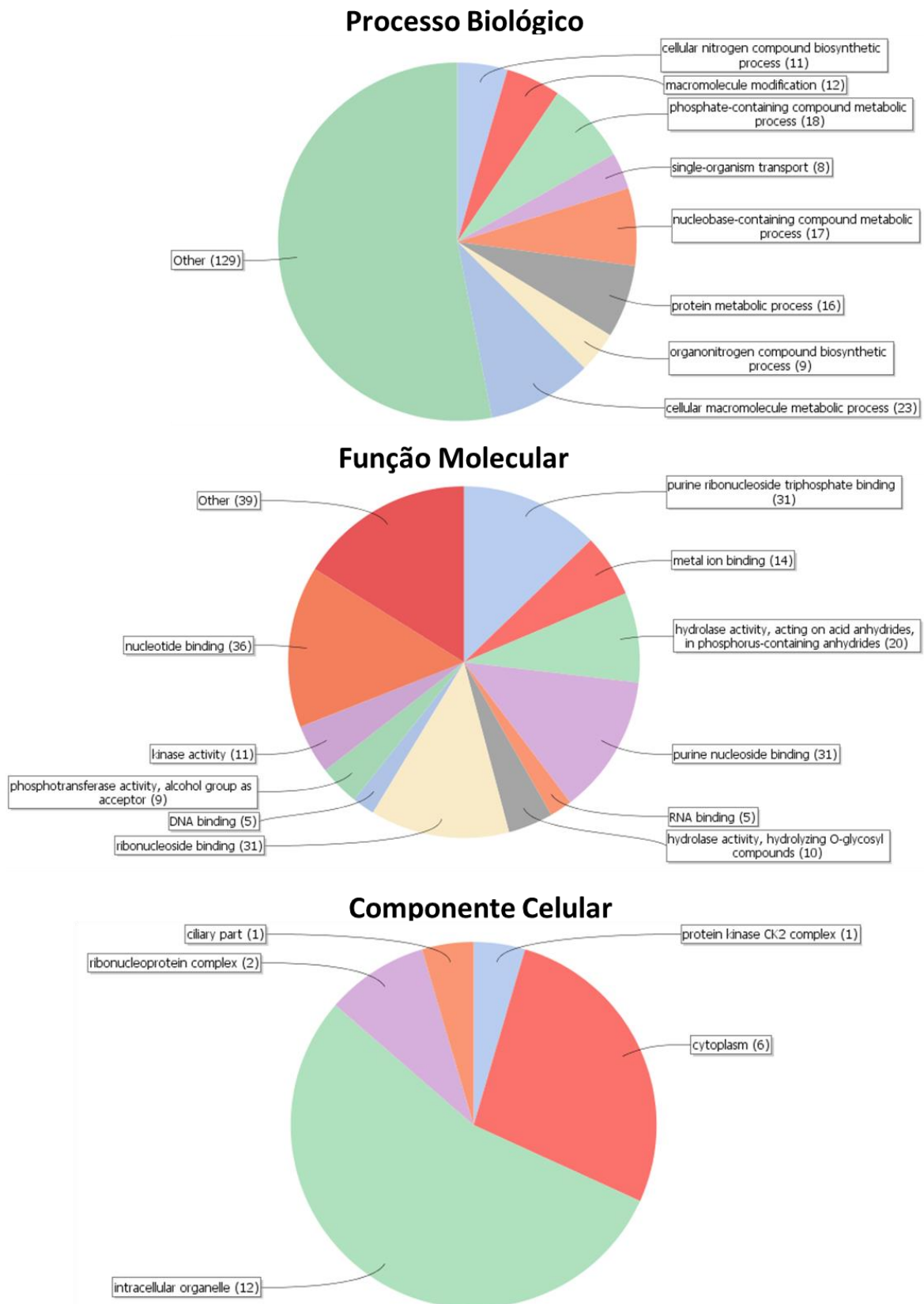
Em seguida foi analisada a anotação dos genes correspondentes a esses transcritos enriquecidos nos grupos de ZFP29-FLAG no banco de dados de tripanossomatídeos (TriTrypDB - Aslett et al. 2010). Foi encontrado que uma grande parte (~ 55%) dos genes estão anotados como codificadores de proteínas hipotéticas tanto nos transcritos de epimastigotas quanto dos parasitas submetidos ao estresse (Tabelas 4.5 e 4.6 em anexo).

Entre os transcritos mais abundantes de epimastigotas associados a ZFP29-FLAG foram encontrados mRNAs referentes a proteínas de superfície, como GP63, proteínas de superfície associadas a mucina (MASP) e proteínas hipotéticas (Tabela 4.5 em anexo).

No grupo de transcritos associados em parasitas em estresse também foram encontrados entre os mais abundantes os mRNAs referentes a MASP e a mucinas. Identificou-se também mRNAs relacionados a proteínas motoras como dineína, miosina e cinesinas e transcritos envolvidos na oxi-redução (Tabela 4.6 em anexo).

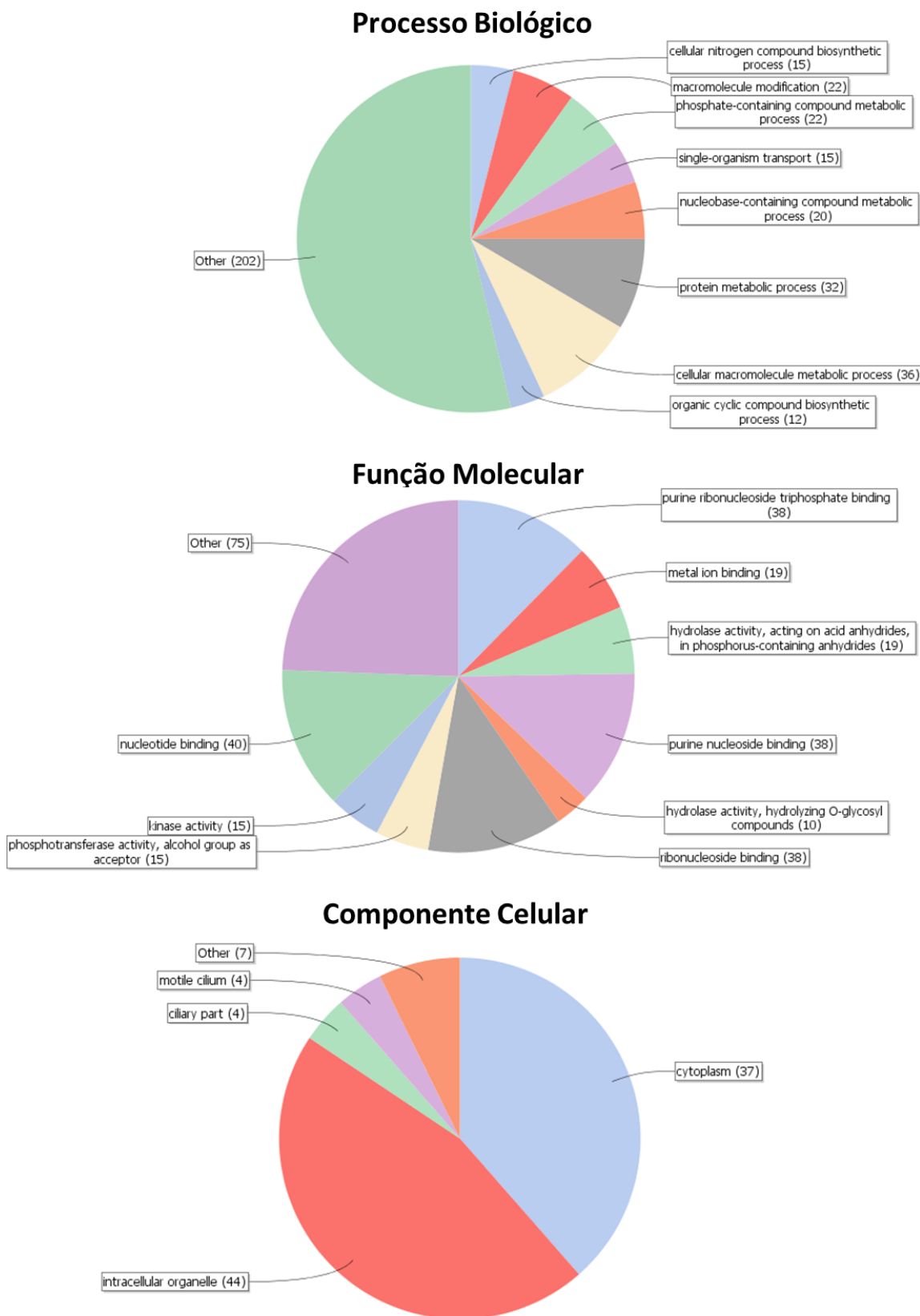
Ao agrupar os mRNAs de epimastigotas em termos de GO (*Gene Ontology*) houve um enriquecimento maior de termos relacionados a ligação a nucleotídeos e processos metabólicos diversos envolvendo proteínas e macromoléculas (Gráfico 4.13).

Já nos mRNAs do grupo de estresse, foi possível visualizar alterações no enriquecimento desses termos, como a atividade quinase, os processos metabólicos modo geral e os relacionados aos componentes celulares que aumentaram no estresse (Gráfico 4.14).



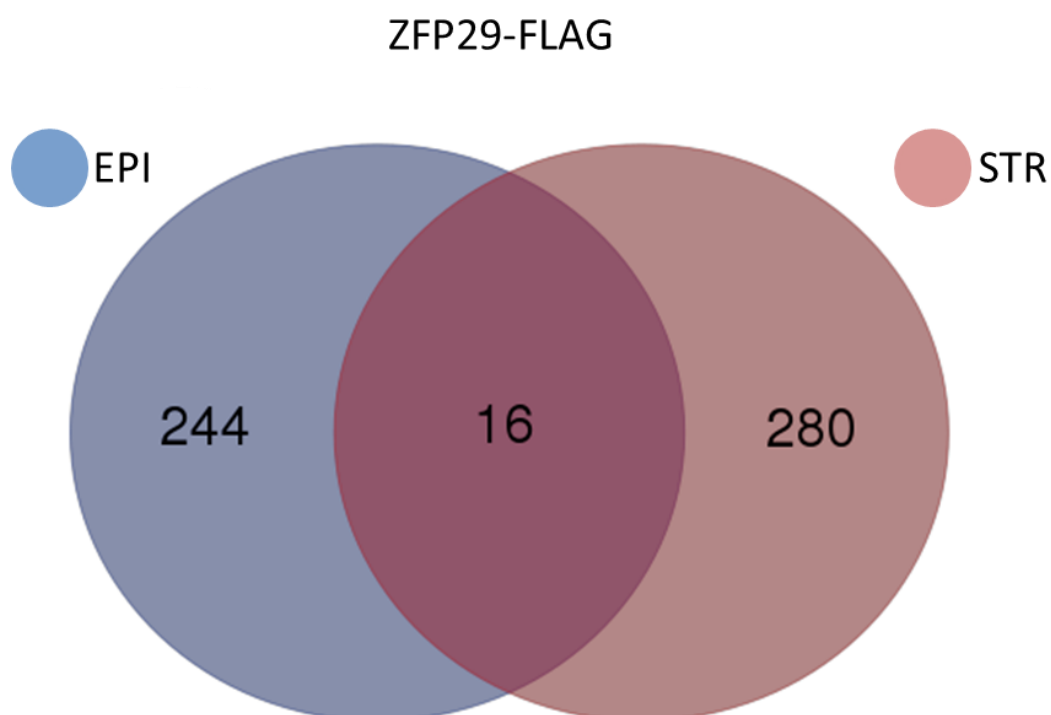
**Gráfico 4.13. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFP29-FLAG (epimastigotas) em termos de GO.** Os três gráficos de pizza trazem os termos enriquecidos para os transcritos associados a ZFP29-FLAG em epimastigotas para cada uma das classes: processo biológico; função molecular e componente celular. Esses gráficos foram gerados utilizando o programa BLAST2GO.





**Gráfico 4.14. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFP29-FLAG (estresse) em termos de GO.** Os três gráficos de pizza trazem os termos enriquecidos para os transcritos associados a ZFP29-FLAG no estresse para cada uma das classes: função molecular; processo biológico e componente celular. Esses gráficos foram gerados utilizando o programa BLAST2GO.

Os termos enriquecidos para os transcritos de epimastigotas e estresse no grupo de ZFP29-FLAG apresentaram diferenças entre essas condições, principalmente acerca dos processos metabólicos e componentes celulares. Esse dado levantou a questão se ZFP29-FLAG estaria se associando a transcritos diferentes em epimastigota e no estresse. Realmente, quando foram comparados os transcritos encontrados nessas duas condições uma grande divergência foi observada (Gráfico 4.15), confirmando que essas populações de mRNAs são de fato distintas.

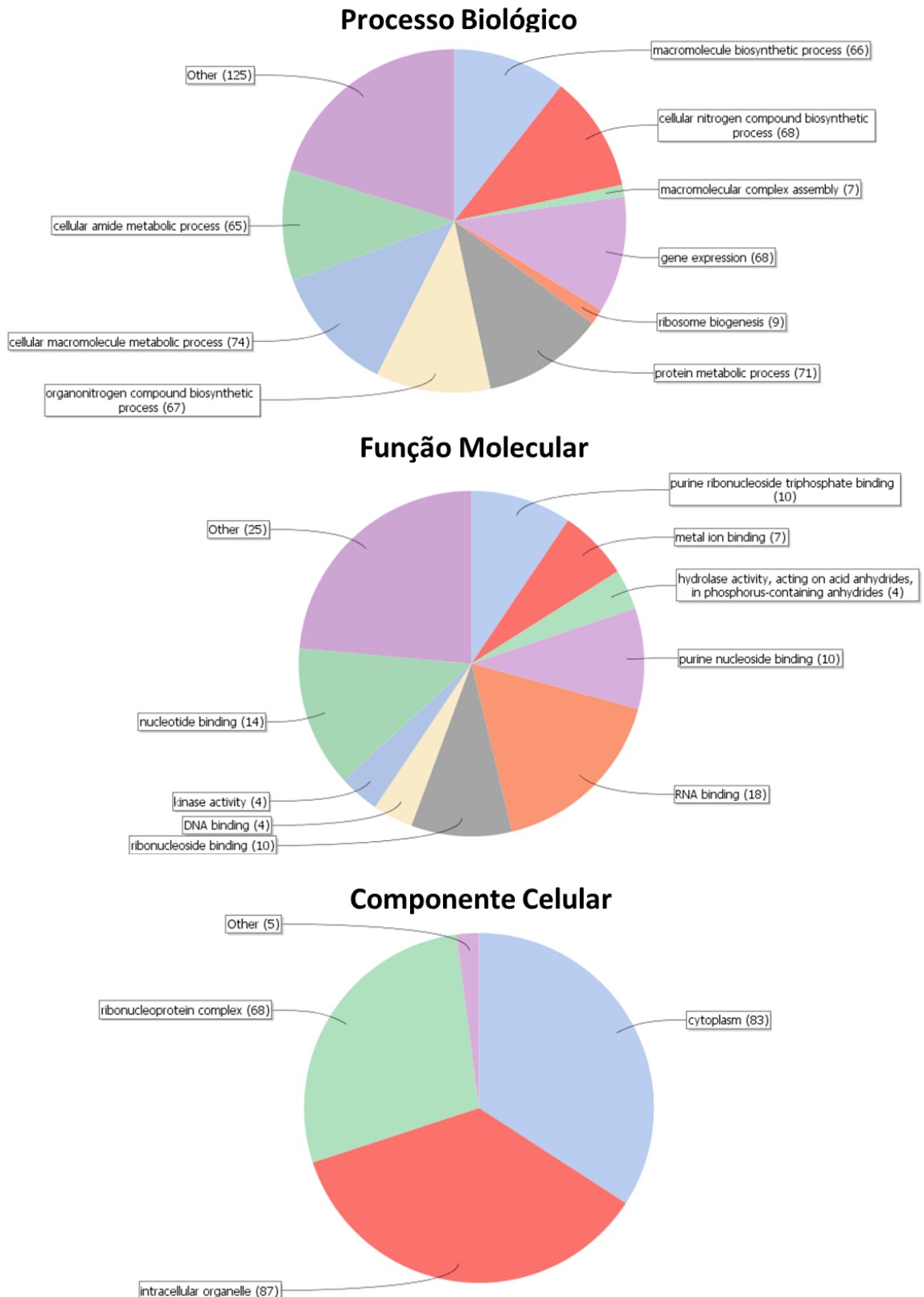


**Gráfico 4.15. Diagrama de Venn com os transcritos associados a ZFP29-FLAG.** O gráfico mostra a correlação entre as populações de mRNA associadas a ZFP29-FLAG em epimastigotas (azul) e o estresse (vermelho). Apenas 16 transcritos foram encontrados como comuns as duas populações.

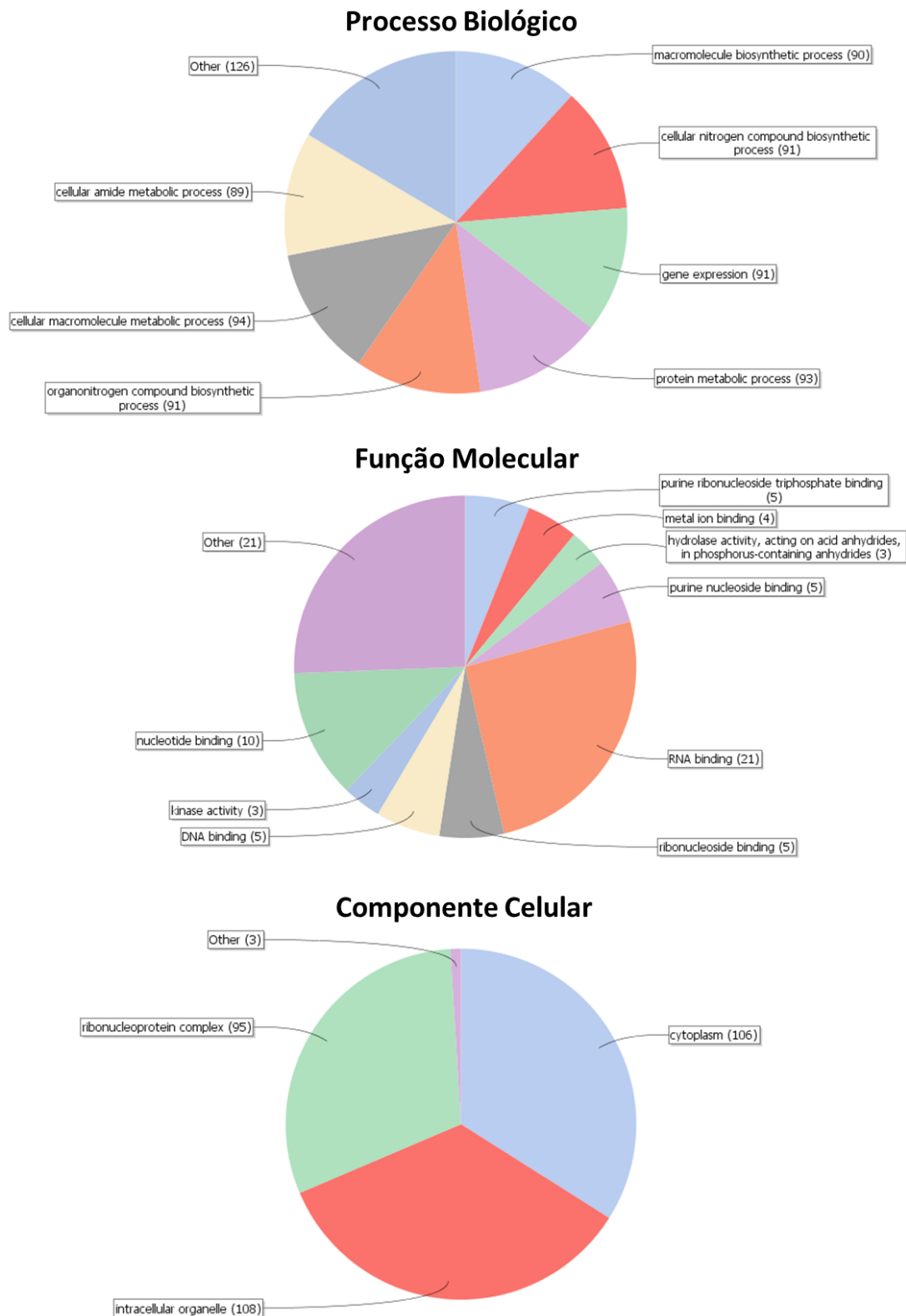
Ao analisar os mRNAs associados a ZFP29-FLAG foram identificados 150 transcritos enriquecidos em epimastigotas e 156 nos parasitas submetidos ao estresse (Tabela 4.7 e 4.8 em anexo). Depois de obtida a descrição dos genes correspondentes a esses mRNAs, observou-se que a grande parte codifica para proteínas ribossomais em epimastigotas (44,6%) e uma maior quantidade no estresse (60,8%) (Tabela 4.7 e 4.8 em anexo).

Quanto aos termos de GO encontrados no grupo de transcritos associados a ZFPTTP-FLAG apresentaram-se enriquecidos os relacionados a processos metabólicos de proteínas e macromoléculas, a expressão gênica e a complexos ribonucleoproteicos (Gráfico 4.16),

Para os mRNAs associados a ZFPTTP-FLAG no estresse a análise por GO apresentou o um enriquecimento para basicamente os mesmos termos encontrados nos transcritos de epimastigotas, porém esse enriquecimento foi maior. (Gráfico 4.17). Essa semelhança entre os termos mais representados e a questão de em ambas as condições terem sido identificados um grande número de transcritos que codificam para proteínas ribossomais, apontou para a possibilidade de ZFPTTP-FLAG se associar a transcritos comuns as formas epimastigotas e os parasitas submetidos ao estresse.



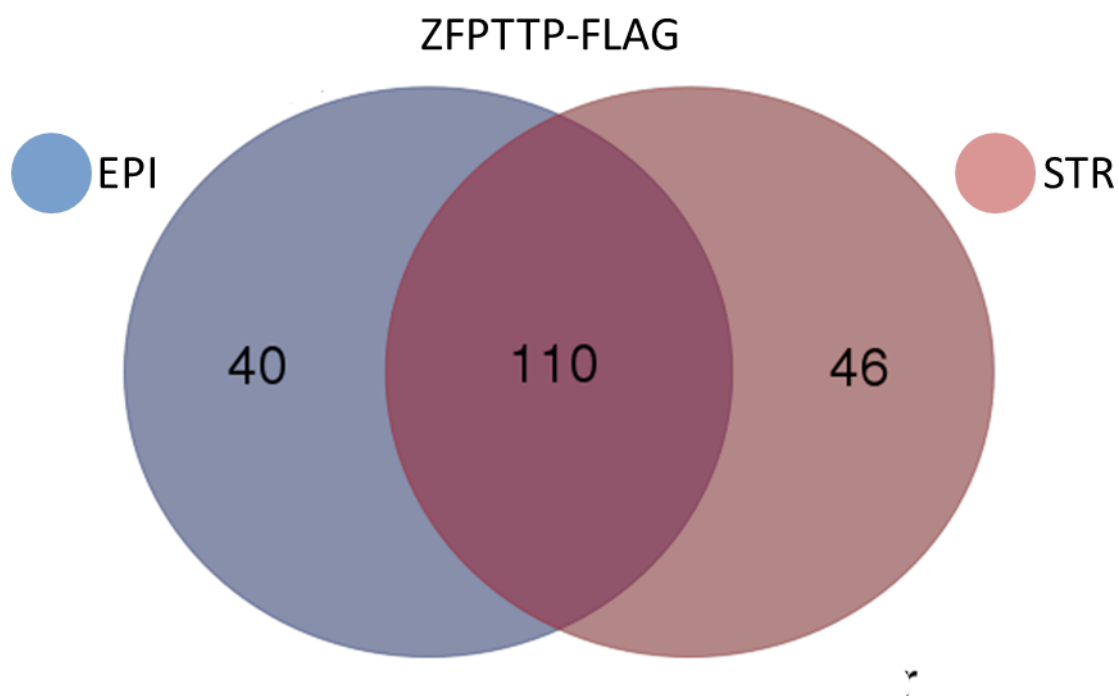
**Gráfico 4.16. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFPTTP-FLAG (epimastigotas) em termos de GO.** Os três gráficos de pizza trazem os termos enriquecidos para os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG em epimastigotas para cada uma das classes: processo biológico; função molecular e componente celular. Esses gráficos foram gerados utilizando o programa BLAST2GO.



**Gráfico 4.17. Distribuição dos mRNAs enriquecidos no grupo ZFPTTP-FLAG (epimastigotas) em termos de GO.** Os três gráficos de pizza trazem os termos enriquecidos para os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG em estresse para cada uma das classes: processo biológico; função molecular e componente celular. Esses gráficos foram gerados utilizando o programa BLAST2GO.

Quando esses grupos de mRNAs de epimastigotas e estresse foram comparados observou-se que realmente existe um número de transcritos comuns as duas condições (Gráfico 4.18). No entanto, cerca de 40 transcritos se associam a ZFPTTP-FLAG exclusivamente em epimastigotas ou no estresse.

Ao analisar os transcritos não compartilhados foi observada uma grande diferença. Enquanto que em epimastigotas os 40 mRNAs referem-se a proteínas hipotéticas, os 46 encontrados exclusivamente no estresse permanecem relacionados a proteínas ribossomais.



**Gráfico 4.18. Diagrama de Venn com os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG.** Em azul estão os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG em epimastigotas e em vermelho os encontrados em estresse.

Ao todo os dados de RNAseq forneceram informações interessantes a respeito dos mRNAs associados às proteínas recombinantes ZFP29 e ZFPTTP em epimastigotas e no estresse.

Para a proteína ZFP29-FLAG foi observado que a sua associação com os mRNAs é dinâmica entre os estágios de epimastigotas e estresse, tendo em vista que ela se associa a populações bem distintas nessas duas condições.

Quanto aos transcritos não foi possível realizar grandes inferências dado que muitos deles estão anotados como proteínas hipotéticas.

No entanto, foram encontrados mRNAs referentes relacionados a proteínas de superfície como GP63, MASPs e mucinas e a associação com transcritos de proteínas motoras, o que é interessante dada a localização da proteína ZFP29 e a identificação de uma dineína como possível parceiro proteico.

Já a proteína ZFPTTP-FLAG apresentou-se associada a uma enorme quantidade de transcritos relacionados a proteínas ribossomais tanto em epimastigota quanto para o estresse. Desses mRNAs uma grande parte foi identificado nas duas condições, sugerindo que a proteína ZFPTTP-FLAG mantém-se ligada a um “core” de transcritos relacionados a tradução.

## 5. DISCUSSÃO

A capacidade de regulação pós-transcricional da expressão gênica é uma característica comum a todos os organismos e é requerida pela necessidade de uma célula responder rapidamente a mudanças ambientais (Van Assche et al. 2015; Schwanhäusser et al. 2011). Apesar de essa característica estar presente desde bactérias até mamíferos, existem organismos que atribuíram a ela um maior valor evolutivo, como o caso dos tripanossomatídeos. Nessa família de protozoários as evidências encontradas suportam a ideia de que o controle pós-transcricional da expressão gênica é a principal forma utilizada por esses organismos para regulação de seus genes (Clayton 2002; Martínez-Calvillo et al. 2010; Fernández-Moya & Estévez 2010).

Entre os membros desse clado se encontram o *T. cruzi*, *T. brucei* e as espécies do gênero *Leishmania*, que são parasitas com ciclo de vida heteroxênico, envolvendo a alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Tyler & Engman 2001; Matthews 1999; Dostálová & Volf 2012). Os hospedeiros distintos exigem dos parasitas uma capacidade de adaptação e tolerância para que esses tenham sucesso na infecção. Em resposta aos desafios encontrados como mudança de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, esses parasitas conseguem modular a expressão de seus genes, alterando seus metabolismos e alternando entre morfologias distintas através de processos de diferenciação (Matthews 1999; Alves & Goldenberg, *in press.*; Figueiredo et al. 2000). Nesse contexto, portanto, destacam-se os fatores envolvidos nas etapas da regulação da expressão gênica que ocorrem após o início da transcrição, dentre eles as RBPs (Glisovic et al. 2008).

Nos tripanossomatídeos o repertório predito de proteínas com domínios de ligação ao RNA é vasto e variado, sobretudo para RBPs da família das proteínas RRM e dedo de zinco C3H (Gaudenzi et al. 2005a; Kramer et al. 2010).

Nessa dissertação foram estudadas duas proteínas com domínio dedo de zinco C3H no *T. cruzi* ZFP29 e ZFPTTP. Os resultados encontrados apontam que essas duas proteínas são reguladas na metaciclogênese não sendo expressas na forma tripomastigota metacíclica. No decorrer desse processo de



diferenciação obteve-se que a expressão de ZFP29 é reprimida após o estresse nutricional, enquanto que ZFPTTP sofre uma drástica redução de seus níveis proteicos durante a etapa de adesão (figura 4.1).

Esse dado tornou-se interessante não apenas pela questão de ZFP29 e ZFPTTP não serem expressas no estágio infectivo do *T. cruzi*, mas também por esse controle ocorrer em etapas importantes durante o disparo da metaciclogênese (Bonaldo et al. 1988; Kollien & Schaub 2000). Existem registros de outras RBPs reguladas durante esse processo de diferenciação no *T. cruzi*, como o caso da proteína TcZFP2 que apresentam-se reduzida nas formas tripomastigotas metacíclicas (Mörking et al. 2012). e da proteína TcRBP40 que não foi detectada nesse estágio (Guerra-Slompo et al. 2012).

A proteína TcZFP2 se liga a sequências ricas em A na região 3'UTR de seus transcritos, dentre os quais os que codificam para proteínas relacionadas ao processamento e transporte de RNA; complexo citocromo B e proteínas associadas a dineína. Nesse estudo foi visto que grande parte dos RNAs alvos de TcZFP2 apresentam uma maior expressão nas formas metacíclicas, onde a proteína é regulada (Mörking et al. 2012).

Já a proteína TcRBP40 se liga a sequências ricas em AG na porção 3'-UTR dos seus transcritos alvos. Dentre os mRNAs associados a TcRBP40 foram encontrados transcritos que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, no dobramento proteico e proteínas com domínios transmembrana (Guerra-Slompo et al. 2012).

No *T. brucei* também foram descritas RBPs que são moduladas durante o processo de diferenciação como o caso da proteína RBP10 que é expressa exclusivamente nas formas sanguíneas desse parasita (Wurst et al. 2012). A proteína RBP10 quando removida das formas sanguíneas ou superexpressa no estágio procíclico promove grandes alterações no transcriptoma do parasita. A indução do RNAi de RBP10 acarretou na redução dos níveis de 320 transcritos, dentre os quais 85 são específicos da forma sanguínea e grande parte é relacionado ao metabolismo de açúcar e ao transporte. Quando essa proteína foi expressa nas formas procíclicas foi observado um aumento de 156 mRNAs, dos quais 78 eram específicos da forma sanguínea, e novamente, associados ao metabolismo de açúcar, enquanto que, entre os transcritos reprimidos, estavam os específicos as formas procíclicas (Wurst et al. 2012).

Um dos principais mecanismos de controle pós-transcricional ocorre por meio do reconhecimento de elementos *cis* nos mRNAs presentes majoritariamente nas regiões 3'-UTR e 5'-UTR (Kramer & Carrington 2011; Pastro et al. 2013). Por essa razão decidiu-se investigar se o controle dos níveis proteicos de ZFP29 e ZFPTTP era decorrente da regulação dessas regiões em seus transcritos, clonando apenas as regiões codificadoras no vetor pTCNEO3XFLAG.

Ao analisar os dados de expressão das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG encontrou-se que as proteínas recombinantes permaneceram sendo reguladas negativamente no estágio metacíclico, apesar de haver diferenças em relação às respectivas proteínas nativas. Com base nesses resultados foi possível descartar que a regulação de ZFP29 e ZFPTTP observada nos tripomastigotas metacíclicos é decorrente das regiões UTRs presentes em seus respectivos transcritos. Entretanto, as diferenças observadas entre as proteínas recombinantes e nativas podem indicar a participação dessas regiões no controle de ZFP29 e ZFPTTP nas formas aderidas ao substrato. Ainda, o fato de tanto as proteínas nativas quanto transfectantes terem sofrido regulação no estágio infectivo (tripomastigota metacíclico) aponta que esse controle nesse estágio está sendo mediado pelo reconhecimento de algum elemento presente nas sequências codificadoras ou nas próprias proteínas.

Ao todo esses dados evidenciam a existência pelo menos dois pontos de controles distintos das proteínas ZFP29 e ZFPTTP em diferentes etapas da metaciclogênese, podendo estes atuar nas UTRs dos transcritos de *zfp29* e *zfpttp* nas formas aderidas e na CDS e/ou própria proteína nos metacíclicos. Para avaliar o papel dos mRNAs de *zfp29* e *zfpttp* na regulação encontrada foram analisados os níveis dos transcritos das proteínas ZFP29 e ZFPTTP na metaciclogênese.

O transcrito de *zfp29* sofre uma redução abrupta de seus níveis no estágio metacíclico comparado aos demais estágios (figura 4.9). Esse dado corrobora com a ideia de que nas formas tripomastigotas metacíclicas a regulação da proteína ZFP29 seja mediada por elementos presentes na região codificadora de seu transcrito, que provavelmente promovem a sua desestabilização, tendo em vista a redução encontrada. Isso explica o fato do mesmo controle ter sido observado para a proteína transfectante. No entanto, nos parasitas aderidos o

mRNA de *zfp29* foi detectado em níveis semelhantes ao das formas epimastigotas, embora a proteína ZFP29 não seja expressa. Essa observação sugere que nesse estágio a regulação dessa proteína não seja dependente do níveis de mRNA, mas sim do controle exercido sobre a própria proteína. No entanto, a proteína ZFP29-FLAG está expressa em epimastigotas aderidos e por essa razão acredita-se que exista também outro mecanismo de controle envolvido atuando nos transcritos, provavelmente nas regiões UTRs.

Já os dados de expressão do mRNA de *zfpttp* revelaram que seu transcrito permanece expresso durante toda a metaciclogênese, evidenciando que a redução nos níveis de ZFPTTP visualizada nas formas metacíclicas não é consequência do controle da quantidade de seu transcrito nesse estágio (Figura 4.10). Com base nessa informação, especula-se que o controle observado nessa etapa possa ser oriundo de mecanismos regulatórios atuando na própria proteína ou na região codificadora do mRNA de *zfpttp*. Em ambas as situações explicaria o perfil de expressão apresentado pela proteína ZFPTTP-FLAG.

A partir dessas observações descritas tanto para ZFP29 quanto para ZFPTTP considerou-se que a regulação dessas proteínas pode estar ocorrendo das seguintes formas: (I) apesar dos mRNAs de *zfp29* e *zfpttp* estarem sendo traduzidos, existem mecanismos regulatórios atuando sobre as próprias proteínas no estágio metacíclico levando-as para degradação. (II) por meio do controle da tradução dos transcritos de *zfp29* e *zfpttp* nos estágios onde os mRNAs estão presentes, mas as proteínas estão sendo reguladas. Os dados sugerem que os elementos *cis* estão presentes na região codificadora desses transcritos.

Apesar da maior parte dos elementos *cis* serem encontrados nas regiões não traduzidas dos transcritos, existem relatos de mRNAs regulados através de sequências presentes em suas regiões codificadoras. Um exemplo é o caso do mRNA da proteína APP em humanos, que é regulada pelos fatores hnRNPc e FMRP que competem pelo mesmo elemento presente na região codificadora e têm influência na tradução desse transcrito. A sequência reconhecida por essas duas proteínas é composta por 120 nucleotídeos e é rica em G e A. Enquanto hnRNPc promove a tradução de APP, a proteína FMRP promove a

associação desse transcrito com corpos de processamento (*P-bodies*) de modo a reprimir a síntese da proteína APP (Lee et al. 2010).

Outro exemplo relatado foi o do mRNA de  $\alpha$ -tubulina no *T. cruzi*, que possui elementos regulatórios na região 3'UTR, mas também nos primeiros quatro códons da região codificadora, conforme visto por análises com gene repórter. Através de um mecanismo de auto regulação o mRNA de  $\alpha$ -tubulina é desestabilizado na presença de grandes quantidades de tubulina livre. Foi identificado uma sequência ARE de 44 nucleotídeos na região 3'UTR semelhante a encontrada em mamíferos que está bem descrita por promover a desestabilização. (Da Silva et al. 2006).

Foram também caracterizadas algumas proteínas que reconhecem elementos cis na região codificadora de seus transcritos alvos, como as já citadas hnRNPC e FMRP, além da proteína RBP42 (Lee et al. 2010; Das et al. 2012). A proteína RBP42 interage com mRNAs associados a polissomos no citoplasma. Através de análises de sequenciamento constatou-se que 94% das leituras mapeadas se encontravam na região codificadora dos transcritos associados a RBP42 e envolvidos com o metabolismo energético celular (Das et al. 2012).

Os dados provenientes de experimentos de *Ribosome Profiling* de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Smircich et al., 2015) forneceram importantes evidências acerca das hipóteses aqui levantadas. A identificação da associação dos transcritos de *zfp29* e *zfp2tp* com polissomos nas formas metacíclicas fortalece as duas suposições feitas anteriormente, uma vez que os mRNAs podem estar sendo traduzidos ou aprisionados pelos ribossomos. O perfil de mapeamento das *reads* ao longo do transcrito pode sugerir se a tradução daquele transcrito está ocorrendo ou não. Isso porque nessa técnica o mapeamento ocorre em regiões protegidas pelo ribossomo da digestão com RNases, logo, se existem regiões onde mais ribossomos foram encontrados no momento da digestão em relação a outras, pode ser um indicativo de que: (I) os ribossomos passam mais devagar ali e por essa razão tem maior chance de protegerem o mesmo segmento do transcrito; (II) os ribossomos podem estar parados naquela posição.

Ao analisar o perfil encontrado para ambos os transcritos em epimastigotas e metacíclicos, nota-se que há diferenças entre os estágios (Figuras 4.11 4.12).

Enquanto que em epimastigotas o mapeamento ocorreu por todo transcrito, nas formas metacíclicas houve a presença de um número menor de regiões mapeadas, concentradas na porção central e C-terminal do transcrito. Esse perfil foi semelhante ao encontrado para os transcritos de outras proteínas do *T. cruzi* como TcSof1, TcImp3, TcImp4 e TcDhr1. Para essas proteínas inferiu-se que o perfil encontrado corresponderia a um mecanismo de regulação na elongação da tradução (Bispo 2014). Os resultados encontrados mostram ainda que, de modo geral, os transcritos permanecem em níveis semelhantes, mas que a sua associação com os polissomos e a eficiência da tradução variam entre os diferentes estágios (Smircich et al. 2015).

Juntos esses dados suportam a hipótese levantada de que o mRNA de zfp29 está sendo regulado na etapa de tradução nas formas metacíclicas. Ainda, a redução dos níveis de mRNA de zfp29 nas formas tripomastigotas metacíclicas observada sugere que esteja ocorrendo a degradação desse transcrito nesse estágio. Logo esses dados apontam para a existência de diferentes mecanismos de controle que provavelmente atuam simultaneamente para controlar a expressão de ZFP29 e ZFPTTP.

A proteína ZFP29 apresentou-se citoplasmática num padrão disperso granular nas formas epimastigotas, mantendo essa característica quando os parasitas foram submetidos ao estresse nutricional.

A proteína ZFPTTP apresentou uma mudança na localização. Em epimastigotas foi citoplasmática num padrão granular disperso com uma maior concentração dessa proteína na periferia nuclear. Nos parasitas ao estressados e aderidos ao substrato, a proteína ZFPTTP aparentou migrar para o núcleo, de modo que a sua localização tornou-se tanto citoplasmática quanto nuclear. Já para a cepa transfectante contendo a proteína ZFPTTP-FLAG nos estágios de estresse e de adesão (nas primeiras 24 horas) a proteína recombinante não exibiu a aparente migração para o núcleo, observada para ZFPTTP. Dessa forma, é possível que a diferença encontrada na localização da proteína recombinante tenha influência na regulação diferenciada que essa apresenta em relação à nativa nas formas aderidas.

De modo geral, a localização das RBPs pode ser bem variada dentro de uma célula tendo em vista a ampla distribuição que suas moléculas alvos (RNAs) apresentam. Nos tripanossomatídeos já foram caracterizadas proteínas

citoplasmáticas que apresentam esse padrão de marcação citoplasmático granular e disperso como caso das proteínas DRBD3, TcZC3H39, TcRBP40, RBP42, RBP10 e ZC3H11 (Alves et al. 2014; Wurst et al. 2012; Das et al. 2012; Guerra-Slompo et al. 2012; Fernández-Moya et al. 2012).

Apesar de ser constitutivamente expressa na metaciclologênese TcZC3H39 apresentou alterações na sua localização ao longo desse processo, como o aumento dos grânulos observados para TcZC3H39 nos parasitas submetidos ao estresse. A proteína TcRBP40 exibe uma localização difusa no citoplasma e com um forte sinal nos reservossomos (organela de armazenamento encontrada exclusivamente nos *T. cruzi*) em epimastigotas. Quando os parasitas são submetidos ao estresse nutricional a marcação nos reservossomos é intensificada (Guerra-Slompo et al. 2012). A proteína DRBD3 encontra-se majoritariamente no citoplasma e quando submetida ao estresse oxidativo por arsenito de sódio migrou para o núcleo, ao passo que durante o estresse nutricional essa proteína foi encontrada acumulada em grânulos citosólicos (Fernández-Moya et al. 2012).

Foram também descritas proteínas RBPs nucleares nesses organismos, dentre as quais as proteínas PTB1, PTB2, TbRRM1, TcRRM2, PUF7 e PUF10 (Martins 2012; Schumann Burkard et al. 2013; Naguleswaran et al. 2015; Stern et al. 2009). Entre essas se destacam as proteínas TbRRM1 que apesar de nuclear em condições de homeostasia, quando o *T. brucei* é submetido a um estresse térmico altera sua localização para o citoplasma (Naguleswaran et al. 2015) e a proteína TcRRM2 que adquiriu uma marcação parcialmente citoplasmática após a inibição da síntese de RNA causada pela droga actinomicina D (Martins, 2012).

Desse modo os relatos de RBPs que alteram sua localização na presença de distintos estímulos de estresse reforçam a ideia de que ZFPTTP possa estar migrando para o núcleo durante a metaciclologênese. Foram feitas buscas de predição de sinal de endereçamento nuclear na sequência de ZFPTTP, porém os resultados obtidos não encontraram uma sequência evidente (dados não mostrados). Isso não descarta que exista uma sequência de localização nuclear nessa proteína, mas levanta a possibilidade da proteína ZFPTTP ser direcionada ao núcleo através da interação com outros fatores (mRNAs ou

proteínas). Contudo a localização de ZFPTTP nesse compartimento ainda deve ser confirmada.

A marcação num padrão granular citoplasmática de RBPs tem suportado evidências de que essas proteínas estejam associadas a grânulos de RNAs, conforme observado para TcZC3H39 e DRBD3 (Alves et al. 2014; Fernández-Moya et al. 2012). Dentre esses grânulos estão os grânulos de estresse e os corpos de processamento (*P-bodies*), que apresentam um importante papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica por serem capazes de modular o destino dos RNAs contidos neles, promovendo a sua degradação, estocagem, seleção para a tradução e transporte dentro da célula (Kramer 2014; Decker & Parker 2012). No *T. cruzi* já foram relatadas a presença de RBPs em grânulos de RNA contendo a proteína TcDHH1, a qual está presente em grânulos que compartilham semelhanças com grânulos de estresse (Holetz et al. 2007).

A expressão de ZFP29-FLAG não apresentou alterações no crescimento quando esse foi comparado aos controles (parasita selvagem e parasita GFP-FLAG) (Gráfico 4.1), sugerindo que a proteína ZFP29 provavelmente não está afetando o crescimento. Já para os parasitas ZFPTTP-FLAG foi encontrado um aumento de seu crescimento nos terceiro e quinto dias (Gráfico 4.2), indicando que essa proteína pode estar modulando positivamente o metabolismo do parasita.

Na literatura estão descritos casos em que RBPs interferem no crescimento de *T. brucei*, como as proteínas RBP42, PTB1, PTB2 e RRM1 (Das et al. 2012; Stern et al. 2009; Naguleswaran et al. 2015). Para essas quatro proteínas observou-se que o seu nocaute induzido por RNAi (RNA *interference*) provocou reduções no crescimento do parasita. Por outro lado, no caso da proteína TbZC3H13, a sua superexpressão promoveu a inibição no crescimento das formas procíclicas (Ouna et al. 2012).

Quando analisado o perfil de diferenciação dos parasitas transfectantes foi observado que para ZFP29-FLAG houve um aumento do número de parasitas no sobrenadante das garrafas no segundo dia da diferenciação em relação aos controles (Gráfico 4.3). No terceiro dia, no entanto, essa quantidade de parasitas foi semelhante à encontrada no segundo dia e menor do que a observada na cultura selvagem. Como no processo de diferenciação *in vitro* o

pico de liberação das formas tripomastigotas metacíclicos é a partir de 72 horas (Contreras et al. 1985; Bonaldo et al. 1988), esse perfil obtido para a cultura transfectante ZFP29-FLAG indica que houve uma antecipação desse processo. Tendo em vista que tanto as formas epimastigotas quanto as tripomastigotas metacíclicas foram alteradas nesses tempos da diferenciação (segundo e terceiro dia – gráfico 4.4), especulou-se que na cultura transfectante ZFP29-FLAG essa mudança observada poderia ser consequência de alguma alteração no processo de adesão das células.

A cultura expressando ZFPTTP-FLAG apresentou diferenças apenas na quantidade de formas epimastigotas encontradas nos segundo e terceiro dias da metaciclogênese (Gráfico 4.6). No período de 48 horas o número de epimastigotas ZFPTTP-FLAG foi superior ao exibido pelo controle, enquanto que no terceiro dia (72 horas) encontrou-se diminuído em relação ao parasita selvagem. Esse fato, aliado com o dado que o número de parasitas transfectantes no sobrenadante (sem distinção de formas) foi equivalente ao parasita selvagem durante a metaciclogênese, sugere que esse processo de diferenciação está alterado nos parasitas ZFPTTP-FLAG. Dessa forma, é possível que a presença dessas proteínas promova distúrbios no decorrer da diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, o que fornece um indício da razão pela qual ZFP29 e ZFPTTP são reguladas na metaciclogênese.

O envolvimento de RBPs na diferenciação já foi observado nos tripanossomatídeos como no caso da proteína TbZFP2, onde o silenciamento de seu gene gênico afetou a diferenciação das formas sanguíneas em procíclicas do *T. brucei* (Hendriks et al. 2001). Outra proteína que apresentou um fenótipo semelhante ao de TbZFP2, inibindo a diferenciação do estágio sanguíneo para o procíclico foi ZC3H18 (Benz et al. 2011). Já para o *T. cruzi*, parasitas nocauteados para TcZC3H31 foram incapazes de se diferenciar em formas tripomastigotas metacíclicas, enquanto que a superexpressão dessa proteína aumentou a quantidade de formas metacíclicas observadas (Alcantara 2014).

Na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG foram identificadas duas proteínas enriquecidas exclusivamente (Tabela 4.1), KMP-11 (TcCLB.508413.68) e uma cadeia pesada de dineína (TcCLB.506679.110). A proteína KMP-11 associa-se



com o citoesqueleto e está presente no citoplasma, flagelo, cinetoplasto, e revestindo o *T. cruzi* (Diez et al. 2008; Thomas et al. 2000). Os poucos dados existentes para as dineína de cadeia pesada em tripanossomatídeos apontam sua importância na mobilidade flagelar (Springer et al. 2011). Como a proteína ZFP29 possui uma localização citoplasmática por todo o corpo do parasita, incluindo o flagelo é possível que elas interajam.

Já na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG foi observado o enriquecimento de seis proteínas (Tabela 4.2). Entre essas se destaca a identificação da subunidade beta-3 do proteassomo (TcCLB.506779.50). Os proteassomos são grandes complexos proteicos cuja função é degradar proteínas consideradas desnecessárias ou danificadas (Rubin & Finley 1995; Hochstrasser 1995).

Desse modo, a interação da proteína ZFPTTP (possivelmente mediada pelo domínio DNAJ) com uma subunidade desse complexo é extremamente interessante, pois pode sugerir que essa proteína pode estar envolvida nessa via de degradação. De fato em trabalho publicado por Cardoso e colaboradores (2008) observou-se que proteassomos estão ativos durante a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas e quando inibidos, ocorre a parada da replicação e diferenciação do *T. cruzi* (Cardoso et al. 2008).

A identificação dos mRNAs associados as proteínas ZFP29 e ZFPTTP em epimastigotas e nos parasitas submetidos a estresse apresentou resultados bem distintos para essas proteínas. A correlação entre os transcritos identificados associados a ZFP29 em epimastigotas e nos parasitas submetidos ao estresse foi baixa (Gráfico 4.15) indicando que o repertório dos mRNAs associados a essa proteína nessas duas condições é bem distinto.

As análises por termos de GO (*Gene Ontology*) apresentaram um enriquecimento de termos relacionados a atividade quinase, processos metabólicos e componentes celulares, estando esses mais representados no estresse (Gráfico 4.13 e 4.14). No estresse também foram encontrados transcritos referentes à proteínas envolvidas na oxi-redução (Tabela 4.6). Esse dado foi semelhante ao que encontrado para a proteína TcZC3H39 que se associa a mRNAs dos complexos citocromo c oxidase VI, VIII e IX e oxoglutarato desidrogenase somente na condição de estresse alterando a estabilidade desses transcritos (Alves et al. 2014). Foram também identificados três mRNAs anotados como cadeia pesada de dineína associados a ZFP29 em

epimastigotas, sendo um dos IDs (TcCLB.506679.110) o mesmo da proteína candidata a parceira de ZFP29. A análise dos mRNAs imunoprecipitados com a proteína TcZFP2 também teve a identificação de transcritos correspondentes a dineína (Mörking et al. 2012). Um dos mecanismos de controle do mRNA é através da sua localização na célula, por meio da associação de complexos mRNPs com o citoesqueleto e as proteínas motoras a ele associadas, como as dineínas (Shahbadian & Chartrand 2012). Um exemplo da participação de proteínas motoras como dineína no controle da localização de mRNAs específicos é o encontrado nos oócitos de *Drosophila*. Nesse organismo, durante a oogênese, ocorre a formação dos eixos embrionários através da polarização de diferentes mRNAs em distintas regiões do oócito (Schnorrer et al. 2000). Foi encontrado que a mobilização de alguns desses mRNAs, como os que codificam para as proteínas Bicoide e Swallow é feita através do transporte desses transcritos pela proteína motora dineína, que os direciona para o polo anterior do oócito (Schnorrer et al. 2000). A mesma interação com dineína foi observada para o mRNA de *grk* (*gurken*) que é transportado primeiramente para a região anterior, e posteriormente direcionado para o núcleo na porção dorsal. Em ambas situações os autores relataram a dependência da dineína para realizar esse transporte (MacDougall et al. 2003).

Para ZFPTTP grande parte dos transcritos identificados codifica para proteínas ribossomais em ambas as condições. Dos transcritos encontrados em epimastigotas e no estresse, 112 são comuns as duas condições, enquanto que 40 foram identificados exclusivamente em epimastigotas e 46 no estresse (Gráfico 4.18).

A quantidade de transcritos que codificam para proteínas ribossomais encontrados se associando a ZFPTTP em epimastigotas e no estresse sugere que essa proteína desempenhe algum papel relacionado à tradução. A interação com mRNAs de proteínas ribossomais também foi observada para outras RBPs, como o caso das proteínas TcZC3H39, TbDRBD3 e TcZFP2 (Alves et al. 2014; Fernández-Moya et al. 2012; Mörking et al. 2012). A proteína TcZC3H39 interage com ao mRNA que codifica para a proteína ribossomal L9 em epimastigotas e no estresse, sendo que na condição de estresse TcZC3H39 promove a desestabilização desse transcrito (Alves et al. 2014).

Quanto ao papel de ZFP29 e ZFPTTP, foi observado que a proteína ZFP29 se associa com transcritos relacionados a processos metabólicos diversos, além de mRNAs que codificam para proteínas motoras e de membrana. Apesar dos termos enriquecidos terem sido comuns entre essas duas condições a população de transcritos encontrados é bem distinta, apontando que a proteína ZFP29 possui uma interação dinâmica. Ao analisar os transcritos associados a ZFPTTP-FLAG notou-se um grande enriquecimento de mRNAs que codificam para proteínas ribossomais tanto em epimastigota quanto no estresse, sugerindo um envolvimento de ZFPTTP no controle da tradução. Tendo em vista que as formas epimastigotas expressando ZFPTTP-FLAG apresentaram um aumento no crescimento, é possível que, ao menos nesse estágio, essa proteína esteja modulando positivamente a tradução.

## 6. CONCLUSÃO

As proteínas ZFP29 e ZFPTTP são reguladas durante a metaciclogênese em pontos distintos: ZFP29 é expressa apenas nas formas epimastigotas e durante o estresse nutricional; ZFPTTP sofre uma redução em seus níveis proteicos nas formas aderidas. Ambas estão ausentes nas formas tripomastigotas metacíclicas.

Foram obtidos parasitas transfectantes expressando as proteínas ZFP29 e ZFPTTP fusionadas à etiqueta FLAG.

A expressão das proteínas ZFP29-FLAG e ZFPTTP-FLAG apresentou um perfil diferente do encontrado para as proteínas nativas, não tendo sido observada a regulação negativa no estágio dos parasitas aderidos. No entanto, o controle da expressão das proteínas ZF29 e ZFPTTP recombinantes nas formas tripomastigotas metacíclicas permaneceu, estando ZFP29-FLAG expressa em níveis drasticamente reduzidos e ZFPTTP-FLAG ausente.

O mRNA de ZFP29 encontra-se em menores níveis de expressão nas formas tripomastigotas metacíclicas. Já o transcrito de ZFPTTP permanece em níveis constantes durante a metaciclogênese.

A imunolocalização da proteína ZFP29 é citoplasmática dispersa por todo o corpo do parasita num padrão granular.

A proteína ZFPTTP localiza-se no citoplasma de epimastigotas num padrão granular e mais concentrado ao redor do núcleo. Quando os parasitas são submetidos ao estresse e nos parasitas aderidos a marcação de ZFPTTP parece estar alterada.

Os parasitas transfectantes expressando a proteína ZFP29-FLAG não apresentaram modificações no crescimento. No, entanto, foi observado alterações na diferenciação desses parasitas estando o número de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos alterado em relação aos controles.

As formas epimastigotas expressando a proteína ZFPTTP-FLAG parece ter afetado positivamente o crescimento do parasita e também alterou o número de formas epimastigotas encontrados durante a diferenciação.

A partir do sequenciamento dos transcritos imunoprecipitados com ZFP29-FLAG em epimastigotas e no estresse foram encontrados 260 e 296 mRNAs enriquecidos, respectivamente. Os mRNAs identificados nessas duas condições constituem populações distintas compostas em sua maioria por transcritos que codificam proteínas hipotéticas.

O sequenciamento dos mRNAs imunoprecipitados com ZFPTTP-FLAG apresentou que 150 transcritos em epimastigotas e 156 no estresse estavam enriquecidos. Desses, grande parte em epimastigotas e a maioria no estresse codificam para proteínas ribossomais e são comuns aos dois estágios.

## 7. REFERÊNCIAS

- Alcantara, M.V., 2014. **Caracterização da Proteína TcZC3H31 de Trypanosoma cruzi, uma CCCH Zinc Finger Essencial para a Metaciclologênese.** Tese de Doutorado. 2014. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Alcantara, M.V., Fragoso, S.P. & Assine Picchi, G.F., 2014. **Knockout confirmation for hurries: Rapid genotype identification of trypanosoma cruzi transfectants by polymerase chain reaction directly from liquid culture.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(4), pp.511–513.
- Alves, L.R., 2010. **Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas ( mRNPs ) em Trypanosoma cruzi.** Tese de Doutorado. 2010. Instituto Oswaldo Cruz, Curitiba.
- Alves, L.R. et al., 2014. **The mRNAs associated to a zinc finger protein from Trypanosoma cruzi shift during stress conditions** *RNA Biology* 11(7), pp.921–933.
- Alves, L.R. & Goldenberg, S., **RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa.** *World Journal of Biological Chemistry (in press)*.
- Aravind, L., Iyer, L.M. & Anantharaman, V., 2003. **The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism.** *Genome Biol*, 4(10), p.R64.
- Archer, S.K. et al., 2009. **Trypanosoma brucei PUF9 Regulates mRNAs for Proteins Involved in Replicative Processes over the Cell Cycle.** *PLoS Pathogens*, 5(8), p.e1000565.
- Aslett, M. et al., 2010. **TriTrypDB: a functional genomic resource for the**

**Trypanosomatidae.** *Nucleic Acids Research*, 38(Database), pp.D457–D462.

Assche, E.V. et al., 2015. **RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria.** *Frontiers in microbiology*, 6(March), p.141.

Ávila, A.R. et al., 2003. **Stage-specific gene expression during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.** *Genetics and Molecular Research*, 2(1), pp.159–168.

Baggerly, K.A. et al., 2003. **Differential expression in SAGE : accounting for normal between-library variation.** *Bioinformatics*, 19(12), pp.1477–1483.

Bangs, J.D. et al., 1992. **Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides.** *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), pp.9805–9815.

Batista, M. et al., 2010. **A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi.** *BMC Microbiology*, 10(1), p.259. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/259>.

Bell, S.D. et al., 2002. **The Interaction of Alba , a Conserved Archaeal Chromatin Protein , with Sir2 and Its Regulation by Acetylation. ,** 296(2002), pp.148–151.

Benjamini, Y. & Yekutieli, D., 2001. **The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency.** *The Annals of Statistics*, 29(4), pp.1165–1188.

Benz, C. et al., 2011. **The Trypanosoma brucei zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 177(2), pp.148–151.

- Bispo, S., 2014. **Regulação da expressão do gene *TcSof1* em *Trypanosoma cruzi***. Tese de Doutorado. 2014. Instituto Carlos Chagas, Curitiba.
- Blackshear, P.J. et al., 2003. **Characteristics of the interaction of a synthetic human tristetraprolin tandem zinc finger peptide with AU-rich element-containing RNA substrates.** *The Journal of biological chemistry*, 278(22), pp.19947–55.
- Blackshear, P.J., 2002. **Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover.** *Biochemical Society Transactions*, 30(Pt 6), pp.945–952.
- Blackshear, P.J. & Perera, L., 2014. **Phylogenetic Distribution and Evolution of the Linked RNA-Binding and NOT1-Binding Domains in the Tristetraprolin Family of Tandem CCCH Zinc Finger Proteins.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(4), pp.297–306.
- Bonaldo, M.C. et al., 1988. **Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation.** *The Journal of cell biology*, 106(4), pp.1349–58.
- Brayer, K.J. & Segal, D.J., 2008. **Keep Your Fingers Off My DNA: Protein–Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains.** *Cell Biochemistry and Biophysics*, 50(3), pp.111–131.
- Brewer, B.Y. et al., 2004. **RNA Sequence Elements Required for High Affinity Binding by the Zinc Finger Domain of Tristetraprolin: CONFORMATIONAL CHANGES COUPLED TO THE BIPARTITE NATURE OF AU-RICH mRNA-DESTABILIZING MOTIFS.** *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), pp.27870–27877.
- Brooks, S.A. & Blackshear, P.J., 2013. **Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action.** *Biochimica et biophysica acta*, 1829(6-7), pp.666–79.



- Brown, R.S., 2005. **Zinc finger proteins: getting a grip on RNA.** *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1), pp.94–98.
- Burd, C.G. & Dreyfuss, G., 1994. **Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins.** *Science*, 265.
- Bustin, S.A. et al., 2009. **The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical Chemistry*, 55(4), pp.611–622.
- Camargo, E., 1964. **Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi.** *Rev Inst Med São Paulo*, 6, pp.93–100.
- Carballo, E., Gilkeson, G.S. & Blakeshear, P.J., 1997. **Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNFalpha overproduction.** *The Journal of clinical investigation*, 100(5), pp.986–95.
- Carballo, E., Lai, W.S. & Blakeshear, P.J., 1998. **Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin.** *Science*, 281(August), pp.1001–5.
- Cardoso, J. et al., 2008. **Inhibition of proteasome activity blocks Trypanosoma cruzi growth and metacyclogenesis.** *Parasitology Research*, 103(4), pp.941–951.
- Caro, F. et al., 2005. **Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of Trypanosoma cruzi : Implications for their functions.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, pp.1017–1025.
- Caro, F. et al., 2006. **Trypanosoma cruzi: Analysis of the complete PUF RNA-binding protein family.** *Experimental Parasitology*, 113(2), pp.112–

124.

Cavalier-Smith, T., 1981. **Eukaryote kingdoms: seven or nine?** *Bio Systems*, 14(3-4), pp.461–481.

Chagas, C., 1909. **Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp.159–218.

Chen, C.Y. et al., 2001. **AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.** *Cell*, 107(4), pp.451–464.

Chen, Y. & Varani, G., 2005. **Protein families and RNA recognition.** *The FEBS journal*, 272(9), pp.2088–97.

Cheng, Y. et al., 2003. **Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1 act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*.** *Developmental Cell*, 4(1), pp.53–66.

Clayton, C., 2013. **The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins.** *PLoS Pathogens*, 9(11), pp.9–12.

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

Clayton, C.E., 2002. **Life without transcriptional control? From fly to man and back again.** *The EMBO journal*, 21(8), pp.1881–8.

Cléry, A., Blatter, M. & Allain, F.H.T., 2008. **RNA recognition motifs: boring? Not quite.** *Current Opinion in Structural Biology*, 18(3), pp.290–298.

Contreras, V.T. et al., 1988. **Biological aspects of the Dm 28c clone of**

**Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1), pp.123–133.

Contreras, V.T., Salles, J.M., et al., 1985. **In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions.** *Molecular and biochemical parasitology*, 16, pp.315–327.

Contreras, V.T., Morel, C.M. & Goldenberg, S., 1985. **Stage specific gene expression precedes morphological changes during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.** *Molecular and biochemical parasitology*, 14(1), pp.83–96.

Das, a. et al., 2012. **The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in Trypanosoma brucei energy metabolism.** *Rna*, 18(11), pp.1968–1983.

Decker, C.J. & Parker, R., 2012. **P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9).

Dias, J.C.P., Silveira, a C. & Schofield, C.J., 2002. **The impact of Chagas disease control in Latin America: a review.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), pp.603–12.

Diez, H. et al., 2008. **Cellular location of KMP-11 protein in Trypanosoma rangeli.** *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 8(1), pp.93–96.

Dominski, Z. et al., 2002. **A novel zinc finger protein is associated with U7 snRNP and interacts with the stem – loop binding protein in the histone pre-mRNP to stimulate 3' -end processing.** *Genes & Development*, pp.58–71.

Dostálová, A. & Volf, P., 2012. **Leishmania development in sand flies:**

**parasite-vector interactions overview.** *Parasites & Vectors*, 5(1), p.276.

Edwards, T.A. et al., 2001. **Structure of Pumilio Reveals Similarity between RNA and Peptide Binding Motifs.** *Cell*, 105(2), pp.281–289.

Fernández-Moya, S.M. et al., 2012. **Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in Trypanosoma brucei.** *PLoS ONE*, 7(11), pp.1–10.

Fernández-Moya, S.M. & Estévez, A.M., 2010. **Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites.** *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*, 1(1).

Figueiredo, R.C., Rosa, D.S. & Soares, M.J., 2000. **Differentiation of Trypanosoma cruzi epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress.** *The Journal of parasitology*, 86(6), pp.1213–1218.

Fraidenraich, D. et al., 1993. **Stimulation of Trypanosoma cruzi adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from Triatoma hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp.10140–10144.

Frankel, a D., Berg, J.M. & Pabo, C.O., 1987. **Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(July), pp.4841–4845.

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

- De Gaudenzi, J.G. et al., 2013. **Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes.** *PeerJ*, 1, p.e118.
- Glisovic, T. et al., 2008. **RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation.** *FEBS letters*, 582(14), pp.1977–86.
- Guerra-Slompo, E.P. et al., 2012. **Molecular characterization of the Trypanosoma cruzi specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), pp.302–307.
- Guo, R., Xue, H. & Huang, L., 2003. **Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo.** *Molecular Microbiology*, 50, pp.1605–15.
- Hall, T.M.T., 2005. **Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins.** *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3 SPEC. ISS.), pp.367–373.
- Hanas, J.S. et al., 1983. **Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene.** *The Journal of biological chemistry*, 258(23), pp.14120–14125.
- Heath, S., Hieny, S. & Sher, a, 1990. **A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of Trypanosoma cruzi.** *Molecular and biochemical parasitology*, 43(1), pp.133–141.
- Hendriks, E.F. et al., 2001. **A novel CCCH protein which modulates differentiation of Trypanosoma brucei to its procyclic form.** *The EMBO journal*, 20(23), pp.6700–11.
- Hochstrasser, M., 1995. **Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of**

**intracellular protein degradation.** *Current Opinion in Cell Biology*, 7(2), pp.215–223.

Holetz, F.B. et al., 2007. **Evidence of P-body-like structures in Trypanosoma cruzi.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4), pp.1062–1067.

Hudson, B.P. et al., 2004. **Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d.** *Nature structural & molecular biology*, 11(3), pp.257–264.

Jimenez, V., 2014. **Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in Trypanosoma cruzi.** *Res Microbiol*, 165(3), pp.155–165.

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

Kersey, P., 2004. **Integr8 and Genome Reviews: integrated views of complete genomes and proteomes.** *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), pp.D297–D302.

Kleffmann, T. & Schaub, G.A., 1998. **Attachment of Trypanosoma cruzi Epimastigotes to Hydrophobic Substrates and Use of this Property to Separate Stages and Promote Metacyclogenesis.** *J. Euk. Microbiol.*, 45, pp.548–555.

Klug, a & Schwabe, J.W., 1995. **Zinc fingers.** *The FEBS journal*, 9(8), pp.597–604.

Kolev, N.G. et al., 2012. **Developmental Progression to Infectivity in Trypanosoma brucei Triggered by an RNA-Binding Protein.** *Science*, 338(6112), pp.1352–1353.

Kolev, N.G., Ullu, E. & Tschudi, C., 2014. **The emerging role of RNA-binding**

- proteins in the life cycle of *T. brucei*.** *Cellular Microbiology*, 16(4), pp.482–489.
- Kollien, A.H. & Schaub, G. a., 2000. **The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae.** *Parasitology Today*, 16(9), pp.381–387.
- Kramer, S., 2011. **Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2), pp.61–72.
- Kramer, S., 2014. **RNA in development: How ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(2), pp.263–284.
- Kramer, S. & Carrington, M., 2011. **Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids.** *Trends in Parasitology*, 27(1), pp.23–30.
- Kramer, S., Kimblin, N.C. & Carrington, M., 2010. **Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*.** *BMC genomics*, 11, p.283.
- Krishna, S.S., 2003. **Structural classification of zinc fingers.** *Nucleic Acids Research*, 31(2), pp.532–550.
- Lai, W.S. et al., 2000. **Interactions of CCCH Zinc Finger Proteins with mRNA: BINDING OF TRISTETRAPROLIN-RELATED ZINC FINGER PROTEINS TO AU-RICH ELEMENTS AND DESTABILIZATION OF mRNA.** *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), pp.17827–17837.
- Laity, J.H., Lee, B.M. & Wright, P.E., 2001. **Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity.** *Current Opinion in Structural Biology*, 11(1), pp.39–46.

- Lee, B.M. et al., 2006. **Induced Fit and “Lock and Key” Recognition of 5S RNA by Zinc Fingers of Transcription Factor IIIA.** *Journal of Molecular Biology*, 357(1), pp.275–291.
- Lee, E.K. et al., 2010. **hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies.** , 17(6), pp.732–739.
- Liang, X.H. et al., 2003. **trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation.** *Eukaryotic Cell*, 2(5), pp.830–840.
- Ling, A.S., Trotter, J.R. & Hendriks, E.F., 2011. **A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes.** *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), pp.20152–20162.
- Longo, D.L. & Bern, C., 2015. **Chagas’ Disease.** *New England Journal of Medicine*, 373(5), pp.456–466.
- Lunde, B.M., Moore, C. & Varani, G., 2007. **RNA-binding proteins: modular design for efficient function.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(6), pp.479–490.
- Luu, V.D. et al., 2006. **Functional analysis of Trypanosoma brucei PUF1.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(2), pp.340–349.
- MacDougall, N. et al., 2003. **Drosophila gurken (TGF $\alpha$ ) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps.** *Developmental Cell*, 4, pp.307–319.
- Mackay, J.P. & Crossley, M., 1998. **Zinc fingers are sticking together.** *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1), pp.1–4.
- Magrane, M. & Consortium, U.P., 2011. **UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data.** *Database*, 2011, pp.1–13.



- Mani, J. et al., 2011. **Alba-domain proteins of Trypanosoma brucei are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery.** *PloS one*, 6(7), p.e22463.
- Martínez-Calvillo, S. et al., 2010. **Gene Expression in Trypanosomatid Parasites.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, pp.1–15.
- Martins, S.T., 2012. **Caracterização da Proteína TcRRM2 de Trypanosoma cruzi: Envolvimento na Regulação da Expressão Gênica e Resposta a Estresse.** Dissertação de Mestrado. 2012. Instituto Carlos Chagas, Curitiba.
- Matthews, J.M. & Sunde, M., 2002. **Zinc Fingers — Folds for Many Occasions.** *IUMB Life*, 54, pp.351–355.
- Matthews, K.R., 1999. **Developments in the differentiation of Trypanosoma brucei.** *Parasitology Today*, 15(2), pp.76–80.
- McBride, A.E. et al., 2005. **Arginine Methylation of Yeast mRNA-binding Protein Npl3 Directly Affects Its Function, Nuclear Export, and Intranuclear Protein Interactions.** *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), pp.30888–30898.
- Miller, J., McLachlan, a. D. & Klug, A., 1985. **Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes.** *The EMBO Journal*, 4(6), pp.1609–1614.
- Miller, M. a & Olivas, W.M., 2011. **Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation.** *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(4), pp.471–92.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013.** Boletim

Epidemiológico, 46.

Mörking, P. a. et al., 2012. **The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6), pp.790–799.

Mörking, P.A. et al., 2004. **TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of Trypanosoma cruzi that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro.** *Biochemical and biophysical research communications*, 319(1), pp.169–77.

Mortazavi, A. et al., 2008. **Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq.** *Nature methods*, 5(7), pp.621–628.

Myung, K.S. et al., 2002. **Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of Leishmania chagasi.** *The Journal of biological chemistry*, 277(19), pp.16489–97.

Naguleswaran, A. et al., 2015. **Trypanosoma brucei RRM1 Is a Nuclear RNA-Binding Protein and Modulator of Chromatin Structure.** *mBio*, 6(2), pp.e00114–15.

Nardelli, S.C. et al., 2007. **Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of Trypanosoma cruzi.** *Eukaryotic Cell*, 6(2), pp.337–345.

Noé, G., De Gaudenzi, J.G. & Frasch, A.C., 2008. **Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes.** *BMC molecular biology*, 9, p.107.

Nogueira, N., Bianco, C. & Cohn, Z., 1975. **Studies on the Selective Lysis and Purification of Trypanosoma cruzi.** *The journal of experimental medicine*, 142, pp.224–229.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde, 2009. **Doença de Chagas. Guia para vigilância , prevenção, controle e manejo clínico da doença e chagas aguda transmitida por alimentos.**

Ouellette, M. & Papadopoulou, B., 2009. **Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes.** *Journal of biology*, 8(11), p.100.

Ouna, B.A. et al., 2012. **The Trypanosoma brucei CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183(2), pp.184–188.

Pastro, L. et al., 2013. **Implication of CA repeated tracts on post-transcriptional regulation in trypanosoma cruzi.** *Experimental Parasitology*, 134(4), pp.511–518.

Pavletich, N.P. & Pabo, C., 1991. **Zinc Structure of a Recognition : Complex Zif268-DNA.** *Advancement Of Science*, 252(5007), pp.809–817.

Pfaffl, M.W., 2001. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.

Preußner, C., Jaé, N. & Bindereif, A., 2012. **mRNA splicing in trypanosomes.** *International Journal of Medical Microbiology*, 302(4-5), pp.221–224.

Queiroz, R. et al., 2009. **Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons.** *BMC Genomics*, 10(1), p.495.

Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A., 2010. **Chagas disease.** *The Lancet*, 375(9723), pp.1388–1402.

Romagnoli, B.A.A., 2013. **CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ZFP11 , ZFP29 E ZFPTTP EM Trypanosoma cruzi.** Monografia. Universidade

Federal do Paraná, Curitiba.

Rubin, D.M. & Finley, D., 1995. **Proteolysis: The proteasome: a protein-degrading organelle?** *Current Biology*, 5(8), pp.854–858.

Schnorrer, F., Bohmann, K. & Nüsslein-Volhard, C., 2000. **The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes.** *Nature cell biology*, 2(4), pp.185–190.

Schumann Burkard, G. et al., 2013. **Nucleolar proteins regulate stage-specific gene expression and ribosomal RNA maturation in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular Microbiology*, 88(4), pp.827–840.

Schwanhäusser, B. et al., 2011. **Global quantification of mammalian gene expression control.** *Nature*, 473(7347), pp.337–342.

Shahbadian, K. & Chartrand, P., 2012. **Control of cytoplasmic mRNA localization.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(4), pp.535–552.

Siegel, T.N. et al., 2010. **Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites.** *Nucleic Acids Research*, 38(15), pp.4946–4957.

Da Silva, R. a., Bartholomeu, D.C. & Teixeira, S.M.R., 2006. **Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *International Journal for Parasitology*, 36, pp.87–96.

Smircich, P. et al., 2015. **Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *BMC Genomics*, 16(1), p.443.

De Souza, W., 2002. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Current pharmaceutical design*, 8, pp.269–285.

- Spassov, D. & Jurecic, R., 2003. **The PUF Family of RNA-binding Proteins: Does Evolutionarily Conserved Structure Equal Conserved Function?** *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 55(7), pp.359–366.
- Springer, A.L. et al., 2011. **Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immotility in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular Biochemical Parasitology*, 175(1), pp.68–75.
- Stern, M.Z. et al., 2009. **Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism.** *Rna*, 15(4), pp.648–665.
- Subota, I. et al., 2011. **ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation.** *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), pp.4205–4219.
- Taylor, G. a. et al., 1996. **A pathogenetic role for TNF $\alpha$  in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency.** *Immunity*, 4(5), pp.445–454.
- Thomas, M.C. et al., 2000. **Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level.** *DNA and cell biology*, 19(1), pp.47–57.
- Thomson, E., Rappsilber, J. & Tollervey, D., 2007. **Nop9 is an RNA binding protein present in pre-40S ribosomes and required for 18S rRNA synthesis in yeast.** *RNA (New York, N.Y.)*, 13(12), pp.2165–74.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), pp.4350–4353.

- Tyler, K.M. & Engman, D.M., 2001. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), pp.472–481.
- Walrad, P.B. et al., 2012. **The post-transcriptional trans-acting regulator, TbZFP3, co-ordinates transmission-stage enriched mRNAs in *Trypanosoma brucei*.** *Nucleic Acids Research*, 40(7), pp.2869–2883.
- Wang, D. et al., 2008. **Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice.** *BMC genomics*, 9, p.44.
- Wang, X., Zamore, P.D. & Tanaka Hall, T.M., 2001. **Crystal structure of a Pumilio homology domain.** *Molecular Cell*, 7(4), pp.855–865.
- Wardleworth, B.N. et al., 2002. **Structure of Alba: An archaeal chromatin protein modulated by acetylation.** *EMBO Journal*, 21(17), pp.4654–4662.
- Wei, S. et al., 2013. **Emerging roles of zinc finger proteins in regulating adipogenesis.** *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(23), pp.4569–84.
- WHO, World Health Organization, 2015. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** , 340, pp.11–14.
- Wickens, M. et al., 2002. **A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life.** *Trends in Genetics*, 18(3), pp.150–157.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L. & Pabo, C.O., 2000. **Dna Recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins.** , pp.183–212.
- Wurst, M. et al., 2012. **Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream-form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular Microbiology*, 83(February), pp.1048–1063.

Ye, J. et al., 2012. **Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.** *BMC Bioinformatics*, 13(1), p.134.

Zamudio, J.R. et al., 2009. **Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation.** *Molecular Microbiology*, 72(5), pp.1100–1110.

## 8. ANEXOS

Tabela 4.5. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG em epimastigotas. (Fold Change >4; FDR < 0,01).

	Identificação (TriTrypDB)	Descrição	Fold Change	FDR	Média Experimento	Média Controle
1	TcCLB.473703.10	surface protease GP63, putative	2670,36	3,72E-15	18825,86	7,05
2	TcCLB.510073.75	hypothetical protein, conserved	1927,36	0,001476	1927,36	0,00
3	TcCLB.505025.80	hypothetical protein, conserved	1744,68	3,73E-21	2195,85	1,26
4	TcCLB.508437.10	hypothetical protein	1441,97	6,15E-21	1441,97	0,00
5	TcCLB.504505.20	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1281,01	2,51E-35	1281,01	0,00
6	TcCLB.506173.60	mucin-associated surface protein (MASP), putative	1015,11	2,62E-08	934,59	0,92
7	TcCLB.511605.5	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	868,02	0	6195,32	7,14
8	TcCLB.510275.405	hypothetical protein	836,95	6,15E-21	836,95	0,00
9	TcCLB.505193.50	hypothetical protein	818,99	2,2E-121	758,18	0,93
10	TcCLB.508243.36	hypothetical protein	818,99	2,2E-121	923,56	1,13
11	TcCLB.504233.50	hypothetical protein, conserved	712,30	7,03E-21	1628,35	2,29



12	TcCLB.511895.40	hypothetical protein	712,30	7,16E-21	248,82	0,35
13	TcCLB.510015.10	hypothetical protein	712,30	7,03E-21	1190,88	1,67
14	TcCLB.508853.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	661,85	6,15E-21	661,85	0,00
15	TcCLB.507609.150	hypothetical protein (pseudogene)	658,65	1,35E-07	1456,16	2,21
16	TcCLB.505171.20	hypothetical protein	617,31	0,001476	617,31	0,00
17	TcCLB.505971.20	hypothetical protein	614,25	2,5E-121	1575,69	2,57
18	TcCLB.509751.28	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	532,37	1,05E-13	44725,31	84,01
19	TcCLB.509363.31	hypothetical protein	525,23	9E-122	525,23	0,00
20	TcCLB.507071.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	524,06	0,001476	524,06	0,00
21	TcCLB.510799.60	mucin TcMUCII, putative	516,19	0,001518	568,73	1,10
22	TcCLB.509197.10	cation transporter, putative	516,19	0,001518	345,54	0,67
23	TcCLB.511151.50	phosphoadenosine phosphosulfate reductase-like protein, putative	516,19	0,001518	475,24	0,92
24	TcCLB.510635.50	zinc-binding phosphatase, putative, Myotubularin-related protein, putative	516,19	0,001518	198,02	0,38
25	TcCLB.506337.190	hypothetical protein, conserved	516,19	0,001518	192,74	0,37

26	TcCLB.511611.30	hypothetical protein	510,43	0	2585,87	5,07
27	TcCLB.509545.10	mucin-associated surface protein (MASP), putative	413,99	0,001476	413,99	0,00
28	TcCLB.506139.110	mucin-associated surface protein (MASP), putative	409,50	8,2E-121	409,55	1,00
29	TcCLB.511655.69	ubiquitin-activating enzyme-like protein	409,50	1,1E-119	278,94	0,68
30	TcCLB.506425.5	receptor-type adenylate cyclase, putative (fragment)	409,50	4,3E-115	268,07	0,65
31	TcCLB.510513.70	hypothetical protein, conserved	409,50	6,72E-91	211,71	0,52
32	TcCLB.503881.10	kynureninase, putative	409,50	1,1E-120	295,30	0,72
33	TcCLB.510483.180	mucin-associated surface protein (MASP), putative	409,50	8,7E-121	383,32	0,94
34	TcCLB.509023.150	integral membrane transport protein, putative, drug resistance protein, putative	409,50	1,2E-120	285,50	0,70
35	TcCLB.510079.10	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	409,50	1,2E-120	284,12	0,69
36	TcCLB.508827.20	hypothetical protein, conserved	409,50	1,1E-103	241,42	0,59
37	TcCLB.507765.30	hypothetical protein, conserved	409,50	3,85E-86	200,60	0,49
38	TcCLB.503521.80	hypothetical protein, conserved	409,50	5,34E-62	144,40	0,35
39	TcCLB.507205.10	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	409,50	5,8E-121	698,53	1,71

40	TcCLB.504427.60	hypothetical protein, conserved	409,50	7,9E-121	436,86	1,07
41	TcCLB.510381.70	hypothetical protein, conserved	409,50	1,1E-106	248,39	0,61
42	TcCLB.511727.70	hypothetical protein, conserved	409,50	3,11E-96	224,12	0,55
43	TcCLB.508461.130	elongation factor 1-alpha (ef-1-alpha), putative, HSP70 subfamily B suppressor 1, putative	409,50	7,46E-89	206,93	0,51
44	TcCLB.509663.50	trans-sialidase, Group VIII, putative	409,50	1,21E-56	131,94	0,32
45	TcCLB.508777.40	leucine-rich repeat protein, putative	409,50	3,2E-50	117,02	0,29
46	TcCLB.506251.130	ubiquitin-protein ligase (pseudogene), putative	409,50	8,6E-28	65,03	0,16
47	TcCLB.507071.340	hypothetical protein	384,71	0,000424	4584,38	11,92
48	TcCLB.507877.10	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	382,25	9E-122	382,25	0,00
49	TcCLB.506805.20	hypothetical protein	364,42	0,001476	364,42	0,00
50	TcCLB.506823.65	trans-sialidase (pseudogene), putative	357,89	9E-122	357,89	0,00
51	TcCLB.508141.80	hypothetical protein, conserved	356,15	8,47E-21	215,84	0,61
52	TcCLB.506841.20	trans-sialidase, Group I, putative	348,94	4,75E-21	745,92	2,14
53	TcCLB.509927.10	trans-sialidase, putative (fragment)	337,04	0,001476	337,04	0,00

54	TcCLB.511589.70	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein, putative	323,03	9E-122	323,03	0,00
55	TcCLB.509105.130	ATP-binding cassette sub-family F member 1, putative (ABCF1)	308,56	5E-09	461,53	1,50
56	TcCLB.510047.100	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	308,56	5E-09	730,22	2,37
57	TcCLB.506973.140	hypothetical protein	263,62	2,7E-114	263,62	0,00
58	TcCLB.507981.40	hypothetical protein	258,09	0,001556	1700,62	6,59
59	TcCLB.438147.9	hypothetical protein, conserved (fragment)	258,09	0,001556	663,76	2,57
60	TcCLB.506355.35	trans-sialidase (pseudogene), putative	258,09	0,001556	555,97	2,15
61	TcCLB.508413.10	hypothetical protein, conserved	258,09	0,001556	331,04	1,28
62	TcCLB.510901.90	ATPase protein, putative	258,09	0,001556	280,23	1,09
63	TcCLB.506619.90	ABC transporter family-like protein	258,09	0,001556	139,66	0,54
64	TcCLB.508933.10	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	249,29	4,2E-108	249,29	0,00
65	TcCLB.508015.40	hypothetical protein	237,43	9,36E-21	712,40	3,00
66	TcCLB.506627.90	hypothetical protein	237,43	9,52E-21	404,34	1,70
67	TcCLB.503861.30	trans-sialidase (pseudogene), putative	210,41	3,16E-91	210,41	0,00

68	TcCLB.468041.10	hypothetical protein	204,75	2E-120	1512,20	7,39
69	TcCLB.509023.190	hypothetical protein, conserved	204,75	4,3E-120	578,19	2,82
70	TcCLB.511277.280	hypothetical protein, conserved	204,75	1,2E-119	303,78	1,48
71	TcCLB.503899.10	heat shock 70 kDa protein, putative	204,75	3,6E-111	261,45	1,28
72	TcCLB.506999.60	hypothetical protein, conserved	204,75	6,69E-45	105,69	0,52
73	TcCLB.506173.150	hypothetical protein	204,75	2,1E-120	1286,08	6,28
74	TcCLB.508241.104	hypothetical protein, conserved	204,75	5,7E-120	464,90	2,27
75	TcCLB.511873.5	hypothetical protein	204,75	6,9E-120	410,78	2,01
76	TcCLB.507953.170	hypothetical protein	204,75	7,8E-120	383,32	1,87
77	TcCLB.511903.300	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	204,75	1,1E-119	329,21	1,61
78	TcCLB.506559.517	hypothetical protein, conserved	204,75	1,1E-119	318,54	1,56
79	TcCLB.510735.50	hypothetical protein, conserved	204,75	8,6E-110	258,18	1,26
80	TcCLB.507053.200	hypothetical protein, conserved	204,75	1,28E-93	220,18	1,08
81	TcCLB.509429.180	hypothetical protein, conserved	204,75	7,29E-79	185,46	0,91
82	TcCLB.503763.30	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	204,75	7,02E-64	150,23	0,73

83	TcCLB.507389.30	hypothetical protein	204,75	8,03E-43	100,81	0,49
84	TcCLB.503919.60	hypothetical protein, conserved	204,75	5,87E-37	87,10	0,43
85	TcCLB.507357.135	hypothetical protein	204,75	2,6E-120	923,56	4,51
86	TcCLB.503917.7	RNA-binding protein, putative	204,75	1,3E-119	298,50	1,46
87	TcCLB.507057.50	hypothetical protein, conserved	204,75	1,4E-90	213,02	1,04
88	TcCLB.508307.110	hypothetical protein, conserved	204,75	3,53E-67	157,99	0,77
89	TcCLB.509163.90	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	204,75	1,46E-59	140,08	0,68
90	TcCLB.507809.100	hypothetical protein, conserved	204,75	3,76E-36	85,21	0,42
91	TcCLB.421231.10	hypothetical protein, conserved	204,75	6E-120	449,71	2,20
92	TcCLB.469735.9	hypothetical protein, conserved	204,75	1,4E-119	283,34	1,38
93	TcCLB.508305.9	trans-sialidase, putative	201,87	1,56E-87	201,87	0,00
94	TcCLB.508931.50	hypothetical protein	195,10	1,33E-84	195,10	0,00
95	TcCLB.508221.650	trans-sialidase, Group V, putative	178,08	1,15E-20	241,54	1,36
96	TcCLB.508165.210	mucin-associated surface protein (MASP), putative	178,08	1,08E-20	575,40	3,23
97	TcCLB.509875.60	hypothetical protein	172,06	0,001596	1090,96	6,34

98	TcCLB.503861.10	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	172,06	0,001596	183,17	1,06
99	TcCLB.511509.10	hypothetical protein, conserved	172,06	0,001596	514,73	2,99
100	TcCLB.510359.180	hypothetical protein, conserved	172,06	0,001596	175,39	1,02
101	TcCLB.507669.50	hypothetical protein, conserved	163,80	1,85E-68	161,80	0,99
102	TcCLB.506559.370	hypothetical protein, conserved	160,26	4,17E-89	926,23	5,78
103	TcCLB.511585.220	calcium/potassium channel (CAKC), putative	158,17	1,42E-68	158,17	0,00
104	TcCLB.508049.40	hypothetical protein, conserved	146,25	4,6E-120	3276,43	22,40
105	TcCLB.507093.170	hypothetical protein, conserved	145,02	3,33E-08	341,81	2,36
106	TcCLB.508221.284	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative, retrotransposon hot spot protein 3 (RHS3), putative (pseudogene)	142,85	6,15E-62	142,85	0,00
107	TcCLB.508293.60	trans-sialidase, Group VI, putative	142,31	1,05E-61	142,31	0,00
108	TcCLB.507685.10	hypothetical protein, conserved	136,50	4,84E-55	130,73	0,96
109	TcCLB.508307.170	60S acidic ribosomal protein, putative	136,50	2,5E-119	598,30	4,38
110	TcCLB.509911.80	hypothetical protein, conserved	136,50	4,5E-119	451,18	3,31
111	TcCLB.508857.130	hypothetical protein, conserved	136,50	1,9E-118	281,99	2,07

112	TcCLB.509007.50	hypothetical protein	136,50	2,5E-119	600,92	4,40
113	TcCLB.503723.60	tartrate-resistant acid phosphatase type 5 precursor, putative, tartrate-resistant acid ATPase, putative	136,50	1,7E-118	291,55	2,14
114	TcCLB.510855.4	hypothetical protein, conserved	136,50	2,08E-86	205,18	1,50
115	TcCLB.503801.9	RAD50 DNA repair protein, putative (fragment)	136,50	7,39E-86	203,87	1,49
116	TcCLB.511407.40	hypothetical protein, conserved	136,50	6,89E-78	184,96	1,36
117	TcCLB.507839.40	trans-sialidase, Group II, putative	136,50	7,47E-77	182,51	1,34
118	TcCLB.510359.200	hypothetical protein, conserved	136,50	9,05E-75	177,56	1,30
119	TcCLB.510759.190	hypothetical protein, conserved	136,50	4,23E-74	175,97	1,29
120	TcCLB.508741.10	hypothetical protein	136,50	5,33E-66	156,73	1,15
121	TcCLB.503757.40	Casein kinase II subunit beta, putative	136,50	3,8E-119	491,46	3,60
122	TcCLB.509901.140	COP9 signalosome complex subunit 5, putative	136,50	9,6E-119	344,89	2,53
123	TcCLB.511211.110	hypothetical protein, conserved	136,50	8,5E-105	248,84	1,82
124	TcCLB.510659.110	hypothetical protein, conserved	136,50	1,04E-55	132,32	0,97
125	TcCLB.507739.110	myosin IB heavy chain, putative	136,50	1,13E-49	118,02	0,86
126	TcCLB.511217.10	hypothetical protein	136,50	1,5E-109	260,13	1,91



127	TcCLB.511907.110	fatty acid transporter protein-like, putative	129,21	5,12E-56	129,21	0,00
128	TcCLB.510221.39	adenosine monophosphate deaminase, putative (fragment)	129,05	0,001649	243,63	1,89
129	TcCLB.510359.150	ATP-dependent helicase, putative	129,05	0,001662	85,24	0,66
130	TcCLB.507023.250	hypothetical protein, conserved	103,24	0,001702	313,68	3,04
131	TcCLB.509611.120	hypothetical protein, conserved	103,24	0,001704	190,20	1,84
132	TcCLB.510355.250	hypothetical protein, conserved	102,37	2,32E-70	168,74	1,65
133	TcCLB.509641.70	hypothetical protein, conserved	102,37	1,38E-65	157,27	1,54
134	TcCLB.509215.10	DNA polymerase delta catalytic subunit, putative	102,37	1,04E-55	133,60	1,31
135	TcCLB.506573.5	surface antigen TASV-A8, putative, surface antigen TASV, putative (TASV-A8)	102,37	9,6E-119	786,34	7,68
136	TcCLB.503955.89	hypothetical protein, conserved	102,37	1,2E-118	695,00	6,79
137	TcCLB.510943.150	glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative	102,37	7,16E-82	196,31	1,92
138	TcCLB.509011.50	hypothetical protein, conserved	102,37	9,5E-71	169,68	1,66
139	TcCLB.509601.10	neutral sphingomyelinase activation associated factor-like protein	102,37	1,02E-68	164,80	1,61
140	TcCLB.504157.80	hypothetical protein, conserved	102,37	1,26E-64	154,97	1,51

141	TcCLB.508153.1030	hypothetical protein, conserved	102,37	9,2E-59	140,92	1,38
142	TcCLB.511127.290	hypothetical protein, conserved	102,37	3,93E-43	103,54	1,01
143	TcCLB.510983.10	hypothetical protein	102,37	4,2E-119	1426,01	13,93
144	TcCLB.509233.210	hypothetical protein, conserved	102,37	4,8E-103	247,06	2,41
145	TcCLB.508741.360	hypothetical protein, conserved	102,37	1,73E-70	169,05	1,65
146	TcCLB.510155.210	calcium/potassium channel (CAKC), putative	102,37	5,79E-66	158,17	1,55
147	TcCLB.508461.230	kinetoplastid kinetochore protein 3, putative (kkt3)	102,37	3,6E-53	127,53	1,25
148	TcCLB.505655.20	hypothetical protein	101,98	2,11E-88	1138,91	11,17
149	TcCLB.510155.30	hypothetical protein, conserved	101,76	2,03E-20	167,86	1,65
150	TcCLB.504241.80	trans-sialidase (pseudogene), putative	98,39	4,82E-06	3743,88	38,05
151	TcCLB.511727.250	hypothetical protein, conserved	91,00	1,39E-91	220,71	2,43
152	TcCLB.504393.10	hypothetical protein	86,03	0,00175	1562,73	18,16
153	TcCLB.509911.40	hypothetical protein, conserved	81,90	5,3E-117	401,20	4,90
154	TcCLB.494675.10	fatty acyl CoA synthetase 2, putative	81,90	1,7E-104	252,96	3,09
155	TcCLB.506789.190	hypothetical protein, conserved	81,90	1,75E-72	175,52	2,14

156	TcCLB.509993.20	mucin TcMUCI, putative	81,90	4,4E-118	882,12	10,77
157	TcCLB.508933.50	hypothetical protein, conserved	81,90	3,9E-110	266,69	3,26
158	TcCLB.504175.9	hypothetical protein, conserved	81,90	3,48E-70	169,96	2,08
159	TcCLB.508909.330	protein kinase, putative	81,90	4,68E-68	164,80	2,01
160	TcCLB.508173.260	hypothetical protein, conserved	81,90	7,35E-67	161,89	1,98
161	TcCLB.508479.160	hypothetical protein, conserved	81,90	8E-57	137,61	1,68
162	TcCLB.508707.70	hypothetical protein, conserved	81,90	1,83E-48	117,41	1,43
163	TcCLB.511179.140	hypothetical protein, conserved	81,90	2,64E-87	211,38	2,58
164	TcCLB.503979.10	ethanolamine phosphotransferase, putative (fragment)	81,90	4,75E-82	198,67	2,43
165	TcCLB.506179.10	ferric reductase transmembrane protein, putative (FR1)	79,14	2,46E-20	294,42	3,72
166	TcCLB.510421.200	hypothetical protein, conserved	79,14	2,59E-20	230,38	2,91
167	TcCLB.509287.220	hypothetical protein, conserved	78,54	8,99E-15	2913,53	37,10
168	TcCLB.511643.80	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	78,09	4,29E-08	249,54	3,20
169	TcCLB.504149.160	phosphoinositide-specific phospholipase C, putative	73,74	0,001812	240,59	3,26
170	TcCLB.507007.50	hypothetical protein, conserved	73,74	0,001812	242,27	3,29

171	TcCLB.510723.20	hypothetical protein	73,74	0,001812	174,33	2,36
172	TcCLB.509395.30	tRNA exportin, putative, exportin-T, putative	71,23	3,13E-20	208,33	2,92
173	TcCLB.507503.70	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	69,79	1,56E-20	535,43	7,67
174	TcCLB.508817.90	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	68,25	1,1E-115	349,26	5,12
175	TcCLB.510963.20	hypothetical protein, conserved	68,25	1,54E-57	140,71	2,06
176	TcCLB.510183.30	hypothetical protein, conserved	68,25	1,88E-48	118,53	1,74
177	TcCLB.510265.30	hypothetical protein, conserved	68,25	5,98E-32	78,37	1,15
178	TcCLB.508479.490	hypothetical protein	67,53	0,000152	3404,00	50,41
179	TcCLB.508297.14	trans-sialidase (pseudogene), putative	64,52	0,001861	368,29	5,71
180	TcCLB.507641.100	hypothetical protein, conserved	64,52	0,001861	251,03	3,89
181	TcCLB.504109.110	cleavage and polyadenylation specificity factor, putative	64,52	0,001861	216,02	3,35
182	TcCLB.511389.80	protein kinase, putative	64,52	0,001861	252,49	3,91
183	TcCLB.504153.150	Unc104-like kinesin, putative	59,36	4,92E-20	156,25	2,63
184	TcCLB.511277.180	hypothetical protein, conserved	58,50	5,4E-101	249,29	4,26
185	TcCLB.509937.30	phosphatidylserine synthase, putative, phosphatidylserine	58,50	7E-109	268,77	4,59

		synthase, putative				
186	TcCLB.510661.120	hypothetical protein, conserved	58,50	1,75E-41	102,54	1,75
187	TcCLB.508965.100	hypothetical protein, conserved	58,50	5,54E-63	155,49	2,66
188	TcCLB.506839.30	hypothetical protein, conserved	58,50	1,37E-51	127,42	2,18
189	TcCLB.505171.10	phospholipid transporting ATPase-like protein, putative	57,35	0,001937	127,77	2,23
190	TcCLB.508505.40	hypothetical protein, conserved	54,45	1,07E-08	137,64	2,53
191	TcCLB.506355.20	receptor-type adenylate cyclase, putative	51,62	0,002003	135,31	2,62
192	TcCLB.506417.70	hypothetical protein	51,19	1E-114	498,59	9,74
193	TcCLB.511277.250	hypothetical protein, conserved	51,19	3,6E-113	304,45	5,95
194	TcCLB.508065.70	protein associated with differentiation 8, putative, protein associated with differentiation 7, putative, hypothetical protein, conserved	51,19	2,38E-87	217,74	4,25
195	TcCLB.503781.60	tRNA pseudouridine synthase A, putative	51,19	3,07E-80	200,01	3,91
196	TcCLB.510599.30	hypothetical protein, conserved	51,19	9,79E-60	148,93	2,91
197	TcCLB.508533.50	hypothetical protein, conserved	51,19	5,35E-51	127,18	2,48
198	TcCLB.508881.100	hypothetical protein, conserved	51,19	2,34E-45	113,17	2,21

199	TcCLB.507615.90	hypothetical protein, conserved	51,19	7,62E-26	64,79	1,27
200	TcCLB.508357.90	T-complex protein 1, beta subunit, putative	51,19	3,6E-104	259,64	5,07
201	TcCLB.504059.30	hypothetical protein, conserved	51,19	2,04E-84	210,41	4,11
202	TcCLB.504149.100	hypothetical protein, conserved	51,19	4,97E-82	204,47	3,99
203	TcCLB.507881.90	trans-sialidase (pseudogene), putative	51,19	1,62E-75	188,25	3,68
204	TcCLB.507665.30	ferric reductase transmembrane protein, putative (FR1)	51,19	5,58E-68	169,47	3,31
205	TcCLB.510125.10	pumilio/PUF RNA binding protein 6, putative (PUF6)	51,19	1,14E-66	166,20	3,25
206	TcCLB.507641.40	hypothetical protein, conserved	51,19	7,39E-36	89,59	1,75
207	TcCLB.511281.60	pyruvate kinase 2, putative	51,19	2,1E-110	275,22	5,38
208	TcCLB.508997.20	phosphatidylinositol 3-kinase, putative, phosphatidylinositol 3-kinase (pseudogene), putative	50,88	9,8E-20	96,91	1,90
209	TcCLB.507053.150	hypothetical protein, conserved	48,18	3,6E-44	110,75	2,30
210	TcCLB.507429.60	hypothetical protein	47,84	5,4E-13	5358,56	112,02
211	TcCLB.511389.10	hypothetical protein, conserved	46,93	0,002072	143,83	3,07
212	TcCLB.508557.29	hypothetical protein, conserved	45,50	3,74E-63	158,96	3,49
213	TcCLB.508543.20	protein kinase, putative	45,50	4,75E-49	123,53	2,71

214	TcCLB.510733.60	DNA polymerase epsilon catalytic subunit, putative	45,50	9,79E-25	62,64	1,38
215	TcCLB.503955.100	protein kinase, putative	45,50	4,44E-33	83,50	1,84
216	TcCLB.509587.10	mitochondrial DNA polymerase I protein D, putative	44,52	1,01E-19	148,86	3,34
217	TcCLB.507659.20	amino acid transporter, putative	43,87	9,6E-115	852,96	19,44
218	TcCLB.508741.390	hypothetical protein, conserved	43,02	0,002136	148,13	3,44
219	TcCLB.511807.280	hypothetical protein, conserved	40,95	3,55E-96	244,42	5,97
220	TcCLB.509167.180	kinesin, putative	40,95	2,09E-48	123,09	3,01
221	TcCLB.511383.89	hypothetical protein, conserved	40,95	5,61E-25	63,87	1,56
222	TcCLB.510689.40	phosphatidylinositol 3-kinase (tor2), putative (TOR2)	39,04	7,71E-08	140,09	3,59
223	TcCLB.507629.30	hypothetical protein, conserved	37,23	6,09E-52	133,34	3,58
224	TcCLB.510729.220	hypothetical protein, conserved	36,87	0,002282	167,60	4,55
225	TcCLB.511467.20	hypothetical protein, conserved	36,87	0,00229	137,45	3,73
226	TcCLB.508111.40	hypothetical protein, conserved	35,14	5,14E-14	101,19	2,88
227	TcCLB.508693.20	DNA topoisomerase IB, large subunit, DNA topoisomerase IB, large subunit, putative	34,12	7,2E-80	206,93	6,06
228	TcCLB.508355.320	arginyl-tRNA synthetase, putative	34,12	1,22E-76	198,57	5,82

229	TcCLB.504109.80	wd repeat-containing protein 19, Putative intraflagellar transport protein F6, Intraflagellar transport protein 144, putative (PIFTF6)	34,12	4,13E-38	98,93	2,90
230	TcCLB.510829.20	hypothetical protein	34,03	0	3476,94	102,18
231	TcCLB.504147.190	hypothetical protein, conserved	32,76	3,42E-57	148,93	4,55
232	TcCLB.509395.20	phosphatidylinositol kinase related protein, putative	31,92	2,36E-08	73,45	2,30
233	TcCLB.510877.80	phospholipid-transporting ATPase-like protein, putative	31,50	1,08E-41	109,21	3,47
234	TcCLB.508257.230	target of rapamycin kinase (TOR) kinase 3, putative	30,76	1,04E-07	131,56	4,28
235	TcCLB.511421.80	Midasin, putative (pseudogene)	29,29	2,69E-05	96,26	3,29
236	TcCLB.511511.5	hypothetical protein	29,25	5,9E-110	552,65	18,89
237	TcCLB.508263.30	kinesin, putative	28,68	0,002614	173,81	6,06
238	TcCLB.504491.10	hypothetical protein	27,30	3,7E-111	1118,78	40,98
239	TcCLB.511003.30	RNA editing associated helicase 2, putative, mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative (REH2)	26,38	9,77E-19	109,75	4,16
240	TcCLB.509979.30	hypothetical protein, conserved	26,18	1,2E-13	101,37	3,87
241	TcCLB.511807.180	hypothetical protein, conserved	25,81	0,00281	153,78	5,96



242	TcCLB.504147.250	hypothetical protein, conserved	25,59	1,25E-27	74,75	2,92
243	TcCLB.511283.240	hypothetical protein, conserved	25,59	2,82E-40	108,61	4,24
244	TcCLB.507053.209	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain (DYNC2H1), putative	24,09	2,95E-31	85,27	3,54
245	TcCLB.510821.20	hypothetical protein, conserved	22,44	0,003189	91,97	4,10
246	TcCLB.509797.40	isoleucyl-tRNA synthetase, putative	21,55	7,24E-43	118,94	5,52
247	TcCLB.505763.10	proton motive ATPase 1, putative	21,55	1,8E-107	811,06	37,63
248	TcCLB.506871.140	cleavage and polyadenylation specificity factor, putative	20,47	3,93E-34	95,76	4,68
249	TcCLB.510329.160	hypothetical protein, conserved	19,12	0,00382	57,14	2,99
250	TcCLB.504105.130	calcium channel protein, putative	18,89	5,76E-08	114,11	6,04
251	TcCLB.508711.10	hypothetical protein, conserved	17,80	1,19E-27	80,01	4,49
252	TcCLB.504153.90	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain (DYNC2H2), putative, dynein heavy chain (pseudogene), putative	17,14	9,29E-08	71,78	4,19
253	TcCLB.508153.1050	hypothetical protein, conserved	17,06	1,41E-21	63,27	3,71
254	TcCLB.505919.80	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	15,16	8,99E-18	248,31	16,38
255	TcCLB.505763.19	P-type H <sup>+</sup> -ATPase, putative	12,41	2,83E-67	213,13	17,18
256	TcCLB.507949.250	hypothetical protein, conserved	11,70	9,86E-91	386,55	33,04

257	TcCLB.506679.110	dynein heavy chain, putative	10,96	6,93E-15	57,54	5,25
258	TcCLB.506925.310	hypothetical protein, conserved	10,24	2,21E-33	113,35	11,07
259	TcCLB.511545.80	L-Lysine transport protein	5,32	2,83E-59	296,57	55,77
260	TcCLB.510963.90	elongation factor 2, putative	4,36	1,56E-28	162,47	37,29

Tabela 4.6. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFP29-FLAG em estresse. (Fold Change >4; FDR < 0,01).

	Identificação (TriTrypDB)	Descrição	Fold Change	FDR	Média Experimento	Média Controle
1	TcCLB.509493.120	hypothetical protein	1372,28	1,79744E- 12	1372,28	0
2	TcCLB.508747.30	hypothetical protein	1244,38	1,86353E- 05	1244,38	0
3	TcCLB.509287.220	hypothetical protein, conserved	1229,71	1,79744E- 12	1229,71	0
4	TcCLB.507953.60	hypothetical protein	1056,53	0	1056,53	0
5	TcCLB.511669.20	hypothetical protein	941,92	1,86353E- 05	941,92	0
6	TcCLB.510483.190	mucin TcMUCII, putative	906,10	1,79744E- 12	906,10	0
7	TcCLB.511391.80	hypothetical protein	863,93	1,86353E- 05	863,93	0
8	TcCLB.509777.21	hypothetical protein	816,27	1,79744E- 12	816,27	0
9	TcCLB.511077.150	hypothetical protein	722,80	1,79744E- 12	722,80	0
10	TcCLB.508221.780	hypothetical protein	620,90	1,79744E- 12	620,90	0
11	TcCLB.508875.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative (fragment)	594,90	1,86353E- 05	594,90	0
12	TcCLB.511613.90	mucin-associated surface protein (MASP), putative	575,81	0	575,81	0
13	TcCLB.509629.20	DnaJ chaperone protein, putative	570,41	1,79744E- 12	570,41	0
14	TcCLB.509623.19	clathrin coat assembly protein ap19, putative (ClaATc)	563,62	1,79744E- 12	563,62	0

15	TcCLB.510003.41	clathrin coat assembly protein ap19, putative	563,62	1,79744E-12	563,62	0
16	TcCLB.505763.10	proton motive ATPase 1, putative	558,08	1,79744E-12	558,08	0
17	TcCLB.504741.50	hypothetical protein, conserved	538,00	1,79744E-12	538,00	0
18	TcCLB.506255.30	hypothetical protein, conserved	523,13	1,79744E-12	523,13	0
19	TcCLB.509957.10	hypothetical protein	509,07	1,79744E-12	509,07	0
20	TcCLB.506871.80	RNA polymerase-like protein, putative	495,75	1,79744E-12	495,75	0
21	TcCLB.503587.3	mucin TcMUC (pseudogene), putative	487,90	1,86353E-05	487,90	0
22	TcCLB.511375.20	hypothetical protein	485,58	1,79744E-12	485,58	0
23	TcCLB.511277.390	hypothetical protein, conserved	480,65	1,79744E-12	480,65	0
24	TcCLB.506763.40	hypothetical protein	478,22	1,79744E-12	478,22	0
25	TcCLB.508221.518	mucin TcMUCII, putative	478,22	1,79744E-12	478,22	0
26	TcCLB.504031.11	hypothetical protein	473,44	1,79744E-12	473,44	0
27	TcCLB.506331.64	hypothetical protein	459,65	1,79744E-12	459,65	0
28	TcCLB.510047.100	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	444,54	1,79744E-12	444,54	0
29	TcCLB.506451.13	hypothetical protein (pseudogene)	428,45	1,79744E-12	428,45	0

30	TcCLB.505481.10	hypothetical protein	426,52	1,79744E-12	426,52	0
31	TcCLB.510873.10	NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase protein, putative (fragment)	420,83	1,79744E-12	420,83	0
32	TcCLB.504005.40	hypothetical protein, conserved	414,79	1,86353E-05	414,79	0
33	TcCLB.507023.110	small GTP-binding protein Rab28, putative	411,68	1,79744E-12	411,68	0
34	TcCLB.506271.10	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase (pseudogene), putative	408,72	1,79744E-12	408,72	0
35	TcCLB.508857.15	trans-sialidase, putative (fragment)	404,07	1,79744E-12	404,07	0
36	TcCLB.511649.90	hypothetical protein, conserved	402,48	1,86353E-05	402,48	0
37	TcCLB.503723.60	tartrate-resistant acid phosphatase type 5 precursor, putative, tartrate-resistant acid ATPase, putative	401,22	1,79744E-12	401,22	0
38	TcCLB.510281.10	hypothetical protein	401,22	1,79744E-12	401,22	0
39	TcCLB.511325.10	amino acid permease (pseudogene), putative	388,59	1,79744E-12	388,59	0
40	TcCLB.506853.60	hypothetical protein, conserved	383,35	1,79744E-12	383,35	0
41	TcCLB.504625.10	trans-splicing factor, putative	382,08	1,86353E-05	382,08	0
42	TcCLB.507949.250	hypothetical protein, conserved	381,00	1,86353E-05	381,00	0
43	TcCLB.510131.30	hypothetical protein, conserved	362,79	1,79744E-12	362,79	0
44	TcCLB.438147.9	hypothetical protein, conserved (fragment)	362,32	1,79744E-	362,32	0

			12		
45	TcCLB.511809.20	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-like protein, putative	360,74	1,86353E-05	360,74 0
46	TcCLB.508409.110	hypothetical protein, conserved	360,03	1,79744E-12	360,03 0
47	TcCLB.511727.120	ethanolamine-phosphate cytidyltransferase (ECT)	354,14	1,86353E-05	354,14 0
48	TcCLB.510583.130	mucin-associated surface protein (MASP), putative	350,69	1,79744E-12	350,69 0
49	TcCLB.511725.10	proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	344,32	1,79744E-12	344,32 0
50	TcCLB.511211.70	cytochrome c oxidase assembly protein (COX15)	341,65	1,86353E-05	341,65 0
51	TcCLB.506435.190	hypothetical protein, conserved	336,97	1,79744E-12	336,97 0
52	TcCLB.508687.25	hypothetical protein	334,58	1,79744E-12	334,58 0
53	TcCLB.510329.40	hypothetical protein, conserved	332,44	1,86353E-05	332,44 0
54	TcCLB.504797.144	hypothetical protein, conserved	327,63	1,86353E-05	327,63 0
55	TcCLB.507913.30	proliferative cell nuclear antigen (PCNA), putative	326,51	1,79744E-12	326,51 0
56	TcCLB.506489.50	serine/threonine protein kinase, putative	320,97	1,79744E-12	320,97 0
57	TcCLB.510645.30	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative	320,97	1,79744E-12	320,97 0
58	TcCLB.511501.10	hypothetical protein, conserved	316,91	1,86353E-05	316,91 0

59	TcCLB.511481.30	hypothetical protein, conserved	314,58	1,79744E-12	314,58	0
60	TcCLB.510551.15	hypothetical protein	310,45	1,79744E-12	310,45	0
61	TcCLB.506993.86	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	309,44	1,79744E-12	309,44	0
62	TcCLB.508707.330	chaperone DNAJ protein, putative	307,43	1,79744E-12	307,43	0
63	TcCLB.508173.264	hypothetical protein, conserved	303,49	1,79744E-12	303,49	0
64	TcCLB.509763.20	hypothetical protein	302,52	1,79744E-12	302,52	0
65	TcCLB.509527.130	hypothetical protein	298,70	1,79744E-12	298,70	0
66	TcCLB.508303.20	hypothetical protein	293,15	1,79744E-12	293,15	0
67	TcCLB.503939.20	hypothetical protein, conserved	289,56	1,79744E-12	289,56	0
68	TcCLB.510679.30	metal-ion transporter, putative, zinc transporter, putative	288,59	1,86353E-05	288,59	0
69	TcCLB.509237.10	mevalonate kinase, putative	287,80	1,79744E-12	287,80	0
70	TcCLB.510363.280	mucin-associated surface protein (MASP), putative	281,99	1,86353E-05	281,99	0
71	TcCLB.510363.320	mucin-associated surface protein (MASP), putative	280,97	1,79744E-12	280,97	0
72	TcCLB.510459.20	mucin-associated surface protein (MASP), putative	280,82	1,86353E-05	280,82	0
73	TcCLB.508777.170	hypothetical protein, conserved	278,49	1,79744E-12	278,49	0

74	TcCLB.511627.120	aldo/keto reductase, putative	278,49	1,79744E-12	278,49	0
75	TcCLB.507787.100	gamma-glutamylcysteine synthetase, putative	272,87	1,79744E-12	272,87	0
76	TcCLB.508779.70	hypothetical protein, conserved	272,09	1,79744E-12	272,09	0
77	TcCLB.503669.10	hypothetical protein, conserved	271,27	1,86353E-05	271,27	0
78	TcCLB.511625.74	hypothetical protein, conserved	261,34	1,86353E-05	261,34	0
79	TcCLB.509733.95	hypothetical protein	260,85	1,79744E-12	260,85	0
80	TcCLB.510197.160	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	260,13	1,79744E-12	260,13	0
81	TcCLB.506289.180	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	258,00	1,79744E-12	258,00	0
82	TcCLB.506295.160	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor, putative	256,61	1,79744E-12	256,61	0
83	TcCLB.506321.280	hypothetical protein, conserved	255,22	1,79744E-12	255,22	0
84	TcCLB.508701.20	cation transporter, putative	255,22	1,79744E-12	255,22	0
85	TcCLB.509505.80	hypothetical protein, conserved	253,85	1,79744E-12	253,85	0
86	TcCLB.506629.150	hypothetical protein, conserved	251,83	1,79744E-12	251,83	0
87	TcCLB.509629.10	trans-sialidase, Group III, putative	250,08	0	250,08	0
88	TcCLB.432067.10	ATP-dependent RNA helicase, putative	250,05	1,79744E-12	250,05	0



89	TcCLB.509161.120	hypothetical protein, conserved	248,52	1,79744E-12	248,52	0
90	TcCLB.511167.110	hypothetical protein, conserved	247,97	1,86353E-05	247,97	0
91	TcCLB.506009.70	hypothetical protein	247,87	1,79744E-12	247,87	0
92	TcCLB.510173.120	hypothetical protein, conserved	247,87	1,79744E-12	247,87	0
93	TcCLB.509487.20	hypothetical protein, conserved	247,66	1,79744E-12	247,66	0
94	TcCLB.508153.1110	arginine N-methyltransferase, putative	245,30	1,79744E-12	245,30	0
95	TcCLB.506775.50	hypothetical protein, conserved	242,70	0	242,70	0
96	TcCLB.507603.60	hypothetical protein, conserved	242,21	1,86353E-05	242,21	0
97	TcCLB.511867.20	hypothetical protein, conserved	240,93	1,79744E-12	240,93	0
98	TcCLB.505843.40	E1-like ubiquitin-activating enzyme, putative (UBA5)	240,32	1,79744E-12	240,32	0
99	TcCLB.507657.10	glutamamyl carboxypeptidase, putative, metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	238,51	1,79744E-12	238,51	0
100	TcCLB.506267.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	237,91	1,79744E-12	237,91	0
101	TcCLB.508257.210	hypothetical protein, conserved	236,72	1,79744E-12	236,72	0
102	TcCLB.510933.110	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	235,54	1,79744E-12	235,54	0
103	TcCLB.506447.10	hypothetical protein	232,65	1,79744E-12	232,65	0

104	TcCLB.507959.80	mucin-associated surface protein (MASP), putative	232,08	1,79744E-12	232,08	0
105	TcCLB.508277.40	divalent cation transporter, putative	231,51	1,79744E-12	231,51	0
106	TcCLB.508993.20	homocysteine S-methyltransferase, putative	230,38	1,79744E-12	230,38	0
107	TcCLB.509617.20	paraflagellar rod protein 3, putative (PAR3)	229,89	1,86353E-05	229,89	0
108	TcCLB.509745.70	hypothetical protein, conserved	228,34	1,86353E-05	228,34	0
109	TcCLB.509941.110	condensin subunit 1, putative	227,61	1,79744E-12	227,61	0
110	TcCLB.506933.70	hypothetical protein, conserved	227,07	1,79744E-12	227,07	0
111	TcCLB.507025.40	hypothetical protein	225,98	1,79744E-12	225,98	0
112	TcCLB.511817.130	hypothetical protein, conserved	225,98	1,79744E-12	225,98	0
113	TcCLB.504147.40	Mitochondrial N(5)-glutamine methyltransferase MTQ1, putative	224,91	1,79744E-12	224,91	0
114	TcCLB.506297.310	hypothetical protein, conserved	220,72	1,79744E-12	220,72	0
115	TcCLB.506853.50	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, putative	219,18	1,79744E-12	219,18	0
116	TcCLB.401473.9	DNA-directed rna polymerase I largest subunit, putative	218,51	1,79744E-12	218,51	0
117	TcCLB.508387.100	ubiquitin-conjugating enzyme, putative	216,18	1,79744E-12	216,18	0
118	TcCLB.506445.110	nucleobase transporter, putative	214,71	1,79744E-12	214,71	0

119	TcCLB.506627.10	AMP deaminase 2, putative	214,22	1,79744E-12	214,22	0
120	TcCLB.507237.250	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	212,30	1,79744E-12	212,30	0
121	TcCLB.509891.60	hypothetical protein, conserved	209,02	1,79744E-12	209,02	0
122	TcCLB.507623.50	oxidoreductase, putative	208,10	1,79744E-12	208,10	0
123	TcCLB.506367.170	hypothetical protein	206,74	1,79744E-12	206,74	0
124	TcCLB.503917.7	RNA-binding protein, putative	205,40	1,79744E-12	205,40	0
125	TcCLB.504153.70	hypothetical protein, conserved	204,89	1,86353E-05	204,89	0
126	TcCLB.510901.50	C-terminal motor kinesin, putative	201,84	1,86353E-05	201,84	0
127	TcCLB.510431.110	hypothetical protein	200,18	1,79744E-12	200,18	0
128	TcCLB.506789.170	ATPase, putative	198,92	1,79744E-12	198,92	0
129	TcCLB.509609.10	hypothetical protein, conserved	196,86	1,79744E-12	196,86	0
130	TcCLB.510503.89	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene), putative	196,86	1,79744E-12	196,86	0
131	TcCLB.507641.100	hypothetical protein, conserved	196,29	1,86353E-05	196,29	0
132	TcCLB.511295.20	hypothetical protein, conserved	196,29	1,86353E-05	196,29	0
133	TcCLB.506993.130	mucin-associated surface protein (MASP, pseudogene),	195,64	1,79744E-	195,64	0

		putative		12		
134	TcCLB.511827.30	hypothetical protein	194,83	1,79744E-12	194,83	0
135	TcCLB.511285.70	hypothetical protein, conserved	193,24	1,79744E-12	193,24	0
136	TcCLB.508461.330	hypothetical protein	192,85	1,79744E-12	192,85	0
137	TcCLB.509253.50	recombination initiation protein NBS1, putative	192,85	1,79744E-12	192,85	0
138	TcCLB.507031.140	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	190,90	1,79744E-12	190,90	0
139	TcCLB.508879.40	hypothetical protein, conserved	190,77	1,86353E-05	190,77	0
140	TcCLB.504643.49	hypothetical protein, conserved (fragment)	188,25	1,79744E-12	188,25	0
141	TcCLB.509745.40	hypothetical protein, conserved	187,87	1,79744E-12	187,87	0
142	TcCLB.509683.20	hypothetical protein, conserved	187,13	1,79744E-12	187,13	0
143	TcCLB.506925.500	hypothetical protein, conserved	186,39	1,79744E-12	186,39	0
144	TcCLB.507031.10	hypothetical protein, conserved	186,27	1,79744E-12	186,27	0
145	TcCLB.506839.70	NADH dehydrogenase, putative	184,58	1,79744E-12	184,58	0
146	TcCLB.508881.80	DNA ligase, putative, mitochondrial DNA ligase homolog, putative	181,39	1,79744E-12	181,39	0
147	TcCLB.508027.90	hypothetical protein, conserved	180,70	1,79744E-12	180,70	0

148	TcCLB.504153.310	heat shock protein, putative	180,61	1,86353E-05	180,61	0
149	TcCLB.510819.90	hypothetical protein, conserved	179,65	1,86353E-05	179,65	0
150	TcCLB.511647.60	hypothetical protein, conserved	179,33	1,79744E-12	179,33	0
151	TcCLB.510659.104	poly(ADP-ribose) glycohydrolase, putative	175,35	1,79744E-12	175,35	0
152	TcCLB.511723.10	surface protease GP63, putative, metallopeptidase, putative	174,06	1,79744E-12	174,06	0
153	TcCLB.504073.10	endonuclease/exonuclease/phosphatase, putative	173,74	1,79744E-12	173,74	0
154	TcCLB.506559.270	sarcoplasmic reticulum glycoprotein, putative	173,42	1,79744E-12	173,42	0
155	TcCLB.504147.50	amino acid transporter (pseudogene), putative	169,08	1,79744E-12	169,08	0
156	TcCLB.505115.10	hypothetical protein, conserved	168,78	1,79744E-12	168,78	0
157	TcCLB.511827.70	hypothetical protein, conserved	168,48	1,79744E-12	168,48	0
158	TcCLB.505997.190	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	168,28	1,86353E-05	168,28	0
159	TcCLB.507939.50	hypothetical protein, conserved	167,04	1,86353E-05	167,04	0
160	TcCLB.508827.20	hypothetical protein, conserved	166,12	1,79744E-12	166,12	0
161	TcCLB.507209.60	hypothetical protein, conserved	165,41	1,86353E-05	165,41	0
162	TcCLB.510663.50	hypothetical protein, conserved	163,82	1,79744E-12	163,82	0

163	TcCLB.509791.90	hypothetical protein, conserved	162,69	1,79744E-12	162,69	0
164	TcCLB.508503.40	hypothetical protein, conserved	162,41	1,79744E-12	162,41	0
165	TcCLB.507711.30	hypothetical protein, conserved	161,58	1,79744E-12	161,58	0
166	TcCLB.438313.9	dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	161,12	1,79744E-12	161,12	0
167	TcCLB.506789.160	hypothetical protein, conserved	160,49	1,79744E-12	160,49	0
168	TcCLB.509259.120	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	159,68	1,79744E-12	159,68	0
169	TcCLB.510691.20	hypothetical protein, conserved	159,68	1,79744E-12	159,68	0
170	TcCLB.511185.80	trans-sialidase, Group V, putative	159,20	1,86353E-05	159,20	0
171	TcCLB.476421.9	protein kinase, putative	159,14	1,79744E-12	159,14	0
172	TcCLB.508153.900	hypothetical protein, conserved	159,01	1,86353E-05	159,01	0
173	TcCLB.504089.50	flagellar radial spoke component, putative	158,61	1,79744E-12	158,61	0
174	TcCLB.508479.290	vacuolar sorting protein, putative	158,34	1,79744E-12	158,34	0
175	TcCLB.511909.10	hypothetical protein, conserved	158,34	1,79744E-12	158,34	0
176	TcCLB.506315.10	hypothetical protein	157,81	1,79744E-12	157,81	0
177	TcCLB.507093.180	transcription factor IIIb, putative	157,03	1,79744E-12	157,03	0

178	TcCLB.508817.20	hypothetical protein	157,03	1,79744E-12	157,03	0
179	TcCLB.508641.90	hypothetical protein, conserved	156,64	1,79744E-12	156,64	0
180	TcCLB.509843.20	trans-sialidase, Group VII, putative	155,37	1,86353E-05	155,37	0
181	TcCLB.504213.110	Putrescine-cadaverine transporter (POT1.1)	154,21	1,79744E-12	154,21	0
182	TcCLB.509683.80	adenylosuccinate synthetase, putative	153,46	1,79744E-12	153,46	0
183	TcCLB.510069.20	protein associated with differentiation 4, putative, protein associated with differentiation 8, putative, protein associated with differentiation 7, putative, hypothetical protein, conserved	153,22	1,79744E-12	153,22	0
184	TcCLB.510305.70	hypothetical protein, conserved	152,97	1,79744E-12	152,97	0
185	TcCLB.511911.110	RNA helicase, putative	152,48	1,79744E-12	152,48	0
186	TcCLB.508077.9	conserved protein (fragment)	151,74	1,79744E-12	151,74	0
187	TcCLB.510901.250	hypothetical protein, conserved	150,30	1,79744E-12	150,30	0
188	TcCLB.511391.90	endosomal integral membrane protein, putative	150,30	1,79744E-12	150,30	0
189	TcCLB.511261.10	hypothetical protein, conserved	150,21	1,86353E-05	150,21	0
190	TcCLB.508177.10	hypothetical protein, conserved	150,06	1,79744E-12	150,06	0
191	TcCLB.511861.90	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	149,82	1,79744E-12	149,82	0

192	TcCLB.509073.40	outer dynein arm docking complex protein (DC2)	145,23	1,79744E-12	145,23	0
193	TcCLB.506977.120	hypothetical protein, conserved	144,29	1,86353E-05	144,29	0
194	TcCLB.510419.20	trans-sialidase, Group VI, putative	144,14	1,86353E-05	144,14	0
195	TcCLB.504051.30	hypothetical protein, conserved	142,17	1,79744E-12	142,17	0
196	TcCLB.506789.210	paraflagellar rod protein, putative	141,32	1,79744E-12	141,32	0
197	TcCLB.510655.110	poly(A)-specific ribonuclease PARN, putative	141,11	1,79744E-12	141,11	0
198	TcCLB.504149.100	hypothetical protein, conserved	140,69	1,79744E-12	140,69	0
199	TcCLB.507591.15	trans-sialidase (pseudogene), putative	140,69	1,79744E-12	140,69	0
200	TcCLB.510007.50	hypothetical protein, conserved	140,49	1,79744E-12	140,49	0
201	TcCLB.503851.10	Elongator-like Protein 3a, putative	139,45	1,79744E-12	139,45	0
202	TcCLB.508897.90	hypothetical protein, conserved	137,63	1,79744E-12	137,63	0
203	TcCLB.506559.450	hypothetical protein	137,15	1,86353E-05	137,15	0
204	TcCLB.503781.50	hypothetical protein, conserved	135,46	1,79744E-12	135,46	0
205	TcCLB.509065.110	hypothetical protein, conserved	134,50	1,79744E-12	134,50	0
206	TcCLB.508707.190	hypothetical protein, conserved	132,99	1,79744E-12	132,99	0



207	TcCLB.507019.10	protein kinase, putative	132,62	1,79744E-12	132,62	0
208	TcCLB.509053.20	hypothetical protein, conserved	132,43	1,79744E-12	132,43	0
209	TcCLB.506459.30	trans-sialidase (pseudogene), putative	131,51	1,79744E-12	131,51	0
210	TcCLB.507041.10	hypothetical protein, conserved	131,15	1,79744E-12	131,15	0
211	TcCLB.504131.160	hypothetical protein	130,42	1,79744E-12	130,42	0
212	TcCLB.510099.70	hypothetical protein, conserved	128,93	1,86353E-05	128,93	0
213	TcCLB.507901.30	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	128,65	1,79744E-12	128,65	0
214	TcCLB.507093.130	hypothetical protein, conserved	126,42	1,79744E-12	126,42	0
215	TcCLB.507991.80	hypothetical protein, conserved	125,25	1,79744E-12	125,25	0
216	TcCLB.510729.130	DNA replication licensing factor MCM9, putative	124,59	1,79744E-12	124,59	0
217	TcCLB.511859.100	trans-sialidase (pseudogene), putative	124,59	1,79744E-12	124,59	0
218	TcCLB.510901.220	hypothetical protein, conserved	121,08	1,79744E-12	121,08	0
219	TcCLB.508153.740	hypothetical protein	119,71	1,79744E-12	119,71	0
220	TcCLB.506195.140	hypothetical protein, conserved	116,75	1,79744E-12	116,75	0
221	TcCLB.506857.80	kinesin, putative	116,61	1,79744E-12	116,61	0

222	TcCLB.506173.170	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	114,63	1,79744E-12	114,63	0
223	TcCLB.506791.10	CYC2-like cyclin 4, putative (CYC4)	114,08	1,79744E-12	114,08	0
224	TcCLB.509233.230	hypothetical protein, conserved	113,98	1,86353E-05	113,98	0
225	TcCLB.510139.20	surface protease GP63, putative	113,94	1,79744E-12	113,94	0
226	TcCLB.509805.40	Multisite-specific tRNA:(cytosine-C(5))-methyltransferase, putative	113,67	1,79744E-12	113,67	0
227	TcCLB.508777.90	ATP-dependent DNA helicase, putative	113,40	1,79744E-12	113,40	0
228	TcCLB.508909.330	protein kinase, putative	113,40	1,79744E-12	113,40	0
229	TcCLB.508909.200	hypothetical protein	111,54	1,86353E-05	111,54	0
230	TcCLB.510901.100	DNA topoisomerase III, putative	111,01	1,79744E-12	111,01	0
231	TcCLB.508317.70	hypothetical protein	110,49	1,79744E-12	110,49	0
232	TcCLB.506321.320	suppressive immunomodulating factor, putative (TSIF)	109,59	1,79744E-12	109,59	0
233	TcCLB.510653.19	hypothetical protein, conserved (fragment)	109,34	1,79744E-12	109,34	0
234	TcCLB.508853.20	trans-sialidase, Group V, putative	108,46	1,79744E-12	108,46	0
235	TcCLB.504253.50	hypothetical protein, conserved	108,34	1,79744E-12	108,34	0
236	TcCLB.506681.20	hypothetical protein, conserved	108,21	1,79744E-12	108,21	0

				12		
237	TcCLB.506503.140	extracellular receptor, putative	106,51	1,79744E-12	106,51	0
238	TcCLB.507105.10	beta prime cop protein, putative	106,51	1,79744E-12	106,51	0
239	TcCLB.509991.9	protein kinase, putative	103,88	1,79744E-12	103,88	0
240	TcCLB.511117.50	surface protease GP63, putative	103,48	1,79744E-12	103,48	0
241	TcCLB.511269.60	Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog, putative	103,15	1,79744E-12	103,15	0
242	TcCLB.511925.10	hypothetical protein, conserved	101,81	1,79744E-12	101,81	0
243	TcCLB.506529.160	hypothetical protein, conserved	100,95	1,79744E-12	100,95	0
244	TcCLB.507765.110	hypothetical protein, conserved	97,62	1,79744E-12	97,62	0
245	TcCLB.506575.9	hypothetical protein, conserved	96,65	1,79744E-12	96,65	0
246	TcCLB.508263.30	kinesin, putative	94,88	1,79744E-12	94,88	0
247	TcCLB.509777.70	Calcium ATPase SERCA-like	94,03	1,79744E-12	94,03	0
248	TcCLB.510797.10	2-oxoglutarate dehydrogenase subunit, putative	93,94	1,79744E-12	93,94	0
249	TcCLB.508217.9	dynein heavy chain, putative	92,05	1,79744E-12	92,05	0
250	TcCLB.510769.120	calcium motive p-type ATPase, putative	91,05	1,79744E-12	91,05	0
251	TcCLB.504047.40	kinesin, putative	90,35	1,79744E-12	90,35	0

				12		
252	TcCLB.503723.20	hypothetical protein, conserved	89,24	1,79744E-12	89,24	0
253	TcCLB.511753.110	hypothetical protein, conserved	87,35	1,79744E-12	87,35	0
254	TcCLB.503929.30	hypothetical protein, conserved	86,63	1,79744E-12	86,63	0
255	TcCLB.504001.6	protein kinase, putative	86,47	1,79744E-12	86,47	0
256	TcCLB.503919.60	hypothetical protein, conserved	85,85	1,86353E-05	85,85	0
257	TcCLB.504123.30	map kinase, putative	84,17	1,79744E-12	84,17	0
258	TcCLB.511907.190	hypothetical protein	83,57	1,79744E-12	83,57	0
259	TcCLB.510355.250	hypothetical protein, conserved	83,16	1,86353E-05	83,16	0
260	TcCLB.507007.80	hypothetical protein	82,77	1,79744E-12	82,77	0
261	TcCLB.506855.70	hypothetical protein, conserved	82,70	1,79744E-12	82,70	0
262	TcCLB.506947.110	myosin heavy chain (pseudogene), putative, myosin heavy chain, putative, frameshift	82,55	1,79744E-12	82,55	0
263	TcCLB.506317.20	hypothetical protein, conserved	82,27	1,79744E-12	82,27	0
264	TcCLB.509895.40	hypothetical protein, conserved	81,21	1,79744E-12	81,21	0
265	TcCLB.507969.10	vesicular transport-associated repeat protein, putative	80,59	1,79744E-12	80,59	0
266	TcCLB.503715.40	protein kinase, putative	80,31	1,79744E-12	80,31	0

				12		
267	TcCLB.506127.90	hypothetical protein, conserved	79,97	1,79744E-12	79,97	0
268	TcCLB.511649.80	myosin heavy chain, putative	79,90	1,79744E-12	79,90	0
269	TcCLB.508257.80	hypothetical protein, conserved	78,64	1,79744E-12	78,64	0
270	TcCLB.508515.110	hypothetical protein, conserved	78,19	1,79744E-12	78,19	0
271	TcCLB.507009.60	hypothetical protein, conserved	77,68	1,79744E-12	77,68	0
272	TcCLB.509255.10	hypothetical protein, conserved	77,63	0	77,63	0
273	TcCLB.508601.110	hypothetical protein, conserved	75,81	1,79744E-12	75,81	0
274	TcCLB.506989.300	receptor-type adenylate cyclase (pseudogene), putative, receptor-type adenylate cyclase, putative, degenerate	75,69	1,79744E-12	75,69	0
275	TcCLB.506737.40	hypothetical protein, conserved	75,03	1,79744E-12	75,03	0
276	TcCLB.504147.250	hypothetical protein, conserved	73,68	1,86353E-05	73,68	0
277	TcCLB.506559.190	dual specificity protein phosphatase, putative	73,63	1,79744E-12	73,63	0
278	TcCLB.511481.60	RNA helicase, putative	73,12	1,79744E-12	73,12	0
279	TcCLB.510105.200	hypothetical protein, conserved	72,12	1,79744E-12	72,12	0
280	TcCLB.508409.240	hypothetical protein, conserved	72,06	1,79744E-12	72,06	0
281	TcCLB.509505.20	hypothetical protein, conserved	71,57	1,79744E-12	71,57	0

282	TcCLB.503925.70	hypothetical protein, conserved	67,78	1,79744E-12	67,78	0
283	TcCLB.511885.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	67,01	1,79744E-12	67,01	0
284	TcCLB.511727.30	hypothetical protein, conserved	65,08	1,79744E-12	65,08	0
285	TcCLB.508911.60	hypothetical protein, conserved	63,08	1,79744E-12	63,08	0
286	TcCLB.504171.50	hypothetical protein, conserved	62,17	1,79744E-12	62,17	0
287	TcCLB.506401.280	hypothetical protein, conserved	61,05	1,79744E-12	61,05	0
288	TcCLB.506287.80	hypothetical protein, conserved	59,89	1,79744E-12	59,89	0
289	TcCLB.509631.140	flagellar attachment zone protein, putative (FAZ1)	59,63	1,79744E-12	59,63	0
290	TcCLB.511239.60	hypothetical protein, conserved	57,01	1,79744E-12	57,01	0
291	TcCLB.511245.200	hypothetical protein, conserved	57,01	1,79744E-12	57,01	0
292	TcCLB.506347.10	dynein heavy chain (pseudogene), putative	56,97	1,86353E-05	56,97	0
293	TcCLB.511293.60	kinesin, putative	56,80	1,79744E-12	56,80	0
294	TcCLB.511507.30	cyclosome subunit, putative	51,86	1,79744E-12	51,86	0
295	TcCLB.509059.40	hypothetical protein, conserved	50,88	1,79744E-12	50,88	0
296	TcCLB.473703.10	surface protease GP63, putative	5,27	0	25287,25	4797,06

**Tabela 4.7. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG em epimastigota (Fold Change >4; FDR < 0,01).**

	<b>Identificação (TriTrypDB)</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fold Change</b>	<b>FDR</b>	<b>Média Experimento</b>	<b>Média Controle</b>
1	TcCLB.509005.91	ribosomal RNA large subunit beta, 5' partial	30915,04	0	30915,04	0
2	TcCLB.511635.10	histone H2B, putative	1165,55	0	1165,55	0
3	TcCLB.411235.9	alpha tubulin, putative	483,28	0	483,28	0
4	TcCLB.477629.10	ribosomal RNA small subunit, 3' partial	333,77	0	333,77	0
5	TcCLB.506563.40	beta tubulin, putative	316,86	0	316,86	0
6	TcCLB.495775.20	C/D small nucleolar RNA (snoRNA), TB9C2C1	275,28	0,01274	275,28	0
7	TcCLB.506275.121	hypothetical protein	243,72	0	243,72	0
8	TcCLB.508441.20	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	242,30	0	242,30	0
9	TcCLB.509671.80	60S ribosomal protein L5, putative	224,48	0	224,48	0
10	TcCLB.511903.130	60S ribosomal protein L26, putative	210,34	1,59E-12	210,34	0
11	TcCLB.508741.40	mucin TcSMUGS, putative	192,75	0	192,75	0
12	TcCLB.508197.10	60S ribosomal protein L11, putative	192,05	0	192,05	0
13	TcCLB.511903.110	40S ribosomal protein S8, putative	170,37	0	170,37	0
14	TcCLB.505683.5	hypothetical protein	168,43	0	168,43	0
15	TcCLB.511727.290	RNA-binding protein, putative	162,59	0	162,59	0
16	TcCLB.506679.140	40S ribosomal protein S10, putative	157,12	7,62E-05	157,12	0
17	TcCLB.511391.110	histone-lysine N-methyltransferase, putative (DOT1A)	155,25	2,16E-06	155,25	0
18	TcCLB.510663.30	60S ribosomal subunit protein L31, putative	152,37	2,41E-06	152,37	0
19	TcCLB.507681.160	40S ribosomal protein S24E, putative	151,69	9,65E-07	151,69	0

20	TcCLB.509713.30	hypothetical protein, conserved	149,91	0	149,91	0
21	TcCLB.508461.480	60S ribosomal protein L23, putative	146,81	0	146,81	0
22	TcCLB.510225.10	histone H1, putative	142,83	0	142,83	0
23	TcCLB.506815.60	60S ribosomal protein L44 (RPL44)	138,94	0	138,94	0
24	TcCLB.508461.510	60S ribosomal protein L27A/L29, putative	135,71	0	135,71	0
25	TcCLB.506679.150	40S ribosomal protein S10, putative	135,29	2,93E-09	135,29	0
26	TcCLB.508543.30	40S ribosomal protein S9, putative	134,03	0	134,03	0
27	TcCLB.506959.140	hypothetical protein, conserved	133,17	0	133,17	0
28	TcCLB.504013.11	ribosomal protein L13, putative (fragment)	129,14	0	129,14	0
29	TcCLB.503395.50	40S ribosomal protein S12, putative	125,75	0	125,75	0
30	TcCLB.508111.30	glutamate dehydrogenase, putative	125,45	0	125,45	0
31	TcCLB.507251.20	ribosomal protein L21E (60S), putative	118,08	0,000208	118,08	0
32	TcCLB.508827.79	40S ribosomal protein S17, putative	117,35	4,41E-11	117,35	0
33	TcCLB.508049.40	hypothetical protein, conserved	116,19	1,99E-06	116,19	0
34	TcCLB.506213.60	40S ribosomal protein S2, putative	115,60	5,17E-11	115,60	0
35	TcCLB.506925.300	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin a, putative (CYPA)	115,26	9,2E-05	115,26	0
36	TcCLB.506577.54	60S ribosomal protein L6, putative	114,60	4,06E-12	114,60	0
37	TcCLB.506315.50	60S ribosomal protein L13a, putative	113,26	0	113,26	0
38	TcCLB.506679.94	40S ribosomal protein S18, putative	109,95	2,7E-14	109,95	0
39	TcCLB.509003.70	beta tubulin (pseudogene), putative	106,51	0	106,51	0
40	TcCLB.511559.50	hypothetical protein, conserved	101,42	0	101,42	0
41	TcCLB.471237.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	101,25	0,000912	101,25	0
42	TcCLB.510835.40	60S ribosomal protein L7a, putative	100,18	0	100,18	0



43	TcCLB.422955.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	98,66	7,93E-07	98,66	0
44	TcCLB.506925.120	eukaryotic initiation factor 5a, putative	98,48	0	98,48	0
45	TcCLB.511231.80	basic transcription factor 3a, putative	96,57	0	96,57	0
46	TcCLB.419169.10	ribosomal RNA large subunit delta (M2), 5' partial	96,18	0,004881	96,18	0
47	TcCLB.509471.68	histone H3, putative	96,06	2,91E-07	96,06	0
48	TcCLB.511277.175	ribosomal protein S27, putative	94,52	0	94,52	0
49	TcCLB.511211.170	heat shock protein 70 (hsp70), putative	94,31	0	94,31	0
50	TcCLB.511727.270	RNA-binding protein, putative	93,52	0	93,52	0
51	TcCLB.504147.120	60S ribosomal protein L22, putative	92,63	0	92,63	0
52	TcCLB.509693.20	plectin, putative	91,83	0	91,83	0
53	TcCLB.508823.20	hypothetical protein, conserved	90,57	0,000203	90,57	0
54	TcCLB.508355.260	60S acidic ribosomal protein P0, putative (P0)	89,74	0	89,74	0
55	TcCLB.503801.20	ribosomal protein S26, putative	88,47	0	88,47	0
56	TcCLB.509749.33	ribosomal protein L29, putative	88,11	0,011835	88,11	0
57	TcCLB.504191.10	sterol 24-c-methyltransferase, putative	87,23	0	87,23	0
58	TcCLB.508741.80	mucin TcSMUGS, putative	86,34	5,34E-08	86,34	0
59	TcCLB.509165.40	60S acidic ribosomal protein P2 beta (H6.4), putative (P2-beta (H6.4))	85,95	0	85,95	0
60	TcCLB.510323.30	60S ribosomal protein L13, putative	84,89	0	84,89	0
61	TcCLB.511807.220	hypothetical protein	83,72	1,75E-13	83,72	0
62	TcCLB.511717.30	chromosomal passenger protein, putative (CPC1)	82,37	0	82,37	0
63	TcCLB.506297.270	60S ribosomal protein L28, putative	82,21	6,25E-11	82,21	0
64	TcCLB.511545.80	L-Lysine transport protein	80,81	1,17E-10	80,81	0
65	TcCLB.508153.184	60S ribosomal protein L39, putative	78,97	0	78,97	0

66	TcCLB.511467.4	hypothetical protein, conserved	77,34	1,09E-06	77,34	0
67	TcCLB.510039.90	60S ribosomal protein L35, putative	76,58	1,48E-12	76,58	0
68	TcCLB.510943.26	ribosomal protein L38, putative	76,28	0	76,28	0
69	TcCLB.509617.20	paraflagellar rod protein 3, putative (PAR3)	75,36	0	75,36	0
70	TcCLB.504539.30	mucin TcSMUGL, putative	75,32	0	75,32	0
71	TcCLB.503899.30	40S ribosomal protein S16, putative	74,30	1,23E-05	74,30	0
72	TcCLB.509429.320	cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, clan CA, family C1, cathepsin L-like, putative	73,00	0	73,00	0
73	TcCLB.506147.9	prostaglandin F2alpha synthase, dehydrogenase, putative, NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase, putative (TcPGFS)	72,68	0	72,68	0
74	TcCLB.506925.130	eukaryotic initiation factor 5a, putative	72,46	0	72,46	0
75	TcCLB.511811.10	40S ribosomal protein S15, putative	72,18	2,11E-13	72,18	0
76	TcCLB.506945.230	40S ribosomal protein S14, putative	71,72	0	71,72	0
77	TcCLB.508551.20	40S ribosomal protein S12, putative	71,20	2,4E-07	71,20	0
78	TcCLB.504223.10	amino acid permease, putative	70,48	8,48E-08	70,48	0
79	TcCLB.510437.20	60S ribosomal protein L14, putative	69,65	5,9E-05	69,65	0
80	TcCLB.511211.160	heat shock protein 70 (hsp70), putative	69,42	0	69,42	0
81	TcCLB.506405.149	ribosomal protein L21E (60S), putative	69,20	0	69,20	0
82	TcCLB.506983.39	calpain-like cysteine peptidase, putative	69,03	2,12E-09	69,03	0
83	TcCLB.507519.110	60S ribosomal protein L7, putative	68,93	0	68,93	0
84	TcCLB.507105.50	hypothetical protein	67,76	8,85E-07	67,76	0
85	TcCLB.503709.20	60S ribosomal protein L44, putative (fragment)	67,33	0,000101	67,33	0
86	TcCLB.507641.233	ribosomal protein L37, putative	67,00	0	67,00	0
87	TcCLB.511277.60	alcohol dehydrogenase, putative	66,61	0	66,61	0

88	TcCLB.504929.5	hypothetical protein, conserved	66,57	5,68E-11	66,57	0
89	TcCLB.508999.250	calpain-like cysteine peptidase (pseudogene), putative, calpain-like cysteine peptidase, clan CA, family C2, putative (pseudogene)	66,53	0	66,53	0
90	TcCLB.510243.40	60S ribosomal protein L10, putative	66,46	2,15E-05	66,46	0
91	TcCLB.507019.86	40S ribosomal protein S30, putative	66,41	0,000152	66,41	0
92	TcCLB.504181.10	60S ribosomal protein L9, putative	66,03	0	66,03	0
93	TcCLB.506559.470	ribosomal protein l35a, putative	65,86	0	65,86	0
94	TcCLB.506853.10	hypothetical protein, conserved	65,85	9,32E-07	65,85	0
95	TcCLB.508017.30	amino acid transporter, putative (fragment)	65,37	0	65,37	0
96	TcCLB.510579.70	nascent polypeptide associated complex subunit, putative	65,34	0,001065	65,34	0
97	TcCLB.504105.94	ribosomal protein S25, putative	64,99	0	64,99	0
98	TcCLB.511277.160	60S ribosomal protein L10a, putative	64,33	4,95E-15	64,33	0
99	TcCLB.509003.30	calpain-like cysteine peptidase, putative, calpain-like cysteine peptidase, clan CA, family C2, putative	62,81	1,44E-07	62,81	0
100	TcCLB.508039.70	hypothetical protein, conserved	62,46	1,04E-05	62,46	0
101	TcCLB.509353.30	40S ribosomal protein S3, putative	61,82	4,95E-15	61,82	0
102	TcCLB.503719.20	40S ribosomal protein SA, putative	61,78	1,66E-12	61,78	0
103	TcCLB.510755.129	60S ribosomal protein L12, putative	61,39	0,011294	61,39	0
104	TcCLB.511215.119	69 kDa paraflagellar rod protein, putative	61,16	0	61,16	0
105	TcCLB.508707.200	nucleoside diphosphate kinase (NDPK1)	60,01	0	60,01	0
106	TcCLB.507019.83	40S ribosomal protein S30, putative	59,70	0,0064	59,70	0
107	TcCLB.511211.120	receptor for activated C kinase 1, putative	59,69	0	59,69	0
108	TcCLB.511825.130	hypothetical protein	59,64	4,34E-07	59,64	0
109	TcCLB.505171.30	hypothetical protein, conserved	59,44	0	59,44	0

110	TcCLB.509147.50	mucin TcSMUGL, putative	59,00	2,48E-15	59,00	0
111	TcCLB.509683.117	40S ribosomal protein S4, putative	57,98	0	57,98	0
112	TcCLB.511907.260	cell division cycle protein 20, putative (CDC20)	57,91	0	57,91	0
113	TcCLB.511233.7	60S ribosomal protein L10a, putative	57,90	0,008369	57,90	0
114	TcCLB.508405.70	protein kinase, putative	57,64	0	57,64	0
115	TcCLB.508823.120	ribosomal protein S20, putative	57,55	1,15E-06	57,55	0
116	TcCLB.511237.50	40S ribosomal protein S33, putative	57,49	0	57,49	0
117	TcCLB.509747.20	60S ribosomal protein L22, putative	57,47	5,75E-07	57,47	0
118	TcCLB.507765.70	40S ribosomal protein S21, putative	57,44	6,34E-13	57,44	0
119	TcCLB.511725.130	hypothetical protein, conserved	56,60	0	56,60	0
120	TcCLB.511727.129	ribosomal protein L18, putative	56,34	2,48E-15	56,34	0
121	TcCLB.508881.70	DNA ligase, putative, mitochondrial DNA ligase homolog, putative	55,70	0,000262	55,70	0
122	TcCLB.511807.120	hypothetical protein, conserved	55,60	3,66E-07	55,60	0
123	TcCLB.511511.6	zinc finger protein ZFP1	55,35	0	55,35	0
124	TcCLB.511233.14	40S ribosomal protein S27, putative	55,30	6,25E-06	55,30	0
125	TcCLB.506593.30	ribosomal protein S7, putative	55,10	6E-10	55,10	0
126	TcCLB.509233.190	ribosomal protein S25, putative	54,66	0	54,66	0
127	TcCLB.509353.60	calmodulin, putative	54,41	0	54,41	0
128	TcCLB.511287.30	60S ribosomal protein L17, putative	53,22	0	53,22	0
129	TcCLB.510877.10	antigenic protein, putative	53,10	0	53,10	0
130	TcCLB.505763.10	proton motive ATPase 1, putative	52,75	9,15E-08	52,75	0
131	TcCLB.511753.130	U3 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), putative, stage specific peptide 24, putative	52,38	0,000762	52,38	0
132	TcCLB.504147.210	hypothetical protein, conserved	52,33	0	52,33	0

133	TcCLB.511479.39	hypothetical protein, conserved	52,10	0,007462	52,10	0
134	TcCLB.510065.30	translationally controlled tumor protein (TCTP), putative	51,93	0,00161	51,93	0
135	TcCLB.509671.70	ribosomal protein L15, putative	51,69	2,1E-07	51,69	0
136	TcCLB.504021.109	40S ribosomal protein S3, putative	51,42	0	51,42	0
137	TcCLB.504013.100	ribosomal protein S19, putative	51,11	0	51,11	0
138	TcCLB.509793.40	kinetoplast-associated protein (TcKAP4)	50,53	2,34E-05	50,53	0
139	TcCLB.505999.20	phosphate-repressible phosphate permease, putative	50,07	0	50,07	0
140	TcCLB.506241.170	40S ribosomal protein S6, putative	50,02	0	50,02	0
141	TcCLB.411483.20	ribosomal RNA large subunit gamma (M1)	19,84	0	276335,63	13930,70
142	TcCLB.473013.10	ribosomal RNA small subunit, 5' & 3' partial	19,35	0	131320,27	6787,50
143	TcCLB.411483.30	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' partial	14,90	2,63E-12	95106,39	6384,35
144	TcCLB.463637.10	ribosomal RNA small subunit, 5' partial	12,08	0	70127,64	5804,46
145	TcCLB.445323.10	ribosomal RNA small subunit, 5' & 3' partial	9,87	0,004658	40350,71	4089,75
146	TcCLB.411483.10	ribosomal RNA large subunit beta, 3' partial	7,52	0	112928,83	15022,04
147	TcCLB.467149.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 3' partial	7,50	0	23229,67	3097,52
148	TcCLB.467341.10	ribosomal RNA small subunit, 3' partial	7,24	5,1E-05	10926,15	1509,16
149	TcCLB.504153.50	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	6,40	0	30953,88	4834,68
150	TcCLB.436429.10	ribosomal RNA large subunit beta, 3' partial	5,47	0	38114,57	6962,96

Tabela 4.8. Transcritos enriquecidos na imunoprecipitação de ZFPTTP-FLAG em estresse (Fold Change >4; FDR < 0,01).

	Identificação (TriTrypDB)	Descrição	Fold Change	FDR	Média	Média Controle
1	TcCLB.511635.10	histone H2B, putative	1056,38	3,96E-09	1056,38	0
2	TcCLB.508461.80	prostaglandin F2alpha synthase (TcPGFS)	378,05	0	378,05	0
3	TcCLB.506563.40	beta tubulin, putative	377,22	0	377,22	0
4	TcCLB.477629.10	ribosomal RNA small subunit, 3' partial	304,03	2,78E-07	304,03	0
5	TcCLB.508461.510	60S ribosomal protein L27A/L29, putative	291,10	1,63E-14	291,10	0
6	TcCLB.506275.121	hypothetical protein	288,64	0	288,64	0
7	TcCLB.509671.80	60S ribosomal protein L5, putative	278,91	0	278,91	0
8	TcCLB.506679.140	40S ribosomal protein S10, putative	274,67	1,04E-05	274,67	0
9	TcCLB.511903.130	60S ribosomal protein L26, putative	267,63	0	267,63	0
10	TcCLB.511903.110	40S ribosomal protein S8, putative	264,05	4,83E-13	264,05	0
11	TcCLB.508197.10	60S ribosomal protein L11, putative	263,71	0	263,71	0
12	TcCLB.507681.160	40S ribosomal protein S24E, putative	258,49	0	258,49	0
13	TcCLB.510663.30	60S ribosomal subunit protein L31, putative	249,20	0	249,20	0
14	TcCLB.508461.480	60S ribosomal protein L23, putative	234,56	0	234,56	0
15	TcCLB.508543.30	40S ribosomal protein S9, putative	228,69	4,29E-09	228,69	0
16	TcCLB.506679.94	40S ribosomal protein S18, putative	203,33	0	203,33	0
17	TcCLB.506925.300	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin a, putative (CYPA)	193,14	5,33E-05	193,14	0
18	TcCLB.506815.60	60S ribosomal protein L44 (RPL44)	180,50	8,6E-08	180,50	0
19	TcCLB.508741.40	mucin TcSMUGS, putative	179,48	0	179,48	0
20	TcCLB.508441.20	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	175,64	0	175,64	0

21	TcCLB.507251.20	ribosomal protein L21E (60S), putative	170,85	0	170,85	0
22	TcCLB.508461.76	C/D small nucleolar RNA (snoRNA), TB9C2C1	170,01	0,001412	170,01	0
23	TcCLB.506679.150	40S ribosomal protein S10, putative	169,87	8,31E-11	169,87	0
24	TcCLB.508153.184	60S ribosomal protein L39, putative	168,38	0,008305	168,38	0
25	TcCLB.511277.175	ribosomal protein S27, putative	163,90	5,12E-10	163,90	0
26	TcCLB.510039.90	60S ribosomal protein L35, putative	148,94	1,61E-13	148,94	0
27	TcCLB.511717.30	chromosomal passenger protein, putative (CPC1)	145,24	6,13E-12	145,24	0
28	TcCLB.507019.86	40S ribosomal protein S30, putative	142,77	1,53E-07	142,77	0
29	TcCLB.504013.11	ribosomal protein L13, putative (fragment)	141,29	0	141,29	0
30	TcCLB.510755.129	60S ribosomal protein L12, putative	137,79	4,66E-08	137,79	0
31	TcCLB.506297.270	60S ribosomal protein L28, putative	137,59	0	137,59	0
32	TcCLB.510323.30	60S ribosomal protein L13, putative	136,13	4,09E-07	136,13	0
33	TcCLB.503709.20	60S ribosomal protein L44, putative (fragment)	128,85	0	128,85	0
34	TcCLB.506405.149	ribosomal protein L21E (60S), putative	128,23	1,77E-07	128,23	0
35	TcCLB.506925.120	eukaryotic initiation factor 5a, putative	128,21	0	128,21	0
36	TcCLB.507019.83	40S ribosomal protein S30, putative	126,71	0	126,71	0
37	TcCLB.471237.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	125,49	0	125,49	0
38	TcCLB.508551.20	40S ribosomal protein S12, putative	125,36	0	125,36	0
39	TcCLB.504181.10	60S ribosomal protein L9, putative	122,62	0	122,62	0
40	TcCLB.511811.10	40S ribosomal protein S15, putative	121,79	0	121,79	0
41	TcCLB.511231.80	basic transcription factor 3a, putative	120,70	1,82E-08	120,70	0
42	TcCLB.506213.60	40S ribosomal protein S2, putative	117,29	0	117,29	0
43	TcCLB.510437.20	60S ribosomal protein L14, putative	116,79	4,25E-14	116,79	0

44	TcCLB.511559.50	hypothetical protein, conserved	115,26	0	115,26	0
45	TcCLB.506559.470	ribosomal protein l35a, putative	114,37	0	114,37	0
46	TcCLB.506925.130	eukaryotic initiation factor 5a, putative	113,80	2,14E-06	113,80	0
47	TcCLB.510243.40	60S ribosomal protein L10, putative	112,71	6,25E-07	112,71	0
48	TcCLB.503801.20	ribosomal protein S26, putative	112,48	6,92E-09	112,48	0
49	TcCLB.506577.54	60S ribosomal protein L6, putative	112,18	5,78E-11	112,18	0
50	TcCLB.422955.10	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	112,05	1,65E-06	112,05	0
51	TcCLB.507105.50	hypothetical protein	110,82	0	110,82	0
52	TcCLB.504147.120	60S ribosomal protein L22, putative	110,51	7,09E-06	110,51	0
53	TcCLB.507519.110	60S ribosomal protein L7, putative	110,09	0	110,09	0
54	TcCLB.511287.30	60S ribosomal protein L17, putative	110,02	1,83E-14	110,02	0
55	TcCLB.511727.290	RNA-binding protein, putative	107,27	4,26E-08	107,27	0
56	TcCLB.503395.50	40S ribosomal protein S12, putative	105,19	0	105,19	0
57	TcCLB.509165.40	60S acidic ribosomal protein P2 beta (H6.4), putative (P2-beta (H6.4))	104,99	0	104,99	0
58	TcCLB.495775.20	C/D small nucleolar RNA (snoRNA), TB9C2C1	104,22	9,33E-08	104,22	0
59	TcCLB.506885.14	ribosomal protein L37, putative	100,95	2,6E-05	100,95	0
60	TcCLB.506593.30	ribosomal protein S7, putative	99,72	0	99,72	0
61	TcCLB.504191.10	sterol 24-c-methyltransferase, putative	99,60	8,46E-07	99,60	0
62	TcCLB.509471.68	histone H3, putative	99,39	0,004512	99,39	0
63	TcCLB.509003.70	beta tubulin (pseudogene), putative	99,30	0	99,30	0
64	TcCLB.508823.20	hypothetical protein, conserved	99,28	0,00015	99,28	0
65	TcCLB.510835.40	60S ribosomal protein L7a, putative	98,33	6,35E-13	98,33	0
66	TcCLB.419169.10	ribosomal RNA large subunit delta (M2), 5' partial	97,59	0,000649	97,59	0



67	TcCLB.507765.70	40S ribosomal protein S21, putative	96,94	1,59E-09	96,94	0
68	TcCLB.507641.233	ribosomal protein L37, putative	96,36	1,32E-06	96,36	0
69	TcCLB.506945.230	40S ribosomal protein S14, putative	95,27	0	95,27	0
70	TcCLB.511545.80	L-Lysine transport protein	93,58	5,63E-07	93,58	0
71	TcCLB.508881.70	DNA ligase, putative, mitochondrial DNA ligase homolog, putative	93,09	0	93,09	0
72	TcCLB.508355.260	60S acidic ribosomal protein P0, putative (P0)	92,43	0	92,43	0
73	TcCLB.511233.14	40S ribosomal protein S27, putative	92,36	1,75E-07	92,36	0
74	TcCLB.509695.170	60S ribosomal protein L9, putative	91,79	0,002281	91,79	0
75	TcCLB.508177.40	hypothetical protein, conserved	91,55	6,46E-14	91,55	0
76	TcCLB.511727.129	ribosomal protein L18, putative	90,69	0	90,69	0
77	TcCLB.510225.10	histone H1, putative	89,51	0	89,51	0
78	TcCLB.509353.30	40S ribosomal protein S3, putative	87,04	2,03E-14	87,04	0
79	TcCLB.504013.100	ribosomal protein S19, putative	85,92	0	85,92	0
80	TcCLB.509233.190	ribosomal protein S25, putative	85,75	0,002712	85,75	0
81	TcCLB.506853.10	hypothetical protein, conserved	85,71	7,55E-08	85,71	0
82	TcCLB.508823.120	ribosomal protein S20, putative	85,28	8,32E-10	85,28	0
83	TcCLB.506315.50	60S ribosomal protein L13a, putative	83,57	5,03E-05	83,57	0
84	TcCLB.509747.20	60S ribosomal protein L22, putative	83,39	0,000679	83,39	0
85	TcCLB.508413.44	60S ribosomal protein L12, putative	82,42	5,06E-14	82,42	0
86	TcCLB.509429.320	cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, clan CA, family C1, cathepsin L-like, putative	82,25	4,37E-13	82,25	0
87	TcCLB.511907.260	cell division cycle protein 20, putative (CDC20)	81,36	7,74E-12	81,36	0
88	TcCLB.503449.10	60S ribosomal protein L17, putative	78,78	0	78,78	0
89	TcCLB.503899.30	40S ribosomal protein S16, putative	75,53	3,22E-06	75,53	0

90	TcCLB.509683.117	40S ribosomal protein S4, putative	75,24	0	75,24	0
91	TcCLB.511233.20	60S ribosomal protein L34, putative	74,19	0	74,19	0
92	TcCLB.511135.20	hypothetical protein, conserved	73,79	0	73,79	0
93	TcCLB.509561.130	hypothetical protein, conserved	73,33	0	73,33	0
94	TcCLB.511139.20	40S ribosomal protein S11, putative	71,99	0	71,99	0
95	TcCLB.503453.40	60S ribosomal protein L30, putative	71,77	0,000342	71,77	0
96	TcCLB.506963.10	60S ribosomal protein L10a, putative	71,74	0	71,74	0
97	TcCLB.508153.280	60S ribosomal protein L13, putative	71,19	9,46E-05	71,19	0
98	TcCLB.506241.100	60S ribosomal protein L32, putative	71,03	0,00838	71,03	0
99	TcCLB.506817.50	ribosomal protein L27, putative	70,79	0	70,79	0
100	TcCLB.506977.49	ribosomal protein L36, putative	70,17	7,55E-12	70,17	0
101	TcCLB.511511.6	zinc finger protein ZFP1	69,92	0,001917	69,92	0
102	TcCLB.510973.30	40S ribosomal protein S13, putative	67,89	1,05E-07	67,89	0
103	TcCLB.510579.70	nascent polypeptide associated complex subunit, putative	67,54	6,7E-13	67,54	0
104	TcCLB.504105.94	ribosomal protein S25, putative	67,18	1,73E-05	67,18	0
105	TcCLB.511237.60	40S ribosomal protein S33, putative	66,09	1,9E-07	66,09	0
106	TcCLB.503395.40	60S ribosomal protein L18, putative	66,08	0	66,08	0
107	TcCLB.508153.290	60S ribosomal protein L13, putative	65,69	0	65,69	0
108	TcCLB.507617.9	prostaglandin F2alpha synthase (TcPGFS)	64,98	0,002712	64,98	0
109	TcCLB.509671.70	ribosomal protein L15, putative	64,04	0,001266	64,04	0
110	TcCLB.508175.146	60S ribosomal protein L23a, putative	63,97	0	63,97	0
111	TcCLB.511181.100	60S ribosomal protein L2, putative, 60S ribosomal protein L8, putative	63,84	0	63,84	0
112	TcCLB.505171.30	hypothetical protein, conserved	62,97	0	62,97	0

113	TcCLB.465241.10	ribosomal RNA large subunit epsilon (M4)	62,86	0	62,86	0
114	TcCLB.509749.33	ribosomal protein L29, putative	61,92	0,000184	61,92	0
115	TcCLB.503719.20	40S ribosomal protein SA, putative	61,88	0	61,88	0
116	TcCLB.511233.7	60S ribosomal protein L10a, putative	61,84	5,11E-08	61,84	0
117	TcCLB.509003.30	calpain-like cysteine peptidase, putative, calpain-like cysteine peptidase, clan CA, family C2, putative	61,83	0	61,83	0
118	TcCLB.506679.250	ribosomal protein L24, putative	61,51	6,9E-09	61,51	0
119	TcCLB.508827.70	40S ribosomal protein S17, putative	61,32	0	61,32	0
120	TcCLB.473001.10	ribosomal RNA large subunit beta, 5' partial	60,76	0	60,76	0
121	TcCLB.509695.180	40S ribosomal protein S23, putative	59,86	0,000215	59,86	0
122	TcCLB.511237.50	40S ribosomal protein S33, putative	59,33	0	59,33	0
123	TcCLB.510101.430	40S ribosomal protein S21, putative	59,04	0	59,04	0
124	TcCLB.505763.10	proton motive ATPase 1, putative	58,39	0	58,39	0
125	TcCLB.506241.170	40S ribosomal protein S6, putative	57,53	5,75E-10	57,53	0
126	TcCLB.511277.160	60S ribosomal protein L10a, putative	57,38	6,16E-15	57,38	0
127	TcCLB.511753.130	U3 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), putative, stage specific peptide 24, putative	57,36	3,3E-12	57,36	0
128	TcCLB.511189.30	40S ribosomal protein S13, putative	57,34	0,004625	57,34	0
129	TcCLB.506963.20	60S ribosomal protein L34, putative	56,43	0,00018	56,43	0
130	TcCLB.506817.30	ribosomal protein L27, putative	56,00	9,19E-12	56,00	0
131	TcCLB.504021.109	40S ribosomal protein S3, putative	55,52	9,16E-05	55,52	0
132	TcCLB.504121.30	60S ribosomal protein L4, putative	55,48	0,000362	55,48	0
133	TcCLB.509793.10	kinetoplast-associated protein 4 (KAP4)	55,15	0,009329	55,15	0
134	TcCLB.508405.40	40S ribosomal protein S11, putative	54,05	3,47E-12	54,05	0

135	TcCLB.506573.81	ribosomal protein L39, putative	53,66	2,15E-07	53,66	0
136	TcCLB.511285.70	hypothetical protein, conserved	53,57	2,51E-10	53,57	0
137	TcCLB.511211.120	receptor for activated C kinase 1, putative	53,48	0	53,48	0
138	TcCLB.511807.220	hypothetical protein	52,83	6,48E-05	52,83	0
139	TcCLB.511911.94	hypothetical protein, conserved	51,83	0,00062	51,83	0
140	TcCLB.506679.230	ribosomal protein L24, putative	51,75	3,84E-11	51,75	0
141	TcCLB.507949.250	hypothetical protein, conserved	51,65	3,33E-13	51,65	0
142	TcCLB.508299.60	60S ribosomal protein L2, putative, 60S ribosomal protein L8, putative	51,54	3,56E-06	51,54	0
143	TcCLB.509695.184	40S ribosomal protein S23, putative	51,13	2,24E-05	51,13	0
144	TcCLB.508041.10	SKP1-like protein	50,98	0,00217	50,98	0
145	TcCLB.506221.110	chromosomal passenger protein, putative (CPC2)	50,79	0	50,79	0
146	TcCLB.511391.120	glutamamyl carboxypeptidase, putative, metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	50,38	0	50,38	0
147	TcCLB.508017.30	amino acid transporter, putative (fragment)	50,18	0,011527	50,18	0
148	TcCLB.509005.91	ribosomal RNA large subunit beta, 5' partial	42,68	0	34563,73	809,89
149	TcCLB.473013.10	ribosomal RNA small subunit, 5' & 3' partial	37,65	0	136127,98	3615,49
150	TcCLB.411483.20	ribosomal RNA large subunit gamma (M1)	26,50	0	262167,64	9893,94
151	TcCLB.463637.10	ribosomal RNA small subunit, 5' partial	16,34	0	74113,47	4534,72
152	TcCLB.411483.30	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' partial	14,54	0	103570,65	7125,38
153	TcCLB.436429.10	ribosomal RNA large subunit beta, 3' partial	11,01	0	31118,52	2825,87
154	TcCLB.504153.50	ribosomal RNA large subunit alpha, 5' & 3' partial	11,01	0	33597,53	3052,19
155	TcCLB.411483.10	ribosomal RNA large subunit beta, 3' partial	8,99	0	117224,15	13039,94
156	TcCLB.467149.10	ribosomal RNA large subunit alpha, 3' partial	5,77	0	24235,11	4199,88

Tabela 4.9. Proteínas identificadas nas amostras imunoprecipitadas de ZFP29-FLAG, ZFP29-FLAG e controle (WT)

ID (Uniprot)	ID (TriTrypDB)	Descrição	Score	Intensidade			Posição (Ranking)			Enriquecimento (E)		↑↓ Posição	
				ZFP29-FLAG	ZFP29-FLAG	WT	ZFP29	ZFP29	WT	ZFP29/WT	ZFP29/WT	ZFP29	ZFP29
Q4DWB5	TcCLB.509733.170	Transitional endoplasmic reticulum ATPase, putative	301,37	4,8E+08	5,7E+08	4,2E+08	3	2	1	0,06	0,13	-2	-1
Q4E0Q0	TcCLB.506297.190	Pyruvate phosphate dikinase, putative	271,11	4,0E+08	3,8E+08	3,3E+08	6	3	2	0,09	0,06	-4	-1
Q4DQP2	TcCLB.506563.40	Beta tubulin, putative	323,31	4,7E+08	3,4E+08	2,9E+08	5	4	3	0,22	0,07	-2	-1
Q4CLA1	TcCLB.411235.9	Alpha tubulin, putative	141,91	4,8E+08	3,3E+08	2,5E+08	4	5	4	0,28	0,12	0	-1
Q4DP69	TcCLB.509599.70	Uncharacterized protein	1,80	1,9E+09	6,0E+08	2,0E+08	1	1	5	0,98	0,48	4	4
Q4DYF9	TcCLB.511367.360	Elongation factor 1-alpha	79,27	2,2E+08	2,2E+08	1,4E+08	7	6	6	0,18	0,19	-1	0
Q4DSP5	TcCLB.509937.190	Uncharacterized protein	0,96	1,3E+08	6,0E+03	1,3E+08	8	846	7	0,00	-4,35	-1	-839
Q4DBM7	TcCLB.509105.140	Heat shock protein 85, putative	156,31	1,2E+08	1,1E+08	9,1E+07	10	7	8	0,12	0,06	-2	1
Q4DAE1	TcCLB.510099.120	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	120,70	1,1E+08	7,3E+07	7,8E+07	11	8	9	0,17	-0,03	-2	1
Q4DYP5	TcCLB.507641.290	Chaperonin HSP60, mitochondrial	145,12	7,5E+07	4,6E+07	5,7E+07	15	11	10	0,12	-0,10	-5	-1
Q4DR85	TcCLB.506577.70	Uncharacterized protein	53,01	3,9E+07	4,2E+07	5,1E+07	25	12	11	-0,12	-0,08	-14	-1
Q4DBC5	TcCLB.507059.60	Orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase, putative	73,41	5,2E+07	5,7E+07	5,0E+07	19	10	12	0,01	0,05	-7	2
Q4E4V7	TcCLB.508461.80	Prostaglandin F2alpha synthase	57,52	1,3E+08	2,8E+07	3,8E+07	9	20	13	0,52	-0,14	4	-7
Q4D5C2	TcCLB.508111.30	Glutamate dehydrogenase	92,26	9,0E+07	3,4E+07	3,8E+07	13	14	14	0,37	-0,05	1	0
Q4DTM8	TcCLB.511211.170	Heat shock protein 70 (HSP70), putative	93,42	8,6E+07	3,4E+07	3,8E+07	14	13	15	0,36	-0,05	1	2
IF4A	TcCLB.511585.190	Probable eukaryotic initiation factor 4A	117,53	5,2E+07	5,8E+07	3,5E+07	18	9	16	0,18	0,22	-2	7

Q4DB81	TcCLB.508441.20	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	77,88	3,6E+07	1,9E+07	2,9E+07	26	27	17	0,10	-0,17	-9	-10
Q4CVR9	TcCLB.507029.30	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial, putative	125,84	4,0E+07	3,0E+07	2,8E+07	24	17	18	0,16	0,03	-6	1
Q4D5X0	TcCLB.508169.20	Elongation factor 2, putative	102,48	5,5E+07	2,9E+07	2,8E+07	17	19	19	0,30	0,02	2	0
Q4CVR5	TcCLB.487507.10	Tryparedoxin peroxidase, putative	27,75	3,1E+07	3,2E+07	2,6E+07	27	15	20	0,08	0,09	-7	5
Q4CYC6	TcCLB.510679.40	Uncharacterized protein	84,60	4,7E+07	2,9E+07	2,6E+07	21	18	21	0,26	0,06	0	3
Q4CR09	TcCLB.510837.20	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	52,20	4,0E+07	2,4E+07	2,5E+07	23	21	22	0,20	-0,02	-1	1
Q4DNQ7	TcCLB.511589.200	Adenosylhomocysteinase	80,36	6,0E+07	3,0E+07	2,1E+07	16	16	23	0,46	0,16	7	7
Q4DKH4	TcCLB.511385.30	Vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1, putative	63,02	2,6E+07	2,0E+07	1,9E+07	30	25	24	0,14	0,02	-6	-1
Q4E2W1	TcCLB.508175.360	Cystathionine beta-synthase	49,40	1,7E+07	1,6E+07	1,9E+07	54	34	25	-0,04	-0,08	-29	-9
Q4D9S6	TcCLB.504045.110	Urocanate hydratase, putative	35,26	2,2E+07	2,4E+07	1,9E+07	37	22	26	0,08	0,10	-11	4
Q4DI67	TcCLB.507831.60	Heat shock protein, putative	57,16	2,2E+07	1,8E+07	1,8E+07	38	28	27	0,10	0,00	-11	-1
Q4D112	TcCLB.509067.70	Pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative (Fragment)	62,13	2,2E+07	2,1E+07	1,7E+07	40	24	28	0,10	0,09	-12	4
Q4CVI0	TcCLB.510795.10	Tyrosine aminotransferase	41,31	5,0E+07	1,1E+07	1,7E+07	20	58	29	0,46	-0,18	9	-29
Q4E133	TcCLB.506247.220	Histidine ammonia-lyase	41,75	2,6E+07	2,0E+07	1,7E+07	31	26	30	0,19	0,07	-1	4
Q4CMD9	TcCLB.506261.10	Fatty acyl CoA synthetase 2, putative	46,20	8,0E+06	1,4E+07	1,7E+07	119	39	31	-0,32	-0,08	-88	-8
Q4DD37	TcCLB.511025.70	T-complex protein 1 subunit alpha	56,04	1,6E+07	1,0E+07	1,6E+07	59	64	32	0,01	-0,20	-27	-32
Q4D5T6	TcCLB.507555.80	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	15,43	1,4E+07	1,3E+07	1,6E+07	67	44	33	-0,06	-0,08	-34	-11
Q4D620	TcCLB.506585.40	Glucose-regulated protein 78, putative	59,59	1,8E+07	1,3E+07	1,5E+07	49	47	34	0,08	-0,08	-15	-13
Q4D5P4	TcCLB.509683.117	40S ribosomal protein S4	35,89	2,1E+07	1,1E+07	1,5E+07	41	59	35	0,15	-0,14	-6	-24
Q4DMK9	TcCLB.504021.109	40S ribosomal protein S3, putative	36,97	2,3E+07	1,8E+07	1,5E+07	35	29	36	0,19	0,07	1	7

Q4DTP9	TcCLB.509695.200	T-complex protein 1 subunit delta	46,68	1,9E+07	1,7E+07	1,5E+07	47	30	37	0,11	0,07	-10	7
Q4DW49	TcCLB.507681.20	Succinyl-CoA ligase subunit beta	31,49	2,3E+07	1,3E+07	1,4E+07	36	43	38	0,20	-0,03	2	-5
Q4DD13	TcCLB.511289.70	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial, putative	33,44	2,1E+07	1,7E+07	1,4E+07	42	31	39	0,18	0,08	-3	8
Q4DY24	TcCLB.506357.40	Elongation factor TU, putative	37,60	1,1E+07	1,2E+07	1,4E+07	86	55	40	-0,10	-0,06	-46	-15
Q4CPG3	TcCLB.509583.10	Chaperonin TCP20, putative	45,77	2,1E+07	1,5E+07	1,4E+07	43	37	41	0,19	0,04	-2	4
Q4DU88	TcCLB.511903.40	Uncharacterized protein	46,52	2,0E+07	1,0E+07	1,3E+07	44	65	42	0,18	-0,13	-2	-23
Q4DBD4	TcCLB.511757.20	Uncharacterized protein	48,91	1,8E+07	1,4E+07	1,3E+07	50	41	43	0,13	0,01	-7	2
Q4CSK6	TcCLB.509141.40	Uncharacterized protein	43,61	2,4E+07	2,2E+07	1,3E+07	32	23	44	0,27	0,23	12	21
Q4DXL5	TcCLB.506195.110	Malate dehydrogenase	41,55	3,0E+07	7,9E+06	1,3E+07	28	85	45	0,36	-0,21	17	-40
Q4CXW2	TcCLB.510163.20	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma), putative	35,40	1,2E+07	1,2E+07	1,3E+07	74	49	47	-0,01	-0,01	-27	-2
RS3A2	TcCLB.511001.9	40S ribosomal protein S3a-2	52,08	1,1E+07	9,9E+06	1,2E+07	79	67	48	-0,03	-0,09	-31	-19
Q4DUI3	TcCLB.510661.90	ATP-dependent RNA helicase, putative	40,90	8,1E+06	7,2E+06	1,1E+07	115	95	49	-0,15	-0,20	-66	-46
Q4CVX9	TcCLB.509695.170	60S ribosomal protein L9, putative	27,35	1,5E+07	1,2E+07	1,1E+07	61	57	50	0,14	0,01	-11	-7
Q4DK88	TcCLB.509611.180	Peptide methionine sulfoxide reductase, putative	24,71	4,2E+06	9,9E+06	1,1E+07	197	66	51	-0,42	-0,05	-146	-15
Q4DWG6	TcCLB.511725.250	Chaperonin containing T-complex protein, putative	31,58	1,2E+07	1,2E+07	1,1E+07	77	53	52	0,02	0,03	-25	-1
Q4DSB7	TcCLB.509767.170	Uncharacterized protein	18,31	1,3E+07	1,2E+07	1,1E+07	70	56	53	0,08	0,04	-17	-3
Q4D5M2	TcCLB.505989.82	RuvB-like DNA helicase, putative	45,06	1,5E+07	1,3E+07	1,1E+07	64	46	54	0,14	0,08	-10	8
Q4CQU0	TcCLB.503719.20	40S ribosomal protein SA	30,29	1,1E+07	1,2E+07	1,0E+07	84	50	55	0,04	0,07	-29	5
Q4DIZ9	TcCLB.503833.40	40S ribosomal protein S2, putative	24,24	1,1E+07	1,0E+07	1,0E+07	89	61	56	0,02	0,01	-33	-5
Q4DTX7	TcCLB.509233.180	ATP synthase subunit beta	75,34	2,3E+07	1,4E+07	1,0E+07	34	38	57	0,36	0,15	23	19
Q4DZ98	TcCLB.504105.140	Enolase, putative	58,97	4,3E+07	8,1E+06	9,8E+06	22	81	58	0,64	-0,09	36	-23

Q4E355	TcCLB.508741.170	Uncharacterized protein	32,23	1,9E+07	1,6E+07	9,8E+06	48	33	59	0,29	0,21	11	26
Q4DHF0	TcCLB.509065.60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	32,21	2,0E+07	8,0E+06	9,8E+06	46	84	60	0,30	-0,09	14	-24
Q4CYQ8	TcCLB.510571.30	Actin, putative	38,64	1,8E+07	1,7E+07	9,6E+06	52	32	61	0,27	0,24	9	29
Q4E4V0	TcCLB.508461.140	Polyadenylate-binding protein	39,34	1,8E+07	1,2E+07	9,5E+06	51	54	62	0,28	0,10	11	8
Q4DPV6	TcCLB.510877.40	Uncharacterized protein	37,96	1,5E+07	6,7E+06	9,5E+06	62	100	63	0,21	-0,15	1	-37
Q4CM27	TcCLB.503577.20	U2 splicing auxiliary factor, putative	15,13	8,7E+06	5,3E+06	9,4E+06	108	132	64	-0,03	-0,25	-44	-68
Q4DIB9	TcCLB.509455.80	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	35,58	1,4E+07	1,5E+07	9,2E+06	65	36	65	0,19	0,21	0	29
Q4DIE1	TcCLB.506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	45,96	1,2E+07	9,6E+06	9,1E+06	76	72	66	0,11	0,02	-10	-6
Q4D4S0	TcCLB.504163.40	Fructose-bisphosphate aldolase	24,68	1,7E+07	2,6E+06	9,1E+06	56	225	67	0,27	-0,54	11	-158
Q4D9G6	TcCLB.508299.80	Threonyl-tRNA synthetase, putative	68,92	9,7E+06	1,2E+07	9,0E+06	92	48	68	0,03	0,13	-24	20
Q4E151	TcCLB.506247.50	Chaperonin, putative	58,13	8,9E+06	8,7E+06	9,0E+06	106	76	69	-0,01	-0,02	-37	-7
Q4DTP7	TcCLB.509695.210	Carboxypeptidase	32,78	1,7E+07	9,6E+06	9,0E+06	58	71	70	0,27	0,03	12	-1
Q4D6N0	TcCLB.508357.90	T-complex protein 1, beta subunit, putative	41,12	9,1E+06	8,4E+06	8,9E+06	100	78	71	0,01	-0,02	-29	-7
Q4DTV8	TcCLB.508693.50	Uncharacterized protein	60,63	2,4E+07	1,0E+07	8,8E+06	33	63	72	0,43	0,06	39	9
Q4E4Q2	TcCLB.508461.570	Gim5A protein, putative	22,14	1,7E+07	1,4E+07	8,7E+06	57	40	73	0,28	0,20	16	33
PGFS	TcCLB.511287.49	Prostaglandin F synthase	17,88	2,7E+07	1,0E+07	8,7E+06	29	62	74	0,50	0,07	45	12
Q4CNC1	TcCLB.510777.20	Aspartyl-tRNA synthetase, putative	49,10	1,1E+07	1,2E+07	8,6E+06	80	51	75	0,12	0,14	-5	24
Q4E4R8	TcCLB.508461.410	T-complex protein 1, eta subunit, putative	46,11	1,2E+07	9,8E+06	8,6E+06	75	68	76	0,14	0,06	1	8
Q4CWP7	TcCLB.509353.10	NAD/FAD dependent dehydrogenase, putative (Fragment)	1,12	1,8E+07	8,8E+06	8,4E+06	53	74	77	0,32	0,02	24	3
Q4CNM5	TcCLB.508665.14	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100),	39,48	7,6E+06	8,3E+06	8,4E+06	120	79	78	-0,04	-0,01	-42	-1



		putative (Fragment)											
Q4DTH5	TcCLB.508737.100	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78, putative	51,06	1,1E+07	1,3E+07	8,4E+06	78	45	79	0,14	0,19	1	34
Q4CZR0	TcCLB.503715.30	Small GTP-binding protein Rab1, putative	30,49	9,6E+06	1,3E+07	8,4E+06	93	42	80	0,06	0,21	-13	38
Q4DPV3	TcCLB.510877.60	RuvB-like DNA helicase, putative	25,45	9,5E+06	1,1E+07	8,3E+06	98	60	81	0,06	0,12	-17	21
Q4D0U9	TcCLB.508319.40	RNA helicase, putative	39,78	9,0E+06	9,7E+06	8,3E+06	104	70	82	0,04	0,07	-22	12
Q4E093	TcCLB.506679.100	40S ribosomal protein S18, putative	39,57	6,1E+06	6,4E+06	8,0E+06	148	110	83	-0,12	-0,10	-65	-27
Q4CQ52	TcCLB.505763.19	P-type H <sup>+</sup> -ATPase, putative (Fragment)	57,18	8,1E+06	6,1E+06	7,9E+06	116	113	84	0,01	-0,11	-32	-29
Q4E2M9	TcCLB.510889.221	Glucose-6-phosphate isomerase	37,37	1,5E+07	5,5E+06	7,8E+06	63	129	85	0,29	-0,15	22	-44
Q4DD50	TcCLB.510241.50	60S ribosomal protein L10, putative	24,87	7,3E+06	3,6E+06	7,6E+06	125	168	86	-0,02	-0,32	-39	-82
Q4DZW1	TcCLB.506789.280	Methylthioadenosine phosphorylase, putative	40,50	1,3E+07	9,5E+06	7,5E+06	68	73	87	0,25	0,10	19	14
Q4DU31	TcCLB.506241.170	40S ribosomal protein S6	15,43	8,8E+06	5,5E+06	7,4E+06	107	128	88	0,08	-0,13	-19	-40
Q4D832	TcCLB.511627.110	Heat shock protein DnaJ, putative	25,20	9,5E+06	6,4E+06	7,4E+06	97	109	89	0,11	-0,06	-8	-20
Q4E2V9	TcCLB.511283.10	Uncharacterized protein	17,64	5,3E+06	5,5E+06	7,3E+06	159	126	90	-0,14	-0,12	-69	-36
Q4DPR3	TcCLB.511181.50	Mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative	16,07	9,0E+06	6,5E+06	7,0E+06	102	104	91	0,11	-0,03	-11	-13
Q4CUC8	TcCLB.506593.19	Ribosomal protein S7, putative	26,11	7,1E+06	5,0E+06	7,0E+06	129	142	92	0,01	-0,15	-37	-50
Q4CXQ1	TcCLB.509219.20	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	14,27	8,3E+06	9,7E+06	6,9E+06	111	69	93	0,08	0,15	-18	24
Q4CR18	TcCLB.509445.39	Glutamate dehydrogenase, putative (Fragment)	27,15	7,3E+06	5,8E+06	6,9E+06	126	120	94	0,02	-0,08	-32	-26
Q4CM63	TcCLB.510185.10	Methyltransferase (Fragment)	39,57	1,7E+07	8,1E+06	6,9E+06	55	80	95	0,39	0,07	40	15
Q4D1L5	TcCLB.504003.60	T-complex protein 1 subunit gamma	40,61	9,9E+06	7,1E+06	6,8E+06	91	96	96	0,16	0,02	5	0
Q4D0U7	TcCLB.508319.70	40S ribosomal protein S11, putative	13,38	4,1E+06	3,5E+06	6,8E+06	203	175	97	-0,22	-0,28	-106	-78

Q4D5X2	TcCLB.506167.50	Clathrin heavy chain	44,40	9,2E+06	6,0E+06	6,7E+06	99	116	98	0,13	-0,05	-1	-18
Q4CLP1	TcCLB.508807.10	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100, putative (Fragment)	32,25	7,5E+06	8,8E+06	6,5E+06	122	75	99	0,06	0,13	-23	24
Q4E088	TcCLB.506679.140	40S ribosomal protein S10, putative	9,79	6,4E+06	1,2E+07	6,5E+06	144	52	100	-0,01	0,26	-44	48
Q4DEK4	TcCLB.503899.20	40S ribosomal protein S16, putative	12,42	7,4E+06	8,6E+06	6,5E+06	123	77	101	0,06	0,13	-22	24
Q4DEP1	TcCLB.506739.50	Heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU, putative	26,25	9,5E+06	7,2E+06	6,4E+06	96	94	102	0,18	0,05	6	8
Q4DW89	TcCLB.506989.190	Lipophosphoglycan biosynthetic protein, putative	25,38	6,3E+06	7,3E+06	6,2E+06	145	92	103	0,01	0,07	-42	11
Q4CV82	TcCLB.506815.30	Beta prime COP protein, putative	34,16	5,0E+06	5,7E+06	6,1E+06	168	123	104	-0,09	-0,03	-64	-19
Q4E2I6	TcCLB.508479.340	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative	17,67	8,3E+06	8,0E+06	6,1E+06	110	83	105	0,14	0,12	-5	22
Q4DY30	TcCLB.511727.290	RNA-binding protein, putative	15,65	6,2E+06	3,8E+06	6,0E+06	147	163	106	0,01	-0,20	-41	-57
Q4DK44	TcCLB.508827.40	Acyl-CoA dehydrogenase, putative	30,38	8,3E+06	7,3E+06	5,9E+06	112	91	107	0,14	0,09	-5	16
Q4E2Q2	TcCLB.504153.310	Heat shock protein, putative	31,55	1,0E+07	4,9E+06	5,9E+06	90	145	108	0,24	-0,08	18	-37
Q4E246	TcCLB.508707.310	Uncharacterized protein	15,35	6,5E+06	5,6E+06	5,9E+06	142	125	109	0,04	-0,02	-33	-16
Q4DGX6	TcCLB.509213.120	Peptidase M20/M25/M40, putative	24,34	1,3E+07	6,1E+06	5,6E+06	69	112	110	0,37	0,04	41	-2
Q4CXX2	TcCLB.508041.30	40S ribosomal protein S15a, putative	14,02	4,2E+06	5,9E+06	5,6E+06	196	118	111	-0,12	0,03	-85	-7
Q4E589	TcCLB.506559.410	Uncharacterized protein	19,79	7,0E+06	3,8E+06	5,5E+06	131	164	112	0,10	-0,17	-19	-52
Q4E4R1	TcCLB.508461.480	60S ribosomal protein L23, putative	12,62	5,1E+06	5,2E+06	5,5E+06	164	134	113	-0,04	-0,03	-51	-21
Q4DYN2	TcCLB.504427.110	Acetyl-coenzyme A synthetase	18,74	1,9E+06	2,5E+06	5,4E+06	328	231	114	-0,45	-0,34	-214	-117
Q4CXE3	TcCLB.508271.10	Phenylalanyl-tRNA synthetase, putative	21,44	6,5E+06	7,6E+06	5,4E+06	141	89	115	0,09	0,15	-26	26
Q4DJS7	TcCLB.509237.130	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative	38,82	8,1E+06	6,6E+06	5,3E+06	114	102	116	0,18	0,09	2	14

Q4D734	TcCLB.506163.50	Uncharacterized protein	15,84	1,1E+07	7,9E+06	5,1E+06	81	86	117	0,35	0,19	36	31
Q4DH96	TcCLB.511285.120	ATP-dependent RNA helicase, putative	21,42	7,3E+06	6,5E+06	5,1E+06	124	103	118	0,16	0,11	-6	15
Q4E3A4	TcCLB.508355.250	60S acidic ribosomal protein P0	22,20	7,2E+06	4,6E+06	5,1E+06	127	148	119	0,15	-0,04	-8	-29
Q4DIZ5	TcCLB.511287.150	Fibrillarlin, putative	12,27	4,7E+06	2,8E+06	5,1E+06	179	212	120	-0,03	-0,26	-59	-92
Q4CVH4	TcCLB.505843.10	Glutamate dehydrogenase, putative (Fragment)	19,16	5,3E+06	5,2E+06	5,0E+06	161	135	121	0,02	0,01	-40	-14
Q4DQ27	TcCLB.510121.20	Hexokinase	51,44	2,0E+07	6,5E+06	5,0E+06	45	106	122	0,59	0,11	77	16
Q4D9R1	TcCLB.508995.40	Vesicle-fusing ATPase, putative	32,67	5,9E+06	7,6E+06	4,9E+06	149	90	123	0,08	0,18	-26	33
Q4D205	TcCLB.503575.34	Ribosomal protein L38, putative	9,30	3,1E+06	8,1E+06	4,8E+06	249	82	124	-0,19	0,22	-125	42
Q4DY45	TcCLB.511727.140	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative	10,61	6,5E+06	5,8E+06	4,7E+06	140	119	125	0,14	0,09	-15	6
Q4DSJ7	TcCLB.508543.30	40S ribosomal protein S9, putative	4,97	3,0E+06	2,8E+06	4,7E+06	254	211	126	-0,20	-0,22	-128	-85
Q4DP89	TcCLB.506127.110	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1, putative	18,67	4,0E+06	4,4E+06	4,7E+06	207	156	127	-0,07	-0,02	-80	-29
Q4E396	TcCLB.508355.330	Uncharacterized protein	18,96	5,3E+06	3,1E+06	4,6E+06	158	193	128	0,07	-0,17	-30	-65
Q4DKS7	TcCLB.509569.100	Nucleoside phosphorylase, putative	10,64	1,1E+07	4,5E+06	4,5E+06	82	154	129	0,40	0,00	47	-25
Q4E4L7	TcCLB.506925.319	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	29,59	1,1E+07	7,2E+06	4,5E+06	87	93	130	0,39	0,21	43	37
Q4CSC4	TcCLB.506945.160	S-adenosylmethionine synthase	6,12	6,8E+06	3,4E+06	4,5E+06	134	178	131	0,18	-0,12	-3	-47
Q4D015	TcCLB.511803.40	Uncharacterized protein	43,64	4,8E+06	5,4E+06	4,4E+06	174	130	132	0,04	0,09	-42	2
Q4CVK6	TcCLB.503749.5	Pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative (Fragment)	32,96	5,7E+06	6,1E+06	4,4E+06	153	114	133	0,11	0,14	-20	19
Q4CMU8	TcCLB.510215.10	NADH-dependent fumarate reductase, putative	27,58	6,8E+06	4,6E+06	4,4E+06	135	149	134	0,19	0,02	-1	-15
Q4DNZ7	TcCLB.507519.110	60S ribosomal protein L7, putative	9,53	3,4E+06	1,9E+06	4,3E+06	237	285	135	-0,11	-0,36	-102	-150
Q4DGP9	TcCLB.506835.60	Calmodulin, putative	60,32	6,9E+06	6,3E+06	4,3E+06	132	111	136	0,20	0,16	4	25

Q4DM82	TcCLB.511301.110	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	22,90	4,7E+06	3,2E+06	4,3E+06	177	189	137	0,04	-0,13	-40	-52
Q4DEL1	TcCLB.507941.150	Histone H4	9,98	2,5E+06	4,0E+06	4,3E+06	290	160	138	-0,25	-0,03	-152	-22
Q4DTX6	TcCLB.504105.94	Ribosomal protein S25, putative	4,18	1,7E+06	4,1E+06	4,3E+06	346	159	139	-0,40	-0,02	-207	-20
Q4CNR6	TcCLB.510395.10	ATP synthase, alpha chain, mitochondrial, putative (Fragment)	18,88	5,3E+06	5,1E+06	4,3E+06	160	137	140	0,09	0,07	-20	3
Q4D0X5	TcCLB.510663.70	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	33,59	9,1E+06	6,4E+06	4,3E+06	101	108	141	0,33	0,18	40	33
Q4D234	TcCLB.507529.50	Uncharacterized protein	22,78	6,6E+06	5,0E+06	4,3E+06	138	143	142	0,19	0,06	4	-1
Q4D7Y8	TcCLB.508415.40	ADP-ribosylation factor 1, putative	38,64	8,6E+06	5,0E+06	4,3E+06	109	141	143	0,30	0,07	34	2
Q4E5N8	TcCLB.506529.430	Alanine aminotransferase, putative	23,37	1,2E+07	3,9E+06	4,2E+06	73	162	144	0,46	-0,04	71	-18
Q4DED2	TcCLB.506405.149	Ribosomal protein L21E (60S), putative	11,27	2,9E+06	2,7E+06	4,2E+06	257	220	145	-0,15	-0,18	-112	-75
Q4CU61	TcCLB.509671.80	60S ribosomal protein L5, putative	19,70	3,4E+06	3,7E+06	4,1E+06	229	165	146	-0,08	-0,05	-83	-19
Q4CTR7	TcCLB.506937.10	Malate dehydrogenase	24,81	1,6E+07	3,5E+06	4,1E+06	60	174	147	0,58	-0,07	87	-27
Q4DXR8	TcCLB.510421.130	Uncharacterized protein	20,43	4,7E+06	7,7E+06	4,1E+06	180	88	148	0,06	0,27	-32	60
Q4DLK5	TcCLB.503939.80	Prolyl-tRNA synthetase, putative	28,86	4,0E+06	6,0E+06	4,1E+06	205	117	149	-0,01	0,16	-56	32
Q4DRI5	TcCLB.507491.151	Flagellar calcium-binding protein, putative	5,92	9,5E+06	4,2E+06	4,1E+06	95	158	150	0,37	0,01	55	-8
Q4DBY0	TcCLB.506977.90	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 5, putative	23,59	5,5E+06	5,8E+06	4,0E+06	156	121	151	0,14	0,16	-5	30
Q4CNP4	TcCLB.503935.20	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase, putative	12,27	3,8E+06	2,7E+06	3,9E+06	216	219	152	-0,02	-0,16	-64	-67
Q4D1U2	TcCLB.509589.20	Squalene monooxygenase, putative	20,77	8,9E+06	4,9E+06	3,9E+06	105	144	153	0,36	0,10	48	9
Q4E268	TcCLB.508707.90	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 7, putative	9,11	1,7E+06	2,4E+06	3,9E+06	350	241	154	-0,37	-0,22	-196	-87

Q4DIV9	TcCLB.507709.50	60S ribosomal protein L6, putative	11,31	1,0E+06	1,5E+06	3,9E+06	434	321	155	-0,58	-0,42	-279	-166
Q4DJJ9	TcCLB.509551.30	Mitochondrial phosphate transporter, putative	24,07	8,2E+06	6,8E+06	3,8E+06	113	99	156	0,33	0,25	43	57
Q4DZ31	TcCLB.511001.120	60S ribosomal protein L18a	6,04	2,0E+06	2,1E+06	3,7E+06	319	266	157	-0,26	-0,25	-162	-109
Q4DTQ1	TcCLB.504181.20	40S ribosomal protein S23, putative	10,52	2,3E+06	8,4E+05	3,7E+06	296	419	158	-0,21	-0,65	-138	-261
Q4E4E4	TcCLB.510187.70	Tyrosine aminotransferase, putative	14,46	5,8E+06	5,1E+06	3,7E+06	150	136	159	0,19	0,14	9	23
Q4DJZ1	TcCLB.509671.110	Uncharacterized protein	10,64	5,4E+06	5,4E+06	3,7E+06	157	131	160	0,16	0,16	3	29
Q4CVF7	TcCLB.511583.40	Tricarboxylate carrier, putative	12,56	7,6E+06	7,7E+06	3,7E+06	121	87	161	0,31	0,32	40	74
Q4D2M6	TcCLB.506931.10	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	17,24	5,7E+06	4,6E+06	3,7E+06	152	150	162	0,19	0,10	10	12
Q4DM85	TcCLB.511301.70	Peptidylprolyl isomerase-like, putative	31,46	5,1E+06	3,2E+06	3,6E+06	163	190	163	0,14	-0,06	0	-27
Q4DRH6	TcCLB.506775.80	14-3-3 protein, putative	23,37	6,8E+06	5,8E+06	3,6E+06	133	122	164	0,29	0,21	31	42
Q4DGA2	TcCLB.506457.40	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative	23,86	6,4E+06	6,8E+06	3,5E+06	143	98	165	0,26	0,29	22	67
Q4D1Q4	TcCLB.510945.70	Aspartate aminotransferase, mitochondrial, putative	17,08	8,0E+06	3,1E+06	3,5E+06	118	198	166	0,36	-0,06	48	-32
Q4CPR5	TcCLB.511465.10	Proteasome activator protein PA26, putative	35,57	4,6E+06	3,6E+06	3,5E+06	185	169	167	0,12	0,02	-18	-2
Q4DKI7	TcCLB.509105.70	Thiol-dependent reductase 1, putative	11,47	1,1E+07	4,8E+06	3,5E+06	85	146	168	0,51	0,14	83	22
Q4D729	TcCLB.506275.20	Hslvu complex proteolytic subunit-like, putative	20,05	4,7E+06	7,0E+06	3,5E+06	178	97	169	0,14	0,31	-9	72
Q4CKQ6	TcCLB.509239.10	Fatty acid desaturase, putative	12,48	4,3E+06	4,6E+06	3,4E+06	192	151	170	0,10	0,13	-22	19
Q4DD39	TcCLB.511025.50	Glucosamine-6-phosphate isomerase	17,38	7,0E+06	3,4E+06	3,4E+06	130	180	171	0,31	-0,01	41	-9
Q4DJX1	TcCLB.510879.110	Ribosomal protein L3, putative	13,67	2,9E+06	1,4E+06	3,4E+06	259	329	172	-0,07	-0,38	-87	-157
Q4E5I9	TcCLB.511277.60	Alcohol dehydrogenase, putative	34,46	1,1E+07	2,6E+06	3,4E+06	88	224	173	0,50	-0,11	85	-51

Q4CSK4	TcCLB.506235.10	Translation initiation factor IF-2, putative	20,79	3,9E+06	5,0E+06	3,4E+06	212	139	174	0,06	0,17	-38	35
Q4DF18	TcCLB.507001.110	Galactokinase-like protein, putative	26,45	9,6E+06	6,4E+06	3,3E+06	94	107	175	0,46	0,29	81	68
Q4DSY2	TcCLB.508347.24	Uncharacterized protein	-2,00	1,4E+07	6,0E+03	3,3E+06	66	848	176	0,62	-2,74	110	-672
Q4D531	TcCLB.510835.40	60S ribosomal protein L7a, putative	8,12	2,8E+06	2,1E+06	3,3E+06	266	272	177	-0,07	-0,20	-89	-95
Q4E4L9	TcCLB.506925.300	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	17,26	1,1E+07	3,5E+06	3,3E+06	83	173	178	0,54	0,03	95	5
Q4DLP7	TcCLB.511859.170	NADH-cytochrome b5 reductase	9,99	3,7E+06	2,2E+06	3,2E+06	218	251	179	0,07	-0,15	-39	-72
Q4DYK2	TcCLB.506211.160	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial, putative	3,16	3,4E+06	3,7E+06	3,2E+06	232	167	180	0,03	0,07	-52	13
Q4DU83	TcCLB.511903.110	40S ribosomal protein S8	21,87	4,2E+06	1,7E+06	3,2E+06	195	298	181	0,12	-0,27	-14	-117
Q4E3Q5	TcCLB.510101.30	60S ribosomal protein L28, putative	11,26	2,6E+06	2,7E+06	3,1E+06	283	221	182	-0,08	-0,06	-101	-39
Q4DNV8	TcCLB.505999.90	Phosphoglycerate kinase	30,96	1,3E+07	3,1E+06	3,1E+06	72	195	183	0,61	0,01	111	-12
Q4E620	TcCLB.508153.730	Elongation initiation factor 2 alpha subunit, putative	13,76	4,6E+06	3,5E+06	3,0E+06	182	172	184	0,18	0,07	2	12
Q4DK33	TcCLB.508827.139	Coatomer gamma subunit, putative (Fragment)	23,49	3,9E+06	2,5E+06	3,0E+06	211	236	185	0,11	-0,09	-26	-51
Q4D360	TcCLB.507925.40	Pyridoxal kinase, putative	6,76	4,0E+06	2,0E+06	3,0E+06	208	281	186	0,12	-0,19	-22	-95
Q4E686	TcCLB.508153.60	Aminopeptidase, putative	22,60	3,6E+06	3,3E+06	3,0E+06	222	181	187	0,08	0,05	-35	6
Q4E5Z1	TcCLB.508153.1050	Uncharacterized protein	21,23	2,1E+06	2,1E+06	3,0E+06	315	271	188	-0,16	-0,16	-127	-83
Q4DKH6	TcCLB.509915.60	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	5,45	2,7E+06	4,5E+06	3,0E+06	272	153	189	-0,04	0,18	-83	36
Q4DKI5	TcCLB.509105.90	RNA-binding protein RGGm, putative	12,16	3,4E+06	2,5E+06	3,0E+06	230	234	190	0,06	-0,08	-40	-44
Q4CX87	TcCLB.509499.14	Tryparedoxin peroxidase, putative	17,21	4,3E+06	2,6E+06	2,9E+06	191	226	191	0,17	-0,05	0	-35
Q4DJB6	TcCLB.508851.180	14-3-3 protein, putative	12,55	4,1E+06	1,9E+06	2,9E+06	202	288	192	0,14	-0,20	-10	-96
Q4DIC9	TcCLB.506959.120	60S ribosomal protein L30, putative	14,60	3,1E+06	6,5E+06	2,9E+06	247	105	193	0,03	0,35	-54	88
Q4DXC0	TcCLB.510901.150	Proteasome regulatory non-ATPase	16,30	2,8E+06	4,7E+06	2,9E+06	267	147	194	-0,02	0,20	-73	47

		subunit 2, putative											
Q4DW87	TcCLB.506989.210	U-box domain protein, putative	16,82	4,3E+06	2,9E+06	2,9E+06	194	208	195	0,17	-0,01	1	-13
Q4DPQ8	TcCLB.511181.100	60S ribosomal protein L2, putative	5,47	2,9E+06	1,3E+06	2,8E+06	263	337	196	0,00	-0,33	-67	-141
Q4CSK3	TcCLB.506235.20	Uncharacterized protein	18,93	4,1E+06	3,1E+06	2,8E+06	201	197	197	0,16	0,03	-4	0
Q4E1S6	TcCLB.506855.180	Adenylate kinase, putative	15,59	2,5E+06	4,6E+06	2,8E+06	291	152	198	-0,06	0,21	-93	46
Q4CW64	TcCLB.509003.30	Calpain-like cysteine peptidase, putative	9,24	2,0E+06	6,6E+06	2,8E+06	323	101	199	-0,16	0,37	-124	98
Q4E342	TcCLB.508741.300	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 6, putative	20,65	4,9E+06	3,3E+06	2,8E+06	172	184	200	0,24	0,07	28	16
Q4CYL3	TcCLB.504423.30	Uncharacterized protein	15,17	4,9E+06	5,1E+06	2,8E+06	171	138	201	0,25	0,26	30	63
Q4DAZ6	TcCLB.506135.9	Heat shock 70 kDa protein, putative (Fragment)	12,26	5,0E+06	2,2E+06	2,8E+06	169	257	202	0,26	-0,10	33	-55
Q4DZM5	TcCLB.504147.200	Proteasome regulatory ATPase subunit, putative	14,14	3,8E+06	3,6E+06	2,8E+06	213	170	203	0,14	0,12	-10	33
Q4E1N1	TcCLB.507093.260	ABC transporter, putative	33,80	5,6E+06	6,0E+06	2,7E+06	155	115	204	0,31	0,34	49	89
Q4DL69	TcCLB.508919.140	Uncharacterized protein	13,47	1,8E+06	2,5E+06	2,7E+06	330	235	205	-0,17	-0,04	-125	-30
Q4E595	TcCLB.506559.350	Asparaginyl-tRNA synthetase, putative	17,05	3,9E+06	2,7E+06	2,7E+06	210	218	206	0,16	0,01	-4	-12
Q4D0B9	TcCLB.511047.50	Proteasome regulatory ATPase subunit 2, putative	9,36	4,0E+06	2,8E+06	2,7E+06	206	216	207	0,17	0,01	1	-9
Q4CWA5	TcCLB.507241.30	Arginine kinase, putative	15,09	8,1E+06	2,8E+06	2,7E+06	117	213	208	0,48	0,02	91	-5
Q4CTX9	TcCLB.508595.50	Cysteine peptidase, putative (Fragment)	16,12	6,0E+03	2,3E+06	2,7E+06	846	249	209	-2,65	-0,07	-637	-40
Q4DVG8	TcCLB.506859.70	Uncharacterized protein	9,22	4,1E+06	3,2E+06	2,7E+06	199	188	210	0,18	0,08	11	22
Q4CU39	TcCLB.507923.10	L-threonine 3-dehydrogenase, putative	13,49	4,3E+06	2,1E+06	2,7E+06	193	267	211	0,20	-0,11	18	-56
Q4CUP4	TcCLB.506047.20	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	6,46	3,3E+06	2,8E+06	2,7E+06	238	215	212	0,09	0,02	-26	-3

Q4D6D8	TcCLB.509047.40	Uncharacterized protein	16,28	4,0E+06	3,3E+06	2,7E+06	204	182	213	0,18	0,10	9	31
Q4E0D8	TcCLB.508999.190	Calpain-like cysteine peptidase, putative	11,83	4,1E+06	5,0E+06	2,6E+06	200	140	214	0,19	0,28	14	74
Q4DE37	TcCLB.506649.20	P-type H <sup>+</sup> -ATPase, putative	14,49	2,6E+06	2,2E+06	2,6E+06	278	253	215	0,00	-0,07	-63	-38
Q4DTN2	TcCLB.511211.120	Activated protein kinase C receptor, putative	18,65	7,2E+06	2,2E+06	2,6E+06	128	260	216	0,44	-0,08	88	-44
Q4DQ78	TcCLB.510543.90	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	3,90	2,6E+06	2,6E+06	2,6E+06	284	227	217	0,00	0,00	-67	-10
Q4CRM5	TcCLB.509917.19	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	11,96	2,6E+06	1,6E+06	2,6E+06	281	310	218	0,01	-0,22	-63	-92
Q4CND5	TcCLB.504221.20	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative (Fragment)	11,06	2,5E+06	3,4E+06	2,6E+06	285	176	219	-0,01	0,13	-66	43
Q4E661	TcCLB.508153.280	60S ribosomal protein L13	10,32	3,2E+06	2,9E+06	2,6E+06	246	204	220	0,09	0,06	-26	16
Q4DYZ3	TcCLB.510303.290	Acyl-CoA dehydrogenase, putative	16,39	3,9E+06	3,1E+06	2,6E+06	209	196	221	0,19	0,08	12	25
Q4DWP4	TcCLB.511421.200	Uncharacterized protein	25,11	2,4E+06	3,2E+06	2,5E+06	293	186	222	-0,03	0,10	-71	36
Q4DS82	TcCLB.510759.120	Reiske iron-sulfur protein, putative	13,99	4,5E+06	2,4E+06	2,5E+06	188	240	224	0,25	-0,03	36	-16
Q4CPV7	TcCLB.503819.30	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit, putative	14,57	3,1E+06	3,7E+06	2,5E+06	248	166	225	0,09	0,17	-23	59
Q4CP43	TcCLB.509761.10	Uncharacterized protein (Fragment)	14,74	3,0E+06	2,0E+06	2,5E+06	251	279	226	0,07	-0,11	-25	-53
Q4DX81	TcCLB.506945.190	Cytochrome p450-like protein, putative	27,33	5,0E+06	2,8E+06	2,5E+06	167	217	227	0,30	0,04	60	10
Q4DME9	TcCLB.506443.150	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	9,54	1,2E+06	2,9E+06	2,5E+06	403	205	228	-0,32	0,06	-175	23
Q4DUS2	TcCLB.507951.160	Uncharacterized protein	11,54	2,4E+06	2,7E+06	2,5E+06	292	223	229	-0,01	0,04	-63	6
Q4E301	TcCLB.506435.410	Uracil phosphoribosyltransferase, putative	11,66	3,1E+06	3,2E+06	2,5E+06	250	185	230	0,10	0,12	-20	45
Q4D8E8	TcCLB.511761.60	Uncharacterized protein	13,00	3,8E+06	2,0E+06	2,5E+06	217	278	231	0,19	-0,09	14	-47



Q4CYL6	TcCLB.504423.10	Uncharacterized protein	7,40	1,8E+06	2,1E+06	2,5E+06	338	264	232	-0,14	-0,06	-106	-32
Q4CLT8	TcCLB.510313.20	Uncharacterized protein (Fragment)	2,01	6,0E+03	6,0E+03	2,4E+06	847	874	233	-2,61	-2,61	-614	-641
Q4D318	TcCLB.509539.50	Small GTP-binding protein, putative	16,45	3,7E+06	4,5E+06	2,4E+06	221	155	234	0,18	0,27	13	79
Q4D4X1	TcCLB.511909.40	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	23,80	3,7E+06	2,9E+06	2,4E+06	220	209	235	0,19	0,08	15	26
Q4DUG8	TcCLB.510661.250	Cystathione gamma lyase, putative	31,04	9,0E+06	1,9E+06	2,4E+06	103	287	236	0,58	-0,11	133	-51
Q4DI18	TcCLB.509229.80	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	8,79	3,2E+06	2,5E+06	2,4E+06	244	229	237	0,12	0,02	-7	8
Q4D2F2	TcCLB.509797.40	Isoleucyl-tRNA synthetase, putative	22,13	2,6E+06	2,3E+06	2,4E+06	279	248	238	0,05	-0,02	-41	-10
Q4DJY1	TcCLB.510879.20	Ribosomal protein S19, putative	3,66	1,0E+06	1,4E+06	2,4E+06	444	331	239	-0,37	-0,22	-205	-92
Q4DDK8	TcCLB.511293.69	Glycosomal malate dehydrogenase, putative	16,91	5,8E+06	2,8E+06	2,4E+06	151	214	240	0,39	0,07	89	26
Q4D5W3	TcCLB.508169.90	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	16,61	3,2E+06	2,2E+06	2,3E+06	241	258	241	0,14	-0,03	0	-17
Q4DGT6	TcCLB.507081.130	Uncharacterized protein	16,76	4,8E+06	1,2E+06	2,3E+06	175	358	242	0,32	-0,30	67	-116
Q4CSX7	TcCLB.510855.10	Peptide methionine sulfoxide reductase, putative	2,84	3,0E+06	3,1E+06	2,3E+06	256	194	243	0,11	0,13	-13	49
Q4DCU2	TcCLB.506839.70	NADH dehydrogenase, putative	16,93	4,8E+06	2,9E+06	2,3E+06	176	203	244	0,32	0,11	68	41
Q4D6H2	TcCLB.509247.50	Methionyl-tRNA synthetase, putative	26,83	2,2E+06	2,2E+06	2,3E+06	305	259	245	-0,02	-0,02	-60	-14
Q4D6V2	TcCLB.506621.30	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	37,46	6,6E+06	2,0E+06	2,3E+06	139	280	246	0,46	-0,06	107	-34
Q4CTR0	TcCLB.511049.40	Leucyl-tRNA synthetase, putative	8,43	3,8E+06	1,2E+06	2,3E+06	215	356	247	0,22	-0,28	32	-109
Q4DSA7	TcCLB.507031.29	Nucleosome assembly protein, putative	10,00	3,5E+06	2,1E+06	2,2E+06	224	268	248	0,20	-0,03	24	-20
Q4E650	TcCLB.508153.400	Serine/threonine protein kinase, putative	9,09	2,1E+06	2,9E+06	2,2E+06	313	207	249	-0,03	0,11	-64	42

Q4CT37	TcCLB.511899.40	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	12,12	6,2E+06	2,3E+06	2,2E+06	146	244	250	0,45	0,02	104	6
Q4DJ68	TcCLB.505183.30	Malic enzyme	15,35	4,6E+06	1,2E+06	2,2E+06	183	349	251	0,32	-0,26	68	-98
Q4E3G1	TcCLB.507611.310	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative	8,88	2,8E+06	1,6E+06	2,2E+06	271	304	252	0,10	-0,13	-19	-52
Q4DXW9	TcCLB.510431.250	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative	11,01	3,8E+06	1,6E+06	2,2E+06	214	305	253	0,24	-0,13	39	-52
Q4E2W0	TcCLB.508175.370	Glutamine synthetase, putative	17,45	5,0E+06	2,2E+06	2,2E+06	170	255	254	0,36	0,00	84	-1
Q4D6I5	TcCLB.409117.20	40S ribosomal protein S14, putative	4,25	1,7E+05	2,9E+06	2,2E+06	760	206	255	-1,11	0,12	-505	49
Q4D7J7	TcCLB.509719.40	Cytochrome P450, putative	12,54	4,6E+06	2,0E+06	2,2E+06	186	282	256	0,32	-0,05	70	-26
Q4D2I4	TcCLB.504433.10	ADP-ribosylation factor 3, putative	18,05	2,5E+06	3,0E+06	2,2E+06	289	200	257	0,06	0,15	-32	57
Q4D5S8	TcCLB.511711.80	Ras-related protein rab-2a, putative	8,00	1,3E+06	3,4E+06	2,1E+06	382	177	258	-0,20	0,21	-124	81
Q4DLG3	TcCLB.503823.160	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase, putative	11,89	4,1E+06	2,3E+06	2,1E+06	198	250	259	0,29	0,03	61	9
Q4DUU1	TcCLB.508501.250	Uncharacterized protein	15,08	3,4E+06	2,2E+06	2,1E+06	235	261	260	0,20	0,01	25	-1
Q4DQC4	TcCLB.506629.200	Uncharacterized protein	18,45	6,7E+06	3,0E+06	2,1E+06	137	199	261	0,50	0,16	124	62
Q4DJT8	TcCLB.509237.10	Mevalonate kinase, putative	14,88	4,5E+06	3,1E+06	2,1E+06	187	192	262	0,33	0,17	75	70
Q4D9Z1	TcCLB.511365.70	Proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	11,93	3,0E+06	2,2E+06	2,1E+06	252	254	263	0,16	0,03	11	9
Q4E5I4	TcCLB.511277.110	Citrate synthase	9,31	3,5E+06	1,4E+06	2,1E+06	228	330	264	0,23	-0,16	36	-66
Q4D1B8	TcCLB.509997.30	Tryparedoxin, putative	5,69	5,0E+06	8,9E+05	2,0E+06	165	407	265	0,39	-0,36	100	-142
Q4E4N4	TcCLB.506925.120	Eukaryotic translation initiation factor 5A	9,55	1,7E+06	1,5E+06	2,0E+06	348	325	266	-0,08	-0,14	-82	-59
Q4CTD8	TcCLB.511635.10	Histone H2B	16,67	1,5E+06	5,6E+06	2,0E+06	366	124	267	-0,13	0,45	-99	143
Q4DK39	TcCLB.508827.79	40S ribosomal protein S17, putative	8,26	1,0E+06	2,2E+06	2,0E+06	438	263	268	-0,29	0,04	-170	5
Q4CQB8	TcCLB.509335.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,88	3,0E+06	3,4E+06	2,0E+06	255	179	269	0,18	0,23	14	90

Q4E3M8	TcCLB.510101.330	Uncharacterized protein	7,69	4,7E+06	3,0E+06	2,0E+06	181	201	270	0,37	0,18	89	69
Q4E408	TcCLB.511127.110	Heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU, putative	13,43	2,8E+06	1,9E+06	2,0E+06	269	283	271	0,15	-0,01	2	-12
Q4E4E7	TcCLB.510187.30	Tyrosine aminotransferase	4,08	2,6E+06	9,4E+05	2,0E+06	282	395	272	0,12	-0,32	-10	-123
Q4D673	TcCLB.511263.9	Heat shock protein, putative (Fragment)	18,62	3,5E+06	7,3E+05	2,0E+06	227	457	273	0,25	-0,43	46	-184
Q4E4E9	TcCLB.510187.20	Tyrosine aminotransferase, putative	9,12	1,9E+09	2,2E+06	2,0E+06	2	256	274	2,99	0,05	272	18
Q4CT43	TcCLB.503555.30	Trypanothione reductase, putative	14,60	5,7E+06	2,4E+06	1,9E+06	154	239	275	0,46	0,09	121	36
Q4CSI2	TcCLB.506441.20	Uncharacterized protein	8,91	2,1E+06	2,5E+06	1,9E+06	317	228	276	0,03	0,12	-41	48
Q4CV38	TcCLB.503689.4	Rab1 small GTP-binding protein, putative	4,02	2,2E+06	8,1E+05	1,9E+06	307	427	277	0,05	-0,37	-30	-150
Q4E5G5	TcCLB.511277.290	Aconitate hydratase	23,76	5,1E+06	1,6E+06	1,9E+06	162	309	278	0,43	-0,09	116	-31
Q4E544	TcCLB.510359.270	Mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	2,82	1,2E+06	1,3E+06	1,9E+06	399	341	279	-0,19	-0,17	-120	-62
Q4D184	TcCLB.506853.50	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, putative	27,22	2,1E+06	1,4E+06	1,9E+06	318	335	280	0,03	-0,15	-38	-55
Q4DRQ7	TcCLB.506739.150	60S ribosomal protein L13a, putative	7,83	1,3E+06	8,0E+05	1,9E+06	385	429	281	-0,16	-0,38	-104	-148
Q4DQB8	TcCLB.511827.30	Uncharacterized protein	15,90	4,3E+06	3,3E+06	1,9E+06	190	183	282	0,36	0,24	92	99
Q4DFB0	TcCLB.508209.100	10 kDa heat shock protein, putative	10,22	2,9E+06	1,1E+06	1,9E+06	261	361	283	0,18	-0,22	22	-78
Q4DI29	TcCLB.511019.90	Superoxide dismutase	15,21	3,4E+06	2,8E+06	1,9E+06	236	210	284	0,25	0,18	48	74
Q4DW38	TcCLB.507681.150	40S ribosomal protein S24	8,61	1,9E+06	1,5E+06	1,9E+06	329	311	285	0,01	-0,09	-44	-26
Q4D826	TcCLB.508285.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,80	1,6E+06	1,8E+06	1,9E+06	352	295	286	-0,06	-0,02	-66	-9
Q4DQS9	TcCLB.511821.179	Uncharacterized protein (Fragment)	11,38	3,0E+05	7,8E+05	1,8E+06	675	438	287	-0,79	-0,38	-388	-151
Q4DRT8	TcCLB.510943.50	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	16,53	6,8E+06	1,8E+06	1,8E+06	136	294	288	0,57	-0,02	152	-6
Q4DA84	TcCLB.506795.44	Uncharacterized protein	7,07	2,2E+06	3,6E+06	1,8E+06	304	171	289	0,08	0,29	-15	118

Q4DCP7	TcCLB.506943.4	Aldehyde dehydrogenase, putative (Fragment)	6,85	2,9E+06	1,5E+06	1,8E+06	262	312	290	0,20	-0,07	28	-22
Q4DHH8	TcCLB.510265.10	Quinone oxidoreductase, putative	5,31	2,0E+06	1,0E+06	1,8E+06	320	384	291	0,05	-0,25	-29	-93
Q4DQP3	TcCLB.506563.30	Coatomer subunit beta	16,81	2,1E+06	2,4E+06	1,8E+06	316	237	292	0,06	0,13	-24	55
Q4DLD9	TcCLB.511311.80	Uncharacterized protein (Fragment)	15,05	2,5E+06	1,7E+06	1,8E+06	288	303	293	0,14	-0,04	5	-10
Q4CYA0	TcCLB.509627.30	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 11, putative	20,09	2,0E+06	1,9E+06	1,8E+06	322	286	294	0,04	0,02	-28	8
Q4CQA8	TcCLB.503945.40	6-phosphogluconolactonase, putative	7,29	3,5E+06	2,5E+06	1,8E+06	226	230	295	0,29	0,15	69	65
Q4DMF2	TcCLB.506443.70	Glutathione-S-transferase/glutaredoxin, putative	5,97	2,6E+06	3,2E+06	1,8E+06	280	191	296	0,17	0,25	16	105
Q4DC80	TcCLB.511151.90	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	14,81	2,9E+06	3,0E+06	1,8E+06	260	202	297	0,22	0,23	37	95
Q4CXB4	TcCLB.503617.40	ATPase alpha subunit, putative (Fragment)	6,68	3,5E+06	1,7E+06	1,7E+06	225	297	298	0,31	0,00	73	1
Q4CW17	TcCLB.511067.30	Transketolase, putative (Fragment)	4,06	3,4E+06	4,4E+05	1,7E+06	231	561	299	0,30	-0,60	68	-262
Q4D9X2	TcCLB.510687.149	Coatomer alpha subunit, putative (Fragment)	10,41	2,7E+06	2,3E+06	1,7E+06	276	242	300	0,20	0,13	24	58
Q4E3F7	TcCLB.507611.370	Protein disulfide-isomerase	16,18	3,6E+06	1,5E+06	1,7E+06	223	314	301	0,32	-0,06	78	-13
Q4D029	TcCLB.506239.40	Uncharacterized protein	18,03	3,3E+06	2,1E+06	1,7E+06	239	270	302	0,29	0,09	63	32
Q4DEQ6	TcCLB.506295.100	Uncharacterized protein	5,72	1,1E+06	1,5E+06	1,7E+06	418	315	303	-0,19	-0,05	-115	-12
Q4CQW2	TcCLB.504121.30	60S ribosomal protein L4, putative	14,70	2,7E+06	9,4E+05	1,7E+06	273	396	304	0,21	-0,25	31	-92
Q4E3B3	TcCLB.508355.150	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 3, putative	14,30	5,0E+06	2,5E+06	1,7E+06	166	232	305	0,48	0,17	139	73
Q4DN73	TcCLB.506963.14	40S ribosomal protein S27, putative	5,37	1,3E+06	1,6E+06	1,6E+06	398	307	306	-0,11	0,00	-92	-1
Q4CTR5	TcCLB.506861.30	40S ribosomal protein L14, putative	3,56	1,4E+06	1,0E+06	1,6E+06	369	376	307	-0,06	-0,19	-62	-69
Q4DMG1	TcCLB.509717.90	Short chain 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase, putative	6,28	1,1E+06	2,0E+06	1,6E+06	424	276	308	-0,17	0,10	-116	32
Q4DTM9	TcCLB.511211.160	Heat shock protein 70 (HSP70),	2,13	1,3E+06	6,9E+05	1,6E+06	392	465	309	-0,09	-0,36	-83	-156

		putative											
Q4DM53	TcCLB.506425.40	Uncharacterized protein	6,72	1,9E+06	1,8E+06	1,6E+06	325	290	310	0,09	0,07	-15	20
Q4E0S3	TcCLB.509965.380	dTDP-glucose 4,6-dehydratase, putative	12,12	1,8E+06	2,1E+06	1,6E+06	337	273	311	0,06	0,12	-26	38
Q4D9T0	TcCLB.504045.60	Thermostable carboxypeptidase 1, putative	7,08	3,2E+06	9,1E+05	1,6E+06	242	403	312	0,32	-0,24	70	-91
Q4DV43	TcCLB.508647.200	Triosephosphate isomerase	8,48	4,6E+06	1,1E+06	1,6E+06	184	368	313	0,47	-0,15	129	-55
Q4DYD9	TcCLB.506321.290	Stress-induced protein sti1, putative	18,86	2,8E+06	1,4E+06	1,5E+06	268	332	314	0,26	-0,05	46	-18
Q4CMJ5	TcCLB.506313.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	7,62	1,5E+06	2,0E+06	1,5E+06	367	275	315	-0,02	0,12	-52	40
Q4DUB8	TcCLB.506625.240	Uncharacterized protein	6,13	1,4E+06	1,5E+06	1,5E+06	371	326	316	-0,03	-0,01	-55	-10
Q4DN94	TcCLB.508541.230	Casein kinase, putative	9,20	2,3E+06	2,5E+06	1,5E+06	297	233	317	0,18	0,21	20	84
Q4DWU3	TcCLB.508409.9	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative (Fragment)	3,52	1,7E+06	1,3E+06	1,5E+06	342	338	318	0,07	-0,04	-24	-20
Q4DGW6	TcCLB.506975.40	Aminoacylase, putative	15,06	4,3E+06	1,7E+06	1,5E+06	189	300	319	0,47	0,06	130	19
Q4DBX3	TcCLB.504103.20	Uncharacterized protein	23,41	2,7E+06	2,2E+06	1,5E+06	277	262	320	0,27	0,17	43	58
Q4DCU1	TcCLB.506839.80	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative	6,06	9,5E+05	9,7E+05	1,4E+06	458	389	321	-0,18	-0,17	-137	-68
Q4D3Z2	TcCLB.508589.30	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,12	6,1E+05	1,1E+06	1,4E+06	554	372	322	-0,37	-0,13	-232	-50
Q4E3H4	TcCLB.507611.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	6,79	2,3E+06	1,4E+06	1,4E+06	299	334	323	0,20	-0,02	24	-11
Q4CYH9	TcCLB.508321.11	Histone H2A (Fragment)	3,26	8,7E+05	5,2E+06	1,4E+06	475	133	324	-0,21	0,57	-151	191
Q4DH98	TcCLB.511285.90	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 8, putative	7,36	2,0E+06	1,7E+06	1,4E+06	324	301	325	0,14	0,07	1	24
Q4DN72	TcCLB.511233.20	60S ribosomal protein L34, putative	4,46	2,0E+05	1,0E+06	1,4E+06	739	382	326	-0,84	-0,14	-413	-56
Q4CXR4	TcCLB.506025.14	Ribosomal protein S29, putative	3,24	4,0E+05	7,4E+05	1,4E+06	629	450	327	-0,55	-0,28	-302	-123

Q4DVM9	TcCLB.508207.70	Adenine phosphoribosyltransferase, putative	9,45	2,1E+06	1,2E+06	1,4E+06	311	350	328	0,18	-0,07	17	-22
Q4E5P5	TcCLB.506529.360	Cytochrome C oxidase subunit IV, putative	4,22	2,3E+06	1,1E+06	1,4E+06	298	373	329	0,21	-0,12	31	-44
Q4E0B2	TcCLB.509287.50	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	7,83	1,2E+06	5,5E+05	1,4E+06	401	519	330	-0,05	-0,40	-71	-189
Q4E0Y0	TcCLB.508277.160	Glutaminyl-tRNA synthetase, putative	5,48	3,2E+06	2,2E+06	1,4E+06	243	252	331	0,36	0,21	88	79
Q4D9X5	TcCLB.510687.120	snoRNP protein gar1, putative	6,07	9,8E+05	7,5E+05	1,4E+06	452	447	332	-0,15	-0,26	-120	-115
Q4DDM3	TcCLB.507601.70	Dihydrolipoamide branched chain transacylase, putative	2,65	2,2E+06	1,3E+06	1,4E+06	302	345	333	0,21	-0,03	31	-12
Q4CYZ6	TcCLB.507689.30	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	2,41	1,7E+06	1,8E+06	1,4E+06	343	292	334	0,10	0,12	-9	42
Q4DWI7	TcCLB.511725.10	Proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	6,14	2,1E+06	1,5E+06	1,4E+06	310	324	335	0,20	0,04	25	11
Q4D8L7	TcCLB.509203.40	Glycosomal membrane protein, putative	6,87	1,5E+06	1,4E+06	1,3E+06	363	333	336	0,04	0,01	-27	3
Q4CNF4	TcCLB.508197.10	60S ribosomal protein L11, putative	15,75	8,1E+05	9,1E+05	1,3E+06	492	400	337	-0,22	-0,17	-155	-63
Q4DE50	TcCLB.508699.40	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	10,75	9,8E+05	5,2E+05	1,3E+06	451	525	338	-0,13	-0,41	-113	-187
Q4D6R8	TcCLB.509581.5	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	4,67	1,1E+06	2,7E+05	1,3E+06	425	639	339	-0,09	-0,68	-86	-300
Q4DQF8	TcCLB.506773.44	Cytochrome b5, putative	8,82	6,9E+05	2,7E+06	1,3E+06	529	222	340	-0,28	0,31	-189	118
Q4E2Y1	TcCLB.508175.146	60S ribosomal protein L23a, putative	3,17	1,4E+06	1,1E+06	1,3E+06	376	364	341	0,02	-0,06	-35	-23
Q4D5J9	TcCLB.511527.70	Myosin heavy chain, putative	17,81	2,5E+06	2,1E+06	1,3E+06	287	265	342	0,28	0,21	55	77
Q4D066	TcCLB.508675.29	Calpain-like cysteine peptidase, putative	3,35	2,3E+06	9,5E+05	1,3E+06	301	392	343	0,24	-0,14	42	-49
Q4E2W6	TcCLB.508175.309	60S ribosomal protein L19, putative	3,06	6,3E+05	6,5E+05	1,3E+06	547	486	344	-0,31	-0,30	-203	-142
Q4DGP4	TcCLB.506835.110	Uncharacterized protein	10,53	3,3E+06	1,8E+06	1,3E+06	240	296	345	0,40	0,14	105	49

Q4E3P1	TcCLB.510101.170	40S ribosomal protein S5, putative	3,86	9,7E+05	1,3E+06	1,3E+06	455	342	346	-0,12	0,01	-109	4
Q4CM88	TcCLB.510739.19	Cystathione gamma lyase, putative (Fragment)	3,98	3,0E+06	1,0E+06	1,3E+06	253	375	347	0,37	-0,09	94	-28
Q4D9J1	TcCLB.506857.90	Proteasome regulatory ATPase subunit 1, putative	2,79	1,3E+06	3,2E+06	1,3E+06	393	187	348	0,00	0,40	-45	161
Q4E256	TcCLB.508707.200	Nucleoside diphosphate kinase	3,98	3,7E+06	7,2E+05	1,3E+06	219	459	349	0,47	-0,24	130	-110
Q4D7V2	TcCLB.508971.40	Acetylornithine deacetylase-like, putative	7,98	1,6E+06	1,2E+06	1,2E+06	359	360	350	0,10	-0,03	-9	-10
Q4DTG3	TcCLB.508737.210	Uncharacterized protein	3,12	1,7E+06	1,8E+06	1,2E+06	345	289	351	0,14	0,18	6	62
Q4E2N6	TcCLB.510889.140	Alanine aminotransferase, putative	9,91	6,0E+03	4,2E+06	1,2E+06	848	157	352	-2,31	0,54	-496	195
Q4D7M6	TcCLB.510507.20	3-ketoacyl-CoA thiolase, putative	5,99	1,8E+06	5,5E+05	1,2E+06	334	520	353	0,17	-0,35	19	-167
Q4D123	TcCLB.510437.40	Malate dehydrogenase	4,28	2,9E+06	1,3E+06	1,2E+06	258	340	354	0,38	0,03	96	14
Q4DTF6	TcCLB.510311.70	26S protease regulatory subunit, putative	5,88	1,3E+06	1,0E+06	1,2E+06	384	379	355	0,04	-0,07	-29	-24
Q4E0D4	TcCLB.509875.11	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	7,91	9,7E+05	2,3E+06	1,2E+06	454	246	356	-0,10	0,28	-98	110
Q4DHz9	TcCLB.511071.171	60S ribosomal protein L12, putative	2,93	1,8E+06	1,5E+06	1,2E+06	340	323	357	0,16	0,08	17	34
Q4DMU8	TcCLB.511517.37	Reticulon-like protein	6,24	2,7E+06	2,3E+06	1,2E+06	274	245	358	0,36	0,29	84	113
Q4DX95	TcCLB.506945.30	CAS/CSE/importin domain protein, putative	7,23	1,4E+06	1,3E+06	1,2E+06	374	339	359	0,08	0,05	-15	20
Q4CUD7	TcCLB.503477.20	Transaldolase	8,34	3,4E+06	7,1E+05	1,2E+06	234	462	360	0,47	-0,21	126	-102
Q4DE55	TcCLB.504089.60	Uncharacterized protein	6,31	1,3E+06	1,6E+06	1,1E+06	388	306	361	0,06	0,16	-27	55
Q4DYM1	TcCLB.504427.250	Ubiquitin-activating enzyme E1, putative	9,10	8,8E+05	8,4E+05	1,1E+06	474	420	362	-0,10	-0,12	-112	-58
Q4DH32	TcCLB.506801.80	Cysteine peptidase inhibitor	1,26	8,6E+05	9,0E+05	1,1E+06	477	404	363	-0,11	-0,09	-114	-41
Q4DSF3	TcCLB.504057.40	Uncharacterized protein	5,68	2,1E+06	1,7E+06	1,1E+06	314	302	364	0,27	0,18	50	62
Q4DCY2	TcCLB.509895.20	Uncharacterized protein	6,69	9,1E+05	1,2E+06	1,1E+06	467	353	365	-0,08	0,04	-102	12

Q4DG60	TcCLB.511575.130	Folate/pteridine transporter, putative	6,64	1,1E+06	7,6E+05	1,1E+06	419	441	366	0,00	-0,16	-53	-75
Q4DIT6	TcCLB.511389.150	Thiolase protein-like protein, putative	5,57	6,9E+05	1,2E+06	1,1E+06	530	354	367	-0,20	0,04	-163	13
Q4DW69	TcCLB.508231.20	40S ribosomal protein S12	14,91	1,9E+06	1,5E+06	1,1E+06	326	316	368	0,25	0,14	42	52
Q4CRU8	TcCLB.503815.10	Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative	14,21	2,3E+06	2,3E+06	1,1E+06	295	243	369	0,33	0,33	74	126
Q4CYW6	TcCLB.506341.10	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein, putative (Fragment)	8,57	7,5E+05	5,0E+05	1,1E+06	511	531	370	-0,15	-0,33	-141	-161
Q4CN29	TcCLB.508597.9	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	1,29	9,9E+05	9,4E+05	1,0E+06	448	394	371	-0,02	-0,04	-77	-23
Q4D6H3	TcCLB.509247.30	Uncharacterized protein	8,33	1,1E+06	7,7E+05	1,0E+06	413	439	372	0,04	-0,13	-41	-67
Q4CYI3	TcCLB.510797.10	2-oxoglutarate dehydrogenase subunit, putative	8,52	1,4E+06	1,3E+06	1,0E+06	372	343	373	0,13	0,10	1	30
Q4CVQ1	TcCLB.511037.20	Uncharacterized protein	7,86	1,6E+06	2,1E+06	1,0E+06	358	269	374	0,18	0,31	16	105
Q4DG65	TcCLB.511575.60	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	11,14	2,8E+06	8,5E+05	1,0E+06	265	418	375	0,44	-0,08	110	-43
Q4DV76	TcCLB.508173.100	Monooxygenase, putative	3,66	1,8E+06	1,4E+06	1,0E+06	332	328	376	0,25	0,15	44	48
Q4D9K6	TcCLB.510039.60	Uncharacterized protein	0,97	5,8E+05	1,2E+06	1,0E+06	561	352	377	-0,24	0,08	-184	25
Q4CQ60	TcCLB.459199.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	7,47	1,1E+06	1,1E+06	1,0E+06	427	366	378	0,03	0,05	-49	12
Q4D8H9	TcCLB.511309.30	Hydrolase, alpha/beta fold family, putative	6,10	1,2E+06	1,2E+06	1,0E+06	406	347	379	0,08	0,10	-27	32
Q4CW20	TcCLB.511067.10	Tubulin folding cofactor D, putative	11,11	1,4E+06	9,8E+05	1,0E+06	380	387	380	0,13	-0,01	0	-7
Q4DGZ5	TcCLB.511809.130	40S ribosomal protein S15, putative	4,08	9,2E+05	7,6E+05	1,0E+06	466	440	381	-0,04	-0,12	-85	-59
Q4D2Z8	TcCLB.504839.50	Nucleosome assembly protein-like protein, putative	5,62	1,5E+06	1,2E+06	1,0E+06	361	359	382	0,18	0,07	21	23
Q4CRM4	TcCLB.503625.10	Asparagine synthetase A, putative	5,57	1,8E+06	1,5E+06	9,9E+05	335	317	383	0,26	0,18	48	66
Q4E0X3	TcCLB.508277.230	Nucleolar RNA binding protein,	4,28	9,9E+05	1,5E+06	9,9E+05	449	320	384	0,00	0,17	-65	64



		putative											
Q4D590	TcCLB.507927.20	Mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	15,51	8,9E+05	8,1E+05	9,9E+05	470	428	385	-0,04	-0,09	-85	-43
Q4E078	TcCLB.503611.20	Ribosomal protein L24, putative	3,18	7,2E+05	6,2E+05	9,9E+05	521	495	386	-0,14	-0,20	-135	-109
Q4CYR3	TcCLB.508039.30	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	4,66	1,3E+06	1,8E+06	9,8E+05	389	291	387	0,13	0,27	-2	96
Q4DZB0	TcCLB.504105.20	Eukaryotic translation initiation factor 5, putative	7,79	1,2E+06	1,2E+06	9,8E+05	402	355	388	0,09	0,09	-14	33
Q4CS16	TcCLB.504835.20	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, putative	3,66	1,0E+06	7,5E+05	9,7E+05	430	446	389	0,04	-0,11	-41	-57
Q4DW67	TcCLB.508231.40	Uncharacterized protein	8,36	2,2E+06	1,1E+06	9,6E+05	306	371	390	0,36	0,04	84	19
Q4DQM4	TcCLB.509109.120	Protein tyrosine phosphatase, putative	4,77	1,2E+06	1,2E+06	9,6E+05	411	348	391	0,08	0,11	-20	43
Q4DAD9	TcCLB.508989.9	Nucleoside phosphorylase, putative (Fragment)	4,75	3,4E+06	8,5E+05	9,5E+05	233	416	392	0,55	-0,05	159	-24
Q4DEQ0	TcCLB.506295.160	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial, putative	7,11	1,1E+06	8,9E+05	9,5E+05	422	406	393	0,06	-0,03	-29	-13
Q4DRG7	TcCLB.506775.180	Uncharacterized protein	3,66	1,0E+06	9,3E+05	9,5E+05	433	397	394	0,04	-0,01	-39	-3
Q4DQB0	TcCLB.511827.100	Cysteine peptidase C (CPC), putative	4,01	1,8E+06	1,1E+06	9,5E+05	339	369	395	0,27	0,05	56	26
Q4CSV7	TcCLB.508373.29	Orotidine 5-phosphate decarboxylase (Fragment)	3,58	3,9E+05	1,0E+06	9,3E+05	632	380	396	-0,37	0,04	-236	16
Q4DNM4	TcCLB.506821.210	NADH-cytochrome b5 reductase	9,33	3,2E+06	1,0E+06	9,2E+05	245	386	397	0,54	0,03	152	11
Q4CXT3	TcCLB.508349.39	RNA-binding protein, putative (Fragment)	11,28	1,5E+06	7,8E+05	9,1E+05	360	437	398	0,22	-0,07	38	-39
Q4CWB3	TcCLB.508369.50	Acetyl-CoA carboxylase, putative (Fragment)	7,75	7,5E+05	7,3E+05	9,1E+05	509	458	399	-0,08	-0,10	-110	-59
Q4DU57	TcCLB.511391.180	Golgi/lysosome glycoprotein, putative	8,53	1,7E+06	1,5E+06	9,1E+05	344	318	400	0,28	0,22	56	82
Q4D7U8	TcCLB.506591.20	U-box domain protein, putative	2,56	1,1E+06	1,1E+06	9,0E+05	412	367	401	0,10	0,09	-11	34

Q4DTU3	TcCLB.504741.20	Obg-like ATPase 1	3,16	6,3E+05	8,9E+05	9,0E+05	549	408	402	-0,16	-0,01	-147	-6
Q4CW22	TcCLB.504001.20	Uncharacterized protein	2,81	1,5E+06	2,0E+06	8,9E+05	368	277	403	0,21	0,35	35	126
Q4DD91	TcCLB.506829.110	Fatty acyl CoA synthetase 2, putative	6,80	1,0E+06	1,1E+06	8,9E+05	436	365	404	0,06	0,10	-32	39
Q4DKM0	TcCLB.506843.40	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	5,94	2,1E+06	1,7E+05	8,7E+05	312	700	405	0,38	-0,72	93	-295
Q4DQQ7	TcCLB.509167.100	Valyl-tRNA synthetase, putative	1,59	1,1E+06	7,4E+05	8,6E+05	420	448	406	0,10	-0,07	-14	-42
Q4D976	TcCLB.506691.14	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative (Fragment)	6,14	6,7E+05	5,6E+05	8,5E+05	540	510	407	-0,11	-0,18	-133	-103
Q4CNH7	TcCLB.509057.20	Importin subunit alpha	4,82	1,4E+06	7,9E+05	8,5E+05	381	433	408	0,20	-0,03	27	-25
Q4CYZ1	TcCLB.509877.30	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein, putative	3,89	1,3E+06	9,7E+05	8,5E+05	395	390	409	0,18	0,06	14	19
Q4D5P1	TcCLB.511051.70	Aminopeptidase, putative	8,84	2,1E+06	5,0E+05	8,5E+05	309	532	410	0,40	-0,23	101	-122
Q4E2R7	TcCLB.504153.160	Carboxypeptidase, putative	7,22	2,8E+06	1,0E+06	8,5E+05	264	383	411	0,52	0,07	147	28
Q4DFX9	TcCLB.510655.120	Aminopeptidase P, putative	14,83	2,7E+06	7,9E+05	8,5E+05	275	432	412	0,50	-0,03	137	-20
Q4DWM7	TcCLB.507089.170	Uncharacterized protein	4,08	9,0E+05	3,6E+05	8,5E+05	468	597	413	0,03	-0,38	-55	-184
Q4DQ04	TcCLB.509735.120	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	6,71	8,4E+05	8,7E+05	8,4E+05	486	412	414	0,00	0,02	-72	2
Q4CV42	TcCLB.509001.40	Calpain-like cysteine peptidase, putative	4,12	7,1E+05	6,5E+05	8,4E+05	522	483	415	-0,07	-0,11	-107	-68
Q4DEQ9	TcCLB.506295.70	Uncharacterized protein	3,02	1,0E+06	1,6E+06	8,4E+05	431	308	416	0,10	0,29	-15	108
Q4DVH1	TcCLB.506859.20	Proteasome regulatory ATPase subunit 5, putative	7,04	1,4E+06	4,8E+05	8,3E+05	373	541	417	0,22	-0,24	44	-124
Q4E1W3	TcCLB.507993.150	Uncharacterized protein	5,99	1,5E+06	8,9E+05	8,3E+05	365	405	418	0,25	0,03	53	13
Q4DJN0	TcCLB.510609.20	Uncharacterized protein	3,33	9,4E+05	5,6E+05	8,2E+05	460	516	419	0,06	-0,17	-41	-97
Q4DAV5	TcCLB.504069.90	Centromere/microtubule binding protein cbf5, putative	6,27	1,6E+06	1,2E+06	8,2E+05	355	357	420	0,28	0,15	65	63
Q4DQN5	TcCLB.506563.210	Calpain-like cysteine peptidase,	7,16	1,4E+06	8,7E+05	8,2E+05	378	413	421	0,22	0,02	43	8

		putative											
Q4DWL8	TcCLB.507089.270	Dihydrolipoyl dehydrogenase	6,08	2,2E+06	8,2E+05	8,2E+05	308	426	422	0,43	0,00	114	-4
Q4DQP9	TcCLB.509167.180	Kinesin-like protein	4,13	6,6E+05	9,7E+05	8,1E+05	542	388	423	-0,09	0,08	-119	35
Q4DA73	TcCLB.510339.50	Spermidine synthase, putative	5,84	1,5E+06	9,1E+05	8,1E+05	364	402	424	0,26	0,05	60	22
Q4DC38	TcCLB.511291.90	40S ribosomal protein S13, putative	3,06	5,5E+05	6,5E+05	8,1E+05	573	480	425	-0,16	-0,09	-148	-55
Q4DJ35	TcCLB.511239.110	Uncharacterized protein	3,85	1,8E+06	5,4E+05	8,0E+05	341	521	426	0,34	-0,17	85	-95
Q4E4T4	TcCLB.508461.270	Rab7 GTP binding protein, putative	5,59	8,4E+05	6,7E+05	8,0E+05	485	476	427	0,02	-0,08	-58	-49
Q4CX26	TcCLB.507501.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	7,62	7,7E+05	1,3E+06	7,9E+05	506	346	428	-0,01	0,21	-78	82
Q4DIV7	TcCLB.507709.70	Uncharacterized protein	2,47	1,0E+06	8,3E+05	7,9E+05	443	423	429	0,11	0,02	-14	6
Q4D757	TcCLB.504071.30	Uncharacterized protein	3,91	1,4E+06	9,3E+05	7,9E+05	370	398	430	0,25	0,07	60	32
Q4CU92	TcCLB.510947.30	Uncharacterized protein	7,84	7,7E+05	4,1E+05	7,9E+05	507	575	431	-0,01	-0,29	-76	-144
Q4E0T7	TcCLB.509965.220	Uncharacterized protein	5,10	1,0E+06	3,5E+05	7,9E+05	442	603	432	0,11	-0,35	-10	-171
Q4D617	TcCLB.506585.70	P450 reductase, putative	3,79	7,4E+05	9,1E+05	7,9E+05	517	401	433	-0,03	0,07	-84	32
Q4D0V1	TcCLB.508319.20	Uncharacterized protein	2,50	3,4E+05	4,1E+05	7,8E+05	658	573	434	-0,36	-0,28	-224	-139
Q4E0T1	TcCLB.509965.290	p22 protein, putative	1,89	1,7E+06	8,9E+05	7,8E+05	347	410	435	0,34	0,06	88	25
Q4E5H8	TcCLB.511277.160	Ribosomal protein	4,11	1,1E+06	9,5E+05	7,7E+05	426	391	436	0,14	0,09	10	45
Q4DG03	TcCLB.509053.170	DREV methyltransferase, putative	4,73	1,0E+06	6,9E+05	7,6E+05	435	466	437	0,13	-0,04	2	-29
Q4CPI5	TcCLB.504985.10	Uncharacterized protein	-2,00	2,3E+05	6,3E+05	7,6E+05	719	490	438	-0,52	-0,08	-281	-52
Q4DJQ7	TcCLB.509395.100	Cytochrome b-domain protein, putative	1,47	8,1E+05	6,6E+04	7,6E+05	498	799	439	0,02	-1,06	-59	-360
Q4DKU9	TcCLB.509769.60	Uncharacterized protein	3,74	1,1E+06	2,5E+05	7,6E+05	421	651	440	0,16	-0,49	19	-211
Q4DA54	TcCLB.507019.40	Histidyl-tRNA synthetase, putative	6,13	1,6E+06	6,5E+05	7,6E+05	357	482	441	0,32	-0,07	84	-41
Q4DSL1	TcCLB.511303.60	Translation initiation factor, putative	6,61	8,6E+05	6,9E+05	7,5E+05	476	467	442	0,06	-0,04	-34	-25

Q4DQN2	TcCLB.509109.30	Uncharacterized protein	3,86	1,2E+06	3,9E+05	7,5E+05	400	585	443	0,22	-0,28	43	-142
Q4DEI4	TcCLB.504867.20	ABC transporter, putative	4,23	7,0E+05	1,7E+06	7,5E+05	526	299	444	-0,03	0,35	-82	145
Q4D1S6	TcCLB.506025.4	Membrane-bound acid phosphatase, putative (Fragment)	3,45	9,4E+05	4,4E+05	7,5E+05	461	560	445	0,10	-0,23	-16	-115
Q4DJZ6	TcCLB.506945.290	Ribosomal protein L15	2,03	4,5E+05	6,6E+05	7,4E+05	609	478	446	-0,22	-0,05	-163	-32
Q4CZ29	TcCLB.503419.30	Thiol-dependent reductase 1, putative	1,70	2,8E+06	1,5E+06	7,4E+05	270	319	447	0,57	0,30	177	128
Q4D939	TcCLB.508897.30	ABC transporter, putative	3,08	7,2E+05	4,1E+05	7,4E+05	518	572	448	-0,01	-0,26	-70	-124
Q4DR82	TcCLB.506577.120	Sterol C-24 reductase, putative	2,90	1,6E+06	8,3E+05	7,4E+05	356	421	449	0,33	0,05	93	28
Q4DGX8	TcCLB.509213.100	Uncharacterized protein	12,53	2,2E+06	1,9E+06	7,4E+05	303	284	450	0,48	0,42	147	166
Q4E2P8	TcCLB.504153.360	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	3,21	1,4E+06	1,0E+06	7,3E+05	375	377	451	0,27	0,15	76	74
Q4DFL2	TcCLB.508323.100	I/6 autoantigen, putative	5,46	1,1E+06	7,5E+05	7,3E+05	414	444	452	0,19	0,01	38	8
Q4E2Y3	TcCLB.508175.110	Uncharacterized protein	4,06	9,3E+05	1,1E+06	7,3E+05	464	363	453	0,10	0,19	-11	90
Q4E1B7	TcCLB.511807.280	Uncharacterized protein	6,41	7,8E+05	5,5E+05	7,3E+05	503	517	454	0,03	-0,12	-49	-63
Q4DZJ0	TcCLB.508799.270	Uncharacterized protein	3,74	1,1E+06	6,7E+05	7,3E+05	428	475	455	0,17	-0,04	27	-20
Q4D3D1	TcCLB.503959.78	Uncharacterized protein (Fragment)	3,77	1,4E+06	4,4E+05	7,2E+05	379	559	456	0,27	-0,22	77	-103
Q4E4A3	TcCLB.510187.480	Phosphomannomutase	6,24	1,3E+06	4,6E+05	7,2E+05	383	548	457	0,27	-0,19	74	-91
Q4DQQ2	TcCLB.509167.150	Homoserine kinase, putative	16,33	1,7E+06	6,8E+05	7,1E+05	349	472	458	0,37	-0,02	109	-14
Q4CTD5	TcCLB.511635.40	Protein tyrosine phosphatase, putative	4,89	8,0E+05	7,6E+05	7,1E+05	500	442	459	0,05	0,03	-41	17
EFTS2	TcCLB.506989.140	Elongation factor Ts 2, mitochondrial	3,07	5,5E+05	6,5E+05	7,1E+05	575	479	460	-0,11	-0,03	-115	-19
Q4DIM7	TcCLB.509777.70	Calcium-transporting ATPase	4,73	9,0E+05	6,7E+05	7,1E+05	469	474	461	0,10	-0,02	-8	-13
Q4CSB2	TcCLB.504339.19	NADP-dependent alcohol hydrogenase, putative (Fragment)	5,24	1,0E+06	5,3E+05	7,0E+05	439	522	462	0,16	-0,13	23	-60
Q4E024	TcCLB.507063.90	Mitochondrial DNA polymerase beta,	6,53	1,6E+06	5,6E+05	7,0E+05	353	511	463	0,37	-0,09	110	-48

		putative											
G3XCP0	TcCLB.510323.40	Heat shock protein 20, putative	4,38	7,6E+05	1,4E+06	6,9E+05	508	336	464	0,04	0,29	-44	128
Q4E1M2	TcCLB.508909.20	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	3,16	8,5E+05	7,2E+05	6,9E+05	483	460	465	0,09	0,02	-18	5
Q4CY89	TcCLB.508649.20	Uncharacterized protein	8,88	4,5E+05	5,5E+05	6,8E+05	612	518	466	-0,18	-0,09	-146	-52
Q4DMX9	TcCLB.511529.160	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, putative	7,51	1,3E+06	7,5E+05	6,7E+05	397	443	467	0,27	0,05	70	24
Q4DK32	TcCLB.506525.10	Uncharacterized protein	3,32	7,4E+05	9,2E+05	6,7E+05	516	399	468	0,04	0,14	-48	69
Q4CN13	TcCLB.510479.11	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	2,02	5,5E+05	1,2E+06	6,6E+05	571	351	469	-0,08	0,26	-102	118
Q4DW33	TcCLB.507681.210	Uncharacterized protein	7,59	1,0E+06	7,4E+05	6,6E+05	440	449	470	0,19	0,05	30	21
Q4D5L7	TcCLB.510897.10	Cullin 2, putative	2,15	4,4E+05	3,7E+05	6,5E+05	615	594	471	-0,17	-0,25	-144	-123
Q4CY60	TcCLB.509793.50	Uncharacterized protein	2,77	6,0E+03	6,9E+05	6,5E+05	849	469	472	-2,04	0,02	-377	3
Q4E0Y1	TcCLB.508277.150	Proliferating cell nuclear antigen	5,58	9,2E+05	8,0E+05	6,5E+05	465	431	473	0,15	0,09	8	42
Q4CXX8	TcCLB.510325.69	Aminopeptidase, putative (Fragment)	1,25	6,0E+03	6,0E+03	6,5E+05	850	875	474	-2,03	-2,03	-376	-401
Q4E397	TcCLB.508355.320	Arginyl-tRNA synthetase, putative	5,95	7,0E+05	5,2E+05	6,5E+05	528	523	475	0,03	-0,09	-53	-48
Q4CNA4	TcCLB.508301.20	Mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative (Fragment)	-2,00	4,8E+05	2,8E+05	6,4E+05	602	637	476	-0,13	-0,36	-126	-161
Q4CNK1	TcCLB.506189.10	Nucleolar protein, putative (Fragment)	4,54	8,3E+05	4,0E+05	6,3E+05	489	576	477	0,11	-0,20	-12	-99
Q4DE25	TcCLB.506619.10	Sedoheptulose-1,6-bisphosphatase, putative	2,28	1,3E+06	4,6E+05	6,3E+05	386	549	478	0,32	-0,13	92	-71
Q4CVF3	TcCLB.509197.39	Cation transporter, putative	2,88	9,6E+05	7,5E+05	6,3E+05	456	445	479	0,19	0,08	23	34
Q4CW13	TcCLB.508727.9	Uncharacterized protein (Fragment)	4,40	7,9E+05	8,2E+05	6,2E+05	501	425	480	0,11	0,12	-21	55
Q4DCA9	TcCLB.506933.60	Mitochondrial RNA binding protein, putative	6,33	5,1E+05	7,8E+05	6,1E+05	589	436	481	-0,08	0,11	-108	45
Q4E0T5	TcCLB.509965.250	Ubiquitin fusion degradation protein	4,37	8,1E+05	4,6E+05	6,1E+05	493	550	482	0,12	-0,12	-11	-68

		2, putative											
Q4DY42	TcCLB.511727.160	Uncharacterized protein	3,93	8,6E+05	1,5E+06	6,1E+05	479	322	483	0,15	0,39	4	161
Q4DHE0	TcCLB.509065.160	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein, putative	4,97	1,2E+06	5,8E+05	6,0E+05	404	506	484	0,30	-0,01	80	-22
Q4DSX1	TcCLB.508347.130	Deoxyhypusine hydroxylase	4,81	4,5E+05	1,1E+06	5,9E+05	608	370	485	-0,12	0,26	-123	115
Q4DWB1	TcCLB.505997.60	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	5,94	2,4E+05	1,0E+06	5,9E+05	710	385	486	-0,38	0,23	-224	101
Q4CT34	TcCLB.504575.20	Uncharacterized protein	7,94	1,2E+06	7,9E+05	5,9E+05	405	435	487	0,31	0,13	82	52
Q4D7N8	TcCLB.503447.40	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,63	6,2E+05	8,2E+05	5,8E+05	551	424	488	0,03	0,15	-63	64
Q4D4C9	TcCLB.506831.40	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	0,97	6,1E+05	4,7E+05	5,7E+05	555	542	489	0,02	-0,08	-66	-53
Q4D3V7	TcCLB.507221.20	Ribonuclease, putative	3,18	4,7E+05	2,5E+05	5,7E+05	604	650	490	-0,09	-0,36	-114	-160
Q4DCY3	TcCLB.509895.10	Uncharacterized protein	4,22	8,4E+05	7,4E+05	5,7E+05	487	452	491	0,17	0,12	4	39
Q4DFC2	TcCLB.507609.60	Myo-inositol-1-phosphate synthase, putative	2,82	1,0E+06	4,8E+05	5,6E+05	437	539	492	0,26	-0,07	55	-47
Q4E4E5	TcCLB.510187.60	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3,93	1,8E+06	5,7E+05	5,6E+05	331	508	493	0,51	0,01	162	-15
Q4DPZ5	TcCLB.509179.100	Uncharacterized protein	4,25	1,3E+06	8,8E+05	5,6E+05	396	411	494	0,36	0,20	98	83
Q4E4D7	TcCLB.510187.140	Uncharacterized protein	2,82	3,5E+05	4,6E+05	5,5E+05	649	546	495	-0,20	-0,08	-154	-51
Q4E4N2	TcCLB.506925.150	Protein phosphatase, putative	2,49	3,2E+05	3,8E+05	5,5E+05	665	590	496	-0,24	-0,16	-169	-94
Q4DZJ8	TcCLB.508799.170	3-methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta subunit, putative	5,16	1,3E+06	1,1E+06	5,5E+05	387	362	497	0,38	0,32	110	135
Q4D7E5	TcCLB.509205.120	Uncharacterized protein	1,93	4,9E+05	6,1E+05	5,5E+05	595	501	498	-0,04	0,05	-97	-3
Q4E4I9	TcCLB.506885.70	Polyadenylate-binding protein	2,03	5,3E+05	1,1E+06	5,5E+05	582	374	499	-0,01	0,28	-83	125
Q4CXB5	TcCLB.503617.31	Nuclear receptor binding factor,	2,97	7,2E+05	5,0E+05	5,4E+05	520	534	500	0,12	-0,04	-20	-34

		putative											
Q4DUK5	TcCLB.511245.150	Elongation of fatty acids protein	0,99	3,2E+05	4,1E+05	5,4E+05	663	571	501	-0,22	-0,12	-162	-70
Q4CRN8	TcCLB.511811.30	Uncharacterized protein (Fragment)	5,11	6,2E+05	6,5E+05	5,4E+05	550	484	502	0,07	0,08	-48	18
Q4D004	TcCLB.509505.10	Protein disulfide isomerase, putative (Fragment)	3,16	6,0E+03	6,0E+03	5,4E+05	851	876	503	-1,95	-1,95	-348	-373
Q4DK90	TcCLB.509611.160	Proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	4,95	8,8E+05	7,3E+05	5,4E+05	473	456	504	0,22	0,13	31	48
Q4DWC3	TcCLB.509733.100	Translation elongation factor 1-beta, putative	3,59	1,3E+06	8,0E+05	5,3E+05	391	430	505	0,38	0,17	114	75
Q4E0K2	TcCLB.509429.270	Proteasome regulatory ATPase subunit 3, putative	3,92	1,9E+06	1,3E+06	5,3E+05	327	344	506	0,56	0,38	179	162
Q4CTN0	TcCLB.508137.30	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative	2,83	9,7E+05	8,5E+05	5,3E+05	453	417	507	0,26	0,21	54	90
Q4DY37	TcCLB.511727.230	MAP protein kinase, putative	2,53	1,3E+06	6,4E+05	5,3E+05	394	488	508	0,38	0,08	114	20
Q4DUK6	TcCLB.511245.140	Elongation of fatty acids protein	1,19	3,1E+05	4,9E+05	5,2E+05	672	535	509	-0,23	-0,02	-163	-26
Q4DT61	TcCLB.511621.50	RNA-binding protein, putative	4,20	2,6E+05	4,2E+05	5,2E+05	702	569	510	-0,31	-0,10	-192	-59
Q4DIM2	TcCLB.509777.130	Uncharacterized protein	7,31	2,0E+06	1,8E+06	5,2E+05	321	293	511	0,59	0,54	190	218
Q4CM92	TcCLB.508955.20	Uncharacterized protein	3,38	7,9E+05	2,0E+05	5,2E+05	502	665	512	0,18	-0,41	10	-153
Q4D8F3	TcCLB.511761.10	Uncharacterized protein	1,73	8,5E+05	6,8E+05	5,2E+05	481	470	513	0,22	0,12	32	43
Q4DWS5	TcCLB.508409.210	Hsc70-interacting protein, putative	7,34	1,4E+06	3,0E+05	5,2E+05	377	623	514	0,43	-0,23	137	-109
Q4DU35	TcCLB.506241.100	60S ribosomal protein L32, putative	2,96	6,4E+04	2,8E+05	5,1E+05	823	634	515	-0,90	-0,26	-308	-119
Q4CSD4	TcCLB.460127.20	CAAX prenyl protease 1, putative	5,81	7,0E+05	6,1E+05	5,1E+05	525	502	516	0,13	0,07	-9	14
Q4CMP6	TcCLB.510873.10	NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase protein, putative (Fragment)	4,47	1,3E+06	6,5E+05	5,1E+05	390	485	517	0,41	0,10	127	32
Q4DUR6	TcCLB.507951.270	Uncharacterized protein	2,47	6,5E+05	2,7E+05	5,0E+05	544	640	518	0,11	-0,27	-26	-122

Q4DXW6	TcCLB.506885.14	Ribosomal protein L37	0,98	1,6E+05	6,0E+03	5,0E+05	770	866	519	-0,50	-1,92	-251	-347
Q4DRU2	TcCLB.510943.33	Fatty acyl CoA synthetase, putative	2,41	3,2E+05	5,1E+05	5,0E+05	667	530	520	-0,19	0,01	-147	-10
Q4DV73	TcCLB.508173.129	Uncharacterized protein	4,29	6,0E+03	7,3E+05	4,9E+05	852	454	521	-1,91	0,17	-331	67
Q4DID7	TcCLB.506959.64	Short-chain dehydrogenase, putative	4,18	9,4E+05	7,4E+05	4,9E+05	462	451	522	0,28	0,18	60	71
Q4CS24	TcCLB.509845.9	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative (Fragment)	4,21	2,6E+05	1,9E+05	4,9E+05	696	681	523	-0,27	-0,41	-173	-158
Q4DYG2	TcCLB.511367.340	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	3,55	7,4E+05	4,4E+05	4,9E+05	515	556	524	0,18	-0,04	9	-32
Q4D7V7	TcCLB.511407.60	Small GTP-binding protein Rab11, putative	2,47	1,0E+06	6,3E+05	4,9E+05	445	493	525	0,32	0,11	80	32
Q4CXF6	TcCLB.507897.30	Serine/threonine-protein kinase A, putative	4,91	1,6E+06	9,4E+05	4,9E+05	354	393	526	0,52	0,29	172	133
Q4E0N9	TcCLB.506297.300	Eukaryotic release factor 3, putative	4,50	5,5E+05	4,9E+05	4,9E+05	572	537	527	0,06	0,01	-45	-10
Q4D0L7	TcCLB.506301.11	Heat shock protein, putative (Fragment)	4,68	4,2E+04	3,9E+05	4,8E+05	835	586	528	-1,06	-0,09	-307	-58
Q4CQ53	TcCLB.505763.10	Proton motive ATPase 1, putative (Fragment)	1,41	4,5E+05	3,2E+05	4,8E+05	611	616	529	-0,03	-0,18	-82	-87
Q4DQH3	TcCLB.505807.180	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative	7,25	1,1E+06	3,5E+05	4,8E+05	423	604	530	0,35	-0,14	107	-74
Q4DK03	TcCLB.509671.10	Uncharacterized protein	4,06	4,6E+05	1,0E+06	4,8E+05	606	378	531	-0,02	0,33	-75	153
Q4E0V0	TcCLB.509965.110	Importin subunit alpha	2,80	8,8E+05	6,6E+05	4,8E+05	472	477	532	0,27	0,14	60	55
Q4CYE4	TcCLB.503801.20	Ribosomal protein S26, putative	1,94	2,1E+05	2,0E+05	4,8E+05	736	671	533	-0,36	-0,38	-203	-138
Q4E0J7	TcCLB.509429.320	Cysteine peptidase, putative	4,44	9,5E+05	2,7E+05	4,8E+05	459	641	534	0,30	-0,25	75	-107
Q4DR33	TcCLB.504109.150	Elongation factor, putative	1,81	6,3E+05	6,0E+03	4,8E+05	546	854	535	0,12	-1,90	-11	-319
Q4DPR0	TcCLB.511181.80	Threonyl-tRNA synthetase, putative	2,56	6,7E+05	7,1E+05	4,8E+05	537	461	536	0,15	0,18	-1	75
Q4DAV6	TcCLB.504069.80	ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	5,87	7,5E+05	4,7E+05	4,7E+05	512	544	537	0,20	0,00	25	-7



Q4DXV5	TcCLB.510719.30	Ribosomal protein L29, putative	1,30	4,0E+05	6,0E+03	4,7E+05	631	857	538	-0,08	-1,90	-93	-319
Q4D6M9	TcCLB.508357.100	Uncharacterized protein	4,72	7,4E+05	3,5E+05	4,7E+05	514	602	539	0,20	-0,13	25	-63
Q4CQK6	TcCLB.507659.30	Amino acid transporter, putative (Fragment)	5,66	5,7E+05	4,6E+05	4,6E+05	565	547	540	0,09	0,00	-25	-7
Q4D5W6	TcCLB.508169.60	Dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase, putative	3,73	8,5E+05	6,0E+03	4,6E+05	482	852	541	0,27	-1,88	59	-311
Q4DWX6	TcCLB.510729.90	Uncharacterized protein	1,29	1,4E+05	2,4E+05	4,6E+05	788	653	542	-0,52	-0,29	-246	-111
Q4E2R5	TcCLB.504153.180	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, putative	5,28	6,8E+05	5,1E+05	4,5E+05	533	528	543	0,17	0,05	10	15
Q4DZY8	TcCLB.509805.190	Uncharacterized protein	1,72	5,9E+05	6,2E+05	4,4E+05	559	498	544	0,12	0,14	-15	46
Q4DTR7	TcCLB.509695.20	Uncharacterized protein	6,09	6,0E+05	3,8E+05	4,4E+05	556	589	545	0,13	-0,07	-11	-44
Q4E3H1	TcCLB.507611.110	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	2,34	3,0E+05	8,3E+05	4,4E+05	674	422	546	-0,16	0,27	-128	124
Q4D8X3	TcCLB.506587.40	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	3,11	1,1E+06	7,3E+05	4,4E+05	417	455	547	0,40	0,22	130	92
Q4DCB6	TcCLB.506933.20	Ribonucleoside-diphosphate reductase	3,38	8,6E+05	7,1E+05	4,4E+05	480	463	548	0,29	0,21	68	85
Q4D214	TcCLB.508503.20	Cytochrome c oxidase subunit V, putative	1,85	2,2E+05	5,0E+05	4,4E+05	729	533	549	-0,30	0,06	-180	16
Q4CWM1	TcCLB.510065.30	IgE-dependent histamine-releasing factor, putative	1,18	6,0E+03	5,2E+05	4,3E+05	853	527	550	-1,86	0,08	-303	23
Q4DU59	TcCLB.511391.160	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial, putative	1,10	1,2E+06	6,1E+05	4,3E+05	409	500	551	0,44	0,16	142	51
Q4D9Z4	TcCLB.511281.60	Pyruvate kinase	4,34	1,8E+06	6,8E+05	4,2E+05	336	471	552	0,63	0,20	216	81
Q4D7H6	TcCLB.511801.60	Mitochondrial DEAD box protein, putative	1,67	7,8E+05	4,7E+05	4,2E+05	505	545	553	0,26	0,05	48	8
Q4E030	TcCLB.507063.20	Translation initiation factor, putative	1,51	4,9E+05	2,3E+05	4,2E+05	598	656	554	0,06	-0,26	-44	-102
Q4E1N4	TcCLB.507093.229	U-rich RNA-binding protein UBP-2	2,90	9,9E+05	4,2E+05	4,2E+05	450	568	555	0,37	0,00	105	-13

Q4E4J9	TcCLB.506925.530	ABC transporter, putative	4,23	8,1E+05	6,2E+05	4,2E+05	497	494	556	0,28	0,17	59	62
Q4DX96	TcCLB.506945.20	Phosphoglycerate kinase	3,57	5,6E+05	4,5E+05	4,2E+05	569	554	557	0,12	0,03	-12	3
Q4DA56	TcCLB.507019.20	Nitrate reductase, putative	3,31	7,5E+05	3,6E+05	4,2E+05	513	595	558	0,25	-0,06	45	-37
Q4CVA3	TcCLB.506411.10	Thimet oligopeptidase, putative	2,75	7,0E+05	2,9E+05	4,2E+05	527	629	559	0,22	-0,15	32	-70
Q4DGY8	TcCLB.511923.130	Uncharacterized protein	1,14	3,8E+05	4,4E+05	4,2E+05	635	557	560	-0,04	0,02	-75	3
Q4E259	TcCLB.508707.180	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	4,10	5,3E+05	4,2E+05	4,1E+05	583	566	561	0,11	0,01	-22	-5
Q4E0M5	TcCLB.509429.4	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	5,81	6,9E+05	3,4E+05	4,1E+05	532	607	562	0,23	-0,08	30	-45
Q4DBH5	TcCLB.503855.30	Adenylosuccinate lyase	4,60	3,1E+05	5,6E+05	4,1E+05	671	515	563	-0,12	0,14	-108	48
Q4DKU5	TcCLB.509769.80	Uncharacterized protein	3,76	5,9E+05	2,1E+05	4,0E+05	557	661	564	0,17	-0,28	7	-97
Q4DLS1	TcCLB.509153.90	Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	2,35	7,1E+05	2,7E+05	4,0E+05	523	642	565	0,25	-0,17	42	-77
Q4DPQ4	TcCLB.511181.150	Uncharacterized protein	2,63	1,7E+05	4,7E+05	4,0E+05	758	543	566	-0,36	0,07	-192	23
Q4CNS3	TcCLB.510227.29	Thioredoxin, putative (Fragment)	1,37	4,8E+05	8,1E+04	4,0E+05	600	784	567	0,08	-0,70	-33	-217
Q4DMX4	TcCLB.511529.210	Uncharacterized protein	5,10	1,1E+06	4,8E+05	4,0E+05	416	540	568	0,45	0,08	152	28
Q4DYS2	TcCLB.507641.50	Uncharacterized protein	1,29	2,2E+05	5,6E+05	4,0E+05	726	512	569	-0,25	0,15	-157	57
Q4D7V1	TcCLB.508971.50	Ubiquitin-protein ligase-like, putative	5,85	5,7E+05	4,3E+05	4,0E+05	562	563	570	0,16	0,04	8	7
Q4CVT0	TcCLB.506631.30	Uncharacterized protein	1,27	8,1E+05	5,2E+05	4,0E+05	496	526	571	0,31	0,12	75	45
Q4CZN2	TcCLB.511353.10	Peptidylprolyl isomerase-like, putative	2,51	8,1E+05	7,3E+05	3,9E+05	494	453	572	0,32	0,27	78	119
Q4DSE3	TcCLB.504057.110	Ribosomal RNA processing protein 6, putative	4,13	6,4E+05	6,2E+05	3,9E+05	545	496	573	0,21	0,20	28	77
Q4DNZ3	TcCLB.507519.150	Adenine phosphoribosyltransferase, putative	2,88	5,6E+05	4,4E+05	3,9E+05	570	555	574	0,16	0,05	4	19
Q4DFM4	TcCLB.511109.130	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	2,83	5,8E+05	6,8E+05	3,9E+05	560	473	575	0,17	0,24	15	102

Q4CTU9	TcCLB.507775.20	Uncharacterized protein	1,56	5,4E+05	7,0E+05	3,9E+05	580	464	576	0,14	0,25	-4	112
Q4CS11	TcCLB.410923.20	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	2,35	1,2E+06	4,2E+05	3,9E+05	410	565	577	0,47	0,04	167	12
Q4CQJ6	TcCLB.507251.30	Uncharacterized protein	2,16	8,4E+05	3,9E+05	3,9E+05	484	587	578	0,34	0,00	94	-9
Q4DYH5	TcCLB.511367.170	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	3,85	4,1E+05	4,0E+05	3,8E+05	622	580	579	0,03	0,02	-43	-1
Q4D144	TcCLB.506985.30	Proteasome subunit alpha type	1,50	8,6E+05	4,6E+05	3,8E+05	478	551	580	0,35	0,08	102	29
Q4D7V3	TcCLB.508971.30	Lysine--tRNA ligase	3,29	6,7E+05	6,0E+03	3,8E+05	539	853	581	0,25	-1,80	42	-272
Q4CPW5	TcCLB.507657.20	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	1,63	5,2E+05	6,2E+05	3,8E+05	584	497	582	0,14	0,21	-2	85
Q4DY82	TcCLB.511907.50	Lysophospholipase, putative	10,81	9,6E+05	3,1E+05	3,7E+05	457	619	583	0,41	-0,08	126	-36
Q4DV36	TcCLB.508647.280	Malic enzyme	2,54	8,4E+05	1,4E+05	3,7E+05	488	717	584	0,35	-0,41	96	-133
Q4E1M8	TcCLB.507093.300	Uncharacterized protein	4,71	3,6E+05	3,8E+05	3,7E+05	642	591	585	-0,01	0,01	-57	-6
Q4DZJ3	TcCLB.508799.240	Aminopeptidase, putative	6,81	5,6E+05	3,4E+05	3,7E+05	567	606	586	0,18	-0,04	19	-20
Q4DDX3	TcCLB.509011.40	Calreticulin, putative	3,64	2,5E+06	4,3E+05	3,7E+05	286	562	587	0,83	0,07	301	25
Q4E658	TcCLB.508153.330	Katanin-like protein, putative	1,20	1,7E+05	4,9E+05	3,7E+05	761	536	588	-0,34	0,13	-173	52
Q4E4E1	TcCLB.510187.100	Glucokinase 1, putative	4,32	5,0E+05	4,9E+05	3,7E+05	592	538	589	0,13	0,12	-3	51
Q4DQD7	TcCLB.506629.70	Cysteine desulfurase, putative	1,45	5,2E+05	6,5E+05	3,6E+05	586	481	590	0,16	0,26	4	109
Q4E4Q4	TcCLB.508461.550	Uncharacterized protein	3,87	4,9E+05	3,5E+05	3,6E+05	599	600	591	0,13	-0,01	-8	-9
Q4DSS9	TcCLB.507809.30	Ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative	1,71	4,2E+05	3,5E+05	3,6E+05	618	601	592	0,07	-0,01	-26	-9
Q4D9L7	TcCLB.510579.70	Nascent polypeptide associated complex subunit, putative	0,96	2,1E+05	2,0E+05	3,6E+05	734	676	593	-0,24	-0,26	-141	-83
Q4DBP9	TcCLB.508601.119	Ribose 5-phosphate isomerase, putative	1,49	7,1E+05	4,0E+05	3,5E+05	524	583	594	0,30	0,05	70	11
Q4CMX1	TcCLB.504209.10	Uncharacterized protein	2,73	4,4E+05	3,7E+05	3,5E+05	614	593	595	0,10	0,03	-19	2

Q4D230	TcCLB.510635.50	Zinc-binding phosphatase, putative	2,70	3,0E+05	3,0E+05	3,5E+05	676	626	596	-0,06	-0,07	-80	-30
Q4DG35	TcCLB.508241.10	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative (Fragment)	1,23	4,9E+05	3,1E+05	3,5E+05	596	622	597	0,15	-0,05	1	-25
Q4CZK3	TcCLB.510299.50	GPI anchor biosynthesis protein, putative	1,07	1,0E+05	2,9E+05	3,5E+05	806	631	598	-0,52	-0,08	-208	-33
Q4CTE8	TcCLB.510717.30	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative	2,72	5,0E+05	3,2E+05	3,5E+05	593	617	599	0,16	-0,04	6	-18
Q4CWQ8	TcCLB.503837.10	Uncharacterized protein	1,19	2,9E+05	1,8E+05	3,4E+05	684	693	600	-0,08	-0,29	-84	-93
Q4CUE0	TcCLB.503413.4	Uncharacterized protein (Fragment)	1,13	3,9E+05	4,0E+05	3,4E+05	634	577	601	0,06	0,07	-33	24
Q4DTH1	TcCLB.508737.150	Mitochondrial carrier protein, putative	4,83	3,6E+05	6,3E+05	3,4E+05	644	491	602	0,03	0,27	-42	111
Q4DTI8	TcCLB.507053.170	Uncharacterized protein	2,82	7,5E+05	5,1E+05	3,4E+05	510	529	603	0,35	0,18	93	74
Q4DFR8	TcCLB.504125.60	Kinesin-like protein	4,07	3,4E+05	9,9E+04	3,3E+05	656	761	604	0,01	-0,53	-52	-157
Q4CPI8	TcCLB.503709.20	60S ribosomal protein L44, putative (Fragment)	2,12	2,5E+05	3,5E+05	3,3E+05	709	598	605	-0,13	0,03	-104	7
Q4DFG3	TcCLB.506155.60	Aldehyde dehydrogenase, putative	1,07	4,6E+05	2,2E+05	3,3E+05	607	660	606	0,14	-0,19	-1	-54
Q4DPG9	TcCLB.510861.140	Serine/threonine protein kinase, putative	2,90	3,4E+05	5,6E+05	3,3E+05	655	513	607	0,02	0,23	-48	94
Q4DFX2	TcCLB.506367.30	Uncharacterized protein	0,95	5,1E+05	1,5E+05	3,3E+05	590	712	608	0,19	-0,34	18	-104
Q4DUR3	TcCLB.507951.299	Uncharacterized protein (Fragment)	3,47	4,9E+05	3,9E+05	3,3E+05	597	588	609	0,18	0,07	12	21
Q4DAS0	TcCLB.506485.80	Oxidoreductase, putative	5,75	1,1E+06	4,0E+05	3,2E+05	429	579	610	0,51	0,09	181	31
Q4CXF4	TcCLB.511011.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,67	8,9E+05	3,2E+05	3,2E+05	471	613	611	0,44	-0,01	140	-2
Q4DCC6	TcCLB.508895.60	RNA-binding protein, putative	2,34	1,0E+06	8,9E+05	3,2E+05	432	409	612	0,51	0,44	180	203
Q4CKM6	TcCLB.468941.9	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative (Fragment)	2,77	6,0E+03	1,6E+05	3,2E+05	854	708	613	-1,73	-0,30	-241	-95
Q4D7R4	TcCLB.508865.10	Glutathione synthetase	11,07	7,2E+05	6,7E+04	3,2E+05	519	798	614	0,35	-0,68	95	-184

Q4CP00	TcCLB.511333.4	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative (Fragment)	2,45	4,1E+05	2,3E+05	3,2E+05	624	657	615	0,11	-0,14	-9	-42
Q4CL61	TcCLB.431357.10	3,2-trans-enoyl-coA isomerase, mitochondrial, putative (Fragment)	2,39	5,2E+05	2,0E+05	3,2E+05	585	674	616	0,22	-0,20	31	-58
Q4DZU7	TcCLB.510105.50	Fibrillarin, putative	1,25	6,0E+03	6,0E+03	3,2E+05	855	877	617	-1,72	-1,72	-238	-260
Q4DXH9	TcCLB.506941.170	ADP-ribosylation factor-like protein, putative	0,95	2,0E+05	2,8E+05	3,1E+05	741	636	618	-0,20	-0,05	-123	-18
Q4D159	TcCLB.507209.10	Small nuclear ribonucleoprotein protein, putative	2,12	2,1E+05	2,0E+05	3,1E+05	737	675	619	-0,18	-0,20	-118	-56
Q4CLW3	TcCLB.509701.10	Trifunctional enzyme alpha subunit, mitochondrial-like protein, putative (Fragment)	3,45	6,6E+05	1,0E+06	3,1E+05	543	381	620	0,32	0,51	77	239
Q4CTC8	TcCLB.507569.10	Uncharacterized protein	2,10	8,1E+05	3,5E+05	3,1E+05	491	599	621	0,41	0,05	130	22
Q4CRW0	TcCLB.509125.20	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78, putative (Fragment)	1,77	5,6E+05	5,2E+05	3,1E+05	566	524	622	0,26	0,23	56	98
Q4D7T7	TcCLB.504047.50	Uncharacterized protein	3,97	5,3E+05	1,3E+05	3,1E+05	581	733	623	0,23	-0,39	42	-110
Q4DRX1	TcCLB.507669.10	Fumarate hydratase, putative	1,45	7,8E+05	3,0E+05	3,1E+05	504	624	624	0,40	-0,01	120	0
Q4CLU7	TcCLB.508725.10	Uncharacterized protein (Fragment)	6,09	5,5E+05	4,4E+05	3,1E+05	577	558	625	0,25	0,15	48	67
Q4E5D3	TcCLB.511277.610	Surface protease GP63, putative	3,30	4,2E+05	2,7E+05	3,1E+05	620	643	626	0,13	-0,06	6	-17
Q4CX53	TcCLB.504203.4	Uncharacterized protein (Fragment)	3,82	6,1E+05	1,2E+05	3,0E+05	553	737	627	0,31	-0,40	74	-110
Q4D0R4	TcCLB.509831.36	Mitochondrial RNA binding protein 1, putative	5,14	2,5E+05	3,3E+05	3,0E+05	705	608	628	-0,08	0,04	-77	20
Q4DSB6	TcCLB.509767.180	Exosome component CSL4, putative	2,42	2,6E+05	3,3E+05	3,0E+05	699	610	629	-0,07	0,04	-70	19
Q4CUG4	TcCLB.508689.20	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	1,14	3,7E+05	3,9E+05	2,9E+05	637	584	630	0,10	0,13	-7	46
Q4DGA5	TcCLB.506457.10	Methionine aminopeptidase 2	3,30	5,4E+05	2,0E+05	2,9E+05	579	669	631	0,27	-0,16	52	-38
Q4DU97	TcCLB.507011.200	Dihydroxyacetone kinase 1-like,	2,97	3,5E+05	1,9E+05	2,9E+05	650	685	632	0,09	-0,19	-18	-53

		putative											
Q4DX67	TcCLB.506945.330	Uncharacterized protein	1,69	4,3E+05	3,6E+05	2,8E+05	617	596	633	0,18	0,10	16	37
Q4DAW6	TcCLB.504069.10	Proteasome subunit alpha type	3,91	5,4E+05	3,1E+05	2,8E+05	578	618	634	0,29	0,05	56	16
Q4DH08	TcCLB.508261.140	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma), putative	-2,00	1,5E+05	2,1E+05	2,8E+05	779	662	635	-0,28	-0,13	-144	-27
Q4CP83	TcCLB.508993.10	CTP synthase (Fragment)	3,04	8,0E+05	3,2E+05	2,7E+05	499	614	636	0,47	0,06	137	22
Q4DMB4	TcCLB.504131.190	Mitochondrial carrier protein, putative	1,05	4,0E+05	6,0E+05	2,7E+05	625	503	637	0,17	0,34	12	134
Q4CPH5	TcCLB.509063.30	Chaperonin HSP60/CNP60, putative (Fragment)	1,32	6,0E+03	4,0E+05	2,7E+05	856	582	638	-1,66	0,17	-218	56
Q4D503	TcCLB.511269.10	Uncharacterized protein	1,15	2,5E+05	4,5E+05	2,7E+05	708	553	639	-0,04	0,22	-69	86
Q4DQE0	TcCLB.506629.40	Uncharacterized protein	4,09	5,9E+05	9,8E+03	2,7E+05	558	843	640	0,34	-1,44	82	-203
Q4D3W3	TcCLB.508375.30	Aspartate carbamoyltransferase, putative	5,20	2,4E+06	8,7E+05	2,7E+05	294	414	641	0,95	0,51	347	227
Q4DR73	TcCLB.504033.90	Mitochondrial carrier protein, putative	1,46	5,5E+05	3,0E+05	2,7E+05	576	625	642	0,31	0,05	66	17
Q4D1S0	TcCLB.506025.50	Vacuolar ATP synthase subunit B, putative	3,02	4,8E+05	3,1E+05	2,7E+05	601	620	643	0,26	0,06	42	23
Q4CWE9	TcCLB.505931.50	Histone H3, putative	1,61	1,2E+05	6,4E+05	2,7E+05	799	487	644	-0,35	0,38	-155	157
Q4CZF5	TcCLB.510911.10	Profilin	3,94	4,5E+05	8,6E+05	2,6E+05	610	415	645	0,23	0,52	35	230
Q4DNU7	TcCLB.511003.30	Uncharacterized protein	1,44	3,1E+05	1,5E+05	2,6E+05	673	711	646	0,07	-0,23	-27	-65
Q4CWR1	TcCLB.506583.60	Mitochondrial elongation factor G, putative	2,31	3,0E+05	1,5E+05	2,6E+05	679	714	647	0,06	-0,25	-32	-67
Q4DYH7	TcCLB.511367.138	Chaperone DnaJ protein, putative	1,08	6,7E+05	2,0E+05	2,6E+05	538	673	648	0,42	-0,11	110	-25
Q4D8D3	TcCLB.508411.10	Cofilin/actin depolymerizing factor, putative	15,53	8,2E+05	2,9E+05	2,6E+05	490	630	649	0,50	0,05	159	19
Q4DNR8	TcCLB.511589.90	Uncharacterized protein	3,94	4,3E+05	4,0E+05	2,6E+05	616	581	650	0,23	0,20	34	69

Q4DNZ4	TcCLB.507519.140	Adenine phosphoribosyltransferase, putative	1,71	3,9E+05	3,0E+05	2,5E+05	633	628	651	0,19	0,07	18	23
Q4E2Y4	TcCLB.508175.100	Uncharacterized protein	2,56	5,1E+05	5,9E+05	2,5E+05	588	504	652	0,31	0,37	64	148
Q4DBH4	TcCLB.503855.40	Calpain-like cysteine peptidase, putative	2,55	9,9E+05	1,9E+04	2,5E+05	447	836	653	0,61	-1,12	206	-183
Q4CVB9	TcCLB.510509.50	Mitochondrial RNA binding protein, putative (Fragment)	2,35	4,0E+05	1,1E+05	2,4E+05	627	744	654	0,22	-0,33	27	-90
Q4DI32	TcCLB.511019.74	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	2,17	9,3E+05	6,0E+03	2,4E+05	463	851	655	0,59	-1,60	192	-196
Q4CQG3	TcCLB.505647.40	Endoribonuclease L-PSP (Pb5), putative	4,29	2,2E+05	7,0E+04	2,4E+05	731	797	656	-0,04	-0,54	-75	-141
Q4E0P0	TcCLB.506297.290	Protein transport protein sec31, putative	2,33	2,8E+05	1,3E+05	2,4E+05	691	732	657	0,07	-0,27	-34	-75
Q4DC76	TcCLB.506777.20	Uncharacterized protein	2,25	9,3E+04	2,0E+05	2,4E+05	812	677	658	-0,40	-0,08	-154	-19
Q4D923	TcCLB.510165.110	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	-2,00	3,4E+05	6,1E+05	2,3E+05	660	499	659	0,16	0,42	-1	160
Q4E0C2	TcCLB.509875.204	Uncharacterized protein	0,98	1,6E+05	2,8E+05	2,3E+05	769	635	660	-0,16	0,08	-109	25
Q4CR40	TcCLB.504411.30	Serine/threonine protein kinase, putative	7,59	1,5E+06	2,4E+06	2,3E+05	362	238	661	0,81	1,02	299	423
Q4DY49	TcCLB.511727.100	Protein phosphatase methylesterase 1	1,56	1,5E+05	4,6E+05	2,3E+05	780	552	662	-0,20	0,30	-118	110
Q4DWH5	TcCLB.511725.160	Uncharacterized protein	2,18	4,4E+05	2,5E+05	2,3E+05	613	649	663	0,29	0,04	50	14
Q4CNG2	TcCLB.509045.29	Kinesin-like protein (Fragment)	4,09	2,9E+05	3,4E+05	2,3E+05	686	605	664	0,10	0,17	-22	59
Q4DUE9	TcCLB.508837.189	Endoplasmic reticulum oxidoreductin, putative	2,99	3,2E+05	2,4E+05	2,3E+05	662	654	665	0,16	0,02	3	11
Q4DN98	TcCLB.508541.210	Uncharacterized protein	3,35	3,5E+05	3,0E+05	2,3E+05	648	627	666	0,19	0,11	18	39
Q4CW60	TcCLB.509003.79	Coatomer beta subunit, putative (Fragment)	2,43	2,9E+05	4,3E+05	2,3E+05	683	564	667	0,11	0,28	-16	103

Q4DE64	TcCLB.506493.80	DNA topoisomerase IA, putative	2,64	4,0E+05	3,2E+05	2,3E+05	626	615	668	0,25	0,15	42	53
Q4CNX6	TcCLB.508085.10	GMP synthase, putative (Fragment)	1,54	3,5E+05	8,8E+04	2,2E+05	654	775	669	0,19	-0,41	15	-106
Q4DC68	TcCLB.506777.80	Seryl-tRNA synthetase, putative	2,19	5,7E+05	1,4E+05	2,2E+05	564	715	670	0,41	-0,19	106	-45
Q4DV84	TcCLB.508173.40	Mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative	1,97	3,5E+05	2,2E+05	2,2E+05	651	659	671	0,21	0,00	20	12
Q4DKD3	TcCLB.509295.80	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	2,87	3,6E+05	4,2E+05	2,2E+05	646	567	672	0,22	0,29	26	105
Q4E2S0	TcCLB.504153.129	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	2,2E+05	857	878	673	-1,56	-1,56	-184	-205
Q4DPE6	TcCLB.507625.99	Gamma-glutamylcysteine synthetase, putative	3,38	1,2E+06	5,6E+05	2,2E+05	407	514	674	0,74	0,41	267	160
Q4CWK5	TcCLB.509543.50	DNAK protein, putative (Fragment)	3,09	1,0E+06	1,3E+05	2,2E+05	441	731	675	0,67	-0,23	234	-56
Q4CN04	TcCLB.503405.10	Glutamine synthetase, putative	3,21	6,7E+05	3,2E+05	2,1E+05	541	611	676	0,49	0,17	135	65
Q4DLU4	TcCLB.509683.10	Uncharacterized protein	3,01	5,2E+05	1,3E+05	2,1E+05	587	730	677	0,38	-0,22	90	-53
Q4E0L4	TcCLB.509429.150	Uncharacterized protein	3,03	3,1E+05	1,6E+05	2,1E+05	670	702	678	0,16	-0,12	8	-24
Q4D8R5	TcCLB.510391.10	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	-2,00	1,0E+06	2,4E+05	2,1E+05	446	652	679	0,67	0,05	233	27
Q4DPJ1	TcCLB.506513.60	ADP-ribosylation factor, putative	1,29	6,0E+03	1,9E+05	2,1E+05	858	684	680	-1,54	-0,04	-178	-4
Q4DIG9	TcCLB.506733.130	Uncharacterized protein	2,47	3,4E+05	3,1E+05	2,1E+05	659	621	681	0,21	0,17	22	60
Q4DJV2	TcCLB.511717.90	Mannose-6-phosphate isomerase	2,73	4,2E+05	1,2E+05	2,0E+05	619	736	682	0,31	-0,22	63	-54
Q4E1V5	TcCLB.507993.260	Uncharacterized protein	1,87	6,8E+05	4,0E+05	2,0E+05	536	578	683	0,53	0,30	147	105
Q4DD81	TcCLB.509747.20	60S ribosomal protein L22, putative	2,33	5,7E+05	1,6E+05	2,0E+05	563	707	684	0,46	-0,09	121	-23
Q4D8U7	TcCLB.503781.70	Proteasome subunit beta type	1,14	1,9E+05	2,0E+05	2,0E+05	747	668	685	-0,03	0,01	-62	17
Q4DFM3	TcCLB.508323.9	Farnesyl pyrophosphate synthase, putative (Fragment)	1,22	3,6E+05	6,0E+03	1,9E+05	643	858	686	0,27	-1,51	43	-172
Q4D674	TcCLB.504625.99	Protein tyrosine phosphatase, putative (Fragment)	2,68	3,3E+05	2,0E+05	1,9E+05	661	666	687	0,23	0,02	26	21



Q4E3Q0	TcCLB.510101.70	Pretranslocation protein, alpha subunit, putative	6,02	6,8E+05	2,8E+05	1,9E+05	535	638	688	0,55	0,16	153	50
Q4DDD7	TcCLB.507485.40	Uncharacterized protein	1,44	1,6E+05	1,1E+05	1,9E+05	765	750	689	-0,06	-0,23	-76	-61
Q4DKK5	TcCLB.509999.90	Carnitine/choline acetyltransferase, putative	3,39	6,2E+05	1,9E+05	1,8E+05	552	682	690	0,53	0,02	138	8
Q4CLI0	TcCLB.509409.10	Protein kinase, putative	3,36	3,2E+05	1,7E+05	1,8E+05	666	697	691	0,25	-0,02	25	-6
Q4DS85	TcCLB.510759.100	Uncharacterized protein	1,47	1,5E+05	3,3E+05	1,8E+05	778	609	692	-0,09	0,26	-86	83
Q4D582	TcCLB.507927.100	Uncharacterized protein	3,32	2,1E+05	2,0E+05	1,8E+05	735	679	693	0,06	0,04	-42	14
Q4D7W2	TcCLB.511407.10	Nuclear transport factor 2, putative	1,92	2,8E+05	6,0E+03	1,8E+05	690	862	695	0,19	-1,48	5	-167
Q4D3C6	TcCLB.508297.50	Short chain dehydrogenase, putative	3,51	6,8E+05	2,5E+05	1,8E+05	534	647	696	0,58	0,15	162	49
Q4DZH8	TcCLB.508641.180	Uncharacterized protein	1,07	1,6E+05	1,1E+05	1,8E+05	772	753	697	-0,06	-0,22	-75	-56
Q4CP72	TcCLB.511363.4	Uncharacterized protein (Fragment)	1,62	1,6E+05	2,9E+05	1,8E+05	764	632	698	-0,03	0,22	-66	66
Q4CSS8	TcCLB.505977.26	60S acidic ribosomal protein P2, putative	1,58	2,6E+05	1,6E+05	1,7E+05	698	705	699	0,17	-0,03	1	-6
Q4DBD1	TcCLB.504099.10	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	2,01	1,8E+05	2,5E+05	1,7E+05	755	648	700	0,02	0,16	-55	52
Q4E0I5	TcCLB.508325.60	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,18	1,7E+05	1,8E+05	1,7E+05	763	690	701	-0,01	0,02	-62	11
Q4DKR1	TcCLB.511867.50	Proteasome alpha 7 subunit, putative	2,20	4,0E+05	1,6E+05	1,7E+05	628	709	702	0,38	-0,02	74	-7
Q4E0P7	TcCLB.506297.220	Uncharacterized protein	2,75	5,0E+05	6,3E+05	1,7E+05	594	489	703	0,47	0,58	109	214
Q4CXT8	TcCLB.509177.59	Uncharacterized protein	1,18	1,6E+05	9,1E+04	1,7E+05	766	770	704	-0,01	-0,26	-62	-66
Q4D905	TcCLB.505171.60	Uncharacterized protein	2,29	3,5E+05	9,2E+04	1,6E+05	652	768	705	0,33	-0,25	53	-63
Q4D9Z9	TcCLB.511281.40	Diphosphomevalonate decarboxylase, putative	2,52	2,6E+05	1,8E+05	1,6E+05	697	692	706	0,21	0,04	9	14
Q4DTW2	TcCLB.508693.10	Cleavage and polyadenylation specificity factor, putative (Fragment)	5,03	2,8E+05	1,7E+05	1,6E+05	688	695	708	0,25	0,04	20	13
Q4CV29	TcCLB.509297.30	ADP-ribosylation factor, putative	2,06	2,3E+05	1,1E+05	1,6E+05	722	745	709	0,16	-0,14	-13	-36

Q4DTH7	TcCLB.508737.70	Fatty acid desaturase, putative	1,00	2,9E+05	1,8E+05	1,6E+05	687	688	710	0,27	0,07	23	22
Q4DZM9	TcCLB.504147.160	ADP-ribosylation factor-like protein, putative	3,64	4,7E+05	2,0E+05	1,6E+05	605	678	711	0,48	0,10	106	33
Q4E349	TcCLB.508741.229	Uncharacterized protein	1,23	6,0E+03	1,7E+05	1,5E+05	859	699	712	-1,41	0,04	-147	13
Q4DJY4	TcCLB.509671.180	Uncharacterized protein	1,43	2,2E+05	1,4E+05	1,5E+05	728	718	713	0,16	-0,03	-15	-5
Q4DJY0	TcCLB.510879.30	Uncharacterized protein	4,22	3,7E+05	3,7E+05	1,5E+05	641	592	714	0,38	0,39	73	122
Q4DE31	TcCLB.506649.70	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative	1,75	4,0E+05	2,0E+05	1,5E+05	630	672	715	0,42	0,12	85	43
Q4DQ03	TcCLB.509179.20	Uncharacterized protein	1,17	3,6E+05	2,8E+05	1,5E+05	647	633	716	0,38	0,28	69	83
Q4D3R4	TcCLB.510003.20	Uncharacterized protein	4,07	1,1E+05	3,2E+05	1,5E+05	804	612	717	-0,14	0,33	-87	105
Q4DHE8	TcCLB.509065.90	Uncharacterized protein	1,47	2,3E+05	1,4E+05	1,5E+05	718	723	718	0,19	-0,04	0	-5
Q4CYK5	TcCLB.503613.20	Proteasome subunit alpha type	7,31	4,8E+05	1,8E+05	1,5E+05	603	691	719	0,51	0,09	116	28
Q4E0M2	TcCLB.509429.80	Uncharacterized protein	1,62	2,0E+05	1,9E+05	1,5E+05	743	683	720	0,13	0,12	-23	37
Q4DSC2	TcCLB.509767.120	Uncharacterized protein	5,19	1,8E+05	1,3E+05	1,5E+05	757	729	721	0,09	-0,05	-36	-8
Q4DZ85	TcCLB.507023.10	Epsilon-adaptin, putative	2,18	3,2E+05	1,8E+05	1,5E+05	664	689	722	0,34	0,10	58	33
Q4D946	TcCLB.509059.50	Pyridoxal kinase, putative	0,99	1,8E+05	1,4E+05	1,4E+05	753	716	723	0,10	0,00	-30	7
Q4DFC3	TcCLB.507609.40	Delta-6 fatty acid desaturase, putative	2,96	2,9E+05	1,3E+05	1,4E+05	680	728	724	0,31	-0,04	44	-4
Q4E5A3	TcCLB.506559.270	Sarcoplasmic reticulum glycoprotein, putative	3,07	2,5E+05	1,2E+05	1,4E+05	706	741	725	0,24	-0,08	19	-16
Q4DG45	TcCLB.510761.14	60S ribosomal protein L26, putative	1,48	6,0E+03	7,9E+05	1,4E+05	860	434	726	-1,37	0,75	-134	292
Q4DPR6	TcCLB.511181.20	Uncharacterized protein	2,80	1,8E+05	6,9E+05	1,4E+05	756	468	727	0,11	0,69	-29	259
Q4DNT1	TcCLB.511003.190	Uncharacterized protein	0,97	2,8E+05	1,2E+05	1,4E+05	689	739	728	0,31	-0,07	39	-11
Q4CU84	TcCLB.507675.10	Uncharacterized protein (Fragment)	1,80	2,7E+05	1,3E+05	1,4E+05	694	725	729	0,29	-0,01	35	4
Q4DRK9	TcCLB.510741.180	ATP-dependent RNA helicase, putative	-2,00	2,0E+04	3,2E+04	1,3E+05	842	823	730	-0,81	-0,61	-112	-93

Q4CR94	TcCLB.503681.9	Uncharacterized protein (Fragment)	3,62	2,9E+05	1,4E+05	1,3E+05	681	722	731	0,35	0,02	50	9
Q4CLQ7	TcCLB.509107.9	Uncharacterized protein (Fragment)	1,84	1,2E+05	1,5E+05	1,3E+05	797	713	732	-0,02	0,07	-65	19
Q4DAW0	TcCLB.504069.53	Proteasome subunit alpha type	3,66	3,7E+05	1,1E+05	1,3E+05	639	755	733	0,46	-0,08	94	-22
Q4DKC8	TcCLB.506355.50	Chaperone DnaJ protein, putative	2,35	4,2E+05	6,0E+03	1,2E+05	621	856	734	0,52	-1,32	113	-122
Q4CMA6	TcCLB.503483.9	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	4,25	2,4E+05	1,4E+05	1,2E+05	715	721	735	0,29	0,06	20	14
Q4CU66	TcCLB.463155.20	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,34	1,5E+05	1,0E+05	1,2E+05	775	759	736	0,10	-0,08	-39	-23
Q4DV37	TcCLB.508647.270	Malic enzyme	2,34	2,6E+05	7,6E+04	1,2E+05	701	788	737	0,32	-0,20	36	-51
Q4DL27	TcCLB.511261.30	Electron transfer protein, putative	4,51	2,9E+05	1,6E+05	1,2E+05	685	704	738	0,38	0,13	53	34
Q4CZD7	TcCLB.511895.69	C-5 sterol desaturase, putative (Fragment)	1,99	3,4E+05	1,6E+05	1,1E+05	657	710	739	0,47	0,14	82	29
Q4E0N6	TcCLB.506297.330	40S ribosomal protein S15a, putative	-2,00	6,0E+03	4,1E+05	1,1E+05	861	574	740	-1,27	0,56	-121	166
Q4DBW6	TcCLB.504103.90	Uncharacterized protein	5,64	1,8E+06	6,0E+03	1,1E+05	333	850	741	1,21	-1,27	408	-109
Q4D577	TcCLB.510689.50	Cell differentiation protein, putative	2,73	2,3E+05	1,8E+05	1,1E+05	720	694	742	0,32	0,20	22	48
Q4DIN6	TcCLB.508045.100	Uncharacterized protein	1,07	1,4E+05	8,8E+04	1,1E+05	785	774	743	0,11	-0,08	-42	-31
Q4CVU1	TcCLB.506851.20	Choline dehydrogenase, putative	1,06	2,4E+05	2,2E+05	1,0E+05	712	658	744	0,37	0,32	32	86
Q4DAD2	TcCLB.508989.90	Uncharacterized protein	1,05	2,3E+05	1,3E+05	1,0E+05	724	724	745	0,34	0,11	21	21
Q4DBH0	TcCLB.506327.10	Proteasome alpha 1 subunit, putative (Fragment)	1,44	1,8E+05	1,1E+05	1,0E+05	752	748	746	0,25	0,04	-6	-2
Q4DA44	TcCLB.507019.120	Uncharacterized protein	1,35	2,4E+05	1,7E+05	1,0E+05	713	696	747	0,37	0,23	34	51
Q4DK47	TcCLB.508827.10	Membrane-bound acid phosphatase, putative (Fragment)	5,03	5,5E+05	1,1E+05	1,0E+05	574	746	748	0,73	0,05	174	2
Q4DZK7	TcCLB.508799.80	Uncharacterized protein	2,17	2,5E+05	7,7E+04	1,0E+05	707	787	749	0,39	-0,12	42	-38
Q4DL24	TcCLB.511261.60	Uncharacterized protein	2,32	1,4E+05	9,8E+04	1,0E+05	783	762	750	0,14	-0,01	-33	-12
Q4D2C9	TcCLB.505163.80	Oligosaccharyl transferase subunit,	1,25	2,2E+05	1,3E+05	9,9E+04	732	727	751	0,34	0,13	19	24

		putative											
Q4DJ87	TcCLB.507515.4	Glutathione peroxidase (Fragment)	1,62	3,5E+05	1,1E+05	9,5E+04	653	754	752	0,56	0,05	99	-2
Q4CVA1	TcCLB.506411.30	Proline oxidase, putative	1,25	1,9E+05	1,2E+05	9,5E+04	746	738	753	0,30	0,11	7	15
Q4DQQ9	TcCLB.509167.80	Uncharacterized protein	0,94	2,1E+05	9,4E+04	9,5E+04	738	765	754	0,34	0,00	16	-11
Q4CNU0	TcCLB.510825.30	Lysosomal/endosomal membrane protein p67, putative	4,98	2,4E+05	1,0E+05	9,5E+04	716	756	755	0,40	0,04	39	-1
Q4E4I3	TcCLB.506885.170	Uncharacterized protein	1,54	1,2E+05	1,0E+05	9,4E+04	800	758	756	0,09	0,04	-44	-2
Q4D4U6	TcCLB.511523.100	Aldehyde dehydrogenase, putative (Fragment)	-2,00	1,8E+05	8,9E+04	9,2E+04	749	772	757	0,30	-0,02	8	-15
Q4CT98	TcCLB.507647.39	Uncharacterized protein (Fragment)	2,43	1,5E+05	1,1E+05	9,1E+04	776	749	758	0,23	0,08	-18	9
Q4DTN4	TcCLB.511211.110	Uncharacterized protein	1,90	1,3E+05	1,1E+05	9,1E+04	793	751	759	0,15	0,08	-34	8
Q4CM74	TcCLB.509351.10	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative (Fragment)	1,66	3,7E+05	7,1E+04	9,1E+04	638	792	760	0,61	-0,10	122	-32
Q4E0R5	TcCLB.506297.30	Uncharacterized protein	3,61	1,4E+05	8,1E+04	8,9E+04	787	783	761	0,19	-0,04	-26	-22
Q4CRA8	TcCLB.509757.20	Leucine carboxyl methyltransferase, putative	2,34	2,1E+05	9,2E+04	8,9E+04	733	769	762	0,37	0,01	29	-7
Q4E5Q9	TcCLB.506529.220	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	8,8E+04	862	879	763	-1,16	-1,16	-99	-116
Q4CW49	TcCLB.506479.20	Uncharacterized protein	1,94	1,7E+05	9,5E+04	8,7E+04	762	764	764	0,28	0,04	2	0
Q4E588	TcCLB.506559.420	Glycosyltransferase ALG2, putative	0,95	2,4E+05	2,1E+05	8,6E+04	711	664	765	0,45	0,38	54	101
Q4CVJ2	TcCLB.504199.10	Uncharacterized protein	2,39	1,9E+05	2,0E+05	8,5E+04	748	667	766	0,34	0,38	18	99
Q4E4K4	TcCLB.506925.480	Ribokinase, putative	2,05	2,7E+05	7,8E+04	8,5E+04	693	785	767	0,51	-0,03	74	-18
Q4DUX5	TcCLB.506605.59	Adenosine 5-monophosphoramidase, putative	3,17	2,0E+05	1,2E+05	8,4E+04	740	734	768	0,38	0,17	28	34
Q4DWS4	TcCLB.508409.220	Uncharacterized protein	2,02	1,1E+05	1,1E+05	8,3E+04	805	752	769	0,11	0,12	-36	17
Q4E631	TcCLB.508153.610	Uncharacterized protein	3,12	1,6E+05	7,0E+04	8,2E+04	767	794	770	0,29	-0,07	3	-24
Q4D4J6	TcCLB.508445.10	Rab11B GTPase, putative	1,56	2,8E+05	2,3E+05	8,1E+04	692	655	771	0,53	0,46	79	116

Q4DGT8	TcCLB.507081.110	Aminopeptidase P1, putative	1,63	5,1E+04	7,8E+04	8,1E+04	831	786	772	-0,20	-0,02	-59	-14
Q4DYI6	TcCLB.511367.60	LA RNA binding protein, putative	-2,00	1,1E+05	5,6E+04	8,1E+04	802	802	773	0,15	-0,16	-29	-29
Q4DNQ4	TcCLB.511589.230	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	1,67	1,8E+05	9,6E+04	7,8E+04	750	763	774	0,37	0,09	24	11
Q4E2S4	TcCLB.504153.70	Uncharacterized protein	2,47	9,5E+04	1,0E+05	7,7E+04	811	757	775	0,09	0,12	-36	18
Q4DQ85	TcCLB.508387.140	Uncharacterized protein	1,32	1,2E+05	1,6E+05	7,7E+04	796	703	776	0,20	0,33	-20	73
Q4DKY8	TcCLB.506337.4	Short-chain dehydrogenase, putative (Fragment)	1,14	2,2E+05	7,0E+04	7,3E+04	730	795	777	0,48	-0,02	47	-18
Q4DLE1	TcCLB.511311.60	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	7,2E+04	863	880	778	-1,08	-1,08	-85	-102
Q4D7Y7	TcCLB.510755.65	Uncharacterized protein	1,88	1,4E+05	1,4E+05	7,2E+04	784	720	779	0,29	0,30	-5	59
Q4CTW7	TcCLB.511535.20	Uncharacterized protein	2,43	6,0E+03	1,2E+05	7,1E+04	864	740	780	-1,07	0,22	-84	40
Q4DQP4	TcCLB.506563.20	Exosome-associated protein 1, putative	2,72	1,3E+05	6,1E+04	7,1E+04	794	800	781	0,26	-0,07	-13	-19
Q4DYS1	TcCLB.507641.60	Aldehyde dehydrogenase, putative	1,63	1,4E+05	8,3E+04	7,0E+04	782	781	782	0,30	0,07	0	1
Q4DTI1	TcCLB.508737.30	Uncharacterized protein	2,54	1,4E+05	5,0E+04	7,0E+04	789	807	783	0,29	-0,15	-6	-24
Q4DHU8	TcCLB.508465.90	Galactokinase, putative	-2,00	6,0E+03	1,2E+05	6,8E+04	865	735	784	-1,05	0,26	-81	49
Q4CTC7	TcCLB.507615.19	Mitotubule-associated protein Gb4, putative (Fragment)	1,93	2,3E+05	1,6E+05	6,6E+04	723	706	785	0,54	0,39	62	79
Q4CPC1	TcCLB.510723.29	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative (Fragment)	1,52	1,5E+05	8,4E+04	6,4E+04	774	779	786	0,38	0,12	12	7
Q4CMX5	TcCLB.510255.29	Uncharacterized protein (Fragment)	2,15	1,4E+05	5,1E+04	6,4E+04	781	806	787	0,35	-0,10	6	-19
Q4DK31	TcCLB.506525.20	Protein transport protein sec13, putative	1,47	1,6E+05	6,0E+03	6,3E+04	771	867	788	0,39	-1,02	17	-79
Q4D779	TcCLB.503849.60	NADH-dependent fumarate reductase, putative	1,34	1,8E+05	3,8E+04	6,2E+04	751	815	789	0,47	-0,21	38	-26
Q4CQU6	TcCLB.503467.9	NADH-dependent fumarate reductase, putative (Fragment)	1,75	1,2E+05	5,2E+04	6,2E+04	798	805	790	0,28	-0,08	-8	-15

Q4CRW5	TcCLB.504765.20	Uncharacterized protein (Fragment)	1,72	5,8E+04	2,7E+04	6,1E+04	828	829	791	-0,03	-0,36	-37	-38
Q4D4V0	TcCLB.511523.60	Uncharacterized protein	-2,00	1,1E+06	1,9E+05	6,1E+04	415	680	792	1,26	0,50	377	112
Q4DXY3	TcCLB.510431.110	Uncharacterized protein	0,98	2,4E+05	8,1E+04	6,0E+04	714	782	793	0,60	0,13	79	11
Q4D3B5	TcCLB.508413.5	Uncharacterized protein (Fragment)	1,33	2,2E+05	1,9E+05	5,9E+04	725	687	794	0,58	0,50	69	107
Q4D4X0	TcCLB.511909.50	Uncharacterized protein	1,17	6,0E+03	7,2E+04	5,7E+04	866	791	795	-0,98	0,10	-71	4
Q4DSA0	TcCLB.507031.90	Arginase, putative	0,98	3,0E+05	5,6E+04	5,7E+04	677	803	796	0,72	-0,01	119	-7
Q4DGU4	TcCLB.507081.50	Uncharacterized protein	1,70	8,1E+04	5,6E+04	5,6E+04	818	801	797	0,16	0,00	-21	-4
Q4DSV5	TcCLB.506227.150	Protein kinase A regulatory subunit, putative	5,24	3,7E+05	8,4E+04	5,5E+04	640	780	798	0,82	0,18	158	18
Q4D6J0	TcCLB.506721.30	Calpain-like cysteine peptidase, putative	1,43	2,0E+05	9,3E+04	5,4E+04	742	767	799	0,57	0,23	57	32
Q4D8Z1	TcCLB.510351.90	Dihydrolipoamide branched chain transacylase, putative	-2,00	9,6E+04	3,4E+04	5,4E+04	810	821	800	0,25	-0,20	-10	-21
Q4D0X3	TcCLB.508779.9	Uncharacterized protein (Fragment)	2,46	1,4E+05	8,6E+04	5,2E+04	786	777	801	0,43	0,22	15	24
Q4D0Z5	TcCLB.504017.79	Glycyl-tRNA synthetase, putative (Fragment)	2,15	1,5E+05	5,5E+04	5,0E+04	777	804	802	0,48	0,04	25	-2
Q4CU94	TcCLB.510947.10	Mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative	1,51	1,6E+05	3,6E+04	4,7E+04	768	818	803	0,53	-0,11	35	-15
Q4DCQ3	TcCLB.509775.40	Superoxide dismutase	1,67	1,4E+05	2,4E+04	4,6E+04	790	832	804	0,48	-0,27	14	-28
Q4DWW6	TcCLB.510729.210	Uncharacterized protein	5,02	6,0E+03	2,3E+06	4,6E+04	867	247	805	-0,88	1,70	-62	558
Q4CZ56	TcCLB.503653.30	Ribosomal RNA processing protein 41B, putative	0,95	9,7E+04	7,4E+04	4,5E+04	809	789	806	0,33	0,21	-3	17
Q4E120	TcCLB.506247.350	Uncharacterized protein	1,41	8,0E+04	3,8E+04	4,4E+04	819	814	807	0,26	-0,06	-12	-7
Q4DDB3	TcCLB.505193.100	Uncharacterized protein	1,66	2,3E+06	7,1E+04	4,4E+04	300	793	808	1,72	0,21	508	15
Q4DYD7	TcCLB.506321.310	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative	2,35	6,4E+04	4,2E+04	4,3E+04	824	813	809	0,17	-0,02	-15	-4
Q4D3E4	TcCLB.508397.30	SPFH domain / Band 7 family protein,	1,00	6,0E+03	8,9E+04	4,2E+04	868	771	810	-0,85	0,32	-58	39

		putative											
Q4E2Y0	TcCLB.508175.160	Deoxyuridine triphosphatase, putative	2,90	2,6E+05	4,2E+04	4,2E+04	695	812	811	0,79	0,00	116	-1
Q4DTD1	TcCLB.509157.220	Uncharacterized protein	-2,00	2,5E+05	6,0E+03	4,1E+04	704	863	812	0,79	-0,83	108	-51
Q4E602	TcCLB.508153.950	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase, putative	-2,00	8,6E+04	1,0E+05	4,1E+04	817	760	813	0,32	0,39	-4	53
Q4D9V7	TcCLB.506681.40	Uncharacterized protein	1,45	1,3E+05	7,2E+04	4,0E+04	795	790	814	0,50	0,25	19	24
Q4DYN8	TcCLB.504427.60	Uncharacterized protein	1,42	9,2E+04	4,2E+04	3,8E+04	814	810	815	0,38	0,04	1	5
Q4CQ55	TcCLB.508463.20	Uncharacterized protein	4,51	3,1E+05	1,6E+05	3,8E+04	669	701	816	0,92	0,64	147	115
Q4DC23	TcCLB.506213.80	60S ribosomal protein L17, putative	1,16	4,5E+04	2,9E+04	3,8E+04	834	825	817	0,08	-0,12	-17	-8
Q4DWS3	TcCLB.508409.230	Uncharacterized protein	1,23	5,6E+04	4,2E+04	3,6E+04	829	811	818	0,19	0,06	-11	7
Q4E5A8	TcCLB.506559.220	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	3,6E+04	869	881	819	-0,78	-0,78	-50	-62
Q4CUZ9	TcCLB.507537.30	Cysteinyl-tRNA synthetase, putative	1,14	9,0E+04	6,0E+03	3,5E+04	815	869	820	0,41	-0,76	5	-49
Q4D940	TcCLB.508897.20	Signal recognition particle protein, putative	-2,00	6,0E+03	1,3E+05	3,4E+04	870	726	821	-0,75	0,59	-49	95
Q4D9S8	TcCLB.504045.80	Uncharacterized protein	-2,00	4,5E+04	6,0E+03	3,3E+04	833	870	822	0,14	-0,74	-11	-48
Q4E0Y6	TcCLB.508277.100	cAMP specific phosphodiesterase, putative	1,21	1,6E+05	4,3E+04	3,1E+04	773	809	823	0,70	0,14	50	14
Q4DUD6	TcCLB.506625.60	Inositol 5-phosphatase 1, putative	1,31	5,3E+04	1,9E+04	3,0E+04	830	835	824	0,25	-0,20	-6	-11
Q4DEQ8	TcCLB.506295.80	ADP-ribosylation factor, putative	1,41	1,4E+05	8,9E+04	2,7E+04	791	773	825	0,71	0,52	34	52
Q4DSE5	TcCLB.504057.97	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	3,2E+04	2,6E+04	871	822	826	-0,63	0,10	-45	4
Q4DSX7	TcCLB.508347.70	Uncharacterized protein	1,54	5,8E+04	2,5E+04	2,5E+04	827	831	827	0,37	0,01	0	-4
Q4D8G0	TcCLB.508567.40	Uncharacterized protein	1,38	7,0E+04	3,7E+04	2,1E+04	821	817	828	0,52	0,23	7	11
<b>Q4E4I0</b>	<b>TcCLB.506885.204</b>	<b>ZFP29</b>	<b>14,78</b>	<b>8,7E+04</b>	<b>5,5E+06</b>	<b>2,1E+04</b>	<b>816</b>	<b>127</b>	<b>829</b>	<b>0,61</b>	<b>2,41</b>	<b>13</b>	<b>702</b>
Q4DH60	TcCLB.509207.90	Pyrroline-5-carboxylate reductase	1,04	2,6E+05	1,2E+05	2,1E+04	700	742	830	1,09	0,75	130	88

Q4CLN6	TcCLB.511651.19	Delta-adaptin, putative (Fragment)	1,52	3,8E+04	2,0E+04	1,9E+04	837	834	831	0,31	0,02	-6	-3
Q4DII8	TcCLB.509799.130	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	1,8E+04	872	882	832	-0,48	-0,48	-40	-50
Q4E4G0	TcCLB.506885.400	40 kDa cyclophilin, putative	1,46	6,1E+04	1,7E+04	1,5E+04	826	838	833	0,61	0,06	7	-5
Q4CQT8	TcCLB.503719.39	Uncharacterized protein (Fragment)	1,72	1,2E+05	2,7E+04	1,3E+04	801	827	834	0,95	0,32	33	7
<b>Q4D8K5</b>	<b>TcCLB.503453.20</b>	<b>ZFPTTP</b>	<b>15,21</b>	<b>1,3E+07</b>	<b>6,0E+03</b>	<b>1,3E+04</b>	<b>71</b>	<b>849</b>	<b>835</b>	<b>3,00</b>	<b>-0,33</b>	<b>764</b>	<b>-14</b>
Q4DDC9	TcCLB.507485.110	Uncharacterized protein	0,94	1,0E+05	2,7E+04	1,1E+04	808	828	836	0,96	0,39	28	8
Q4CNU8	TcCLB.509637.9	Uncharacterized protein (Fragment)	1,10	1,5E+04	1,7E+04	1,1E+04	844	837	837	0,14	0,20	-7	0
Q4DFE8	TcCLB.506155.120	Glycosyl hydrolase, putative	1,08	6,2E+04	1,4E+04	9,7E+03	825	839	838	0,81	0,15	13	-1
Q4DL32	TcCLB.503893.170	Uncharacterized protein	1,41	4,0E+04	1,2E+04	8,7E+03	836	841	839	0,67	0,14	3	-2
Q4DPX9	TcCLB.507049.50	ABC transporter, putative	1,07	3,4E+04	1,1E+04	6,5E+03	839	842	840	0,72	0,21	1	-2
Q4D2G0	TcCLB.505609.30	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	-2,00	9,3E+07	6,0E+03	6,0E+03	12	847	873	4,19	0,00	861	26
Q4DU62	TcCLB.511391.120	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	1,48	1,6E+06	1,5E+06	6,0E+03	351	327	843	2,44	2,39	492	516
Q4DIC7	TcCLB.506959.140	Uncharacterized protein (Fragment)	1,06	1,2E+06	1,2E+05	6,0E+03	408	743	857	2,30	1,28	449	114
Q4DNU8	TcCLB.511003.10	Phospholipid-transporting ATPase (Fragment)	-2,00	8,1E+05	5,8E+05	6,0E+03	495	505	845	2,13	1,99	350	340
Q4D7Y1	TcCLB.510755.120	RNA-binding protein, putative	3,92	6,9E+05	5,7E+05	6,0E+03	531	509	847	2,06	1,98	316	338
Q4D3I2	TcCLB.506505.30	Uncharacterized protein	1,42	6,3E+05	6,0E+03	6,0E+03	548	855	874	2,02	0,00	326	19
Q4DXF7	TcCLB.510355.269	Cytochrome b5, putative (Fragment)	4,03	5,6E+05	2,0E+06	6,0E+03	568	274	841	1,97	2,53	273	567
Q4DQ97	TcCLB.508387.20	Methylthioadenosine phosphorylase, putative	2,83	5,1E+05	1,7E+05	6,0E+03	591	698	855	1,93	1,45	264	157
Q4D5I2	TcCLB.510131.40	Haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	2,02	4,1E+05	5,7E+05	6,0E+03	623	507	846	1,83	1,98	223	339
Q4D9D2	TcCLB.506627.20	Uncharacterized protein	1,71	3,1E+05	6,3E+05	6,0E+03	668	492	844	1,72	2,02	176	352
Q4DHA9	TcCLB.506779.50	Proteasome beta 3 subunit, putative	2,39	3,0E+05	6,0E+03	6,0E+03	678	860	875	1,69	0,00	197	15



Q4DSP9	TcCLB.509937.150	Serine hydroxymethyltransferase	1,30	2,9E+05	6,0E+03	6,0E+03	682	861	876	1,69	0,00	194	15
Q4DTF4	TcCLB.510311.90	Quinone oxidoreductase, putative	2,49	2,6E+05	8,7E+04	6,0E+03	703	776	859	1,63	1,16	156	83
Q4DS18	TcCLB.507949.4	Cytidine triphosphate synthase, putative (Fragment)	1,66	2,3E+05	2,6E+05	6,0E+03	717	645	850	1,59	1,63	133	205
Q4DG77	TcCLB.506201.120	Uncharacterized protein	1,36	2,3E+05	9,3E+04	6,0E+03	721	766	858	1,58	1,19	137	92
Q4DPB7	TcCLB.508577.160	Proteasome subunit beta type	1,33	2,2E+05	6,0E+03	6,0E+03	727	864	877	1,57	0,00	150	13
Q4E0Y2	TcCLB.508277.140	Phosphomevalonate kinase-like protein, putative	1,32	2,0E+05	2,0E+05	6,0E+03	744	670	853	1,52	1,52	109	183
Q4E5E9	TcCLB.511277.460	Uncharacterized protein	1,59	1,9E+05	2,6E+05	6,0E+03	745	646	851	1,51	1,63	106	205
Q4E2R8	TcCLB.504153.150	Kinesin-like protein	-2,00	1,8E+05	4,2E+05	6,0E+03	754	570	848	1,48	1,84	94	278
Q4CM65	TcCLB.511023.10	Proline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative (Fragment)	-2,00	1,7E+05	6,0E+03	6,0E+03	759	865	878	1,46	0,00	119	13
Q4CZV4	TcCLB.509903.5	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	1,49	1,4E+05	1,9E+05	6,0E+03	792	686	854	1,36	1,49	62	168
Q4DWG4	TcCLB.511725.280	Uncharacterized protein	1,86	1,1E+05	8,5E+04	6,0E+03	803	778	860	1,28	1,15	57	82
Q4D313	TcCLB.506569.10	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	1,41	1,0E+05	1,2E+04	6,0E+03	807	840	870	1,23	0,31	63	30
Q4DUK7	TcCLB.511245.130	Elongation of fatty acids protein	1,00	9,2E+04	6,0E+03	6,0E+03	813	868	879	1,19	0,00	66	11
Q4DDA0	TcCLB.506829.10	Uncharacterized protein	-2,00	7,6E+04	4,9E+04	6,0E+03	820	808	862	1,11	0,91	42	54
Q4CPZ0	TcCLB.510685.10	Calreticulin, putative	1,04	6,6E+04	8,0E+03	6,0E+03	822	845	872	1,04	0,12	50	27
Q4E1Q3	TcCLB.507093.63	Uncharacterized protein	-2,00	4,9E+04	2,7E+04	6,0E+03	832	826	867	0,91	0,66	35	41
Q4DL36	TcCLB.503893.130	Uncharacterized protein	-2,00	3,4E+04	3,7E+04	6,0E+03	838	816	863	0,76	0,79	25	47
Q4DJX8	TcCLB.510879.50	Regulatory subunit of protein kinase a-like protein, putative	2,05	3,3E+04	6,0E+03	6,0E+03	840	871	880	0,74	0,00	40	9
Q4D9I9	TcCLB.506857.110	Uncharacterized protein	-2,00	3,1E+04	6,0E+03	6,0E+03	841	872	881	0,72	0,00	40	9
Q4DHT6	TcCLB.506177.60	Uncharacterized protein	-2,00	1,9E+04	6,0E+03	6,0E+03	843	873	882	0,51	0,00	39	9
Q4D9J2	TcCLB.506857.80	Kinesin-like protein	-2,00	9,1E+03	2,5E+04	6,0E+03	845	830	868	0,18	0,63	23	38

Q4D3A7	TcCLB.508413.68	Kinetoplastid membrane protein KMP-11	3,00	6,0E+03	1,5E+06	6,0E+03	873	313	842	0,00	2,41	-31	529
Q4E092	TcCLB.506679.110	Dynein heavy chain, putative	-2,00	6,0E+03	2,7E+05	6,0E+03	874	644	849	0,00	1,65	-25	205
Q4DIQ5	TcCLB.506635.70	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	2,1E+05	6,0E+03	875	663	852	0,00	1,54	-23	189
Q4CRG4	TcCLB.508557.29	Uncharacterized protein (Fragment)	-2,00	6,0E+03	1,4E+05	6,0E+03	876	719	856	0,00	1,37	-20	137
Q4DNK5	TcCLB.506871.90	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	7,0E+04	6,0E+03	877	796	861	0,00	1,07	-16	65
Q4CMF8	TcCLB.510379.20	Uncharacterized protein (Fragment)	-2,00	6,0E+03	3,5E+04	6,0E+03	878	819	864	0,00	0,76	-14	45
Q4E1Q4	TcCLB.507093.60	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	3,4E+04	6,0E+03	879	820	865	0,00	0,75	-14	45
Q4DUD8	TcCLB.506625.19	Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative (Fragment)	-2,00	6,0E+03	3,0E+04	6,0E+03	880	824	866	0,00	0,70	-14	42
Q4E112	TcCLB.506247.420	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	2,3E+04	6,0E+03	881	833	869	0,00	0,59	-12	36
Q4E2D5	TcCLB.509979.140	Uncharacterized protein	-2,00	6,0E+03	9,3E+03	6,0E+03	882	844	871	0,00	0,19	-11	27
Q4D3U8	TcCLB.505945.20	Ribonuclease mar1, putative	1,05	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	884	884	884	0,00	0,00	0	0
Q4DP16	TcCLB.509669.70	Uncharacterized protein	1,02	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	888	888	888	0,00	0,00	0	0
Q4DKL8	TcCLB.506843.100	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	889	889	889	0,00	0,00	0	0
Q4D5H3	TcCLB.508405.30	Phosphatase-like protein, putative	5,28	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	885	885	885	0,00	0,00	0	0
Q4DBG1	TcCLB.506327.99	Serine/threonine protein kinase, putative (Fragment)	5,90	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	886	886	886	0,00	0,00	0	0
Q4CXR9	TcCLB.506905.50	Cystathionine beta-synthase	-2,00	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	883	883	883	0,00	0,00	0	0
Q4DCW2	TcCLB.506407.10	Alpha-mannosidase	1,09	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	887	887	887	0,00	0,00	0	0
Q4E3S5	TcCLB.506401.180	Uncharacterized protein	1,59	6,0E+03	6,0E+03	6,0E+03	890	890	890	0,00	0,00	0	0