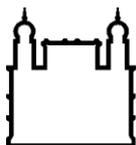


INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Doutorado em Biociências e Biotecnologia

**RELAÇÃO DE SUB2 COM DIFERENTES
MAQUINARIAS DO METABOLISMO NUCLEAR DO RNA
MENSAGEIRO**

PRISCILA MAZZOCCHI HIRAIWA

CURITIBA/PR
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

PRISCILA MAZZOCCHI HIRAIWA

RELAÇÃO DE SUB2 COM DIFERENTES
MAQUINARIAS DO METABOLISMO NUCLEAR DO RNA
MENSAGEIRO

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

Orientadores: Dra. Andrea Rodrigues Ávila
Dra. Fabíola Barbieri Holetz

CURITIBA/PR

2017

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

H668 Hiraiwa, Priscila Mazzocchi

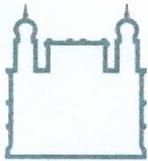
Relação de Sub2 com diferentes maquinarias do metabolismo nuclear do RNA mensageiro / Priscila Mazzocchi Hiraiwa. – Curitiba, 2017.
xiii, 137 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2017.

Bibliografia: f. 116-128

1. Sub2. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Trans splicing*. 4. Exportação RNAm. 5. Transcrição *in vitro*. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

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

Aos 10 dias do mês de março de dois mil e dezessete, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz, Dra. Daniela Fiori Gradia e Dra. Maria Carolina Q.B. Elias- Sabbaga, com a finalidade de julgar a tese da candidata **Priscila Mazzocchi Hiraiwa**, intitulada: **“Relação de Sub2 com diferentes maquinarias do metabolismo nuclear do RNA mensageiro”**, sob a orientação de Andréa Rodrigues Ávila e co - orientação de Fabíola Barbieri Holetz, para obtenção do grau de **Doutor** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

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

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 10 de Março de 2017

Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna Muniz - ICC/Fiocruz-Pr

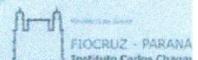
Prof. Dra. Daniela Fiori Gradia - UFPR

Prof. Dra. Maria Carolina Q.B. Elias - Sabbaga - Instituto Butantan

Candidato(a): Priscila Mazzocchi Hiraiwa

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



*Aos meus pais, Francisco e Neiva,
que me apoiam e me incentivam constantemente.*

Agradecimentos

Chego ao fim da formação acadêmica. Melhor, formação formal da vida acadêmica! Como a minha formação não acaba aqui, também não iniciei esta história na escola ou na universidade. Por isso, primeiramente, agradeço àqueles que estão me acompanhando desde o início e que me ensinaram, antes de tudo, o que não está escrito em nenhum livro ou artigo. Agradeço aos meus pais por terem escrito esta história comigo.

Também agradeço a todos que contribuíram para a minha formação e me levaram a seguir a ciência. Em especial, agradeço àqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho:

À Dra. Andrea Rodrigues Ávila pela orientação e oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa. Por ter confiado em mim para o desenvolvimento do projeto e pela compreensão nas fases difíceis.

À Dra. Fabíola Barbieri Holetz pela co-orientação e auxílio em etapas essenciais do doutorado. Por me apoiar durante o doutorado, mesmo quando os “grânulos” não estavam ao nosso favor.

À Dra. Alessandra Melo de Aguiar pelo auxiliado nos experimentos de transcrição *in vitro*, pela compreensão e incentivo para finalizar este trabalho. Por ter me ensinado muito nesses anos de trabalho e amizade.

Ao Dr. Stênio Fragoso Perdigão e ao Dr. Nilson Zanchin por aceitarem os desafios comigo e por terem compartilhado suas experiências. Trabalhamos muito e não chegamos a todos os resultados desejados. Mas aprendi muito com vocês, inclusive que precisamos reconhecer o momento de parar e mudar.

Ao Dr. Paulo Carvalho e Dra. Lysangela Alves por contribuírem com os dados de proteômica e transcritoma, respectivamente. Agradeço pelo auxílio nestas áreas do conhecimento.

Às Plataformas de Citometria de Fluxo, Microscopia, Proteômica e Engenharia e Purificação de Proteínas do Instituto Carlos Chagas. Em especial, à equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo que me ensinou a trabalhar com citometria de fluxo e os princípios para realizar um bom experimento. O que aprendi contribuiu muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do grupo de pesquisa pela amizade, auxílio nos experimentos e companheirismo no dia-a-dia.

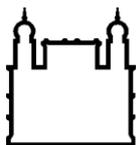
A todos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica pela amizade, discussão dos protocolos e colaboração para desenvolver este projeto.

Aos Laboratórios de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Biologia Celular, Biologia Básica de Células Tronco, Genômica Funcional e Virologia Molecular pelas ajudas e experiências compartilhadas.

Aos Laboratórios de Preparo de Materiais pela organização e pela ajuda técnica que facilitou o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos, que fizeram esses anos ficarem mais leve e mais divertido!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

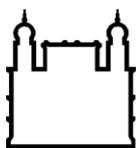
RELAÇÃO DE SUB2 COM DIFERENTES MAQUINARIAS DO METABOLISMO NUCLEAR DO RNA MENSAGEIRO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Priscila Mazzocchi Hiraiwa

A expressão gênica em eucariotos é regulada por diversos mecanismos, incluindo o controle do processamento do RNAm e a exportação do núcleo para o citoplasma. Entretanto, os componentes da via de exportação de RNA não são conservados em espécies divergentes e ainda são pouco compreendidos em tripanossomatídeos. Uma exceção é a proteína Sub2, uma proteína altamente conservada, que é um componente essencial para a exportação de RNAm em tripanossomatídeos. Estudos anteriores mostram que a depleção de Sub2 em *Trypanosoma brucei* causa o acúmulo do SL RNA e diminui a quantidade da estrutura em Y, subproduto do *trans splicing*, indicando que esta proteína pode estar relacionada com o processamento do pré-RNAm ou com a transcrição. Uma hipótese é que Sub2 é um componente da maquinaria de transcrição do pré-RNAm e a depleção de Sub2 afeta a síntese do pré-RNAm, causando o acúmulo do SL RNA. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a interação de Sub2 com diferentes vias do metabolismo nuclear do RNAm. Para avaliar a taxa de transcrição, estabelecemos uma metodologia baseada em fluorescência para quantificar o RNA nascente de forma acurada. Os dados mostram que o silenciamento de Sub2 não bloqueia a atividade da RNA polimerase II, indicando que o acúmulo do SL RNA é consequência da inibição de mecanismos pós-transcricionais. Além disso, Sub2 co-precipita com U2AF35, uma proteína essencial para as etapas iniciais do *trans splicing*, apesar de outros componentes do spliceossomo não serem identificados por proteômica. Sub2 também interage com proteínas relacionadas com o direcionamento ou controle de qualidade do RNAm e com proteínas hipotéticas conservadas exclusivamente em tripanossomatídeos/kinetoplastídeos. Nossos resultados indicam que Sub2 acopla diferentes vias da biogênese do RNA no núcleo de tripanossomatídeos e provavelmente é um componente crucial dos mecanismos divergentes, os quais possuem novas proteínas relacionadas com o *trans splicing* e/ou a via de exportação de RNAm.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

**INVOLVEMENT OF SUB2 IN DIFFERENT PATHWAYS OF NUCLEAR MRNA
METABOLISM**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Priscila Mazzocchi Hiraiwa

Eukaryotic gene expression is regulated by several mechanisms, including control of mRNA processing and nucleocytoplasmic export. However, the components of mRNA export are not conserved in divergent species and still poorly understood in trypanosomatid parasites. One exception is Sub2, a highly conserved protein, which is an essential component of mRNA export in trypanosomes. Previous studies have shown that Sub2 knock down in *Trypanosoma brucei* increased the SL RNA level and decreased the Y structure, intermediate of *trans* splicing, indicating that its protein can also be involved in pre-mRNA processing or transcription. One hypothesis is that Sub2 is a component of the transcription machinery and that depletion of Sub2 affects pre-mRNA synthesis causing SL RNA accumulation. For this reason, the aim of this study was to evaluate the interaction of Sub2 with distinct pathways of mRNA nuclear metabolism. In order to evaluate transcription rate, we established a methodology based on fluorescent approaches for accurate quantification of nascent mRNA. The results have shown that Sub2 knock down does not block RNA polymerase II activity, indicating that SL RNA accumulation is a direct consequence of defects on post-transcriptional pathways. Indeed, Sub2 co-precipitates with U2AF35, an essential protein for the initial steps of *trans* splicing, although other components of spliceosome complex could not be identified by proteomics. Furthermore, Sub2 interacts with proteins involved in sorting or quality control of mRNAs in addition to hypothetical proteins conserved exclusively in species of trypanosomatids/kinetoplastids. Together, our results indicate that Sub2 links distinct pathways of mRNA nuclear biogenesis in trypanosomes and it is probably a crucial component of a divergent pathway which novel proteins involved in *trans* splicing and/or mRNA export pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Transcrição policistrônica e processamento do pré-RNA em tripanossomatídeos	3
Figura 1.2 - Sequências conservadas no pré-RNA de metazoários e de leveduras	5
Figura 1.3 - Interação molecular no sítio de ramificação e no sítio de <i>splicing</i> 3'	6
Figura 1.4 - Processamento do pré-RNA por <i>cis splicing</i>	7
Figura 1.5 - Representação esquemática do <i>trans splicing</i>	9
Figura 1.6 - Trato de pirimidina não associado à região codificante à montante	10
Figura 1.7 - <i>Trans splicing</i> alternativo em tripanossomatídeos	12
Figura 1.8 - Comparação entre os fatores de <i>splicing</i> descritos em humanos e em tripanossomas	15
Figura 1.9 - Via de exportação de RNA do núcleo para o citoplasma em leveduras	17
Figura 1.10 - Modelo de exportação do RNA dependente do EJC	19
Figura 1.11 - Modelos de recrutamento do complexo TREX dependente do <i>cap</i> e do <i>splicing</i>	20
Figura 1.12 - Modelo de interação do mecanismo de processamento da extremidade 3' e exportação do RNA	21
Figura 3.1 - Região de Sub2 de <i>T. brucei</i> selecionada para clonar no vetor PN-PURO-PTP ..	37
Figura 4.1 - Representação da estratégia de análise da metodologia de transcrição <i>in vitro</i> por citometria de fluxo	50
Figura 4.2 – Ensaio de transcrição <i>in vitro</i> e análise por citometria de fluxo.	52
Figura 4.3 - Representação da estratégia de análise por sistema de imagem de alta performance	53
Figura 4.4 - Localização nuclear do RNA nascente visualizado por sistema de imagem de alta performance	54
Figura 4.5 – Análise estatística dos dados de transcrição <i>in vitro</i> obtidos por sistema de imagem de alta performance	55
Figura 4.6 - Validação da coloração com DAPI para análise de ciclo celular com o protocolo de transcrição <i>in vitro</i>	56
Figura 4.7 - Análise simultânea do ciclo celular e da transcrição em células permeabilizadas	58
Figura 4.8 – Análise da taxa de transcrição <i>in vitro</i> , por citometria de fluxo, após o silenciamento de Sub2 de <i>T. brucei</i>	60

Figura 4.9 - O silenciamento de Sub2 de <i>T. brucei</i> não altera a taxa de transcrição.....	61
Figura 4.10 - O silenciamento de Sub2 de <i>T. brucei</i> não altera a taxa de transcrição.....	63
Figura 4.11 - Localização nuclear da proteína Sub2 e do RNA nascente.	65
Figura 4.12 - Clonagem da região 5' de Sub2 de <i>T. brucei</i> no vetor PN-PURO-PTP	68
Figura 4.13 – Linhagem expressando a proteína Sub2 fusionada a etiqueta PTP na extremidade N-terminal.....	70
Figura 4.14 - Separação dos complexos proteicos por cromatografia de exclusão de tamanho.	72
Figura 4.15 – Ensaio de imunoprecipitação da proteína Sub2 de <i>T. brucei</i> fusionada à etiqueta PTP na extremidade N terminal.....	73
Figura 4.16 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas de <i>T. brucei</i> (Tb927.1.2750) e de <i>T. cruzi</i> (TcCLB.509005.60).....	77
Figura 4.17 - Análise da proteína Tb927.6.1470.....	78
Figura 4.18 - Análise de conservação e da estrutura da proteína TbAPI5.	79
Figura 4.19 - Análise de conservação e da estrutura da proteína TbHip.....	80
Figura 4.20 - Análise da estrutura e da conservação da proteína RNA helicase HEL67 dependente de ATP.....	83
Figura 4.21 - Análise da estrutura e da conservação da proteína RNA helicase DEAD/H ATP dependente, putativa.	84
Figura 4.22 - Análise da estrutura e da conservação da proteína DRBD2	85
Figura 4.23 – A proteína Hip-HA é nuclear	88
Figura 4.24 – Localização da proteína Sub2 e Hip fusionada a 3xHA nas fases do ciclo celular	89
Figura 4.25 - Localização da proteína U2AF35 fusionada a GFP.....	90
Figura 4.26 – Análise de interação de Sub2 com proteínas API5 e DHH1 por imunoprecipitação seguida de <i>Western blotting</i>	92
Figura 4.27 – Imunoprecipitações das proteínas Hip e Mago de <i>T. brucei</i> fusionadas à etiqueta HA na extremidade C terminal.....	93
Figura 4.28 – Imunoprecipitação das proteínas U2AF35 de <i>T. brucei</i> fusionadas à etiqueta GFP na extremidade C terminal	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Dados numéricos obtidos das análises por citometria de fluxo (média de 3 experimentos independentes).	52
Tabela 4.2 - Dados numéricos do ciclo celular das amostras coradas com DAPI e PI.....	57
Tabela 4.3 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas após a imunoprecipitação do complexo contendo a proteína TbSub2-PTP-N.....	74

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Família Trypanosomatidae	1
1.2	Expressão gênica em tripanossomatídeos	2
1.3	Mecanismo de splicing	4
1.3.1	Cis Splicing	4
1.3.2	Trans splicing	8
1.4	Splicing e exportação do RNAm	16
2	OBJETIVO	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3.1	Microrganismos e cultivo	25
3.2	Meios de cultura	25
3.3	Preparo de bactéria cálcio competente e transformação bacteriana	26
3.4	Extração de ácido nucleico	27
3.4.1	Extração de DNA Genômico de <i>T. brucei</i>	27
3.4.2	Extração de RNA Total de <i>T. brucei</i>	28
3.4.3	Extração de DNA Plasmidial de bactéria	28
3.5	eletroforese de ácidos nucléicos e proteínas	28
3.5.1	Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	28
3.5.2	Eletroforese de RNA em Gel de Agarose em Condição Desnaturante	28
3.5.3	Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)	29
3.5.3.1	Coloração por Comassie Blue	29
3.5.3.2	Coloração por Nitrato de Prata	29
3.5.3.3	Western blotting	30
3.6	Reação de amplificação De DNA por PCR	31
3.7	Localização celular de proteínas por microscopia de imunofluorescência indireta	31
3.8	Transcrição <i>in vitro</i> em <i>T. brucei</i> e análise por ferramentas quantitativas	32
3.8.1	Transcrição <i>In vitro</i> em Células Permeabilizadas	32
3.8.2	Análise da Taxa de Transcrição e do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo Simultaneamente	34
3.8.3	Validação da Análise do Ciclo Celular com DAPI	34
3.8.4	Análise da Taxa de Transcrição por Sistema de Imagem de Alta Performance (<i>High-Content Imaging System</i>)	35
3.8.5	Análise Estatística	36
3.8.6	Análise da Taxa de Transcrição Após o Silenciamento de Sub2	36
3.9	Obtenção de linhagens de <i>Trypanosoma brucei</i> expressando proteínas fusionadas à etiquetas	36

3.9.1 Clonagem Molecular da Região que Codifica a Extremidade N Terminal da Proteína Sub2 de <i>Trypanosoma brucei</i> no Vetor PN-PURO-PTP	36
3.9.2 Amplificação dos Vetores pMOTag Para Adicionar uma Etiqueta na Região C-terminal das Proteínas	38
3.9.3 Transfecção e Seleção de <i>Trypanosoma brucei</i>	39
3.9.4 Análise das Linhagens	40
3.9.4.1 Análise das proteínas fusionadas às etiquetas por <i>Western blotting</i>	40
3.9.4.3 Localização celular das proteínas fusionadas às etiquetas por microscopia de imunofluorescência indireta	40
3.10 Análise do complexo proteico	41
3.10.1 Expressão e Purificação de Nanobodies Anti-GFP	41
3.10.2 Conjugação do Nanobody anti-GFP ou do Anticorpo Anti-proteína A à Dynebeads Epoxy M270 ...	42
3.10.3 Preparo de Extrato Celular de <i>T. brucei</i> para Imunoprecipitação	42
3.10.4 Cromatografia de Gel Filtração	43
3.10.5 Imunoprecipitação Utilizando Nanobodies Anti-GFP ou Anticorpo Anti-Proteína A Ligados à Dynebeads Epoxy M270	43
3.10.6 Imunoprecipitação Utilizando a Resina Anti-HA	44
3.10.7 Processamento das Amostras e Espectrometria de Massas	44
3.10.8 Processamento dos Dados Obtidos do Espectrômetro de Massas e Análise dos Dados	46
3.10.9 Busca de Domínios, Predição de Estrutura, Análise de Homologia, Ortologia e Identidade	47
3.10.10 Conjugação dos Nanobodies a Alexa Fluor 488 5-SDP	48
4 Resultados	49
4.1 Silenciamento da expressão de Sub2 não altera a taxa de transcrição	49
4.1.2 Análise da Taxa de Transcrição por Citometria de Fluxo: Adaptação do Método, Estratégias e Critérios de Análise do Ensaio	49
4.1.2 Análise da Taxa de Transcrição após o Silenciamento de Sub2	58
4.2 Proteínas que pertencem ao mesmo complexo proteico que Sub2 são conservadas apenas em kinetoplastídeos	66
4.2.1 Construção da Linhagem TbSub2-PTP-N	67
4.2.2 Purificação do Complexo Proteico que Contém Sub2 em <i>T. brucei</i> e Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas	70
4.2.3 Ensaio de Imunoprecipitação Confirmam a Interação de Sub2 com Algumas Proteínas Identificadas por Proteômica	85
4.2.3.1 Construção de ferramentas para o ensaio de co-imunoprecipitação e localização celular das proteínas selecionadas	86
4.2.3.1.1 Expressão e purificação dos nanobodies	86
4.2.3.1.2 Localização celular das proteínas selecionadas	87

4.3.3.1.2.1 TbHip-HA.....	88
4.3.3.1.2.2 TbU2AF35-GFP.....	90
4.2.3.2 Ensaio de imunoprecipitação	90
5 Discussão	95
6 Conclusão	112
7 Referências Bibliográficas.....	114
8 Apêndices	127
<i>Apêndice A: Oligonucleotídeos</i>	<i>127</i>
<i>Apêndice B - Silenciamento de Sub2 não altera o ciclo celular dos parasitas.....</i>	<i>128</i>
<i>Apêndice C - Purificação dos nanobodies por cromatografia de afinidade His-Tap FF. (A).....</i>	<i>129</i>
<i>Apêndice D - Os nanobodies reconheceram especificamente a proteína GFP em T. brucei</i>	<i>130</i>
<i>APÊNDICE E - Proteínas identificadas por espectrometria de massas após a imunoprecipitação do complexo contendo a proteína TbSub2-PTP-N.....</i>	<i>131</i>
<i>Apêndice F - Membrana do Western blotting, corada com Ponceau, da imunoprecipitações das proteínas Hip e Mago de T. brucei fusionadas à etiqueta HA na extremidade C terminal</i>	<i>133</i>
9 Anexo	134
<i>Anexo A - Mapa do vetor PN-PURO-PTP. (A) Representação do esquemática do vetor PN-PURO-PTP</i>	<i>134</i>
<i>Anexo B - Mapa dos vetores pMOTag.</i>	<i>135</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A família Trypanosomatidae compreende parasitas obrigatórios divididos em nove gêneros: *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Rhynchoidomonas*. Esta família pertence à (CAVALIER-SMITH, 2010):

Ordem: Kinetoplastida

Classe: Kinetoplastea

Filo: Euglenozoa

Reino: Protozoa

Os tripanossomatídeos são classificados como monoxênicos quando possuem apenas um hospedeiro, ou heteroxênicos quando alternam entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado. Segundo esta classificação, os parasitas dos gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* e *Rhynchoidomonas* são monoxênicos, tendo como único hospedeiro diferentes espécies de insetos. Os outros gêneros possuem parasitas heteroxênicos. Tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* alternam o ciclo biológico entre um inseto hemíptero fitófago e um vegetal, e são prejudiciais para algumas plantas de importância agrícola e econômica. *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania* são parasitas de vertebrados transmitidos por insetos hematófagos, sendo que os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* contêm alguns protozoários de importância médica: *T. cruzi* que causa a doença de Chagas ou tripanossomíase americana; *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* causam a doença do sono ou tripanossomíase africana; e diversas espécies de *Leishmania* spp. podem ser o agente etiológico da leishmaniose tegumentar ou da leishmaniose visceral.

A Organização Mundial de Saúde estima que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi*, principalmente na América Latina (WHO, 2017a). Em 2009, menos de 10.000 casos de doença do sono foram registrados e em 2015, 2804 casos foram registrados. A doença é endêmica em 36 países da África subsaariana, sendo que 95 % dos casos são causados pelo *T. brucei gambiense* (WHO, 2017b). Em relação às leishmanioses, em torno de 12 milhões de pessoas estão infectadas e estima-se a incidência de 2 milhões de casos por ano (WHO, 2017c).

Os kinetoplastídeos possuem alguns mecanismos moleculares peculiares, como variação antigênica das glicoproteínas de superfície, edição do RNA mitocondrial, presença de glicossomo, transcrição policistrônica e processamento do RNAm por *trans splicing* (DONELSON; GARDNER; EL-SAYED, 1999). Estes mecanismos são alvos em potencial para o desenvolvimento de terapias contra os patógenos, pois não devem afetar a célula hospedeira.

1.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Na maioria dos eucariotos, os genes codificadores para proteínas são transcritos individualmente pela RNA polimerase II. O primeiro transcrito é chamado de pré-RNA, pois contém sequências intrônicas, que serão removidas, e sequências exônicas, regiões codificantes separadas pelos introns. O pré-RNA nascente é processado co-transcricionalmente pelas enzimas associadas à RNA polimerase II, com a adição do *cap* 7-metilguanossina (m7G *cap*) na extremidade 5' do RNA, eliminação dos introns por *cis splicing* e adição da cauda de adenina na extremidade 3', gerando o RNAm. O RNAm é transportado do núcleo para o citoplasma onde pode ser traduzido em uma proteína. Por isso, a regulação da expressão gênica pode ocorrer nas diferentes etapas, desde o início da transcrição, o principal ponto de controle, até a expressão e estabilidade da proteína (ORPHANIDES; REINBERG, 2002).

Devido à transcrição policistrônica e ausência de promotores individuais para a transcrição de genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase II em tripanossomatídeos, a expressão gênica é regulada principalmente por mecanismos pós-transcricionais (CLAYTON, 2002; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Neste caso, diferentemente da maioria dos eucariotos, os genes codificadores de proteínas transcritos pela RNA polimerase II estão agrupados em unidades transcricionais no genoma, o que resulta em longos pré-RNA policistrônicos contendo informações gênicas que, normalmente, não possuem relação metabólica nem temporal, ou seja, genes de um mesmo policistron codificam proteínas sem funções relacionadas e que são expressas em níveis e estágios diferentes (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010). Os pré-RNAm policistrônicos são rapidamente processados por *trans splicing* (item 1.3.2), mecanismo que adiciona o *splice leader* (SL), também chamado de mini exon (ME), às sequências codificadoras e poliadenilados, gerando os RNAm monocistrônicos, ou seja, molécula com informação para codificar apenas uma proteína (LIANG et al., 2003) (Figura 1.1).

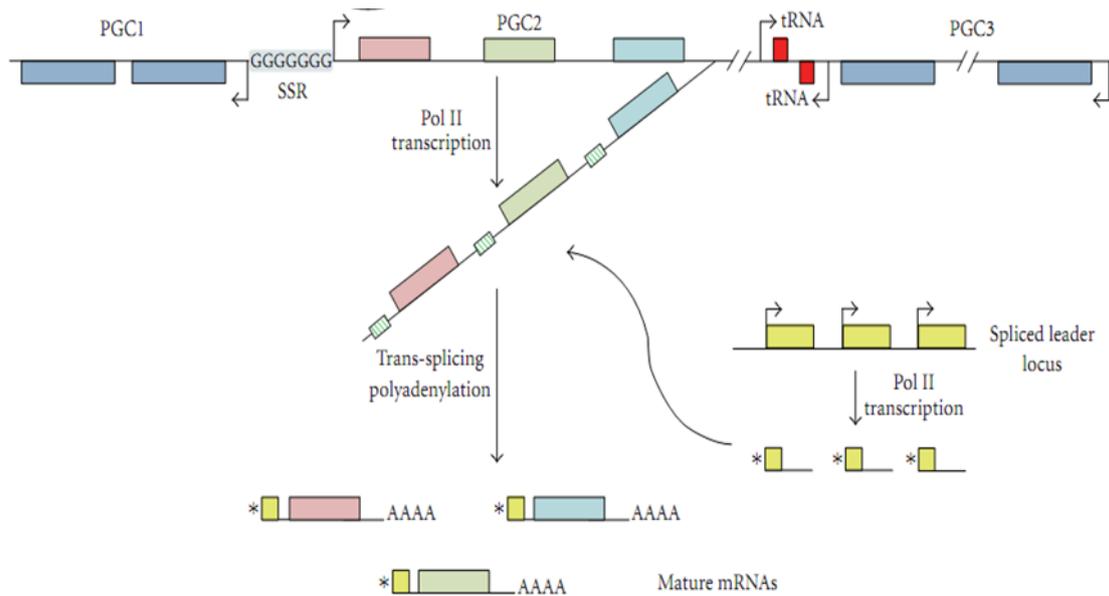


Figura 1.1 - Transcrição policistrônica e processamento do pré-RNAm em tripanossomatídeos. Representação hipotética de um cromossomo contendo grupos de genes (PGC – *polycistronic gene clusters*) que são transcritos pela RNA polimerase II em um único pré-RNAm. Este transcrito é processado por *trans splicing* e poliadenilação para gerar o RNAm. Por *trans splicing*, o SL (amarelo) contendo o *cap4* (asterisco) é adicionado à extremidade 5' de cada RNAm. Cada gene que codifica para o SL RNA possui um promotor reconhecido pela RNA polimerase II. A sequência AAAA nos RNAm representa a cauda poli(A).

Fonte: Modificado de MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010.

Diferentemente da transcrição do pré-RNAm, a transcrição do SL RNA pela RNA polimerase II (DOSSIN; SCHENKMAN, 2005; GÜNZL et al., 1997) é regulada por um promotor, identificado em seis kinetoplastídeos (CAMPBELL; STURM; YU, 2000) com as regiões regulatórias descritas em *T. brucei* (GÜNZL et al., 1997). Os genes que codificam para o SL RNA estão presentes em tandem no genoma dos parasitas (NELSON et al., 1983), porém são transcritos individualmente (KOOTER; DE LANGE; BORST, 1984) e sofrem modificações co-transcricionalmente na extremidade 5' (MAIR; ULLU; TSCHUDI, 2000), como ligação 5'-5' trifosfato da 7-metilguanossina ao primeiro nucleotídeo do SL RNA (GÜNZL et al., 1997) (*7G cap*), metilação dos 4 primeiros nucleotídeos (2'-O-ribose metilados) e das bases dos nucleotídeos 1 e 4, gerando a estrutura chamada de *cap 4*: $m^7G(5')ppp(5')m^2_6AmpAmpCmpm^3Ump$ (BANGS et al., 1992; FREISTADT; CROSS; ROBERTSON, 1988). Além disso, o SL RNA é pseudouridilado na posição -12 (LIANG; XU; MICHAELI, 2002) e a cauda poli(A), residual do término da transcrição, é clivada gerando o SL RNA maduro para o *trans splicing* (STURM; YU; CAMPBELL, 1999).

Em eucariotos, a RNA polimerase I transcreve os RNA ribossomais (RNAr), mas em *T. brucei*, ela também transcreve duas famílias de genes codificadores de proteínas, as glicoproteínas variantes de superfície (*variant surface glycoproteins* - VSG) e as prociclinas (LEE; VAN DER PLOEG, 1997; ZOMERDIJK et al., 1991). Como o processamento do pré-RNAm não é um evento co-transcricional dependente da RNA polimerase II em tripanossomatídeos, os RNA transcritos por outras RNA polimerases também são processados por *trans splicing* (STEWART et al., 2010).

A RNA polimerase III de tripanossomatídeos transcreve os RNAt, 5s RNAr, 7SL RNA e, diferentemente dos outros eucariotos, todos os snRNA (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; TSCHUDI; ULLUT, 2002). Na maioria dos eucariotos, a RNA polimerase III transcreve somente o U6 snRNA, além dos outros RNA listados. Os snRNAs U1, U2 e U4 snRNAs possuem o m⁷G *cap* trimetilado (2,7,7 trimetilguanossina – TMG), chamado de m³G *cap* (DJIKENG et al., 2001; MOTTRAM et al., 1989) e o U6 snRNA possui o γ -monometil fosfato *cap* (MOTTRAM et al., 1989), como observados em outros eucariotos. A exceção é o U5 snRNA de tripanossomatídeos que não possui m³G *cap* (DUNGAN; WATKINS; AGABIAN, 1996; XU; BEN-SHLOMO; MICHAELI, 1997). Não se sabe ainda como é adicionado o *cap* aos snRNA de tripanossomatídeos, já que o m⁷*cap* é adicionado co-transcionalmente pela RNA polimerase II em outros eucariotos (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003).

1.3 MECANISMO DE *SPLICING*

O processamento por *trans splicing* apresenta algumas similaridades ao *cis splicing*. Como o *cis splicing* está mais elucidado, este será primeiramente descrito baseado nas revisões de Wahl, Will e Lührmann (2009) e de Will e Lührmann (2011). Posteriormente, serão apresentadas as peculiaridades do *trans splicing* em tripanossomatídeos.

1.3.1 *Cis Splicing*

Muitas funções biológicas na célula são realizadas por ribonucleoproteínas (RNP), complexos formados por proteínas e RNAs, como a regulação da expressão gênica, o processamento do pré-RNAm e a tradução. No *splicing*, os pequenos complexos ribonucleoproteicos nucleares ricos em uridina (U snRNPs) formam o spliceossomo, que são responsáveis pelo processamento do pré-RNAm. Os componentes dos snRNPs só apresentam

atividade catalítica quando ocorre interação entre as proteínas e os RNAs do complexo, além disso, os complexos isoladamente não possuem sítios ativos, estes são remodelados durante o *splicing* e ativados. A conformação e a composição do spliceossomo são dinâmicas, conferindo acurácia e flexibilidade ao processo.

As U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs são compostas por um snRNA e diversas proteínas específicas. Os complexos U1, U2, U4 e U5 snRNPs possuem 7 proteínas Sm em comum, chamadas Sm B/B', D1, D2, D3, E, F e G, que interagem umas com as outras pelos domínios Sm1 e Sm2, formando um anel heteromérico ao redor do sítio Sm conservado, região em simples fita rica em uridina, dos snRNAs. O complexo U6 RNP possui sete proteínas Sm-like, LSm2 a LSm8, ligadas ao U6 snRNA (FISCHER; ENGLBRECHT; CHARI, 2011; WILL; LÜHRMANN, 2001).

O processamento do pré-RNA por *cis splicing* começa com a formação do complexo E de *splicing*, este complexo é responsável pelo reconhecimento dos sítios de *splicing* 5' e 3' e do sítio de ramificação. Inicialmente, o complexo U1 snRNP reconhece o sítio de *splicing* 5' (5'SS). A extremidade 5' do U1 snRNA pareia com o sítio de *splicing* 5' e as proteínas U1-70K, U1-C e proteínas da família SR (proteínas ricas em serina e arginina) estabilizam esta interação. Posteriormente, a proteína SF1/BBP se liga ao sítio de ramificação e as subunidades de 65 kDa e 35 kDa do fator associado a U2 (U2AF) ligam ao trato de polipirimidina e ao sítio de *splicing* 3' (3'SS), respectivamente. A subunidade U2AF65 interage tanto com SF1/BBP quanto com U2AF35.

Os sítios de *splicing* e o trato de pirimidina são altamente conservados em leveduras e complementares às sequências do U1 e U2 snRNA. Em metazoários, estas sequências são degeneradas (Figura 1.2) e outras proteínas participam como fatores regulatórios do *splicing*, facilitando ou dificultando o reconhecimento destes sítios.

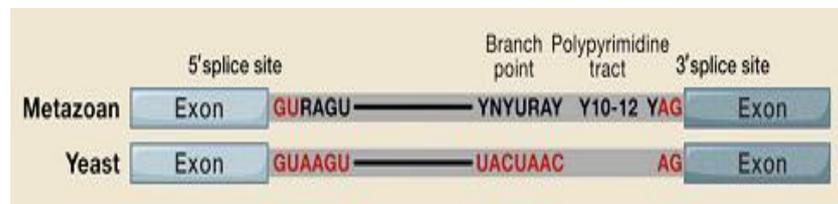


Figura 1.2 - Sequências conservadas no pré-RNA de metazoários e de leveduras. Os exons estão separados pelo intron. No intron está representado a sequência consenso do sítio de *splicing* 5', sítio de ramificação, trato de polipirimidina e sítio de *splicing* 3'. N, R e Y representam qualquer nucleotídeo, purinas e pirimidinas, respectivamente. Fonte: Wahl; Will; Lührmann (2009).

Depois do reconhecimento dos sítios de *splicing*, o complexo A é formado quando ocorre o pareamento do U2 snRNA com o sítio de ramificação do pré-RNA e exposição da adenosina, necessária para a primeira reação de transesterificação do processamento. Esta interação é dependente de ATP e é estabilizada por outras proteínas do complexo U2 snRNP, como SF3a, SF3b, e pelo domínio rico em arginina e serina de U2AF65. O recrutamento de U2 snRNP substitui a proteína SF1/BBP do sítio de ramificação pelo complexo SF3b14a/p14 e a subunidade U2AF65 passa a interagir com SF3b155, presente na U2 snRNP (Figura 1.3).

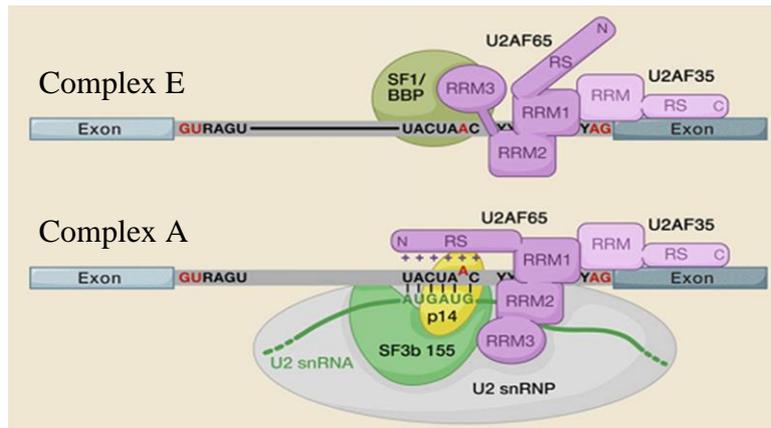


Figura 1.3 - Interação molecular no sítio de ramificação e no sítio de *splicing* 3'. No complexo E, as proteínas SF1/BBP e as duas subunidades do fator auxiliar a U2 (U2AF65 e U2AF35) estão ligadas ao sítio de ramificação, trato de polipirimidina e ao sítio de *splicing* 3', respectivamente. No complexo A, SF1/BBP é deslocada para o U2 snRNP interagir com o pré-RNA. Neste complexo a adenosina (A em vermelho) do sítio de ramificação é exposta.
Fonte: Adaptado de Wahl; Will; Lührmann (2009).

Duas características do início do processamento do pré-RNA regulam o *splicing*. Uma delas corresponde às várias etapas de reconhecimento dos sítios do pré-RNA pelas proteínas ou pelo snRNA, garantindo a precisão do processamento. A outra corresponde às fracas interações binárias entre as moléculas que agem em sinergismo para definir o local que será processado.

Posteriormente, U4/U6.U5 tri-snRNP se liga ao complexo A, formando o complexo B, ainda inativo. Neste complexo o U5 snRNA interage com os nucleotídeos dos exons adjacentes e o U6 snRNA pareia com o U2 snRNA. O sítio ativo de U6 snRNA está inativado, pois está pareado com o U4 snRNA, impedindo que o pré-RNA seja cortado prematuramente. Para o complexo ser ativado, complexo B*, o U1 snRNA é deslocado do sítio de *splicing* 5', a interação entre U4/U6 snRNA é rompida, o U6 snRNA interage com os nucleotídeos do sítio de *splicing* 5' e o spliceossomo altera a conformação. Consequentemente, as U1 e U4 snRNPs, as proteínas associadas aos complexos e as proteínas que mantinham a U5 snRNP ligada ao

U4/U6.U5 tri-snRNP são liberadas do spliceossomo, possibilitando a primeira reação de transesterificação. O grupo 2'OH da adenina exposta do sítio de ramificação realiza um ataque nucleofílico no sítio de *splicing* 5', resultando na clivagem deste sítio e ligação da extremidade 5' do intron à adenosina formando uma estrutura em laço (Figura 1.4).

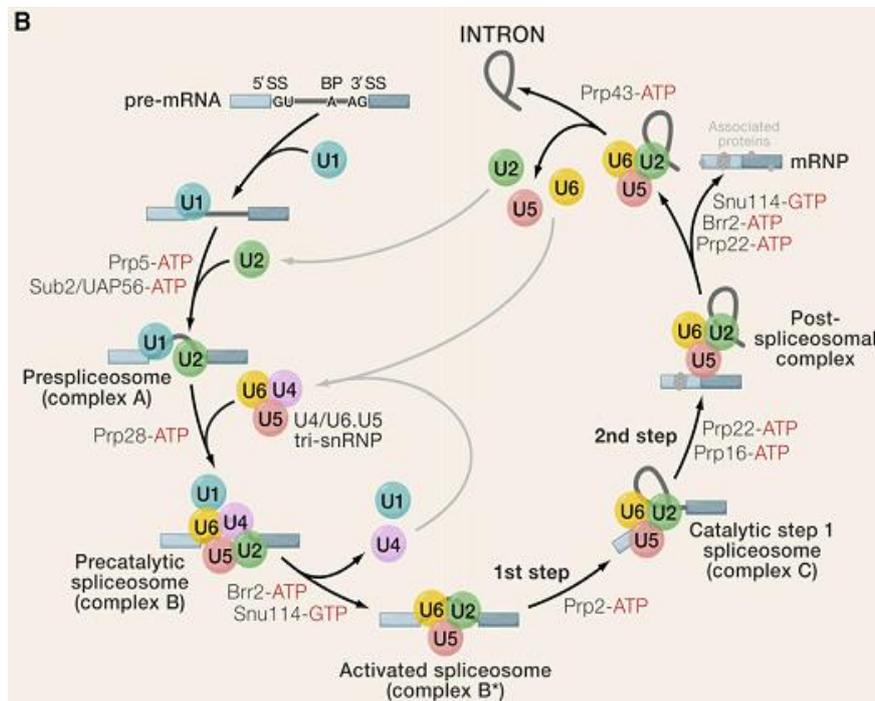


Figura 1.4 - Processamento do pré-RNm por *cis* splicing. Interação dos complexos snRNP com o pré-RNm e remodelagem do spliceossomo durante o *cis* splicing. As helicases responsáveis pelo remodelamento estão indicadas nas setas. Fonte: Wahl; Will; Lührmann (2009)..

Após a primeira reação catalítica, o spliceossomo é chamado de complexo C. Neste ponto, o intron está na forma de um laço e o exon 5' está com a extremidade 3' livre. Em seguida, ocorre outra alteração conformacional no spliceossomo possibilitando a segunda reação de transesterificação, assim o 3'OH do exon 5' ataca o sítio de *splicing* 3', juntando os exons e liberando o intron na forma de um laço. Finalizado o processo, o spliceossomo é dissociado, liberando o RNAm e as U2, U5 e U6 snRNPs, que podem ser reutilizadas no processamento de outros pré-RNm.

Além dos complexos snRNPs, outras proteínas participam do processamento do pré-RNm. O spliceossomo de células humanas contém aproximadamente 45 proteínas nos complexos snRNPs e cerca de 170 proteínas associadas aos diferentes complexos snRNPs.

Durante as etapas de montagem e ativação do *splicing* (complexos E, A, B, B* e C), alguns complexos snRNPs e algumas proteínas associadas aos complexos são substituídos por

outros, devido à dinâmica do mecanismo e às mudanças conformacionais das RNPs. As proteínas helicases/ATPases DExD/H box RNA dependente são responsáveis por remodelamentos específicos na rede de interação do spliceossomo, utilizando a energia liberada da hidrólise do ATP (Figura 1.4). Ao romper as interações, as proteínas DExD/H box permitem que o RNA interaja com outro ou se ligue a uma proteína (BROW, 2002; STALEY; GUTHRIE, 1998).

No início do processamento, as helicases Sub2/UAP56 e Prp5 são necessárias para formar o complexo A. Enquanto Sub2 favorece a troca de SF1 pela U2 snRNP no sítio de ramificação, Prp5 hidrolisa o ATP para remodelar U2 snRNP e favorecer esta interação. Posteriormente, para formar o complexo B ativo, B*, outras proteínas atuam, a Prp28 transfere o sítio de *splicing* 5' do U1 snRNA para o U6 snRNA, iniciando a ativação do spliceossomo, a Brr2 separa os U4/U6 snRNA e permite que U6 snRNA anele com U2 snRNA, estas etapas são reguladas pela Prp8, para que o pré-RNAm seja corretamente clivado, e pela Snu114 GTPase, que na presença de GTP promove a atividade helicase da Brr2. A enzima Sub2 também tem atividade helicase para separar o U4/U6 snRNA (SHEN et al., 2008). A helicase Prp2 controla a alteração conformacional entre o complexo B* e o complexo C, quando ocorre a primeira reação catalítica do pré-RNAm. Para que ocorra a segunda reação de transesterificação, o remodelamento do spliceossomo é realizado pelas proteínas Prp16, Prp18, Slu7, Prp22. As proteínas Prp16 e Prp22 também controlam a fidelidade do processamento e Prp22 libera o RNAm do spliceossomo. Finalizando o processamento, Brr2 e Snu14 facilitam a separação do complexo U2/U6 e Prp43 desmonta o spliceossomo.

1.3.2 *Trans splicing*

Como citado anteriormente, o RNAm dos tripanossomatídeos são processados por *trans splicing* (AGABIAN, 1990), processamento que ocorre entre duas moléculas de RNA precursoras transcritas a partir de regiões genômicas diferentes. Um destes RNA é o *splice leader* RNA (SL RNA) e, por isto, o processamento também é chamado de *spliced leader (SL) trans-splicing* (HASTINGS, 2005). Este mecanismo de processamento também foi descrito em outros organismos, como nematódeos (KRAUSE; HIRSH, 1987), euglenóides (TESSIER et al., 1991), trematodos (RAJKOVIC et al., 1990) e cordados (VANDENBERGHE; MEEDEL; HASTINGS, 2001).

Nos tripanossomatídeos, o SL RNA é composto pela sequência SL adjacente a um intron de tamanho variável. O SL contém 39 a 41 nucleotídeos conservados e o *cap* 4 na extremidade 5'. Na primeira reação catalítica do processamento, o sítio de ramificação ataca o sítio de *splicing* 5', deixando o SL com um 3'OH livre. O SL reage com o sítio aceptor AG do pré-RNA, que está localizado após o trato de pirimidina (LIANG et al., 2003; SIEGEL; TAN; CROSS, 2005), liberando uma estrutura em Y (MURPHY; WATKINS; AGABIAN, 1986) em vez do laço observado no *cis splicing* (Figura 1.5). O trato de pirimidina, além de indicar o sítio de *splicing* 3', também orienta a poliadenilação do pré-RNA a montante, quase simultaneamente ao *trans splicing* separa o pré-RNA policistrônico em unidades monocistrônicas funcionais (AGABIAN, 1990; LEBOWITZ et al., 1993; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994; ULLU; MATTHEWS; TSCHUDI, 1993).

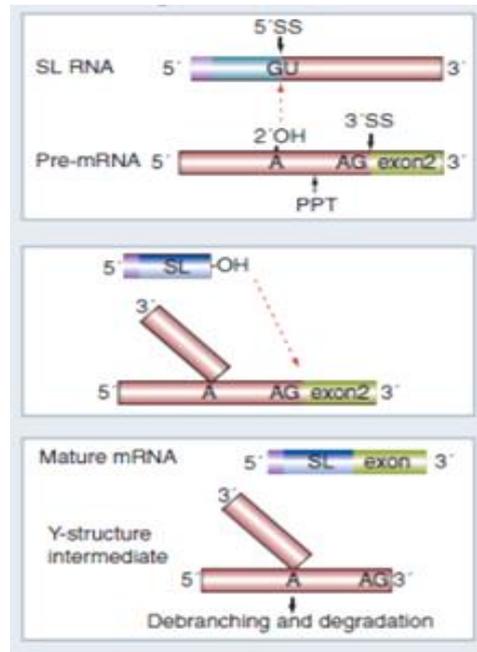


Figura 1.5 - Representação esquemática do *trans splicing*. No *trans splicing*, o sítio de *splicing* 5' (5'SS) está presente no SL RNA e o sítio de *splicing* 3' (3'SS) está no pré-RNA. A adenosina do sítio de ramificação (A) ataca o sítio de *splicing* 5', que posteriormente ataca o sítio de *splicing* 3', liberando a estrutura em Y. PPT: trato de pirimidina.
Fonte: Michaeli (2011).

Analisando sequências de cDNA de *T. brucei*, foram identificadas ORFs separadas por longas regiões intergênicas e tratos de polipirimidina não associados a regiões codificantes a jusante. Nestes casos, o primeiro trato de polipirimidina [(1) na Figura 1.6] determina o local da poliadenilação da ORF a montante (ORF1) e, após o processamento da segunda ORF

(ORF2) utilizando o segundo trato de polipirimidina [(2) na Figura 1.6], a longa região intergênica gera um RNA não codificante (BENZ et al., 2005).



Figura 1.6 - Trato de pirimidina não associado à região codificante à montante. O trato de pirimidina (1) determina o local da poliadenilação da ORF1. O trato de pirimidina (2) indica o local do *trans splicing* da ORF2, porém não determina a poliadenilação de nenhum gene a montante, liberando um RNA não codificante.

Fonte: Benz et al. (2005).

Também foi evidenciado experimentalmente que um RNA policistrônico pode ser parcialmente processado gerando um RNA intermediário, ou seja, um dicistron contendo SL na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3' ou um transcrito com o SL na extremidade 5' porém com a região 3' UTR não processada. Sugere-se que o processamento parcial do pré-RNA pode ser um mecanismo de regulação da expressão gênica, que mantém os RNAs estocados na célula para serem processados em monocistrônicos funcionais quando forem necessários (JAGER et al., 2007).

Também foi detectado baixo nível de RNA dicistron de tubulina no citoplasma, sugerindo que RNAm não processados completamente por *trans splicing* podem estar presentes no parasita naturalmente. Porém, neste trabalho, sugere-se que um mecanismo de controle reconhece e degrada os RNA parcialmente processados por *trans splicing*, pois dicistron de tubulina decaem mais rapidamente que o RNAm maduro de tubulina (KRAMER et al., 2012).

Os trabalhos de transcrito de *T. brucei* estão mostrando outras características do processamento do pré-RNA que não foram descritas anteriormente. O transcrito de *T. brucei rhodesiense*, forma procíclica, mostra que: o tamanho médio da 5'UTR e 3'UTR de *T. brucei* é de 130 e 388 nucleotídeos, respectivamente. Dos 8592 genes analisados para o processamento na extremidade 5', somente 11 % dos transcritos analisados possuem um único sítio de *splicing* 3', 62% tem entre 2 e 4 sítios e 27% tem mais de 4 sítios de adição do SL. Apesar desta heterogeneidade, o dinucleotídeo AG não precedido de um resíduo de guanina (G), após o sítio de pirimidina, define o sítio de *splicing* 3'; o trato de pirimidina tem o comprimento médio de 18 nucleotídeos, variando entre 7 e 79 nucleotídeos com prevalência dos resíduos de timina e está localizado cerca de 43 nucleotídeos a montante do sítio de *splicing* 3', mas pode estar até 200 nucleotídeos a montante; a média entre o sítio de *trans splicing* 3' e

o sítio de poliadenilação à montante é de 142 nucleotídeos, sendo que em 50 % dos casos varia entre 123 e 178 nucleotídeos (KOLEV et al., 2010).

O transcrito de *T. brucei* Lister 427, cepa comumente manipulada nos laboratórios, também foi analisado. Os RNA identificados correspondem a aproximadamente 90% do genoma e a análise possibilitou identificar os sítios aceptores de *splicing* (SAS) e os sítios de poliadenilação (PAS) de muitos genes. Em relação aos SAS, foram identificados em 6959 genes, sendo que 4220 (63,51%) possuem mais de um SAS e a média é de 1,6 SAS por gene. A maioria dos genes possui de 1 a 3 SAS alternativos. Baseado nos SAS predominante, quando foi identificado mais de um SAS no gene, definiram que o tamanho médio da 5'UTR é de 184 pb (mediana 89 pb) e que 80% das 5' UTR são menores do que 248 bp. Os PAS foram identificados em 5948 genes e 3979 (66,89%) genes possuem mais de um PAS. Os genes podem ter aproximadamente 10 PAS, indicando a promiscuidade da poliadenilação. O tamanho médio da 3' UTR predominante é de 604 pb (mediana 400 pb) (SIEGEL et al., 2010).

Mais recentemente, o transcrito de *Leishmania major* (clone V1,MHOM/IL/80/Friedlin) também foi analisado. O tamanho médio da sequência codificante dos genes é de 1241 nucleotídeos, variando de 69 a 52178 nucleotídeos. O tamanho médio da 5'UTR (sem a sequência SL) é de 547 bases, enquanto da 3'UTR é de 729 bases. De acordo com o valor médio das estruturas do gene, um gene tem 2517 nucleotídeos. Sendo a 5'UTR, a região codificante e a 3' UTR correspondentes a 22, 49 e 29% do tamanho do gene, respectivamente. A região intergênica tem o tamanho médio de 643 nucleotídeos e contém o trato de pirimidina com 21 nucleotídeos em média, variando entre 7 e 123 nucleotídeos. A distância média entre o trato de pirimidina e o sítio de adição do SL a jusante é 64 nucleotídeos, enquanto que a distância do sítio de poliadenilação a montante é de 558 nucleotídeos. Sítios aceptores de *splicing* (SAS) alternativos foram identificados em 98% dos 8981 gene e sítios de poliadenilação (PAS) alternativos foram identificados em aproximadamente 95% dos 8841 genes poliadenilados, indicando que o RNAm de *L. major* é processado de forma mais heterogênea do que o RNAm de outros tripanossomas (DILLON et al., 2015).

Os dados dos transcritos de *T. brucei* indicam que há SAS anterior ou posterior ao códon do início da tradução atribuído durante a anotação do genoma, portanto estas ORF devem ser revisadas (KOLEV et al., 2010; SIEGEL et al., 2010). Também foram identificados SAS após o códon de início da tradução predito que podem gerar ORF com a mesma fase de leitura dentro da ORF predita ou ORF com outra fase de leitura, indicando que o mesmo gene pode produzir mais de uma proteína (SIEGEL et al., 2010).

Os transcriptomas de *T. brucei* também indicam a heterogeneidade dos sítios de processamento por *trans splicing* e quatro *splicing* alternativos foram descritos (Figura 1.7): *splicing* após o códon de início de tradução (AUG), inibindo a tradução; inclusão ou exclusão de sinais de direcionamento; inclusão ou exclusão de elementos regulatórios; e o uso de sequências de leituras (ORFs) alternativas. Como o *trans splicing* é necessário para gerar os RNAm, questiona-se se o *trans splicing* alternativo seria outro mecanismo de regulação pós transcricional em tripanossomatídeos, contribuindo com a diversidade de RNAm e com a capacidade codificante do genoma (PREUßER; JAÉ; BINDEREIF, 2012).

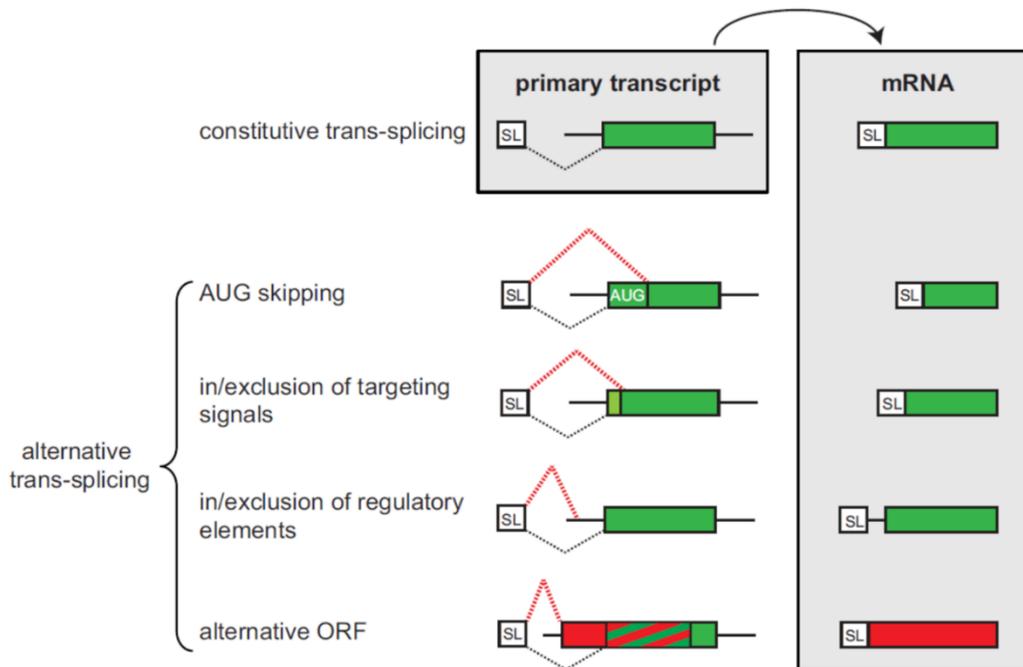


Figura 1.7 - *Trans splicing* alternativo em tripanossomatídeos. Quatro *trans splicing* alternativos do pré-RNAm que podem gerar diferentes RNAm. Exons codificantes de proteínas e o SL derivado do SL RNA estão representados por quadrados/retângulos. Regiões intergênicas estão representadas por linhas sólidas pretas. *Trans splicing* alternativos estão representados por linhas pontilhadas vermelhas e pretas.

Fonte: Preußer; Jaé; Bindereif (2012).

O processamento por *trans splicing* é semelhante ao *cis splicing*, sendo a diferença mais evidente a participação da SL RNP no primeiro mecanismo e da U1 RNP no segundo. As RNP que participam do *trans splicing* também contêm as sete proteínas Sm ligadas aos snRNA e apresentam as mesmas interações para formar o anel, como descrito para células de mamíferos e leveduras (PALFI et al., 1991, 2000). As proteínas LSm 2 a 8 que ligam ao U6 snRNA também foram identificadas nos tripanossomatídeos (TKACZ et al., 2008). Apesar das proteínas Sm serem conservadas e estarem presentes nos complexos snRNP de

tripanossomatídeos, o U2 e U4 snRNP possuem algumas proteínas Sm substituídas pelas proteínas SSm (*specific spliceosomal Sm*) (TKACZ et al., 2007; WANG et al., 2006).

Wang et al. (2006) identificaram duas proteínas que substituem o dímero SmB/SmD3 de U2 snRNP e as chamaram de Sm15k e Sm16.5k, respectivamente. Estas proteínas conferem especificidade para que as proteínas Sm do complexo U2 snRNP reconheçam especificamente o sítio Sm do U2 snRNA (AACUGUUG), sendo que a purina (G), que não está presente na sequência consenso rica em pirimidina (PuAU₄₋₆GPu), é responsável por esta especificidade. Por experimentos de imunoprecipitação e RNAi das proteínas Sm, Tkacz et al. (2007) observaram que além do complexo U2 snRNP não interagir com as sete proteínas Sm canônicas, U4 snRNP também apresenta modificações. Neste trabalho, as proteínas que substituem SmB e SmD3 da U2 RNP e a SmD3 da U4 RNP foram chamadas de SSm2-1, SSm2-2 e SSm4, respectivamente. As proteínas SSm2-1 e SSm2-2 são as proteínas Sm15k e Sm16.5K descritas por Wang et al. (2006). Posteriormente, a proteína SSm4 foi caracterizada bioquimicamente como componente exclusivo da U4 snRNP substituindo a SmD3 e como uma proteína importante para a viabilidade celular e para o processamento do pré-RNA, pois o silenciamento de SSm4 inibe o crescimento dos parasitas, altera o processamento por *cis* e *trans splicing* e desestabiliza o U4 snRNA e U4/U6 di-snRNP (JAE et al., 2010).

Sugere-se que as proteínas Sm específicas da U2 snRNP direcionam o complexo para o sítio de ramificação independentemente do pareamento de bases com o pré-RNA e que fatores adicionais devem recrutar U2 RNP para a maquinaria de *splicing* (GUNZL, 2010; LIANG et al., 2003), pois o U2 snRNA de tripanossomatídeos é menor do que dos outros metazoários e não possui a sequência conservada (GUAGUA) que interage com o sítio de ramificação do pré-RNA como os outros organismos (LIANG et al., 2003). Além disso, em células de mamíferos, o fator proteico U2AF65 interage com U2AF35, fator que liga ao sítio de *splicing* 3', e SF1, proteína que reconhece o sítio de ramificação, para determinar o local do *cis splicing* e recrutar U2 snRNP. U2AF65 de tripanossomatídeos forma um complexo estável com SF1, porém não interage ou a interage fracamente com U2AF35 (VAZQUEZ et al., 2009).

Em um estudo mais amplo, ao imunoprecipitar SmD1, uma proteína que interage com todos snRNA, exceto com U6 snRNA, foram identificadas 47 proteínas dos complexos snRNP, entre elas estão quase todas as proteínas Sm, LSm e as proteínas específicas dos snRNP já identificadas. Devido à alta estringência dos experimentos e análises de bioinformática, acredita-se que as 21 proteínas hipotéticas conservadas identificadas também são fatores de *splicing* em tripanossomatídeos, como validado para as proteínas LSm2, U1A, Prp4, U5-40K e

U5-Cwc21. Esta última proteína não possui homologia com nenhum fator de *splicing* descrito (LUZ AMBROSIO et al., 2009), mas interage com outras proteínas do complexo U5 snRNP de tripanossomatídeos (SILVA et al., 2011).

Apesar de a maioria do pré-RNAm de tripanossomatídeos serem processados por *trans splicing*, foram identificados alguns componentes da U1 snRNP que participam do *cis splicing*, como o U1 snRNA (PALFI, 2005) e algumas proteínas específicas do complexo U1 snRNP, a U1-70K, a U1A, a U1-24K e a U1C (PALFI, 2005; PALFI; LANE; BINDEREIF, 2002; TKACZ et al., 2010). O processamento por *cis splicing* de genes codificadores para proteínas ocorre somente nos pré-RNAm de poli(A) polimerase (PAP) e de uma DEAD/H RNA helicase dependente de ATP putativa de *T. brucei* (KOLEV et al., 2010; MAIR et al., 2000; SIEGEL et al., 2010). O complexo U1 snRNP de tripanossomatídeos deve ter outras funções além do *cis splicing*. Além de ser componente do U1 snRNP e participar do *trans splicing*, a proteína U1A também interage com os fatores de poliadenilação e está envolvida com a poliadenilação do RNAm, indicando associação dos dois mecanismos (TKACZ et al., 2010).

Em relação ao processamento do pré-RNAm em tripanossomatídeos, os estudos estão direcionados para as snRNP, os snRNAs e as sequências do pré-RNAm que orientam o *splicing*. A Figura 1.8 indica as proteínas que participam do processamento por *cis splicing*, destacando as proteínas ortólogas identificadas, bioinformaticamente e/ou empiricamente, em tripanossomatídeos e os fatores exclusivos destes parasitas.

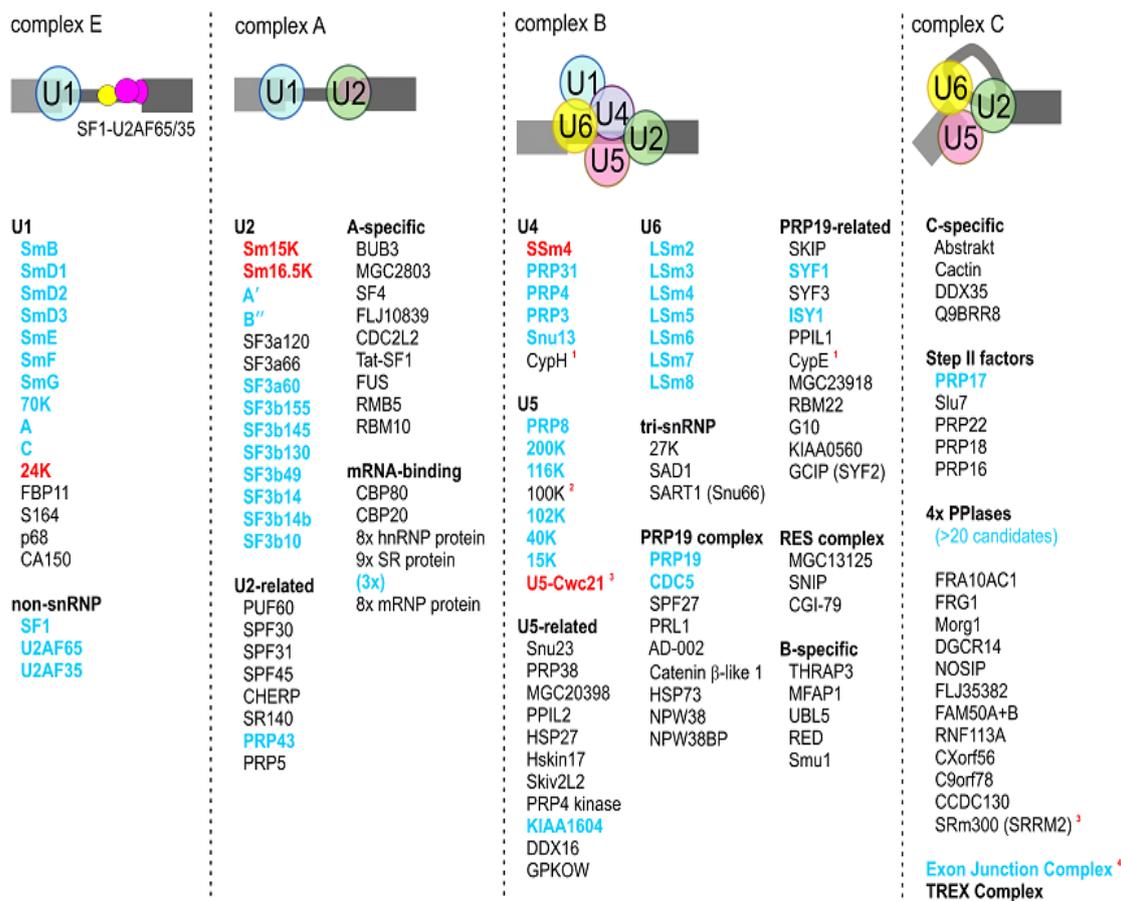


Figura 1.8 - Comparação entre os fatores de *splicing* descritos em humanos e em tripanossomas. Representação esquemática dos complexos snRNP e da composição do spliceossomo durante o *splicing*. Proteínas em azul indicam que os ortólogos já foram identificados em tripanossomas e proteínas em vermelho representam os fatores de *splicing* específicos de tripanossomas.

Fonte: Gunzl, 2010.

Até agora, poucas proteínas que não fazem parte dos complexos snRNP foram descritas em tripanossomatídeos. Entre as RNA helicases, a proteína Prp43, que libera a estrutura em laço do *cis splicing*, também participa do processamento por *cis* e *trans splicing* em tripanossomatídeos. Nestes organismos, o silenciamento de Prp43, além de causar o acúmulo do SL RNA e de pré-RNA e diminuir o RNA, também acumula a estrutura em Y, o oposto do observado para outros fatores de *splicing* caracterizados, sugerindo que Prp43 deve liberar a estrutura em Y do spliceossomo, semelhantemente à função desempenhada no *cis splicing* (LIANG et al., 2006).

Apesar da caracterização dos componentes do spliceossomo de tripanossomatídeos, ainda há pouco conhecimento sobre a dinâmica do spliceossomo dos parasitas. Além disso, a maquinaria do *trans splicing* ainda precisa ser elucidada e ser identificado como a SL RNP

ativa seu sítio de *splicing* 5', quais são as proteínas específicas da SL RNP de tripanossomatídeos, quais fatores medeiam a interação entre o *trans splicing* e a poliadenilação e como estes mecanismos de processamento estão relacionados com a transcrição policistrônica, como o *trans splicing* alternativo é regulado, quais fatores estão envolvidos e qual a função biológica do *trans splicing* alternativo (PREUßER; JAÉ; BINDEREIF, 2012). Além disso, quais proteínas participam do *trans splicing*, mas não pertencem aos complexos U snRNP e como podem contribuir para o processamento do pré-RNAm.

Elucidar as diferenças entre o processamento por *cis* e *trans splicing* e descobrir os mecanismos específicos deste podem levar ao desenvolvimento de drogas que inibam o processamento do pré-RNAm por *trans splicing* e de terapias contra as doenças causadas pelos tripanossomatídeos.

1.4 *SPLICING* E EXPORTAÇÃO DO RNAM

De modo geral, durante a transcrição de RNAs sem introns, presentes tanto em leveduras quanto em metazoários, o complexo THO interage com a maquinaria de transcrição e recruta as proteínas de exportação Sub2/UAP56 e Yra1/Aly (levedura/metazoário), também conhecida como REF em metazoários, formando o complexo TREX (*TR*anscription/*EX*port), que acopla a transcrição com a exportação (AGUILERA, 2005; STRÄßER; HURT, 2001). A ligação do receptor de transporte Mex67/TAP (também chamada de Nxf1 em humanos), na presença do cofator Mtr2/p15 (p15 ou Nxt1 em humanos) (KATAHIRA et al., 1999), com a proteína Yra1/Aly desloca Sub2/UAP56 e induz a saída dos mRNPs do núcleo através do poro nuclear (IGLESIAS; STUTZ, 2008). Na face citoplasmática do complexo do poro nuclear, a RNA helicase DEAD-box Dpb5 tem a atividade ATPase ativada pela Gle1 (WEIRICH et al., 2006) e libera o RNAm no citoplasma da célula para a tradução e os fatores de exportação do RNAm para a reciclagem (IGLESIAS; STUTZ, 2008) (Figura 1.9).

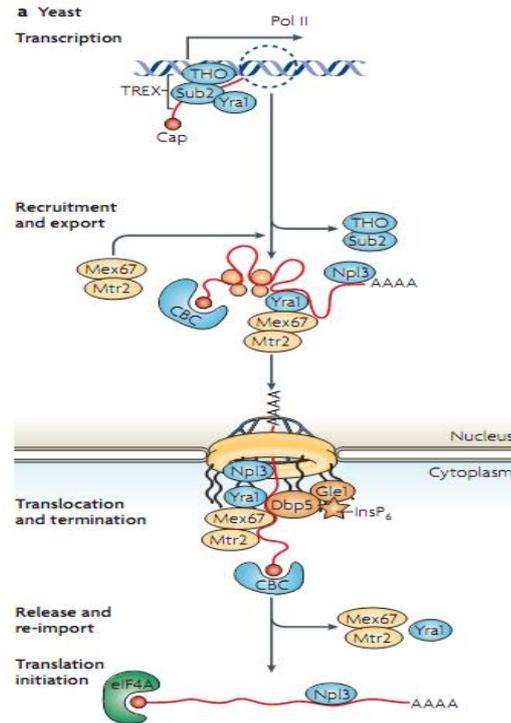


Figura 1.9 - Via de exportação de RNAm do núcleo para o citoplasma em leveduras.
 Fonte: Köhler; Hurt, 2007)

Outras seis proteínas foram identificadas como possíveis componentes do complexo TREX: CIP29, ZC11A, ELG, SKAR/PDIP3, SRAG, ERH. Estas proteínas foram imunoprecipitadas com UAP56 e THOC2 (componente do complexo THO). As proteínas CIP29 (DUFU et al., 2010), ZC11A e PDIP3 (FOLCO et al., 2012) foram caracterizadas funcionalmente e as outras proteínas ainda precisam ser caracterizadas na via de exportação de RNA.

CIP29 é ortóloga a proteína Tho1 de levedura, presente no complexo THO. Em células de mamíferos, CIP29 está presente em domínios chamados speckle, regiões do núcleo onde está a maquinaria de processamento do pré-RNAm e os componentes do complexo TREX. CIP29 é recrutada ao RNA processado, sem intron e com o *cap* na extremidade 5'. Aly e CIP29 interagem simultaneamente com UAP56, dependente de ATP, que interage com o complexo THO, independente de ATP, ou seja, CIP29 e Aly não interagem diretamente entre elas e nem com o complexo THO (DUFU et al., 2010).

As proteínas PDIP3 e ZC11A precisam do ATP para interagir com UAP56 e com o complexo TREX. Estudos funcionais indicam que as proteínas participam da exportação do RNAm, pois a superexpressão de PDIP3 retém o RNAm em speckles nucleares, enquanto que o silenciamento de ZC11A acumula o RNAm no nucleoplasma, exceto na região do nucléolo.

Esta distribuição sugere que ZC11A participa da exportação de RNAm de forma diferente dos outros fatores de exportação que acumulam o RNAm nos speckles nucleares, como UAP56 e Aly (FOLCO et al., 2012).

Recentemente, em humanos, a proteína FOP, também chamada de Chtop/C1orf77/Srag, foi identificada como novo componente do complexo TREX. A proteína é codificada em duas isoformas e a isoforma maior é modificada por metilação (CHANG et al., 2013; VAN DIJK et al., 2010). A proteína FOP liga e ativa as atividades helicase e ATPase de UAP56 (ortóloga a Sub2 de leveduras) (CHANG et al., 2013), porém a metilação não interfere na interação entre FOP e Sub2 (TENG; WILSON, 2013; VIPHAKONE et al., 2012). A metilação é necessária para ligação de FOP com o domínio NTF2-like de NXF1 (ortóloga de Mex67 de leveduras) (CHANG et al., 2013).

Nos organismos que possuem genes interrompidos por introns, o *cis splicing* do pré-RNAm é acoplado com a exportação do RNAm e muitas proteínas associadas aos complexos snRNPs também têm função em outros mecanismos da célula, como a transcrição, processamento da extremidade 3' e controle de qualidade do *splicing* (HOCINE; SINGER; GRUNWALD, 2010; KÖHLER; HURT, 2007; REED, 2003). Inicialmente, foi proposto que a maquinaria de *splicing* e exportação do RNAm estavam integrados pelo complexo de junção dos exons [*exon junction complex* (EJC)] (Figura 1.10). Algumas proteínas de transporte, como UAP56, Aly e Tap/p15, interagem com o EJC localizado 20 a 24 nucleotídeos a montante da ligação de dois exons do RNAm, independente da sequência nucleotídica (LE HIR et al., 2000, 2001; REICHERT, 2002). A proteína UAP56, que também participa do *splicing* do pré-RNAm, interage com a proteína Aly, proteína adaptadora de ligação ao RNA da via de exportação do RNAm, acoplando estes dois mecanismos (LUO et al., 2001; STRÄßER; HURT, 2001). O recrutamento de Aly é dependente do *cis splicing* do pré-RNAm e pode ser considerado um mecanismo de controle para evitar a exportação de RNAs mutantes ou inapropriados para o citoplasma (REED; HURT, 2002).

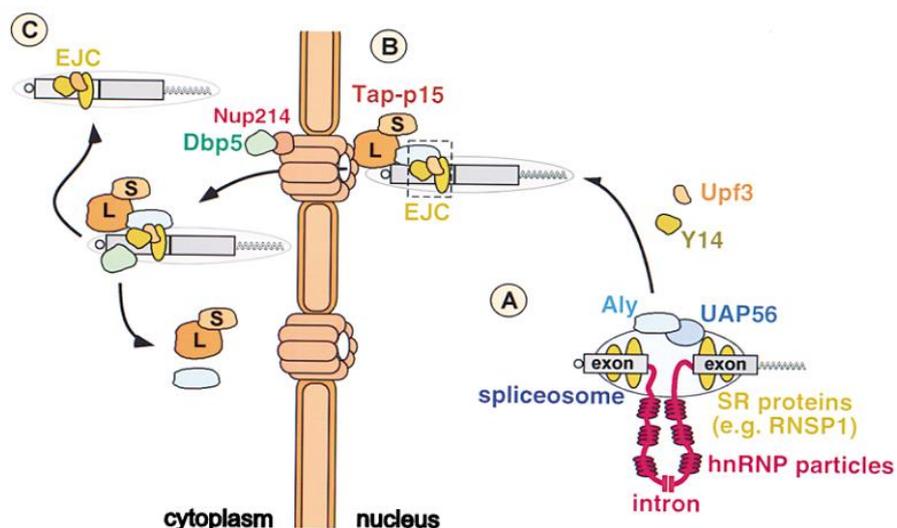


Figura 1.10 - Modelo de exportação do RNAm dependente do EJC. (A) UAP56 e Aly associam ao spliceossomo que contém o pré-RNAm. (B) Aly interage com o EJC e com heterodímero Tap-p15 para direcionar o complexo RNAm para o poro nuclear. (C) No citoplasma, os fatores de exportação do RNAm se dissociam do EJC e do RNAm.
 Fonte: Reed; Hurt, 2002.

Posteriormente, foi observado que o complexo TREX não interage com o pré-RNAm, mas interage especificamente com o RNAm que sofreu *cis splicing* (MASUDA et al., 2005). Além disso, as proteínas Aly e Tho2, do complexo TREX, estão presentes somente no primeiro exon do RNAm e de modo independente do EJC. Estas proteínas interagem com RNAm na mesma região que a proteína CBP80, presente no complexo de ligação ao *cap* (CBC) com a proteína CBP20 (CHENG et al., 2006). O mesmo estudo, afirma que o complexo TREX é recrutado para o RNAm dependente do *cis splicing* e do processamento da extremidade 5', com a adição do *cap*, sendo que a interação entre o TREX com CBC é mediada pelas proteínas Aly e CBP80, respectivamente. Tanto o mecanismo de *splicing* (LUO; REED, 1999) quanto o *cap* (CHENG et al., 2006) são necessários para a exportação do RNAm, indicando que a ligação do complexo TREX ao RNAm está relacionada com o mecanismo de *splicing* e não com a transcrição, como ocorre em leveduras (CHENG et al., 2006; MASUDA et al., 2005).

Cheng et al., (2006) propõem novos modelos, não mutuamente exclusivos, de interação entre a maquinaria de exportação do RNAm, a maquinaria de *cis splicing* e o *cap* (Figura 1.11).

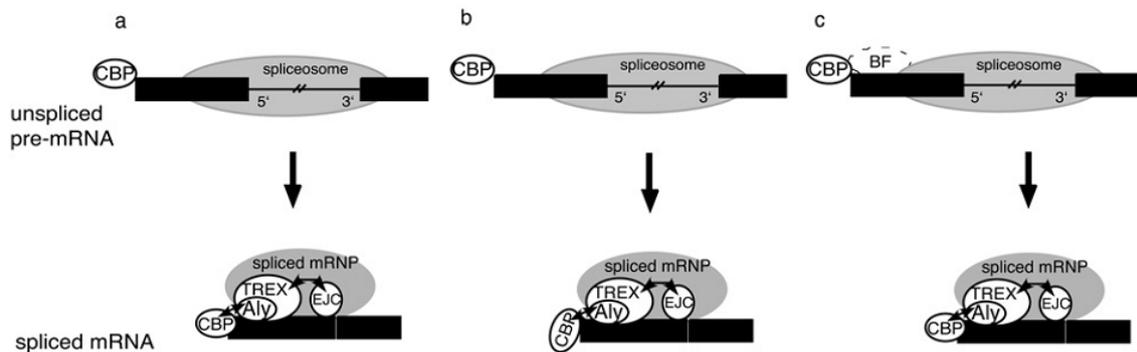


Figura 1.11 - Modelos de recrutamento do complexo TREX dependente do *cap* e do *splicing*. Os modelos estão descritos no texto.
 Fonte: Cheng et al., 2006.

Considerando que a interação do complexo TREX com o RNAm processado é mediada pelo complexo de ligação ao *cap* (CBP), o spliceossomo é importante para recrutar o EJC, que estabiliza o complexo TREX no RNAm (Figura 1.11, A), e aumenta a eficiência da exportação (LE HIR et al., 2001). Alternativamente, o spliceossomo pode causar algumas modificações, como a alterações conformacionais, que favorecem a interação entre a proteína CBP80 e o TREX, mediado pela proteína Aly (Figura 1.11, B). Outra possibilidade é um fator de bloqueio (BF) impedir o recrutamento de TREX ao pré-RNAm até ocorrer um rearranjo durante o *splicing* e eliminá-lo (Figura 1.11, C).

O processamento da extremidade 3' [clivagem e adição da cauda poli(A)] e a via de exportação do RNA também são interdependentes, pois deleção das sequências que indicam o local do processamento da extremidade 3' do RNA produz transcritos que ficam retidos no núcleo (HAMMELL et al., 2002). Mutações em proteínas da via de exportação do RNA [THO, Sub2 (SAGUEZ et al., 2008), Xpo1, Mex67 e Kap104 (HAMMELL et al., 2002)] afetam o processamento da extremidade 3' do pré-RNAm, finalizando a transcrição de forma prematura e inibindo a poliadenilação. A interação entre as subunidades do complexo THO (SAGUEZ et al., 2008), a exportina Xpo1 (HAMMELL et al., 2002) e Aly/Yra1 (JOHNSON; CUBBERLEY; BENTLEY, 2009) com alguns fatores do processamento da extremidade 3' foram descritos.

Aly/Yra1 interage com Pcf11, subunidade do fator de clivagem e poliadenilação CF1A da RNA polimerase II, em leveduras e humanos (JOHNSON; CUBBERLEY; BENTLEY, 2009) (Figura 1.12). CF1A é recrutado ao RNA nascente progressivamente, com altos níveis na região de poliadenilação, e é composto pelos fatores Pcf11, Rna14 e Rna15 e Clp1. Pcf11, presente na RNA polimerase II, interage diretamente com Yra1 durante o processamento da extremidade 3' do RNA, independentemente de Sub2.

genômica comparativa a conservação das proteínas das vias de exportação dos diferentes RNA, a via dependente de RanGTP exporta RNAt, RNAr, RNAmi e a via independente de Ran-GTP está relacionada com a exportação de RNAm. As proteínas da via Ran-GTP dependentes são mais conservadas entre os diferentes eucariotos analisados do que as proteínas da via Ran-GTP independente. Entre estas proteínas altamente conservadas da via de exportação de RNAm, está a proteína UAP56/Sub2, presente no complexo TREX (SERPELONI et al., 2011a).

Resultados anteriores mostram que Sub2 é essencial para a exportação do RNAm em tripanossomatídeos. A proteína Sub2 de *T. cruzi* possui estrutura tridimensional similar à proteína ortóloga humana (UAP56), está localizada em borda de cromatina densa e colocaliza com sítios ativos de transcrição da RNA polimerase II, indicando que a proteína Sub2 estaria localizada nos locais de transcrição/processamento do RNAm. Além disso, o silenciamento de Sub2 em *T. brucei* causou o acúmulo de RNAm no núcleo e diminuiu a taxa de tradução das células, sugerindo que Sub2 é um componente da via de exportação de RNAm em tripanossomas, corroborando com os resultados de genômica comparativa (SERPELONI et al., 2011b).

A proteína ortóloga de mamíferos, UAP56, participa da via de exportação de RNA, juntamente com as outras proteínas do complexo TREX e do EJC, entregando o RNAm para o receptor de transporte Mex67 (IGLESIAS; STUTZ, 2008; LE HIR et al., 2000, 2001; REICHERT, 2002). A proteína UAP56 também participa do *cis splicing*, recrutamento U2 snRNP para o pré-RNAm e com atividade helicase para separar o complexo U4/U6 RNP (SHEN, 2009; SHEN et al., 2008).

Como a maquinaria de processamento do pré-RNAm está interligada com a via de exportação do RNAm do núcleo para o citoplasma em mamíferos, verificamos se Sub2 também interferia no processamento o pré-RNAm por *trans splicing* em tripanossomatídeos. Observamos que o silenciamento de Sub2 em *T. brucei* aumenta na quantidade do SL RNA e diminui a estrutura em Y, fenótipo característico da inibição das primeiras etapas do *trans splicing*. Além disso, a proteína não está relacionada com o processo de formação do *cap4* do SL RNA, pois o silenciamento de Sub2 não altera o padrão de metilação do SL RNA e este poderia ser utilizado para o processamento do pré-RNAm por *trans splicing* (HIRAIWA, 2012).

Na maioria dos eucariotos, a transcrição pela RNA polimerase II e processamento do pré-RNAm (*caping*, *cis splicing* e poliadenilação) também são interconectados e um processo interfere no outro, ou seja, a transcrição regula o processamento do pré-RNAm e este regula a transcrição (HOCINE; SINGER; GRUNWALD, 2010; LENASI; BARBORIC, 2012). Devido

a esta interconexão entre a transcrição e o *cis splicing* em outros eucariotos, Sub2 também poderia ter relação com a transcrição em tripanossomatídeos e a depleção da proteína poderia diminuir a taxa de transcrição e causar o acúmulo do SL RNA, observado anteriormente (HIRAIWA, 2012).

Os dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, indicam que a proteína Sub2 desempenha funções importantes no metabolismo do RNA. Por isto, o objetivo principal deste trabalho foi identificar a relação de Sub2 com as maquinarias do metabolismo nuclear do RNAm. Para complementar a análise funcional da proteína Sub2, avaliamos se a proteína é essencial para a transcrição de RNA pela RNA polimerase II, se interage com fatores do *trans splicing* e quais proteínas pertencem ao mesmo complexo proteico que Sub2.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação de Sub2 com as diferentes maquinarias do metabolismo nuclear do RNAm

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se Sub2 é essencial para o processo de transcrição de RNA mensageiro
- Investigar a interação de Sub2 com proteínas relacionadas com o *trans splicing* e com outros componentes nucleares

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E CULTIVO

Trypanosoma brucei cepa 427 (CROSS; MANNING, 1973) e linhagem estável de *Trypanosoma brucei* para RNAi de Sub2 (TbSub2-RNAi) (SERPELONI et al., 2011b): formas procíclicas foram mantidas em cultura axênica em meio SDM-79 suplementado com 10% de soro fetal bovino (BRUN; SCHÖNENBERGER, 1979), à 28 °C, com passagens a cada três dias com inóculo de 5 x 10⁵ células/mL. TbSub2-RNAi foi cultivada com 50 µg/ml de higromicina e 15 µg/ml de neomicina para manter o sistema do RNAi.

T. brucei cepa 29-13 (WIRTZ et al., 1999) expressa o repressor da tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de genética reversa por RNAi. Serpeloni et al., (2011b) transfectaram os parasitas com plasmídeo p2T7-177 contendo uma parte da sequência do gene de Sub2 de *T. brucei* e selecionaram clones capazes de induzir o silenciamento de Sub2. Neste trabalho, estes parasitas são chamados de TbSub2-RNAi.

O silenciamento da expressão de Sub2 foi induzido com adição de 2 µg/mL de tetraciclina ao inóculo de 5 x 10⁵ células/mL e, após 24 horas, foi adicionado 1 µg/mL de tetraciclina, mantendo as mesmas condições dos trabalhos anteriores (HIRAIWA, 2012; SERPELONI et al., 2011b). Como controle, foram mantidas culturas nas mesmas condições, porém sem a adição de tetraciclina. Cada experimento foi realizado em triplicada.

Escherichia coli DH5α, *Escherichia coli* BL21(DE)pLysS e *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3): as células foram mantidas em meio LB a 37 °C por 18 horas ou estocadas em mesmo volume de glicerol (1 volume de cultura : 1 volume de glicerol) a -70 °C. *Escherichia coli* BL21(DE)pLysS foi mantida com o 50 µg/mL de cloranfenicol e *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3) com 20 µg/mL de gentamicina.

3.2 MEIOS DE CULTURA

Meio SDM-79	quantidade/L
MEM (Minimum Essential Medium).....	7,0 g
Meio 199.....	2,0 g
MOPS.....	5,0 g
HEPES.....	8,0 g

Glicose.....	1,0 g
NaHCO ₃	2,0 g
Piruvato de Sódio.....	100 mg
L-Alanina.....	200 mg
L-Arginina.....	100 mg
L-Glutamina.....	300 mg
L-Metionina.....	70 mg
L-Fenilalanina.....	80 mg
L-Prolina.....	600 mg
L-Serina.....	60 mg
Taurina.....	160 mg
L-Treonina.....	350 mg
Guanosina.....	10 mg
Glucosamina.....	50 mg
Ácido Fólico.....	4 mg
PABA (ácido Para-aminobenzóico).....	2 mg
Biotina.....	2 mg
Penicilina	2 mg
Solução de aminoácidos MEM 50X.....	8,0 mL
Aminoácidos não essenciais MEM 100X	6,0 mL
Solução de vitamina BME 100X.....	10 mL
Soro bovino fetal.....	100 mL

Meio LB (Luria - Bertani)	quantidade/L
Bacto-triptona.....	10,0 g
NaCl.....	5,00 g
Extrato de levedura.....	5,00 g
(LB-ágar: adição de 1,5% de agar-ágar)	

3.3 PREPARO DE BACTÉRIA CÁLCIO COMPETENTE E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As bactérias competentes foram preparadas segundo o método de cloreto de cálcio descrito em Sambrook e Russel (2001). Assim, uma colônia de bactéria *E. coli* foi inoculada

em 2 mL de meio LB. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1,0 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB (inóculo de 1:100). As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica_{600nm} de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4000 x g por 5 minutos a 4 °C, as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de 100 mM CaCl₂ e 10 mM HEPES. A suspensão foi mantida no gelo durante 30 minutos. Após este período, foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e as células foram suspensas em 2,0 mL (1/50 do volume original) da solução de 100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10% glicerol. As células foram mantidas no gelo por pelo menos duas horas antes da transformação ou mantidas a -80° C por até 6 meses.

Para a transformação bacteriana, as bactérias foram incubadas com uma alíquota dos plasmídeos por 30 minutos no gelo. Após esse período, a mistura foi incubada por 2 minutos a 42 °C e, novamente, no gelo por 2 minutos. Cerca de 1,0 mL de meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram mantidas a 37 °C, sob agitação constante, por uma hora. Diferentes volumes da cultura contendo as bactérias transformadas foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura LB-ágar 1,5% com antibiótico seletivo apropriado, de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas.

3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO

3.4.1 Extração de DNA Genômico de *T. brucei*

O equivalente a 1×10^{10} células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g por 5 minutos a 4 °C. As células foram lavadas em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄.7H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄), centrifugadas novamente e suspensas em tampão TELT (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM EDTA pH 8,0; 2,5M LiCl; 4% Triton X-100). Posteriormente, foi adicionado a solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada e o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto e, após a centrifugação a 12000 x g por 15 minutos, o sedimento foi lavado com etanol 70% e submetido a centrifugação novamente. O DNA foi suspenso em água ultrapura e tratado com 10 µg/mL de RNase A por 10 minutos a 37 °C.

3.4.2 Extração de RNA Total de *T. brucei*

O RNA total de 5×10^8 parasitas foi extraído com 1 mL de TRIzol (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante. Após as extrações, a qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose 1,2 % em condição desnaturante (item 3.5.2).

3.4.3 Extração de DNA Plasmidial de bactéria

Colônias obtidas de meio LB-ágar seletivo foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico seletivo. As culturas foram incubadas a 37 °C por 18 horas sob agitação constante e em seguida centrifugadas a 8000 x g durante 2 minutos. O DNA plasmidial foi extraído com o kit QIAprep Miniprep (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. Este método é baseado na lise celular alcalina seguido por adsorção em sílica na presença de alta concentração de sal.

3.5 ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS E PROTEÍNAS

3.5.1 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, como descrito em Sambrook e Russel (2001). Os géis de agarose, em diferentes concentrações (0,8 a 2,0%), foram preparados com tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA 2 mM pH 8,0) e submersos no mesmo tampão. As amostras e o padrão de massa molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) foram diluídos em tampão de amostra para DNA 6X (0,25%, azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% glicerol) e aplicados no gel. O sistema foi submetido à diferença de potencial (70 a 100 V) com amperagem constante.

As moléculas de DNA foram coradas com brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 15 minutos e visualizadas em transiluminador, com luz ultravioleta (260 nm), acoplado ao sistema de fotodocumentação, L-Pixx (Loccus biotecnologia).

3.5.2 Eletroforese de RNA em Gel de Agarose em Condição Desnaturante

O gel de agarose 1,2% em condição desnaturante foi preparado com 2,2 M de formaldeído em tampão MOPS (20 mM MOPS; 5 mM acetato de potássio; 1 mM EDTA pH 8,0), sendo que agarose foi fundida em tampão MOPS e o formaldeído foi adicionado após o resfriamento a 60 °C, aproximadamente (LEHRACH et al., 1977).

A amostra contendo o RNA foi adicionada a três volumes de tampão de amostra de RNA [60% formamida deionizada; 2,5M formaldeído; tampão MOPS e 10% corante (tampão MOPS; 25% glicerol; 0,25% azul de bromofenol)], aquecido a 65 °C por 3 minutos e submetido a migração eletroforética em gel de agarose desnaturante. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS, a voltagem (70 a 100 V) e amperagem constantes.

Após a separação eletroforética, o gel foi lavado de 2 a 4 vezes por 10 minutos em água para retirar o formaldeído. O gel foi submerso em uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e as moléculas de RNA foram visualizadas em transiluminador, com luz ultravioleta (260 nm), acoplado ao sistema de fotodocumentação.

3.5.3 Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida Desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras, contendo tampão de amostra para proteína 4X (160 mM Tris-HCl 1M pH 8,0; 4% SDS; 10% β-mercaptoetanol; 24% glicerol; 0,02 % azul de bromofenol), foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos, centrifugadas a 12000 x g por 2 minutos e o sobrenadante das amostras e o marcador de proteína BenchMarck Ladder (Invitrogen) foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de Coomassie Blue, de nitrato de prata ou submetido à técnica de *Western blotting*.

3.5.3.1 Coloração por Coomassie Blue

Após a eletroforese, os géis foram corados com a solução de Coomassie Blue (0,1% azul de coomassie R-250; 45% metanol; 10% ácido acético) por 10 a 30 minutos e descorados em uma solução descorante (30% metanol; 7,5% ácido acético).

3.5.3.2 Coloração por Nitrato de Prata

As proteínas dos géis SDS-PAGE foram coradas com a solução de nitrato de prata quando precisava de mais sensibilidade para detectar as proteínas. Para isto, o gel foi incubado

em solução de fixação de SDS-PAGE (etanol 50%; ácido acético 12%; formaldeído 37% 0,5 mL/L) por, no mínimo, 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado com etanol 50% por 5, 10 e 15 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado com a solução de sensibilização para prata (tiosulfato de sódio 0,02%) por 1 minuto, lavado com água ultrapura por 3 vezes e incubado com a solução de coloração (nitrato de prata 0,2%; formaldeído 37% 0,7 5ml/L) por 30 minutos. Após a incubação, o gel foi lavado 3 vezes com água ultrapura e incubado em solução de revelação de prata (carbonato de sódio 3%; formaldeído 37% 0,5 mL/L; 2% de solução de sensibilização). A reação foi interrompida com a solução de término de revelação (etanol 50%; ácido acético 12%).

3.5.3.3 *Western blotting*

Após a separação eletroforética em gel de poliacrilamida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™-C, GE Healthcare), conforme descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). A transferência foi realizada em tampão de *Western blotting* (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 20% metanol) durante 16 horas a 4 °C, utilizando diferença de potencial de 30 V ou durante 1 hora, a 4 °C e 100 V com amperagem constante.

Para confirmar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com a solução Ponceau S [0,5% Ponceau S (Sigma P-3504), 1% ácido acético glacial], descorada em água bidestilada e incubada em tampão de bloqueio (0,1% Tween 20; 5% leite em pó desnatado em PBS) em temperatura ambiente por 1 hora, sob leve agitação. Em seguida, o anticorpo primário foi adicionado e incubado por mais 1 hora a 37 °C, sob leve agitação.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS/0,1% Tween 20, incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou de camundongo conjugados com fosfatase alcalina (diluído 1:10000), peroxidase (diluído 1:10000) ou fluoróforos (IRDye 800CW ou Alexa Fluor 700, diluídos 1:15000), diluídos em PBS/0,1% Tween 20, por 1 hora a 37°C, com sob agitação, e novamente lavada com PBS/0,1% Tween 20 por 3 vezes.

As membranas incubadas com o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina foram reveladas com NBT (50 mg/mL *nitroblue tetrazolium*) e BCIP (50 mg/mL *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate*) em tampão de revelação (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂).

O produto da reação enzimática da peroxidase conjugada aos anticorpos foi detectado por quimioluminescência utilizando o kit ECL *Western blotting* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. A membrana foi exposta ao filme Kodak por diferentes tempos, incubado na solução de revelação por 2 minutos, lavado em água por 2 minutos e incubado na solução de fixação por mais 2 minutos, na ausência de luz. Os tempos de exposição foram padronizados para cada experimento.

Os anticorpos conjugados a fluoróforos foram detectados com Odyssey Imaging Systems (LI-COR).

3.6 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

As reações de amplificação foram realizadas em 20 μ L contendo DNA molde (1 a 20 ng de DNA plasmidial ou 100 ng de DNA genômico), 1,25 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 mM $MgCl_2$, 0,175 mM dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo e tampão de PCR para *Taq* DNA polimerase (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl). O DNA foi desnaturado a 94°C por 10 minutos e a amplificação realizada por 25 a 35 ciclos compostos pelas temperaturas de: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento entre 48 a 56°C, padronizada para os diferentes oligonucleotídeos, por 30 segundos; extensão a 72°C por 30 a 120 segundos, considerando que a *Taq* DNA polimerase sintetiza 1000 pb por minuto.

3.7 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

Para os ensaios de microscopia de imunofluorescência, lâminas de 8 poços, delimitados por teflon, foram pré-tratadas com poli-L-lisina por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com água deionizada.

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 5000 x g por 3 minutos e lavados duas vezes com PBS. Após a última lavagem, o PBS foi descartado e os parasitas foram rapidamente suspensos em paraformaldeído 4% em PBS e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Os parasitas foram lavados com PBS por duas vezes e suspensos na concentração de $3,3 \times 10^7$ células/mL em PBS. O correspondente a 1×10^6 células (30 μ L de suspensão) foi aplicado em cada poço da lâmina e as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente para que pudessem aderir na lâmina.

Após este período, as células que não aderiram foram retiradas e os poços foram lavados com PBS por duas vezes. As células foram permeabilizadas com Triton 0,1%, diluído em PBS, por 90 segundos e novamente lavadas com PBS por duas vezes. Posteriormente, foi adicionado PBS-BSA 4% aos poços e o material foi incubado a 4 °C por 16 horas, em câmara úmida. Após este período, anticorpos primários foram aplicados sobre os poços e incubados a 37 °C por 1 hora. Em seguida, os poços foram lavados com PBS por 2 vezes, com posterior adição de anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou de camundongo conjugados com os fluoróforos Alexa Fluor 594 ou Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluídos 1:400, incubados por mais 1 hora a 37 °C e novamente lavados com PBS. Para a coloração do material genético, foi adicionado 2 µg/µL de DAPI em PBS e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida as lavagens foram realizadas. Adicionou-se N-propil-galato e as lâminas foram seladas com as lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio Nikon Eclipse 80i, da Plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas.

3.8 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* EM *T. BRUCEI* E ANÁLISE POR FERRAMENTAS QUANTITATIVAS

Para avaliar a taxa de transcrição, a metodologia original de transcrição *in vitro*, utilizando *T. brucei* permeabilizados, foi modificado e adaptado para ser compatível com os sistemas de análises quantitativos por fluorescência. Portanto, primeiramente, foi padronizado o protocolo e, posteriormente, analisado a taxa de transcrição após o silenciamento de Sub2.

Os dados foram adquiridos na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas.

3.8.1 Transcrição *In vitro* em Células Permeabilizadas

O protocolo foi adaptado de Ullu e Tschudi (1990). O total de $1,2 \times 10^8$ parasitas (1×10^7 /amostra) foram centrifugados a $5000 \times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os parasitas foram lavados com 12 mL de tampão A (150 mM sucrose; 20 mM glutamato de potássio; 20 mM Hepes-KOH pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 1 mM DTT) e recuperados por centrifugação, nas mesmas condições da centrifugação anterior. Os parasitas foram lavados mais duas vezes. Após a última lavagem e centrifugação, os parasitas foram suspensos em 960 µL tampão A e mantidos no gelo por 5 minutos. Em seguida, o volume foi medido e adicionado Palmitoyl-L-a-lysophosphatidylcholine (LPC, 10 mg/mL em água, Sigma - catalogo

n. 62962) para obter a concentração final de 250 µg/ml. A suspensão celular foi incubada no gelo por exatamente 2 minutos para permeabilizar a célula e manter a maquinaria de transcrição ativa. Após os 2 minutos, foi adicionado 4,8 mL de tampão A. Este volume é suficiente para preparar 12 amostras e foi dividido em alíquotas de 500 µL para a reação de transcrição *in vitro*.

As alíquotas foram centrifugadas (5000 \times g, 5 minutos, temperatura ambiente) e suspendidas em 18 µL de tampão B mais 2 µL do mix de nucleotídeos BrUTP (ATP, CTP, GTP, BrUTP) para obter o tampão de transcrição (150 mM sacarose; 20 mM glutamato de potássio; 20 mM Hepes-KOH pH 7,7; 3 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,6 mg/mL creatina quinase; 25 mM creatina fosfato; 400 U/mL RNase Out; 10 µg/mL leupeptina; 4 mM ATP; 2mM GTP; 2 mM CTP; 2 mM BrUTP). Na amostra controle_UTP foi adicionado o mix de nucleotídeos contendo UTP (ATP, CTP, GTP, UTP), em vez de Br-UTP e na amostra controle_sem nucleotídeo foi adicionado água ultrapura, no lugar do mix de nucleotídeos. A amostra controle_α-amanitina foi incubada com 75 µg/mL α-amanitina em tampão B, por 4 minutos a 28 °C com agitação (300 rpm), antes de adicionar o mix de nucleotídeos BrUTP.

Para a incorporação dos nucleotídeos adicionados, as amostras foram incubadas a 28 °C por 15 minutos com agitação (300 rpm). Após este período, foi adicionado 1 mL de tampão A em cada amostra e os parasitas foram recuperados por centrifugação (5000 \times g, 5 minutos, temperatura ambiente).

Posteriormente, para a imunofenotipagem, os parasitas foram fixados por 10 minutos com paraformaldeído 4% preparado em PBS, lavados com 1 mL de PBS, recuperados por centrifugação (7000 \times g, 5 minutos, temperatura ambiente), permeabilizados e bloqueados com 200 µL de tampão C (2% saponina e 2% albumina de soro bovino em PBS) por uma hora em temperatura ambiente com agitação (60 rpm). Em seguida, os parasitas foram incubados com o anticorpo anti- BrdU produzido em camundongo (3:50, clone monoclonal MoBU-1, Invitrogen – catalogo n. B35139) diluído em tampão C, por 16 horas, a 4 °C. Os parasitas foram lavados com 1 mL de PBS, recuperados por centrifugação (7000 \times g, 5 minutos, temperatura ambiente) e incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488, produzido em cabra (1:200, Molecular Probes) e 2 µg/mL DAPI, diluídos em 50 µL de tampão C. As células foram lavadas com 1 mL de PBS e suspendidas em 200 µL de PBS contendo 10 µg/ml de RNase A, que melhorou o perfil do ciclo celular obtido com o DAPI.

3.8.2 Análise da Taxa de Transcrição e do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo Simultaneamente

Para analisar o RNA nascente e o ciclo celular simultaneamente, os dados de 20.000 eventos de cada amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto (BD). O fluoróforo Alexa Fluor 488 foi excitado pelo laser azul (488 nm) e a luz emitida foi detectada com o filtro 530/30 (band pass). O DAPI foi excitado pelo laser violeta (405 nm) e detectado com o filtro 450/40 (band pass). Não foi necessário compensar os dados e estes foram analisados no software FlowJo versão 10.0.1.

Para analisar os dados, primeiramente foi selecionada a população de *T. brucei* com os parâmetros FSC (*Forward Scatter*) vs. SSC (*Side Scatter*). Posteriormente, as células isoladas foram selecionadas baseadas na área (DAPI-A) e na largura (DAPI-W) do pulso do sinal do DAPI, excluindo grumos e restos celulares (NUNEZ, 2001). A partir desta população, foram feitas duas análises: ciclo celular, baseado na fluorescência do DAPI, e RNA nascente, baseado na fluorescência do Alexa Fluor 488. As fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foram estimadas com o modelo de Watson, disponível no software FlowJo. Para determinar a porcentagem de células com RNA nascente, chamadas de “*Run-on +*”, a amostra Controle sem nucleotídeos foi utilizada para estabelecer que 5 % desta amostra seria considerada positiva (*Run-on +*) e determinar a linha de corte, ou seja, o processo de transcrição será considerado positivo quando a intensidade de fluorescência for maior do que esta linha de corte. A mesma análise foi aplicada para as diferentes amostras dos experimentos. Dados semelhantes podem ser obtidos utilizando outras estratégias de análise.

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

3.8.3 Validação da Análise do Ciclo Celular com DAPI

Para comparar a eficiência da coloração do DNA com DAPI, os dados foram comparados com a coloração com iodeto de propídeo. Para isto, as amostras passaram pelo processo de transcrição *in vitro*, lavadas com PBS e suspensas em 100 μ L de PBS mais 100 μ L de solução de iodeto de propídeo 2x (3,4 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1 % NP40; 10 μ g/ml RNase A; 10 mM NaCl; 30 μ g/mL iodeto de propídeo).

O dado de 10.000 eventos foi adquirido no citômetro FACSCanto (BD). O iodeto de propídeo foi excitado com o laser azul (488 nm) e a fluorescência emitida foi detectada com o filtro 585/42 (band pass). As células isoladas foram selecionadas baseadas área (PE-A) e na largura (PE-W) do pulso do sinal do iodeto de propídeo (NUNEZ, 2001). As fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) foram estimadas com o modelo de Wastson, disponível no software FlowJo versão 10.0.1.

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

3.8.4 Análise da Taxa de Transcrição por Sistema de Imagem de Alta Performance (*High-Content Imaging System*)

Para analisar a taxa de transcrição por outro método, as células obtidas no item 3.8.1, foram aderidas em placas de 96 poços pré-tratadas com poli L-lisina e os dados foram adquiridos no Operetta high-content imaging system (PerkinElmer) acoplado ao software Harmony 3.5. As imagens foram adquiridas com a lente objetiva de 40 X no plano focal do DAPI. Os fluoróforos foram excitados com a luz de xênon. As imagens do DAPI e do Alexa Fluor 488 foram adquiridas com os filtros de excitação 360/400 nm e 460/490 nm e os filtros de emissão 410/480 nm e 500/550 nm, respectivamente. Foram adquiridas 50 imagens por poço.

As imagens foram analisadas no software Harmony. O núcleo foi detectado com o algoritmo “find nuclei (method C)” com o sinal do DAPI. Células cortadas nas bordas das imagens foram excluídas da análise. Posteriormente, os núcleos isolados, excluindo grumos celulares, foram selecionados baseados nas propriedades morfológicas, utilizando a área do núcleo como critério. A partir destas células, foi analisada a mediana da intensidade de fluorescência do Alexa Fluor 488, correspondente ao RNA nascente, da região nuclear das amostras controles e definido a linha de corte. As células, com intensidade de fluorescência acima da linha de corte, foram consideradas positivas para o RNA nascente e calculado a porcentagem de células positivas em relação a células isoladas.

Foram utilizados os dados dos experimentos com mais de 600 células isoladas, por amostra, selecionadas a partir dos núcleos isolados, descrito acima. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

3.8.5 Análise Estatística

A diferença entre as amostras do ensaio de transcrição *in vitro* foram analisadas por análise de variância com um fator (ANOVA), seguido por comparações múltiplas de Tukey. A análise foi realizada no software GraphPad Prism versão 5.01. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.001$.

3.8.6 Análise da Taxa de Transcrição Após o Silenciamento de Sub2

A taxa de transcrição foi analisada com a metodologia descrita acima, utilizando os parasitas TbSub2-RNAi submetidos à indução do silenciamento de 48 horas. Nestes experimentos, foram adicionadas as amostras Controle_sinefungina, tratadas com 1 µg/mL de sinefungina por 4 ou 15 minutos em tampão B, a 28 °C sob agitação (300 rpm), antes de adicionar o mix de nucleotídeos BrUTP. Além disso, na etapa da imunofenotipagem também foi utilizado o anticorpo anti-Sub2, produzido em coelho, e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 594, produzido em cabra (1:200, Molecular Probes). A análise foi realizada como descrito acima, incluído a quantificação da expressão de Sub2. Portanto, o fluoróforo Alexa Fluor 546 foi excitado pelo laser azul (488 nm) e a luz emitida foi detectada com o filtro 585/42 (band pass), no FACSCanto II. No Operetta high-content imaging system (PerkinElmer) acoplado ao software Harmony 3.5, as imagens foram adquiridas com o filtro de excitação 520/550 nm e o filtro de emissão 560/580, respectivamente.

3.9 OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI* EXPRESSANDO PROTEÍNAS FUSIONADAS À ETIQUETAS

3.9.1 Clonagem Molecular da Região que Codifica a Extremidade N Terminal da Proteína Sub2 de *Trypanosoma brucei* no Vetor PN-PURO-PTP

O vetor PN-PURO-PTP (SCHIMANSKI; NGUYEN; GÜNZL, 2005) (Anexo A) é utilizado para adicionar, na extremidade 5' do gene de interesse, a sequência que codifica a etiqueta PTP. Para isto, a extremidade 5' da região codificante do gene de interesse é clonada no vetor pN-PTP-NEO. Esta sequência também deve conter um sítio único para uma enzima de restrição, presente na região clonada e ausente no vetor, para possibilitar a integração do

vetor no genoma do parasita. Após a clonagem, o clone é digerido neste sítio único, o parasita é transfetado e selecionado na presença do antibiótico puromicina.

Assim, foi desenhado o oligonucleotídeo TbSub2N-F, e o oligonucleotídeo TbSub2C-R, para amplificar a extremidade 5' da região codificante do gene, que contém o sítio *Eco*NI (Figura 3.1). Esses iniciadores foram desenhados a partir da sequência nucleotídica depositada no banco de dados TriTrypDB, Gene ID Tb927.10.540. Os oligonucleotídeos TbSub2N-F e Tbsub2N-R contêm os sítios para as enzimas de restrição *Apa*I e *Not*I, respectivamente, na extremidade 5', para a clonagem no vetor PN-PURO-PTP.

```

ATGAGTAGTGGTCTCGCTGACTTTGACGGAGATGATGTGCGGGCGCCAGTTGTGGCTGCGCAACCGC
ATATTGGTGTGGTCTCGGAACCCACAGTGCCGTTGCTCTCGGCGGTTTCCAAGATTTTTGTCTCAA
AAGTGAACTCGCCAACGCCATTCGAGAAAACGGCTTCGAACATCCCAGTGAAGTGCAGCATCAGGCC
CTTCCACAAGCCATGCTCGGTGCAGATATCCTTGCACAGGCAAAGTCTGGTATGGGTAAAACAGCCG
TGTTTGTGTTTGCTTTATTGGAGCAAGTGAAAAACCAACGGATGGGCAGCGGCCCTTCTGTCAAGC
CATCGTCAATTGCCCATGCACGCGAGTTGGCATATCAAATTGAGCAGGAGTTCAAGCGTTTCAACAAA
TACTTGCCGCATTGTACCACTGGTGTCTTCTTTGGGGGCGTCCCTGAAGACGAGAACATAAAACAAC
TCAAGAAGGAGGTTCCCGCAATAGTGGTGGCCACACCAGGTCGAATTTGTTCCCTCATTGAGCGAAA
AGCTCTCGACGTGTCGCGTGTAAAGTGGTTTGTGTTGATGAATTCGATCGCTGCCTAGAGGATGTG
AAAATGCGTCGCGATGTGCAGACGGCATTCCCTAAGACACCGAAGGAAAAACAGGTGATGATGTTCT
CAGCCACCATGACGGAGGAGCTGCGGAATGTGGCGAAGAAATTTATGTGAACCCCACTGAAATCTA
CGTTGACCAGCGTTCCAAGCTTACACTTCACGGGTTGGCGCAATATTACATCAATGTGACGGAGGCA
CAGAACTTCGTAAGTTGTGCGACATCCTCGACGCTGTTGAGTTCAATCAAGTCATTATATCACTT
CCACTGTTGAGCGCTGTGAGGCTCTCAGCCGTCAGTGCAGGCTCTTAAGTTTCCCTCCAAGGCGAT
TCACTCTCGCATGGAGCAGGCGGAGCGGTTGGTTGTGTATGAGAGCTGCAAAACAAACCAAGCTCGT
ATCATCGTCGCCACAGACATCTTTGGCCGTTGGTGTGGATATTGACCGTATTAATCTTGTGTACAGT
TTGATATGGCGTCTGATGCTGACTCGTACCTTCATCGTGTGGTCTGCTGGTCTGCTTTGGTACGAA
GGGACTTACGGTGGCATTCCCTCACTGAAGAGGAAAAGGAAATTAAGCGTGAGAACCGTAAATATACT
GACCAGGGTATCATGAAGGAAGTGCAGGAGCGATTTGAGATGCAGGTCAGGAACTTACTGACATCG
CCACACAACCTGAACCAGAGCCAGTATATGAACCAATAG

```

Figura 3.1 - Região de Sub2 de *T. brucei* selecionada para clonar no vetor PN-PURO-PTP. Sequência nucleotídica de Sub2 com a região selecionada para clonagem no vetor PN-PURO-PTP (negrito), os oligonucleotídeos TbSub2N-F (vermelho) e TbSub2N-R (azul) e o sítio de clivagem por *Eco*NI (verde) em destaque.

A extremidade 5' da região codificante do gene Sub2 de *T. brucei* foi amplificada por PCR. A amplificação foi realizada utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen),

segundo as recomendações do fabricante, utilizando como molde o DNA genômico de *T. brucei*. O produto da PCR, também chamado de inserto, foi analisado em gel de agarose.

O inserto e o plasmídeo PN-PURO-PTP foram digeridos com as enzimas *Apa I* e *Not I* (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante. A digestão do plasmídeo foi confirmada em gel de agarose 0,8%. Após a digestão, o inserto e o vetor foram aplicados em gel de agarose 0,8% e purificados do gel com o kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), após a eletroforese.

A reação de ligação foi realizada em 20 µL contendo 300 ng do inserto, 30 ng do vetor, 5 U T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da T4 DNA ligase, incubada por 18 horas a 16 °C. A ligação foi transformada em DH5α cálcio competente e plaqueada em LB-ágar 1,5% contendo 100 µg/mL de ampicilina, como descrito no item 3.3.

Algumas colônias foram analisadas diretamente por PCR utilizando os oligonucleotídeos pN-F e pN-R (Apêndice A) que anelam no vetor. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

A orientação da sequência clonada no vetor pN-Sub2#11 foi analisada por PCR utilizando a combinação de iniciadores TbSub2N-F e pN-R, TbSub2N-R e pN-F e TbSub2N-F e TbSub2N-R. Além disso, os clones foram sequenciados para confirmar se a sequência do inserto estava em fase com a etiqueta PTP. Após a confirmação da sequência, 15 µg do clone pN-Sub2#11 foi digerido com *EcoNI* e transfectado em *T. brucei* cepa 427. Os parasitas foram selecionados e mantidos com o antibiótico puromicina.

3.9.2 Amplificação dos Vetores pMOTag Para Adicionar uma Etiqueta na Região C-terminal das Proteínas

Para obter as proteínas fusionadas a etiquetas na região C-terminal, os genes dos parasitas foram modificados utilizando a técnica descritas por Oberholzer et al. (2006), a partir da amplificação por PCR da etiqueta e do gene de resistência dos vetores pMOTag (Anexo B). Para o gene U2AF35 foi utilizado o vetor pMOTag3G (GFP e neomicina) e para os genes Hip e Mago, o vetor pMOTag4H (3xHA e higromicina).

Para cada gene modificado neste estudo, foi desenhado o oligonucleotídeo forward contendo a sequência dos 100 nucleotídeos da extremidade 3' da região codificante do gene, sem o códon de parada, e a sequência que anela antes da sequência da etiqueta nos vetores pMOTag. O oligonucleotídeo reverse foi desenhado com a sequência dos 100 nucleotídeos da

região intergênica a jusante a região codificante do gene e a sequência que anela depois do gene de resistência dos vetores pMOTag. As sequências, correspondentes ao vetor, adicionadas aos oligonucleotídeos anelam em uma região comum a todos os vetores pMOTag, portanto poderia utilizar qualquer vetor pMOTag e amplificar diferentes combinações de etiqueta e gene de resistência por PCR.

Os oligonucleotídeos foram desenhados baseados nas informações do banco de dados TriTrypDB. Como utilizamos o parasita *T. brucei* Lister 427 utilizamos preferencialmente as sequências de DNA desta cepa, porém, quando a sequência da região intergênica não estava definida, utilizamos a sequência de *T. brucei* TREU 927.

Para obter o material necessário para transfectar, foram realizadas 10 PCRs de cada gene e a amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, o material foi precipitado com 10% do volume de acetado de sódio 3M pH 5,2 e 3 volumes de etanol. O material foi armazenado por 16 horas a -20 °C e este foi recuperado por centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sedimento obtido foi lavado com etanol 70%, o DNA foi recuperado novamente por centrifugação e o etanol descartado. Após a evaporação do etanol, foi adicionado 50 µL de água ultrapura e utilizado para a transfecção de *T. brucei*.

3.9.3 Transfecção e Seleção de *Trypanosoma brucei*

Um total de 1×10^8 parasitas em fase logarítmica de crescimento foram utilizados para cada transfecção. Os parasitas foram centrifugados a 5000 x g por 3 minutos, lavados com 2 mL de ZPMF (129 mM NaCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8 mM KCl; 8 mM NaH₂PO₄; 1,5 mM MgCl₂; 90 µM CaCl₂; 2,4 mM CH₃COONa pH 7,0), centrifugados novamente nas mesmas condições e suspensos em 450 µL de ZPMF. Os parasitas foram transferidos para a cubeta de eletroporação de 0,4 mm e adicionou-se o DNA. Os parasitas foram incubados por 10 minutos no gelo, submetidos a um pulso de 1,5 kV com capacitância de 25 µF em eletroporador GenePulser II Apparatus (Bio-Rad) e rapidamente transferidos para 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10% SBF e com o antibiótico de seleção (2 µg/mL de puromicina, 20 µg/mL de neomicina ou 20 µg/mL higromicina).

Em uma placa de petri, foram misturados 5,5 mL dos parasitas submetidos à transfecção, 5,5 mL dos parasitas não transfectados e 15,5 mL do meio SDM-79 suplementado com 10% SBF e com o antibiótico de seleção. Desta mistura, o volume de 250 µL foi transferido para cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços. Os parasitas foram incubados em estufa

com 5% de CO₂ a 28 °C por 24 horas. Após este período, foi realizado o repique na proporção de 1:4 em outra placa de poliestireno de 96 poços, contendo a mesma concentração de antibiótico. Os parasitas foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ a 28 °C até o meio de alguns poços turvarem, aproximadamente 15 dias, indicando a seleção e o crescimento dos parasitas. Cada população, correspondente aos diferentes poços com os parasitas geneticamente modificados, foi expandida em placa de poliestireno de 24 poços e, posteriormente, transferida para tubo cônico de 15 mL, sempre mantendo a proporção de 1:4, porém no meio de cultivo SDM-79 contendo 4 µg/mL de puromicina, 40 µg/mL de neomicina ou 40 µg/mL higromicina).

3.9.4 Análise das Linhagens

3.9.4.1 Análise das proteínas fusionadas às etiquetas por *Western blotting*

Após a seleção das linhagens, os parasitas foram mantidos em meio SDM-79 com o antibiótico de seleção. A partir de culturas em fase exponencial de crescimento, preparou-se os extratos proteicos contendo 1 x 10⁶ células/µL em 75% PBS e 25 % tampão de amostra para proteína 4X. Os extratos foram aquecidos a 95 °C por 5 minutos para desnaturar as proteínas e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida. Após a separação eletroforética, os extratos foram transferidos para a membrana de nitrocelulose como descrito no item 3.5.3.3. As proteínas fusionadas à etiqueta foram detectadas utilizando anticorpo primário anti-proteína A produzido em coelho (1:40000, Sigma, P3775), anti-GFP produzido em camundongo (1:500) ou anti-HA produzido em coelho (1:250, Invitrogen, 715500) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo marcados com fosfatase alcalina (diluição 1:10000).

3.9.4.3 Localização celular das proteínas fusionadas às etiquetas por microscopia de imunofluorescência indireta

As proteínas fusionadas às etiquetas foram localizadas nos parasitas utilizando o anticorpo anti-proteína A produzido em coelho (1:40000, Sigma, P3775), anti-GFP produzido em camundongo (1:500), anti-HA produzido em coelho (1:250, Invitrogen, 715500) ou nanobody anti-GFP (1:1500) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugados ao fluoróforo Alexa Fluor 594 ou Alexa 488 (Invitrogen), como descrito no item 3.7.

3.10 ANÁLISE DO COMPLEXO PROTEICO

3.10.1 Expressão e Purificação de Nanobodies Anti-GFP

A expressão de nanobodies anti-GFP em sistema bacteriano e a purificação das moléculas foram realizadas como descrito por Fridy et al. (2014), com algumas modificações. Portanto, bactérias *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3) competente foram transformadas com o clone LAg16-G4S-2 obtido em pET21b-pelB e cultivadas em LB-ágar 1,5% suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor.

Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina e 20 µg/mL gentamicina e incubada a 37 °C, com agitação a 200 rpm, durante 18 horas. Posteriormente, foi realizado um inóculo (1:20) em 1 L em LB contendo apenas 100 µg/mL ampicilina. As células foram incubadas a 37 °C, com agitação a 200 rpm, até atingir a densidade óptica de 0,6, quantificada em espectrofotômetro a 600 nm. Esta densidade óptica foi atingida em aproximadamente 3 horas de incubação. Em seguida, foi adicionado 0,1 mM IPTG e a cultura foi incubada a 12 °C, com agitação a 200 rpm, por 18 horas.

Para obter a fração periplasmática, as bactérias foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e suspendidas em 10 mL de tampão TES (0,2 M Tris-HCL pH 8,0; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 0,5M sacarose). Logo em seguida, foi adicionado mais 15 mL de tampão TES diluído 1:4 (3 mL tampão TES mais 12 mL H₂O) e as bactérias foram incubadas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 15000 x g por 45 minutos, o sobrenadante foi recolhido e adicionado 770 µL NaCl 5M para obter a concentração final de 150 mM NaCl no tampão TES.

Devido as características do vetor pET21b-pelB, os nanobodies foram expressos fusionados a seis aminoácidos histidina na extremidade C-terminal. Portanto, a purificação dos nanobodies foi realizada com a coluna HisTrapFF – 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) no cromatógrafo ÄktaPurifier (GE – GE Healthcare Life Sciences). Toda a cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 mL/minuto e pressão máxima de 0,5 mPa. Inicialmente, a coluna HisTrapFF foi lavada com 5 volumes de H₂O ultrapura e com 5 volumes de tampão A (25 mM imidazol; 50 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 % glicerol). Em seguida, a amostra foi injetada, passada na coluna e esta foi lavada novamente com 5 volumes de tampão A. Posteriormente foi aplicado um gradiente linear de 25 mM até 250 mM imidazol, com os

tampões A e B (250 mM imidazol; 50 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 % glicerol). O gradiente foi realizado com 18 volumes da coluna e as amostras eluídas foram coletadas em frações de 1 mL. Em seguida a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão B, 5 volumes de tampão A, 5 volumes de H₂O ultrapura e 5 volumes de etanol 20%. A coluna foi armazenada a 4 °C.

Uma alíquota das frações 4, 7, 9, 11, 13, 15 e 19 foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e o gel foi corado com Comassie Blue, como descrito nos itens 3.5.3 e 3.5.3.1.

Posteriormente, as frações contendo os nanobodies foram dialisadas em tampão fosfato 100 mM pH 8,0 utilizando Amicon Ultra Centrifugal Filter (Merck Milipore), com membrana NMWL de 10 kDa.

3.10.2 Conjugação do Nanobody anti-GFP ou do Anticorpo Anti-proteína A à Dynebeads Epoxy M270

Para a conjugação das proteínas [nanobody anti-GFP, obtidos como descrito no item 3.10.1, ou anticorpo anti-proteína A (Sigma)] às esferas magnéticas, 20 mg de resina Dynebeads epoxy M270 (Invitrogen) foi lavada com tampão fosfato 100 mM pH 8,0 por duas vezes, sendo que na segunda vez as esferas foram mantidas no tampão por 15 minutos com agitação. Posteriormente, o tampão foi removido e adicionado 100 µL de tampão fosfato mais 100 µL da solução contendo a proteína na concentração de 2 mg/mL, também diluída em tampão fosfato. Em seguida, foi adicionado 100 µL de sulfato de amônia 3M lentamente, para evitar a precipitação das proteínas. Esta suspensão foi incubada a 30 °C por 72 horas, com agitação de 200 rpm. Após este período, as esferas foram lavadas sequencialmente com 1 mL de cada solução: tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0; glicina 100 mM pH 2,5; tris-HCl 10 mM pH 8,8; 100 mM trietilamina; PBS; triton x-100 0,5% diluído em PBS; e duas vezes com PBS. As esferas foram suspensas em 150 µL de PBS e armazenadas a 4°C.

3.10.3 Preparo de Extrato Celular de *T. brucei* para Imunoprecipitação

Parasitas (2 a 5 x 10⁸), na fase logarítmica do crescimento, foram centrifugados a 2000 x g por 10 minutos, lavados com 1 mL de PBS e centrifugados novamente 2000 x g por 10 minutos. Em seguida, as células foram suspensas em 500 µL de tampão citrato (20 mM Hepes

pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 10 μ CaCl₂; 10 mM Na₃C₆H₅O₇; 0,1% Chaps) gelado, contendo inibidor de protease *cOmplete mini protease inhibitor cocktail, EDTA free* (Roche). A amostra foi sonicada por 3 segundos, potência de 30 % por 2 vezes, com intervalo de 1 minuto mantida no gelo. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 20000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a cromatografia de exclusão de tamanho ou para imunoprecipitação do complexo.

3.10.4 Cromatografia de Gel Filtração

Extrato proteico de *T. brucei* foi preparado como descrito no item acima e separado por cromatografia de exclusão de tamanho com a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada ao cromatógrafo ÄktaPurifier (GE – GE Healthcare Life Sciences). Toda a cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 mL/minuto e pressão máxima de 1,5 mPa, utilizando o tampão citrato (20 mM Hepes pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 10 μ CaCl₂; 10 mM Na₃C₆H₅O₇; 0,1% Chaps) como fase móvel. Inicialmente, a coluna foi lavada com 2 volumes de H₂O ultrapura e com 2 volumes de tampão citrato. Em seguida, a amostra foi injetada e separada pela coluna de acordo com a massa dos complexos. As amostras eluídas foram coletadas em frações de 0,5 mL. Em seguida a coluna foi lavada com 2 volumes de H₂O ultrapura, 5 volumes de etanol 20% e armazenada a 4 °C.

Uma alíquota das frações ímpares de 13 a 33 foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e analisadas por *Western blotting*, como descrito nos itens 3.5.3 e 3.5.3.3.

3.10.5 Imunoprecipitação Utilizando Nanobodies Anti-GFP ou Anticorpo Anti-Proteína A Ligados à Dynebeads Epoxy M270

Para cada ensaio de imunoprecipitação, 1,5 μL de Dynebeads epoxy M270, conjugada com nanobodies anti-GFP ou com anticorpo anti-proteína A, foi incubada com o extrato proteico de *T. brucei* (item 3.10.3) por 2 horas, a 4 °C com agitação circular a 40 rpm. Posteriormente, a resina foi lavada três vezes com 1 mL de tampão citrato, com o auxílio de uma estante magnética. A resina foi centrifugada por 15 segundos a 1000 x g e o excesso de tampão foi removido. Em seguida, foram adicionados 20 μL de tampão de amostra para proteína 4X e aquecida a 94 °C por 20 minutos. A amostra eluída foi recuperada e analisada por

eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata, *Western blotting* ou espectrometria de massa.

3.10.6 Imunoprecipitação Utilizando a Resina Anti-HA

Para cada ensaio de imunoprecipitação, 10 μ L de resina anti-HA, do kit Anti-HA immunoprecipitation (Sigma, IP0010), foi adicionada ao extrato proteico de *T. brucei* (item 3.10.3). Nas amostras sem RNase A foi adicionado 40U de RNase Out (Invitrogen) e nas amostras com RNase A foi adicionada a enzima para obter a concentração final de 10 μ g/mL. As amostras foram incubadas por 2 horas, a 4 °C com agitação circular a 40 rpm, lavadas 5 vezes com o tampão citrato e eluídas com tampão de amostra para proteína. A manipulação da coluna foi realizada como descrita no manual do fabricante.

3.10.7 Processamento das Amostras e Espectrometria de Massas

Após a corrida das amostras imunoprecipitadas em gel de acrilamida e coloração com nitrato de prata, as regiões do gel correspondentes as amostras foram cortadas e processadas pela Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas. Os géis foram incubados com a solução de descoloração (tiossulfato de sódio 50 mM; ferrocianeto de potássio 15 mM) até sair a coloração da prata e os géis ficarem amarelo. Posteriormente, os géis foram lavados com bicarbonato de amônio 50 mM por 10 minutos, a 25 °C com agitação a 800 rpm para remover a coloração amarela. Esta lavagem foi repetida até o gel ficar transparente. Em seguida, os géis foram desidratados incubando 2 vezes com etanol por 10 minutos, a 25 °C com agitação a 800 rpm e seco em *Savant SPD131DDA Speed-vac Concentrator* (Thermo Scientific), com pressão de vácuo a 0,1.

Posteriormente, os géis foram incubados com a solução de redução (DTT 10 mM diluído em bicarbonato de amônio 50 mM) por 60 minutos a 56 °C com 800 rpm de agitação e, em seguida, com a solução de alquilação (iodoacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 50 mM) por 45 minutos a 25 °C com 800 rpm de agitação e protegido da luz. Estas soluções reduzem as pontes dissulfeto entre as cisteínas das proteínas e alquilam os enxofres para impedir a formação das pontes dissulfeto. Após o tratamento, os géis foram lavados com bicarbonato de amônio 50 mM por 20 minutos a 25 °C com 800 rpm de agitação e desidratados com etanol por 10 minutos a 25 °C com 800 rpm de agitação. A etapa de lavagem foi realizada mais uma

vez, seguida de 2 etapas de desidratação nas mesmas condições. Posteriormente, os géis foram desidratados em *Savant SPD131DDA Speed-vac Concentrator* (Thermo Scientific), com pressão de vácuo a 0,1, e adicionado a solução de tripsina 12,5 ng/μL diluída em bicarbonato de amônio 50 mM, volume suficiente cobrir cada gel. Os géis foram mantidos por 20 minutos a 4 °C para hidratação, cobertos com bicarbonato de amônio 50 mM e incubados por 18 horas a 37 °C. Após este período, a atividade da tripsina foi inibida com a adição de ácido trifluoacético, concentração final de 0,5%, e as frações líquidas foram transferidas para um tubo novo. Em seguida, os géis foram incubados com ácido trifluoacético 0,5% e acetonitrila 30% por 10 minutos a 25 °C com 800 rpm de agitação. As frações líquidas foram coletadas e transferidas para o tubo contendo as frações anteriores. Esta etapa foi realizada mais uma vez. Os géis foram incubados com acetonitrila 100 % por 10 minutos a 25 °C com 800 rpm de agitação. As frações líquidas foram coletadas e transferidas para o tubo contendo as frações anteriores. Esta etapa foi realizada mais uma vez.

As frações líquidas, correspondentes aos peptídeos tripticos da amostra, foram concentradas no *Savant SPD131DDA Speed-vac Concentrator* (Thermo Scientific), com pressão de vácuo a 0,1, até reduzir o para 10 a 20 % do volume original. Posteriormente, as soluções foram aplicadas nos StageTip (STop And Go Extraction Tip), previamente lavados com metanol e ácido fórmico 0,1 %, e centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos. Posteriormente, os StageTip foram lavados 2 vezes com ácido fórmico 0,1 % e os peptídeos foram eluídos com 40 μL de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila 40% e recuperados por centrifugação a 1000 x g por 1 minuto. As amostras foram secas no *Savant SPD131DDA Speed-vac Concentrator* (Thermo Scientific), com pressão de vácuo a 0,1, sem aquecimento, e adicionado ácido fórmico 0,1 % e DMSO 5%.

Após este processo, as amostras foram divididas em 3 alíquotas de 5 μL e analisadas por espectrometria de massas. Assim, cada 5 μL foi analisado por cromatografia líquida no cromatógrafo Easy-nLC 1000 da (Thermo Scientific). A separação dos peptídeos foi realizada com gradiente linear de 5 a 40% de acetonitrilo, 5% de DMSO em coluna analítica de 15 cm, com diâmetro interno de 75 μm e partículas de C18 de 3 μm. A cromatografia foi realizada a 60 °C durante 60 minutos. Após o fracionamento, os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray (voltagem de 2,7 kV) e injetados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). O scan inicial foi realizado no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no ion trap. Paralelamente ao MS2, foi realizado um full scan no Orbitrap com uma resolução de

60.000. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 90 segundos. A opção *lock mass* foi utilizada para obtenção de melhor acurácia (erro abaixo de 0,5 p.p.m.) de massa dos peptídeos tripticos precursores detectados por espectrometria de massas.

3.10.8 Processamento dos Dados Obtidos do Espectrômetro de Massas e Análise dos Dados

Os dados brutos obtidos do espectrômetro de massas foram processados com o software *PatternLab for proteomics* (versão 4.0) (PL) (CARVALHO et al., 2016). Os espectros de massas obtidos experimentalmente foram comparados com os espectros teóricos utilizando a ferramenta Comet 2015.2, embutida no PL 4.0, contra o banco de dados que contém sequências do *Trypanosoma brucei* Lister 427, *Trypanosoma brucei* TREU927 do TriTrypDB (ASLETT et al., 2010) (baixado em 31 de outubro de 2016, <http://www.tritrypdb.org/>), e de mais 127 contaminantes comuns a espectrometria de massas (como tripsina, queratina e BSA). Em seguida, para cada sequência do banco foi incluída uma sequência invertida. O banco final continha 40.336 sequências de proteínas. Para reduzir as redundâncias do banco, sequências contidas dentro de outra sequência (com 100% de identidade) foram removidas e as respectivas descrições foram incluídas na descrição da proteína com sequência mais extensa. Os parâmetros para identificar os peptídeos foram: peptídeos tripticos e semi-tripticos com massas entre 600 e 5.500 Da; peptídeos com até 2 sítios de clivagem perdidos; peptídeos com modificação fixa para carbamidometilação na cisteína; peptídeos com modificação variável para oxidação na metionina; tolerância inicial de 40 ppm para íons precursores.

Os resultados foram filtrados utilizando o modulo *Search Engine Processor* do PL (SEPro) (CARVALHO et al., 2012). As identificações foram agrupadas pelo estado de carga (+2 e \geq +3) e pelo número de extremidades clivadas pela enzima (triptico e semi-triptico), resultando em quatro subgrupos distintos. Para cada resultado, os escores de cada métrica (XCorr, DeltaCN e ZScore) foram usados para gerar um discriminador Bayesiano, aceitando 1% de falsas descobertas (*False Discovery Rate*, FDR), estimadas pelo número de identificações de sequências do banco reverso. Sequências com menos de 6 resíduos de aminoácidos foram excluídas da análise. Os resultados foram adicionalmente filtrados para aceitar apenas PSMs com erro de massa inferior a 5 ppm. Proteínas identificadas por um único espectro (*1 hit wonder*) com XCorr abaixo de dois foram excluídas. Este último filtro levou a um FDR global da análise de 1% (BARBOZA et al., 2011). Finalmente, as proteínas foram agrupadas de acordo com a máxima parcimônia (ZHANG; CHAMBERS; TABB, 2007).

A quantificação dos peptídeos foi realizada usando o módulo XIC Extractor do módulo SEProQ do PatternLab. O XIC (*extracted ion chromatograms*) integra a corrente iônica de cada peptídeo durante a eluição cromatográfica. O programa descartou XICs com menos de três leituras de MS1. Em seguida, os dados foram normalizados de acordo com o *Normalized Ion Abundance Factor* (NIAF) (SANTANA et al., 2015). O NIAF é uma adaptação do *Normalized Spectral Abundance Factor* (NSAF). O *Normalized Abundance Factor* (NAF) de uma determinada proteína é calculado pelo somatório dos *spectral counts* dos peptídeos desta proteína dividido pelo número de aminoácidos da mesma proteína. O NSAF de uma proteína é obtido dividindo o NAF da respectiva proteína pelo somatório dos NAFs de todas as proteínas identificadas (ZYBAILOV et al., 2006). O NIAF utiliza o XIC ao invés do *spectral counting* como medida quantitativa. Esta análise é uma quantificação que estima os valores próximos dos valores absolutos de cada proteína presente na amostra.

3.10.9 Busca de Domínios, Predição de Estrutura, Análise de Homologia, Ortologia e Identidade

A homologia indica que diferentes genes de espécies diferentes possuem um ancestral em comum e pode ser verificado pela sequência de DNA comum. Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta Protein Blast (BlastP) (ALTSCHUL et al., 1990), disponível no website: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Os genes com e-value menor do que 1×10^{-10} foram considerados homólogos.

A ortologia indica que genes de espécies diferentes possuem um ancestral em comum e codificam proteínas com mesmas funções e propriedades. Neste caso, esta informação foi verificada no OrthoMCL database (versão 5), incluso no EuPathDB - eukaryotic pathogen database resources (AURRECOECHEA et al., 2013).

Os domínios foram identificados com as ferramentas Protein Blast (BlastP) (ALTSCHUL et al., 1990) e hmmscan (FINN et al., 2015). A hmmscan está disponível no website EBI web server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) e foram utilizados os bancos de dados Pfam, TiGRFAM, Gene3C, Superfamily e PIRSF.

A sequência de aminoácidos foi utilizada para predizer a estrutura da proteína com a ferramenta Phyre2 (KELLEY et al., 2015), para verificar se há proteínas com estrutura semelhante.

O alinhamento e a identidade entre sequências gênicas foram analisados com o software Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), disponível no EBI web server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.10.10 Conjugação dos Nanobodies a Alexa Fluor 488 5-SDP

Após a expressão e purificação dos nanobodies da fração periplasmática, os nanobodies foram concentrados e dialisados com tampão carbonato 100 mM pH 9,0 utilizando Amicon Ultra Centrifugal Filter (Merck Milipore), com membrana NMWL de 10 kDa. Posteriormente, a quantidade de 200 µg foi separada e o volume foi ajustado para 40 µL com tampão carbonato 100 mM pH 9,0. A quantidade de 40 µg de Alexa Fluor 5-SDP foi dissolvida em 4 µL de DMSO e adicionado lentamente ao nanobody. A reação foi incubada por 2 horas, a temperatura ambiente com 50 rpm de agitação e protegido da luz. Após este período, foram adicionados 2 µL de NH₄Cl 50 mM e incubado por 1 hora, em temperatura ambiente com 50 rpm de agitação e protegido da luz. O fluoróforo que não ligou aos nanobodies foi removido por diálise em PBS com a membrana *SnakeSkin Dialysis Tubing* com limite de exclusão de 10 kDa (Thermo Scientific). Após a diálise, os nanobodies conjugados ao fluoróforo foram recolhidos e armazenados a -20 °C.

4 RESULTADOS

4.1 SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE SUB2 NÃO ALTERA A TAXA DE TRANSCRIÇÃO

4.1.2 Análise da Taxa de Transcrição por Citometria de Fluxo: Adaptação do Método, Estratégias e Critérios de Análise do Ensaio

A metodologia de transcrição *in vitro*, também conhecida como *Run-on*, foi descrita por Ullu e Tschudi (1990) para *T. brucei*. O protocolo foi padronizado utilizando o nucleotídeo radioativo α -[³²P]UTP, que é incorporado ao RNA durante o processo de transcrição em células previamente permeabilizadas com L- α -Lysophosphatidylcholine (LPC). Nas condições estabelecidas, os parasitas mantêm principalmente a síntese do SL RNA e de RNAm, que são transcritos pela RNA polimerase II. Para adaptar o protocolo para a análise por citometria de fluxo, inicialmente verificamos qual seria a melhor concentração do detergente L- α -Lysophosphatidylcholine (LPC) (100, 250, 500, 750 e 1000 μ g/mL) e o tempo de tratamento, por 1 ou 2 minutos (dados não mostrados). Consideramos a concentração de 250 μ g/mL LPC por 2 minutos a mais indicada para permeabilizar a membrana nuclear e celular, mantendo a maquinaria de transcrição funcional. Após a permeabilização dos parasitas, a incorporação dos nucleotídeos foi realizada como descrito anteriormente (ULLU; TSCHUDI, 1990), mas substituindo o α -[³²P]UTP por Br-UTP (5-Bromouridine 5'-Triphosphate). Para a detecção do RNA nascente por citometria de fluxo, os parasitas foram lavados com tampão A, fixados com paraformaldeído 4%, lavados com PBS, bloqueados e permeabilizados com tampão B (BSA2%/saponina 1%/PBS). A lavagem com PBS e o tampão B foram padronizados de modo que as células fixadas permaneçam em solução sem aglomerar, o que possibilita a marcação do Br-UTP com o anticorpo anti-BrdUTP e, em seguida, com anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo. Ambos os anticorpos foram diluídos em tampão B. Juntamente com o anticorpo secundário, foi adicionado 2 μ g/ μ L DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol). Acredita-se que o DAPI se ligue ao sulco menor do DNA dupla fita, interagindo preferencialmente com sequências A-T. Este fluoróforo também pode intercalar com outras sequências de DNA ou com RNA dupla fita, emitindo menos fluorescência (KAPUSCINSKI, 1995). Por isto, os parasitas foram tratados com 700U/L de RNase A, enzima que cliva as ligações fosfodiester do RNA (CUCHILLO; NOGUÉS; RAINES, 2011; RAINES, 1998) e degrada o RNA de dupla fita (LIBONATI; SORRENTINO, 2001), eliminando o sinal da interação do DAPI com o RNA

de dupla fita. Consequentemente, o tratamento com RNase A otimizou a marcação definida com DAPI, melhorando a análise do perfil do ciclo celular. Esse tratamento não alterou a detecção do Br-UTP, devido ao *cross-linking* entre as diferentes moléculas da célula realizado com paraformaldeído anteriormente.

Os dados de cada amostra, referentes a 20000 eventos da população celular, foram adquiridos no citômetro FACSCanto II e analisados no programa FlowJo v10.1. Para analisar os dados, primeiramente, uma população de células foi selecionada com os parâmetros FSC (Forward Scatter) vs. SSC (Side Scatter) e chamada de “*T. brucei*” (Figura 4.1A). Desta população, foi selecionada uma sub-população sem agregados de células utilizando os parâmetros DAPI-A vs. DAPI-W (NUNEZ, 2001), definida como “*T. brucei* isolados” (Figura 4.1B). A partir desta população celular, foram realizadas duas análises: Transcrição *in vitro* (Figura 4.1C), referente a quantidade de RNA nascente; e ciclo celular (Figura 4.1D), para determinar as fases do ciclo celular simultaneamente a análise do RNA nascente.

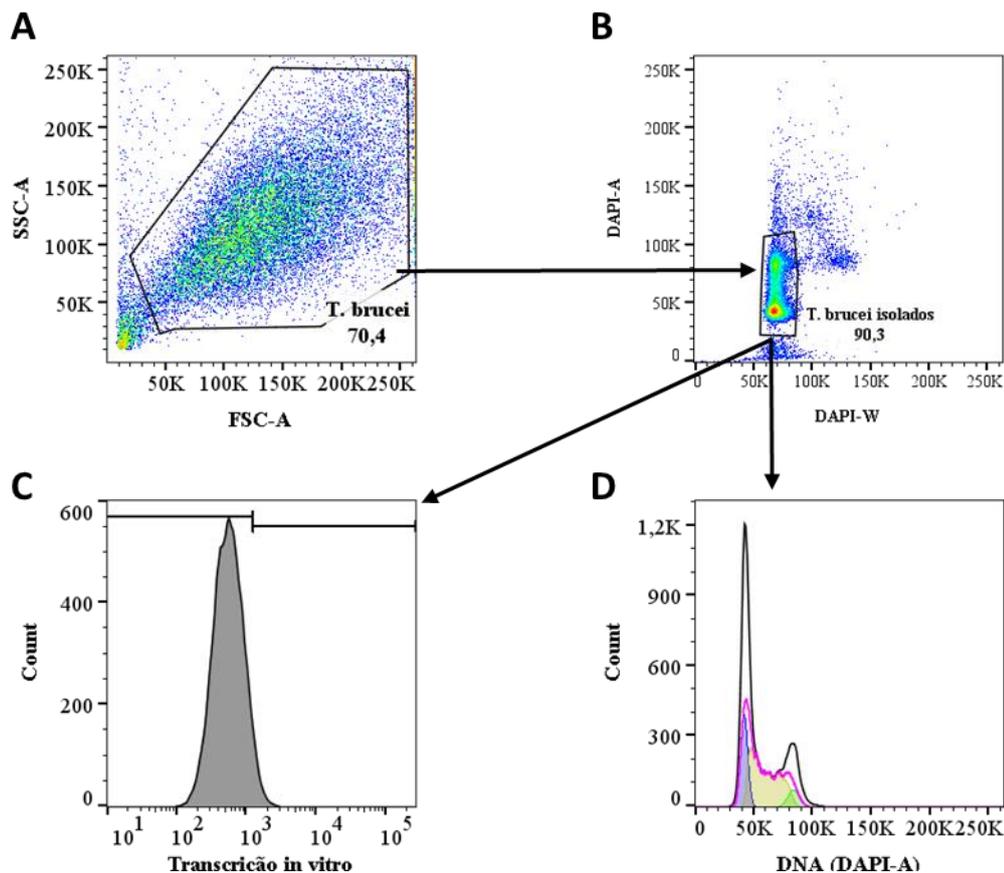


Figura 4.1 - Representação da estratégia de análise da metodologia de transcrição *in vitro* por citometria de fluxo. (A) Seleção dos parasitas *T. brucei*. (B) seleção dos parasitas isolados, sem aglomerados celulares. (C) Análise da taxa de transcrição. (D) Análise do ciclo celular. O experimento foi realizado no FACSCantoII (Becton-Dickinson, San-Jose, USA) e os dados foram analisados no software FlowJo v10.1.

Para validar a especificidade do ensaio, a amostra controle sem nucleotídeos (Controle_sem nucleotídeos), de cada experimento, foi utilizada para estabelecer o que corresponderia ao ruído da metodologia. Na Figura 4.1 está representada a análise dos dados utilizando a amostra Controle_sem nucleotídeos, que passou pelos mesmos procedimentos que as outras, porém não foi adicionado nenhum nucleotídeo durante o processo de transcrição *in vitro*. Esta amostra foi utilizada como controle negativo e estabelecido que 5 % desta amostra seria considerada positiva (*Run-on +*) para determinar a linha de corte, ou seja, o processo de transcrição será considerado positivo quando a intensidade de fluorescência for maior do que esta linha de corte. A mesma análise foi aplicada para as diferentes amostras dos experimentos. A estratégia descrita seleciona somente os parasitas e exclui os restos celulares e os agregados de células. Dados semelhantes podem ser obtidos utilizando outras combinações de parâmetros e populações.

Após a padronização e a definição da análise, três experimentos independentes foram realizados para verificar a reprodutibilidade e validar a metodologia. O desenho experimental consiste em avaliar a transcrição na ausência (transcrição normal – *Run-on*) e na presença de 75 µg/mL de alfa-amanitina (transcrição inibida – controle_alfa-amanitina), droga que inibe as diferentes RNA polimerases de acordo com a concentração. Neste trabalho foi utilizada a concentração de 75 µg/mL que inibe especificamente a RNA polimerase II (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; GÜNZL et al., 1997; LAIRD et al., 1985).

Nestes experimentos, além das amostras com a transcrição normal e inibida, foram feitos os controles: sem nenhum anticorpo (Controle_sem anticorpo), somente com o anticorpo secundário (Controle_secundário), sem nucleotídeos (Controle_sem nucleotídeos) e com UTP em vez de Br-UTP (Controle_UTP). A Figura 4.2 representa os resultados obtidos por citometria de fluxo de um dos experimentos. Os resultados mostram que a metodologia é eficiente para detectar as células transcricionalmente ativas, comparando com as células que tiveram o processo de transcrição inibido (Figura 4.2A e B). Os dados dos três experimentos estão representados como média e desvio padrão na Figura 4.2C. A partir destes dados, foi realizado a análise estatística utilizando o teste ANOVA e comparação múltipla de Tukey e a amostra *Run-on* é estatisticamente diferente de todos os controles utilizados (***: $P \leq 0,001$).

Os dados numéricos dos 3 experimentos estão representados na Tabela 4.1: valor da média da porcentagem de células “*Run-on +*”, da mediana da intensidade de fluorescência e da razão da mediana da intensidade de fluorescência em relação a amostra Controle_Sem

nucleotídeos. Nas três análises, observa-se que os valores da amostra *Run-on* são significativamente maiores do que as outras amostras.

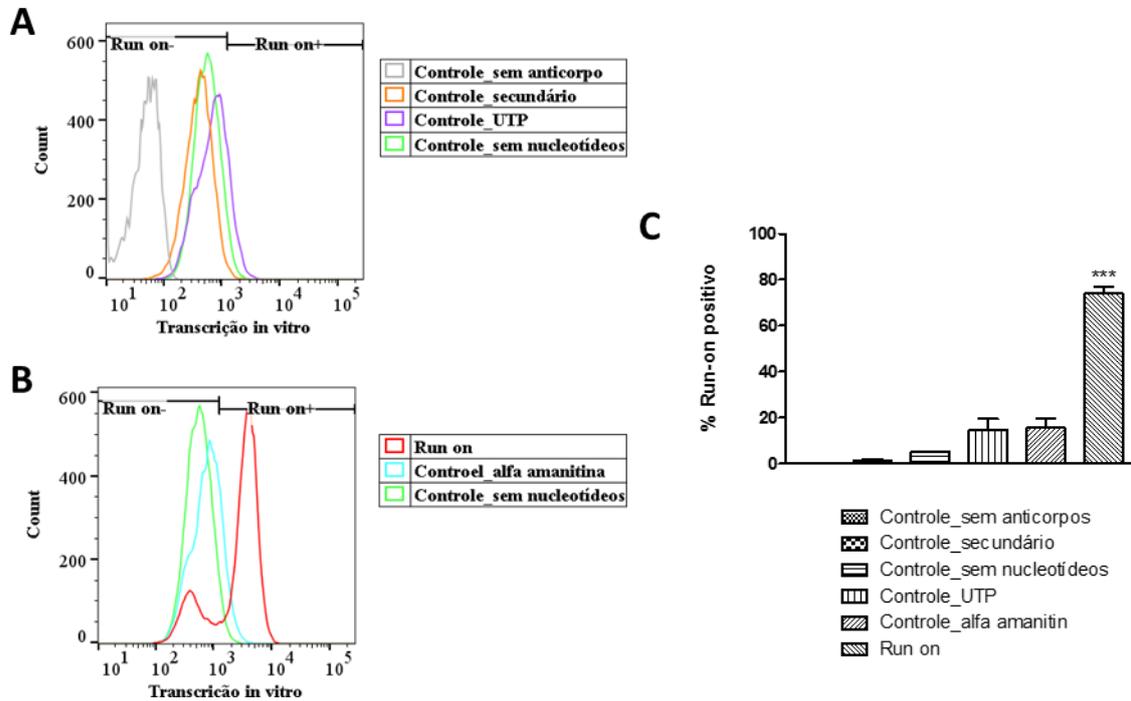


Figura 4.2 – Ensaio de transcrição *in vitro* e análise por citometria de fluxo. (A) Controles do experimento. A gate para quantificar as células com RNA nascente foi delimitada a partir da amostra preparada sem nucleotídeos (Controle sem nucleotídeos). (B) RNA nascente foi detectado em torno de 70 % das células na amostra chamada de *Run-on*. Alfa-amanitina (75 µg/mL) foi utilizada como controle para inibir a atividade da RNA polimerase II (Controle alfa amanitina). O experimento foi realizado no FACSCantoII (Becton-Dickinson, San-Jose, USA) e os dados foram analisados no software FlowJo v10.1. (C) Análise estatística do ensaio, considerando a média de 3 experimentos independentes. Os dados foram analisados utilizando ANOVA e comparação múltipla de Tukey. ***: $P \leq 0,001$.

Tabela 4.1 - Dados numéricos obtidos das análises por citometria de fluxo (média de 3 experimentos independentes).

Amostra	% <i>Run-on</i> +	Desvio padrão	Média da intensidade do sinal	Média amostra/ controle sem nucleotídeos
Controle sem anticorpo	0.00	0	51.90	0.08
Controle Sem nucleotídeos	5.02	0.03	658.67	1.00
Controle UTP	14.63	4.73	915.33	1.39
Controle secundário	1.29	0.62	538.67	0.82
Controle alfa amanitina	15.47	4.21	934.33	1.42
<i>Run-on</i>	74.03	2.94	4456.33	6.77

Fonte: a autora.

Os dados indicam que $74,03 \% \pm 2,94$ (média \pm SD) dos parasitas, em fase exponencial de crescimento, estão transcrevendo RNA pela RNA polimerase II. O tratamento com α -amanitina reduziu para $15,47 \% \pm 4,20$ (média \pm SD) a frequência de células com atividade da RNA polimerase II. Comparando com os controles, também se observa a especificidade dos reagentes. Com bases nestes resultados, podemos concluir que o Br-UTP é incorporado ao RNAm e o anticorpo anti-Bromo reconhece especificamente esta molécula, pois a concentração da droga α -amanitina utilizada inibe a síntese de RNAm pela RNA polimerase II.

Devido a disponibilidade de outros equipamentos para quantificar a fluorescência de moléculas, decidimos avaliar o protocolo estabelecido por sistema de imagem de alta performance (*high-content imaging system*). Para isto, as mesmas amostras foram depositas em placa de 96 poços e as imagens foram adquiridas no plano focal do núcleo celular, baseado no sinal do DAPI. Posteriormente, ao analisar as imagens, os núcleos celulares foram selecionados, excluindo fragmentos e aglomerados celulares. Foi analisada a intensidade de fluorescência referente ao RNA nascente dos núcleos celulares e a porcentagem de células positivas acima do ruído da metodologia. O ruído foi definido baseado na fluorescência da amostra controle sem nucleotídeo (Controle_sem nucleotídeos), como na análise por citometria de fluxo. A estratégia da análise está representa na Figura 4.3 para as amostras Controle_sem nucleotídeos (Figura 4.3A) e *Run-on* (Figura 4.3B).

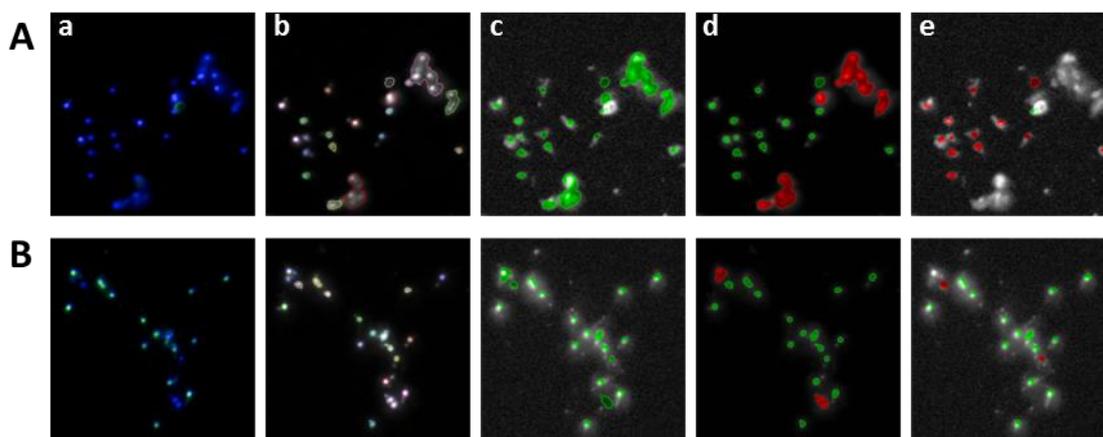


Figura 4.3 - Representação da estratégia de análise por sistema de imagem de alta performance. (A) amostra Controle_sem nucleotídeos. (B) Amostra Run-on. (a) Imagem adquirida no PerkinElmer Operetta high-content imaging system. DNA corado com DAPI (azul) e RNA nascente detectado com anticorpo anti-bromo e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). (b) identificação dos núcleos (linhas coloridas) com o algoritmo “Find nucleus” (método C) com o sinal do DAPI. (c) Núcleos selecionados, excluindo os núcleos das bordas da imagem (não há núcleos nas bordas desta imagem). (d) A partir dos núcleos selecionados em (c), os núcleos isolados foram selecionados utilizando critérios de morfologia. (e) A partir dos núcleos isolados, foram identificados os núcleos com RNA nascente com o sinal de Alexa Fluor 488. Nas imagens (c), (d) e (e), as

marcações em vermelho indicam que o evento foi excluído e as marcações em verde foram selecionadas. As imagens foram adquiridas no PerkinElmer Operetta high-content imaging system e analisadas no software Harmony 3.5.

As imagens obtidas permitem visualizar a localização e o sinal dos fluoróforos (Figura 4.4). Na amostra *Run-on* (Figura 4.4A), observa-se que o RNA nascente está presente no núcleo da célula, colocalizando com a marcação do DNA nuclear, ambos os sinais com alta intensidade. A amostra Controle_alfa-amanitina (Figura 4.4B) mostra que o tratamento inibe a transcrição realizada pela RNA polimerase II, pois 75 $\mu\text{g/mL}$ de alfa-amanitina inibe a atividade desta enzima (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; GÜNZL et al., 1997; LAIRD et al., 1985), indicando a especificidade do método para a marcação e detecção de RNA mensageiro.

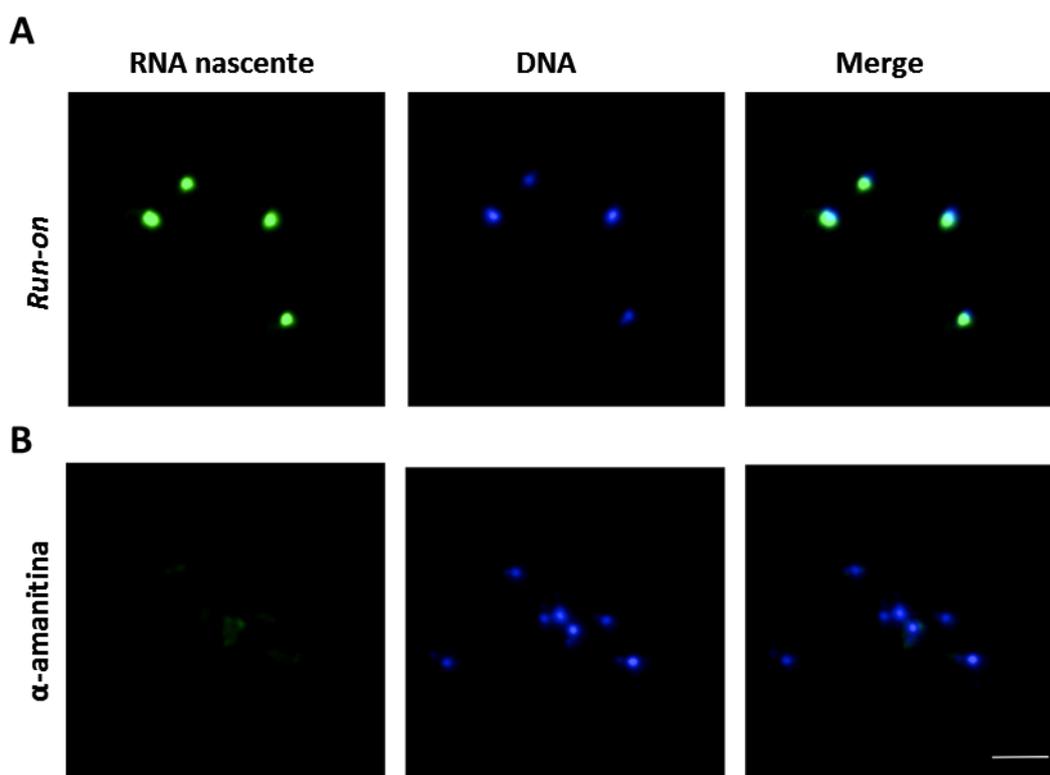


Figura 4.4 - Localização nuclear do RNA nascente visualizado por sistema de imagem de alta performance. (A) Amostras *Run-on* com RNA nascente localizado na região do núcleo. (B) amostra tratada com 75 $\mu\text{g/mL}$ α -amanitina, para inibir a atividade da RNA polimerase II. RNA nascente detectado com anticorpo anti-bromo e anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde) e DNA corado com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas no PerkinElmer Operetta high-content imaging system. Barra: 10 μm .

Dois experimentos independentes foram analisados pelo sistema de imagem de alta performance e a porcentagem de células com RNA nascente detectado é semelhante a

porcentagem obtida por citometria de fluxo, também com significância estatística ($P \leq 0.001$) e reprodutibilidade altas, como observado no gráfico (Figura 4.5).

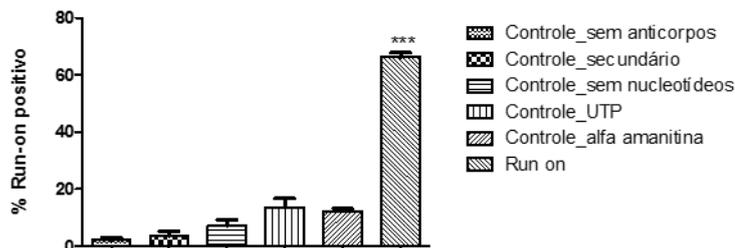


Figura 4.5 – Análise estatística dos dados de transcrição *in vitro* obtidos por sistema de imagem de alta performance. As imagens foram adquiridas no PerkinElmer Operetta high-content imaging system e analisadas no software Harmony 3.5. Análise estatística do ensaio, considerando a média de 2 experimentos independentes, utilizando ANOVA e comparação múltipla de Tukey. ***: $P \leq 0,001$.

A partir da metodologia estabelecida para ensaios de transcrição em células permeabilizadas associada a análise por citometria de fluxo, foi possível também estabelecer a análise de ciclo celular, ampliando a possibilidade de uma análise multiparamétrica para tripanossomatídeos. Neste caso, o DNA foi quantificado a partir da aquisição do sinal de fluorescência do DAPI, simultaneamente a aquisição da fluorescência referente ao RNA nascente (Alexa Fluor 488). A estratégia de análise dos dados para obter o perfil do ciclo celular da amostra está representada na Figura 4.1.

Para validar o ensaio de ciclo celular com DAPI, o resultado da amostra *Run-on* foi comparado com a coloração do DNA com iodeto de propídeo (PI), que é normalmente utilizada nos ensaios de ciclo celular. Neste caso, a amostra seguiu as etapas iniciais do protocolo de transcrição *in vitro*, porém após a incubação com Br-UTP, a amostra foi suspensa em PBS e incubada com o mesmo volume de solução de iodeto de propídeo 2X. Posteriormente, o dado foi adquirido por citometria de fluxo, as células isoladas foram selecionadas nos parâmetros PI-A vs. PI-W e definido o perfil do ciclo celular destas células.

O histograma das amostras coradas com DAPI (Figura 4.6A) e PI (Figura 4.6B) foi analisado com o modelo de Watson para definir as fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). Três

amostras independentes foram analisadas em cada protocolo e a Figura 4.6C mostra a média da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular.

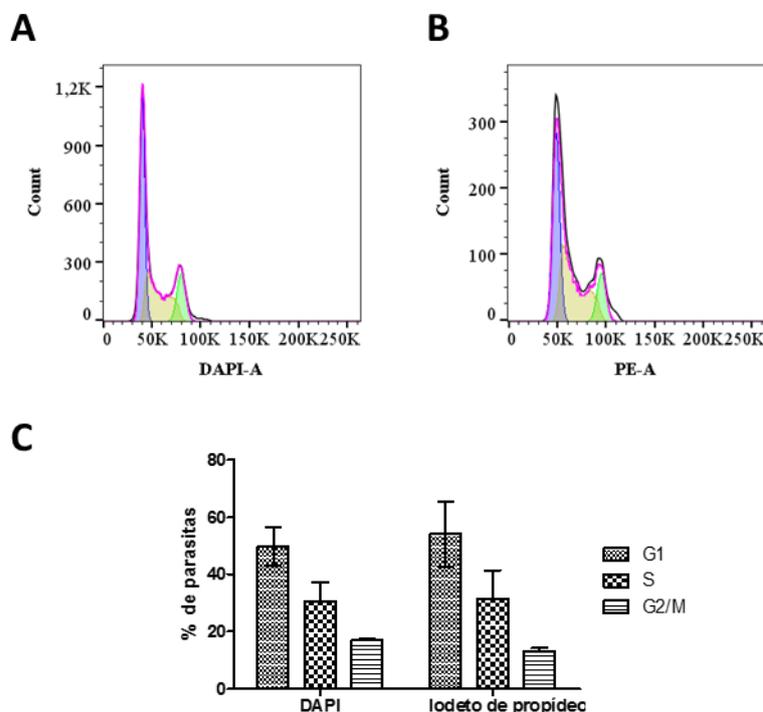


Figura 4.6 - Validação da coloração com DAPI para análise de ciclo celular com o protocolo de transcrição *in vitro*. Histograma representativo das amostras coradas com DAPI (A) e iodeto de propídeo (B) com o modelo de Watson (linha rosa). A quantidade de fluorescência está diretamente relacionada a quantidade de DNA, sendo que 40K (roxo) corresponde a fase G1, 80K (verde) corresponde a G2 e a população intermediária (amarelo), a fase S. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCantoII (Becton-Dickinson, San-Jose, USA) e analisados no software FlowJo v10.1. (C) Frequência das células (média \pm SD) nas fases G1, S, G2/M de três experimentos independentes.

Ambas colorações apresentaram resultados semelhantes. Como esperado, parasitas na fase G1 e S do ciclo celular são predominantes na população de parasitas em fase exponencial de crescimento.

A Tabela 4.2 mostra os dados numéricos das duas metodologias, representados pela média e desvio padrão de três experimentos independentes. Todos os parâmetros analisados possuem baixo desvio padrão (SD), indicando reprodutibilidade entre os experimentos realizados. Além disso, ambas metodologias apresentam valor próximo a 2 para a razão do pico de G2 em relação ao pico de G1 (G2/G1 MFI: razão da média da intensidade de fluorescência da população G2 em relação a G1 na Tabela 4.2), indicando a estequiometria e linearidade dos corantes. O coeficiente de variação da fluorescência de G1 (CV de G1 na Tabela 4.2), indicativo

da acurácia do método, também é similar nos dois casos. Portanto, a coloração com DAPI apresenta resultados semelhantes a coloração com PI, nas condições descritas.

Tabela 4.2 - Dados numéricos do ciclo celular das amostras coradas com DAPI e PI

	DAPI	PI
% G1	49.77 ± 6.66	54.17 ± 11.35
% S	30.5 ± 6.69	31.63 ± 9.88
% G2	16.9 ± 0.75	13.17 ± 1.16
G1 MFI	45356 ± 6137	47409 ± 844
G2 MFI	89916 ± 12642	93105 ± 2727
G2/G1 MFI	1.98 ± 0.03	1.96 ± 0.03
CV de G1	10.60 ± 1.41	9.49 ± 2.67
CV de G2	9.25 ± 2.64	7.28 ± 1.89

Fonte: a autora.

A citometria de fluxo permite adquirir simultaneamente diferentes informações da mesma população de células. Portanto, a citometria de fluxo permitiu adquirir os dados referentes a transcrição *in vitro* e ao ciclo celular no mesmo experimento. Neste caso, obtivemos a taxa de transcrição *in vitro* (Figura 4.7A) e o perfil do ciclo celular (Figura 4.7B) da mesma amostra. Como os dois dados foram adquiridos simultaneamente, é possível representar os dois parâmetros no mesmo gráfico (Figura 4.7C), podendo concluir que a população celular sem transcrição ativa (“*Run-on -*”, baixo sinal no eixo Y) está predominantemente na fase G1 do ciclo celular (baixo sinal no eixo X). Este resultado também pode ser representado como na Figura 4.7D, ao analisar o ciclo celular das subpopulações “*Run-on -*” e “*Run-on +*” (Figura 4.7A), comparando com a população total.

Esta análise mostra que as células transcricionalmente ativas (*Run-on +*) estão distribuídas nas três fases do ciclo celular, enquanto que a maioria das células sem atividade transcricional (*Run-on -*) estão na fase G1 do ciclo. A metodologia e os dados obtidos não permitem explorar a relação biológica entre a fase G1 do ciclo celular e ausência da atividade transcricional. Outros estudos são necessários para investigar esta relação.

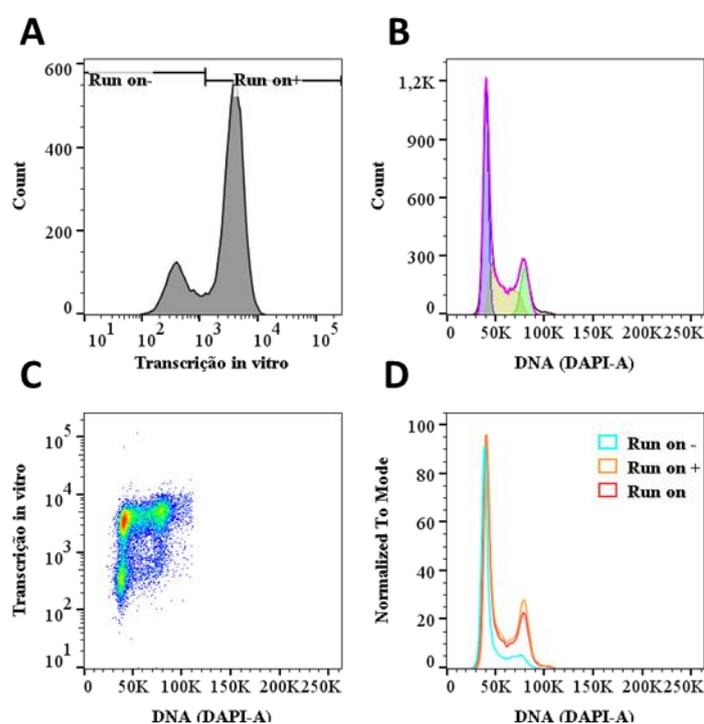


Figura 4.7 - Análise simultânea do ciclo celular e da transcrição em células permeabilizadas. (A) A população total foi subdividida em “Run-on +” e “Run-on -”. (B) Perfil do ciclo celular de toda a população representada em (A). (C) Representação da taxa de transcrição e do ciclo celular da população total, representada em A. (D) Perfil do ciclo celular da população total (vermelho), Run on- (azul) e Run on+ (laranja).

Devido às características da metodologia descrita e à capacidade de a citometria de fluxo analisar diversos parâmetros simultaneamente, acreditamos que outros anticorpos podem ser adicionados para analisar a expressão das proteínas de interesse simultaneamente.

4.1.2 Análise da Taxa de Transcrição após o Silenciamento de Sub2

Anteriormente, demonstramos que o silenciamento de Sub2 retém o RNAm no núcleo (SERPELONI et al., 2011b), acumula o SL RNA e diminui a estrutura em Y, subproduto do *trans splicing* (HIRAIWA, 2012), após 48 e 36 horas de indução do silenciamento, respectivamente. Além disso, verificamos que o SL RNA está metilado e poderia ser utilizado para o processamento do pré-RNAm por *trans splicing*, portanto, o acúmulo de SL RNA não foi devido a defeitos no seu processamento (HIRAIWA, 2012). Baseado nestes dados, decidimos avaliar se o acúmulo do SL RNA, causado pelo silenciamento de Sub2, poderia ser devido ao bloqueio da transcrição de pré-RNAm. Para isto, o silenciamento da expressão da

proteína foi induzido por RNAi durante 48 horas de cultivo da cepa TbSub2-RNAi (SERPELONI et al., 2011b), antes de realizar a metodologia de transcrição *in vitro*. Esta amostra, denominada de RNAi I (transcrição *in vitro* após a indução do RNAi), foi comparada com a amostra sem a indução do RNAi, denominada de RNAi NI (transcrição *in vitro* sem a indução do RNAi). Além disso, como controle, foram analisadas as amostras tratadas com sinefungina, droga que inibe o processamento do RNAm em tripanossomatídeos, por 4 (sinefungina_4 minutos) ou 15 minutos (sinefungina_15 minutos) antes da etapa de incorporação dos nucleotídeos descrita na metodologia de transcrição *in vitro*. Como o processo de transcrição foi previamente padronizado sem o intervalo de 15 minutos, adicionado devido ao tratamento com sinefungina, as amostras RNAi I_15 minutos e RNAi NI_15 minutos foram adicionadas para verificar se a transcrição permaneceria funcional com a adição de 15 minutos de incubação em tampão de transcrição antes da incorporação dos nucleotídeos.

Foram realizados três experimentos de forma independente e analisados como descrito anteriormente. Os gráficos de um experimento estão representados na Figura 4.8. A média e o desvio padrão obtido dos experimentos foram plotados no gráfico da Figura 4.9.

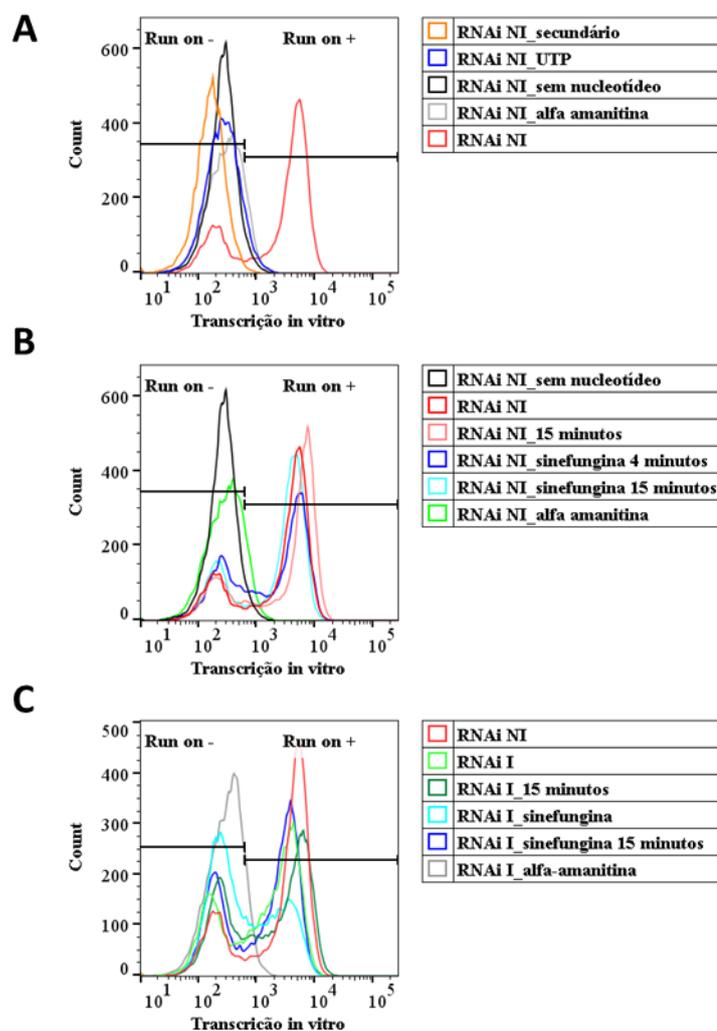


Figura 4.8 – Análise da taxa de transcrição *in vitro*, por citometria de fluxo, após o silenciamento de Sub2 de *T. brucei*. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes para avaliar se Sub2 está relacionada com o processo de transcrição em *T. brucei*. (A) Controles do experimento. A gate para quantificar as células com RNA nascente foi delimitada a partir da amostra preparada sem nucleotídeos (Controle sem nucleotídeos). (B) RNA nascente das amostras sem a indução do RNAi. (C) RNA nascente das amostras com indução do RNAi, comparado com a amostra RNAi NI. Alfa-amanitina (75 µg/mL) e sinefungina (1 µg/mL) foram utilizadas como controle para inibir a atividade da RNA polimerase II e do processamento do RNA por *trans splicing*, respectivamente. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCantoII (Becton-Dickinson, San-Jose, USA) e analisados no software FlowJo v10.1

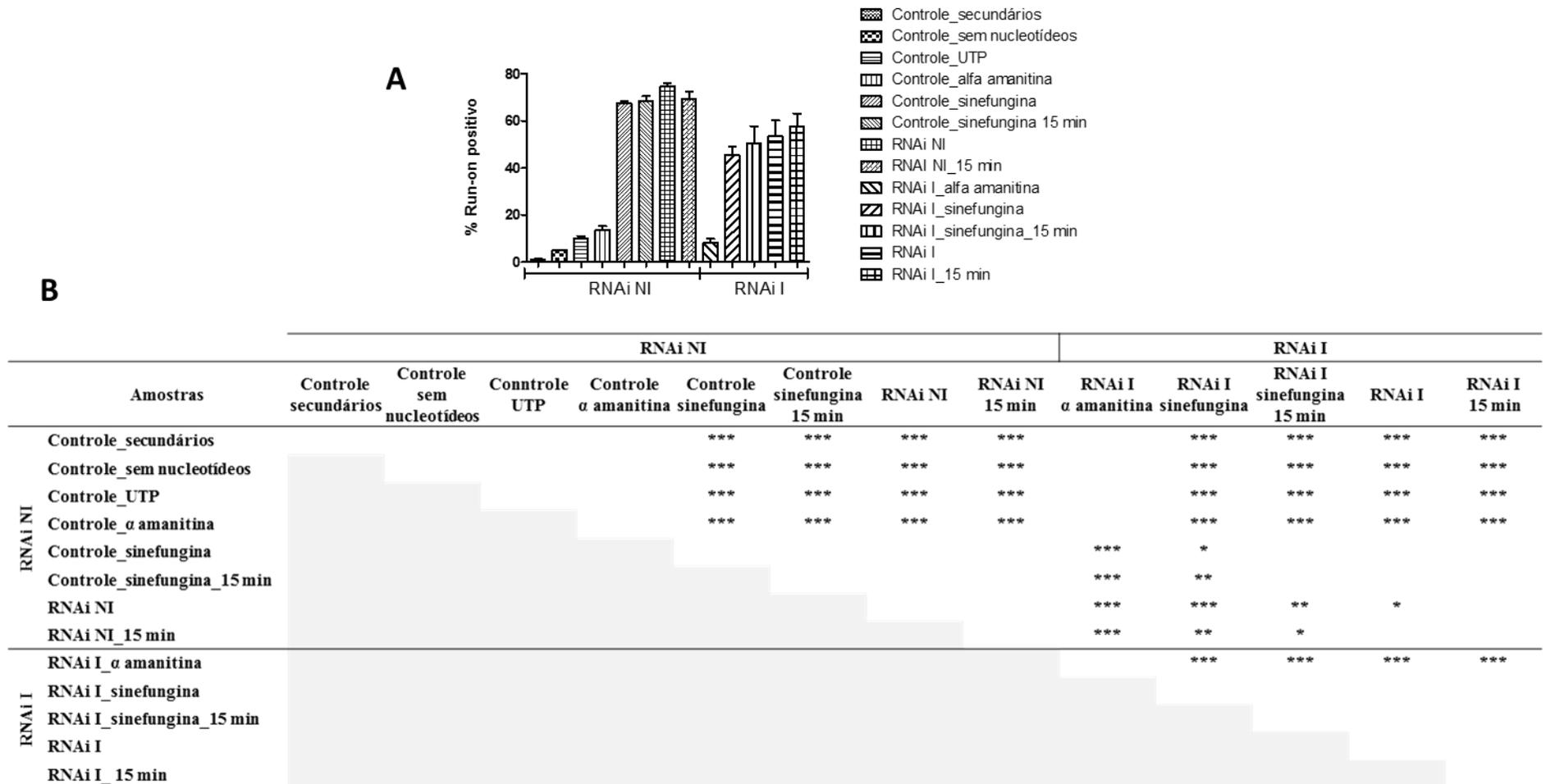
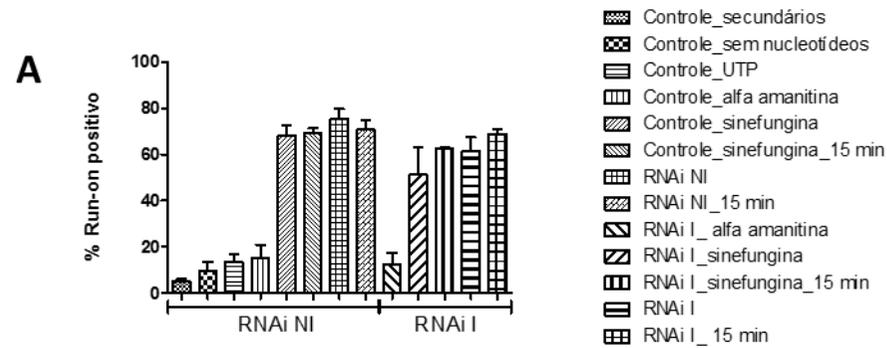


Figura 4.9 - O silenciamento de Sub2 de *T. brucei* não altera a taxa de transcrição. Análise estatística do ensaio realizado por citometria de fluxo, considerando a média de 3 experimentos independentes. Os dados foram obtidos no FACSCantoII (Becton-Dickinson, San-Jose, USA) e analisados no software FlowJo v10.0.7. A análise estatística foi realizada com ANOVA e comparação múltipla de Tukey. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

Para confirmar os dados obtidos por citometria de fluxo, dois experimentos independentes foram analisados pelo sistema de imagem de alta performance e estão representados na Figura 4.10. O terceiro experimento foi excluído das análises devido ao baixo número de células isoladas detectadas nos campos analisados.



B

Amostras	RNAi NI							RNAi I					
	Controle secundários	Controle sem nucleotídeos	Controle UTP	Controle α amanitina	Controle sinefungina	Controle sinefungina 15 min	RNAi NI	RNAi NI 15 min	RNAi I α amanitina	RNAi I sinefungina	RNAi I sinefungina 15 min	RNAi I	RNAi I 15 min
Controle_secundários					***	***	***	***		***	***	***	***
Controle_sem nucleotídeos					***	***	***	***		***	***	***	***
Controle_UTP					***	***	***	***		**	***	***	***
Controle_alfa amanitina					***	***	***	***		**	***	***	***
Controle_sinefungina									***				
Controle_sinefungina_15 min									***				
RNAi NI									***				
RNAi NI_15 min									***				
RNAi I_alfa amanitina										**	***	***	***
RNAi I_sinefungina													
RNAi I_sinefungina_15 min													
RNAi I													
RNAi I_15 min													

Figura 4.10 - O silenciamento de Sub2 de *T. brucei* não altera a taxa de transcrição. Análise estatística do ensaio realizado por sistema de imagem de alta performance, considerando a média de 2 experimentos independentes. Os dados foram obtidos no PerkinElmer Operetta high-content imaging system e analisadas no software Harmony 3.5. A análise estatística foi realizada com ANOVA e comparação múltipla de Tukey. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

Os dados de RNA nascente obtidos com os dois sistemas de análise são muito semelhantes, com significância estatística e reprodutibilidade altas, como demonstrado nos gráficos. A amostra com RNAi de Sub2 induzido e tratada com sinefungina por 4 minutos (RNAi I_sinefungina) apresenta uma variação estatística entre os dados adquiridos pelos dois sistemas (Figura 4.9B e 4.10B), sendo significativamente diferente das amostras controles RNAi_NI e Controle_sinefungina (4 e 15 minutos) nos dados de citometria de fluxo. Porém estas amostras controles apresentam menor diferença estatística com a amostra com RNAi de Sub2 induzido e tratada com sinefungina por 15 minutos (RNAi I_sinefungina_15 min). A redução da taxa de transcrição da amostra RNAi I_sinefungina (4 minutos com a droga) provavelmente não é devido ao efeito da droga, pois a amostra RNAi I_sinefungina_15 min foi incubada com a droga por um período maior e não teve o efeito semelhante ou acentuado. Possivelmente, esta alteração na taxa de transcrição foi devido a um efeito inespecífico durante a laboriosa metodologia de transcrição *in vitro*.

A partir destas análises, observa-se que o silenciamento da proteína Sub2 (RNAi I ou RNAi I_15minutos) não altera a taxa de transcrição de forma estatisticamente significativa, sendo que o efeito causado pela depleção de Sub2 é semelhante as amostras sem o silenciamento da expressão da proteína (RNAi NI, RNAi NI_15 minutos) e das amostras tratadas com sinefungina, inibidor do *trans splicing*. Estas amostras são estatisticamente diferentes das amostras Controle_sem nucleotídeos, Controle _UTP, Controle_secundários e RNAi I_alfa amanitina.

As imagens obtidas com sistema de imagem de alta performance permitem visualizar a localização e o sinal dos fluoróforos correspondentes a proteína Sub2 e ao RNA nascente (Figura 4.11A). Na amostra RNAi NI, a proteína Sub2 e o RNA nascente estão presentes no núcleo da célula. Na amostra RNAi I, a intensidade da fluorescência corresponde a Sub2 é inferior à da amostra RNAi NI, como pode ser visualizado na foto (Figura 4.11A) e nos gráficos (Figura 4. 11B), porém o RNA nascente continua sendo detectado com intensidade semelhante nas duas amostras. Outra observação foi que o tratamento com sinefungina não altera a detecção do RNA nascente, porém o tratamento com α -amanitina diminui a detecção do RNA nascente.

A expressão de Sub2 também foi quantificada simultaneamente a análise de RNA nascente por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 4.11C, a quantidade de

proteína Sub2 diminuiu após a indução do RNAi (RNAi I), comparada com a amostra sem induzir silenciamento (RNAi NI).

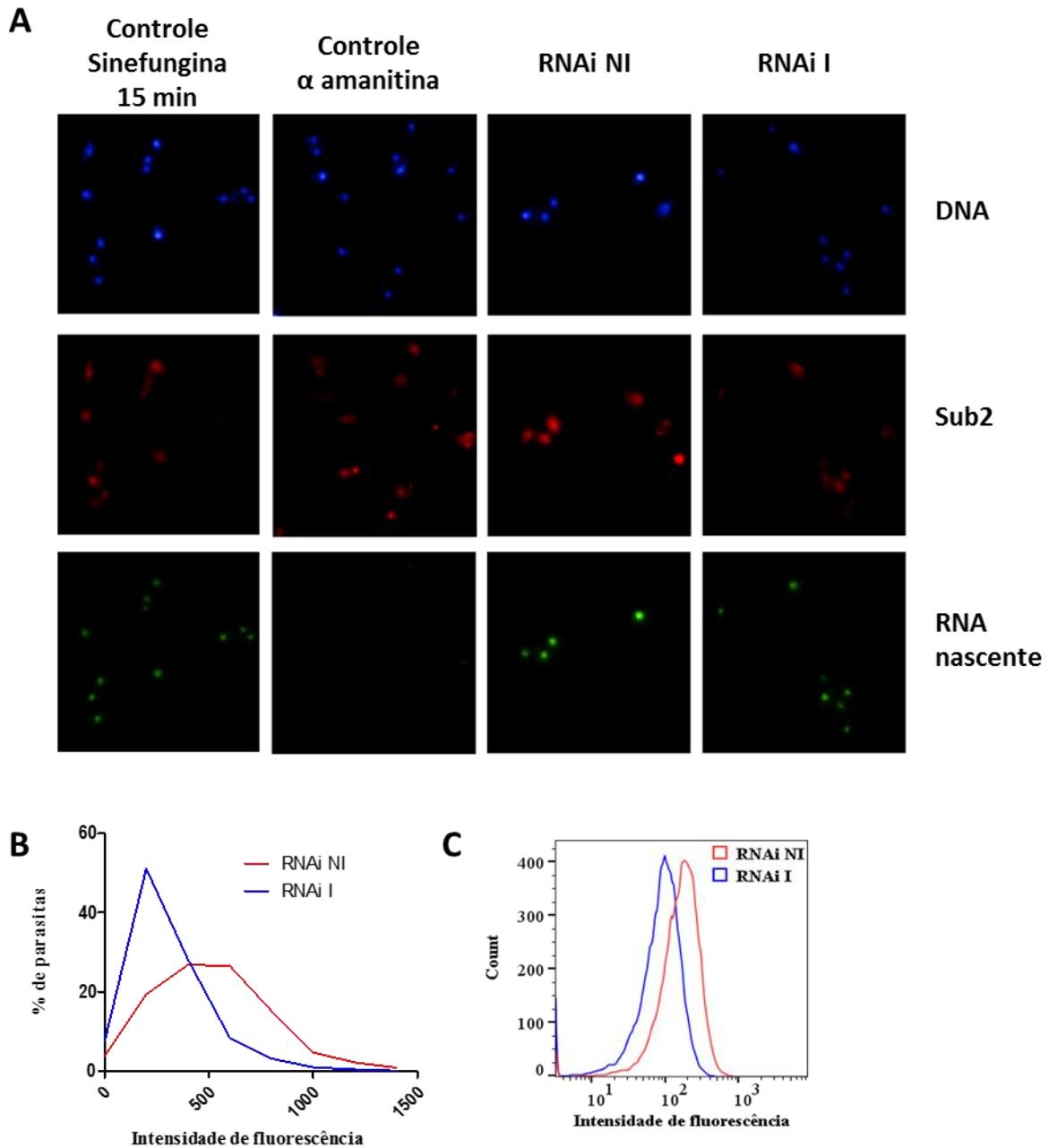


Figura 4.11 - Localização nuclear da proteína Sub2 e do RNA nascente. (A) Imagem das amostras adquiridas no PerkinElmer Operetta high-content imaging system. Barra: 10 μ m. (B e C) Quantificação da expressão de Sub2 nas amostras RNAi NI e RNAi I. Os dados foram obtidos simultaneamente ao ensaio de transcrição *in vitro* por sistema de imagem de alta performance (B) e citometria de fluxo (C).

Além da atividade transcricional, o ciclo celular também foi analisado simultaneamente por citometria de fluxo (Apêndice B), sendo que o silenciamento de Sub2 também não altera de forma significativa a porcentagem de células em cada fase do ciclo neste período analisado,

portanto o silenciamento de Sub2 após 48 horas não altera o perfil do ciclo celular, corroborando o resultado descrito anteriormente, utilizando o protocolo clássico com iodeto de propídeo (SERPELONI et al., 2011b).

Concluindo, os dados indicam que apesar de Sub2 ser essencial para a sobrevivência do parasita, a proteína não está relacionada com a maquinaria de transcrição e regulação do ciclo celular. O efeito letal causado pelo silenciamento deve ser, principalmente, devido ao bloqueio do *trans splicing* (HIRAIWA, 2012) e da exportação do RNAm (SERPELONI et al., 2011b).

4.2 PROTEÍNAS QUE PERTENCEM AO MESMO COMPLEXO PROTEICO QUE SUB2 SÃO CONSERVADAS APENAS EM KINETOPLASTÍDEOS

Antes de descrever os resultados desta etapa, é necessário relatar que diversos protocolos de lise, cromatografia de exclusão de tamanho e imunoprecipitação foram realizados com parasitas expressando a proteína Sub2 fusionada a etiqueta PTP [TbSub2-PTP (HIRAIWA, 2012)] e GFP [TbSub2-GFP (Apêndice D)], ambas etiquetas na região C-terminal. Diferentes tampões e condições de lise foram testadas e alguns testes foram realizados com *cross linking* por formaldeído. Os resultados de cromatografia indicavam que a proteína permanecia em complexo em algumas condições. Portanto, tentamos enriquecer o complexo proteico de Sub2 por imunoprecipitação, com previa separação por cromatografia ou não. Duas formas de analisar a eficiência do protocolo de imunoprecipitação foram aplicadas. Uma delas era verificar se a proteína Sub2 estava enriquecida e se era possível observar a presença de algumas proteínas a mais na amostra da imunoprecipitação de Sub2 em relação ao controle em gel SDS-PAGE corado com prata. Dificilmente, observa-se proteínas específicas na amostra da imunoprecipitação de Sub2. Por isso, algumas amostras foram analisadas por proteômica, a segunda forma de análise. Após o processamento dos dados de proteômica, quando a proteína Sub2 não era a proteína mais abundante, concluíamos que as condições do ensaio não estavam adequadas para imunoprecipitar o complexo proteico. Em alguns casos, a proteína Sub2 era a mais representada, porém poucas proteínas eram identificadas ou as proteínas não possuíam funções relacionadas, indicando que o complexo ainda não estava estável nas condições testadas e que as proteínas identificadas deveriam ter permanecido nas amostras devido a interações inespecíficas.

Os ensaios de imunoprecipitação com proteínas fusionadas a etiquetas geralmente são mais eficientes do que soros policlonais para evitar interações inespecíficas. Entretanto, devido

à ausência de resultados conclusivos com a proteína Sub2 fusionada a etiquetas na região C-terminal, acreditamos que a etiqueta estava desestabilizando as interações durante os ensaios de imunoprecipitação. Por isso, optamos por obter linhagens de parasita expressando a proteína Sub2 fusionada a etiqueta PTP na região N-terminal (TbSub2-PTP-N) para os ensaios de imunoprecipitação e, com base nos mesmos critérios descritos acima, obtivemos resultados conclusivos com esta linhagem.

4.2.1 Construção da Linhagem TbSub2-PTP-N

O vetor PN-PURO-PTP (SCHIMANSKI; NGUYEN; GÜNZL, 2005) foi modificado para adicionar a sequência que codifica a etiqueta PTP na extremidade 5' do locus de Sub2. A etiqueta PTP contém dois domínios de ligação à imunoglobulina G (IgG) da proteína A (ProtA) de *Staphylococcus aureus*, um sítio de clivagem pela protease do vírus etch do tabaco (*tobacco etch virus* - TEV) e um epítipo de 12 aminoácidos da proteína C (ProtC) (SCHIMANSKI; NGUYEN; GÜNZL, 2005). Esta combinação ProtA-TEV-ProtC permite purificar a proteína fusionada à etiqueta por duas cromatografias de afinidade utilizando os epítopos proteína A e proteína C. Neste trabalho foi realizado somente a cromatografia de afinidade utilizando os domínios da proteína A.

Para obter a construção para a fusão N-terminal em Sub2, a região correspondente a extremidade 5' da região codificadora de Sub2 foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos TbSub2N-F e TbSub2N-R. O produto desta amplificação, de 357 nucleotídeos, e o vetor PN-PURO-PTP foram digeridos com as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI* (Figura 4.12A e B) e purificados do gel. O produto de PCR e o vetor foram ligados e transformados em bactérias *E. coli* DH5 α . Os clones foram selecionados por análise de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos pN-F e pN-R, que anelam no vetor, adjacente a região onde Sub2 foi inserido (Figura 4.12C e D). Destes clones, somente o clone pN-PTP-Sub2-PURO #11 amplificou um produto com o tamanho esperado de 602 nucleotídeos, correspondente a sequência da extremidade 5' de Sub2 (357) flanqueada pelas sequências do vetor (245). A orientação do gene

foi analisada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Sub2N-F e pN-R e Sub2N-R e pN-F e comprovou-se que Sub2 está na mesma orientação que a etiqueta PTP (Figura 4.12E e F).

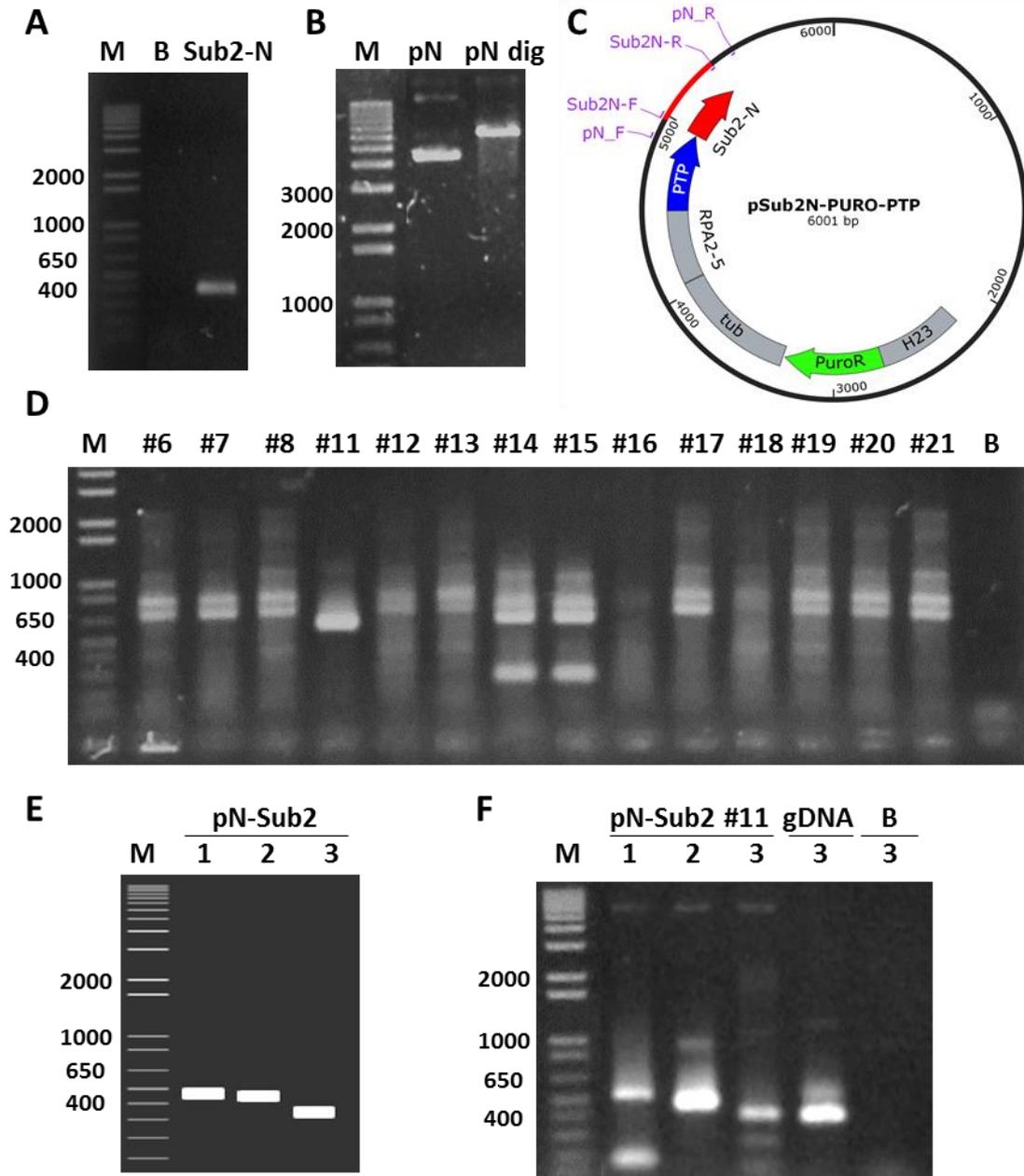


Figura 4.12 - Clonagem da região 5' de Sub2 de *T. brucei* no vetor PN-PURO-PTP. (A) Produto de PCR da região 5' de Sub2 (Sub2-N). (B) Vetor PN-PURO-PTP digerido com as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI* (pN dig), comparado com o vetor não digerido (pN). (C) Representação do vetor pN-PTP-Sub2-PURO esperado. (D) Análise dos clones pN-PTP-Sub2-PURO por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos pN-F e pN-R. Após a PCR, espera-se obter um fragmento de 602 nucleotídeos. (E) Representação das PCR utilizando os oligonucleotídeos 1 (Sub2N-F e pN-R) e 2 (pN-F e Sub2N-R) e 3 (Sub2N-F e Sub2N-R) para verificar a inserção e orientação do inserto no clone pN-PTP-Sub2-PURO #11. (F) PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos 1, 2 e 3 e o vetor pSub2N-PURO-PTP #11 ou o DNA genômico (gDNA) como molde. B: branco da PCR. M: marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

O plasmídeo pN-PTP-Sub2-PURO #11 foi digerido com *Eco*NI, sítio presente apenas uma vez no plasmídeo e dentro da sequência de Sub2. A linearização do plasmídeo possibilita que este integre no lócus de Sub2 e adicione a sequência de PTP ao gene endógeno. O vetor linearizado foi transfectado e os parasitas modificados foram selecionados por pressão seletiva com o antibiótico puromicina.

Foram obtidas 4 populações, denominadas de TbSub2-PTP-N #1, #2, #4 e #10. A expressão da proteína Sub2 fusionada à etiqueta PTP foi analisada por *Western blotting* e por microscopia de fluorescência indireta utilizando o anticorpo primários anti-proteína A (Figura 4.13). O soro anti-proteína A reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 68 kDa, correspondente aos 49,22 kDa da proteína Sub2 fusionada aos 18,08 kDa da etiqueta PTP, em todas as populações analisadas. Porém somente as populações TbSub2-PTP-N #1 e #2 expressam a proteína localizada no núcleo na maioria das células indicando maior eficiência da transfecção e seleção destes parasitas. Por isso, a população #2 foi selecionada para os experimentos de imunoprecipitação.

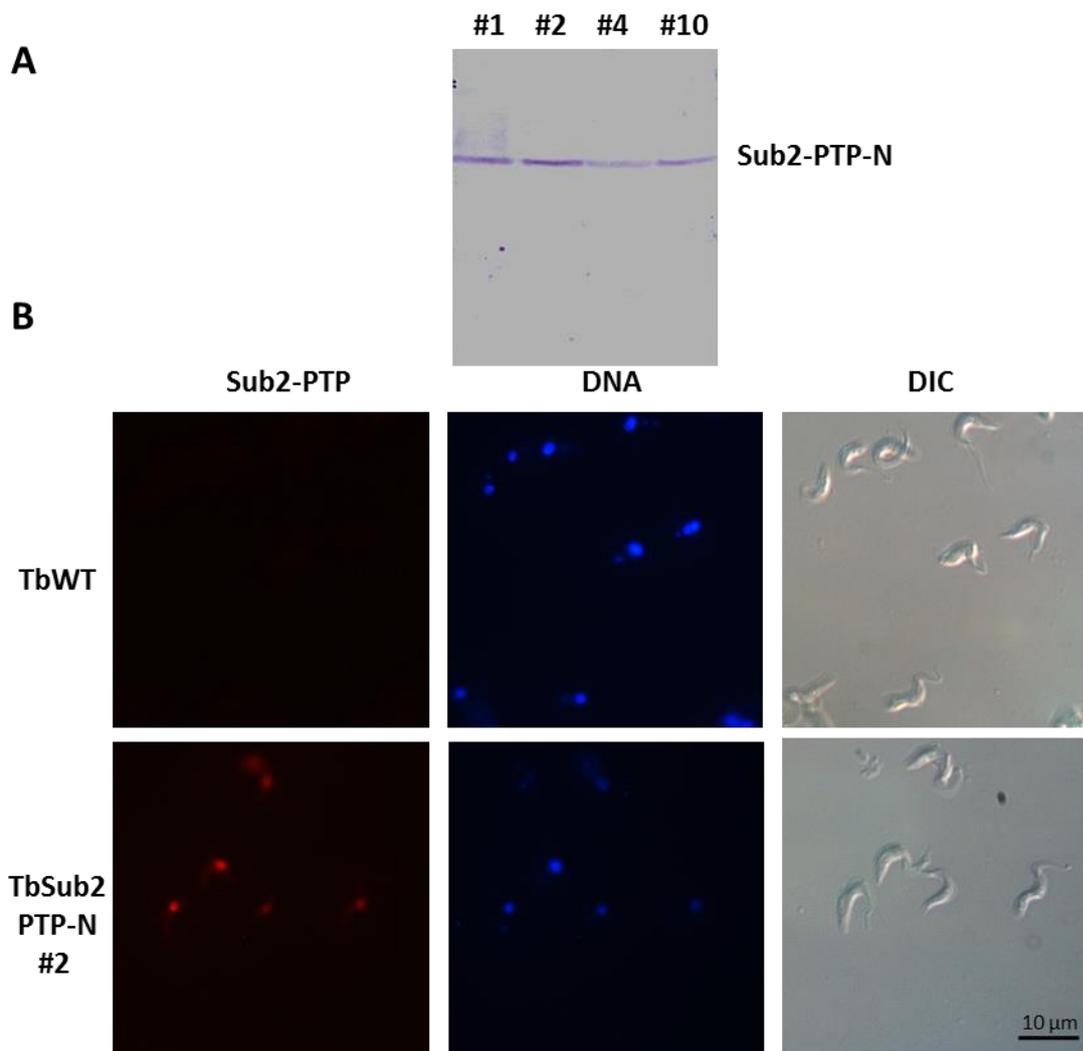


Figura 4.13 – Linhagem expressando a proteína Sub2 fusionada a etiqueta PTP na extremidade N-terminal. (A) Expressão da proteína TbSub2-PTP nas populações transfectantes foi analisada por *Western blotting* (A) e por microscopia de imunofluorescência indireta, comparada com *T. brucei* selvagem (TbWT) (B). Nos dois ensaios foi utilizado o anticorpo primário anti-proteína A (1:40000). DNA: a marcação do material genético foi realizada com DAPI. DIC: contraste por interferência diferencial. As imagens foram adquiridas por microscopia de imunofluorescência.

4.2.2 Purificação do Complexo Proteico que Contém Sub2 em *T. brucei* e Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas

A proteína ortóloga de mamíferos UAP56 foi descrita como um fator do *cis splicing* essencial para o processamento do pré-RNAm (FLECKNER et al., 1997) e como um fator de exportação de RNAm (LUO et al., 2001; STRÄßER; HURT, 2001). Dados do nosso grupo

mostram que o silenciamento de Sub2 em *T. brucei* causa o acúmulo de SL RNA e diminui a estrutura em Y, subproduto do *trans splicing* (HIRAIWA, 2012).

Por isto, decidimos avaliar se Sub2 de tripanossoma estaria associada também com fatores de processamento do RNAm por *trans splicing*. Inicialmente, a presença de complexos contendo Sub2 foi analisada por cromatografia de exclusão, utilizando extrato de parasitas expressando a proteína SmD1, uma das proteínas do core do spliceossomo (GUNZL, 2010; LUZ AMBROSIO et al., 2009), fusionada a etiqueta PTP na região C-terminal, chamados de TbSmD1-PTP (HIRAIWA, 2012; LUZ AMBROSIO et al., 2009). O extrato do parasita foi separado por cromatografia de exclusão de tamanho e as frações foram coletadas para analisar o perfil de sedimentação dos complexos contendo Sub2 e SmD1-PTP (Figura 4.14). Neste ensaio, foi utilizado tampão citrato para preparar o extrato e realizar o fracionamento cromatográfico. Dados do grupo, obtidos em paralelo a este trabalho, indicam que os melhores resultados para estabilizar o complexo com a proteína Sub2 de *T. cruzi* são obtidos com tampões contendo citrato (INOUE, 2015). Por isso, decidimos testar se o mesmo tampão utilizado para a imunoprecipitação do complexo de Sub2 de *T. cruzi* seria eficiente para a purificação da proteína de *T. brucei*. Após a cromatografia e análise por *Western blotting* do extrato proteico de *T. brucei*, a proteína Sub2 foi detectada com maior intensidade nas frações 17 a 19, que correspondem a complexos com massa de 670 kDa aproximadamente, enquanto que a proteína SmD1 foi detectada com maior intensidade nas frações 23 a 25, que correspondem a massas menores que 440 kDa. O perfil de sedimentação obtido por cromatografia indica que as condições utilizadas para extrair as proteínas dos parasitas estabilizam o complexo que contém a proteína Sub2 endógena, sem a adição de nenhuma etiqueta, e indica que Sub2 e SmD1 estão presentes em complexos diferentes, pois a maior parte do complexo que contém Sub2 apresenta massa molecular diferente do complexo que contém SmD1.

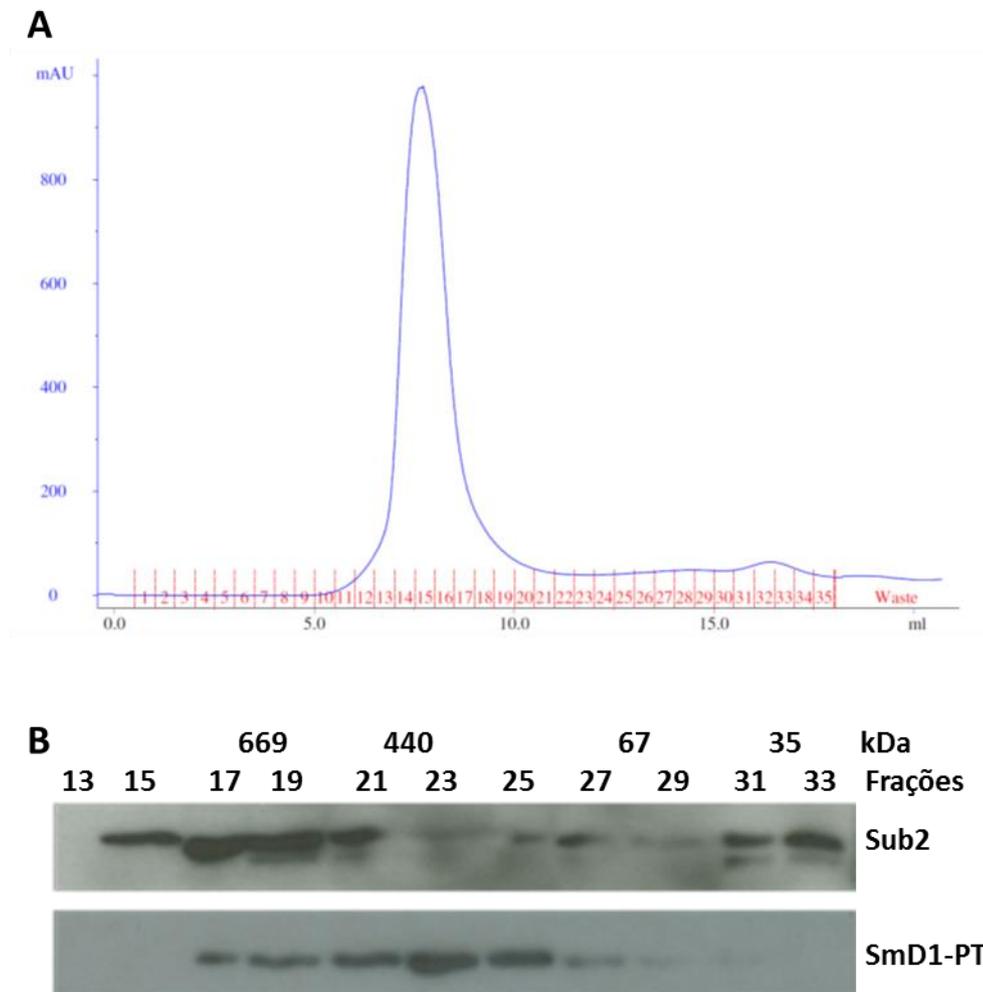


Figura 4.14 - Separação dos complexos proteicos por cromatografia de exclusão de tamanho. (A) Cromatograma da separação em coluna Superdex 200 10/30 GL (GE Healthcare). A linha em azul representa a absorbância em 280 nm, correspondente a concentração de proteína. Em vermelho, estão representadas as frações coletadas. (B) As frações ímpares de 13 a 33 foram analisadas por *Western blotting*, com os anticorpos primários anti-proteína A (1:40000) e anti-Sub2 (1:600).

Para identificar o complexo proteico de Sub2, realizamos alguns ensaios de imunoprecipitação com a linhagem TbSub2-PTP-N. Apesar de o tampão citrato manter o complexo de Sub2 íntegro, como demonstrado acima, resolvemos testar as imunoprecipitações com diferentes tampões (PBS/Triton X-100 0,05%; PBS/Triton X-100 0,1%; PBS/Chaps 0,1%; tampão citrato). Nas quatro condições testadas, foi visível o enriquecimento de Sub2-PTP-N (aproximadamente 70 kDa) após a imunoprecipitação das amostras dos parasitas transfectantes, comparado com as amostras de parasitas selvagens, controle das imunoprecipitações. (Figura 4.15).

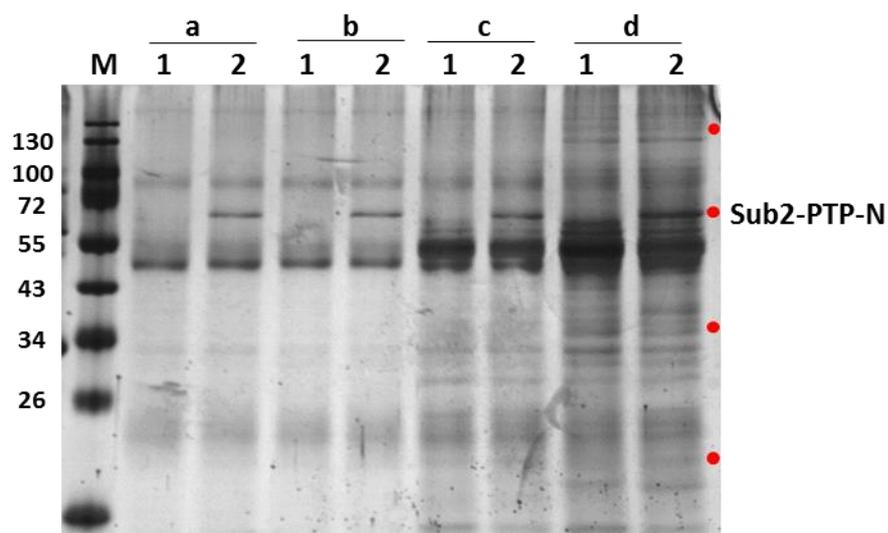


Figura 4.15 – Ensaio de imunoprecipitação da proteína Sub2 de *T. brucei* fusionada à etiqueta PTP na extremidade N terminal. As imunoprecipitações foram realizadas com a resina Dynabeads epoxy M270 (Invitrogen, 14301) ligada ao anticorpo anti-proteína A. O extrato proteico foi preparado com diferentes tampões (PBS/Triton X-100 0,05%; PBS/Triton X-100 0,1%; PBS/Chaps 0,1%; tampão citrato). Extrato de *T. brucei* selvagem (WT) foi utilizado como controle. Após a imunoprecipitação, o material foi analisado por SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Sub2-PTP possui 70 KDa, aproximadamente. 1: Extrato de *T. brucei* selvagem. 2: Extrato de TbSub2-PTP-N. a: tampão PBS/Triton X-100 0,05%. b: Tampão PBS/Triton X-100 0,1%. c: Tampão PBS/Chaps 0,1%. d: tampão citrato. Pontos vermelhos: indicam diferenças entre a imunoprecipitação de TbSub2-PTP-N e de parasita selvagem. M: marcador molecular PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific).

Com base no resultado dos testes e destacado na Figura 4.15, o ensaio realizado com tampão citrato proporcionou, além do enriquecimento de Sub2, a imunoprecipitação de proteínas presentes apenas na amostra de Sub2-PTP-N, quando comparado com o controle, confirmando que é melhor condição para estabilizar. Para a identificação das proteínas por espectrometria de massas, 3 experimentos independentes foram realizados e cada amostra foi subdividida em 3, totalizando 9 réplicas. Estas réplicas foram submetidas a cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (LC/MS/MS). Os dados foram processados e as proteínas foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: proteínas presentes somente na amostra TbSub2-PTP-N, com no mínimo três espectros MS1, dois peptídeos no MS2 e presente em pelo menos 2 réplicas diferentes. A tabela com as proteínas selecionadas continha algumas proteínas das subunidades ribossomais e proteínas hot spot de retrotransposon (RHS) (Apêndice E). Como são proteínas abundantes, podem ter sido co-purificadas de forma

inespecífica e, por isso, foram excluídas dos dados e focamos as análises em proteínas relacionadas com outras funções. O resultado está representado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas após a imunoprecipitação do complexo contendo a proteína TbSub2-PTP-N. (*T. brucei* ID e Descrição Tritryp: número de acesso e descrição obtidos do banco TriTrypDB. Número de réplicas e Amostras: número de réplicas identificadas e em quais amostras. Sinal: valor referente a quantidade de proteína identificada. Observações: observações das proteínas)

<i>T. brucei</i> TREU 927 ID	Número de réplicas	Amostras	Sinal	Descrição Tritryp	Observações
Tb927.10.540	8	1, 2, 3	0.12862	ATP-dependent RNA helicase SUB2, putative	Sub2; Putative spliceosomal helicases (TKACZ et al., 2010)
Tb927.1.2750	8	1, 2, 3	0.06782	hypothetical protein, conserved	Uncharacterized protein (INOUE, 2015)
Tb927.6.1470	8	1, 2, 3	0.06552	hypothetical protein, conserved	Fop (Friend of PRMT1) (INOUE, 2015)
Tb927.7.2240	9	1, 2, 3	0.03718	hypothetical protein, conserved	API5 (INOUE, 2015)
Tb927.4.3060	9	1, 2, 3	0.02206	hypothetical protein, conserved	Uncharacterized protein (INOUE, 2015); TbHip
Tb927.10.14550	8	1, 2, 3	0.01036	ATP-dependent RNA helicase HEL67	Putative spliceosomal helicase (TKACZ et al., 2010), VASA (KRAMER et al., 2012), DBP1 (FRITZ et al., 2015), RNA helicase (INOUE, 2015)
Tb927.10.5620	7	1, 2, 3	0.00867	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal	
Tb927.11.8770	8	1, 2, 3	0.00788	ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative	Hel45 (INOUE et al., 2014)
Tb927.7.2910	6	1, 3	0.00732	histone H2A, putative	
Tb927.4.2030 Tb927.4.2040	7	1, 2, 3	0.00641	ALBA-Domain Protein	ALBA3/ALBA4 (INOUE, 2015). PRP19 co-purified proteins (AMBRÓSIO; BADJATIA; GÜNZL, 2015)
Tb927.10.13010	8	1, 2, 3	0.00561	protein kinase A catalytic subunit	
Tb427tmp.02.4150 ₁	7	1, 2, 3	0.00459	pyruvate phosphate dikinase	

Tb927.10.10580	5	1, 3	0.00306	histone H2B, putative	
Tb927.5.1060	7	1, 2, 3	0.00271	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16/mitochondrial processing peptidase	
Tb927.9.12510	5	1, 2, 3	0.00201	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	Putative spliceosomal helicases (TKACZ et al., 2010)
Tb927.10.3990	6	1, 2, 3	0.00175	DHH1	Without known <i>splicing</i> functions (PREUßER et al., 2012)
Tb927.9.13990	4	1, 2	0.00101	RNA-binding protein, putative	DRBD2 (DE GAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005)
Tb927.8.4330	3	1, 3	0.00095	Rab11A GTPase	
Tb927.10.7550	4	1, 3	0.00085	hypothetical protein, conserved	
Tb927.7.4960	5	1, 2	0.00076	hypothetical protein, conserved	
Tb927.11.3980	4	1, 2	0.00051	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	
Tb927.11.2340	2	1	0.00051	hypothetical protein, conserved	Mex67A (SERPELONI et al., 2011a)
Tb927.2.2130	4	1, 3	0.00050	small GTP-binding protein RAB6	
Tb927.4.410	2	1, 2	0.00044	CAF 40	
Tb11.v5.0774.1-p1	3	1	0.00033	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor, putative	
Tb927.7.880	2	1	0.00031	RNA-binding protein, putative	MLN51/CASC3/Barentsz eIF4AIII binding/BTZ (INOUE, 2015)(Inoue, 2015); RBP25(DE GAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005)
Tb927.5.4420	2	1	0.00020	nucleolar RNA helicase II, putative	nucleolar RNA helicase II (INOUE, 2015)
Tb927.6.850	2	1	0.00017	ccr4-not transcription complex subunit 2	
Tb927.10.7570	3	1	0.00014	dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit, putative	
Tb11.v5.0689.1-p1	2	1	0.00012	NOT2 / NOT3 / NOT5 family, putative	

Tb927.10.8540	2	1	0.00012	chaperone protein DNAj, putative
Tb927.2.5130	2	1	0.00011	hypothetical protein, conserved
Tb927.1.5030	2	1	0.00010	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative
Tb927.2.3910	2	1	0.00008	beta-ketoacyl synthase family protein, putative
Tb927.11.2370	2	1	0.00006	mRNA export factor MEX67
Tb927.10.14320	2	1	2.18E-05	Flagellum attachment zone protein 9

¹: proteína identifica no bando de dados de *T. brucei* Lister 427

Fonte: a autora.

Os dados de proteômica mostram que a proteína Sub2 é a proteína mais abundante nas amostras dos transfectantes expressando a proteína Sub2-PTP, seguida de quatro proteínas anotadas como hipotéticas conservadas no banco de dados TriTrypDB. Estas proteínas hipotéticas também foram identificadas na imunoprecipitação de Sub2 de *T. cruzi* (INOUE, 2015). Para tentar obter alguma informação sobre a função biológica destas proteínas hipotéticas, as sequências de aminoácidos foram utilizadas como iscas em análises comparativas por similaridade com outros organismos, como para procurar genes homólogos por BLASTP e domínios por hmmerScan. A ferramenta Phyre2 foi utilizada para prever a estrutura terciária da proteína. Além disso, a ortologia das proteínas foi avaliada dentro do grupo *Euglenozoa*, de acordo com informações do banco TriTrypDB, e a semelhança entre as proteínas de *T. brucei* e *T. cruzi* foram analisadas com a ferramenta Clustal Omega.

As análises realizadas com a proteína codificada pelo gene Tb927.1.2750 (a segunda mais abundante no complexo que contém TbSub2), revelam que a proteína é similar a proteínas presentes somente em parasitas da família Trypanosomatidae. Utilizando a ferramenta Phyre2, observa-se que 22 % da sequência desta proteína possui estrutura semelhante a proteína abp1 de centrômero (proteína de ligação a DNA) com 42,3 % de confiança (dados não mostrados), não representando a maior parte da proteína. Nenhum domínio foi identificado pela sequência de aminoácidos.

De acordo com o alinhamento das sequências com o Clustal Omega, a proteína de *T. brucei* possui 59,21 % de identidade com a ortóloga de *T. cruzi* (TcCLB.510953.40) (Figura 4.16) e ambos os genes estão classificados no grupo OG5_150634 de ortologia.

```

Tb927.1.2750      MESGKNAHRLNRIFRKPKTMVAPRAWRFPAADGEGEQPFSGVSLQRINAMISELSEER
TcCLB.509005.60  MDSKKNHRLSRIFRKPKVMVAPRSWREE----GGENTLHSGVPLSLNAMVHELTDKDK
*: *  * * * * * . * * * * * . * * * * * : * *      * . : . * * * * . : * * * : * * : : : : :

Tb927.1.2750      TRALAQDPPPTVVQEELAKRAARFGLTIERADAGNNEKTASSEITPEVQAVFQRMERFQ
TcCLB.509005.60  TRVAAQQDPPSVLQEELAKRAARFGLAVGGHNGNGGDAAAGD-----DSMRKRMERFQ
* * . * * * * * . * : * * * * * * * * * * * : :      : . . . . : : * . .      : : : * * * * *

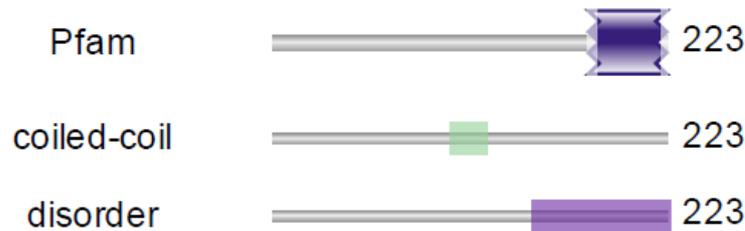
Tb927.1.2750      Q-----SAAEEAMQKRVARFGNAATSAEGPGVELKLS
TcCLB.509005.60  TTDPPPLPVLVVDEATLKSREARFKSEEEKKMDEAMQKRLARFGAAP-----AVVELKLS
. : * * * * * : * * * * * *      *      * * * * *

Tb927.1.2750      EADREAMQRRQSRFGG-
TcCLB.509005.60  EADREAMARRESRFASC
* * * * * * * * * : * * * * . .

```

Figura 4.16 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas de *T. brucei* (Tb927.1.2750) e de *T. cruzi* (TcCLB.509005.60).

Ao analisar a conservação da proteína codificada pelo gene Tb927.6.1470 (a terceira mais abundante no complexo que contém TbSub2), denominada de FOP, observa-se que a proteína está presente na família Trypanosomatidae e em *Bodo saltans* (ordem Kinetoplastida, família Bodonidae), com baixa cobertura entre as sequências homólogas de algumas espécies, incluindo algumas espécies de *Leishmania*, como a *Leishmania major* strain Friedlin (32% de cobertura e e-value 2e-11 com LmjF30_0090), e *Trypanosoma cruzi* CL Brener (44% de cobertura e e-value 2e-31 com TcCLB.509033.80). Apesar disto, os genes de *T. cruzi* e *T. brucei* pertencem ao mesmo grupo de ortólogos (OG5_148845) e as proteínas apresentam 59,30 % de identidade. Além disso, a proteína de *T. brucei* apresenta o domínio FOP (Friend of PRMT1) (Figura 4.17A), segundo a busca por domínios utilizando hmmerScan, como identificado para a proteína de *T. cruzi* (INOUE, 2015). A proteína FOP de mamíferos possui uma região rica em arginina e glicina (GAR) na região central da proteína com 26 repetições RG/GR e dois domínios UBM (*Uap56 binding motif*) na extremidade C-terminal (CHANG et al., 2013; VAN DIJK et al., 2010). As proteínas de *T. cruzi* e *T. brucei* apresentam algumas diferenças. A proteína de *T. cruzi* possui os dois domínios UBM típico (LDXXLD) e os aminoácidos RG/GR distribuídos pela proteína, com enriquecimento na extremidade C-terminal, dentro do domínio FOP. A proteína de *T. brucei* apresenta um domínio UBM típico e uma sequência semelhante (LDXXLL) e menos sequências RG/GR do que a proteína de *T. cruzi*, sendo que apenas 3 repetições estão conservadas nas duas espécies, considerando toda a proteína (Figura 4.17B). A sequência de aminoácido não prediz uma estrutura confiável com a ferramenta Phyre2.

A**B**

```

Tb927.6.1470      MRRDDFDRRLRDLYDRNVRRVRLAEARDQRRSDREDDLPAPRRYLVSERTRTRLEGFGY
TcCLB.509033.80  MRRGDFERRRLRDLYERNVRRVRLADARDGGRSGRDDDIAPRRYVVSERTRTRLEGFGR
***.**:*****:*****:*** **.*:**: *****:*****

Tb927.6.1470      GDRQVRRSRSDGERSRRFSDRRLFRSSAADRFARDEDIERQLRREERERLLRLERLER
TcCLB.509033.80  GGYQVQRSRRFGRDPRIRRFSDRGVYRGALDRFEREEDFERKLRERFR-----
*. **:*** . * ***** ::*.* ** *:*:***:***** .

Tb927.6.1470      LERLERRDRLRERLPLRGGVAMGRLRRRLVEGRRRRLQRE-----NDRQRPQQQP
TcCLB.509033.80  -----ERRLNEGGLRFGRLRLRRSERRELRLQRELRLELRALRSAQRNQNG
** .**: :**** * * * . * **

Tb927.6.1470      -QRRKLDDELLQRTNRSRGGNNSAHNKKEGARRSGPMTREGLDDELLDRFRGAA
TcCLB.509033.80  DRRGKLDKE-LDRYRKDRGGRRGGGG--RGRGAPNSVTKEGLDAELDDRFRGGN
:* **.* * ** * :..***... . * . :*:*** :*****.

```

Figura 4.17 - Análise da proteína Tb927.6.1470. (A) Domínio FOP na extremidade C-terminal da proteína, localizado do aminoácido 180 a 223, com e-value $5,6 \times 10^{-8}$, segundo a busca com hmmerScan. (B) Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas de *T. brucei* (Tb927.6.1470) e de *T. cruzi* (TcCLB.509033.80). Domínio FOP destacado em cinza. Repetições RG destacados em negrito e sublinhado. Possíveis motivos UBM (*Uap56 binding motif*) destacado em itálico e sublinhado.

A proteína codificada pelo gene Tb927.7.2240 (a quarta mais abundante no complexo que contém TbSub2) possui similaridade com proteínas presentes apenas em parasitas da ordem Kinetoplastida. A proteína apresenta dois domínios API5 (*apoptosis inhibitory protein 5*), do aminoácido 97 a 293 e 343 a 542 (Figura 4.18A), e por isso será denominada de TbAPI5. A proteína ortóloga de *T. cruzi*, TcAPI5 (TcCLB.511807.280), foi identificada associada a TcSub2 (INOUE, 2015). Diferentemente da proteína de *T. cruzi*, que apresenta três domínios API5, TbAPI5 contém apenas dois domínios. As duas proteínas estão classificadas no grupo de ortólogos OG5_151625 e possuem 56,67% de identidade (Figura 4.18A). A estrutura da proteína API5 de *T. brucei* foi predita baseada nas proteínas inibidora da apoptose 5 e symplekin. A estrutura predita possui 90 % de confiança, utilizando 81 % dos resíduos da proteína, apenas as extremidades possuem baixa confiança (Figura 4.18B e C).

A

```

Tb927.7.2240      MPVKKKVATAKNDEKED-LTTSVMAAETTPASSPTMQHLDTQPQGTTSASELYAVLQAA
TcCLB.511807.280  MAPKKNASAAAAAKEETECPAEVTTT-----TPPTSPQTESLPSACNAVELYATLQAA

```


(hipotética) neste trabalho. A análise de similaridade permitiu verificar que existem proteínas ortólogas em algumas espécies de *Trypanosoma* (*T. cruzi*, *T. congolense* e *T. vivax*) com mais de 97% de cobertura entre as sequências. Em todas as espécies, a proteína está anotada como hipotética. As proteínas ortólogas de *T. brucei* e de *T. cruzi* (TcCLB.506265.130) possuem 51,70% de identidade (Figura 4.19A) e pertencem ao mesmo grupo de ortologia OG5_162295. A proteína ortóloga de *T. cruzi* também foi identificada no complexo de TcSub2 (INOUE, 2015).

A busca por homologia de sequência, utilizando o BlastP que está associado a ferramenta *NCBI Conserved Domain Search*, também identificou o domínio da superfamília eIF3 zeta e o domínio putativo metiltransferase (PRK10864) (Figura 4.19B), porém a ferramenta de busca hmmerScan não identificou nenhum domínio. A sequência de aminoácido não prediz uma estrutura confiável com a ferramenta Phyre2.

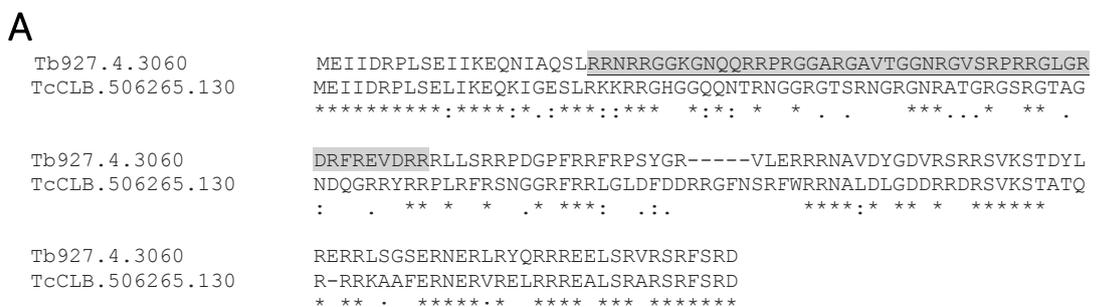


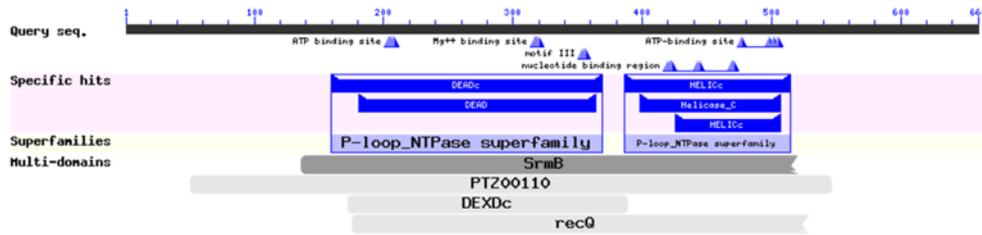
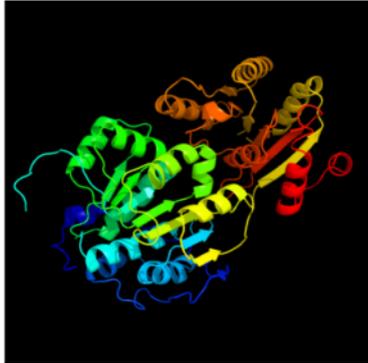
Figura 4.19 - Análise de conservação e da estrutura da proteína TbHip. (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas hipotéticas de *T. brucei* (Tb927.4.3060) e *T. cruzi* (TcCLB. 506265.130). Domínio da superfamília eIF3 zeta destacado em cinza e o domínio putativo metiltransferase (PRK10864) sublinhado na sequência da proteína TbHip. (B) Domínio da superfamília eIF3 zeta e domínio putativo metiltransferase (PRK10864), identificados com a ferramenta BlastP associado a ferramenta *NCBI Conserved Domain Search*.

Além dessas proteínas citadas acima, as análises de proteômica também identificaram proteínas que estão associadas a complexos de processamento por *splicing*, mas que não existem dados sobre a atividade no processamento do pré-mRNA. Estas proteínas seriam as seguintes: Tb927.10.14550/ATP-dependent RNA helicase HEL67, Tb927.9.12510/ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putativa, Tb927.10.3990/DHH1 e Tb927.4.2040/Alba3/Alba4.

A proteína DHH1 pertence à família DEAD box helicase e está localizada em grânulos citoplasmáticos de degradação de RNAm, chamados de *P-bodies*, em *T. cruzi* (HOLETZ et al., 2007) e *T. brucei* (KRAMER et al., 2008). As proteínas ALBA são caracterizadas pelo domínio ALBA, que liga a ácidos nucleícos. As proteínas ALBA3 e ALBA4 de *T. brucei* estão presentes no citoplasma do parasita. Após o estresse nutricional, as proteínas formam grânulos citoplasmáticos que colocalizam com a proteína DHH1 e parcialmente com RNA poli(A+) (SUBOTA et al., 2011).

A proteína HEL45 é uma RNA helicase associada ao metabolismo do RNAm e migra entre o núcleo o citoplasma, dependente do receptor Mex67 da via de exportação. Hel45 está localizada próximo ao complexo do poro nuclear, do lado citoplasmático, e associada a periferia de cromatina eletrodensa no núcleo (INOUE et al., 2014). Hel45 pode interagir com proteínas de EJC (Mago e, possivelmente, Y14), um receptor NTF2-like e formar complexo com Sub2 e FOP. Esta interação, corrobora a potencial função de Hel45 na via de exportação de mRNA, recrutamento do receptor Mex67 que pode mediar a passagem do mRNP pelo complexo do poro nuclear (CPN) (INOUE, 2015).

A helicase HEL67 (Tb927.10.14550) possui o domínio DEAD/H box, helicase, sítio de ligação a ATP e Mg^{2+} , sítio de ligação a nucleotídeos e pertence a superfamília II DNA e RNA helicase (SrmB) e hidrolase de nucleosídeo trifosfato (P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolase) (Figura 4.20A). A estrutura terciária da RNA helicase HEL67 foi predita, com 65% da sequência e 100 % de confiança, com a RNA helicase DDX3X ATP dependente (Figura 4.20B). A helicase HEL67 de *T. brucei* possui 67% de identidade com a proteína ortóloga de *T. cruzi*, sendo que a extremidade N-terminal da proteína de *T. brucei* é maior (Figura 4.20C).

A**B****C**

```

Tb927.10.14550      MLTVCPLSFFTRALLVCFKSLTRLSPPCAPILPLTKKKRYLKMHGMMNFGQGGH-QQFNPN
TcCLB.506213.120  -----MHFNNTSYGQKDVPPFPPTPQ
                                     .. ::** .   *:**

Tb927.10.14550      ANPWAR-APAFGEAGHQVGYNNYGGYQQRPREGFDGPS-----RGRGE
TcCLB.506213.120  -FQWGGRRPGAFNGSPQSAY--NSYQPRAGGGFDGGHFRGGRGRGGGGYSRGGGFQGEN
      * .   ***:.. * . *   . . ** *   ****          * : :

Tb927.10.14550      FIRRNVPYQGETSGHGYHREEPADEDIFKDHTPGINFQHGVEVNMITPNDIAPVLSFSE
TcCLB.506213.120  GFNRPLQYQGESPESHAYHREEKPEEEIFKEHTPGINFQYEAIAIKVHISPNDIPPMSFAS
      :.* :   ****: .*.***** :*:***:*****:   : : : *:** * : **:.

Tb927.10.14550      MNMVPVLEENVKRCGYTKPTPVQSLGIPTALNHRDLMACAQTGSGKTASYLIPAINIILL
TcCLB.506213.120  MNTPLALKENVARCRYQKPTPVQKYGIPVVLGHDLMACAQTGSGKTAAYLIPLVSILS
      **   . * ** * * * ***** . ** . * :*****:*****:***** :..**

Tb927.10.14550      NISNRPPYSPGSHSSPQALILAPTRELSLQIYGEARKFTYHTPVRCVVVYGADPRHQVH
TcCLB.506213.120  NATP-NHQGQGSRSSPAALVMAPTRELSIQIHEEGRKFTYRTGIRCVVYGGADPRHQVH
      * :   . **:** * ** :*****:***: * .*****:* :*****:*****

Tb927.10.14550      ELSRGCKLLVATPGRLMDMFSRGYVRFSEIRFLILDEADRMLDMGFEPQIRIMIVQGPDS
TcCLB.506213.120  ELSRGCGLLVATPGRLWDVTRGYVTFSSIRFMVLDEADRMLDMGFEPQIRIMIVQGQESD
      ***** ***** * : * : ** * ** . ** : : *****:***** :**

Tb927.10.14550      MPRAGQRQTLLYSATFPVEIQRLAREFMCRHSFLQVGRVGGSTTENITQDVRWIEDPKRQ
TcCLB.506213.120  MPPPGQRQTLLYSATFPTEIQQLAREFLHRHYFLQVGRVGGSTTENITQDVRWVEDNDKRE
      ** ***** . ** : ** * : * *****:*****: ** * ** :

Tb927.10.14550      ALLTLLRENEGKLVLFVEKKRDADYLERFLRNSELACVSIHGDRVQREREALRLFKSG
TcCLB.506213.120  HLLRLLHENQNQLILVFVEKKRDADYLERFLRNNRVACASIHGDRVQREREALRMFKSA
      ** * : ** : : : ***** . . . * . *****:*****: * ** .

Tb927.10.14550      ACQVLVATDVASRGLDIPNVGVVIQYDMPSNIDYVHRIGRTGRAGKVGVAISFFNEKNR
TcCLB.506213.120  SCQVLVATDVASRGLDIPDVSIQYDMPSNIDYVHRIGRTGRAGKVGRAISFFNEKNR
      :*****:*****: * : :*****:*****:***** *****

Tb927.10.14550      NIVDDLIPLNETNQVISPEVRALAKRPNNNNNNRGGGGGGYRFGFRGGNSGGFGMGG
TcCLB.506213.120  NIVDDLVLPLNETHQNLVQQIMDLTKRPNVNG--RGGNAGGGFRGFHGGGFFGGSGFRG
      *****:*****:* : : : * : ** * * . . * . ** : ** * * * * : *

Tb927.10.14550      GRGGGGG---GGYRGGRGNS-GGFGMSNVFGRGNSGGFGMGGGRGGG-GGGGGGFG
TcCLB.506213.120  SRGGYRGGNNRGGYGGYGGYGGYGD--GFYGSYGANMGGGRGGGSRGYGGSSTG

```

```

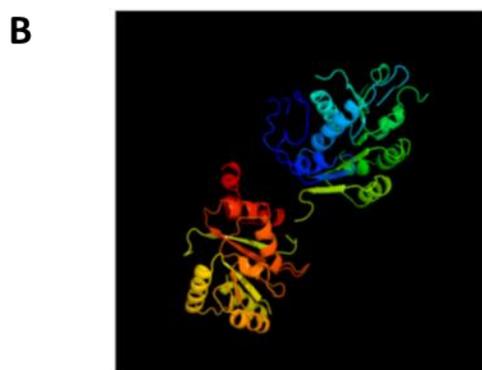
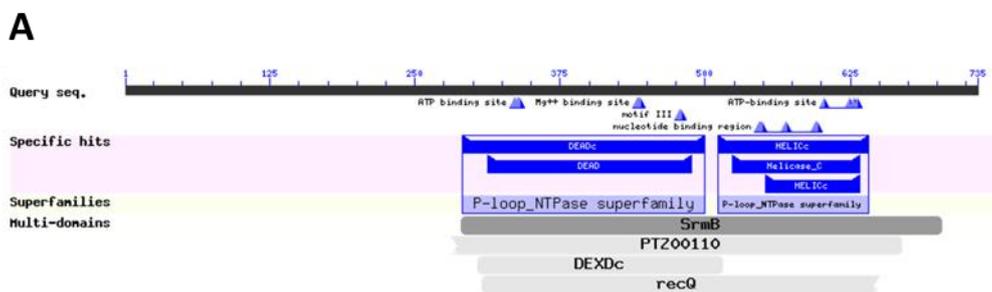
      .*** **   *** ** * .  **:*   ** *.. * .  ***** * **.. *
Tb927.10.14550      SGGFGASGGNMRGMFGGGGGGPTM
TcCLB.506213.120   GGAFGGPTGNVRSMFADGLNS---
      .***.  **:*..***..* .

```

Figura 4.20 - Análise da estrutura e da conservação da proteína RNA helicase HEL67 dependente de ATP. (A) Domínios e superfamília da proteína identificados pela ferramenta BlastP. (B) Modelagem molecular da RNA helicase HEL67. (C) Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas de *T. brucei* (Tb927.10.14550) e de *T. cruzi* (TcCLB.506213.120).

A descrição da proteína Tb927.9.12510, no banco de dados TriTrypDB, reflete as características da proteína encontradas pelo BlastP e hmmer: DEAD/H box helicase, sítio de ligação a ATP e Mg²⁺, sítio de ligação a nucleotídeos e pertence a superfamília II DNA e RNA helicase (SrmB) (Figura 4.21A). A estrutura desta RNA helicase foi predita baseada na RNA helicase prp5, helicase relacionada com o processamento de pré-RNA dependente de ATP, com 100 % de confiança e 53 % de cobertura da sequência (Figura 4.21B). A proteína de *T. brucei* possui 71,53% de identidade com a proteína de *T. cruzi* (Figura 4.21C).

C



```

Tb927.9.12510      MSLSRTEENGTSDTPAREFNNERNAPVNNNGGA-GRGGRWAFRG-----
TcCLB.510661.90   MSFPQTEKNGITSESPAREFNTNEHGDLLNSAGEPWRGGRFQERGRGRGRGRGRGRYEGD
** : **:* **:*:*****:**: .:..*   ***** **

Tb927.9.12510      -DFRSDEGGERK GK---PWGRFP---QGDGERGNRGYGGGYRGR-----
TcCLB.510661.90   GEWRRSDNDRERGNERFSWRRSGDAGGGGDYEGEEYGGGWPRGGRSGYNNNYYNRGGG
:* .:.....:*      * *          *..*:*:*****:

Tb927.9.12510      -----GGRG-RGGGGGGGF
TcCLB.510661.90   GRGRSQYGPGRKEQWSNWRQDQPKRDAGDDYSEPHRGGGDNYDVEGGRGRGRGRGRGF

```

```

***** ** * * * *
Tb927.9.12510 REGSFGFENRAQQQPPREGLMNDQAP---QEERQPTEESEPVQRGRFDVDFYDRPRRRG
TcCLB.510661.90 ADDDRELEERAQRRS--QGATDDTDQQEPAQQSEGGQQQQPPAQYGRFDVDSYERPRGRG
:. . :*:***: : * :* *:.. :. . *. * ***** *:*** **

Tb927.9.12510 RGRQYGGRGDNDGERGFFGGDNNERQPKQRQNNPKPFGQQQQLEPQQEDEQEAVASPQQ
TcCLB.510661.90 RDRPYRGRGG-----YFREVEEERQQQPQ---PQPQPQE-----
*.* * ***. :* :*:** * * *: * * :

Tb927.9.12510 QYNQQRQRPERRPDTAPTMDPISTNPNRTQRAPRFRKNCRDEREIEKLFESHHQQKGISL
TcCLB.510661.90 -----QQQRPRVSEDPISTNPSRTQRAPHLRKNCHDEREIEQLFEHHHQQKGISL
: : : *****.*****:****:*****:*** *****

Tb927.9.12510 ENYASIPVDIVPRDIDAVESFEDLFVEPALALNIAKCGYKEPTPVQRYGIPVCLNGNDLM
TcCLB.510661.90 DNYANIPVDIIPNNVEPVESFEDLYVEPALALNVAKCGYKQPTPVQRYGIPVCLNGDDL
:***.*****:*.: : : *****:*****:*****:*****:*****:***

Tb927.9.12510 ACAQTGSGKTA AFLVPVVHYILKNGVSPAKDRISHPIAVIMAPTRELALQIYDEVKLTFF
TcCLB.510661.90 ACAQTGSGKTA AFLVPVVHYILKHGVS PARERVSYP IAVIMAPTRELALQIYDEVKLTFF
*****:*****:*.*:*****:*****

Tb927.9.12510 RTDIFYDVVYGGTPYPTRFENDILVACPGRLKDFDRNIVSFSVCVKFLILDEADRMLEMG
TcCLB.510661.90 RTDIFYDVVYGGTPYPTRFENDILVACPGRLKDFDRGIVSFSRVKFLVLDEADRMLEMG
*****.*****.*****.*****.*****.*****

Tb927.9.12510 FEEQIEYLVASRYSDMPSSEERQTLMF SATFPQRILNLAKRYLRPKYLLTVGRVGSSTK
TcCLB.510661.90 FEEQIEYLVASRYTDMPTTERTQTLMF SATFPQRILNLAKRYLRQHYLLTVGRVGSSTK
*****:***.: *****:*****:*****:*****

Tb927.9.12510 NITQKLERVPEAEKDKLFDIIYKQKQTDLVLI FVETKRSAEQLHSALKSSGIPSTTIHG
TcCLB.510661.90 NITQKIVRVQSEKMDKLF EVIYQQKQTDLVLI FVETKRAAEELHYALKSEGIPSATIHG
*****: ** *.* ** * ***: : * : *****:*****:*. * ** * . * ** : * **

Tb927.9.12510 DRRQSDREIALKDFKSGITPILVATDVASRGLDIPNVAHVIQYDLPKEMDDYTHRIGRTG
TcCLB.510661.90 DRRQFDRERALRDFKDGITPILVATDVASRGLDVPNVAHVIQYDLPKEMDDYTHRIGRTG
**** * ** *.* ** * ***: *****:*****:*****:*****

Tb927.9.12510 RAGNKGVATSFYDRNRRNLAVELYHYLREHEQEVPMWLENEKDAVEGERFVGGTRGGN--
TcCLB.510661.90 RAGNKGATATSFYNKNNRNLVDLYNLKEHEQDIPLWFEEEEKENVEGERFLGMSRGRGGG
*****.*****.:*****:*.**:*:*****:*.*:*****: *****:* : ** .

Tb927.9.12510 -----RRGGGESRAAAPLGNSTWGEAATGRGGRQGGQQQERKESNVDDGGF
TcCLB.510661.90 GIGRRGGGGGDNYRAAPTLSNSTWGESAPSRGRARGVGR--PQNNNSNVDDGGF
*.*: ** * .*****:* . ** : * : :.*****

```

Figura 4.21 - Análise da estrutura e da conservação da proteína RNA helicase DEAD/H ATP dependente, putativa. (A) Domínios e superfamília da proteína identificados pela ferramenta BlastP associado a ferramenta *NCBI Conserved Domain Search*. (B) Modelagem molecular da RNA helicase. (C) Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas de *T. brucei* (Tb927.9.12510) e de *T. cruzi* (TcCLB.510661.90).

A proteína codificada pelo gene Tb927.9.13990, chamada de DRBD2, pois possui dois domínios RRM (RNA recognition motif) de ligação ao RNA e um domínio de repetição Q (Q-repeat) (DE GAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005). A estrutura da proteína DRBD2 (Figura 4.22A) foi modelada baseada no fator de *splicing* associado a U4/U6 snRNA prp24. A

Além das proteínas identificadas pelas análises de proteômica, selecionamos a proteína U2AF35 (Tb927.10.3200), que está funcionalmente relacionada com o *trans splicing* em tripanossomatídeos (VAZQUEZ et al., 2009), para avaliar também a interação de Sub2 com a maquinaria de processamento. Neste caso, foi obtida a linhagem expressando U2AF35 fusionadas a GFP.

Um dado interessante obtido pelo nosso grupo foi a presença de proteínas ortólogas a fatores do EJC (Exon Junction Complex) de mamíferos no complexo de Sub2 de *T. cruzi* (INOUE, 2015). Considerando a sobreposição das proteínas identificadas entre os complexos de Sub2 de *T. cruzi* e *T. brucei*, decidimos avaliar se Sub2 também estaria associada a fatores de EJC. Neste caso, decidimos realizar a imunoprecipitação da proteína Mago (Tb927.6.4950).

4.2.3.1 Construção de ferramentas para o ensaio de co-imunoprecipitação e localização celular das proteínas selecionadas

4.2.3.1.1 Expressão e purificação dos nanobodies

A estratégia escolhida para os ensaios de imunoprecipitação foi purificação de proteínas fusionadas a GFP por cromatografia de afinidade. Neste caso, os nanobodies anti-GFP tem mostrado alta afinidade pela GFP (FRIDY et al., 2014). Nanobodies são domínios proteicos recombinantes com afinidade a antígenos. Os domínios são derivados da região variável de imunoglobulinas da família dos camélídeos e são compostas por homodímeros de cadeia pesada (MUYLDERMANS, 2013). Em 2014, Fridy et al. produziram os nanobodies que reconhecem a proteína GFP e selecionaram as moléculas com alta afinidade e os chamaram de LaG (Llama antibody against GFP). Posteriormente, selecionaram LaGs que reconhecem porções diferentes da GFP e as fusionaram para obter dímeros. O dímero LaG16-LaG2 (LAg16-G4S-2) é o que possui maior afinidade ($k_d = 0.036$ nM) para a proteína GFP e foi utilizado neste trabalho.

Portanto, uma das etapas foi a produção e purificação destes nanobodies. Os nanobodies foram expressos na bactéria Arctic Express (DE3) e a fração periplasmática foi isolada por choque osmótico (FRIDY et al., 2014). Posteriormente, optamos por purificar os nanobodies por cromatografia de afinidade utilizando a resina HisTrap FF – 1 mL acoplada ao cromatógrafo, assim, a eluição foi realizada utilizando um gradiente linear crescente de imidazol (25 a 250 mM) e pode-se monitorar a absorvância das amostras (280nm). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e os nanobodies foram eluídos com

110 mM de imidazol, aproximadamente (Apêndice C). Os nanobodies do periplasma foram purificados de forma eficiente nas condições descritas.

Em paralelo, os nanobodies solúveis do citoplasma da bactéria também foram purificados por cromatografia de afinidade, porém utilizando a resina HisTrap HP - 5 mL. Esta condição possui mais proteínas contaminantes no início do processo e a cromatografia enriqueceu os nanobodies, mas não purificou de forma eficiente (dados não mostrados). Provavelmente, a quantidade de extrato utilizado foi inferior a quantidade necessária para saturar a coluna cromatográfica, portanto, outras proteínas ligaram a coluna de forma inespecífica e foram eluídas nas mesmas condições que os nanobodies. Considerando estes resultados, somente os nanobodies purificados da fração periplasmática foram utilizados nos outros ensaios.

Os nanobodies foram conjugadas ao fluoróforo Alexa Fluor 488 5-SDP Ester para verificar se poderiam ser utilizados em ensaios de microscopia e para avaliar a especificidade. Com isto, foi possível verificar que os nanobodies são específicos para a GFP e que não reconhecem as proteínas de *T. brucei* inespecificamente (Apêndice D). Portanto, os nanobodies foram utilizados em ensaios de imunoprecipitação e de microscopia de imunofluorescência.

4.3.3.1.2 *Localização celular das proteínas selecionadas*

A estratégia escolhida foi obter linhagens de *T. brucei* expressando proteínas fusionadas a etiquetas, que poderiam ser utilizadas nos ensaios de imunoprecipitação e localização celular. As etiquetas GFP e 3xHA foram escolhidas devido a disponibilidade dos nanobodies anti-GFP e anticorpos comerciais anti-HA específicos para o epítipo HA. Portanto, os genes dos parasitas foram modificados utilizando a técnica descritas por Oberholzer et al. (2006), utilizando os vetores pMOTAG, para adição da etiqueta GFP ou 3xHA às proteínas. Segundo esta metodologia, são necessários oligonucleotídeos que contenham as sequências para direcionar a integração das etiquetas no locus do gene. Estes oligonucleotídeos também contêm as sequências para anelar nos vetores pMOTAG e, portanto, são utilizados para amplificar a etiqueta e o gene de resistência dos vetores por PCR. Este produto de PCR é transfectado em *T. brucei* e os parasitas são selecionados com o antibiótico de resistência, de acordo com o vetor utilizado. Os parasitas geneticamente modificados foram denominados de TbHip-HA, TbMago-HA e TbU2AF35-GFP.

4.3.3.1.2.1 TbHip-HA

A proteína Hip possui 17,7 kDa e foi fusionada a etiqueta 3xHA, que contém 3 epítomos da hemagutina A (HA), acrescentando 3,4 kDa à proteína. Após a transfecção e seleção, três clones foram analisados por *Western blotting* (Figura 4.23A) e microscopia de imunofluorescência indireta (Figura 4.23B). Os três clones expressam a proteína fusionada a HA e a proteína apresenta marcação nuclear. O clone TbHip-HA #2 apresentou maior número de parasitas com marcação no ensaio de microscopia e será utilizado nos ensaios de imunoprecipitação. Na Figura 4.23B, também se observa que a proteína Hip colocaliza com a proteína Sub2 e com o DNA nuclear do parasita.

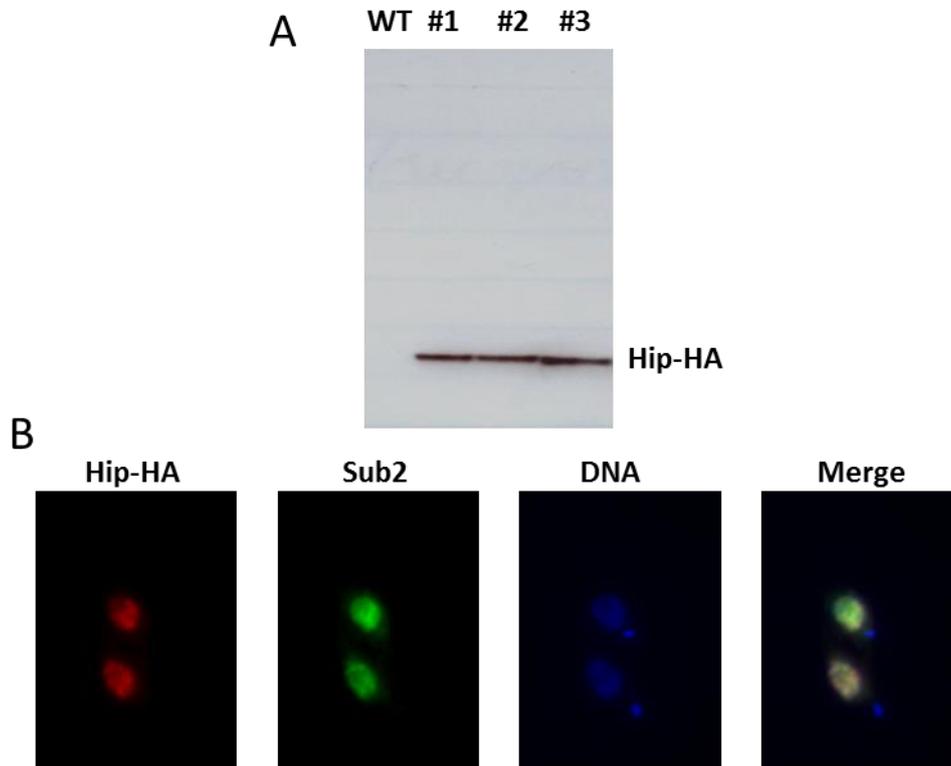


Figura 4.23 – A proteína Hip-HA é nuclear. (A) Expressão da proteína Hip-HA analisada por *Western blotting*, comparada com *T. brucei* selvagem (WT). (B) Localização nuclear da proteína Hip-HA e Sub2 em TbHip-HA #2. DNA: a marcação do material genético foi realizada com DAPI.

As imagens sugerem localização semelhante para as proteínas TbHip e Sub2, o que sugere co-localização nuclear das proteínas. As imagens de microscopia foram utilizadas para avaliar a localização das proteínas durante o ciclo celular, a co-localização durante o ciclo celular poderia ser um indicativo da interação entre as proteínas. As fases do ciclo celular podem ser definidas pelo número, tamanho e forma do núcleo e cinetoplasto (AKIYOSHI;

GULL, 2013; WOODWARD; GULL, 1990). Portanto, estes parâmetros foram utilizados para a seleção das células nas diferentes fases do ciclo e analisamos a co-localização das proteínas Hip-HA e Sub2. A Figura 4.24 mostra que as proteínas co-localizam independentemente do estado do DNA durante o ciclo celular, indicando que as proteínas provavelmente interagem. Assim, a próxima etapa foi avaliar a interação por ensaio de co-imunoprecipitação.

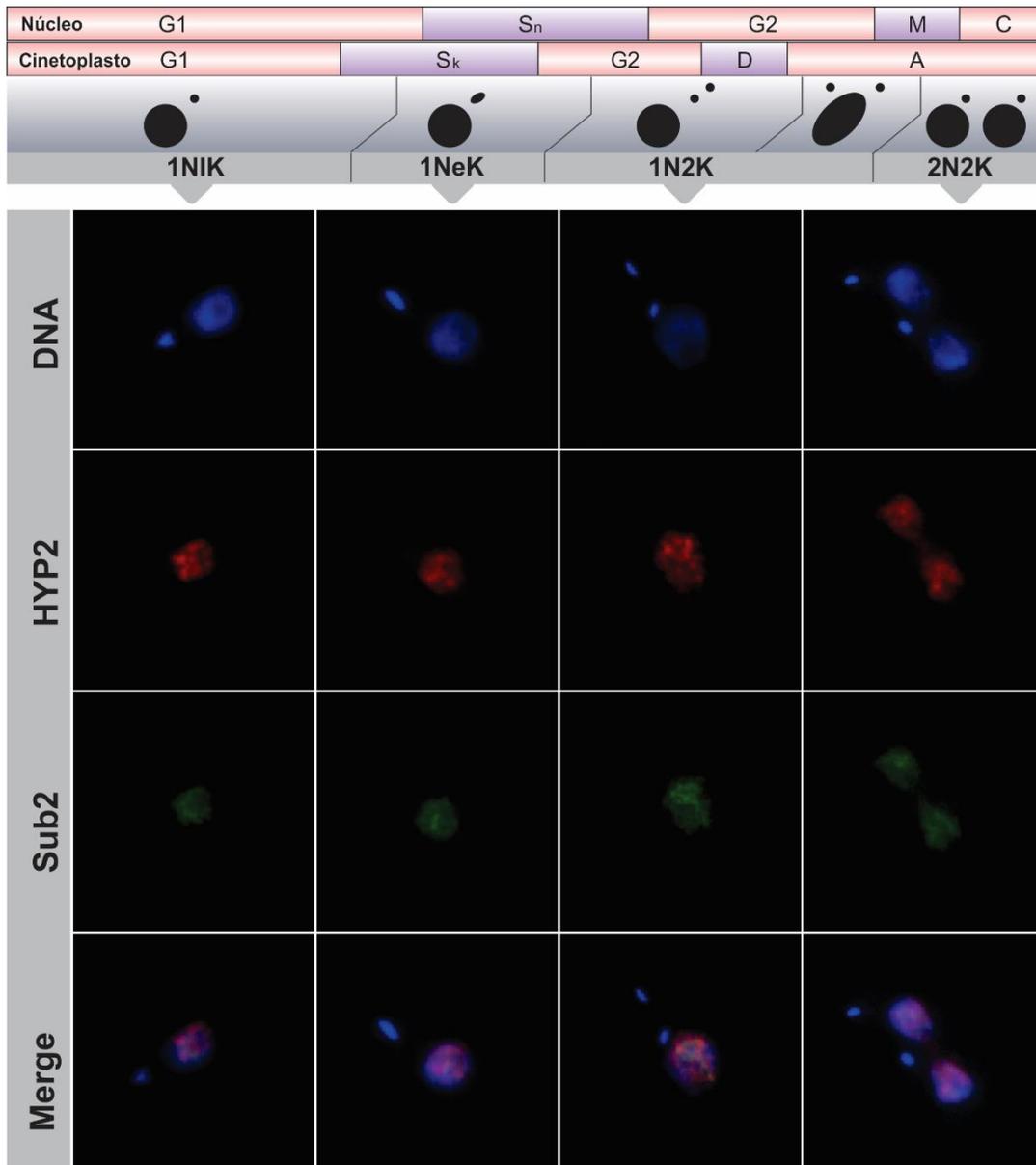


Figura 4.24 – Localização da proteína Sub2 e Hip fusionada a 3xHA nas fases do ciclo celular. DNA: a marcação do material genético foi realizada com DAPI. HYP2: Hip-3xHA. Merge: sobreposição das imagens. Fases do ciclo celular baseado no DNA nuclear: G1, S_n, G2, mitose (M) e citocinese (C). Fases da divisão do cinetoplasto: G1, S_k, G2, D (divisão do cinetoplasto), A (período antes da divisão da célula, célula com dois cinetoplasto).

4.3.3.1.2.2 TbU2AF35-GFP

A proteína U2AF35 foi fusionada a etiqueta GFP. Após a transfecção e seleção, dois clones foram analisados por citometria de fluxo (Figura 4.25A). Apenas a linhagem TbU2AF35-GFP #2 expressa a proteína fusionada a GFP e a proteína possui localização nuclear (Figura 4.25B), como descrito para a proteína endógena e para U2AF35 fusionada a etiqueta TAP (VAZQUEZ et al., 2009).

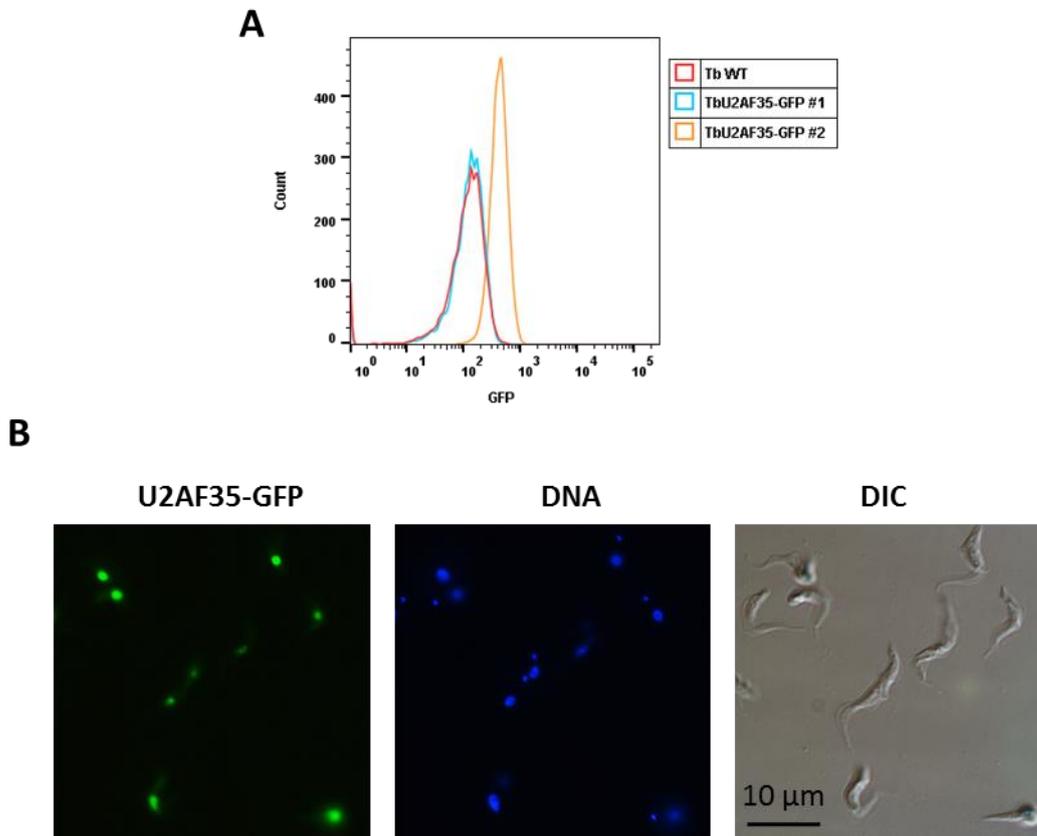


Figura 4.25 - Localização da proteína U2AF35 fusionada a GFP. (A) Expressão da proteína U2AF35-GFP por citometria de fluxo, comparado com *T. brucei* selvagem (TbWT) (B) Localização nuclear da proteína U2AF35-GFP da população TbU2AF35-GFP #2. DNA: a marcação do material genético foi realizada com DAPI. DIC: contraste por interferência diferencial.

4.2.3.2 Ensaio de imunoprecipitação

Ensaio de imunoprecipitação e detecção por *Western blotting* foram realizados para confirmar se as proteínas identificadas por espectrometria de massas interagem com o complexo

de Sub2. Para isto, as imunoprecipitações foram realizados nas mesmas condições da imunoprecipitação de Sub2-PTP-N.

Primeiramente, utilizando uma alíquota de duas amostras da imunoprecipitação de TbSub2-PTP-N analisadas por espectrometria de massas, avaliamos se as proteínas API5 e DHH1 poderiam ser detectadas por *Western blotting*, (Figura 4.26). A Tabela 4.3 indica que API5 é uma das proteínas mais abundante no complexo proteico, enquanto que DHH1 está menos representada na amostra.

Pelos resultados, observa-se que as proteínas API5 e DHH1 estão presentes no extrato dos parasitas selvagem e TbSub2-PTP-N, porém, somente API5 foi detectada por *Western blotting* nas amostras Sub2-PTP-N imunoprecipitada. A proteína API5 possui a massa predita de 59,66 kDa e a proteína Sub2 fusionada ao PTP tem 67, 22 kDa (49,22 + 18 kDa), como as proteínas possuem massa molecular próxima, migraram de forma semelhante no gel SDS-PAGE 13% (Figura 4.26 - sobreposição). A etiqueta PTP contém dois domínios de ligação a imunoglobulina G (IgG) da proteína A, que possui alta afinidade pela fração cristalizável de IgG, independentemente da especificidade do anticorpo conferida pela fração de ligação ao antígeno (Fab). Portanto, para confirmar a presença de API5 no complexo proteico, avaliamos se API5 co-imunoprecipita com Hip-HA (Figura 4.27), que será descrito a seguir.

Outras duas proteínas, Hip e Mago, foram imunoprecipitadas e avaliamos, por *Western blotting*, se Sub2 e API5 co-imunoprecipitam com estas proteínas. A proteína Hip também está altamente representada no complexo de Sub2 de *T. cruzi* e de *T. brucei*. Entretanto a proteína Mago foi identificada somente no complexo de Sub2 de *T. cruzi* (INOUE, 2015), segundo os dados de proteômica. Para realizar os ensaios, extrato dos parasitas TbHip-HA e TbMago-HA foram utilizados no ensaio de imunoprecipitação com a resina anti-HA e, como controle negativo, foi utilizado extrato de parasitas selvagens. A incubação do extrato com a resina foi realizada sem ou com a adição de RNase A, para verificar se a interação entre as proteínas depende de RNA.

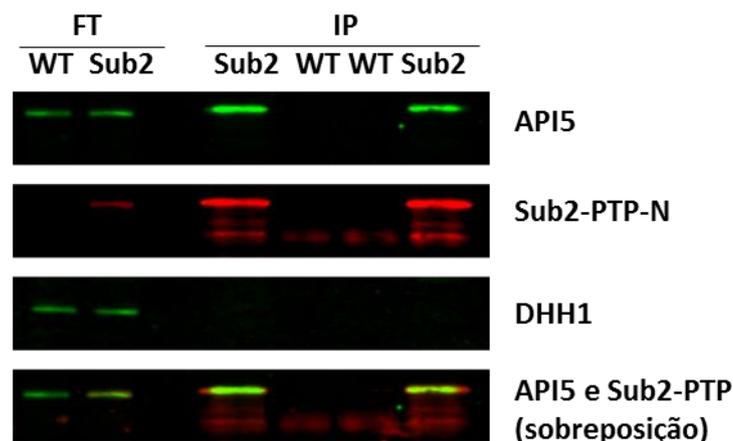


Figura 4.26 – Análise de interação de Sub2 com proteínas API5 e DHH1 por imunoprecipitação seguida de *Western blotting*. As imunoprecipitações foram realizadas com extratos da proteína Sub2 de *T. brucei* fusionada à etiqueta PTP na extremidade N terminal (Sub2) preparado com tampão citrato. O extrato foi incubado com a resina Dynabeads epoxy M270 (Invitrogen) ligada ao anticorpo anti-proteína A. Extrato de parasitas *T. brucei* selvagens (WT) foi utilizado como controle negativo. Após a imunoprecipitação, uma alíquota do *flow through* (FT), correspondente a 2×10^6 células, e o material imunoprecipitado (IP) foram analisados por *Western blotting* com os anticorpos primários anti-Proteína A (1:40000, coelho), anti-API5 (1:500, camundongo) e anti-DHH1 (1:500, camundongo) e com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Alexa Fluor 700 (1:10000) e anti-IgG de camundongo produzido em cabro conjugado a IRDye 800 (1:15000). O *Western blotting* foi revelado utilizando o Odyssey Imaging Systems (LI-COR).

Os resultados mostram que as proteínas fusionadas a Hip-HA (21,2 kDa) e Mago-HA (22,7 kDa) foram imunoprecipitadas e detectadas no *Western blotting*, porém a proteína Sub2 (49,22 kDa) e API5 (59,66 kDa) foram detectadas somente na imunoprecipitação da proteína Hip, sem a adição de RNase A. A proteína DHH1(46,47 kDa) não foi detectada em nenhuma imunoprecipitação (Figura 4.27). Assim, confirmamos que as proteínas Sub2, API5 e Hip pertencem ao mesmo complexo proteico e que a interação é dependente de RNA.

As proteínas API5, DHH1 e Hip-HA não foram detectadas no *flow through* da imunoprecipitação de TbHip-HA sem RNase A, provavelmente, devido à pouca quantidade de proteína analisada neste gel, como visualizado na membrana corada com Ponceau (Apêndice F).

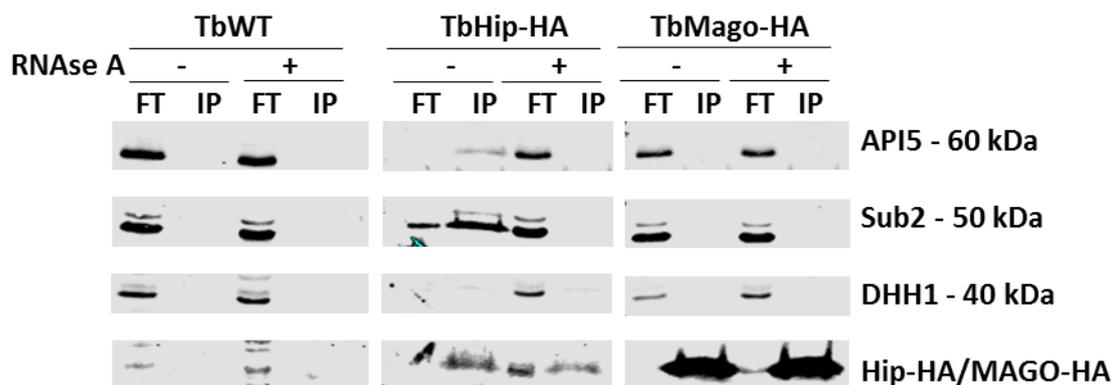


Figura 4.27 – Imunoprecipitações das proteínas Hip e Mago de *T. brucei* fusionadas à etiqueta HA na extremidade C terminal. As imunoprecipitações foram realizadas com a resina anti-HA (Sigma). O extrato proteico foi preparado com tampão citrato. Extrato de *T. brucei* selvagem (TbWT) e TbHip-HA(TbHip-HA) e TbMago-HA foram utilizados, sendo que TbWT foi utilizado como controle negativo. O ensaio foi realizado sem (-) ou com (+) a adição de RNase A. Após a imunoprecipitação, uma alíquota do *flow through* (FT), correspondente a 2×10^6 células, e o material imunoprecipitado (IP) foram analisados por *Western blotting* com os anticorpos primários anti-HA (1:250, coelho), anti-Sub2 (1:600, coelho), anti-API5 (1:500, camundongo) e anti-DHH1 (1:500, camundongo) e com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado a Alexa Fluor 700 (1:10000) e anti-IgG de camundongo produzido em cabro conjugado a IRDye 800 (1:15000). O *Western blotting* foi revelado utilizando o Odyssey Imaging Systems (LI-COR).

A proteína U2AF35 não foi identificada na análise de proteômica, porém é um fator que participa do *trans splicing* em tripanossomas (VAZQUEZ et al., 2009). No processamento por *cis splicing*, U2AF35, U2AF65 e SF1/BBP interagem e reconhecem as sequências do pré-RNA que direcionam o *cis splicing*. Em seguida, UAP56 (ortóloga a Sub2) favorece a troca de SF1 pela U2 snRNP dando continuidade ao processamento (WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009). Por isso, decidimos avaliar se Sub2 interage com um desses fatores de *T. brucei* e tentar indicar uma etapa que Sub2 poderia agir no *trans splicing*.

Para esta análise, U2AF35 foi fusionada a etiqueta GFP na porção C terminal, como descrito anteriormente, e extrato dos parasitas TbU2AF35-GFP foram utilizados nos ensaios de imunoprecipitação e a presença de Sub2 foi analisada *por Western blotting*. Como controle negativo, foi utilizado extrato de parasitas selvagens. A proteína U2AF35-GFP imunoprecipitou nestas condições e Sub2 também foi detectada na amostra da proteína imunoprecipitada (Figura 4.28).

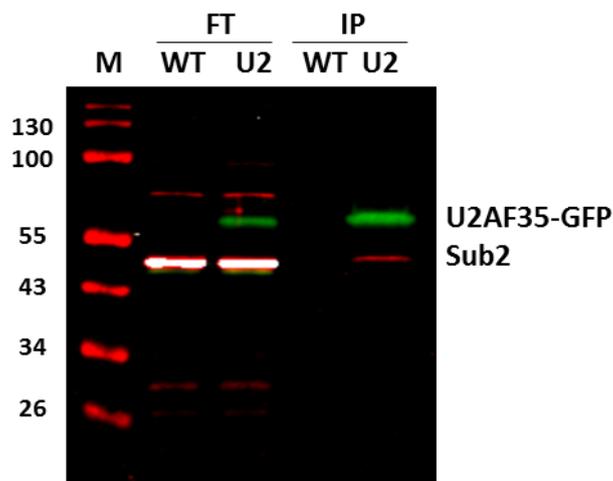


Figura 4.28 – Imunoprecipitação das proteínas U2AF35 de *T. brucei* fusionadas à etiqueta GFP na extremidade C terminal. As imunoprecipitações foram realizadas com a resina Dynabeads epoxy M270 (Invitrogen) ligada aos nanobodies anti-GFP. O extrato proteico foi preparado com tampão citrato. Extrato de parasitas TbU2AF35-GFP (U2), foram utilizados para imunoprecipitação. Extrato de *T. brucei* selvagem (WT) foi utilizado como controle negativo. Após a imunoprecipitação, uma alíquota do *flow through* (FT) e o material imunoprecipitado (IP) foram analisados por *Western blotting* com os anticorpos primários anti-GFP (1:500, camundongo) e anti-Sub2 (1:600, coelho) e com os anticorpos secundários IRDye800CW Goat anti-Mouse IgG (LI-COR, representado em verde) e Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 700 (Invitrogen, representado em vermelho), respectivamente. O *Western blotting* foi revelado utilizando o Odyssey Imaging Systems (LI-COR). M: marcador molecular PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific).

5 DISCUSSÃO

A proteína Sub2 pertence à família das proteínas DEAD box helicases. Proteínas desta família dissociam as interações RNA-RNA ou proteína-RNA, remodelando complexos ribonucleoproteicos e estão relacionadas com vários processos do metabolismo do RNA, como transcrição, processamento do pré-RNAm, biogênese do ribossomo, transporte nucleocitoplasma, decaimento do RNA e expressão gênica em organelas (CORDIN et al., 2006; LINDER, 2006).

Dados anteriores do nosso grupo, demonstraram que a proteína Sub2 é essencial para a exportação do RNAm em tripanossomatídeos, pois o silenciamento de Sub2 acumula RNAm no núcleo e diminui a taxa de tradução (SERPELONI et al., 2011b). Além disso, observamos que o silenciamento de Sub2 causa o acúmulo do *splice leader* RNA (SL RNA) e diminui a estrutura em Y, subproduto do *trans splicing* (HIRAIWA, 2012), indicando a participação da proteína também no processamento do pré-RNAm por *trans splicing* nestes organismos.

A proteína ortóloga de mamíferos, UAP56, é um fator de *splicing* essencial que interage com U2AF65 e recruta o complexo U2 snRNP. UAP56 também separa o complexo U4/U6 RNP durante o processamento do pré-RNAm por *cis splicing*. UAP56 também é um fator de exportação de RNAm, interagindo com a proteína Aly do complexo TREX da via de exportação (FLECKNER et al., 1997; SHEN, 2009; SHEN et al., 2008). O complexo TREX interage com o RNAm que foi processado por *splicing* e que contém o *cap*, acoplando o processamento e a exportação do RNAm (CHENG et al., 2006; MASUDA et al., 2005).

Com base nestas informações e visando investigar a atuação de Sub2 no metabolismo de RNA em tripanossomas, decidimos avaliar se o acúmulo do SL RNA, após o silenciamento de Sub2 em *T. brucei*, poderia ser decorrente da inibição da transcrição de RNA policistrônicos e, conseqüentemente, do *trans splicing*. Portanto, avaliou-se a taxa de transcrição, após o silenciamento de Sub2.

Em tripanossomas, o ensaio de transcrição *in vitro* em células permeabilizadas ainda é realizado de forma laboriosa e com nucleotídeo radioativo (ABUIN et al., 1999; CLAYTON et al., 1990; GENTIL et al., 2009; GUNZL et al., 2003; ULLU; TSCHUDI, 1990). Resumidamente, os parasitas são lavados para remover o meio de cultura, permeabilizados e incubados com o tampão de transcrição, que mantém a atividade da RNA polimerase II e contém os nucleotídeos necessários para a síntese de RNA (ATP, CTP, GTP e UTP radioativo) (ULLU; TSCHUDI, 1990). Após o processo de transcrição, o RNA dos parasitas é extraído e

hibridizado com as sondas de DNA depositadas em membranas (*slot blot*), previamente preparadas. Após 48 horas, as membranas são lavadas e expostas a filmes de raio X por diferentes períodos. Os filmes são revelados e as autoradiografias podem ser quantificadas por densitometria, usando softwares de análise de imagens. A intensidade do sinal corresponde a quantidade de RNA nascente. Portanto, o método é limitado para quantificar de forma precisa o nível de transcrição.

Este ensaio contribuiu para identificar mecanismos de regulação da expressão de genes em tripanossomatídeos. O ensaio de transcrição *in vitro* demonstrou que a RNA polimerase I de *T. brucei* transcreve, além do RNA ribossomal, duas famílias de genes codificadores de proteínas: a família de glicoproteínas variantes de superfície (GUNZL et al., 2003) e a família das prociclinas (CLAYTON et al., 1990). Em *T. cruzi*, a técnica contribuiu para identificar que mecanismos de regulação pós-transcricional são importantes para regular a expressão gênica durante os diferentes estágios do ciclo de vida, como descrito para de GP82 (GENTIL et al., 2009), amastina, trans-sialidade e GP85 (ABUIN et al., 1999). Por exemplo, a taxa de transcrição do RNAm de GP82 é semelhante nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*, porém o RNAm está presente na forma tripomastigota metacíclica (GENTIL et al., 2009).

A metodologia de transcrição *in vitro* com material radioativo é um método que requer alto número de células com as desvantagens associadas aos isótopos, como licenças, toxicidade, custo, decaimento do material e resíduos gerados. Outra desvantagem é a baixa reprodutividade do método quando a taxa de expressão do gene é baixa, como relatado para o modelo celular Hepa lcl7 (hepatoma de fígado de camundongo) (ELFERINK; REINERS, 1996). Também percebemos esta dificuldade ao realizar o ensaio de transcrição *in vitro* em *T. brucei* com UTP radioativo. Por isto, buscamos estabelecer um método para marcar o RNA nascente baseado em fluorescência e que pudesse ser quantificado com ferramentas mais robustas e precisas.

O primeiro passo foi buscar métodos descritos na literatura para estabelecer um protocolo para tripanossomatídeos. No caso de células de mamíferos, já foram descritos ensaios para a marcação de RNA nascente baseado em fluorescência. Para isto, o nucleotídeo BrUrd (5-bromo uridine) é adicionado ao meio de cultura e o nucleotídeo é incorporado ao RNA nascente. Em seguida, a célula é fixada e incubada com o anticorpo anti-bromodeoxiuridina (BrdUrd) e analisada por citometria de fluxo (JENSEN et al., 1993; JENSEN; LARSEN; LARSEN, 1993; LARSEN; JENSEN; LARSEN, 2001). (JENSEN et al., 1993; JENSEN; LARSEN; LARSEN, 1993). De forma semelhante, o kit Click-iT RNA Imaging (ThermoFisher

Scientific) indica adicionar o nucleosídeo modificado 5-etinil uridine (EU) ao meio de cultura e o EU é incorporado ao RNA nascente. Após a fixação e permeabilização da célula, o EU é detectado por uma reação química seletiva, chamada *click reaction*, o RNA modificado é marcado com um fluoróforo e pode ser analisado por microscópio de fluorescência ou confocal. O kit é indicado para células de mamífero e o RNA nascente é detectado no núcleo, com intensas marcações nos nucléolos (JAO; SALIC, 2008). O nucléolo é o local de transcrição de RNA ribossomal e representa a atividade da RNA polimerase I (PAULE; WHITE, 2000).

Com base nos métodos descritos acima, os primeiros testes em *T.brucei* foram realizados adicionando diferentes concentrações de EU (0.5, 1.0, 2.0 ou 5.0 mM EU por 2, 4 ou 8 horas) no meio de cultura SDM-79 suplementado com 10% SBF (dados não mostrados). Após esta etapa, foi realizada a *click reaction*, como descrito no manual do kit Click-iT RNA Imaging (ThermoFisher Scientific) e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, porém o RNA nascente não foi detectado em nenhuma das condições marcadas.

Em tripanossomatídeos, também já foram publicados trabalhos que avaliam a taxa de transcrição com material não radioativo. Nestes casos, o RNA nascente é marcado com um análogo de UTP, não radioativo, e analisado por microscopia (DOSSIN; SCHENKMAN, 2005; NAVARRO; GULL, 2001; POMBO et al., 1999; SMITH et al., 2009), que permite explorar a estrutura celular e a localização do RNA nascente. Entretanto, a microscopia apresenta limitações para quantificar a intensidade do sinal ou determinar a porcentagem do evento de interesse, que é baseado em poucas células. Devido a estas limitações e ao tempo de análise, geralmente são exploradas poucas informações quantitativas das imagens de microscopia. Smith et al. (2009) analisaram a intensidade da transcrição (fluorescência) de alguns parasitas *T. brucei* (50 células por amostra). Por outro lado, Dossin e Schenkman (2005) observaram que 70% dos parasitas *T. cruzi* possuíam marcação positiva para núcleo e para Br-UTP, porém os autores não informam o número de células analisadas e o critérios utilizados para analisar as imagens.

Portanto, apesar de alguns trabalhos analisarem a transcrição sem material radioativo em tripanossomatídeos, nenhuma metodologia permite uma análise quantitativa. A citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance são técnicas apropriadas para ensaios quantitativos e com reprodutibilidade e novas abordagens estão sendo descritas para quantificação precisa e acurada de parasitas (MIRANDA et al., 2015; MOON et al., 2014).

Por isso, devido à falta de um método para quantificar o RNA nascente em tripanossomatídeos baseado em fluorescência, adaptamos o protocolo de transcrição *in vitro*

em tripanossomatídeos, descrito por Ullu e Tschudi (1990), para análise por citometria de fluxo ou por sistema de imagem de alta performance (*high-content imaging system*). O protocolo descrito por Ullu e Tschudi (1990) foi utilizado como referência pois mantém a atividade da RNA polimerase II e o processamento por *trans splicing*, com pouca atividade da RNA polimerase I.

A primeira adaptação foi reduzir a quantidade de material utilizado no ensaio. O número de parasitas foi reduzido para 1×10^7 por reação. O menor número de células permite realizar o ensaio com parasitas de culturas com baixa densidade, o que pode ocorrer após modificações genéticas ou tratamentos com drogas. Como a citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance permitem a análise quantitativa com menor número de células que a análise tradicional, verificamos que 1×10^7 parasitas são suficientes para realizar o ensaio de transcrição *in vitro* e analisar por estas duas técnicas.

O protocolo descrito por Ullu e Tschudi permeabiliza os parasitas com 500 $\mu\text{g/mL}$ de LPC, no gelo, por 1 minuto. Devido a redução do número de parasitas, diferentes concentrações de LPC (100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$), por 1 ou 2 minutos, foram testadas para avaliar qual seria a melhor concentração para permeabilizar os parasitas e realizar a transcrição *in vitro*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo e a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ de LPC, no gelo por exatamente 2 minutos, foi considerada a condição ótima para o ensaio de transcrição *in vitro* em pequena escala (poucas células e pequeno volume de reação). Esta análise indica que a permeabilização é uma etapa crítica da metodologia e indicamos que seja realizada como descrito neste trabalho.

Outra modificação foi substituir o isótopo de UTP por 5-bromouridina trifosfato (Br-UTP) para marcar o RNA nascente, estabelecer as condições para detectar o Br-UTP com anticorpos e manter as células em suspensão com poucos agregados celulares para analisar por citometria de fluxo. Para isto, foram testados os detergentes triton x-100, tween 20, NP-40 e saponina e este apresentou melhores resultados: mantém a célula em suspensão, com poucos agregados celulares e é compatível com a detecção antígeno-anticorpo. Por isso, a saponina foi utilizada no tampão C para permeabilizar, bloquear e incubar os anticorpos.

Com o método de transcrição *in vitro* e com a quantificação por fluorescência padronizados, a metodologia foi utilizada para quantificar a frequência de parasitas, em fase exponencial de crescimento, que apresentam atividade transcricional ativa (amostra chamada de “*Run-on*”). A quantificação foi realizada por citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance utilizando as mesmas amostras nos dois sistemas. Os dados de citometria de fluxo

foram obtidos com 3 experimentos independentes e os dados do sistema de imagem de alta performance foram obtidos com 2 experimentos, o terceiro experimento foi excluído devido ao baixo número de dados adquiridos. Esta limitação poderia ser superada aumentando o número de campos para a leitura no sistema de imagem de alta performance. Em ambas análises, o controle sem nucleotídeos (Controle_sem nucleotídeos) de cada experimento foi utilizado para estabelecer o que corresponderia ao ruído da metodologia. Para quantificar a porcentagem de célula com RNA nascente, os debris e grumos celulares foram excluídos da análise. As médias dos experimentos analisados nos dois sistemas, indicam que aproximadamente 70%, dos parasitas possuem atividade transcricional.

Para verificar a especificidade da marcação, ou seja, se nenhum reagente ou condição poderiam causar um resultado falso positivo, foram realizados 4 controles: controle_sem anticorpo, que passou pelo processo de transcrição *in vitro*, mas não foi incubado com os anticorpos; controle_anticorpo secundário, que foi incubado somente com o anticorpo secundário após a reação de transcrição; controle_UTP, que foi incubado com o UTP, em vez de Br-UTP, durante o processo de transcrição; controle_sem nucleotídeos, que passou pelo processo de transcrição *in vitro*, porém sem adição dos nucleotídeos no tampão de transcrição. Os resultados, obtidos por citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance mostram que as amostras controles apresentam baixa intensidade do sinal de fluorescência e/ou baixa frequência de células com atividade transcricional, indicando que o Br-UTP incorporado ao RNA nascente é detectado de forma específica na amostra *Run-on* e os baixos sinais nas amostras controles correspondem ao ruído da técnica.

Para confirmar que o protocolo está otimizado para a atividade da RNA polimerase II e, conseqüentemente, transcrição dos RNA policistrônicos, os parasitas foram tratados com α -amanitina (amostra controle_alfa-amanitina). Em tripanossomatídeos, a α -amanitina inibe as RNA polimerases de forma seletiva. A RNA polimerase II é mais sensível ao tratamento com α -amanitina, enquanto que a RNA polimerase III apresenta nível intermediário de resistência e a RNA polimerase I é resistente (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; LAIRD et al., 1985). Nos experimentos, os parasitas foram tratados com 75 $\mu\text{g/mL}$ α -amanitina, por 4 minutos, antes da transcrição *in vitro*, pois esta concentração inibe a atividade da RNA polimerase II (LAIRD et al., 1985). Os dados mostram que a porcentagem de parasitas com atividade transcricional reduziu para $15.47\% \pm 4.20$ e $12,37 \pm 1.216$ (média \pm desvio padrão) nas análises por citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance, respectivamente,

indicando que o ensaio de transcrição *in vitro* está otimizado para a transcrição de RNAm, corroborando os resultados anteriores (ULLU; TSCHUDI, 1990).

Além da informação quantitativa, as imagens adquiridas pelo sistema de imagem de alta performance permitem visualizar que o RNA nascente está localizado em todo o núcleo celular. O tratamento com α -amanitina, com concentração que inibe a RNA polimerase II, diminui o sinal do RNA nascente significativamente e os outros controles (controle_sem anticorpo, controle_antikorpo secundário, controle_UTP, controle_sem nucleotídeos) apresentam pouco ruído. Estas imagens confirmam que o ensaio detecta o RNA nascente de forma específica e a distribuição do RNA nascente por todo o núcleo também indica atividade da RNA polimerase II, pois se a metodologia favorecesse a transcrição de RNAr pela RNA polimerase I, os RNA seriam detectados na região do nucléolo (NAVARRO; GULL, 2001; PAULE; WHITE, 2000).

Durante a padronização da metodologia foi utilizado o corante DAPI para marcar o DNA. O corante foi adicionado para selecionar os parasitas íntegros, eliminando os debris dos dados de citometria de fluxo. Porém, observamos que o sinal do DAPI era semelhante ao perfil de ciclo celular e poderia ser utilizado para quantificar o DNA de *T. brucei* fixado por citometria de fluxo. A quantificação do DNA normalmente é utilizada em células eucarióticas para determinar as fases do ciclo celular, detectar ploidias do DNA ou presença de células apoptóticas (DARZYNKIEWICZ, 2010). Métodos de quantificação de DNA requerem a utilização de corantes fluorescentes que se ligam de forma estequiométrica ao DNA, para que o sinal de fluorescência seja proporcional a quantidade de DNA (DARZYNKIEWICZ, 2010; NUNEZ, 2001).

Uma característica dos tripanossomatídeos é a presença de duas organelas com DNA, o cinetoplasto e o núcleo. O cinetoplasto é uma estrutura que contém o DNA mitocondrial e corresponde a 30% do DNA celular e o núcleo contém o DNA nuclear do parasita (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009). Estas duas organelas possuem afinidade diferentes aos corantes de DNA. Corantes que se ligam ao sulco menor do DNA (como o DAPI) tem preferência para o DNA do cinetoplasto (kDNA), enquanto que corantes que intercalam no DNA (como o iodeto de propídeo) tem maior afinidade ao DNA nuclear (WHEELER; GULL; GLUENZ, 2012). Provavelmente, devido a afinidade ao DNA nuclear, muitos trabalhos que analisam o ciclo celular de tripanossomatídeos utilizam métodos que se baseiam na coloração com iodeto de propídeo (CARDOSO et al., 2008; DE MELO ALVES PAIVA et al., 2011; GALE; CARTER; PARSONS, 1994; HAMMARTON et al., 2003; KUMAR; WANG, 2005; LI; UMEYAMA; WANG, 2009; MENNA-BARRETO et al., 2007; MUTOMBA et al., 1997)

ou Sytox Green (GRAEFE et al., 2002). Recentemente, os corantes supravitais Vibrant Dye Cycke Violet (KABANI; WATERFALL; MATTHEWS, 2010; TRINDADE et al., 2016) e DyeCycle Orange (BUCERIUS et al., 2011; SIEGEL; HEKSTRA; CROSS, 2008) também têm sido utilizados.

Apesar de a coloração do DNA com DAPI para analisar o ciclo celular por citometria ainda não ter sido descrita em tripanossomatídeos, percebemos que, após a reação de transcrição *in vitro* e fixação dos parasitas, a adição do DAPI e RNase A, permitia quantificar o DNA nuclear e analisar o ciclo celular. Para comparar os dados com o corante tradicionalmente utilizado para quantificação do DNA, os parasitas foram submetidos ao protocolo de transcrição *in vitro* e corados com iodeto de propídeo. Os histogramas obtidos da coloração do DNA com DAPI e iodeto de propídeo são semelhantes e mostram que a intensidade de fluorescência das células na fase G2/M do ciclo celular é o dobro da intensidade das células na fase G0/G1, como esperado dos métodos de quantificação de DNA (DARZYNKIEWICZ, 2010). Além disso, a variação da intensidade de fluorescência das células na fase G0/G1, representada pelo coeficiente de variação (CV) do valor médio da intensidade de fluorescência desta população celular, é semelhante nos dois protocolos de coloração de DNA. O CV das células na fase G0/G1 representa a acurácia da quantificação do DNA e quanto menor o valor de CV, maior a acurácia do método, porém não há um consenso do valor máximo do CV (DARZYNKIEWICZ, 2010).

Os resultados confirmam que a análise do ciclo celular com DAPI é semelhante a análise com iodeto de propídeo. Considerando que os tripanossomas possuem duas organelas com DNA e que a acurácia da coloração com DAPI é semelhante da coloração com iodeto de propídeo, consideramos que o DAPI pode ser utilizado para determinar o ciclo celular por citometria de fluxo nas condições estabelecidas neste trabalho.

Portanto, foi possível estabelecer uma metodologia para avaliar o RNAm nascente e ciclo celular simultaneamente na mesma célula em tripanossomas. Com base nos dados obtidos, observa-se que as células consideradas transcricionalmente ativas estão distribuídas nas três fases (G0/G1, S, G2/M) do ciclo celular. Enquanto que as células sem atividade transcricional estão, principalmente, na fase G0/G1. Apesar desta correlação, não foram analisados outros fatores para avaliar por que somente uma fração de células em G0/G1 estão sem atividade transcricional, portanto, são necessários outros estudos para investigar esta correlação.

Os resultados demonstram que foi possível estabelecer as condições para quantificar o RNA nascente transcrito pela RNA polimerase II e para analisar o ciclo celular de células

fixadas simultaneamente. A metodologia descrita permitiu quantificar a taxa de transcrição de forma mais rápida e precisa do que o protocolo clássico com nucleotídeo radioativo. Os resultados dos ensaios de transcrição *in vitro* analisados tanto por citometria de fluxo quanto por sistema de imagem de alta performance são semelhantes, portanto, ambas as ferramentas de análises quantitativas podem ser utilizadas. A metodologia também poderá ser adaptada para ser analisada em outros equipamentos com sistema de detecção e quantificação de fluorescência. A análise simultânea do ciclo celular foi realizada somente por citometria de fluxo, mas os sistemas de imagens de alta performance são capazes de quantificar a marcação do DNA nuclear e determinar o perfil do ciclo celular, o que também poderia ser padronizado para tripanossomatídeos.

Acreditamos que a metodologia é apropriada para estudos que buscam compreender a biogênese de RNAm, os mecanismos de transcrição pela RNA polimerase II, a regulação da expressão gênica nas diferentes fases do ciclo celular e os mecanismos de progressão e controle do ciclo celular em tripanossomatídeos. O método também poderá ser utilizado para a triagem e descoberta de inibidores da transcrição e do ciclo celular, como novos candidatos a drogas para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos.

Após a padronização do método, utilizamos esta abordagem para avaliar se a proteína Sub2 está relacionada com o processo de transcrição, pois o silenciamento da proteína causa o acúmulo do SL RNA metilado (HIRAIWA, 2012) e decidimos avaliar se o acúmulo do SL RNA poderia ser decorrente da inibição da transcrição do pré-RNAm. O acúmulo do SL RNA e do RNAm no núcleo é detectado a partir de 36 e 48 horas, respectivamente, de indução do silenciamento de Sub2 (HIRAIWA, 2012; SERPELONI et al., 2011b). Por isto, o silenciamento da proteína Sub2 foi induzido por RNAi em *T. brucei* e, após 48 horas, a quantidade de Sub2 e a taxa de transcrição foram avaliadas por citometria de fluxo e por sistema de imagem de alta performance.

Após a indução do silenciamento de Sub2, observa-se que a quantidade de proteína Sub2 é menor nestes parastias do que em parasitas controle, sem a indução do RNAi. Nestas condições, a taxa de transcrição sofreu pouca alteração, ou seja, a depleção da proteína Sub2 causa a redução de 20%, aproximadamente, de parasitas com atividade transcricional ($53,33 \pm 11,80$ e $61,39 \pm 8,65$, média e desvio padrão dos dados analisados por citometria de fluxo e sistema de imagem de alta performance, respectivamente), comparado com os parasitas sem a depleção da proteína ($74,67 \pm 2,38$ e $75,42 \pm 6,03$). Esta redução foi semelhante a observada para os parasitas tratados com sinefungina ($67,50 \pm 1,41$ e $68,08 \pm 6,38$), droga que inibe o

trans splicing (MCNALLY; AGABIAN, 1992) e diferente do tratamento como α -amanitina ($13,80 \pm 2,54$ e $15,05 \pm 8,36$), droga que inibe a atividade da RNA polimerase II. Portanto, o efeito na taxa de transcrição causado pela depleção da proteína Sub2 é mais semelhante ao efeito causado pelo tratamento com sinefungina do que com α -amanitina.

Como a depleção da proteína Sub2 não bloqueia a transcrição, o acúmulo do SL RNA e redução da estrutura em Y devem ser decorrentes da inibição do início do *trans splicing*. O mesmo fenótipo, acúmulo de SL RNA e redução da estrutura em Y, também foi observado após a depleção de componentes do spliceossomo ou de proteínas associadas ao *trans splicing* [SF1, U2AF35 (VAZQUEZ et al., 2009), SSm4 (JAE et al., 2010), proteínas Sm (MANDELBOIM et al., 2003; TKACZ et al., 2007), LSm (LUZ AMBROSIO et al., 2009; TKACZ et al., 2008), U5-15K (SILVA et al., 2011), U5-Cwc21 (LUZ AMBROSIO et al., 2009), Prp31 (LIANG et al., 2006), SPF27/complexo PRP19 (AMBRÓSIO; BADJATIA; GÜNZZL, 2015), CYC12 (BADJATIA et al., 2016), TSR1 e TSR1IP (GUPTA et al., 2014)].

Sub2 pode agir no processamento sem interferir na taxa de transcrição, pois o processamento do pré-RNA_m por *trans splicing* não depende da interação com a maquinaria de transcrição (STEWART et al., 2010). Além disso, as análises de ultra-estrutura em *T. cruzi* mostram que Sub2 está presente, principalmente, em regiões de cromatina mais frouxa com tendência de associação na periferia da cromatina mais densa, que são regiões típicas de processamento de mRNA (SERPELONI et al., 2011b).

Como a proteína UAP56, ortóloga de mamíferos, foi descrita como um fator essencial para o *cis splicing* do pré-RNA_m (FLECKNER et al., 1997) e interage com componentes da maquinaria de *splicing* (FLECKNER et al., 1997; SHEN, 2009; SHEN et al., 2008), decidimos avaliar se Sub2 de tripanossomatídeos estaria associada com proteínas do core do spliceossomo, formando pelas proteínas Sm/LSm e os U snRNAs (GUNZZL, 2010). Inicialmente comparamos o perfil de sedimentação das proteínas após o fracionamento de extrato proteico por cromatografia de exclusão de tamanho. Para isto, extrato de *T. brucei*, expressando a proteína do core do spliceossomo SmD1 fusionada a etiqueta PTP (HIRAIWA, 2012; LUZ AMBROSIO et al., 2009), foi preparado com tampão citrato, fracionado por cromatografia de exclusão e analisado por *Western blotting*. Nestas condições, os resultados obtidos mostram que os complexos que contêm as proteínas Sub2 e SmD1 migram de forma diferente, devido a diferente massa molecular dos complexos. Este dado indica que Sub2 não pertence ao core do spliceossomo, chamados de core snRNP, em *T. brucei*. Além dos cores snRNP, os complexos contêm proteínas especificadas de cada snRNP, formando os U snRNPs, e outras proteínas

adaptadoras ou reguladoras relacionadas com o *splicing* (GUNZL, 2010). Poranto, Sub2 deve ser uma proteína adaptadora ou reguladora do *trans* splicing, como descrito para a proteína ortóloga no *cis* *splicing* (SHEN, 2009).

Para tentar compreender a relação de Sub2 com o *trans* *splicing* e com a via de exportação de RNAm em *T. brucei*, buscamos identificar quais proteínas estão associadas à Sub2. Inicialmente, a estabilidade do complexo que contém Sub2 foi avaliada por cromatografia de exclusão de tamanho e análise por *Western blotting* com parasitas expressando a proteína Sub2 fusionada a etiqueta GFP ou PTP, na extremidade C-terminal. Diferentes tampões e condições de lise foram testadas e alguns testes foram realizados com *cross linking* por formaldeído. Os resultados indicavam que a proteína permanecia em complexo em algumas condições. Portanto, tentamos enriquecer o complexo proteico de Sub2 por imunoprecipitação, com previa separação por cromatografia ou não, e analisamos por gel SDS-PAGE corado com prata ou espectrometria de massas. Em algumas condições, era evidente a presença de Sub2 no gel SDS-PAGE corado com prata, comparado com a amostra controle, porém não era possível identificar o enriquecimento de outras proteínas. Mesmo assim, algumas amostras foram analisadas por proteômica e, nos dados em que Sub2 era a mais representada, identificou-se poucas proteínas ou proteínas sem funções relacionadas, indicando que o complexo não estava estável nas condições testadas e que as proteínas identificadas devem ter permanecido nas amostras devido a interações inespecíficas.

A adição de etiquetas às proteínas pode gerar alterações conformacionais e funcionais. A proteína Sub2 pertence à família DEAD box helicase, portanto possui os 9 motivos característicos da família, incluindo os motivos funcionais ATPase e de ligação RNA (BITTENCOURT, 2015), distribuídos por toda a proteína e se enovela em dois domínios estruturais (SERPELONI et al., 2011b). Como não foi possível enriquecer o complexo de Sub2 por imunoprecipitação utilizando as etiquetas (GFP ou PTP) na região C-terminal de Sub2, acredita-se que as modificações na porção C-terminal alteraram as interações de Sub2 com outras proteínas. As etiquetas também podem ter modificado a distribuição e interação entre os motivos de Sub2, pois a distribuição e interação de todos os motivos contribuem para a atividade e para conformação das proteínas DEAD (CORDIN et al., 2006; LINDER, 2006).

Como não foi possível identificar o complexo por imunoprecipitação com as etiquetas na extremidade C-terminal, a etiqueta PTP foi adicionada à extremidade N-terminal da proteína Sub2, obtendo a linhagem TbSub2-PTP-N. Extratos destes parasitas foram preparados com diferentes tampões e utilizados para imunoprecipitação. As amostras foram analisadas por gel

SDS-PAGE corado com prata e foi possível detectar o enriquecimento de Sub2-PTP e a presença de algumas proteínas apenas na amostra de Sub2-PTP-N, em relação ao controle (extrato de parasita selvagem). O melhor resultado foi obtido no ensaio realizado com tampão citrato. O mesmo tampão permitiu a identificação de proteínas do complexo proteico de Sub2 de *T. cruzi*, obtido por imunoprecipitação da proteína fusionada a GFP na extremidade N-terminal (INOUE, 2015).

Devido aos resultados obtidos com tampão citrato, a imunoprecipitação foi repetida em triplicata biológica e as amostras foram analisadas três vezes por espectrometria de massas, totalizando 9 réplicas. Foram selecionadas as proteínas que tiveram no mínimo três espectros MS1, dois peptídeos no MS2 e que estavam presentes em pelo menos duas réplicas diferentes. Destas, foram mantidas as proteínas presentes apenas nas amostras Sub2-PTP, excluindo as proteínas identificadas também nas amostras de parasitas selvagens. Em seguida, proteínas das subunidades ribossomais e proteínas hot spot de retrotransposon (RHS) foram excluídas da análise. Após estes critérios, foram selecionadas 36 proteínas. Algumas proteínas identificadas no complexo de Sub2 de *T. brucei* também foram identificadas no ensaio de *T. cruzi* (INOUE, 2015), indicando que ambos complexos são estáveis e semelhantes nestas condições. As proteínas identificadas em pelo menos 5 réplicas estão presentes em maior quantidade na amostra e, provavelmente, interagem de forma mais estável com o complexo. Estas proteínas foram consideradas relevantes para discussão neste trabalho.

As quatro proteínas mais abundantes identificadas, além de Sub2, ainda não foram caracterizadas em *T. brucei* e estão descritas no banco de dados TriTrypDB como proteínas hipotéticas (Tb927.1.2750, Tb927.6.1470, Tb927.7.2240, Tb927.4.3060). A busca de proteínas homólogas por análise de sequências (BlastP) indica que a proteína Tb927.4.3060 é conservada somente em tripanossomas, as proteínas Tb927.1.2750 e Tb927.6.1470 estão conservadas somente em espécies da família Trypanosomatidae e a proteína Tb927.7.2240 está conservada em espécies da ordem Kinetoplastida. Estas informações mostram que estas proteínas podem ser exclusivas de kinetoplastídeos/tripanosomatídeos e que os mecanismos moleculares relacionados a estas proteínas podem ser diferentes dos mecanismos dos eucariotos superiores.

As análises de domínios identificaram que a proteína codificada pelo gene Tb927.6.1470 possui o domínio FOP (*Friend of PRMT1*), um domínio UBM (*Uap56 binding motif*) típico (LDXXLD) e uma sequência semelhante (LDXXLL) e duas sequências RG/GR entre os possíveis domínios UBM. A proteína homóloga de *T. cruzi* (TcFOP) também foi identificada no complexo proteico de Sub2 e possui uma região rica em arginina e glicina (GAR

- 5 repetições RG/GR) entre os dois domínios UBM. Esta proteína está sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa e os resultados obtidos até agora mostram que a proteína é nuclear e interage com componentes da via de exportação, como Mex67 e Sub2, e do EJC, como Hel45 (Domingues, P. em preparação).

A proteína Fop, também chamada de Chtop/C1orf77/Srag, é altamente conservada em vertebrados, porém as proteínas ortólogas em leveduras, vermes e insetos não foram identificadas (VAN DIJK et al., 2010). A Fop foi identificada como componente do complexo TREX, competindo com a proteína Aly (ortóloga a Yra1 de levedura) pela interação com UAP56 (ortóloga a Sub2 de leveduras). Provavelmente, a proteína Aly interage com Fop no início da formação do complexo TREX e favorece a interação de Fop com Nxf1 (ortóloga a Mex67 de leveduras) (CHANG et al., 2013; TENG; WILSON, 2013). A presença do complexo TREX é essencial para a interação de Nxf1 com o RNAm e, conseqüentemente, para a exportação do RNA para o citoplasma (VIPHAKONE et al., 2012).

Além disso, já foi descrito que a Fop ativa a transcrição de genes responsivos a estrógeno (VAN DIJK et al., 2010) e ao fator de transcrição Zbp-89 (FANIS et al., 2012), mas ainda não foi estabelecido a relação entre a transcrição e a exportação do RNAm e se Fop desempenha alguma função no processamento do RNA.

A proteína Tb927.7.2240, descrita como hipotética nos bancos de dados, possui estrutura semelhante as proteínas API5 (*apoptosis inhibitory protein 5*) e symplekin, segundo a análise de estrutura obtida a partir da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta Phyre2. A proteína API5 é alongada e composta somente por α -hélices, esta estrutura possibilita a interação com múltiplos parceiros de diferentes complexos (HAN et al., 2012), incluindo as proteínas AIP1/2 (LI et al., 2011) e Acinus (RIGOU et al., 2009). As proteínas AIP1/2 (*API5-interacting protein 1 e 2*) de *Oryza sativa* (arroz) são homólogas a Sub2/UAP56 e regulam a morte celular programada durante o desenvolvimento do gametócito masculino (LI et al., 2011). Em células de mamíferos (HeLa), a proteína Acinus regula o processamento do pré-RNAm (RODOR et al., 2016), pertence a um complexo que participa do *splicing* e da apoptose (ASAP - *apoptosis and splicing-associated protein*) (SCHWERK et al., 2003) e é componente auxiliar do EJC (*exon junction complex*) (RODOR et al., 2016; TANGE, 2005). A proteína Tb927.7.2240 também é estruturalmente semelhante a symplekin. Apesar da semelhança estrutural, a proteína Tb927.7.2240 possui apenas 22,47 % de identidade com a symplekin (Tb927.8.7490) de *T. brucei*, identificada recentemente (KOCH et al., 2016). A symplekin de *T. brucei* e outros 9 fatores estão relacionados com o processamento da extremidade 3' do

RNA_m. O silenciamento destas proteínas indica que a maioria é essencial para o crescimento, poliadenilação e *trans splicing*, demonstrando que estas duas reações de processamento do RNA_m são acopladas (KOCH et al., 2016). De forma semelhante, a symplekin de mamíferos interage com os fatores de clivagem e poliadenilação do pré-RNA_m (TAKAGAKI; MANLEY, 2000; VETHANTHAM; RAO; MANLEY, 2007) e pertence ao complexo de processamento do pré-RNA_m de histonas, que não possui intron e possui uma estrutura em loop na extremidade 3', em vez da cauda poli(A) (KOLEV; STEITZ, 2005; SULLIVAN; STEINIGER; MARZLUFF, 2009).

Como a symplekin de *T. brucei* foi identificada, deve-se avaliar funcionalmente se a proteína Tb927.7.2240 participa da poliadenilação ou de outra etapa do metabolismo nuclear do RNA. Esta análise está sendo realizada com a proteína homóloga em *T. cruzi* pelo nosso grupo de pesquisa. Os dados mostram que a proteína é nuclear e estamos tentando identificar o complexo proteico (Domingues, P. em preparação).

Em relação às outras duas proteínas (Tb927.1.2750, Tb927.4.3060 - Hip) identificadas com maior quantidade nas imunoprecipitações, não foi possível inferir a função ou a estrutura pelas análises realizadas com as ferramentas hmmscan, Phyre2 e BlastP.

Muitas proteínas de tripanossomatídeos estão descritas como hipotéticas nos bancos de dados. Isto requer mais análises de bioinformática e experimentos bioquímicos e/ou moleculares para identificar a função das proteínas. Portanto, as principais proteínas identificadas no complexo proteico com Sub2 devem ser estudadas para verificar se participam da via de exportação e/ou processamento do RNA_m.

Além das proteínas hipotéticas, foram identificadas outras proteínas. Entre elas, estão as proteínas Hel67 (também identificada como VASA e DBP1) e DHH1 que pertencem aos grânulos periféricos nucleares (NPGs). Estes grânulos são formados externamente ao núcleo quando o *trans splicing* é inibido e, conseqüentemente, ocorre acúmulo de RNA_m processados parcialmente. Os NPGs são compostos pela proteína de ligação a poli(A) 2, VASA e proteínas presentes em *P-bodies* (DHH1, SCD6 e XRNA) (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; HOLETZ et al., 2007; KRAMER et al., 2008), grânulos que contêm enzimas envolvidas na degradação do RNA_m. Apesar do NPG compartilhar algumas proteínas com o *P-bodies*, os dois grânulos respondem de forma diferente, pois o NPG não depende da proteína core dos *P-bodies*, SCD6. Sugere-se que NPG de tripanossomatídeos possua a função de controle de qualidade dos RNA_m recém transcritos e possa direcioná-los para a tradução, degradação ou estocagem no citoplasma (KRAMER et al., 2012), portanto a interação entre componentes do

NPGs e de processamento/exportação poderia corresponder a uma etapa do controle de qualidade do RNA.

Como componente de uma maquinaria de controle de qualidade, também foi identificada a proteína Hel45, que interage com proteínas da via de exportação do RNA e do EJC (*Exon Junction Complex*) (INOUE, 2015). O EJC tem sido descrito como o complexo que acopla o *splicing* do pré-RNAm com os diferentes mecanismos celulares: exportação do mRNA, localização citoplasmática do RNA, tradução e *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (WOODWARD et al., 2016).

Os mecanismos NPG e EJC provavelmente são responsáveis pelo controle de qualidade dos RNA dentro do núcleo, desde a transcrição até a exportação, em tripanossomatídeos. Como o silenciamento de Sub2 altera a exportação do RNAm (SERPELONI et al., 2011b) e o *trans splicing* (HIRAIWA, 2012), a proteína também poderia interagir com os mecanismos de controle direcionando o destino do RNA. Com isto, Sub2 interligaria os diferentes mecanismos relacionados com a biogênese RNAm.

No grupo de proteínas identificadas com maior relevância (em pelo menos 7 réplicas) na imunoprecipitação de Sub2, incluem proteínas ALBA (Tb927.4.2030/ Tb927.4.2040), ATP-dependent DEAD/H RNA helicase putative (Tb927.9.12510) e a DHH1, que interagem com os complexos U snRNP de *splicing* ou com os complexos que auxiliam o *splicing*, porém ainda não foi descrita a função destas proteínas no *trans splicing*. Além disso, a subunidade de uma quinase e uma piruvato diquinase foram identificadas e ainda não foram analisadas funcionalmente. Também foram identificadas proteínas de organelas citoplasmáticas (aldolase glicosomal e metalo-peptidase mitocondrial) e duas histonas (H2A e H2B), que podem ter imunoprecipitado como contaminantes devido a presença de membranas delimitando o núcleo e estas organelas na célula intacta ou devido à alta quantidade de proteína no núcleo, respectivamente.

Os dados de espectrometria de massas indicam as possíveis proteínas do complexo proteico de Sub2 e decidimos confirmar a interação de algumas proteínas por co-imunoprecipitação e análise por *Western blotting*. Estes ensaios foram realizados com duas proteínas hipotéticas (Tb927.7.2240 e Tb927.4.3060 - Hip), identificadas em todas as réplicas e altamente representadas nos dados, e com DHH1, identificada em 6 réplicas e menos representada do que as proteínas hipotéticas. Como não temos anticorpo contra a proteína Hip, a etiqueta HA foi adicionada à extremidade C-terminal da proteína para o ensaio de imunoprecipitação. Para avaliar se a interação das proteínas é mediada por RNA, a

imunoprecipitação também foi realizada com RNase A. Após a imunoprecipitação de Hip-HA e Sub2-GFP-N, avaliou-se a presença das outras proteínas por *Western blotting*. Assim, confirmou-se a interação entre Sub2, API5 e Hip (Tb927.4.3060). As proteínas foram identificadas somente nas amostras sem RNase A, portanto a interação entre as proteínas depende de RNA. Neste mesmo ensaio, não foi detectada a proteína DHH1, com ou sem a RNase A. Este dado indica que a proteína pode ter sido imunoprecipitada de forma inespecífica nas amostras analisadas por espectrometria de massas ou está presente em pouca quantidade na amostra analisada por *Western blotting*.

Além das proteínas identificadas por espectrometria de massas, analisamos se Sub2 interage com U2AF35. No processamento por *cis splicing*, U2AF35 forma um complexo com U2AF65 e SF1/BBP, que reconhece as sequências que definem o local do *cis splicing* no pré-RNAm. Sub2 favorece a troca de SF1 por um dos complexos core do spliceossomo, U2 snRNP, dando continuidade ao processamento (WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009). Como o silenciamento de Sub2 em *T. brucei* causa o acúmulo do SL RNA e diminuição da estrutura em Y, fenótipo que indica inibição da primeira reação de transesterificação do *trans splicing* (HIRAIWA, 2012), decidimos avaliar se Sub2 pertence ao mesmo complexo que U2AF35 por imunoprecipitação. Após a imunoprecipitação de U2AF35-GFP, a presença de Sub2 foi avaliada por *Western blotting*. O resultado mostra que Sub2 imunoprecipita com U2AF35, indicando sua interação com a maquinaria de *trans splicing*. Esta interação corrobora que Sub2 pode agir nas etapas iniciais do *trans splicing*, levando ao acúmulo do SL RNA e diminuição da estrutura em Y após a depleção de Sub2 (HIRAIWA, 2012), fenótipo também observado após o silenciamento de U2AF35 (VAZQUEZ et al., 2009). Pelo ensaio realizado, não se pode avaliar se a interação entre as proteínas é direta ou mediada por outra proteína ou RNA. Para isto, devem ser feitas outras análises como, por exemplo, ensaios de duplo híbrido ou *pull down*.

Devido ao acúmulo de SL, do perfil de sedimentação diferente entre Sub2 e SmD1, ausência dos componentes do core spliceossomo nas imunoprecipitações e interação de Sub2 com U2AF35 acreditamos que a proteína Sub2 seja um fator auxiliar no *trans splicing* e não uma proteína dos complexos U snRNP. As interações de Sub2 podem ser dinâmicas e transientes, o que dificultaria a identificação destas interações. Portanto, apesar de enriquecer o complexo de Sub2 nas condições utilizadas para imunoprecipitação, outras condições podem estabilizar as interações transientes, como o uso de *cross linking*.

Na maioria dos eucariotos, o RNAm é gerado pela transcrição e processamento (*capping*, *splicing* e poliadenilação) do pré-RNAm. A transcrição do pré-RNAm é realizada

pela RNA polimerase II, que também coordena as reações de processamento co-transcricionalmente. O domínio C-terminal (CTD) da subunidade maior da RNA polimerase II, Rrb1, é composto por repetições de um heptapeptídeo conservado (YSPTSPS). Os heptapeptídeos sofrem várias modificações, que direcionam a atividade da RNA polimerase II e recrutam os fatores dos mecanismos que ocorrem co-transcricionalmente. Após as etapas iniciais da transcrição, quando o pré-RNAm atinge 22 a 25 nucleotídeos, iniciam as reações para formar o *cap* 7-metilguanossina (7meGpppN) na extremidade 5' do RNA. Em seguida, o *cap* interage com o complexo de ligação ao *cap* (CBC), formando pelas proteínas de ligação ao *cap* (CBP20 e CBP80). Conforme ocorre a transcrição dos introns, os complexos U snRNP do *splicing* reconhecem os sinais de processamento no pré-RNAm e interagem com o CTD da RNA polimerase II, assim inicia a remoção do intron. O CTD também contribui para o processamento reconhecendo os exons e facilitando o posicionamento dos exons durante a reação de *splicing*. No final da transcrição, os complexos de clivagem e poliadenilação, associados a CTD, reconhecem sequências específicas no RNA nascente, resultando no processamento da extremidade 3' do RNA e dissociação da RNA polimerase II. Apesar de a transcrição e o processamento serem descritos de forma sequencial, os eventos são interconectados e um processo interfere no outro, ou seja, a transcrição regula o processamento do pré-RNAm, como as três etapas do processamento regulam a transcrição (HOCINE; SINGER; GRUNWALD, 2010; LENASI; BARBORIC, 2012).

Tanto o mecanismo de *splicing* (LUO; REED, 1999) quanto o *cap* (CHENG et al., 2006) são necessários para a exportação do RNAm, indicando que a maquinaria de processamento do pré-RNAm está interligada com a via de exportação do RNAm em metazoários (HOCINE; SINGER; GRUNWALD, 2010; KÖHLER; HURT, 2007). A proteína UAP56, que participa do *splicing* do pré-RNAm e da exportação, interage com a proteína Aly da via de exportação do RNAm (LUO et al., 2001; STRÄßER; HURT, 2001). O complexo TREX, da via de exportação, interage com o RNAm que possui *cap* e sofreu *splicing* (CHENG et al., 2006; MASUDA et al., 2005). Esta interação é mediada pela proteína da via de exportação Aly, presente no primeiro exon do RNAm, que interage com CBP80 do complexo de ligação ao *cap* (CHENG et al., 2006).

Os tripanossomatídeos possuem diversos mecanismos moleculares que são diferentes de outros eucariotos, incluindo os mecanismos relacionados com a expressão gênica (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010). A subunidade maior da RNA polimerase II de tripanossomatídeos não possui as repetições de heptapeptídeos no domínio carboxi-terminal

(CTD) (EVERS et al., 1989; PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006; SMITH et al., 1989) e a RNA polimerase II transcreve longos RNAs policistrônicos, que precisam ser processados para gerar os RNAs monocistrônicos.

A transcrição e o *trans splicing* ocorrem de forma independente em tripanossomatídeos (STEWART et al., 2010), entretanto, poliadenilação e *trans splicing* parecem estar acoplados, pois os fatores de poliadenilação são essenciais para a adição da cauda poli(A) e para o *trans splicing* em *T. brucei* (KOCH et al., 2016). Estes fatores foram identificados recentemente e ainda não foi descrita a interação física entre os diferentes mecanismos. De forma semelhante, demonstramos que a proteína Sub2 não é essencial para a transcrição, porém é essencial para o processamento (HIRAIWA, 2012) e para a exportação do RNA (SERPELONI et al., 2011b). Também, ainda não identificamos como Sub2 está acoplando estes dois mecanismos.

De modo geral, os dados obtidos neste trabalho mostram que Sub2 interage com proteínas que não estão conservadas em outros organismos, indicando que, assim como outras vias do metabolismo de RNAm, o *trans splicing* e/ou a exportação devem possuir proteínas divergentes. Por isso, a caracterização das proteínas associadas a Sub2 contribuirá para elucidar a função de Sub2 e os mecanismos nucleares relacionados com o RNAm.

6 CONCLUSÃO

Uma das inovações deste trabalho foi o estabelecimento de uma metodologia baseada em fluorescência para quantificar o RNA nascente, transcrito pela RNA polimerase II, em tripanossomatídeos. Este método quantifica o RNA nascente de forma mais rápida, precisa e com menor número de células que o protocolo clássico, que utiliza material radioativo. O protocolo estabelecido possibilita analisar a transcrição *in vitro*, o ciclo celular e é compatível com os ensaios de fenotipagem utilizando anticorpo. A citometria de fluxo e o sistema de imagem de alta performance permitem que os dados sejam obtidos simultaneamente. Acreditamos que o protocolo pode ser adaptado para realizar as análises individualmente ou em combinações, de acordo com o objetivo do experimento. Por exemplo, se o objetivo for correlacionar a expressão de uma determinada proteína com as fases do ciclo celular, a etapa de incubação com o tampão B contendo os nucleotídeos e as etapas de detecção do Br-UTP não devem ser necessárias para obter o resultado.

A metodologia descrita poderá contribuir para aprofundar os conhecimentos relacionados com a transcrição, biogênese do RNAm e ciclo celular. Também poderá ser utilizada para a triagem e descoberta de novos candidatos a drogas para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos.

De acordo com os objetivos voltados para entender a função de Sub2 no metabolismo nuclear do RNA, esta metodologia foi eficiente para mostrar que a depleção de Sub2 reduz a porcentagem de células transcricionalmente ativas de forma semelhante ao efeito causado pelo tratamento com sinefungina, droga que inibe o *trans splicing*, e diferentemente do efeito de α -amanitina, droga que inibe a transcrição. Portanto, o SL RNA acumulado após o silenciamento de Sub2 não é decorrente do bloqueio da transcrição de pré-RNAm, indicando inibição do *trans splicing*.

A proteína UAP56, ortóloga a Sub2, é um fator auxiliar para o processamento do pré-RNAm por *cis splicing*. Portanto, acreditamos que Sub2 também interage com a maquinaria do *trans splicing*, porém não é um componente do core do spliceossomo e deve agir de forma dinâmica, pois o complexo que contém Sub2 possui massa molecular diferente dos complexos snRNP do spliceossomo, que contém as proteínas core Sm/LSm, e não foram identificadas as proteínas do spliceossomo na imunoprecipitação de Sub2 seguida de proteômica, nas condições utilizadas neste trabalho. A relação de Sub2 como um fator auxiliar no *trans splicing* foi evidenciado pela interação com U2AF35, ambas envolvidas com as primeiras etapas do

processamento, antes da primeira reação de transesterificação. Assim, acreditamos que Sub2 não tem as características de um fator de processamento estrito, mas está envolvida com a maquinaria de processamento e de exportação como em outros eucariotos.

Além de U2AF35, Sub2 interage com proteínas que estão relacionadas com os mecanismos de controle de qualidade e direcionamento do RNA. Em outros eucariotos que possuem *splicing*, tanto a maquinaria de processamento quanto a maquinaria de exportação estão relacionadas com a maquinaria de controle de qualidade do RNA.

Além disso, Sub2 interage com proteínas hipotéticas conservadas exclusivamente em tripanossomatídeos/kinetoplastídeos. Ainda não temos resultados experimentais demonstrando a participação destas proteínas no processamento e/ou na exportação, porém, a presença destas proteínas corrobora os dados da literatura que sugerem uma via de exportação de RNAm divergente nestes organismos e com a peculiaridade do processamento por *trans splicing*, reforçando que estudos mais detalhados destas vias podem trazer informações importantes para entender a biologia destes parasitas e auxiliar na identificação de novos alvos para quimioterapia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUIN, G. et al. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13041–7, 7 maio 1999.
- AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157–60, 29 jun. 1990.
- AGUILERA, A. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 242–250, jun. 2005.
- AKIYOSHI, B.; GULL, K. Evolutionary cell biology of chromosome segregation: insights from trypanosomes. **Open Biology**, v. 3, n. 5, p. 130023–130023, 1 maio 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.
- AMBRÓSIO, D. L.; BADJATIA, N.; GÜNZL, A. The spliceosomal PRP19 complex of trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 885–901, mar. 2015.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, jan. 2010.
- AURRECOECHEA, C. et al. EuPathDB: the eukaryotic pathogen database. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D684-91, jan. 2013.
- BADJATIA, N. et al. Cyclin-Dependent Kinase CRK9, Required for Spliced Leader trans Splicing of Pre-mRNA in Trypanosomes, Functions in a Complex with a New L-Type Cyclin and a Kinetoplastid-Specific Protein. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. e1005498, 8 mar. 2016.
- BANGS, J. D. et al. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 14, p. 9805–15, 15 maio 1992.
- BARBOZA, R. et al. Can the false-discovery rate be misleading? **Proteomics**, v. 11, n. 20, p. 4105–8, out. 2011.
- BENZ, C. et al. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125–134, out. 2005.
- BITTENCOURT, I. A. **Caracterização funcional e estrutural da proteína TcSub2 por ensaios bioquímicos, genéticos e espectroscópicos**. Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, 2015.
- BROW, D. A. Allosteric cascade of spliceosome activation. **Annual review of genetics**, v. 36, p. 333–60, 2002.
- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta tropica**, v. 36, n. 3, p. 289–92, set. 1979.
- BUCERIUS, F. et al. Reliable quantification of cell cycle-dependent mRNA abundance using fluorescence-activated cell sorting in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 175, n. 2, p. 205–8, fev. 2011.

- CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R.; YU, M. C. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 2, p. 78–82, fev. 2000.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and infection**, v. 5, n. 13, p. 1231–40, nov. 2003.
- CARDOSO, J. et al. Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, p. 941–951, 26 set. 2008.
- CARVALHO, P. C. et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 944–9, abr. 2012.
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–17, jan. 2016.
- CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Molecular microbiology**, v. 65, n. 3, p. 655–70, ago. 2007.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, n. 3, p. 342–345, 2010.
- CHANG, C.-T. et al. Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 3, p. 473–486, 8 jan. 2013.
- CHENG, H. et al. Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. **Cell**, v. 127, n. 7, p. 1389–1400, dez. 2006.
- CLAYTON, C. E. et al. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 6, p. 3036–47, jun. 1990.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–8, 15 abr. 2002.
- CORDIN, O. et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, v. 367, p. 17–37, fev. 2006.
- CROSS, G. A.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315–31, dez. 1973.
- CUCHILLO, C. M.; NOGUÉS, M. V.; RAINES, R. T. Bovine Pancreatic Ribonuclease: Fifty Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. **Biochemistry**, v. 50, n. 37, p. 7835–7841, 20 set. 2011.
- DARZYNKIEWICZ, Z. Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content. In: **Current Protocols in Cytometry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- DE GAUDENZI, J.; FRASCH, A. C.; CLAYTON, C. RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 12, p. 2106–2114, 1 dez. 2005.
- DE MELO ALVES PAIVA, R. et al. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 941–947, maio 2011.
- DE SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The International Journal**

of **Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 10, p. 2069–2080, out. 2009.

DILLON, L. A. L. et al. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 14, p. 6799–6813, 18 ago. 2015.

DJIKENG, A. et al. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 113, n. 1, p. 109–15, mar. 2001.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 2579–81, 16 mar. 1999.

DOSSIN, F. DE M.; SCHENKMAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 5, p. 960–70, maio 2005.

DUFU, K. et al. ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p. 2043–2053, 15 set. 2010.

DUNGAN, J. M.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Evidence for the presence of a small U5-like RNA in active trans-spliceosomes of *Trypanosoma brucei*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 15, p. 4016–29, 1 ago. 1996.

ELFERINK, C. J.; REINERS, J. J. Quantitative RT-PCR on CYP1A1 heterogeneous nuclear RNA: a surrogate for the in vitro transcription run-on assay. **BioTechniques**, v. 20, n. 3, p. 470–7, mar. 1996.

EVERS, R. et al. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. **Cell**, v. 56, n. 4, p. 585–97, 24 fev. 1989.

FANIS, P. et al. Five friends of methylated chromatin target of protein-arginine-methyltransferase[prmt]-1 (chttop), a complex linking arginine methylation to desumoylation. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 11, p. 1263–73, nov. 2012.

FINN, R. D. et al. HMMER web server: 2015 update. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W30-8, 1 jul. 2015.

FISCHER, U.; ENGLBRECHT, C.; CHARI, A. Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 5, p. 718–731, set. 2011.

FLECKNER, J. et al. U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. **Genes & development**, v. 11, n. 14, p. 1864–72, 15 jul. 1997.

FOLCO, E. G. et al. The Proteins PDIP3 and ZC11A Associate with the Human TREX Complex in an ATP-Dependent Manner and Function in mRNA Export. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43804, 23 ago. 2012.

FREISTADT, M. S.; CROSS, G. A.; ROBERTSON, H. D. Discontinuously synthesized mRNA from *Trypanosoma brucei* contains the highly methylated 5' cap structure, m⁷GpppA*A*C(2'-O)mU*A. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 29, p. 15071–5, 15 out. 1988.

- FRIDY, P. C. et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. **Nature methods**, v. 11, n. 12, p. 1253–60, dez. 2014.
- FRITZ, M. et al. Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 16, p. 8013–8032, 18 set. 2015.
- GALE, M.; CARTER, V.; PARSONS, M. Cell cycle-specific induction of an 89 kDa serine/threonine protein kinase activity in *Trypanosoma brucei*. **Journal of cell science**, v. 107 (Pt 7, p. 1825–32, jul. 1994.
- GENTIL, L. G. et al. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 109, n. 2, p. 152–158, fev. 2009.
- GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 936–943, 1 dez. 2002.
- GUNZL, A. et al. RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 542–551, 1 jun. 2003.
- GUNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 1 ago. 2010.
- GÜNZL, A. et al. Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 85, n. 1, p. 67–76, mar. 1997.
- GUPTA, S. K. et al. Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. **RNA biology**, v. 11, n. 6, p. 715–31, 2014.
- HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–77, dez. 2007.
- HAMMARTON, T. C. et al. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22877–86, 20 jun. 2003.
- HAMMELL, C. M. et al. Coupling of Termination, 3' Processing, and mRNA Export. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 18, p. 6441–6457, 15 set. 2002.
- HAN, B.-G. et al. Helical Repeat Structure of Apoptosis Inhibitor 5 Reveals Protein-Protein Interaction Modules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 10727–10737, 30 mar. 2012.
- HASTINGS, K. E. M. SL trans-splicing: easy come or easy go? **Trends in genetics : TIG**, v. 21, n. 4, p. 240–7, abr. 2005.
- HIRAIWA, P. M. **Análise de TbSub2 como um fator envolvido no processamento de pré-RNAm em tripanossomatídeos**. Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, 2012.
- HOCINE, S.; SINGER, R. H.; GRUNWALD, D. RNA Processing and Export. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 12, p. a000752–a000752, 1 dez. 2010.

- HOLETZ, F. B. et al. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 4, p. 1062–1067, maio 2007.
- IGLESIAS, N.; STUTZ, F. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 1987–1996, 18 jun. 2008.
- INOUE, A. H. et al. Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109521, 2014.
- INOUE, A. H. **Exportação de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi*: análise funcional de Hel45**. Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, 2015.
- JAE, N. et al. Essential Role of a Trypanosome U4-Specific Sm Core Protein in Small Nuclear Ribonucleoprotein Assembly and Splicing. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 379–386, 1 mar. 2010.
- JAGER, A. V. et al. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2035–2042, 13 fev. 2007.
- JAO, C. Y.; SALIC, A. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 41, p. 15779–15784, 14 out. 2008.
- JENSEN, P. O. et al. Flow cytometric measurement of RNA synthesis using bromouridine labelling and bromodeoxyuridine antibodies. **Cytometry**, v. 14, n. 4, p. 455–8, 1993.
- JENSEN, P. Ø.; LARSEN, J.; LARSEN, J. K. Flow Cytometric Measurement of Rna Synthesis Based on Bromouridine Labelling and Combined with Measurement of Dna Content or Cell Surface Antigen. **Acta Oncologica**, v. 32, n. 5, p. 521–524, 8 jan. 1993.
- JOHNSON, S. A. et al. The export factor Yra1 modulates mRNA 3' end processing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 10, p. 1164–1171, 25 set. 2011.
- JOHNSON, S. A.; CUBBERLEY, G.; BENTLEY, D. L. Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factor Yra1 by Direct Interaction with the 3' End Processing Factor Pcf11. **Molecular Cell**, v. 33, n. 2, p. 215–226, jan. 2009.
- KABANI, S.; WATERFALL, M.; MATTHEWS, K. R. Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 169, n. 1, p. 59–62, jan. 2010.
- KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 70, n. 5, p. 220–233, 12 jan. 1995.
- KATAHIRA, J. et al. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 9, p. 2593–2609, 4 maio 1999.
- KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–58, jun. 2015.
- KOCH, H. et al. The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: Characterization of the functional poly(A) polymerase. **RNA Biology**, v. 13, n. 2, p. 221–231, 4 fev. 2016.
- KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 761–773, out. 2007.

- KOLEV, N. G. et al. The Transcriptome of the Human Pathogen *Trypanosoma brucei* at Single-Nucleotide Resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001090, 9 set. 2010.
- KOLEV, N. G.; STEITZ, J. A. Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. **Genes & development**, v. 19, n. 21, p. 2583–92, 1 nov. 2005.
- KOOTER, J. M.; DE LANGE, T.; BORST, P. Discontinuous synthesis of mRNA in trypanosomes. **The EMBO journal**, v. 3, n. 10, p. 2387–92, out. 1984.
- KRAMER, S. et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 phosphorylation at Thr169. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 18, p. 3002–3014, 19 ago. 2008.
- KRAMER, S. et al. Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 12, p. 2896–2909, 15 jun. 2012.
- KRAUSE, M.; HIRSH, D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. **Cell**, v. 49, n. 6, p. 753–61, 19 jun. 1987.
- KUMAR, P.; WANG, C. C. Depletion of Anaphase-promoting Complex or Cyclosome (APC/C) Subunit Homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* Arrests the Procyclic Form in Metaphase but the Bloodstream Form in Anaphase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31783–31791, 9 set. 2005.
- LAIRD, P. W. et al. Mature mRNAs of *Trypanosoma brucei* possess a 5' cap acquired by discontinuous RNA synthesis. **Nucleic acids research**, v. 13, n. 12, p. 4253–66, 25 jun. 1985.
- LARSEN, J. K.; JENSEN, P. Ø.; LARSEN, J. Flow cytometric analysis of RNA synthesis by detection of bromouridine incorporation. **Current protocols in cytometry**, v. Chapter 7, p. Unit 7.12, maio 2001.
- LE HIR, H. et al. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **The EMBO journal**, v. 19, n. 24, p. 6860–9, 15 dez. 2000.
- LE HIR, H. et al. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4987–97, 3 set. 2001.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.
- LEE, M. G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. **Annual review of microbiology**, v. 51, p. 463–89, 1997.
- LEHRACH, H. et al. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. **Biochemistry**, v. 16, n. 21, p. 4743–51, 18 out. 1977.
- LENASI, T.; BARBORIC, M. Mutual relationships between transcription and pre-mRNA processing in the synthesis of mRNA. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 4, n. 2, p. 139–154, mar. 2012.
- LI, X. et al. Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 Coupled with Two DEAD-Box Adenosine 5'-

- Triphosphate-Dependent RNA Helicases Regulates Tapetum Degeneration. **The Plant Cell**, v. 23, n. 4, p. 1416–1434, abr. 2011.
- LI, Z.; UMEYAMA, T.; WANG, C. C. The Aurora Kinase in *Trypanosoma brucei* Plays Distinctive Roles in Metaphase-Anaphase Transition and Cytokinetic Initiation. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 9, p. e1000575, 11 set. 2009.
- LIANG, X. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830–40, out. 2003.
- LIANG, X. et al. Analysis of spliceosomal complexes in *Trypanosoma brucei* and silencing of two splicing factors Prp31 and Prp43. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 29–39, jan. 2006.
- LIANG, X.-H.; XU, Y.-X.; MICHAELI, S. The spliced leader-associated RNA is a trypanosome-specific sn(o) RNA that has the potential to guide pseudouridine formation on the SL RNA. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 2, p. 237–46, fev. 2002.
- LIBONATI, M.; SORRENTINO, S. Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. **Methods in enzymology**, v. 341, p. 234–48, 2001.
- LINDER, P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 15, p. 4168–4180, 25 ago. 2006.
- LUO, M.-J. et al. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 644–647, 11 out. 2001.
- LUO, M. J.; REED, R. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 14937–42, 21 dez. 1999.
- LUZ AMBROSIO, D. et al. Spliceosomal Proteomics in *Trypanosoma brucei* Reveal New RNA Splicing Factors. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 990–1000, 1 jul. 2009.
- MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 2, p. 163–9, fev. 2000.
- MAIR, G.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28994–9, 15 set. 2000.
- MANDELBOIM, M. et al. Silencing of Sm Proteins in *Trypanosoma brucei* by RNA Interference Captured a Novel Cytoplasmic Intermediate in Spliced Leader RNA Biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 51469–51478, 19 dez. 2003.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 525241, 2010.
- MASUDA, S. et al. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. **Genes & development**, v. 19, n. 13, p. 1512–7, 1 jul. 2005.
- MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & development**, v. 8, n. 4, p. 491–501, 15 fev. 1994.
- MCNALLY, K. P.; AGABIAN, N. *Trypanosoma brucei* spliced-leader RNA methylations are

required for trans splicing in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 11, p. 4844–51, nov. 1992.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 895–905, 2 set. 2007.

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

MIRANDA, C. G. et al. A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 152, p. 8–16, dez. 2015.

MOON, S. et al. An Image-Based Algorithm for Precise and Accurate High Throughput Assessment of Drug Activity against the Human Parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87188, 4 fev. 2014.

MOTTRAM, J. et al. Isolation and sequence of four small nuclear U RNA genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*: identification of the U2, U4, and U6 RNA analogs. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 3, p. 1212–23, mar. 1989.

MURPHY, W. J.; WATKINS, K. P.; AGABIAN, N. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. **Cell**, v. 47, n. 4, p. 517–25, 21 nov. 1986.

MUTOMBA, M. C. et al. Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 90, n. 2, p. 491–504, 15 dez. 1997.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 775–797, 2 jun. 2013.

NAVARRO, M.; GULL, K. A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 759–63, 13 dez. 2001.

NELSON, R. G. et al. Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 34, n. 3, p. 901–9, out. 1983.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current issues in molecular biology**, v. 3, n. 3, p. 67–70, jul. 2001.

OBERHOLZER, M. et al. A vector series for rapid PCR-mediated C-terminal in situ tagging of *Trypanosoma brucei* genes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 145, n. 1, p. 117–20, jan. 2006.

ORPHANIDES, G.; REINBERG, D. A unified theory of gene expression. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 439–51, 22 fev. 2002.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135–41, abr. 2006.

PALFI, Z. et al. Affinity purification of *Trypanosoma brucei* small nuclear ribonucleoproteins reveals common and specific protein components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 20, p. 9097–101, 15 out. 1991.

- PALFI, Z. et al. The spliceosomal snRNP core complex of *Trypanosoma brucei*: Cloning and functional analysis reveals seven Sm protein constituents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8967–8972, 1 ago. 2000.
- PALFI, Z. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2493–2503, 28 abr. 2005.
- PALFI, Z.; LANE, W. S.; BINDEREIF, A. Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 121, n. 2, p. 233–43, maio 2002.
- PAULE, M. R.; WHITE, R. J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 6, p. 1283–98, 15 mar. 2000.
- POMBO, A. et al. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. **The EMBO journal**, v. 18, n. 8, p. 2241–53, 15 abr. 1999.
- PREUßER, C. et al. Pre-mRNA Splicing in *Trypanosoma brucei*: Factors, Mechanisms, and Regulation. In: BINDEREIF, A. (Ed.). **RNA Metabolism in Trypanosomes**. 1. ed. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 49–77.
- PREUßER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 302, n. 4–5, p. 221–4, out. 2012.
- RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chemical reviews**, v. 98, n. 3, p. 1045–1066, 7 maio 1998.
- RAJKOVIC, A. et al. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 22, p. 8879–83, nov. 1990.
- REED, R. Coupling transcription, splicing and mRNA export. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 3, p. 326–31, jun. 2003.
- REED, R.; HURT, E. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 523–31, 22 fev. 2002.
- REICHERT, V. L. 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. **Genes & Development**, v. 16, n. 21, p. 2778–2791, 1 nov. 2002.
- RIGOU, P. et al. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. **The EMBO journal**, v. 28, n. 11, p. 1576–88, 3 jun. 2009.
- RODOR, J. et al. The RNA-binding profile of Acinus, a peripheral component of the exon junction complex, reveals its role in splicing regulation. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 22, n. 9, p. 1411–26, set. 2016.
- SAGUEZ, C. et al. Nuclear mRNA Surveillance in THO/sub2 Mutants Is Triggered by Inefficient Polyadenylation. **Molecular Cell**, v. 31, n. 1, p. 91–103, jul. 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Londres: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTANA, A. G. et al. A Method for Purifying Native Transthyretin from Human Plasma.

Biochemistry & Pharmacology: Open Access, v. 4, n. 5, 2015.

SCHIMANSKI, B.; NGUYEN, T. N.; GÜNZL, A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 11, p. 1942–50, nov. 2005.

SCHWERK, C. et al. ASAP, a Novel Protein Complex Involved in RNA Processing and Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2981–2990, 15 abr. 2003.

SERPELONI, M. et al. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC evolutionary biology**, v. 11, p. 7, 11 jan. 2011a.

SERPELONI, M. et al. An Essential Nuclear Protein in Trypanosomes Is a Component of mRNA Transcription/Export Pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20730, 8 jun. 2011b.

SHEN, H. et al. Distinct activities of the DExD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome. **Genes & Development**, v. 22, n. 13, p. 1796–1803, 1 jul. 2008.

SHEN, H. UAP56- a key player with surprisingly diverse roles in pre-mRNA splicing and nuclear export. **BMB reports**, v. 42, n. 4, p. 185–8, 30 abr. 2009.

SIEGEL, T. N. et al. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 15, p. 4946–4957, 1 ago. 2010.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; CROSS, G. A. M. Analysis of the *Trypanosoma brucei* cell cycle by quantitative DAPI imaging. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 160, n. 2, p. 171–4, ago. 2008.

SIEGEL, T. N.; TAN, K. S. W.; CROSS, G. A. M. Systematic Study of Sequence Motifs for RNA trans Splicing in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 21, p. 9586–9594, 1 nov. 2005.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539–539, 16 abr. 2011.

SILVA, M. T. A. DA et al. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 130–8, mar. 2011.

SMITH, J. L. et al. In trypanosomes the homolog of the largest subunit of RNA polymerase II is encoded by two genes and has a highly unusual C-terminal domain structure. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 815–27, 10 mar. 1989.

SMITH, T. K. et al. Blocking Variant Surface Glycoprotein Synthesis in *Trypanosoma brucei* Triggers a General Arrest in Translation Initiation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7532, 26 out. 2009.

STALEY, J. P.; GUTHRIE, C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 315–26, 6 fev. 1998.

STEWART, M. et al. Processing of a phosphoglycerate kinase reporter mRNA in *Trypanosoma brucei* is not coupled to transcription by RNA polymerase II. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 172, n. 2, p. 99–106, ago. 2010.

- STRÄßER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 648–52, 11 out. 2001.
- STURM, N. R.; YU, M. C.; CAMPBELL, D. A. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 2, p. 1595–604, fev. 1999.
- SUBOTA, I. et al. ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 22, p. 4205–4219, 15 nov. 2011.
- SULLIVAN, K. D.; STEINIGER, M.; MARZLUFF, W. F. A Core Complex of CPSF73, CPSF100, and Symplekin May Form Two Different Cleavage Factors for Processing of Poly(A) and Histone mRNAs. **Molecular Cell**, v. 34, n. 3, p. 322–332, maio 2009.
- TAKAGAKI, Y.; MANLEY, J. L. Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 5, p. 1515–25, mar. 2000.
- TANGE, T. O. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. **RNA**, v. 11, n. 12, p. 1869–1883, 1 dez. 2005.
- TENG, I.-F.; WILSON, S. A. Mapping interactions between mRNA export factors in living cells. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67676, 2013.
- TESSIER, L. H. et al. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to premature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. **The EMBO journal**, v. 10, n. 9, p. 2621–5, set. 1991.
- TKACZ, I. D. et al. Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 13, n. 1, p. 30–43, 22 nov. 2007.
- TKACZ, I. D. et al. Identification of the heptameric Lsm complex that binds U6 snRNA in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 1, p. 22–31, jul. 2008.
- TKACZ, I. D. et al. Analysis of Spliceosomal Proteins in Trypanosomatids Reveals Novel Functions in mRNA Processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27982–27999, 3 set. 2010.
- TRINDADE, S. et al. *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 6, p. 837–48, jun. 2016.
- TSCHUDI, C.; ULLUT, E. Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids. **Gene expression**, v. 10, n. 1–2, p. 3–16, 2002.
- ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 1, p. 720–5, jan. 1993.
- ULLU, E.; TSCHUDI, C. Permeable trypanosome cells as a model system for transcription and trans-splicing. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 11, p. 3319–26, 11 jun. 1990.
- VAN DIJK, T. B. et al. Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 1, p. 260–72, jan. 2010.

- VANDENBERGHE, A. E.; MEEDEL, T. H.; HASTINGS, K. E. mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. **Genes & development**, v. 15, n. 3, p. 294–303, 1 fev. 2001.
- VAZQUEZ, M. P. et al. Functional characterization and protein-protein interactions of trypanosome splicing factors U2AF35, U2AF65 and SF1. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 164, n. 2, p. 137–46, abr. 2009.
- VETHANTHAM, V.; RAO, N.; MANLEY, J. L. Sumoylation Modulates the Assembly and Activity of the Pre-mRNA 3' Processing Complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 24, p. 8848–8858, 15 dez. 2007.
- VIPHAKONE, N. et al. TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. **Nature communications**, v. 3, p. 1006, 2012.
- WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701–18, 20 fev. 2009.
- WANG, P. et al. Sm core variation in spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins from *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 19, p. 4513–4523, 4 out. 2006.
- WEIRICH, C. S. et al. Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 668–676, 18 jul. 2006.
- WHEELER, R. J.; GULL, K.; GLUENZ, E. Detailed interrogation of trypanosome cell biology via differential organelle staining and automated image analysis. **BMC Biology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.
- WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>>. Acesso em: 25 jan. 2017a.
- WHO. **News Commentaries Events Fact sheets Fact files Questions & answers Features Multimedia Contacts Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>>. Acesso em: 25 jan. 2017b.
- WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/>. Acesso em: 25 jan. 2017c.
- WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 3, p. 290–301, jun. 2001.
- WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, 1 jul. 2011.
- WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89–101, 15 mar. 1999.
- WOODWARD, L. A. et al. The exon junction complex: a lifelong guardian of mRNA fate. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, p. e1411, dez. 2016.
- WOODWARD, R.; GULL, K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. **Journal of cell science**, v. 95 (Pt 1), p. 49–57, jan. 1990.

XU, Y. X.; BEN-SHLOMO, H.; MICHAELI, S. The U5 RNA of trypanosomes deviates from the canonical U5 RNA: the *Leptomonas collosoma* U5 RNA and its coding gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 16, p. 8473–8, 5 ago. 1997.

ZHANG, B.; CHAMBERS, M. C.; TABB, D. L. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 9, p. 3549–57, set. 2007.

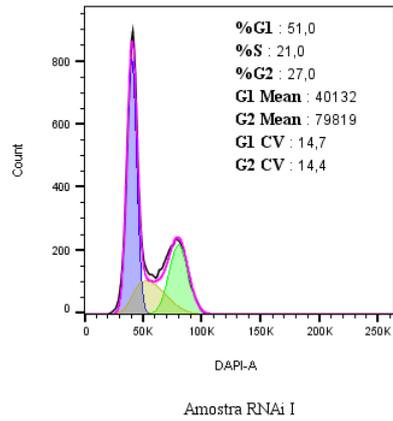
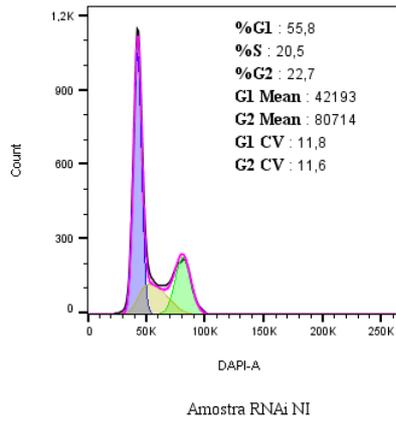
ZOMERDIJK, J. C. et al. Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5153–8, 11 out. 1991.

ZYBAILOV, B. et al. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 9, p. 2339–47, set. 2006.

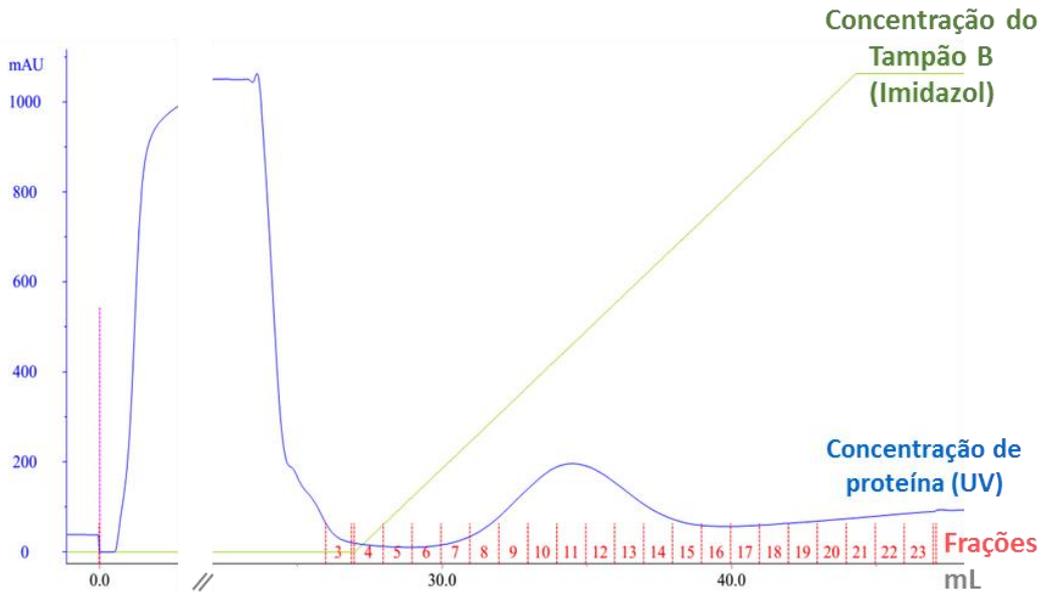
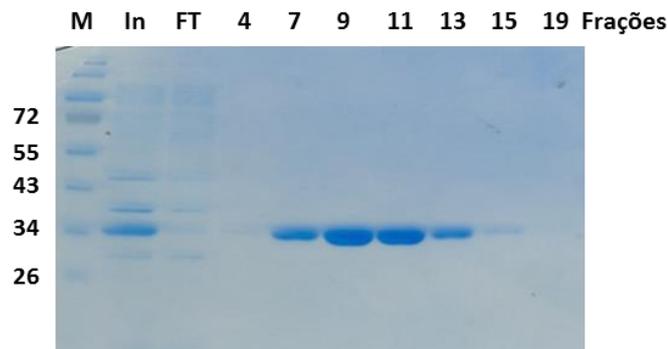
8 APÊNDICES

APÊNDICE A: OLIGONUCLEOTÍDEOS

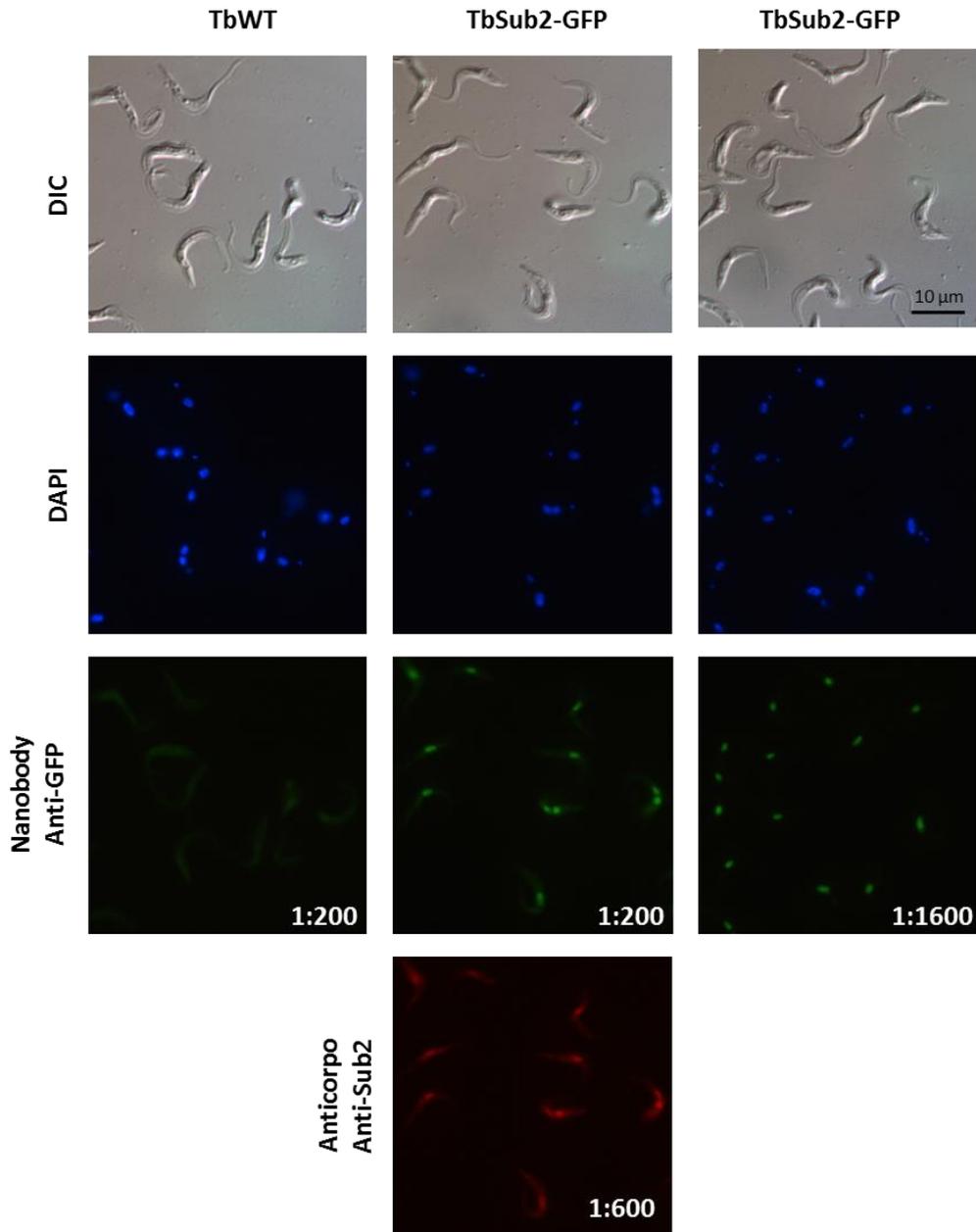
Nome	Sequência
SUB2N_F	GGGGCGGCCG CAGTAGTGGTCTCGCTGACTTTGAC GG
SUB2N_R	GGGGGGCCCCTCGCGTGCATGGGCAATGA
PNPTPPURO_F (pN-F)	GCCGAAAGTAGACGCGAATTGTG
PNPTPPURO_R (pN-R)	TGGCGAAAGGGGGATGTGCT
PMO_U2AF35_F	GCGCGGGAGGGACAGGCAAAAGTCACCTCGGGG GTATTCCAGCGACATGTGCCATATTTGTGGAAAA TCTGGTCACATCTCTCGCGAATGCCCTTAAAAG GTACCGGGCCCCCCTCGAG
PMO_U2AF35_R	CATACGGCATTCTCAAACAGAACCCGCGCCGCGA GCCCGAATGACATCTTTGTTATATTATATTTTTTTT ATGTTTATTATCTCTTTTCTGCTCCTATTCTGGCGG CCGCTCTAGAACTAGTGGAT
PMO_Hipotética- 3060_F	GAACGCCTCCGGTACCAGCGCCGTCGCGAAGAAC TCTCCCGCGTCCGCTCCCGCTTCTCACGTGATGGT ACCGGGCCCCCCTCGAG
PMO_Hipotética- 3060_R	TCAGTCACGCATCTCAAACACCTGACCTTCAATAA TTCTGTTCATCTCTCCCCCTCGTATTGGGCGCCCCG GCCTTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGAT



APÊNDICE B - SILENCIAMENTO DE SUB2 NÃO ALTERA O CICLO CELULAR DOS PARASITAS. Os dados foram obtidos simultaneamente ao ensaio de transcrição *in vitro*.

A**B**

APÊNDICE C - PURIFICAÇÃO DOS NANOBODIES POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE HIS-TAP FF. (A) Perfil da cromatografia apresentando a concentração de proteína em relação ao gradiente de imidazol. Os nanobodies foram eluídos com 110 mM imidazol, aproximadamente, correspondente às frações 7 a 15. (B) Análise da purificação dos nanobodies por SDS-PAGE. Uma alíquota da fração periplasmática, representando o material inicial (In), uma alíquota do *flow through* (FT), e as frações eluídas 4, 7, 9, 11, 13, 15 e 19 estão representadas no gel. M: marcador molecular pageruler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisher Scientific).

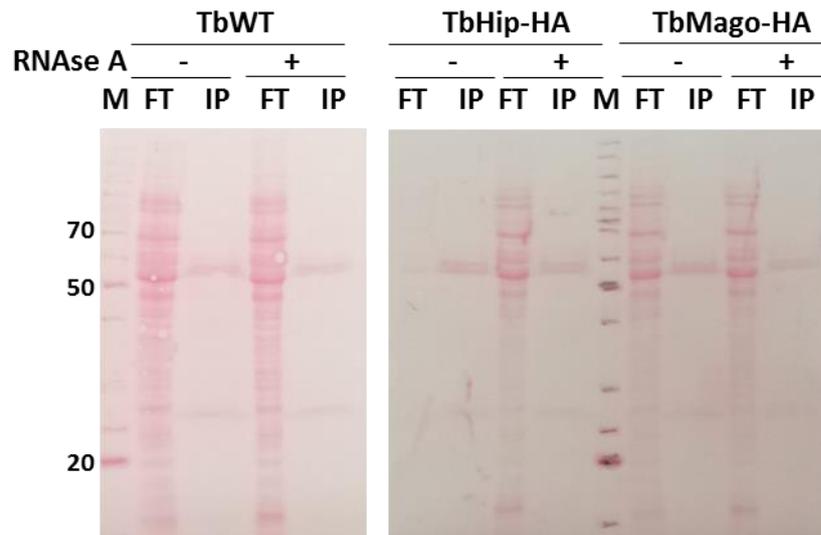


APÊNDICE D - OS NANOBODIES RECONHECERAM ESPECIFICAMENTE A PROTEÍNA GFP EM *T. BRUCEI*. *T. brucei* selvagem (TbWT) e Tbsub2-GFP foram incubados com nanobodies conjugados a Alexa Fluor 488 (1:200 ou 1:1600). Tbsub2-GFP também foi incubada com o anticorpo primário anti-Sub2 (1:600) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em galinha, conjugado com Alexa 594 (1:400). DNA: marcação do material genético com DAPI. DIC: contraste por interferência diferencial.

APÊNDICE E - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS APÓS A
IMUNOPRECIPITAÇÃO DO COMPLEXO CONTENDO A PROTEÍNA TbSUB2-PTP-N

<i>T. brucei</i> TREU 927 ID	Replicate count	Total signal	Trityp description
Tb927.10.14320	2	2.18E-05	Flagellum attachment zone protein 9
Tb927.11.2370	2	5.53E-05	mRNA export factor MEX67
Tb927.2.3910	2	8.00E-05	beta-ketoacyl synthase family protein, putative
Tb927.1.5030	2	9.65E-05	leucine-rich repeat protein (LRRP), putative
Tb927.2.5130	2	0.000105737	hypothetical protein, conserved
Tb927.10.8540	2	0.000120288	chaperone protein DNAj, putative
Tb11.v5.0689.1-p1	2	0.000122855	NOT2 / NOT3 / NOT5 family, putative
Tb927.10.7570	3	0.000142914	dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit, putative
Tb927.6.850	2	0.000153755	ccr4-not transcription complex subunit 2
Tb927.5.4420	2	0.000199173	nucleolar RNA helicase II
Tb927.7.880	2	0.000305874	RNA-binding protein, putative
Tb11.v5.0774.1-p1	3	0.000327179	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor, putative
Tb927.4.410	2	0.000442381	CAF 40
Tb927.2.2130	4	0.000500152	small GTP-binding protein RAB6, putative
Tb927.11.2340	2	0.000505341	hypothetical protein, conserved
Tb927.11.3980	4	0.000514	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16
Tb927.7.4960	5	0.000759425	hypothetical protein, conserved
Tb927.10.7550	4	0.000870719	hypothetical protein, conserved
Tb927.8.4330	3	0.000946181	small GTP-binding protein Rab11
Tb927.9.13990	4	0.001005952	RNA-binding protein, putative
Tb927.10.14710	4	0.001179844	40S ribosomal protein S2, putative
Tb927.10.14600	4	0.001179844	40S ribosomal protein S2, putative
Tb927.2.470	8	0.001608281	retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative
Tb927.2.340	8	0.001649025	retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative
Tb927.10.3990	6	0.001750936	DHH1
Tb927.2.1120	8	0.0018031	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative
Tb927.9.12510	5	0.002011886	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
Tb927.10.5340	4	0.002501611	40S ribosomal protein S18, putative
Tb927.10.5330	4	0.002501611	40S ribosomal protein S18, putative
Tb927.5.1060	7	0.0027084	mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative
Tb927.1.120	9	0.002779734	retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative
Tb927.10.10480	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10510	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10460	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10540	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10590	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10470	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10580	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10500	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10570	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10530	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10490	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10445	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10550	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10520	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.10.10560	5	0.00306464	histone H2B, putative
Tb927.9.11030	6	0.004525434	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2

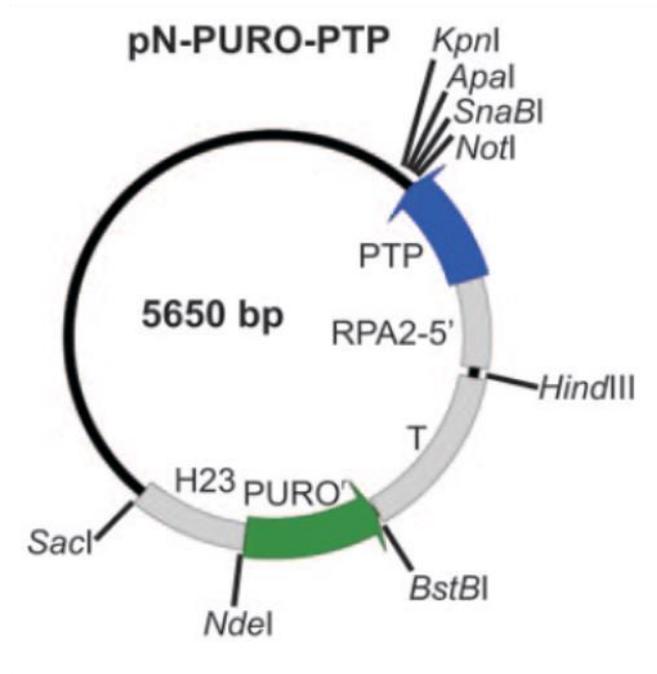
Tb427tmp.02.4150-t26_1-p1	7	0.004586566	pyruvate phosphate dikinase
Tb927.10.13010	8	0.00560882	protein kinase A catalytic subunit 3
Tb927.4.2030	7	0.005610007	ALBA-Domain Protein
Tb927.4.2040	7	0.006407219	ALBA-Domain Protein
Tb927.7.2890	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2850	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2930	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2820	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2880	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2860	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2920	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2940	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2870	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2900	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2840	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2910	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.7.2830	6	0.007320446	histone H2A, putative
Tb927.11.8770	8	0.007880576	ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative
Tb927.10.5620	7	0.008671318	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal
Tb927.10.14550	8	0.010339834	ATP-dependent RNA helicase HEL67
Tb927.4.3060	9	0.022056036	hypothetical protein, conserved
Tb927.7.2240	9	0.036764485	hypothetical protein, conserved
Tb927.6.1470	8	0.065519661	hypothetical protein, conserved
Tb927.1.2750	8	0.067820082	hypothetical protein, conserved
Tb927.10.540	8	0.128619225	ATP-dependent RNA helicase SUB2, putative



APÊNDICE F - MEMBRANA DO WESTERN BLOTTING, CORADA COM PONCEAU, DA IMUNOPRECIPITAÇÕES DAS PROTEÍNAS HIP E MAGO DE *T. BRUCEI* FUSIONADAS À ETIQUETA HA NA EXTREMIDADE C TERMINAL. As imunoprecipitações foram realizadas com a resina anti-HA (Sigma). O extrato proteico foi preparado com tampão citrato. Extrato de *T. brucei* selvagem (TbWT) e TbHIP-HA e TbMago-HA foram utilizados, sendo que TbWT foi utilizado como controle negativo. O ensaio foi realizado sem (-) ou com (+) a adição de RNAse A. Após a imunoprecipitação, uma alíquota do *flow through* (FT), correspondente a 2×10^6 células, e o material imunoprecipitado (IP) foram analisados por *Western blotting*.

9 ANEXO

A

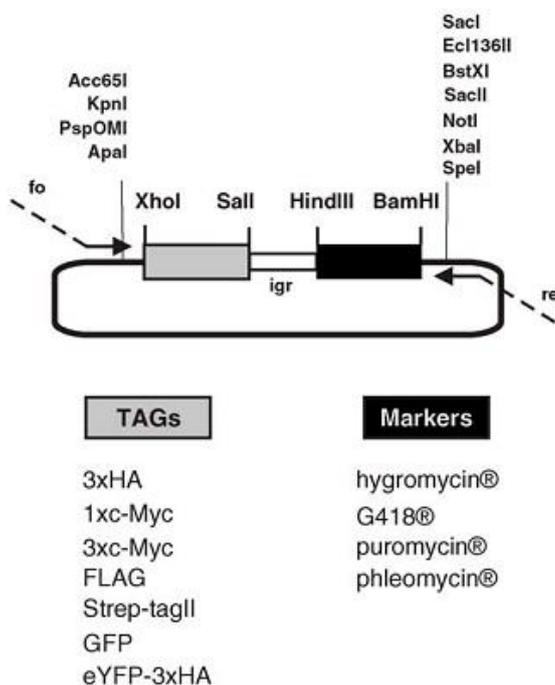


B



ANEXO A - MAPA DO VETOR PN-PURO-PTP. (A) REPRESENTAÇÃO DO ESQUEMÁTICA DO VETOR PN-PURO-PTP. (A) Representação do esquemática do vetor pN-PURO-PTP. PURO: codifica resistência para puomicina. RPA2-5': região 5' ao gene TbRPA2. H23: região intergênica entre os genes 2 e 3 de HSP70. T: região intergênica entre β e α tubulina. (B) Representação da integração do gene no genoma do parasita. O vetor precisa ser digerido (setas) dentro da sequência alvo (vermelho) para ser inserido por recombinação homologa ao próprio locus.

Fonte: SCHIMANSKI; NGUYEN; GÜNZL, 2005.



List of available plasmids

	Tag	Marker
pMOTag3H	3xHA	G418®
pMOTag4H	3xHA	hygro®
pMOTag4M	c-Myc	hygro®
pMOTag33M	3xc-Myc	G418®
pMOTag43M	3xc-Myc	hygro®
pMOTag4F	FLAG	hygro®
pMOTag3S	Strep-tagII	G418®
pMOTag4S	Strep-tagII	hygro®
pMOTag3G	GFP	G418®
pMOTag4G	GFP	hygro®
pMOTag4YH	eYFP-3xHA	hygro®

Precursor plasmids

	α - β -tubulin intergenic region	marker
pMOTag1	+	-
pMOTag2	+	puro®
pMOTag3	+	G418®
pMOTag4	+	hygro®
pMOTag5	+	phleo®

ANEXO B - MAPA DOS VETORES PMOTAG. Setas nomeadas como “fo” e “re” indicam os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR. As regiões 3’ dos oligonucleotídeos (regiões contínuas das setas) correspondem as regiões que anelam no plasmídeo e amplificam a etiqueta e o gene de resistência. As regiões 5’ dos oligonucleotídeos (regiões pontilhadas) correspondem aos 100 nucleotídeos do genoma, que direcionarão o local onde o produto da PCR será integrado. A região “igr” corresponde a região intergênica de α - β tubulina.

Fonte: Oberholzer et al. (2006)