

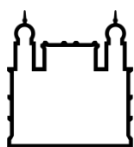
**INSTITUTO CARLOS CHAGAS
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

PATRICIA FERREIRA DOMINGUES

**ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE
NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi***

CURITIBA

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

PATRICIA FERREIRA DOMINGUES

ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, pelo programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/Paraná.

Orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila
Co-orientador: Dr. Alexandre Haruo Inoue

CURITIBA

2021

Domingues, Patricia Ferreira .

Análise funcional de proteínas envolvidas no transporte núcleo-citoplasmático de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi* / Patricia Ferreira Domingues. - Curitiba, 2021.

173 f.; il.

(Doutorado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Andréa Rodrigues Ávila.

Co-orientador: Alexandre Haruo Inoue.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Exportação de RNA mensageiro. 3. TcSub2. 4. TceIF4AIII. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

**Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de Doutora em
Biotecnologia e Biotecnologia.**

Aos 21 dias do mês de setembro de dois mil e vinte um, às 8:30 horas, através de teleconferência <https://us02web.zoom.us/j/4239063043>, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Stenio Perdigão Fragoso, Dra. Julia Pinheiro Chagas da Cunha e Dr. Michel Batista, com a finalidade de julgar a tese da candidata Patricia Ferreira Domingues, intitulada: "ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO DE RNA MENSAGEIRO EM *Trypanosoma cruzi*", sob a orientação de Dr. Andréa Rodrigues Ávila e Dr. Alexandre Haruo Inoue, para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia 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. Stenio Perdigão Fragoso. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

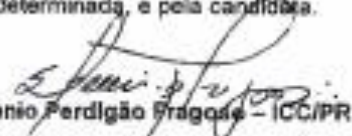
Aprovação da tese por unanimidade

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, 21 de setembro de 2021


Dr. Stenio Perdigão Fragoso - ICC/PR


Dra. Julia Pinheiro Chagas da Cunha - Instituto Butantã


Dr. Michel Batista - ICC/PR


Candidata: Patricia Ferreira Domingues

+55(41)3316-3230

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



À minha família que sempre me acolheu e me incentivou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por me proporcionar o privilégio de conhecer e conviver com pessoas incríveis e suas histórias inspiradoras que fizeram e fazem parte da minha história e meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus orientadores, Dra. Andréa Rodrigues Ávila e Dr. Alexandre Haruo Inoue que durante essa longa jornada, repleta de alegrias, decepções, sucessos e fracassos, sempre estiveram por perto, respeitando minha individualidade e tentando tirar o melhor de mim. Agradeço por tê-los tido como mentores e amigos, por todas as nossas conversas e discussões, pelo incentivo e cobrança. Obrigada por confiarem em mim!!

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Apicomplexa (LaPAPI), com toda certeza os meus dias foram muito mais leves e felizes com vocês ao meu lado, obrigada por toda ajuda, companheirismo, discussões científicas e conversas aleatórias com as quais rimos e rimos muito!! Vocês fazem parte da minha história e vou levá-los sempre com muito carinho e admiração.

Aos colegas de todos os laboratórios e setores do ICC, que de alguma maneira fizeram parte da minha jornada acadêmica.

A toda equipe do preparo pelo valioso apoio técnico!! Vocês tornaram o meu trabalho muito mais fácil e ágil.

A querida Sibelli Tanjoni, que sempre me auxiliou com sorriso no rosto e muita eficiência em todas as ocasiões em que recorri a ela. Você é e sempre será o meu contatinho do preparo!!!

À colombiana mais brasileira que passou pelo Instituto Carlos Chagas, Dra. Yirys Díaz Olmos, minha querida companheira nas manhãs de LCP, lugar onde trabalhamos muito, rimos, conversamos e dividimos (disputamos) a cabine de segurança biológica 1. Sempre lembrarei com carinho da sua generosidade e da forma inigualável pela qual me chamava (PATRI).

Ao Bernardo Gabiatti por todo auxílio, troca de reagentes e favores para a realização das milhões de IPs que fizemos.

A toda equipe da plataforma de microscopia, que sempre me ajudou de forma profissional e atenciosa em todos os experimentos realizados.

Ao Dr. Michel Batista e a toda equipe da plataforma de espectrometria de massas pelo auxílio e eficiência na realização dos experimentos.

À Dra. Adriana Ludwig pela preciosa ajuda nas análises de filogenia da TcHYP.

Aos colaboradores da Universidade de Dundee pela contribuição e construção das árvores filogenéticas de TcFOP, TcAPI5 e TcNTF2L.

À equipe da plataforma de citometria de fluxo, Rodrigo e Pri, por estarem sempre disponíveis e por toda ajuda com a seleção dos meus preciosos clones.

Aos meus pais e toda minha família, pelo apoio constante e amor incondicional!!! Amo vocês infinitamente!!

Ao meu esposo Roger, pelo apoio nos momentos mais difíceis e desgastantes que tive ao longo dessa jornada. Obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a prosseguir sem olhar para trás.

Enfim, a jornada acadêmica acaba aqui, mas meu carinho, respeito e admiração, por cada um de vocês, não!!!

“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”.

Sir Isaac Newton

RESUMO

A exportação núcleo-citoplasmática de mRNA é uma via essencial para a regulação da expressão gênica em células eucarióticas, mas ainda é pouco compreendida em parasitas protozoários. Ortólogos de apenas poucas proteínas envolvidas na exportação de mRNA em eucariotos superiores são detectáveis por análises *in silico*. Descrevemos anteriormente duas RNAs helicases conservadas, componentes da via de exportação de mRNA em *T. cruzi*: TcSub2, essencial para a sobrevivência do parasita e para a exportação de mRNA, e TcelF4AIII, uma proteína que migra entre núcleo e citoplasma. Análises de imunoprecipitação de complexos associada a espectrometria de massas, usando como isca TcSub2 e TcelF4AIII, identificaram componentes adicionais a esse sistema, incluindo proteínas exclusivas de kinetoplastídeos, denominadas de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP. Confirmamos que TcFOP, TcAPI5 e TcHYP são proteínas nucleares e colocalizam com TcSub2 enquanto TcNTF2L é uma proteína citoplasmática que possui padrão de distribuição similar a TcelF4AIII. Estas proteínas também foram utilizadas como isca para isolamento dos complexos, tanto para confirmação de interações como identificação de novos componentes. Os resultados demonstraram significativa interação de proteínas envolvidas no processamento, exportação, controle de qualidade e tradução do mRNA. Isso indica um alto nível de conectividade entre múltiplos aspectos da maturação e transporte de mRNA em tripanossomatídeos e reforça a presença de componentes específicos destes organismos. O *knockdown* de TcFOP, TcAPI5, TcHYP e TcNTF2L mostra que essas proteínas não são essenciais, contudo, a depleção de TcFOP, TcAPI5 e TcSub2 causa importantes alterações celulares que evidenciam morte celular, como condensação da cromatina na região perinuclear, desestruturação de mitocôndria e células multinucleadas, além de um acúmulo de acidocalcisomas. De modo geral, o core central de proteínas (super-interatoma) descrito neste trabalho, composto por fatores conservados e proteínas filogeneticamente divergentes, é altamente interativo desde o *splicing* até a exportação nuclear criando um mecanismo único e coordenado da maturação do mRNA. Sugerimos que esses novos componentes provavelmente façam parte da adaptação evolutiva à transcrição policistronica/*trans-splicing*

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, exportação de mRNA, TcSub2, TcelF4AIII

ABSTRACT

The nucleocytoplasmic RNA export is an essential pathway for gene expression regulation in eukaryotic cells, but it is still poorly understood in protozoan parasites. Orthologs of only few proteins involved in mRNA export in higher eukaryotes are detectable. We previously described two conserved DEAD-box RNA helicases, components of the mRNA export pathway in *T. cruzi*: TcSub2, an essential protein for parasite survival and export of mRNA, and eIF4AIII, a shuttling protein and component of mRNA complexes. Analyses of the interactomes of TcSub2 and eIF4AIII uncovered additional components of this system, including lineage-specific proteins of trypanosomatids, named as TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L and TcHYP. We confirmed that TcFOP, TcAPI5 and TcHYP are nuclear proteins and colocalize with TcSub2. However, TcNTF2L is a cytoplasmic protein that has a similar distribution pattern to TceIF4AIII. Through immunoprecipitation assays coupled with mass spectrometry, we showed the presence of proteins involved in the processing, export, quality control and translation of mRNA. Suggesting a high level of connectivity between multiple aspects of mRNA processing and transport in trypanosomatids. Knockdown of TcFOP, TcAPI5, TcHYP and TcNTF2L shows that those proteins are not essential, although depletion of TcFOP, TcAPI5 and TcSub2 causes important ultrastructural changes that evidence cell death, such as chromatin condensation in the perinuclear region, mitochondria and multinucleate breakdown, and accumulation of acidocalcysomes. The protein core described in this work, composed of conserved factors and divergent proteins, is highly interactive from splicing to nuclear export, creating a unique and coordinated mechanism for mRNA maturation. We suggest that these new components are likely part of the evolutionary adaptation to polycistronic transcription / trans-splicing

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, mRNA export, TcSub2, TceIF4AIII

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO EVOLUTIVO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
FIGURA 2. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CICLO DE VIDA DO T. cruzi E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	22
FIGURA 3. TRANSCRIÇÃO POLICISTRÔNICA E PROCESSAMENTO DE mRNAs EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	23
FIGURA 4. MECANISMO DE CIS-SPLICING E TRANS-SPLICING	24
FIGURA 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ARQUITETURA MOLECULAR DO COMPLEXO DE PORO NUCLEAR.....	26
FIGURA 6. TRANSPORTE VIA COMPLEXO DE PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP.....	28
FIGURA 7. DIFERENTES VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs EM LEVEDURAS	29
FIGURA 8. MODELO ESQUEMÁTICO EXPORTAÇÃO DE mRNA CO-TRANSCRICIONAL EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	32
FIGURA 9. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS E METAZOÁRIOS.....	34
FIGURA 10. COMPLEXO DE JUNÇÃO ÉXON.....	36
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE COMO O COMPLEXO TREX-2 INTEGRA A FORMAÇÃO DE UM mRNP COMPETENTE PARA EXPORTAÇÃO PELO CPN.....	38
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RECEPTOR DE EXPORTAÇÃO Nxf1 ..	39
FIGURA 13. MODELO ESQUEMÁTICO DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DE NXF1/MEX67, INDUZIDA POR TREX PARA A EXPORTAÇÃO DE mRNA.....	40
FIGURA 14. DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE TbMex67 E SUAS ORTÓLOGAS.....	41
FIGURA 15. REGIÕES UTILIZADAS PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP.....	54
FIGURA 16. MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 (Invitrogen).....	58
FIGURA 17. DESENHO ESQUEMÁTICO QUE MOSTRA OS PASSOS DA CONSTRUÇÃO DO VETOR pTcGWGFPN.....	61
FIGURA 18. REGIÕES UTILIZADAS PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 E TbHYP.....	70
FIGURA 19. MAPA DO VETOR p2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi	73
FIGURA 20. MAPA DO VETOR p2T7-177/LacZ UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi	75
FIGURA 21. BUSCA POR DOMÍNIOS FUNCIONAIS NAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
FIGURA 22. FILOGENIA DE TcFOP E TcAPI5.....	82
FIGURA 23. FILOGENIA DE TcNTF2L	83
FIGURA 24. FILOGENIA DE TcHYP	84
FIGURA 25. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS CLONADOS EM VETOR pDONR™221 (INVITROGEN).....	85
FIGURA 26. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA ANÁLISE DE CLONES DE TcNTF2L E TcHYP	87
FIGURA 27. ANÁLISE POR WESTERN BLOT DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO PROTEÍNAS FUSIONADA À GFP E/OU FLAG NAS EXTREMIDADES N E/OU C-TERMINAL .	88
FIGURA 28. ANÁLISE DE LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO POR MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA.....	90
FIGURA 29. ANÁLISE DE COLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL EM T. cruzi.....	92
FIGURA 30. ANÁLISE DE COLOCALIZAÇÃO DE TcNTF2L E TceIF4AIII ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL EM T. cruzi	94

FIGURA 31. IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5 E TcNTF2L. IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5 E TcNTF2L.....	96
FIGURA 32. DIAGRAMA DE VENN DE PROTEINAS IDENTIFICADAS POR IMUNOPRECIPITAÇÃO ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	98
FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO INTERATOMO DO MAQUINÁRIO DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM <i>T. cruzi</i>	99
FIGURA 34. ALINHAMENTO ENTRE ORTÓLOGAS EM <i>T. cruzi</i> E <i>T. brucei</i>	108
FIGURA 35. DIGESTÃO DIAGNÓSTICA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE TbNTF2 E TbHyp EM VETOR p2T7-177	110
FIGURA 36. VALIDAÇÃO DO SISTEMA DE RNAi POR qPCR E SEU EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS/ML APÓS SUA INDUÇÃO.....	112
FIGURA 37. EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE TbFOP E TbAPI5 NA LOCALIZAÇÃO DE mRNA	114
FIGURA 38. EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE TbNTF2 E TbHYP NA LOCALIZAÇÃO DE mRNA	115
FIGURA 39. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TbSub2 EM <i>Trypanosoma brucei</i>	117
FIGURA 40. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TbFOP EM <i>Trypanosoma brucei</i>	118
FIGURA 41. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TbAPI5 EM <i>Trypanosoma brucei</i>	119
FIGURA 42. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TbNTF2 EM <i>Trypanosoma brucei</i>	120
FIGURA 43. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO <i>KNOCKDOWN</i> DE TbHYP EM <i>Trypanosoma brucei</i>	121
FIGURA 44. ESQUEMA DA COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS TcFOP, DE <i>T. cruzi</i> E HsCHTOP (DE HUMANOS).....	124
FIGURA 45. MODELO ESQUEMÁTICO DE INTERAÇÃO ENTRE A MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO E CPN	128
FIGURA 46. LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE TcHYP FUSIONADA À FLAG NAS EXTREMIDADES N E C-TERMINAL EM <i>T. cruzi</i> POR IMUNOFLUORESCÊNCIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA.....	147
FIGURA 47. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TCFOP E TCAPI5 COM OS TAMPÕES 1, 2 E 3 PARA SUSPENSÃO DE “PÓ” DE CÉLULAS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE CRYOGRINDING.....	150
FIGURA 48. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP E TcAPI5 COM O TAMPÃO 4.....	151
FIGURA 49. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP E TcAPI5 COM O TAMPÃO 5.....	152
FIGURA 50. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PADRONIZADO COM TAMPÃO 6	15454

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CORE PROTEICO DO COMPLEXO TREX.....	35
TABELA 2. SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE	51
TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR™221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcNTF2L e TcHYP.....	56
TABELA 4. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS GÊNICOS DE DE TbFOP, TbAPI5, TbNTF2, TbHYP	72
TABELA 5. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA ENSAIOS de qPCR de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP em <i>Trypanosoma brucei</i>	78
TABELA 6. PROTEÍNAS PRESENTES NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP.....	100
TABELA 7. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP	102
TABELA 8. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcAPI5	103
TABELA 9. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcNTF2L	104
TABELA 10. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcHYP	105
TABELA 11. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 1, 2 E 3 UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS DE TCFOP E TCAPI5 PARA A SUSPENSÃO DO “PÓ” DE CÉLULAS OBTIDO PELA TÉCNICA DE CRYOGRINDING.....	148
TABELA 12. TAMPÕES UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS POR LISE POR DETERGENTE.....	149
TABELA 13. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 5 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcFOP.....	155
TABELA 14. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 7 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcAPI5	158
TABELA 15. LISTA LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 4 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcNTF2	160
TABELA 16. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 7 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcHYP.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS

BLASTP- *Basic Local Alignment Search Tool Program*
CPN – Complexo de Poro Nuclear
DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol
Dm - *Didelphis marsupialis*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FG-Nups – Nucleoporinas com repetições em tandem de fenilalanina-glicina
GAP- Proteína ativadora de GTPase (*GTPase-activation protein*)
GEF - Fator de troca de nucleotídeos de guanina (*Guanine nucleotide exchange factor*)
G418 - Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina
GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
kDa - kilo-Dalton
LB - Meio Luria-Bertani
LC-MS/MS - Cromatografia líquida-espectrometria de massas em tandem
LIT - Meio Infusão de fígado e triptose (*Liver Infusion Tryptose*)
LRR - *Leucine Rich Repeat*
mRNA - RNA mensageiro
mRNP – Complexo ribonucleoprotéico
PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
Ran - RAs-related Nuclear protein
RanBP - Proteína de ligação a Ran (*Ran binding protein*)
RBP - Proteína de ligação a RNA (*RNA Binding Protein*)
RBP – Proteínas de ligação a RNA (*RNA Binding Proteins*)
RNA - Ácido ribonucléico
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SLRNA – RNA *Spliced-Leader*
TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA
TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

Tris-HCl - Tris-hidroximetil aminometano cloridrato
Tween 20 - Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana
UTR - Região não traduzida (*Untranslated Region*)

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa)

g - Aceleração de gravidade

kDa - QuiloDalton

L - litro

M - Molar

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

bp - Pares de bases

U - Unidade

V-Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	20
1.2. EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	23
1.2.1. Transporte de moléculas através do Complexo de Poro Nuclear	25
1.2.2. Transporte núcleo-citoplasmático de mRNA	28
1.2.2.1. Complexo TREX	32
1.2.2.2. Complexo de Junção Éxon (EJC).....	35
1.2.2.3. Complexo TREX-2	37
1.2.2.4. Mex67-Mtr2: Principal receptor de exportação de mRNA	38
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. OBJETIVO GERAL.....	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	45
4.1.1. Análise Filogenética	45
4.2. TAMPÕES E SOLUÇÕES	46
4.3. CULTIVO DE CÉLULAS	47
4.3.1. <i>Escherichia coli</i>	47
4.3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
4.3.3. <i>Trypanosoma brucei</i>	48
4.4. MEIOS DE CULTURA.....	48
4.4.1. Meio LB (Luria – Bertani)	48
4.4.2. Meio LIT (Liver Infusion Tryptose).....	49
4.4.3. Meio SDM-79	50
4.5. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E PROTEÍNAS	51
4.5.1. Eletroforese de DNA	51
4.5.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	51
4.5.2.1. Coloração por Azul de Comassie	52
4.5.2.2. Coloração Nitrato de Prata (OAKLEY, KIRSCH E MORRIS, 1980)	52
4.6. CLONAGEM MOLECULAR DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	53
4.6.1. Extração de DNA genômico	53
4.6.1.1. <i>T. cruzi</i> Dm28c e <i>T. brucei</i> 427.....	53
4.6.2. Amplificação gênica por PCR.....	53
4.6.3. Clonagem dos fragmentos gênicos na plataforma Gateway® (Invitrogen) ..	57
4.6.4. Transformação e seleção de clones recombinantes.....	58
4.6.4.1. Preparo de células competentes	58
4.6.4.2. Transformação de células competentes	59
4.6.4.3. Seleção de clones recombinantes por PCR de colônia	59
4.7. OBTENÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> EXPRESSANDO PROTEÍNAS FUSIONADAS À ETIQUETAS.....	60
4.7.1. Clonagem em vetores de destino.....	60

4.7.2.	Transfecção e seleção de parasitas	62
4.7.2.1.	Transfecção em <i>T. cruzi</i> por eletroporação e seleção de transfectantes	62
4.7.2.2.	Single Cell Sorting para seleção clonal de <i>T. cruzi</i>	62
4.8.	MICROSCOPIA ÓTICA	63
4.8.1.	Imunofluorescência indireta	63
4.9.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	64
4.9.1.	Processamento para Epon® (LUFT, 1961)	64
4.10.	IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS	65
4.10.1.	Conjugação do nanobody anti-GFP as esferas magnéticas (CRISTEA et al., 2005).....	65
4.10.2.	Preparação do extrato proteico por lise por detergente	65
4.10.3.	Isolamento dos complexos proteicos.....	66
4.10.4.	Análise por espectrometria de massas.....	66
4.11.	ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> (TOWBIN, STAEHELIN E GORDON, 1992).....	68
4.12.	SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi) DE GENES DE <i>T. brucei</i> ORTÓLOGOS AOS GENES IDENTIFICADOS EM <i>T. cruzi</i>	69
4.12.1.	Escolha dos alvos para os ensaios de RNAi	69
4.12.2.	Amplificação por PCR das sequências alvo para RNAi de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP	71
4.12.3.	Clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD et al., 2002)	73
4.12.4.	Clonagem em vetor p2T7-111/LacZ.....	74
4.12.5.	Transfecção e seleção de transfectantes	76
4.12.5.1.	Transfecção de <i>T. brucei</i> por eletroporação e seleção de transfectantes	76
4.12.5.2.	Single Cell Sorting para seleção clonal de <i>T. brucei</i>	76
4.12.6.	Indução de RNAi em <i>Trypanosoma brucei</i>	77
4.12.7.	Curva de crescimento para <i>Trypanosoma brucei</i>	77
4.12.8.	Validação do ensaio de RNAi por PCR quantitativa	77
4.12.9.	Localização de mRNA por ensaio de hibridização in situ fluorescente (FISH).....	79
5.	RESULTADOS	80
5.1.	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIVERGENTES ASSOCIADAS À MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO DE MRNA	80
5.1.1.	Análise de conservação das proteínas alvo	80
5.2.	OBTENÇÃO DE LINHAGENS TRANSFECTANTES.....	85
5.2.1.	Clonagem em vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway® (Invitrogen).....	85
5.2.2.	Clonagem em vetores de destino pTcGWGFP e pTcGWFLAG (BATISTA et al., 2010; KUGERATSKI et al., 2015).....	86
5.3.	LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP	89
5.3.1.	TcFOP, TcAPI5 e TcHYP colocalizam com TcSub2.....	91
5.3.2.	TcNTF2L colocaliza com TceIF4AIII.....	93
5.4.	ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP	95
5.4.1.	Fatores diretamente associados a biogênese do mRNA estão igualmente presentes nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP	97
5.4.2.	Intereção de TcNTF2L com proteínas nucleares.....	106

5.5. ANÁLISE DO FENÓTIPO CAUSADO PELO SILENCIAMENTO GÊNICO EM <i>T. brucei</i> DOS GENES ORTÓLOGOS DE TcFOP (TbFOP), TcAPI5 (TbAPI5), TcNTF2L (TbNTF2) E TcHYP (TbHYP) IDENTIFICADOS EM <i>T. cruzi</i>	107
5.5.1. Obtenção das linhagens transfectantes para ensaios de RNA de interferência	107
5.5.2. Validação do ensaio de RNAi por qPCR	111
5.5.3. Localização de mRNA após silenciamento gênico de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP	113
5.5.4. Efeito do silenciamento gênico na morfologia ultraestrutural do <i>Trypanosoma brucei</i>	116
6. DISCUSSÃO.....	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
ANEXO.....	147

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Os kinetoplastídeos são protozoários parasitas de animais e plantas, sendo responsáveis pela morbidade, mortalidade e danos agrícolas em muitas regiões do mundo (CLAYTON, 2016). Este grupo inclui patógenos humanos de grande relevância médica como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania spp.*, agentes etiológicos da Doença de Chagas, Doença africana do sono e leishmanioses, respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2017). Juntos, esses parasitas infectam aproximadamente 20 milhões de pessoas em todo o mundo (com mais de dois milhões de novos casos por ano), levando à aproximadamente 50.000 mortes por ano (KHARE *et al.*, 2016).

De acordo com as estimativas mais recentes da OMS, o número de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, em todo o mundo, pode chegar a 7 milhões de pessoas (WHO, 2021).

O maior número de pessoas infectadas está concentrado em quatro países: Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186) (ANTINORI *et al.*, 2017), sendo assim, uma doença endêmica da América Central e do Sul. Entretanto, nas últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença mudou de rural para predominantemente urbana, principalmente devido à mobilidade populacional, urbanização, emigração e outros modos de transmissão. Estes fatores fizeram com que a Doença de Chagas se espalhasse além de seus limites geográficos naturais, tornando-se uma questão de saúde global (WHO, 2021; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015; SCHMUNIS; YADON, 2010). Devido ao alto número de pessoas que permanecem sem diagnóstico ou tratamento, combinado com as áreas com transmissão ativa remanescente, cerca de 75 milhões de pessoas estão em risco de infecção (WHO, 2021).

Estima-se um gasto anual de \$627.46 milhões de dólares com saúde em decorrência da Doença de Chagas. (LEE *et al.*, 2013).

T. cruzi é um microrganismo heteroxênico com ciclo biológico alternado entre hospedeiros invertebrado e vertebrados. De modo geral seu ciclo de vida é caracterizado morfológica e bioquimicamente por quatro formas distinguíveis:

epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos presentes no inseto vetor, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos presentes no hospedeiro mamífero (FIGURA 1).

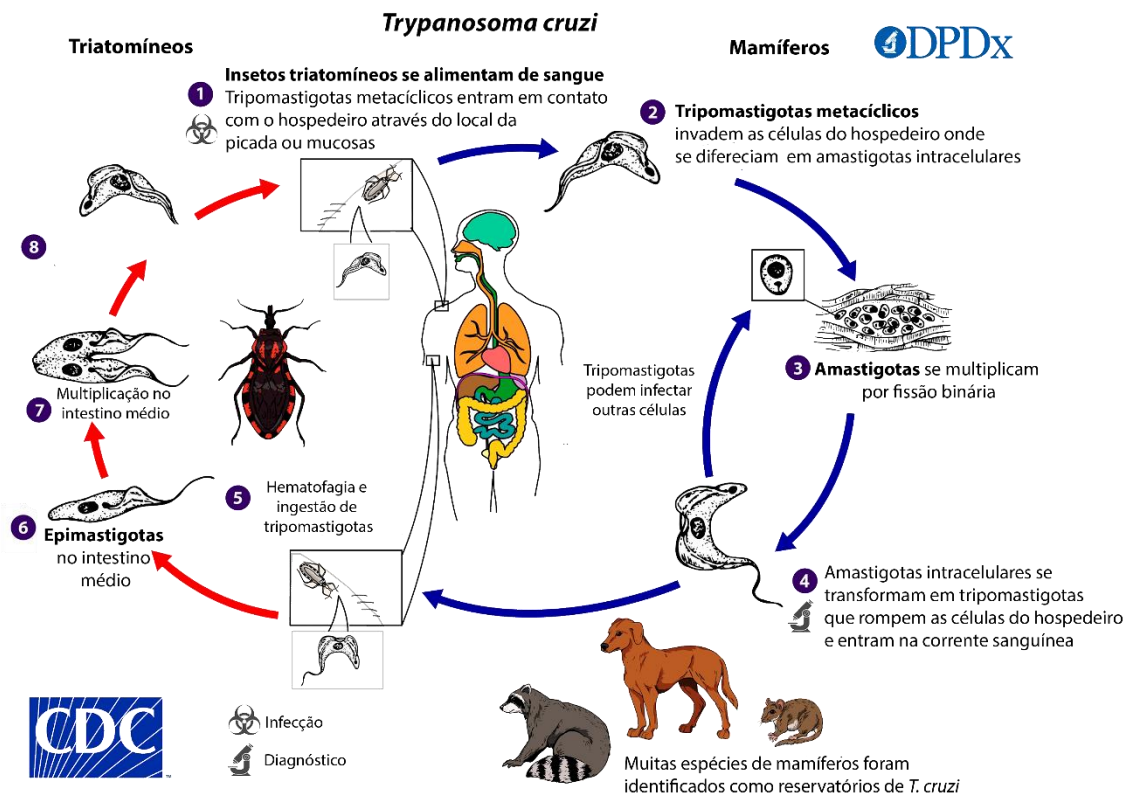


FIGURA 1. CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*. Modificado de <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

Existem diferentes formas de transmissão da doença, dentre as quais destaca-se a transmissão vetorial mediada pelo contato das fezes do inseto infectado com a mucosa, conjuntivas ou pele do hospedeiro. A transmissão mais relevante é devido a insetos do gênero *Triatoma* (*T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*), *Rhodnius* (*R. prolixus*) e *Panstrongylos* (*P. megistus*) (GÜRTLER E CARDINAL, 2015; ZINGALES *et al.*, 2012). Outros meios de transmissão como ingestão acidental de alimentos e líquidos contaminados com *T. cruzi*, transplante de órgãos, transfusão sanguínea, e transmissão congênita tem se tornado um grande problema (BALOUZ, AGÜERO E BUSCAGLIA, 2016). A figura 2 mostra as

diferentes características biológicas que contribuem para a transmissão e estabelecimento da doença.

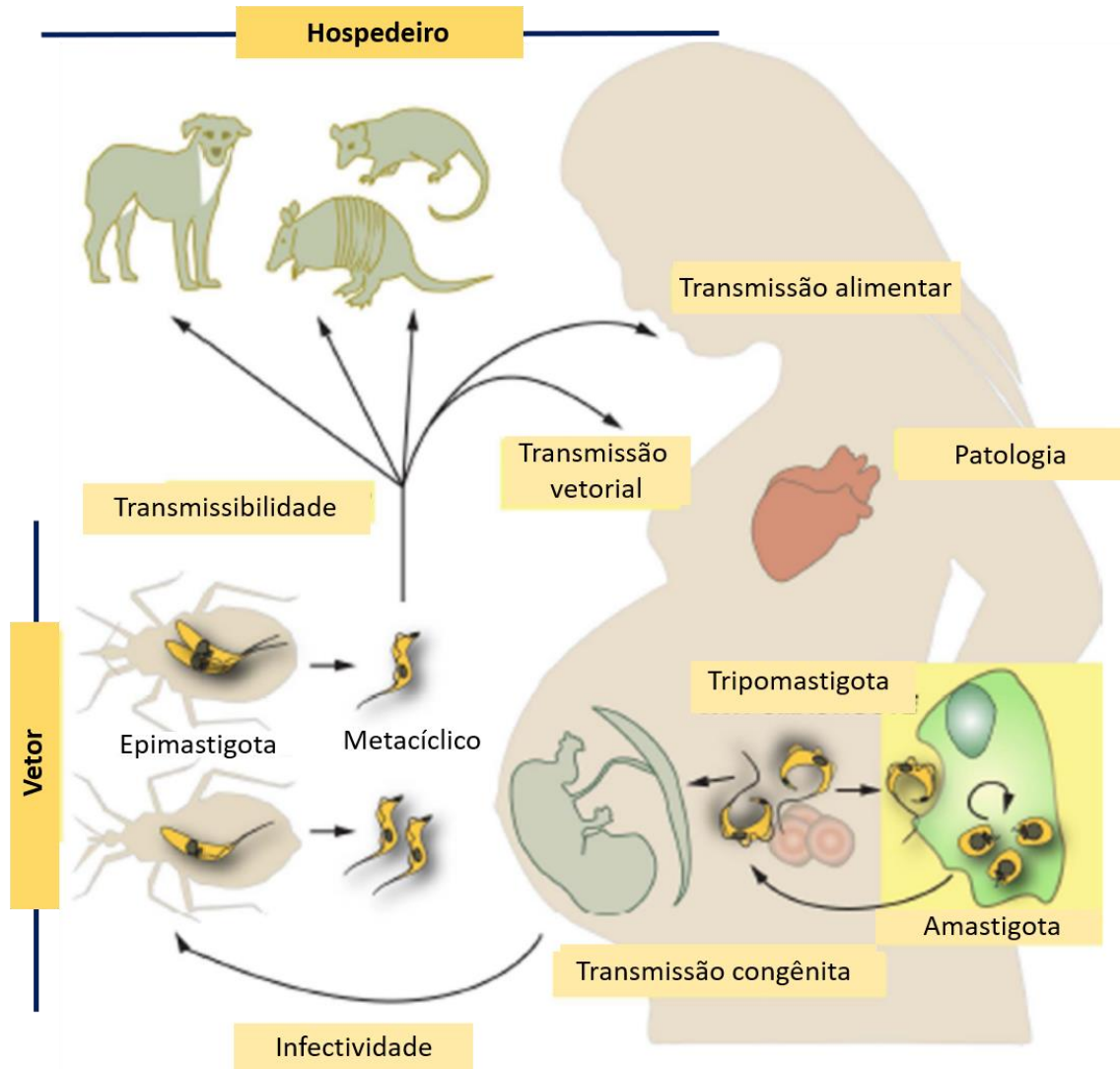


FIGURA 2. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CICLO DE VIDA DO *T. cruzi* E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS. As diferentes formas de transmissão incluem transmissão vetorial, alimentar, congênita e até mesmo por transfusão sanguínea e transplantes de órgãos. Muitas espécies de mamíferos foram identificadas como reservatórios de *T. cruzi*, do ponto de vista epidemiológico, esses reservatórios podem desempenhar importantes papéis como fatores determinantes que afetam a dinâmica de transmissão da doença em áreas endêmicas. Adaptado BALOUZ, AGÜERO E BUSCAGLIA, 2016

1.2. EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Devido a adaptação à diferentes ambientes ao longo do ciclo de vida do parasita, ocorre uma ampla modulação da expressão gênica principalmente a nível de mRNA (DILLON *et al.*, 2015; JENSEN *et al.*, 2009) e proteínas (URBANIAK *et al.*, 2012), isso porque o início da transcrição pela RNA polimerase II não possui controle gene-específico. Assim, os tripanossomatídeos apresentam um controle da regulação da expressão gênica majoritariamente pós-transcricional agindo nas etapas de maturação do mRNA, afetando seja a estabilidade, exportação ou a tradução do mRNA (CLAYTON, 2019; DE GAUDENZI *et al.*, (2011)

Nestes organismos, os genes são organizados de modo a formar cerca de 167 unidades de transcrição policistrônica (FIGURA 3). Esses policistrons são transcritos pela RNA polimerase II a partir de locais de início da transcrição que são epigeneticamente marcados por modificações de histonas (Revisto por KRAMER, 2021; SIEGEL *et al.*, 2009). Em contraste com o que ocorre em *operons* bacterianos, os genes presentes no mesmo *cistron* não estão funcionalmente relacionados (SMIRCICH *et al.*, 2011; KOLEV *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010); WORTHEY *et al.*, 2003).

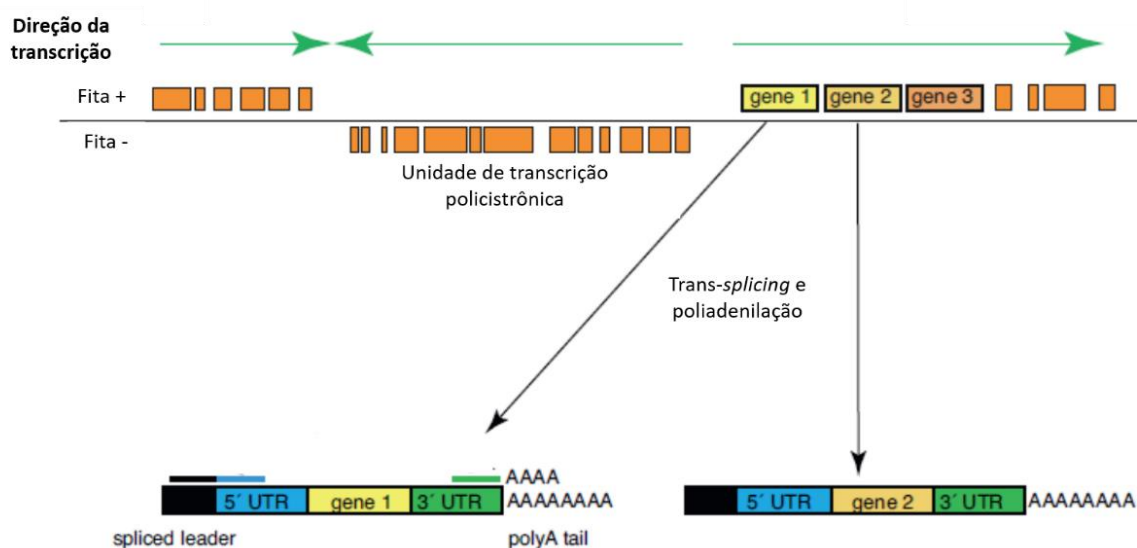


FIGURA 3. TRANSCRIÇÃO POLICISTRÔNICA E PROCESSAMENTO DE mRNAs EM TRIPANOSSOMATÍDEOS. O mRNA maduro contém um mini-éxon (Spliced Leader – SL) na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3'. Adaptado SIEGEL *et al.*, 2011).

O pré-mRNA é processado em mRNAs monocistrônicos por *trans-splicing* e poliadenilação. O *trans-splicing* é o processo que adiciona um mini-éxon ou *Spliced Leader* (SL), uma sequência de 39 nucleotídeos que contém um *cap* hipermetilado conhecido como “cap4” (ZAMUDIO *et al.*, 2009), na extremidade 5’ dos mRNAs.

Como o *cis-splicing*, o *trans-splicing* ocorre via duas reações de transesterificação, mas com a formação de uma estrutura intermediária em “Y” ao invés de em laço (FIGURA 4) (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

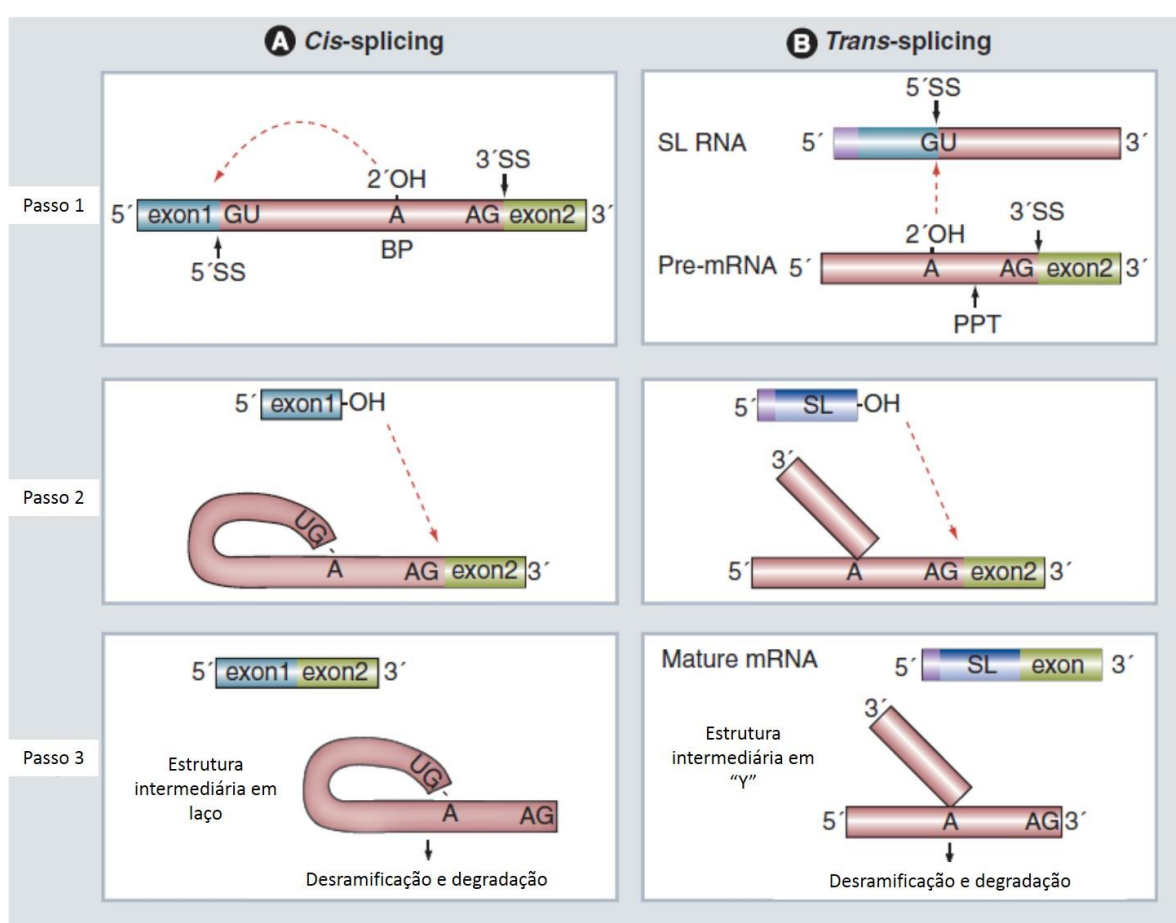


FIGURA 4. MECANISMO DE CIS-SPLICING E TRANS-SPLICING. (A) representa *cis-splicing* e (B) os mecanismos de *trans-splicing*. Os dois passos de transesterificação são apresentados. Locais de *splicing* 5' (GU) e 3' (AG) e as sequências BP são indicados. BP: ponto de ramificação; PPT: sequência de polipirimidina; SL: *Spliced Leader*, SS: Local de *splicing*. Adaptado de MICHAELI, 2011.

O mRNA pode associar-se a proteínas de ligação a RNA (RBPs – *RNA Binding Protein*) no núcleo para formar um complexo ribonucleoproteico mensageiro (mRNP) antes da exportação através do complexo de poro nuclear (Revisado por CLAYTON, 2016).

1.2.1. Transporte de moléculas através do Complexo de Poro Nuclear

Uma característica primária de células eucarióticas é o sistema de endomembranas e a presença de um núcleo, resultando na separação do material genético do restante da célula. (Revisto por Kramer (2021); Clayton (2019); WICKRAMASINGHE E LASKEY (2015); KABACHINSKI E SCHWARTZ, 2015)

Ao restringir o acesso ao núcleo e separar a transcrição gênica da tradução de proteínas, as células eucarióticas evoluíram para controlar a expressão gênica de uma maneira altamente regulada. Embora separado pelo envelope nuclear de membrana dupla, o interior do núcleo não está completamente isolado. Inseridos em todo o envelope nuclear estão grandes complexos de proteínas conhecidos como complexo de poro nuclear (CPN) (KABACHINSKI E SCHAWRTZ, 2015).

Os CPNs têm um peso molecular de aproximadamente 60 MDa em leveduras e 120 MDa em humanos. Sendo eles, compostos por múltiplas cópias de 30 diferentes proteínas, chamadas de nucleoporinas (Nups) (OBADO *et al.*, 2016; STRAMBIO-DE-CASTILLIA *et al.*, 2010; ROUT *et al.*, 2000).

Os principais elementos estruturais do CPN incluem: anel de poro interno, que reside na fusão das membranas nucleares interna e externa, anéis nucleares e anéis citoplasmáticos que são ancorados pelo anel de poro interno; elementos periféricos como a cesta nuclear e filamentos citoplasmáticos que emanam dos anéis nucleares e citoplasmáticos, respectivamente (DICKMANNNS *et al.*, 2015) (FIGURA 5).

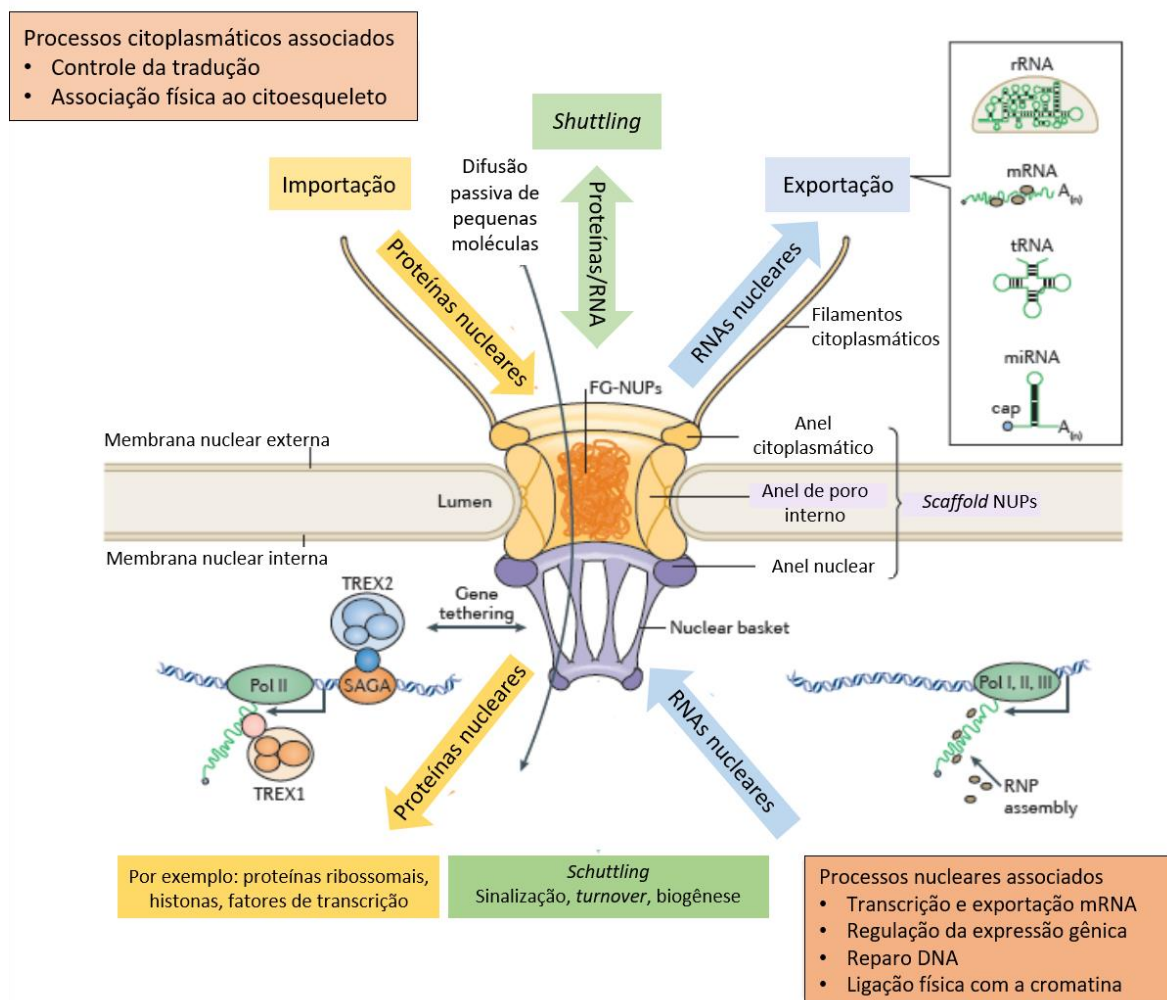


FIGURA 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ARQUITETURA MOLECULAR DO COMPLEXO DE PORO NUCLEAR. O CPN media o transporte núcleo-citoplasmático em ambas as direções. São indicadas a difusão livre de pequenas moléculas e as principais rotas de transporte ativo através do CPN, como a importação nuclear de proteínas, a exportação de RNA e ribonucleoproteínas (RNPs), e a transferência bidirecional de moléculas - incluindo RNA, RNPs e proteínas. Adaptado BECK E HURT, 2017.

As Nups são divididas em três classes principais, sendo elas: Proteína de membrana de poro (Poms) que possuem domínios transmembrânicos que servem para ancorar o CPN no envoltório nuclear. As nucleoporinas (Nups) centrais são os principais componentes estruturais do CPN e interagem com o envoltório nuclear e Poms e as Nups FG que contêm repetições em tandem de fenilalanina-glicina (FG) (ROUT *et al.*, 2000; CRONSHAW *et al.*, 2002). As Nups FG emanam para o interior do canal do CPN, formando uma densa malha hidrofóbica que funciona como uma

barreira de difusão passiva que limita a troca de macromoléculas entre o núcleo e o citoplasma (STANLEY *et al.*, 2017; KATAHIRA, 2015).

Enquanto metabólitos, íons e moléculas com até 30 kDa podem transitar livremente através do CPN por difusão (Revisto por KRAMER, 2021; STANLEY *et al.*, 2017; FELDHERR E AKIN, 1997; KEMINER E PETERS, 1999), proteínas maiores e quase todas as moléculas de RNA requerem sistemas de transporte mais complexos e só podem transitar entre núcleo e citoplasma através de receptores específicos (STANLEY *et al.*, 2017; KATAHIRA *et al.*, 2015), os quais se ligam transitoriamente aos resíduos de fenilalanina-glicina presentes nas Nups FG do complexo de poro nuclear (revisto em KÖHLER E HURT, 2007).

A maioria dos receptores de transporte nuclear (NTRs – *Nuclear Transport Receptors*) são pertencentes à família das carioferinas Kap- β (14 em levedura e cerca de 20 em metazoários) que incluem importinas (receptores de importação nuclear), exportinas (receptores de exportação nuclear) e Kap- β s bidirecionais que podem mediar tanto a importação quanto a exportação nuclear (MATSUURA, 2016). Os NTRs reconhecem e interagem com os sinais de localização nuclear (NLS – *Nuclear Localisation Sequence*) ou sequências de exportação nuclear (NES – *Nuclear Export Signal*) presentes nas cargas a serem transportadas (DINGWALL *et al.*, 1988; GOLDFARB *et al.*, 1986).

As vias de transporte nuclear mediadas por carioferinas requerem uma Ran GTPase (altamente conservada – 80% de identidade entre leveduras e humanos) (FRIED E KUTAY, 2003), que controla as interações NTR-carga (FUNG E CHOOK, 2014). No núcleo, Ran é mantida principalmente em sua forma ligada à GTP (RanGTP) pelo fator de troca de nucleotídeos de guanina (RCC1) que está ligado à cromatina. Por outro lado, a proteína ativadora de Ran GTPase (RanGAP – *GTPase activating protein*) está localizada no citoplasma, onde Ran está principalmente na forma vinculada à GDP (RanGDP). O gradiente RanGDP-RanGTP determina a direcionalidade do transporte mediado por importinas e exportinas. As importinas ligam-se as cargas no citoplasma liberando-as no núcleo após a ligação ao RanGTP. Por outro lado, para a exportação, forma-se um complexo trimérico que inclui RanGTP este complexo é desmontado no citoplasma, onde a Ran GTPase (RanGEF – *Guanine nucleotide Exchange fator*) é ativada (LUI E HUANG, 2009) (FIGURA 6)

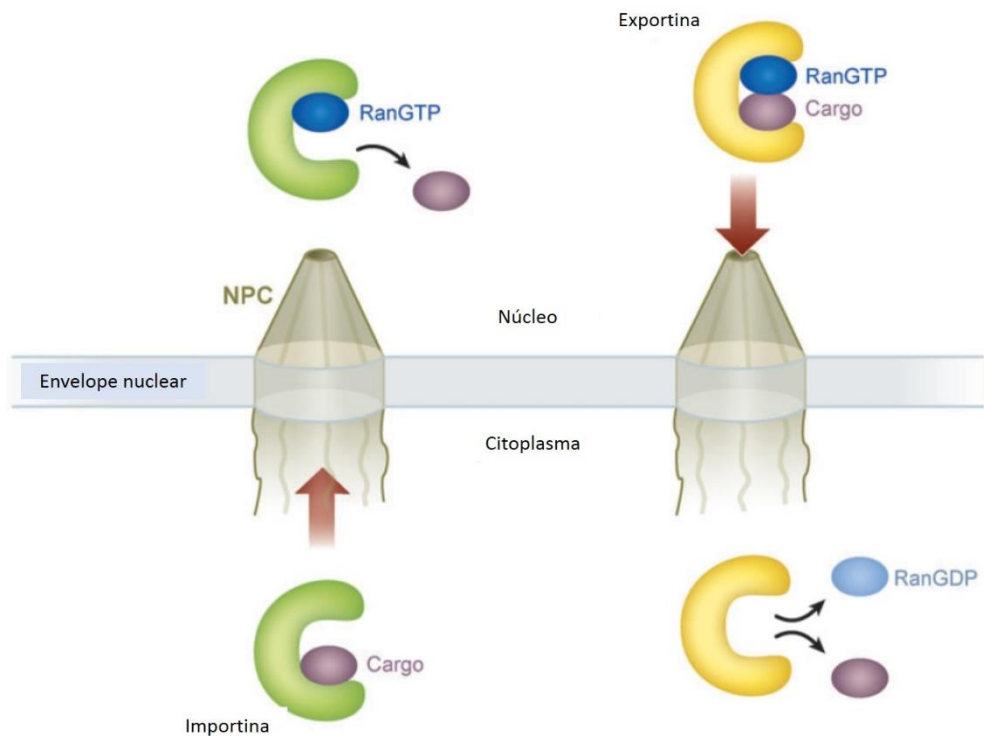


FIGURA 6. TRANSPORTE VIA COMPLEXO DE PORO NUCLEAR MEDIADO POR RECEPTORES E GRADIENTE DE GTP. Para a importação, cargos contendo um NLS se associam a importinas e são liberados dentro do núcleo com a presença de RanGTP. Para a exportação, exportinas interagem com NES de cargos na presença de RanGTP e quando GTP é hidrolisado, o cargo é liberado no citoplasma. Adaptado: COOK *et al.*, 2007

1.2.2. Transporte núcleo-citoplasmático de mRNA

A maioria dos RNAs, como tRNAs, miRNAs e snRNAs, e rRNA, requer receptores de transporte do tipo carioferinas para exportação nuclear (FIGURA 7). No entanto, mRNAs são coordenados para uma via específica, essas moléculas são transportadas por receptores de exportação heterodiméricos específicos, denominados de TAP-p15 (também nomeado como Nxf1-NXT1 em metazoários e Mex67-Mtr2 em *Saccharomyces cerevisiae* (revisado em KATAHIRA E YONEDA, 2011)). Portanto, a exportação de mRNA em eucariotos é um processo dependente de ATP e independente de Ran, e a direção do transporte é estabelecida por outros mecanismos. Assim como as carioferinas, os fatores exportadores de mRNA podem interagir fisicamente com as Nups do CPN, promovendo o transporte de mRNA para o citoplasma, por superar a barreira de permeabilidade (REED E HURT, 2002).

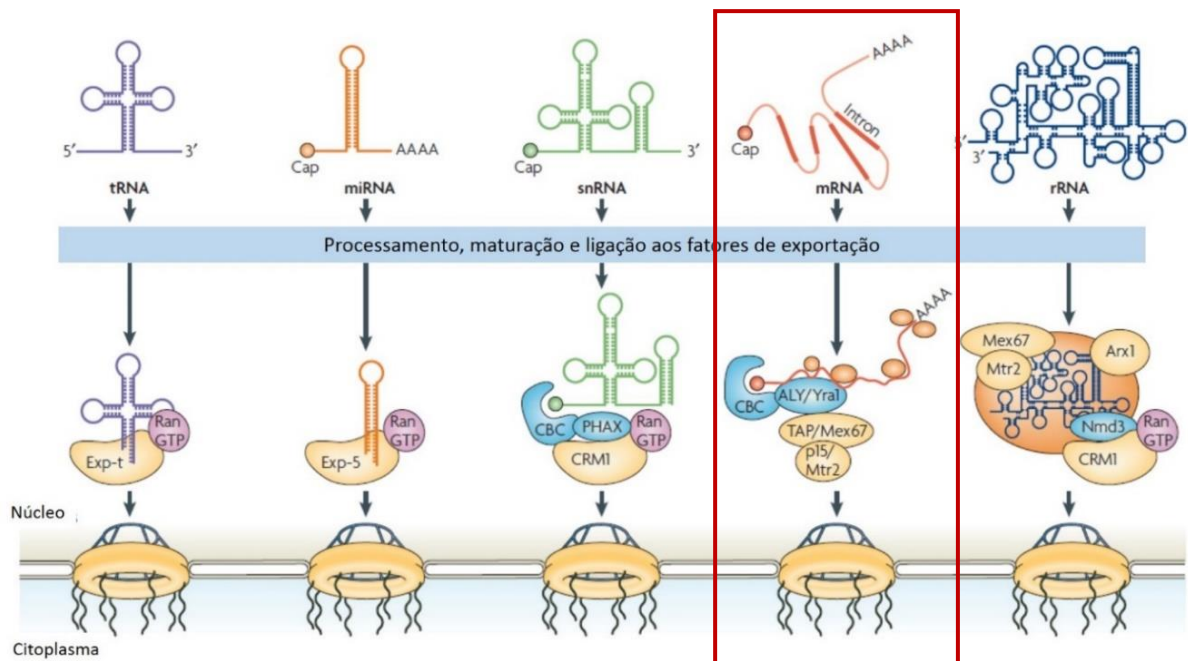


FIGURA 7. DIFERENTES VIAS DE EXPORTAÇÃO DE RNAs EM LEVEDURAS. As vias majoritárias de transporte estão ilustradas: RNA transportador (tRNA), microRNA (miRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA), RNA mensageiro (mRNA) e RNA Ribossomal (rRNA). Em cada caso, o transcrito primário está ilustrado, bem como a proteína transportadora correspondente após processamento dos respectivos RNAs. Os adaptadores de exportação estão ilustrados em azul e receptores de exportação, em amarelo. No caso de mRNA, os homólogos em humanos e fungos estão indicados, separados por "/". Em humanos são: ALY, TAP e p15. Em fungos: Yra1, Mex67 e Mtr2. CBC, fator de ligação ao CAP; Exp, exportina. A via de mRNA está destacada em vermelho. Adaptado de KÖHLER E HURT, 2007.

A preparação dos mRNAs para a exportação núcleo-citoplasmática é um processo altamente coordenado que começa co-transcricionalmente e resulta na adição e remoção de proteínas de ligação ao RNA, garantindo assim, que apenas mRNAs maduros e totalmente processados possam ser exportados para o citoplasma.

Após a síntese pela RNA polimerase II, moléculas denominadas de pré-mRNAs são geradas. Estas moléculas geralmente sofrem uma série de modificações, como capeamento, *splicing* e poliadenilação, originando as moléculas de mRNAs maduras que se associam a diversos fatores proteicos (Complexo

ribonucleoproteico mensageiro – mRNP) antes de serem exportados para o citoplasma (STEWART, 2010).

Os componentes de um mRNP variam de fatores que participam do processamento e exportação nuclear. Alguns destes componentes são liberados no núcleo, enquanto outros acompanham o mRNP para o citoplasma. Assim, a estrutura de um mRNP e a composição das proteínas associadas remodelam-se continuamente (KATAHIRA *et al.*, 2015).

Em eucariotos, como fungos e mamíferos, a via de exportação de mRNA é bem caracterizada, diferente do que acontece com os tripanossomatídeos. Dados na literatura têm mostrado, que nesses organismos, a via de exportação de mRNA possui características distintas e provavelmente existam fatores, específicos de linhagem, ainda não identificados.

Corroborando essa premissa Serpeloni e colaboradores (2011a) demonstraram que a via de exportação de mRNA, é a menos conservada dentre as vias de transporte dos vários tipos de RNA e quando comparada a outros eucariotos, as proteínas envolvidas com a exportação de mRNA são muito pouco conservadas em diversas espécies de parasitas (SERPELONI *et al.*, 2011a), entre as exceções estão as proteínas Sub2 (SERPELONI *et al.*, 2011b), eIF4AIII (INOUE *et al.*, 2014) e Mex67 (DOSTALOVA *et al.*, 2013).

Dentre as diferenças observadas entre tripanossomatídeos no que diz respeito ao transporte núcleo-citoplasmático de mRNA, foi relatado que o ortólogo do receptor de exportação Mex67 em *T. brucei* (TbMex67) possui diferenças estruturais, possivelmente determinando suas peculiaridades funcionais (RINK E WILLIAMS, 2019). Outra característica interessante é que embora a estrutura do CPN seja conservada em tripanossomatídeos, ela possui características que indicam diferenças fundamentais na via de exportação de mRNA (Revisto por KRAMER 2021). Obado e colaboradores (2016) mostraram, por microscopia eletrônica, que a disposição das nucleoporinas do CPN de tripanossomatídeos é simetricamente distribuída entre as faces nuclear e citoplasmática, diferente do que acontece com outros eucariotos, onde a distribuição assimétrica é necessária para a unidirecionalidade do transporte. Também identificaram a falta de ortólogos para muitas NUPs com funções específicas na exportação e controle da exportação de mRNA incluindo toda a remodelação dependente de ATP que ocorre na face

citoplasmática. Sugerindo assim, que o mecanismo de exportação de mRNA em tripanossomatídeos provavelmente é diferente dos opistocontes. Eles propuseram que, diferente de outros organismos, a exportação de mRNA em tripanossomatídeos é dependente de Ran.

Goos e colaboradores (2019) demonstraram que tripanossomatídeos podem iniciar a exportação de mRNA co-transcricionalmente e que o início da exportação não depende da conclusão do *trans-splicing*, indicando que o controle da exportação de mRNA não é tão rígido nestes organismos (Revisto por KRAMER, 2021).

A exportação co-transcricional não ocorre para todos os mRNAs, apenas para cerca da metade dos transcritos longos, os quais tem maior probabilidade de atingir o CPN enquanto a transcrição ainda está ativa (Revisto por KRAMER, 2021; GOOS *et al.*, 2019). No entanto, os dados obtidos não excluem um ponto de controle na exportação para mRNAs não processados adequadamente (Revisto por KRAMER, 2021).

Com o intuito de investigar um possível mecanismo de controle de qualidade, Goos e colaboradores (2019) inibiram o *trans-splicing* com o uso de sinefungina (droga que inibe a metilação do Cap), para aumentar massivamente o número de mRNAs não processados, interessante observou-se a formação de estruturas granulares na parte externa do CPN, denominadas de NPGs (*Nuclear Pore Granules*) (FIGURA 8), nessas estruturas estão presentes inúmeras proteínas citoplasmáticas de ligação ao RNA, como por exemplo DHH1, SCD6 e PABP2, enquanto proteínas envolvidas nas etapas anteriores de processamento do mRNA estão ausentes. Sugerindo que estas estruturas atuam como um compartimento de controle de qualidade do mRNA citoplasmático (GOOS *et al.*, 2019).

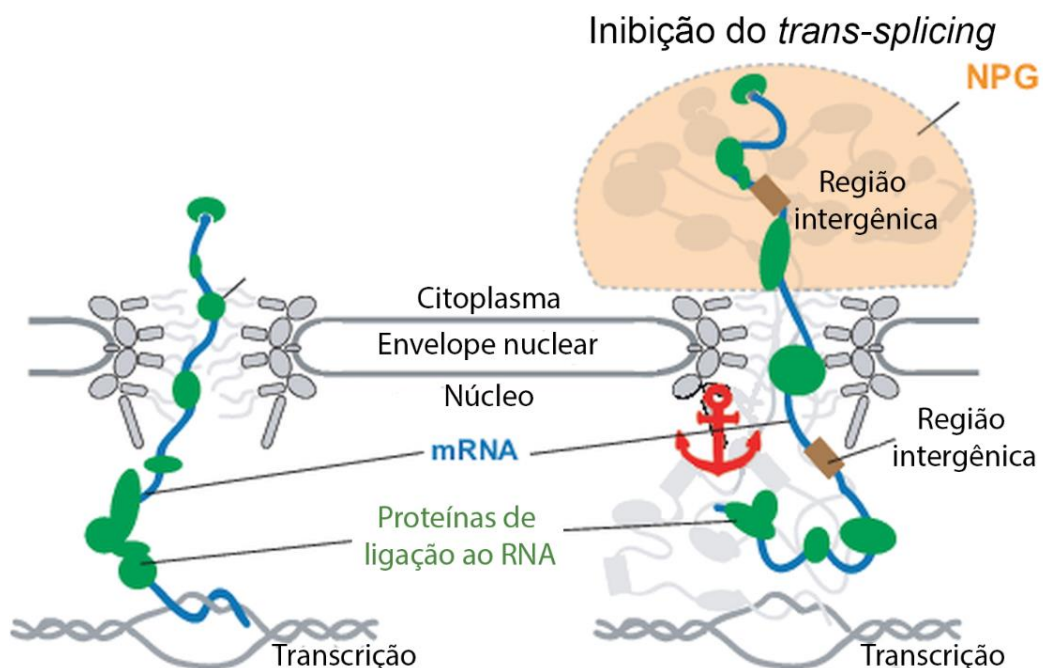


FIGURA 8. MODELO ESQUEMÁTICO EXPORTAÇÃO DE mRNA CO-TRANSCRICIONAL EM TRIPANOSSOMATÍDEOS. No modelo esquemático estão representadas células não tratadas (esquerda) e células tratadas com sinefungina para inibição do *trans-splicing* (direita). Em ambas as condições, os transcritos deixam o núcleo enquanto ainda estão em transcrição. Quando o *trans-splicing* é inibido, o progresso da exportação é retardado ou evitado por um mecanismo ainda desconhecido (âncora), resultando na formação de grânulos na face citoplasmática do complexo de poro nuclear. Esses grânulos contêm transcritos não processados presos na exportação, bem como proteínas de ligação de RNA citoplasmático. Adaptado de KRAMER, 2021.

1.2.2.1. Complexo TREX

Um participante chave na biogênese e na maturação do mRNP é o complexo **Transcrição/Exportação (TREX)**. TREX é conservado em uma ampla gama de organismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Xenopus* e humanos (STRÄSSER *et al.*, 2002, REHWINKEL *et al.*, 2004; YELINA, 2010; EL BOUNKARI *et al.*, 2009; MASUDA *et al.*, 2005) o que indica a sua importância fisiológica.

TREX consiste em um núcleo formado pelo subcomplexo THO (composto de Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2 e Tex1), a RNA helicase Sub2 (UAP56/DDX39B), adaptadores e coadaptadores de ligação ao RNA (Revisto por KRAMER, 2021; HEATH *et al.*, 2016). Juntas estas proteínas recrutam o receptor de exportação e estimulam

a atividade de ligação ao RNA promovendo a exportação do mRNA (VIPHAKONE *et al.*, 2015, 2012; CHANG *et al.*, 2013) CHANG *et al.*, 2013; HAUTBERGUE *et al.*, 2008;).

Os componentes de TREX estão funcionalmente ligados a cada passo de processamento de mRNA, e isto é refletido pela sua associação física com complexos de proteínas tais como o complexo de ligação ao Cap 5' (CBC), o complexo de Junção Éxon (EJC) e os fatores de processamento na extremidade 3'. Portanto, TREX provavelmente atua como uma interface para esses vários processos ajudando a manter a alta fidelidade da expressão gênica (HEATH, VIPHAKONE & WILSON, 2016), uma vez que desempenha um importante papel na expressão de genes, integrando a informação a partir de eventos de transcrição e processamento do mRNA no núcleo para assegurar a exportação oportuna para o citoplasma (CHANG *et al.*, 2013).

Em leveduras, TREX é recrutado co-transcricionalmente para o mRNP enquanto em metazoários associa-se com a maquinaria de *splicing* (STRÄSSER E HURT, 2000; MASSUDA *et al.*, 2005). Em metazoários, TREX se associa ao complexo THO e a proteínas ALY e UAP56 (Yra1 e Sub2 em levedura) que são responsáveis pelo recrutamento dos receptores de exportação de exportação Nxf1 ou TAP (Mex67 em levedura) (JIMENO *et al.*, 2002, ABRUZZI *et al.*, 2004, MASUDA *et al.*, 2005). (FIGURA 9)

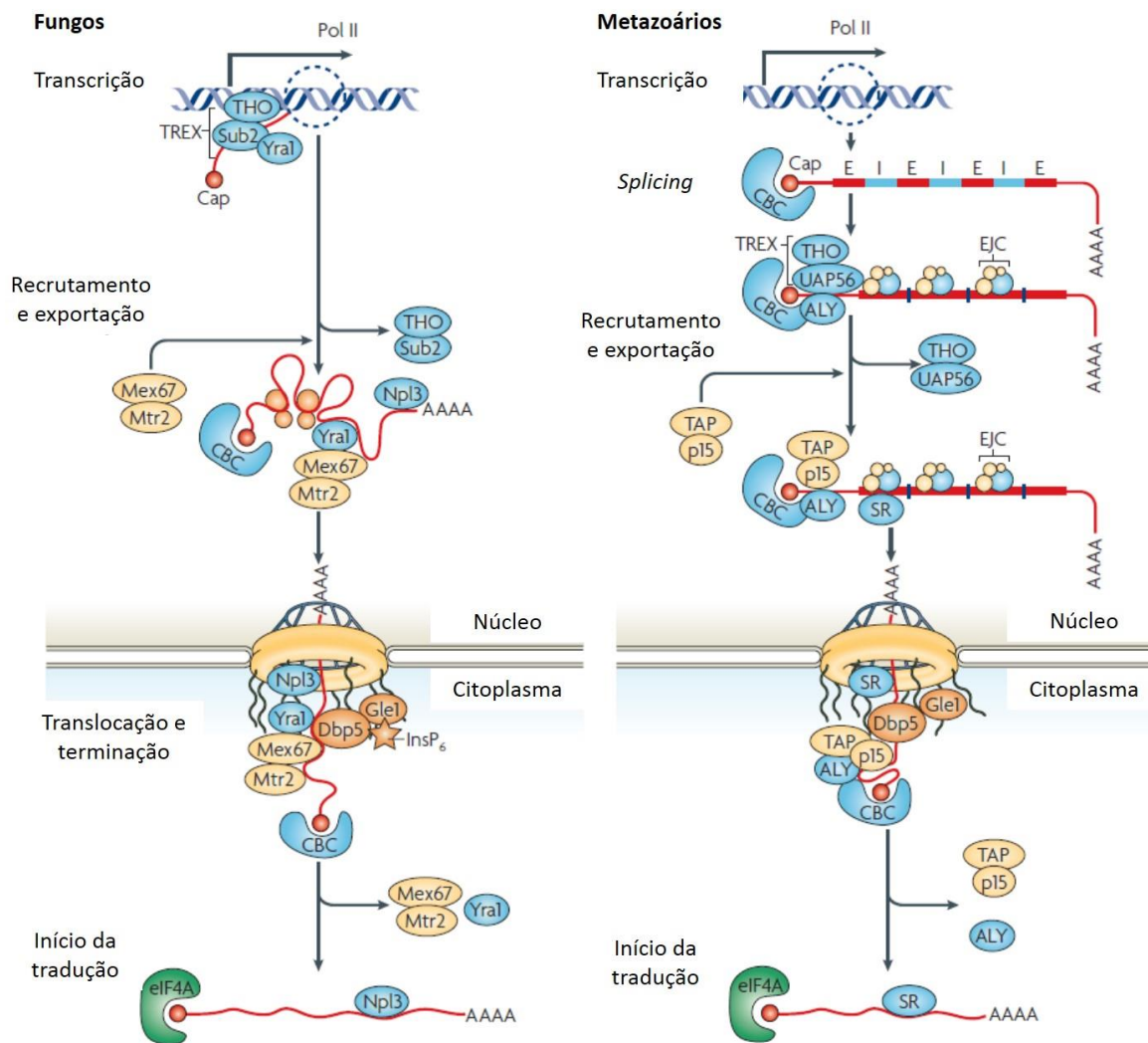


FIGURA 9. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS VIAS DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM FUNGOS E METAZOÁRIOS. Adaptado de KÖHLER E HURT, 2007

A RNA helicase Sub2 (UAP56 / DDX39B) desempenha vários papéis no complexo TREX e tem funções conservadas na exportação de mRNA. Ela se liga progressivamente ao mRNA recém-transcrito, promovendo a montagem do spliceossomo junto com U2AF65 e é essencial no processo de *splicing* do pré-mRNA (Revisto por CLAYTON, 2019). A montagem de TREX requer ATP, e das proteínas presentes no complexo de transcrição/exportação, quatro são conhecidas por interagir com o receptor de exportação Nxf1/Mex67, sendo elas: Aly, Thoc5, Hpr1 e FOP (VIPHAKONE *et al.*, 2012).

Tripanossomatídeos possuem um ortólogo para a proteína Sub2 do complexo TREX (Tabela 1). Esta RNA helicase tem localização nuclear em *Trypanosoma cruzi*

e *Trypanosoma brucei*, e o *knockdown* de TbSub2 causa morte celular 48 horas após a indução por tetraciclina do sistema de RNA de interferência e acúmulo de mRNA no núcleo celular, indícios de uma função essencial na exportação de mRNA (Serpeloni *et al.*, 2011b). No entanto, é improvável que estes organismos possuam um complexo TREX convencional, uma vez que os ortólogos para todas as outras subunidades TREX (Yra1, Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2 e Tex1) estão ausentes (Revisto por KRAMER, 2021)

TABELA 1. CORE PROTEICO DO COMPLEXO TREX

Sub complexo	Levedura	Humano	<i>T. brucei</i>
	Sub2	UAP56/DDX39B	Sub2 (Tb927.10.540)
	Yra1	ALYREF/THOC4	-
THO	Hpr1	THOC1	-
THO	Tho2	THOC2	-
THO	Tex1	THOC3	-
THO	Mft1	-	-
THO	Thp2	-	-

Apenas os componentes do complexo TREX de *S. cerevisiae* estão listados com os respectivos homólogos humanos; as subunidades TREX exclusivas para humanos não estão listadas. E os componentes específicos do complexo TREX de leveduras, Gbp2 e Hrb1, não estão incluídas nesta tabela. Adaptado KRAMER, 2021

1.2.2.2. Complexo de Junção Éxon (EJC)

O complexo EJC é composto por três fatores invariáveis (eIF4AIII, Y14 e Magoh) e diversas proteínas de interação que variam dependendo do contexto celular e da etapa da expressão gênica (SCHLAUTMANN E GEHRING, 2020).

O EJC funciona como um acoplador molecular entre *splicing*, exportação, localização citoplasmática e tradução do mRNA (FIGURA 10), garantindo também a alta fidelidade da expressão gênica, auxiliando na identificação e eliminação rápida de mRNAs mal processados pela via de degradação *nonsense-mediated decay* (NMD).

O complexo EJC se liga ao mRNA em locais específicos, independente da sequência, aproximadamente 20-24 nucleotídeos a montante da junção éxon-éxon durante o *splicing* do pré-mRNA (revisito por WOODWARD *et al.*, 2017).

O complexo também desempenha um importante papel no recrutamento do complexo TREX interagindo diretamente com inúmeros componentes, incluindo a RNA helicase Sub2 (UAP56) componente do complexo TREX (revisito por KRAMER, 2021)

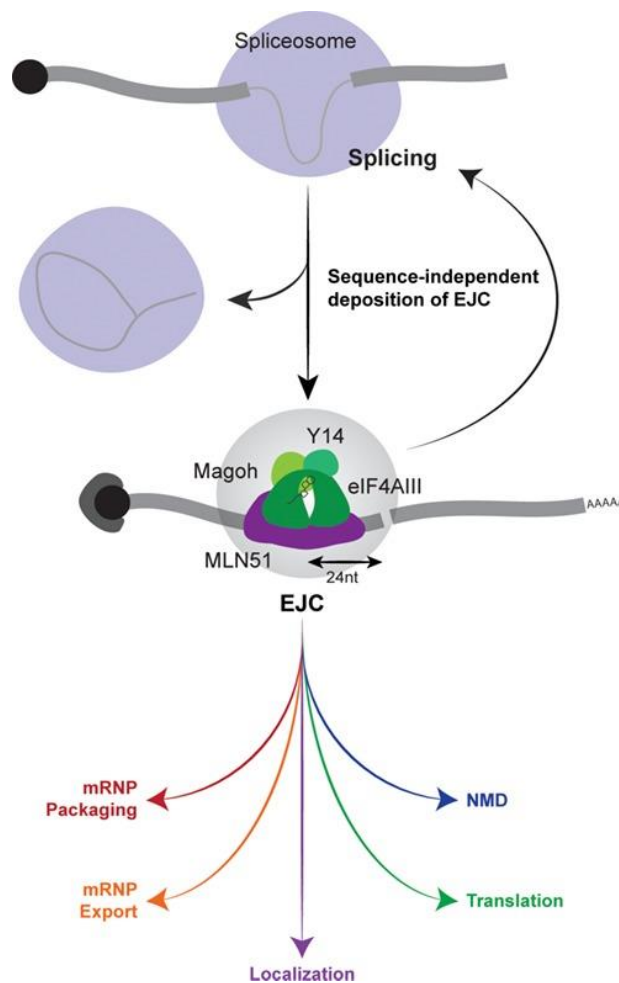


FIGURA 10. COMPLEXO DE JUNÇÃO ÉXON. As subunidades do EJC são recrutadas co-transcricionalmente para o spliceossomo ativado. Muitos fatores são depositados de maneira dependente do *splicing* (indicado pelo círculo cinza ao redor do EJC). Alguns destes fatores são removidos antes da exportação, enquanto outros permanecem ligados ao mRNA acoplando o *splicing* do pré-mRNA a processos pós-transcricionais como exportação, localização, tradução e degradação do mRNA. Adaptado WOODWARD *et al.*, 2017.

Tripanossomatídeos possuem órtologos putativos para os três principais componentes do complexo EJC (eIF4AIII, Magoh e Y14) (BANNERMAN *et al.*, 2018). Os dados disponíveis até o momento fornecem evidências da presença de um EJC em tripanossomatídeos, mas sua composição e função permanecem obscuras (KRAMER, 2021).

Atualmente não se sabe o local exato no qual o EJC de tripanossomatídeos é depositado no pré-mRNA. Entretanto, se for depositado no SL na extremidade 5'-UTR de cada mRNA após o *trans-splicing*, seria um excelente marcador para mRNAs recém-processados (CLAYTON, 2019), uma vez que a exportação de mRNA em tripanossomatídeos pode começar logo após a síntese da extremidade 3' do pré-mRNA (GOOS *et al.*, 2018).

A análise filogenética, realizada pelo nosso grupo, mostrou que a proteína, com número de identificação TcCLB.506587.40, é ortóloga de eIF4AIII em metazoários e Fal1 em *S. cerevisiae* (INOUE *et al.*, submetido). eIF4AIII é um componente central do EJC com múltiplas funções no metabolismo do mRNA (SERPELONI *et al.*, 2011a) e Fal1 está envolvida na biogênese da subunidade ribossômica 40S (KATOKA *et al.*, 2000).

1.2.2.3. Complexo TREX-2

TREX-2 é um complexo multiproteico composto pelos fatores Sac3, Thp1, Cdc31, Sem1 e duas cópias de Sus1 (STEWART, 2019). É encontrado principalmente na face nuclear do CPN onde interage, via Sac3, com o receptor de exportação Mex67-Mtr2 (Nxf1-NXT1). Assim como o complexo TREX, TREX-2 possui múltiplos papéis no metabolismo do mRNA nuclear, atuando desde a regulação da transcrição até a exportação de mRNA. (Revisto por KRAMER, 2021). Este complexo facilita a transferência dos mRNPs do interior do núcleo para o complexo de poro nuclear (FIGURA 11). Em leveduras, TREX-2, regula diversos processos associados a cromatina (SCHUBERT E KÖHLER, 2016; VALKOV *et al.*, 2014)

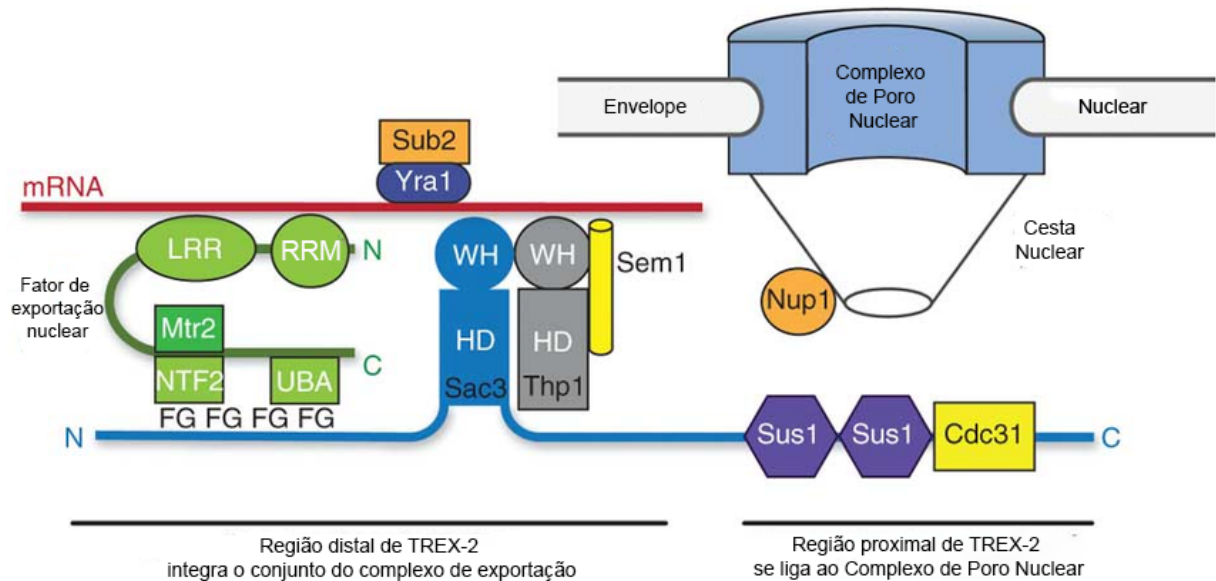


FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE COMO O COMPLEXO TREX-2 INTEGRA A FORMAÇÃO DE UM mRNP COMPETENTE PARA EXPORTAÇÃO PELO CPN. A região proximal de Sac3 à qual Sus1 e Cdc31 estão ligados se liga a componentes da cesta nuclear, como Nup1, enquanto a região distal que contém os domínios de Sac3 e Thp1 se liga ao mRNA, ao qual Yra1-Sub2 também está ligado. O fator de exportação nuclear Mex67 – Mtr2 se liga às repetições FG na região distal de Sac3, provavelmente por meio de seus domínios NTF2 e UBA os quais interagem com as repetições FG das nucleoporinas. Esta interação traz os domínios LRR e RRM de Mex67 perto do mRNA, facilitando a remodelação mediada por Sub2 gerando um mRNP competente para exportação. Adaptado ELLISDON *et al.*, 2012.

1.2.2.4. *Mex67-Mtr2: Principal receptor de exportação de mRNA*

O heterodímero Mex67-Mtr2 (também conhecido como Nxf1-NXT1 ou TAP-p15 em metazoários) é o principal complexo de exportação de mRNA, conservado na maioria dos eucariotos (Segref *et al.*, 1997; Katahira *et al.*, 1999).

Mex67 possui uma estrutura modular (FIGURA 12) que inclui um motivo rico em arginina (RBD – *RNA Binding Motif*), presente na extremidade N-terminal, responsável por reconhecer e se ligar ao RNA, este motivo tem um papel essencial no transporte núcleo-citoplasmático de mRNA, e se torna acessível para a ligação ao RNA por uma mudança conformacional induzida pela ligação ao complexo TREX (revisto por KRAMER, 2021; VIPHAKONE *et al.*, 2012;) (FIGURA 13). Também possui um motivo de reconhecimento de RNA (RRM – *RNA Recognition Motif*), e

uma região rica em leucina (LRR – *Leucine Rich Repeat Domain*), ambos estão envolvidos na exportação de RNA, principalmente por ligação a proteínas da família SR (proteínas ricas em arginina-serina). Também possui um domínio semelhante ao fator de transporte nuclear 2 (NTF2L – *Nuclear Transport Factor 2 Like*) e um domínio C-terminal associado à ubiquitina (UBA – *Ubiquitin Associated Domain*).

Dois aspectos são fundamentais para o receptor de exportação: o reconhecimento da carga e a capacidade de reconhecer as sequências em tandem de fenilalanina-glicina presentes nas Nups-FG do complexo de poro nuclear. Os domínios RBD, RRM, LRR são capazes de se ligar ao RNA, enquanto os domínios NTF2L e UBA são capazes de reconhecer e interagir com as Nups-FG (Revisto por XIE E REN, 2019). A proteína parceira, NXT1 ou p15 (Mtr2), também exibe um domínio semelhante a NTF2 o qual se liga ao domínio NTF2L presente em Nxf1 (Mex67) (Revisto por XIE E REN, 2019 KRAMER, 2020)



FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RECEPTOR DE EXPORTAÇÃO Nxf1. (também conhecido como TAP ou Mex67 em leveduras). Retirado de VIPHAKONE *et al.*, 2012.

Nxf1 (TAP ou Mex67) se liga ao RNA através do domínio RBD. Uma vez montado no complexo ribonucleoproteico mensageiro (mRNP), TREX tem a capacidade de liberar o domínio de ligação ao RNA de Nxf1 (TAP ou Mex67) permitindo a associação do receptor com o mRNA (FIGURA 13), que subsequentemente conduz o seu transporte pelo complexo do poro nuclear. Assim, TREX age sinalizado à célula quando o mRNA foi processado e está adequado para a exportação (VIPHAKONE *et al.*, 2012).

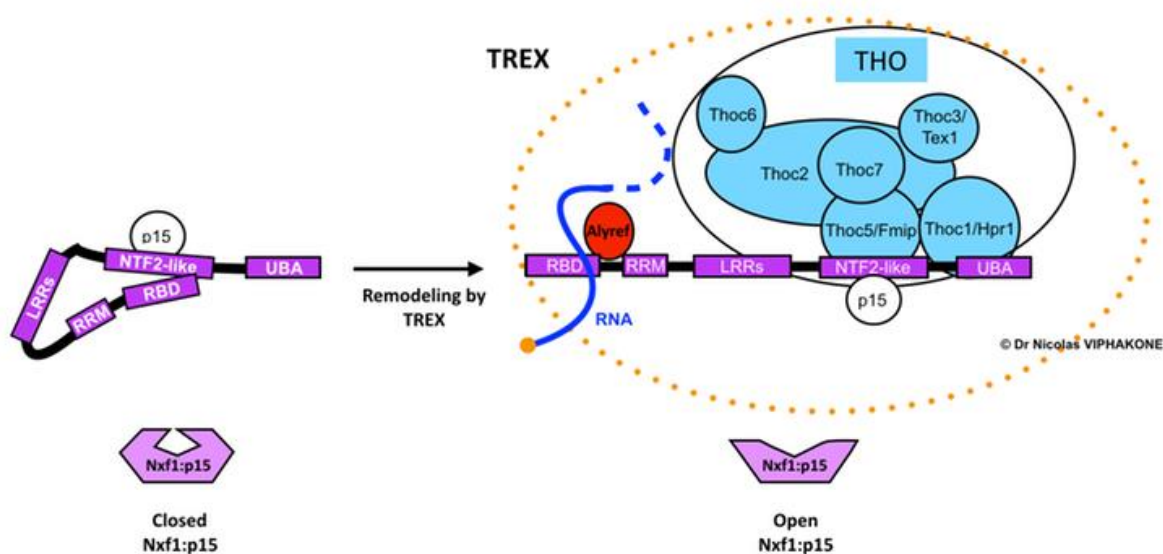


FIGURA 13. MODELO ESQUEMÁTICO DA MUDANÇA CONFORMACIONAL DE NXF1/MEX67, INDUZIDA POR TREX PARA A EXPORTAÇÃO DE mRNA. Interação com p15 promove um dobramento de NXF1 fazendo com que seu domínio RBD se ligue ao domínio NTF2-like. Durante a exportação de mRNA, TREX é montado e permite que as duas subunidades Alyref e Thoc5 remodelam NXF1/Mex67 para expor seu domínio de ligação ao RNA, permitindo a interação direta entre NXF1/Mex67 e mRNA durante a exportação. Por razões de clareza nem todas as subunidades de TREX estão ilustrados na figura (Adaptado de VIPHAKONE *et al.*, 2012).

Mex67 e Mtr2 de *Trypanosoma brucei* (TbMex67 e TbMtr2, respectivamente), também desempenham um importante papel na exportação de mRNA (DOSTALOVA *et al.*, 2013). TbMex67 se associa a diversas proteínas de complexo de poro nuclear (OBADO *et al.*, 2016). Embora contenha um domínio rico em leucina (LRR) e um domínio semelhante a NTF2, como seus ortólogos, a estrutura de TbMex67 é incomum (FIGURA 14), uma vez que possui em sua extremidade N-terminal um motivo dedo de zinco (CCCH) ao invés de um domínio de reconhecimento de RNA (RRM), também parece lhe faltar ou possuir um domínio pobremente conservado associado à ubiquitina (UBA). O motivo dedo de zinco mostrou ser essencial na exportação de mRNA (Revisto por RINK E WILLIAMS, 2019; OBADO *et al.*, 2016; DOSTALOVA *et al.*, 2013).



FIGURA 14. DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE TbMex67 E SUAS ORTÓLOGAS. A organização do domínio estrutural de ortólogos Mex67 da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal (domínios não mostrados em escala). ScMex67 (Mex67 de *S. cerevisiae*; HuNXF1 (NXF1 de humano). RINK E WILLIAMS, 2019

2. JUSTIFICATIVA

Os eventos pós-transcricionais são pontos majoritários para a regulação da expressão gênica em Tripanossomatídeos, dos quais os mecanismos que alteram a meia vida do RNA e a tradução são bastante estudados (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; ARAÚJO E TEIXEIRA, 2011). Entretanto, o transporte núcleo-citoplasmático do mRNA ainda não é bem compreendido nestes organismos. Portanto, estudos relacionados com a via de exportação de mRNA pode trazer informações relevantes sobre componentes peculiares e essenciais para a sobrevivência destes parasitas, e como estes componentes estariam associados a regulação da expressão gênica.

Serpeloni e colaboradores (2011a) demonstraram através de análises *in silico* que a via de exportação de mRNA é a menos conservada dentre as vias de transporte dos vários tipos de RNA. Quando comparadas a outros eucariotos, as proteínas envolvidas com a exportação de mRNA são muito pouco conservadas em diversas espécies de parasitas. Nosso grupo também descreveu duas proteínas conservadas, envolvidas no transporte núcleo-citoplasmático de mRNA no parasita *Trypanosoma cruzi*. Uma delas, TcSub2, foi descrito por Serpeloni e colaboradores (2011b) e trata-se de uma proteína nuclear que está associada a sítios de transcrição. O silenciamento gênico do ortólogo em *T. brucei* causa um bloqueio na exportação de mRNA e morte do parasita em 48 horas após a indução do sistema de RNAi. A outra proteína descrita é TcelF4AIII (anteriormente chamada de TcHel45). Proteína esta, que possui uma localização citoplasmática e tem a capacidade de migrar entre o núcleo e o citoplasma (INOUE *et al.*, 2014).

Nosso grupo tem investido em abordagens de genética reversa e proteômica para identificar componentes essenciais e exclusivos de tripanossomatídeos envolvidos com a via de exportação de mRNA. Ensaios de imunoprecipitação de complexos de proteínas acoplados à espectrometria de massas permitiram a identificação de componentes exclusivos de tripanossomatídeos associados aos complexos de TcSub2 e TcelF4AIII (INOUE, 2015). Neste trabalho foram identificados quatro fatores exclusivos de cinetoplastídeos, anotados como proteínas hipotéticas no banco de dados, e presentes como os mais abundantes nos complexos proteicos de TcSub2 e TcelF4AIII.

Ferramentas para busca de domínios funcionais conseguiram prever domínios em três dessas quatro proteínas hipotéticas exclusivas de tripanossomatídeos. Uma delas possui o domínio FOP, presente na proteína FOP/CHTOP que é descrita como um fator que interage com Sub2/UAP56 em mamíferos (TENG *et al.*, 2013). A segunda proteína possui um domínio API5 (*Apoptosis Inhibitor 5*), que está presente em proteínas com função anti-apoptótica e superexpressa em células cancerígenas (HAN *et al.*, 2012). Em *Oriza sativa*, foi demonstrado que API5 interage com Sub2/UAP56 (LI *et al.*, 2011) e, em *Drosophila*, interage com Acinus (EJC) (RIGOU *et al.*, 2009). Recentemente, Bong e colaboradores (2020) demonstraram que, em mamíferos, API5 interage diretamente com UAP56 (Sub2) e sua depleção causa acúmulo de mRNA no núcleo celular. A terceira proteína analisada contém um domínio NTF2, presente em diversos receptores de transporte capazes de interagir com o complexo de poro nuclear permitindo a exportação núcleocitoplasmática, como por exemplo, Mex67, MTR2 e a proteína NTF2 (FRIBOURG *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2007). A quarta proteína escolhida não mostrou nenhum domínio conservado pelas abordagens utilizadas. No entanto, ela aparece como componente de ambos os complexos proteicos de TcSub2 e TceIF4AIII.

Com base nessas informações e por questão didática, as proteínas foram denominadas em *T. cruzi* como TcFOP, TcAPI5, TcNTF2LL e TcHYP e são foco de estudo deste trabalho que buscou investigar o papel destas proteínas, assim como, ampliar os dados sobre as interações entre os componentes da via. Com isso, visionamos obter dados relevantes para entender as peculiaridades sobre os mecanismos de exportação de mRNA que podem servir de base para melhor conhecimento desta etapa na regulação da expressão gênica nestes organismos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a função de proteínas exclusivas de kinetoplastídeos quanto ao seu papel na exportação de RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma. Analisar os componentes dos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP para a construção de um “*core*” proteico responsável pela exportação de mRNA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Realizar a análise *in silico* da conservação
 - 3.2.1.1. Busca por domínios conservados
 - 3.2.1.2. Análise de similaridade
 - 3.2.1.3. Análise Filogenética
- 3.2.2. Avaliar a localização celular
 - 3.2.2.1. Clonagem em vetor de entrada da plataforma Gateway® (INVITROGEN)
 - 3.2.2.2. Clonagem em vetor de destino pDEST™17 (INVITROGEN)
 - 3.2.2.3. Obtenção de linhagens de parasitas expressando as proteínas alvo fusionadas à etiqueta GFP na extremidade N-terminal e/ou C-terminal
 - 3.2.2.4. Análises de localização por microscopia de fluorescência e confocal
- 3.2.3. Analisar a interação das proteínas alvo com outros componentes da via de exportação de mRNA
 - 3.2.3.1. Imunoprecipitação dos complexos proteicos
 - 3.2.3.2. Análise dos dados por espectrometria de massas
- 3.2.4. Analisar o fenótipo causado pelo silenciamento das proteínas em *T. brucei* por RNA de interferência (RNAi)
 - 3.2.4.1. Obtenção de linhagem de *T. brucei* para silenciamento da expressão gênica pelo sistema de RNAi
 - 3.2.4.2. Analisar a viabilidade e a efetividade do silenciamento gênico
 - 3.2.4.3. Analisar a localização de mRNA após silenciamento gênico
 - 3.2.4.4. Analisar possíveis alterações ultraestruturais após silenciamento gênico

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANÁLISES *IN SILICO*

Para a busca de sequências foi utilizado o programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997). As buscas foram feitas contra o banco de dados *Reference Sequence - RefSeq* (O'Leary *et al.*, 2016) do *National Center of Biotechnology Information - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As proteínas ortólogas foram identificadas através do critério de *reciprocal best hit* (RBH). O alinhamento das múltiplas sequências ortólogas foi realizado utilizando o programa MUSCLE (Edgar *et al.*, 2004). Os domínios das proteínas foram identificados através do programa hmmscan do pacote HMMER (Eddy, 1998), usando modelos ocultos de Markov (*Hidden Markov Models - HMM*) disponíveis no banco de dados do Pfam, versão 32.0 (Finn *et al.*, 2014).

4.1.1. Análise Filogenética

As sequências de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L (cepa *Trypanosoma cruzi* CL Brener *Non-Esmeraldo-like*) foram obtidas no TriTrypDB versão 33 e usadas como “isca” para BLASTp utilizando banco de dados contendo 121 proteomas eucarióticos, com *e-value* de 0,1. Todos os *hits* identificados foram sujeitos ao BLASTp reverso usando o *e-value* de 0,1 como referência. A ortologia também foi prevista com base no *reciprocal best hit* (RBH).

Para TcAPI5, TcFOP e TcNTF2L resultados adicionais foram identificados usando sequências obtidas de *Bodo saltans* e *Dictyostelium purpureum*. Sequências ortólogas preditas foram alinhadas usando MUSCLE (EDDY, 2004), com triagem manual em ambas as árvores filogenéticas ML e BA foram construídas usando PhyML (GUINDON *et al.*, 2014) e MrBayes (RONQUIST *et al.*, 2012), respectivamente. PhyML 3.0 foi usado com configurações padrão e um bootstrap de 1000 e MrBayes 3.2.6 foi usado com uma geração MCMC de 800000, variação de taxa de forma com 4 categorias discretas e uma frequência de amostragem de 1000 com o primeiro trimestre como *burn-in*. Árvores MrBayes foram executadas usando a

plataforma CIPRES *Science Gateway* (MILLER, PFEIFFER E SCHWARTZ, 2010). As proteínas foram identificadas pelo número de acesso no banco de dados Trityp ((ASLETT *et al.*,2010). Domínios de proteína foram pesquisados usando InterProscan (JONES *et al.*, 2014) ou HMMscan de HMMER (EDDY, 1998) procurando por modelos de Markov ocultos (HMM) disponíveis no banco de dados Pfam versão 27.0 (FINN *et al.*,2014).

As proteínas ortólogas para TcHYP também foram identificadas por critérios RBH e avaliação sintênica. Um total de 108 posições com alinhamento mais confiável obtido pelo PSI-coffee (CHANG, TOMMASO E NOTREDAME, 2012) compuseram o conjunto de dados final. A árvore foi feita usando a seqüência *Bodo saltans*. A árvore evolutiva de ortólogos de TcHYP foi inferida usando o método de Análise Bayesiana (BA) (modelo misto + invgamma) usando MrBayes 3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012). O Markov Chain Monte Carlo (MCMC) da BA foi executado por 1.000.000 de gerações, amostrando árvores a cada 1.000 gerações. Uma árvore ML (JTT + F + G + I) também foi inferida usando MegaX (KUMAR *et al.*, 2018) com bootstrap de 1000 réplicas.

4.2. TAMPÕES E SOLUÇÕES

AP Buffer (tampão de reação para fosfatase alcalina): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

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

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

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

Solução para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: Azul de comassie R-250 0,1% em metanol/ácido acético v/v (45%:10%); água 45%.

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

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

Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x: Azul de bromofenol 0,25% xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

Tampão de amostra de proteínas: Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, β -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%.

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na_2HPO_4 0,74 mM.

Tampão de purificação de proteínas: TRITON X-100 2%, Na_2HPO_4 100 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl pH 8,0 10 mM, Uréia 2 M.

Tampão de sonicação de proteínas: NaCl 500 mM, TRITON X-100 2%, Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

Tampão de suspensão de proteínas: Na_2HPO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Uréia 8 M pH 8,0.

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

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

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

Tampão PBS - solução de uso (*Phosphate-buffer saline*): KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM; NaCl 137 mM.

Solução de Fenol - clorofórmio - álcool isoamílico: Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes.

4.3. CULTIVO DE CÉLULAS

4.3.1. *Escherichia coli*

Genótipo BL21(DE3): {pLysSTM {F- *ompT hsdSB* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)}.

Genótipo DH5 α TM: {F- *recA1 endA1 hsdR17* (rk^- , mk^+) *supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*}.

Genótipo *ccdB* resistente: (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG* *tonA::PtrcccdA*);

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (ver item 4.4.1) a 37 °C durante 16 horas. Para a estocagem, células foram misturadas em igual volume (1:1) de glicerol 100% e mantidas a -70 °C em ultrafreezer.

4.3.2. *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone *Dm28c* (CONTRERAS *et al.*, 1988) foram mantidas em culturas axênicas em meio LIT (LIT - *liver infusion tryptose*) (ver item 4.4.2) a 28°C e passagens a cada três dias com inóculo de 10⁶ células/mL.

4.3.3. *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* cepa 427 (CROSS E MANNING, 1973) foram mantidas em cultura axênica em meio SDM-79 (ver item 4.4.3) suplementado com 10% de soro fetal bovino (BRUN E SCHONENBERGER, 1979), à 28°C e passagens a cada três dias com inóculo de 10⁶ células/ml. Para a linhagem de *T. brucei* 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1999), o meio foi suplementado também com antibióticos Higromicina 50 µg/ml e G418 15 µg/ml. Esta linhagem celular expressa o repressor da tetraciclina e a T7 RNA polimerase para utilização em ensaios de RNA de interferência.

4.4. MEIOS DE CULTURA

4.4.1. Meio LB (*Luria – Bertani*)

Bacto-triptona.....	10,0 g/L
NaCl.....	5,0 g/L
Extrato de levedura.....	5,0 g/L

(LB-ágar): adição de 1,5% de agar-ágar.

4.4.2. Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

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

4.4.3. Meio SDM-79

MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	7,00 g/L
Meio 199	2,00 g/L
MOPS	5,00 g/L
Hepes	8,00 g/L
Glicose.....	1,00 g/L
NaHCO ₃	2,00 g/L
Piruvato de Sódio	0,10 g/L
L-Alanina	0,20 g/L
L-Arginina	0,10 g/L
L-Glutamina	0,30 g/L
L- Metionina	0,07 g/L
L-Fenilalanina	0,08 g/L
L-Prolina	0,60 g/L
L-Serina	0,60 g/L
Taurina	0,18 g/L
L-Treonina	0,35 g/L
Adenosina	0,10 g/L
Guanosina	0,01 g/L
Glucosamina	0,05 g/L
MEM <i>amino acids solution</i> , 50X	10 mL
MEM <i>non essential amino acids</i> 100X	6 mL
Penicilina	0,059 g/L
Streptomicina.....	0,133 g/L
Ácido Fólico	0,004 g/L
PABA (ácido para-aminobenzóico)	0,002 g/L
Biotina	0,002 g/L

4.5. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E PROTEÍNAS

4.5.1. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose conforme descrito em Sambrook e Russel (2001). As amostras de DNA foram diluídas na proporção 1:5 em tampão de amostra para eletroforese de DNA e aplicadas em gel de agarose 0,8-1% submerso em tampão TBE (TBE 1X – Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0). Para cada gel, era aplicado 150 ng de marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)*.

A corrida eletroforética foi realizada a 90 V e, em seguida, o DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (brometo de etídio 0,5 µg/ml em água destilada) e visualizado em transluminador acoplado ao sistema de foto documentação.

4.5.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por gel vertical desnaturante SDS-PAGE, conforme o descrito por Laemmli (1970). Os volumes das soluções utilizadas para montagem dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. SOLUÇÕES E VOLUMES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE

	Gel de empilhamento	Gel de corrida		
		10%	13%	15%
	5%	10%	13%	15%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	2,95 ml	3,8 ml	4,4 ml
Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM)	-	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml
Tris-HCl 1M pH 6,8 (concentração final 120 mM)	0,6 ml	-	-	-
H2O ultra pura	3,7 ml	5,5 ml	4,6 ml	4,0 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%)	35 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

4.5.2.1. *Coloração por Azul de Coomassie*

Os géis SDS-PAGE, após corrida eletroforética das amostras, foram corados em solução para coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%) por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, os géis foram lavados com água destilada fervida para a retirada do corante e análise das proteínas.

4.5.2.2. *Coloração Nitrato de Prata (OAKLEY, KIRSCH E MORRIS, 1980)*

Para coloração de maior sensibilidade em géis SDS-PAGE, alternativamente, foi utilizada a marcação por nitrato de prata. Para isso, o gel foi incubado em solução de fixação de SDS-PAGE (Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%) por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, lavado 3 vezes com solução de Etanol 50%. Posteriormente, o gel foi incubado com solução de sensibilização para coloração por prata (Tiosulfato de Sódio 0,02% em água ultrapura) por 2 minutos, lavado com água ultrapura por 3 vezes e incubado com solução de coloração por prata (Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%) por 30 minutos. Após lavagem com água, a revelação foi realizada com solução de revelação de prata (para 100 ml: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização).

A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (Etanol 50%; Ácido Acético 12%).

4.6. CLONAGEM MOLECULAR DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

4.6.1. Extração de DNA genômico

4.6.1.1. *T. cruzi* Dm28c e *T. brucei* 427

As extrações de DNA de *T. cruzi* clone Dm 28c e *T. brucei* 427 foram realizadas como descrito em Medina-Acosta & Cross (1993). O total de 1×10^{10} células cultivadas em meio LIT ou SDM-79 foram separadas por centrifugação a $7.000 \times g$ por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS, suspensas em $350 \mu\text{L}$ de tampão TELT (Solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e TRITON X-100 4%) e incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após lise, o mesmo volume de solução de fenol/clorofórmio foi adicionado e o material foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 10 min. A fração aquosa foi coletada para um novo tubo e o DNA foi precipitado com duas vezes o volume de etanol absoluto. O material foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 10 minutos e o DNA foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em tampão TE.

4.6.2. Amplificação gênica por PCR

A amplificação dos genes de TcFOP (TcCLB.509033.80) e TcAPI5 (TcCLB.511807.280), TcNTF2L (TcCLB.511367.220) e TcHYP (TcCLB.506435.150) foi obtida através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA genômico de *T. cruzi* e oligonucleotídeos iniciadores específicos. As reações para TcFOP e TcAPI5 foram obtidas previamente (DOMINGUES, 2017). A figura 15 ilustra as regiões utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região genômica codificante de cada uma das proteínas.

TcFOP

5' **ATGCCGACGTGGCGATTTTGAG**CGTCGGCGCCTTCGTGATTTGTACGAGCGGAATGTGCGCCGGGTGCGGGCTTTGGCGGATGCGCGAG
ATGGGGCAAGGTCCTGGCAGGGACGATGATATTGCGGCTCCCGCCGCTTATGTCGTGTCAGCGAGCGTCAACTCGCCTCGAAGGGTTTGGCC
GTGGTGGCTACCAAGTGACGGGTACGCGCGTTTGGCCGCGATCCAAGGATCCGTCGGTTCAGCGACAGGGGGCTTTACCGCTCGCGGTG
CCCTGGACCGCTTTGAACGCGAGGAGGACTTTGAGCGGAAGCTGCGTGTGACGCTTTCCGTGAACGCGCTTTAATGAGGGCGGACTGC
GGTTCGGTTCGTGCGCCTTCGCGCAGCGAACGACGGGAGCTGCGCCAACCTGCGAGAGCTCCGAGAACTCCGTGAACCTTCGCGCCCTAC
GAAGCGCACAACGAAACCAGGGCAATGGCGATCGGCGCGGCAAGCTAGACAAGGAATTGGATCGCTACAGAAAGGACCAGCGCGGCGGAC
GCAGGGGTGGAGGTGGCCGTGGCCGTGGCGCACCAAAATTCGGTGACGAAGGAAGGACTCGACGGGA**ACTTGACCGCTTCCGCGGCGGCA**
ATTAG 3'

TcAPI5

5' **ATGGCCCCAAAAGAAGAGCG**CTTCTGCTGCTGCTGCGGCAAAAGAGGAGACAGAAGAATGCGTCCCGGCTGAGGTGACAACAACAA
CACCCCCACATCTCCGACAGACTGAATCCTTGCCCTCCGCATGCAACGCTGTGGAGTTGTACGCAACCCCTCAGGCAGCTTTTCGGAGG
ATCCTGCAAGCTGAATGATTTGTGCGGAATTACTCCAGGCGCTGAGCGATGCGGAGTGCCCGGATGCACCCCTTCTGGTCCGTGTGC
GTACCCTTGAGTTTATTAGCAAATACGGACAGCATGTACGTGACGGCAATGCTCTTAAAAAGATTGTTACATCTCTTGTAAAAATATTGA
GTGGCTCAGAGGACACGCGCAGCTTCTGTGGCTGCTGTTACAGGGCTTTTCATCGCTAGGGCTGTCTCTGTACTGGACAAGAAGTGGG
AATATTTGTCCCGCAGGGGGCAGATGTTCTCATGCGGTAATGTTGGACGAAGAGGATTTGCGGAAAGTGTGCGTCAAGCCGCTTCCA
AGGCGTTGGACTCCCTCATTACAGCCGATTTTCGTCCCGTTGTGACGAAGCTGTACACTGGATAAGCGACAATCGTGAGACGGAGGACG
AAGATCAACTGAAGAAGGAGCGGCGCATGGCTCTGACGCGACTGAGGAAGCTGGCGCACACACCGTCCCTGCAGTGCCAGTGACGGAGG
AGGTTCAGGAACATGCTTTGAGCCTCATTGTTCTGTGTCTTCCAACGGTCACTGTGACGGAATTTGTGCAACTCAGGACATTTGCTGCAT
CATTGCGGATGATGACGACAGGCGGGAGTGCTTTCTCAAGCGCTTTTGGCGCAAAATGCAATCAACACTGACCTGCTGTGTGGAGT
CCCTAAGTATTATTGGAGGACATATTGGCGCCGACCGTACGACATTTGTTCCGTTCTTGAGGATGCAGGGCTTCTTACAACACTGTTG
AGAAGAATACCGCAGGGGATGTGGCAGCGAAGGTGTTGTTGCTGGCTGCTCGACTTGCCACTCCTGATAACATTGATAAATTGTACA
ATGCGGTGTTGGAACAGCTGGCGCATGTATGATGATGGAGTGGTTCGCGGAGAATATGACGACTCTCGAGGTGCTACTCTTTGCCG
TTATGGGGCAGGACAAAAAAACCAGTTGAGATGTTGAAGTATTTGAATGATGATGCGTTTCGTGCGAAGTGCATGGGTCTGGAGGAGC
TCGTGCGCCAGATGGAACCACTCCTGATTTACGCCGTTAAGAAACGGATGCAGAAGTCAATCGCGGGGCCAAAAGGATGCGGGAGGTAATTG
GATGCTGCCATAACGTGCGAGTCATCTTGAGCGCTTCTCCGCCAAAACACATGCCACTGGTACCCTCACGGAGAGTTGGCTCCACAAGA
ATAAGTTGCCAAGTGTGAAACACGCCCGCAGCCAGCAGCAGCGCAAAGGCAACAGAGACTACAGCGGGAATTTGCTGGGGCCCGCCCGC
GACATTTGGGTGTGCTGCGCCCTCCCCCTGGCAGGAGGAACATGCTAAGAAAAGGTCCTGTTGTCAGGAGTCCCGTTACAACAAGAATG
CTAACAGGAATAAGGGTGGTTGGAATGGCAACGGCCGTACAA**GAGAGCACGTCGTGGCGGAGTCTACTAA**3'

TcNTF2L

5' **ATGTTGGGTCGTGACACTGTTGCCG**GGGTTGCTGTAGCTTTCTCGTACTTACTACCGTGAGTTTGTAAAGGAGAAGGAGGTGCTTG
GCTTTGTCGAGCTCTACGGGAGTCCCTCGCTGATCACATACGCGGGTACAATGAGGAGACCACCGTCTGTCGCGCAGGGCCGGCACGAGA
TTGCGCAGCATCTCGGCAAGATGGACGATGCGCTTGGCCGCGCAAGTGGAGGTGCGCTTTGCCGACTTTACCCCGCTGCCAGGTGGGT
GTATCCACATTTGTTGCCAGGGCATCTTGTACTTCCGCGCCAGCGCAGGGCTTCTTCCAGGTGTTTGTGTTGGCCCCGACGAGTACC
GCACCAACACGTACCACATCGCCATCGACTACTTTCGTGTGATGGTGGTTCGAGGTGGAACAGATCCCGGAGGACAGCATCATGACCC
CGCGCAGGTTGCACAACATCTGCTGGAGGAACACGAGCAGCGCCGCAAGCGCATGGAGGAGTCCGCTGAGCAGCTTCGGCGCAACAAGCGG
CCGCGGAGGCCCTTCGGTGCAGCAATTGGAGGAGGCGGCGGACGGAAGGAATTCACCAGACAGTGGGGAACAGGAGCCCGTCTATG
GGCGTCATGAGCGTCAAACAACGGCACCCGCAACGAGCGCTATGGAACAATACAAGCAACCGCAGGGATCGCGTGGAAATGGAATGACG
ACAGGCGGGGAGACCGAACAGATACGCGGACTCTCATTGCAATGAAGGGAGCGTCAGCCGAAACAACCGGCTGAGCGTGGCGAGCGAA
ACAATGCGAGGTACGATGAGCGAAATGAAAGAAACGGTGAACCCGTTGGGAACGTCACGATGGCATGCGTGGGGAGAGGAACGACAACG
TGAGGGCCCGCAGCAGAGGGGCGTATTGGAGGAGGACCTGCGCCACAAAACACAGTCCCTTGGCTCACGCGAGCAGCAAGCACGG
CAGTCCGCAAAATCAGAAAATGGCGGCAGCAAAACCAGCATCGCCAGACTGTTCCACGCTCAAAGGCCGCTGGAGAAACGCTTTGAGG
GCAGGGCCGAAATGAGGAAAATAACATCAATAACAGGAATGAGGCTGTCGCTCAAGGCGAGTCTCCGAAGAAGCTGCAAGGAAGGAGG
AAACAAGAAAGAAACACGACGCAACAGCAGCGGCGGCGCTACAGGCAAGGACCGCCGACGGGACCGCCCGAGTTCAACAGAA
CGGGAACACGGATTATGCTCGCCTTGTGAGGGTCCGGAAGTACGTCACGTTGACTGACATAAAGGGCGGCTAACGTCGTCTTGGCG
CGGAGCGATTGATGCATACTGTTACGGCCGAGTAGTGCCGACTGTGTGCTGACGCTACGGTCTCCATGCTGTGGAGCAGCTGGTGC
GAGATTCGCTGACGGTGTGAGTGCAGG**CTGAGTGTGCAAAAGTTCTACCCTAG**3'

TcHYP

5' **ATGGAGATTATCGATAGGCCGCTC**AGTGAACATCAAGGAGCAGAAGATTGGAGAAAGCCGCTGCTAAGAAACGTCGTGGGCACGGCG
GACAGCAGAATACCCGCAACGGTGGGCGGGCACATCCCGCAACGGCCGTGGGAACAGAGCGATGGGGCTGGCAGCCGCGGCACCGCGG
GCAACGATCAGGGACCGCTTATCGCCGCCCTGCGGTTTCGAGCAACGGCGGCGCTTCCGTCGCTTGGAAATGGCTTCGACGACC
GCCGCGCTTCAATTCCCGTTTCTGGCGCCGCAACGCACTGGACTTGGGCGAGCATCGACGCGATCGCTCCGTGAAGAGCACCGCCACCG
AGCGCCGAGGAAGCGGCATTTGAGCGCAACGACCGTGTGAGGAATTCGCTGCGGCTGAGGC**TCTCTCACGTGCCCGGTTCGCGT**
CACGCGATTAG3'

FIGURA 15. REGIÕES UTILIZADAS PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP. As regiões destacadas em amarelo representam a área delimitada para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos, Forward (F) e Reverse (R).

A finalidade da amplificação, as sequências de cada iniciador, e os ciclos específicos de desnaturação, anelamento dos iniciadores e extensão de cada um dos fragmentos gênicos estão apresentadas na tabela 3, a sequência em negrito refere-se à sequência *attB* necessária para posterior reação de recombinação com o vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma *Gateway* (Invitrogen). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8-1%, conforme descrito no item 4.5.1.

TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE ENTRADA pDONR™221 NA PLATAFORMA GATEWAY (INVITROGEN) PARA TcNTF2L e TcHYP

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica	Tamanho do fragmento	Uso	Padrão de ciclagem			
TcNTF2L (GenBank Gene ID: TcCLB.511807.280)	TcNTF2L <i>Foward</i> (F)	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT <u>CATG</u> TTGGGTCGTGACTGTTGCCG3'	1494 pb	amplificação do gene de TcNTF2L	30 ciclos	30 ciclos	94°C	2'
	TcNTF2L <i>Reverse</i> (R)	5' GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTC <u>CTAC</u> GGGTAGAACTTTGCAGCACTCAG3'				Desnaturação	94°C	30''
			Anelamento	58°C		30''		
			Extensão	68°C		1,5'		
TcHYP (GenBank Gene ID: TcCLB.506435.150)	TcHYP <i>Foward</i> (F)	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGATTATCGATAGGCCGCTC 3'	456 pb	Amplificação do gene de TcHYP	30 ciclos	30 ciclos	94°C	2'
	TcHYP <i>Reverse</i> (R)	5' GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATCGCGTGAAAAACGCGACCGGGCACC GGGCACGTGAGAGA3'				Desnaturação	94°C	30''
			Anelamento	57°C		30''		
			Extensão	68°C		45''		

Em negrito destaca-se a sequência *attB* adicionada à extremidade 5' do *primer*, necessária para posterior recombinação em vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway® (Invitrogen)

As reações foram realizadas em volume final de 100 µL contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador F e R, tampão para a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), água ultrapura, e oligonucleotídeos iniciadores segundo o protocolo do fabricante da enzima.”

4.6.3. Clonagem dos fragmentos gênicos na plataforma Gateway® (Invitrogen)

O sistema Gateway® utiliza o sistema lambda de recombinação (Ptashne, 1992) que facilita a transferência de sequências heterólogas de DNA entre vetores (Hartley *et al.*, 2000). Duas reações de recombinação constituem a base da tecnologia.

Na primeira reação, catalisada por BP Clonase™ enzyme mix (Invitrogen), ocorre a recombinação entre os sítios attB1/attB2, inseridos por PCR no *amplicon* a ser clonado, e os sítios attP1/attP2, presentes no vetor de entrada (pDONR™221), gerando um clone de entrada no sistema. Na segunda reação, catalisada por LR Clonase™ enzyme mix (Invitrogen), ocorre a recombinação entre os sítios attL1/attL2 do clone de entrada, e os sítios attR1/attR2, presentes no vetor de destinação escolhido, gerando um clone de destinação.

A plataforma Gateway possibilita realizar a transferência dos genes de interesse para diferentes vetores de destinação com distintas aplicações.

Desta forma, os *amplicons* dos genes de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP foram usados para reação de recombinação com o vetor pDONR™221 da plataforma Gateway (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen - Catálogos 12535-019 e 12535-027). A figura 16 mostra o mapa do vetor. As reações de recombinação foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5α cálcio-competente, conforme item a seguir.

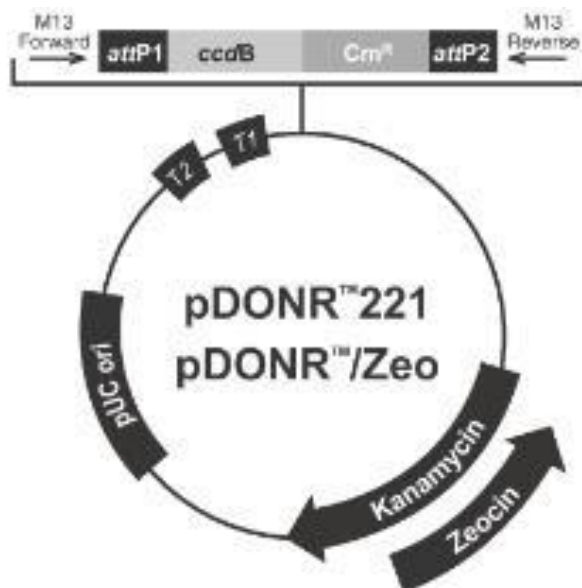


FIGURA 16. MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221 (Invitrogen). pUC ori: origem de replicação de alta cópia. attP1/attP2: sequência de 200 bp presente no pDONR para recombinação com sítio attB presente no produto PCR. ccdB: gene que permite seleção negativa do pDONR, interferindo na DNA girase de *E. coli*, que é substituído após recombinação com o sítio attB do produto de PCR. Kanamycin: gene de resistência à canamicina. CmR: gene de resistência ao cloranfenicol. T1/T2: terminadores de transcrição. M13 Forward e Reverse (FONTE: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen)

4.6.4. Transformação e seleção de clones recombinantes

4.6.4.1. Preparo de células competentes

Para o preparo de bactérias cálcio-competentes, foi utilizado o método de CaCl₂ descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante de 220 rpm. Um volume de 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C sob as mesmas condições de agitação até alcançar a fase de crescimento exponencial (D.O.600 de 0,6).

A cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 5 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 50 mL (metade do volume original) de solução gelada de CaCl₂ 100 mM tamponada com HEPES 10 mM pH 7,0 e mantidas no gelo durante 30 minutos.

A suspensão foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores, as células foram suspensas em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) da solução anterior acrescida de 10% de glicerol, mantidas no gelo seco por 2 horas e em seguida aliqüotadas e armazenadas a – 80 °C.

4.6.4.2. *Transformação de células competentes*

Para a transformação de bactérias cálcio-competentes utilizou-se o seguinte protocolo: as reações foram incubadas com 50 µL da suspensão de *E. coli* cálcio-competentes por 30 minutos no gelo. Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico pela incubação a 42 °C por 2 minutos, seguido de incubação de 2 minutos no gelo e posterior adição de 1 mL de meio LB para incubação sob agitação constante de 200 rpm a 37°C por uma hora.

Após período de 1 hora de incubação, reduziu-se o volume por centrifugação durante 2 minutos a 6.000 rpm para 100 µL permitindo o cultivo em placa de toda a amostra. Foram utilizadas placas contendo meio LB e antibióticos específicos para as seleções, sendo eles ampicilina 100 µg/ml resistência conferida pelos vetores pDESTTM17, pTcGWGFPN, pTcGWFLAG, ou canamicina 50 µg/ml, resistência conferida pelo vetor pDONRTM221, utilizados em bactérias *E. coli* DH5α e/ou cloranfenicol 34 µg/ml, utilizado para expressar proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* pLysS. Após crescimento de 16 a 20 horas em estufa a 37 °C, fez-se a seleção dos clones, por PCR de colônia, conforme descrito no item 4.6.4.3.

4.6.4.3. *Seleção de clones recombinantes por PCR de colônia*

Para uma varredura inicial de clones, algumas colônias crescidas em meio seletivo foram coletadas em tubo de microcentrifuga, diluídas em 100 µl de água ultrapura (proporção 1:100). Deste, 1 µl foi utilizado como molde para a reação de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabelas 3 e 4). Previamente, as amostras foram aquecidas a 94°C durante 10 minutos e, posteriormente, foram submetidas aos ciclos específicos de desnaturação,

anelamento dos iniciadores e extensão de cada um dos fragmentos gênicos. As amostras foram analisadas em gel de agarose conforme item 4.5.1.

Os clones positivos selecionados foram inoculados em 2 mL de meio LB adicionado de antibiótico apropriado e as culturas incubadas a 37°C durante 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram então utilizadas para extração de DNA plasmidial utilizando o sistema *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) ou *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen), dependendo da quantidade necessária para o ensaio. Ambas as purificações foram realizadas conforme descrição em protocolo padrão do fabricante. Os clones selecionados foram denominados de pDONR-TcNTF2L, pDONR-TcHYP e foram utilizados para recombinação com outros vetores de destino, entre eles o pDEST™17, para produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, e os vetores pTcGWGFPN-NH e pTcGWGFPN-CO, utilizado para expressão de proteínas fusionadas a GFP nas extremidades N-terminal e C-terminal em *T. cruzi* (Batista *et al.*, 2010) e também o pTcGWFLAG-NH e pTcGWFLAG-CO utilizado para a expressão de proteínas fusionadas a FLAG nas extremidades N-terminal e C-terminal em *T. cruzi* (KUGERATSKI *et al.*, 2015). Após a identificação dos plasmídeos recombinantes, estes foram sequenciados para plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) para confirmação da correta clonagem.

4.7. OBTENÇÃO DE *T. CRUZI* EXPRESSANDO PROTEÍNAS FUSIONADAS À ETIQUETAS

4.7.1. Clonagem em vetores de destino

Com o objetivo de avaliar a localização celular em *T. cruzi* através da detecção de etiqueta, e a imunoprecipitação de complexos proteicos, as proteínas foram fusionadas à GFP (BATISTA *et al.*, 2010) e/ou PTP e/ou FLAG (KUGERATSKI *et al.*, 2015). As clonagens dos genes de TcFOP, TcAPI5 (descritas em Domingues 2017), TcNTF2L e TcHYP em vetores expressando as proteínas fusionadas à GFP e/ou PTP, foram realizadas conforme protocolo da reação de recombinação LR (Invitrogen). Como TcHYP não possui nenhum domínio

conservado e sendo uma proteína de 17,7 kDa optamos por fusionar a proteína, em ambas as extremidades (N e C), com as etiquetas GFP e FLAG, o mapa do vetor está ilustrado na figura 17.

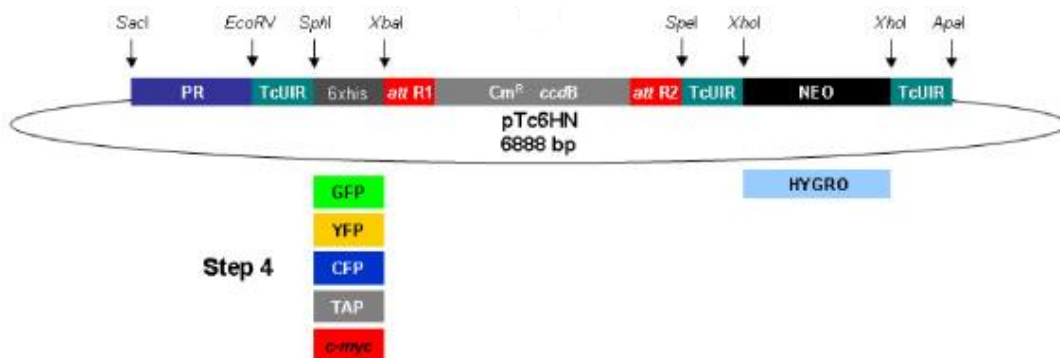


FIGURA 17. DESENHO ESQUEMÁTICO QUE MOSTRA OS PASSOS DA CONSTRUÇÃO DO VETOR pTcGWGFPN. Os elementos NEO e HYGR0: são respectivamente os genes de resistência a neomicina e a higromicina. TcUIR: lócus região intergênica ubiquitina do *T. cruzi*. attB1 , attB2 , attr1 e attR2: locais de ligação e recombinação para os Gateway. CMR: gene de resistência a cloranfenicol. ccdB: gene de selecção negativa durante a clonagem. 6xHis , GFP , YFP , PCP , TAP e c- myc: marcas de fusão. PR: promotor ribossomal. (BATISTA *et al.*, 2010; KUGERATSKI *et al.*, 2015)

As transformações bactérias *E. coli* DH5 α cálcio-competentes, seleção dos clones e extração dos plasmídeos recombinantes foram realizadas conforme anteriormente descritas. Os clones foram denominados da seguinte forma: pTcGWGFP-FOP, pTcGWGFP-API5 (Domingues, 2017), pTcGWGFP-NTF2, pTcGWGFPN-Hipo, pTcGWGFPC-Hipo, pTcGWFLAGN-Hipo, pTcGWFLAGC-Hipo. Os plasmídeos foram purificados em maior escala através do *Hi-Speed Plasmid Mid Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, e 50 μ g dos plasmídeos foram utilizados para a transfecção por eletroporação de *T. cruzi*.

4.7.2. *Transfecção e seleção de parasitas*

4.7.2.1. *Transfecção em T. cruzi por eletroporação e seleção de transfectantes*

Um total de 5×10^6 células, em fase de crescimento exponencial, foi coletado por centrifugação por 5 minutos a $2.000 \times g$ lavadas com 1 mL de tampão Tb-BSF (90 mM Fosfato de Sódio, 5 mM de Cloreto de Potássio, 0,15 mM Cloreto de Cálcio, 50 mM HEPES, pH 7.3) e suspensas em 1 mL do mesmo tampão, as células foram transferidas para cubeta de eletroporação de 0,2 mm resfriada em gelo.

Para transfecção em *T. cruzi* foram adicionados 50 µg do plasmídeo às células. Para eletroporação utilizamos o programa U-33 do eletroporador Nucleofector™2b (Lonza). Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio LIT adicionado de 100 µl de solução de penicilina + streptomicina (10000 U de penicilina + 10000 µg de streptomicina / mL) e incubadas a 28 °C durante 24 horas. Após este período, o processo de seleção dos parasitas foi feito pela adição de 500 µg/mL de G418. Aproximadamente após 5 dias da adição da droga, foi feita uma diluição de 1:10 dos parasitas em meio LIT contendo 500 µg/mL de G418.

As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que se observou a inibição total do crescimento celular na cultura controle.

4.7.2.2. *Single Cell Sorting para seleção clonal de T. cruzi*

Em uma placa de 96 poços, o equivalente a 100 µl de meio LIT acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, 10 µg/mL de gentamicina, penicilina/streptomicina 1X e 500 µg/mL de G418, foram dispensados individualmente em cada poço com o auxílio de uma pipeta multicanal. 10^6 parasitas na forma epimastigota em crescimento exponencial foram diluídos em 1 mL de PBS 1x e a separação em células individuais por poço foi realizada em citômetro de fluxo.

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo BD FACSAria™ II (plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz – PR).

4.8. MICROSCOPIA ÓTICA

4.8.1. *Imunofluorescência indireta*

As lâminas foram preparadas com 0.1% poli-L-lisina e os parasitas foram centrifugados a 2.000 x g, lavadas duas vezes e suspensos em PBS 1x. Posteriormente, foram fixados em para-formaldeído 4% e aderidas por 20 minutos nas lâminas previamente preparadas e, em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, e então foi adicionada uma solução de Triton X-100 0,1% durante 90 segundos para a permeabilização dos parasitas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e bloqueadas com PBS-BSA 1% por 16 horas a 4 °C em câmara úmida. Após o período de bloqueio, as lâminas foram lavadas e incubadas por uma hora a 37 °C com anticorpo primário produzido em coelho ou camundongo, diluído 1:500 em PBS-BSA 4%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora a 37 °C com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho e/ou de camundongo conjugado com Alexa 594 e/ou Alexa 488 diluído 1:600 em PBS-BSA 4%. Para a coloração do material genético nuclear e do cinetoplasto foi acrescentado DAPI (5 mg/ml) em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS. Foi então adicionado N-propil-galacto 0,1 M e as lâminas foram lacradas utilizando lamínula de microscopia e selador. As lâminas foram analisadas na plataforma de microscopia do ICC. As imagens bidimensionais foram obtidas no microscópio de fluorescência Nikon 80i com sistema de câmera CoolSnap PROcf (Media Cybernetics) e análise com Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics). As imagens com maior resolução foram obtidas a partir do microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

4.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

4.9.1. *Processamento para Epon® (LUFT, 1961)*

Os parasitas na forma epimastigotas em fase de crescimento exponencial foram coletados, e as células foram lavadas por 3 vezes em tampão Cacodilato e fixadas por 1 hora em temperatura ambiente, em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e Cacodilato 0,1 M pH 7,2.

Em seguida, foram lavadas 3 vezes em tampão Cacodilato 0,1M (Glutaraldeído 25%, Paraformaldeído 10%, Cacodilato 0,1M e água destilada), centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos. Após lavagens, os parasitas foram fixados por 1 hora com 1% tetróxido de ósmio (diluído em tampão Cacodilato 0,1M) e 0,8% ferrocianeto de potássio. Lavando novamente as células por 3 vezes em tampão Cacodilato 0,1M.

As células foram desidratadas gradativamente por 10 minutos cada em acetona 30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100% novamente.

Os parasitas foram emblocado em resina Epon e acetona em proporção de 1:1 por aproximadamente 16 horas. Após este período a solução de resina e acetona foi substituída por resina pura, ficando um período de 8 horas e sendo substituído por resina pura novamente e incubando em estufa a 60°C por no mínimo 48 horas.

Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrótomo Leica Reichert Ultracuts. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel e incubados durante 30 minutos com PBS 1x pH 7,4 para hidratação dos cortes. Após hidratação os cortes foram incubados por 45 minutos em solução de cloreto de amônio 50 mM diluído em PBS 1X para bloquear ligações inespecíficas a grupamentos aldeídicos livres. A contrastação foi realizada durante 20 minutos com acetato de uranila (5% em água) e 1 minuto em citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM-1400Plus operado de 80 a 100 kV. O processamento das amostras e a captura das imagens foram realizados na plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas (PDTIS/ Fiocruz).

4.10. IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS

4.10.1. Conjugação do nanobody anti-GFP as esferas magnéticas (CRISTEA et al., 2005)

Inicialmente, bactérias *Escherichia coli* linhagem Arctic Express (DE3) (Agilent) transformadas com o vetor pET21-peIB-VHH foram utilizadas para a indução, expressão e purificação de *nanobody* recombinante α -GFP, conforme descrito em Fridy et al., (2014). Assim, foram utilizados 20 mg de esferas magnéticas Dynabeads® M-270 epoxy (Life technologies) que foram lavados com 1 ml de tampão fosfato pH 8,0 100 mM e suspendidas em 100 μ l do mesmo tampão fosfato. Foi acrescentado *nanobody* anti-GFP ou anticorpo anti-proteína A (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 μ g de anticorpo ou *nanobody* para cada mg de esferas magnéticas num volume final de 200 μ l. 100 μ l de sulfato de amônio 3 M foi acrescentado lentamente para evitar precipitação de proteínas. Essa mistura foi incubada, durante 72 horas a 30°C sob agitação constante de 200 rpm. Após isso, foram lavadas sequencialmente com 1 ml de cada solução: tampão fosfato pH 7,4 100 mM; Glicina pH 2,5 100 mM; Tris-HCl pH 8,8 10 mM; Trietilamina 100 mM; solução de PBS; Triton X-100 0,5% em PBS e, novamente, solução de PBS. As esferas foram suspendidas em 100 μ l de PBS e estocadas a 4°C até o momento do uso.

4.10.2. Preparação do extrato proteico por lise por detergente

Para a obtenção dos complexos proteicos de *T. cruzi*, 5×10^8 parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 5000 x *g* e lavados com PBS 1x. As células foram lisadas com 1 ml de tampão citrato contendo 50 mM citrato de sódio, 20 mM HEPES, 1mM MgCl₂, 10 μ M CaCl₂, 0,5% Triton X-100 e inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche), seguido por sonicação em potência 20% por 1 segundos no sonicador Ultrasonic Processor (Cole-Parmer). A lise dos parasitas foi verificada em microscópio óptico e o extrato proteico foi obtido por centrifugação a 20.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C.

4.10.3. Isolamento dos complexos proteicos

Aos extratos proteicos solubilizados em tampão citrato, foram adicionados 3 µl da esfera magnética conjugada com *nanobody* anti-GFP, previamente preparado conforme descrito no item 4.10.1, a suspensão foi incubada sob agitação constante a 4°C durante duas horas. Em seguida, as esferas magnéticas foram lavadas três vezes em tampão citrato de suspensão contendo citrato de sódio 50 mM, Hepes 20 mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 10 µM, Triton X-100 0,1% e inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche). A eluição das esferas magnéticas foi realizada com 15 µl de tampão de eluição (SDS 2% e Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e 15 µl de tampão de amostra 4X fervido a 72°C durante 20 minutos. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado durante 1 minuto a 1000 x g, o sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma estante magnética, transferido para outro microtubo e analisado em gel SDS-PAGE, conforme descrito no item 4.5.2, corado pela técnica de coloração por nitrato de prata, conforme o item 4.5.2.2, e por *western blot* (item 4.11).

4.10.4. Análise por espectrometria de massas

As amostras de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP foram processadas pela plataforma de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR.

Após separação das proteínas eluídas do procedimento de captura por afinidade por SDS-PAGE, cada canaleta do gel foi excisada e desidratadas com etanol 100% e secas numa centrífuga de vácuo. Após redução com DTT 10 mM, bicarbonato de amônio 50 mM, as amostras foram alquiladas com iodoacetamida 55 mM, bicarbonato de amônio 50 mM. Os géis foram lavados em tampão de digestão (bicarbonato de amônio 50 mM), desidratados com etanol a 100%, e secas numa centrífuga de vácuo. Em seguida, os géis foram incubados com 12,5 ng / ml de tripsina (Promega, V5113), bicarbonato de amônio 50 mM a 37 ° C durante 18 horas. Após a tripsinização, foi adicionado solução de extração (água, ácido trifluoroacético (TFA) 3% e acetonitrila 30%).

Os peptídeos foram extraídos da matriz do gel, concentrados em centrífuga a vácuo e dessalinizados usando colunas C18 (Stagetip – *Stop and Go Extraction in Tip*).

A análise por LC-MS/MS (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem) em um sistema Thermo Scientific Easy-nLC 1000 acoplado a um LTQ Orbitrap XL ETD (Plataforma de Espectrometria de Massas RPT02H / Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR). A separação de peptídeos foi realizada em uma coluna compactada interna de sílica fundida de 15 cm (75 µm de diâmetro interno) com resina ReproSil-Pur C18-AQ 1,9 µm de fase reversa (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Alemanha). As execuções de cromatografia foram realizadas com uma taxa de fluxo de 250 nL / min de 5 a 40% de MeCN em 0,1% de ácido fórmico, 5% de DMSO em um gradiente de 120 min. O espectrômetro de massa operou em um modo dependente de dados para alternar automaticamente entre a aquisição MS e MS / MS (MS2).

Os espectros de varredura completa de MS (na faixa de 300 - 2.000 m / z) foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução de 60.000 em m / z 400 (após acumulação para um valor alvo de 1.000.000 no C-trap). Os doze íons mais intensos foram isolados sequencialmente e fragmentados usando dissociação induzida por colisão em um valor alvo de 30.000. A coleta da lista de picos, identificação, quantificação e validação de proteínas foram feitas usando a plataforma MaxQuant (versão 1.5.5.1), que inclui o algoritmo Andromeda para pesquisa de banco de dados. Parâmetros padrão do software foram usados para todas as etapas de análise, a menos que indicado de outra forma. As proteínas foram identificadas por busca automática em banco de dados de sequências de proteínas *T. cruzi* CL Brener (contendo 19242 sequências de proteínas, baixadas em 10 de agosto de 2016 da Uniprot) e anexando-as às sequências forward. Esta base de dados foi complementada com contaminantes frequentemente observados (tripsina suína, *Achromobacter lyticus* lisil endopeptidase e queratinas humanas) e suas sequências invertidas.

A quantificação de proteínas foi realizada com base no número de peptídeos identificados e na intensidade (soma da área dos picos tridimensionais dos peptídeos obtidos no MS). As análises de dados de TcAPI5, TcFOP, TcNTF2LL e TcHYP foram realizadas com base nas médias de todas as réplicas e comparando a intensidade entre as amostras alvo e o controle. Foi considerado um *fold change* ≥ 2 para selecionar as proteínas

4.11. ENSAIO DE *WESTERN BLOT* (TOWBIN, STAEHELIN E GORDON, 1992)

As proteínas separadas em gel SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) através de voltagem de 20 V por 16 horas a 4 °C em tampão de transferência para *Western blot* (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi então corada com solução de Ponceau S para verificação da transferência, posteriormente descorada em água bidestilada e incubada em solução de bloqueio (PBS 1X; Tween 20 0,05%; leite em pó desnatado 5%) por uma hora com leve agitação a temperatura ambiente.

Em seguida, foi adicionado anticorpo primário específico na diluição desejada, e a incubação foi mantida por uma hora a 37 °C com leve agitação. Para revelação por fosfatase alcalina, após a incubação do anticorpo primário, a membrana foi incubada por uma hora a 37 °C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de coelho ou camundongo (Promega) conjugados com a enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:10000 em PBS-Tween 0,05% e após o período de incubação, foi novamente lavada por três. A reação imunoenzimática foi revelada com os substratos NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) a 50 mg/ml (Promega) e BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*) a 50 mg/ml (Promega) em tampão da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Após a revelação, esta reação foi interrompida por solução de EDTA 100 mM.

Para revelação por fluorescência, a membrana de nitrocelulose, incubada previamente com os anticorpos primários, foi incubada por uma hora a 37°C sob leve agitação com anticorpos anti-IgG de camundongo ou coelho conjugados com fluoróforo, que quando excitados em um comprimento de onda específico (700 ou 800 nm) produzem fluorescência. As imagens foram obtidas no aparelho Odyssey (*Li-cor*).

4.12. SILENCIAMENTO GÊNICO POR INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAI) DE GENES DE *T. BRUCEI* ORTÓLOGOS AOS GENES IDENTIFICADOS EM *T. CRUZI*

4.12.1. Escolha dos alvos para os ensaios de RNAi

Com o auxílio da ferramenta RNAit da base de dados do Trypanofan - Genômica funcional de *T. brucei* (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>) (REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003), foi determinado pelo programa, fragmentos com 546 pb, 524 pb, 528 pb e 434 pb do mRNA para alvo nos ensaios de RNAi para TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHyp, respectivamente.

Nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos iniciadores de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP foram inseridos sítios de restrição para a enzima *Xba*I (NEB). As regiões utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e as respectivas sequências estão ilustradas nas figuras 18.



FIGURA 18. REGIÕES UTILIZADAS PARA DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DE TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 E TbHYP. Sequência de nucleotídeos dos genes de TbFOP (Tb927.6.1470), TbAPI5 (Tb927.7.2240), TbNTF2 (Tb927.10.2240) e TbHYP (Tb427.04.3060), respectivamente. As letras em vermelho delimitam a região escolhida através da ferramenta RNAit, utilizada para desenho dos iniciadores, *Forward* (F) e *Reverse* (R), destacados em verde

A escolha dos alvos para clonagem em vetor p2T7-177 de TbFOP (Tb927.6.1470) e TbAPI5 (Tb927.7.2240) foram feitas previamente (DOMINGUES, 2017)

4.12.2. Amplificação por PCR das sequências alvo para RNAi de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP

Para as reações de amplificação por PCR dos fragmentos, foram utilizados 100 ng de DNA genômico de *T. brucei*, em um volume de reação de 20 µL contendo: tampão de reação, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador *F* e *R*, descritos na tabela 4, e *Taq* DNA polimerase 2,5 U (Invitrogen).

TABELA 4. OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS GÊNICOS DE DE TbFOP, TbAPI5, TbNTF2, TbHYP. Na tabela estão presentes as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse*, utilizados para a obtenção dos fragmentos utilizados para os ensaios de interferência por RNA. Em vermelho destaca-se o sítio de clivagem pela enzima *Xba*I (NEB), inserido na extremidade 5'.

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotíca	Tamanho do fragmento	Padrão de ciclagem			
TbFOP (Tb927.6.1470)	TbFOP Forward	5' <u>CGCTCTAGA</u> AAGATGATCTCCCAGCACCAC 3'	546	30 ciclos	holding	94 °C	2'
	TbFOP Reverse	5' <u>CGCTCTAGA</u> AACCGATCCAACCTGCTCATC 3'			Desnaturação	94 °C	30''
TbAPI5 (Tb927.7.2240)	TbAPI5 Forward	5' <u>CGCTCTAGATAT</u> GAACCTTATAGGCGATGGAAAC 3'	524		Anelamento	58 °C	30''
	TbAPI5 Reverse	5' <u>CGCTCTAGA</u> ACTTCCAACCACGACTTCTTCCT 3'			Extensão	58 °C	45''
TbNTF2 (Tb927.10.2240)	TbNTF2 Forward (F)	5' <u>CGCTCTAGAG</u> GCTGCCGTTCTGCAACTTCCA3'	528 pb		holding	72 °C	10'
	TbNTF2 Reverse (R)	5' <u>CGCTCTAG</u> ACTAGGGATAGAACCGTGCCA3'					
TbHyp (Tb427.04.3060)	TbHyp Forward (F)	5' GATCGGGCCCGGTACCATCGGCCCTAAGTAAAATC 3'	434 pb				
	TbHyp Reverse (R)	5' GATCTCTAGAGGATCCTCAATCACGTGAGAAGCGG 3'					

Foi adicionado um *holding* de 72°C por 10 minutos, que permite a adição de adeninas à extremidade 3' do produto da amplificação necessário para clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002)

4.12.3. Clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD et al., 2002)

Os insertos obtidos por meio de clonagem em vetor pGEM® – Teasy (Promega), foram previamente digeridos com XbaI (NEB), purificados e então ligados ao vetor p2T7-177, cujo mapa está ilustrado na figura 19.

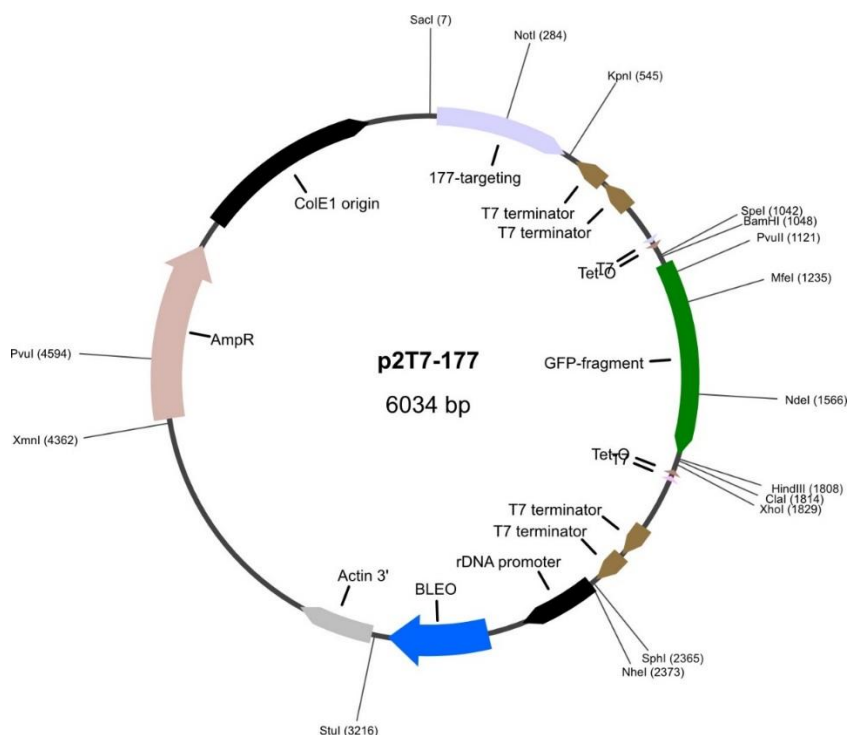


FIGURA 19. MAPA DO VETOR p2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi. T7 prom: Promotor de T7 RNA Polimerase induzido por tetraciclina. T7 term: Terminador de transcrição. 177: Seqüência repetitiva de 177 pares de bases para alvo de inserção em minicromossomos. Phleo: gene de resistência à fleomicina. GFP: Proteína Green Fluorescent Protein, os sítios para as enzimas de restrição estão indicados. Amp^R: gene de resistência à ampicilina (FONTE: WICKSTEAD; ERSFELD, K.; GULL, 2002).

Para as reações de ligação, foram utilizadas a relação de 1:10 pmol de vetor p2T7-177 e inserto. A reação ocorreu com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante. Esta reação foi incubada a 16 °C durante 18 horas e posteriormente utilizada para transformar *E. coli* DH5α quimiocompetentes, como descrito no item 4.6.4.2. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177. Para a confirmação dos clones positivos, as colônias isoladas foram analisadas por PCR

conforme citado no item 4.6.4.3 utilizando os iniciadores específicos dos respectivos fragmentos.

Os plasmídeos correspondentes aos clones positivos foram purificados através do sistema *HiSpeed® Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

4.12.4. Clonagem em vetor p2T7-111/LacZ

Alternativamente, foi utilizado um vetor p2T7-177 modificado com inserção do gene LacZ que expressa β -galactosidase e permite a seleção pela coloração de colônias azul ou branca, conforme anteriormente descrito. Assim para clonagem direta do produto de PCR em vetor p2T7-177/LacZ, foi feita uma reação de ligação utilizando a proporção de 50 ng do vetor p2T7-177/LacZ para 500 ng de inserto. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes conforme descrito no item 4.6.4.2, após a confirmação de clones positivos por PCR de colônia, item 4.6.4.3, o DNA plasmidial foi extraído e linearizado com o auxílio da enzima de restrição NotI e transfectado em *T. brucei* conforme descrito no item 4.12.5. O mapa do vetor está ilustrado na figura 20.

4.12.5. Transfecção e seleção de transfectantes

4.12.5.1. Transfecção de *T. brucei* por eletroporação e seleção de transfectantes

Para cada transfecção de *T. brucei* cepa 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1999), aproximadamente 10 µg dos plasmídeos foram linearizados com a enzima *Not I* (New England Biolabs), conforme descrição do fabricante e a reação foi incubada a 37 °C por 16 horas. Essa linearização é necessária para a integração do vetor em regiões repetitivas de repetições 177 de minicromossomos dentro do genoma do parasita (WICKSTEAD *et al.*, 2002).

Os plasmídeos linearizados foram transfectados em *T. brucei* com o auxílio do eletroporador Nucleofector™2b (Lonza), utilizando o programa X-001 pré-estabelecido na programação do aparelho. Como controle, foi realizada a eletroporação de células sem adição de plasmídeo recombinante.

Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm³ contendo 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, acrescido de 15 µg/ml G418, 50 µg/ml Higromicina e 5 µg/ml Fleomicina e incubados em estufa de CO₂ 5% a 28°C.

As culturas foram cultivadas com passagens regulares até que se observou a inibição total do crescimento celular na cultura controle.

4.12.5.2. Single Cell Sorting para seleção clonal de *T. brucei*

Em uma placa de 96 poços, o equivalente a 100 µl de meio SDM-79 acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, 10 µg/mL de gentamicina, penicilina/streptomicina 1X e 5 µg/mL de Fleomicina, foram dispensados individualmente em cada poço com o auxílio de uma pipeta multicanal. 10⁶ parasitas na forma epimastigota em crescimento exponencial foram diluídos em 1 mL de PBS 1x e a separação em células individuais por poço foi realizada em citômetro de fluxo.

Os experimentos foram realizados em citômetro de fluxo BD FACSAria™ II (plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz – PR).

4.12.6. Indução de RNAi em *Trypanosoma brucei*

A indução do RNAi foi realizada com adição de tetraciclina 2 µg/ml diretamente nas culturas de células. Como controle negativo, culturas de células sem tetraciclina foram cultivadas nas mesmas condições.

4.12.7. Curva de crescimento para *Trypanosoma brucei*

Com intuito de manter a cultura dos transfectantes sempre em fase logarítmica de crescimento, 5×10^6 parasitas/ml foram cultivados durante 24 horas e repicados para a mesma densidade celular inicial durante 5 dias, em meio SDM-79 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, acrescido de G418 15 µg/ml, Higromicina 50 µg/ml, Fleomicina 5 µg/ml, em culturas induzidas com tetraciclina e não induzidas. As contagens das culturas para curva de crescimento tipo “serrote” foram feitas em triplicatas técnicas.

4.12.8. Validação do ensaio de RNAi por PCR quantitativa

O RNA total foi extraído a partir 10^9 células utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen) e tratado com RQ1 (RNA Qualified) RNase-free DNase (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Para a obtenção do cDNA utilizou-se o sistema da transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega) juntamente com 0,5 µg/µl *Randon Primer* (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante.

O cDNA obtido foi utilizado como *template* para as reações de qPCR. Os oligonucleotídeos iniciadores específicos e o padrão de ciclagem utilizado na qPCR estão descritos na tabela 5.

TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores para ensaios de qPCR de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP em *Trypanosoma brucei*

Produto de amplificação	Oligonucleotídeos	Sequência nucleotídica	Padrão de ciclagem	
TbFOP	TbFOP <i>Foward</i> (F)	5'GAGACGACTTCGACCGCAGGC3'	Pré-incubação	95°C – 60''
	TbFOP <i>Reverse</i> (R)	5'ATCTTCCCTGTCACCTTCTTCG3'		
TbAPI5	TbAPI5 <i>Foward</i> (F)	5'TGCCGGTTAAGAAGAAGGTTGC3'	Amplificação (65x)	95°C – 20''
	TbAPI5 <i>Reverse</i> (R)	5'AGTCGGCGTCGTTTCTGCTGC3'		55°C – 20''
TbNTF2	TbNTF2 <i>Foward</i> (F)	5'CGCTCTAGAGCTGCCGTTCTGCAACTTCCA3'		72°C – 20''
	TbNTF2 <i>Reverse</i> (R)	5'CGCTCTAGACTAGGGATAGAACCGTGCCA3'		
TbHyp	TbHYP <i>Foward</i> (F)	5'TGCGCATAATCAAGTCGGACCAA 3'	Melting	95°C – 60''
	TbHYP <i>Reverse</i> (R)	5'TTCCATGCTTGATCGACCTTTCCTT 3'		40°C – 60''
Tb7SL	Tb7SL <i>Forward</i> (F)	5'CGCATTGCTCTGTAACCTTCGGG3'		65°C – 1''
	Tb7SL <i>Reverse</i> (R)	5'CCTCAACACCGACACGCAACC3'		97°C – 1''

A qPCR em tempo real foi realizada em triplicata técnica com o SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) em sistema LightCycle 96 (Roche). O padrão de ciclagem utilizado está descrito na tabela acima. 7SL RNA foi utilizado como normalizador para as análises de qPCR. A temperatura de melting de 55°C foi utilizada para todas as reações. Os níveis relativos de expressão de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TcHYP foram calculados com o método Pfaffl's (PFAFFL, 2001)

4.12.9. Localização de mRNA por ensaio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Um total de 10⁶ células foi coletado para cada poço da lâmina. Os parasitas foram lavados em PBS (pH 7,4), fixado com paraformaldeído 4% e aderido em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina.

A permeabilização celular foi feita por incubação com HCl 0,2 M (diluído em PBS) por 10 minutos. O pré-tratamento e a hibridização foram realizados em condições livres de RNase. Para a pré-hibridização (baseado em Schwede *et al.*, 2009) as células foram incubadas com tampão Denhardt 10X, EDTA 1 mM, formamida 35% em 4X SSC] e suplementado com 0,5 µg/ml de tRNA e 2 mU/ml RNaseOUT durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A sonda de oligo(dT) conjugada à digoxigenina (6 ng/µl) foi diluída no devido tampão de pré-hibridação para cada parasita e desnaturada por aquecimento a 65°C durante 3 minutos. A hibridização foi realizada durante 16 horas a 37°C. Como controle, 100 µg/ml de RNase A foi adicionado ao tampão antes da hibridação da sonda. Em seguida, as células foram lavadas com SSC 2X, SSC 1X e PBS duas vezes cada. A detecção da sonda foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal de antidigoxigenina (Sigma-Aldrich, diluição 1:300 produzido em camundongo) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, diluição 1: 600 produzido em cabra).

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIVERGENTES ASSOCIADAS À MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO DE mRNA

5.1.1. Análise de conservação das proteínas alvo

Anteriormente, nosso grupo descreveu duas proteínas envolvidas na via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos, as quais foram denominadas de TcSub2 (SERPELONI *et al.*, 2011) e TcelF4AIII (INOUE *et al.*, 2014). Visando identificar outros componentes da via de exportação, investiu-se na abordagem de imunoprecipitação associada a análises por espectrometria de massas dos complexos proteicos. Isso permitiu a identificação de várias proteínas, dentre as quais destacamos quatro proteínas hipotéticas altamente representativas nos complexos proteicos de TcSub2 e TcelF4AIII (INOUE *et al.*, submetido).

Com o auxílio da ferramenta hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998) fizemos a predição de domínios conservados para as quatro proteínas alvo deste trabalho.

A proteína com número de identificação TcCLB509033.80 apresenta um domínio FOP (*Friend of PRMT1*) (VAN DJIK *et al.*, 2010) na extremidade C-terminal (FIGURA 21 A). O domínio FOP é constituído por uma região rica em arginina e glicina (RGG box, possíveis sítios de metilação para a proteína Arginina Metil Transferase 1 – PRMT1) e dois motivos de ligação à UAP56 (Sub2 leveduras) (UAP56/Sub2 *Binding Motif* - UBM).

A presença de um duplo domínio API5 (*Apoptosis Inhibitory 5*) na extremidade C-terminal foi predito para proteína com número de identificação TcCLB511807.280 (FIGURA 21 B). Proteínas com esse domínio funcional foram associadas atuando como fatores anti-apoptóticos. Em humanos, a proteína é superexpressa em células cancerígenas, cuja expressão impede a morte celular programada que ocorre após a privação de fatores de crescimento (ESPOSITO *et al.*, 1999; TEWARI *et al.*, 1997, HAN *et al.*, 2012). Recentemente, Bong e colaboradores (2020) demonstraram que em células de mamíferos, API5 interage diretamente com UAP56 (Sub2) e sua depleção causa acúmulo de mRNA no núcleo celular.

Já para TcCLB511367.220, foi predito um domínio NTF2 (*Nuclear transport factor 2*) na extremidade N-terminal (FIGURA 21 C), este domínio está presente em diversos receptores de transporte que interagem com o poro nuclear durante o transporte núcleo-citoplasmático, como por exemplo, Mex67, MTR2 e proteína NTF2 (FRIBOURG *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2007).

Entretanto, para a proteína com número de identificação TcCLB.506435.150, não foi possível prever qualquer domínio conservado com as abordagens utilizadas.

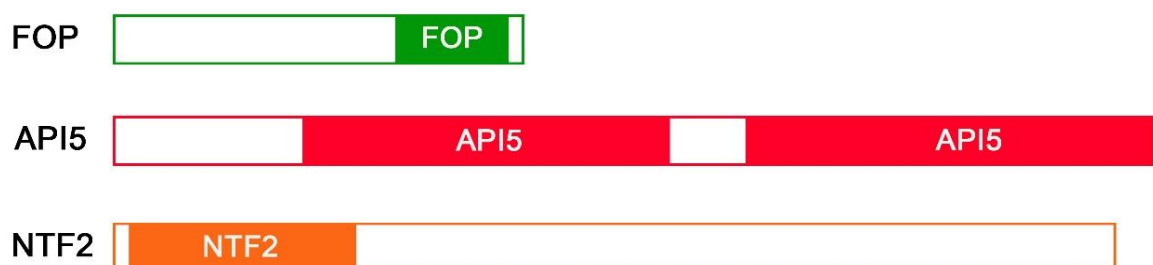


FIGURA 21. BUSCA POR DOMÍNIOS FUNCIONAIS NAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE *Trypanosoma cruzi*. Domínios identificados através do programa hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998). A) TcCLB.509033.80 apresenta um domínio FOP (Friend of PRMT1) foi em sua extremidade C-terminal entre os aminoácidos 174 e 207, com e-valor de 7.7e-05 (DOMINGUES, 2017). B) TcCLB511807.280 apresenta um duplo domínio API5 (Apoptosis Inhibitory 5) foi na extremidade C-terminal entre os aminoácidos 92 e 291 e 339-559, com e-valor de 5.6e-07. C) TcCLB511367.220 apresenta o domínio NTF2 (Nuclear transport factor 2) na extremidade N-terminal entre os aminoácidos 10 e 133, com e-valor de 1e-06 (Adaptado INOUE *et al.*, submetido).

Por uma questão didática, nomeamos as proteínas deste trabalho de acordo com os domínios preditos para cada uma delas, sendo TcFOP (TcCLB509033.80) TcAPI5 (TcCLB511807.280), TcNTF2L (TcCLB511367.220) e TcHYP (TcCLB506435.150).

Com o objetivo de avaliar a conservação destas proteínas em outros organismos, utilizamos a ferramenta BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), usando banco de dados contendo 121 proteomas eucarióticos. As sequências ortólogas previstas foram alinhadas e a reconstrução das árvores filogenéticas foi feita conforme descrito no item 4.1.1. A reconstrução filogenética de TcFOP e TcAPI5 demonstrou que esses fatores são exclusivos de

tripanosomatídeos e Eubodonida (FIGURA 22), e, portanto, são fatores específicos de linhagem.

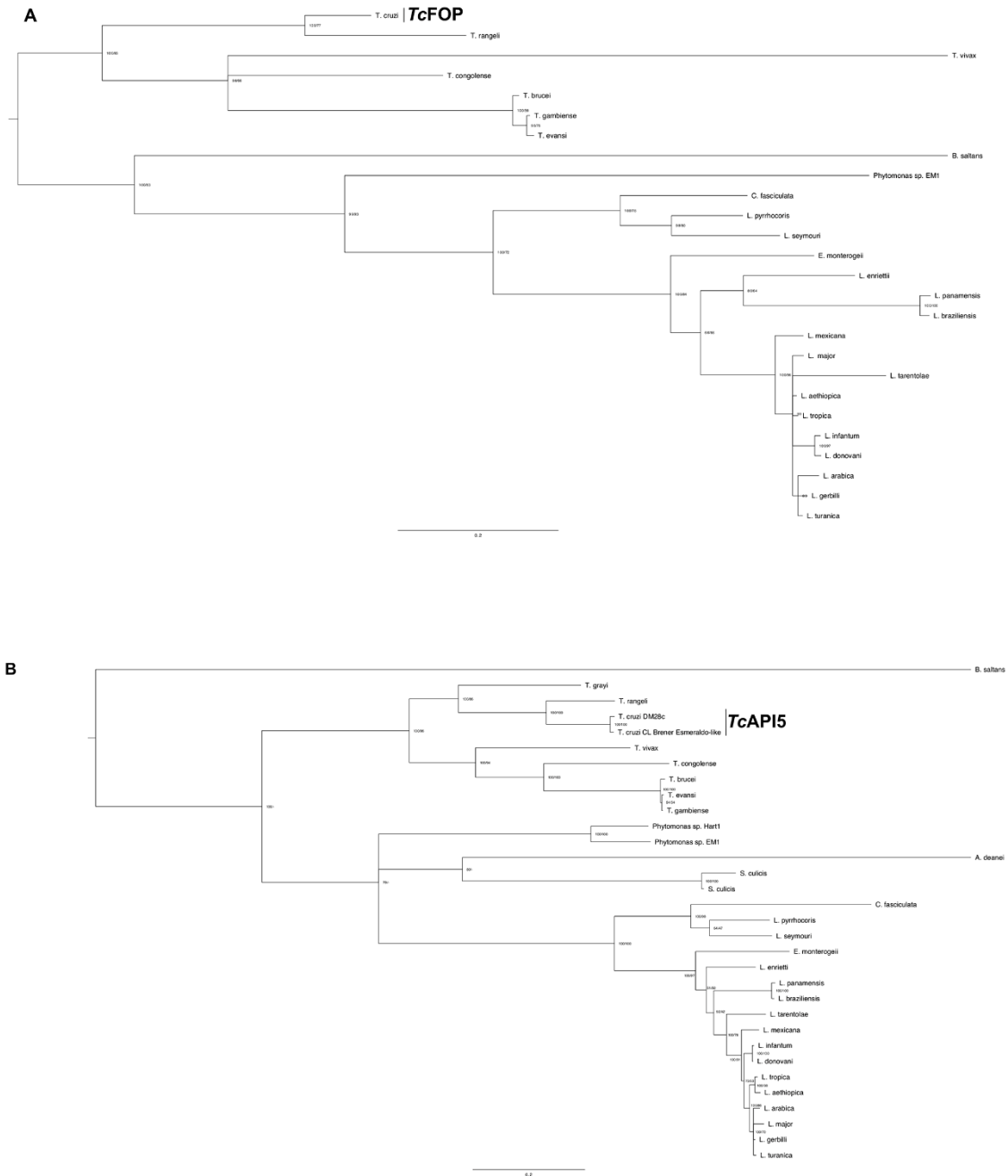


FIGURA 22. FILOGENIA DE TcFOP E TcAPI5. Ortólogos para TcFOP e TcAPI5 foram encontrados em tripanossomatídeos e Eubodonida. Barra indica o número de alterações estimado (INOUE *et al.*, submetido).

Para TcNTF2L foram identificados hits em outras linhagens, no entanto, eles não se agrupam com o clado principal de cinetoplastídeo (FIGURA 23). A árvore de homólogos ao NTF2 enraizada pelo ponto médio mostra dois cladogramas principais refletindo claramente a grande divergência desses dois grupos, um contendo as proteínas NTF2 do cinetoplastídeo e o outro contendo todas as outras (Para mais informações vide ANEXO 1).

Essas observações suportam a hipótese de que os cinetoplastídeos possuem vias únicas para a exportação de mRNA.

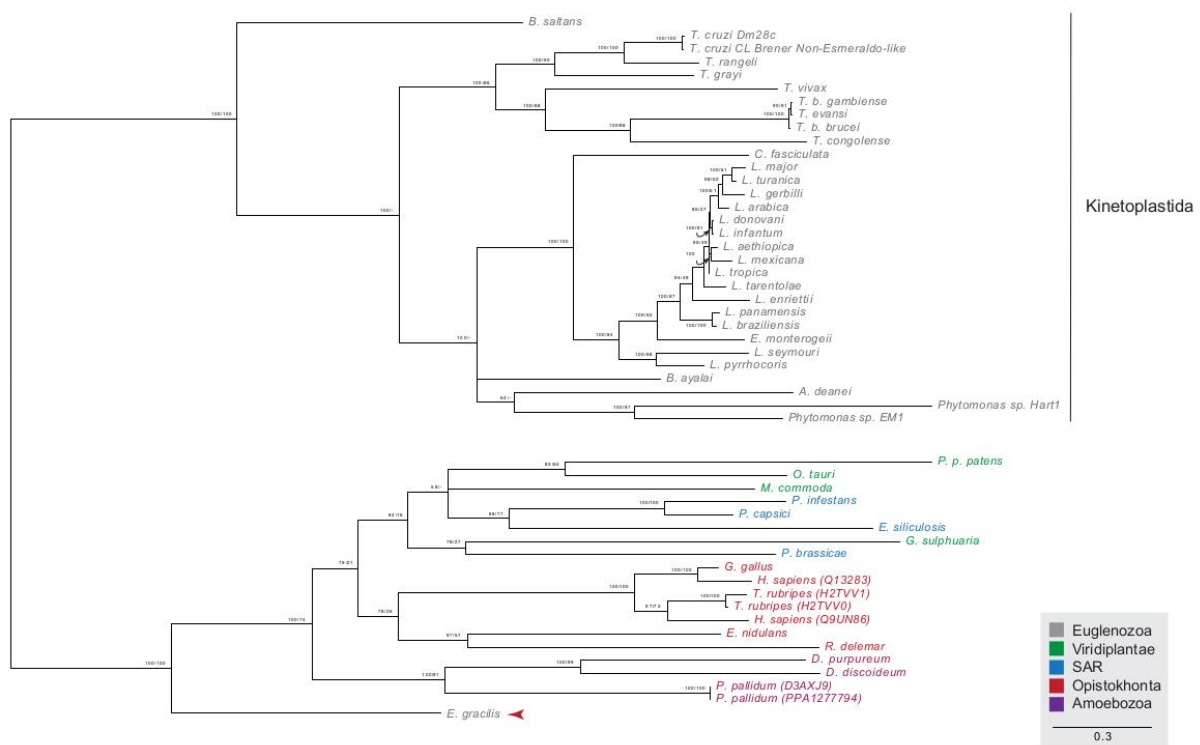


FIGURA 23. FILOGENIA DE TcNTF2L. Ortólogos para TcNTF2L foram encontrados em Tripanossomatídeos e Eubodonida. As cores representam proteínas ortólogas, de espécies representativas de metazoários, agrupadas em distintos tipos de cladogramas. Barra indica o número de alterações estimado (INOUE *et al.* submetido).

As informações obtidas com a reconstrução filogenética de TcHYP demonstrou que se trata de um fator presente em várias espécies de tripanosomatídeos, entretanto está ausente em algumas espécies como *Leishmania mexicana*, *L. panamensis*, *Crithidia fasciculata* e *T. grayi*. A dificuldade em

estabelecer a ortologia de TcHYP dentro dos próprios tripanossomatídeos é um indício da grande divergência encontrada.

Duas regiões mais conservadas no alinhamento das sequências podem ser observadas (posições de 1 a 32 e 238 a 275 (ANEXO 2)) do alinhamento total. Essas regiões devem ser importantes para o funcionamento da proteína, porém nenhum domínio conservado foi encontrado.

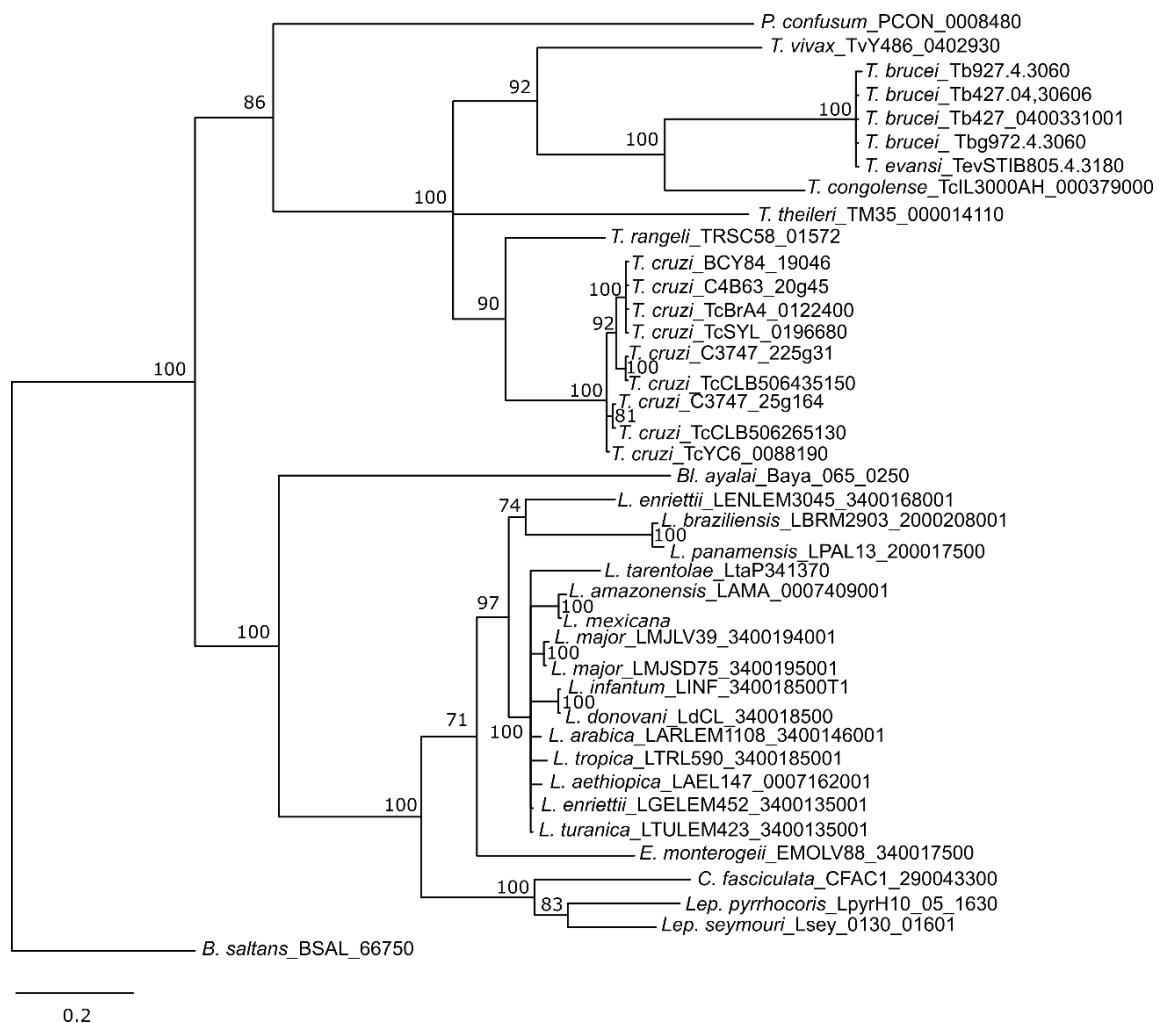


FIGURA 24. FILOGENIA DE TcHYP. Árvore evolutiva por Análise Bayesiana (mixed model + G, 339 aa) das proteínas homólogas a TcCLB.506435.150. Valores de probabilidade posterior são indicados próximos aos nós e clados com suporte menor do que 50% foram colapsados. A árvore foi enraizada pela sequência de *B. saltans*.

5.2. OBTENÇÃO DE LINHAGENS TRANSFECTANTES

5.2.1. Clonagem em vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway® (Invitrogen)

Foram geradas linhagens celulares expressando TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP fusionadas às etiquetas GFP e/ou FLAG nas extremidades N e/ou C-terminal.

Os genes de interesse foram primeiramente clonados em vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway (Invitrogen). Os *amplicons* obtidos por PCR, conforme descrito no item 4.6.2, foram recombinados em vetor de entrada pDONR™221 conforme manual do fabricante, e a reação dessa recombinação foi utilizada para transformação em *E. coli* DH5- α quimio-competente, conforme item 4.6.4.2. A seleção dos clones foi realizada por PCR de colônia, como descrito no item 4.6.4.3, para verificação da presença do inserto (FIGURA 25).

Vale ressaltar que as linhagens celulares expressando TcFOP e TcAPI5 foram obtidas anteriormente (DOMINGUES, 2017)

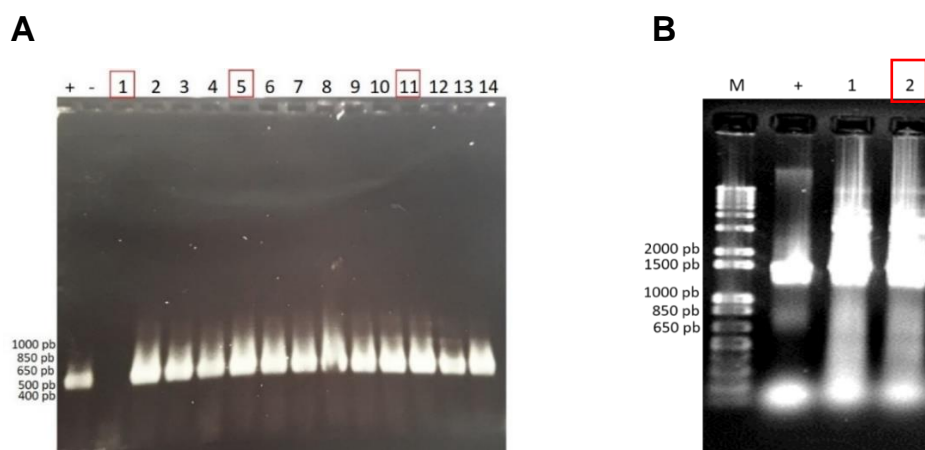


FIGURA 25. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS CLONADOS EM VETOR pDONR™221 (INVITROGEN). Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (A) Análise por PCR de colônia de clones de TcHYP em vetor pDONR™221. +: Controle positivo da reação utilizando como molde DNA genômico de *Trypanossoma cruzi* e os oligonucleotídeos iniciadores de TcHYP (459 pb). -: Controle negativo da reação. 1-14) resultado da amplificação por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcHYP. (B) Análise por PCR da miniprep de clones de TcNTF2L em vetor pDONR™221. +: Controle positivo da reação de amplificação por PCR de colônia utilizando como molde DNA genômico de *Trypanossoma cruzi* e os oligonucleotídeos iniciadores de TcNTF2L (1494 pb). 1-2: resultado da amplificação por PCR da

miniprep utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de TcNTF2L. Destacados em vermelho os clones utilizados.

Os clones selecionados para obtenção das linhagens transfectantes foram sequenciados utilizando os serviços da plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). Após a confirmação de que as sequências gênicas estavam corretas, os plasmídeos recombinantes foram utilizados como vetores de entrada para recombinação dos genes em plasmídeos de destino.

5.2.2. Clonagem em vetores de destino pTcGWGFP e pTcGWFLAG (BATISTA *et al.*, 2010; KUGERATSKI *et al.*, 2015)

Para clonagem em vetores de destino com o objetivo de expressar as proteínas recombinantes fusionadas às etiquetas, utilizamos duas abordagens.

Para TcNTF2L, fusionamos a etiqueta de GFP na extremidade N-terminal. No entanto, pelo fato de TcHYP ser uma proteína de pouco mais de 17 kDa, e por não apresentar nenhum domínio conservado, optamos por fusionar sua sequência às etiquetas GFP e FLAG em ambas as extremidades.

Para tanto, os genes clonados em pDONR™221 (pDONR-TcHYP#11 e pDONR-TcNTF2L#1), foram recombinados aos vetores pTcGWGFP e pTcGWFLAG (BATISTA, *et al.*, 2010; KUGERATSKI *et al.*, 2015). As reações de recombinação foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli* DH5 α quimio-competentes, e as análises dos clones positivos foram feitas através de PCR de colônia, conforme descrito nos itens 4.6.4.2 e 4.6.4.3 (FIGURA 26). As clonagens em vetores de destino para TcFOP e TcAPI5 foram feitas previamente (DOMINGUES, 2017)

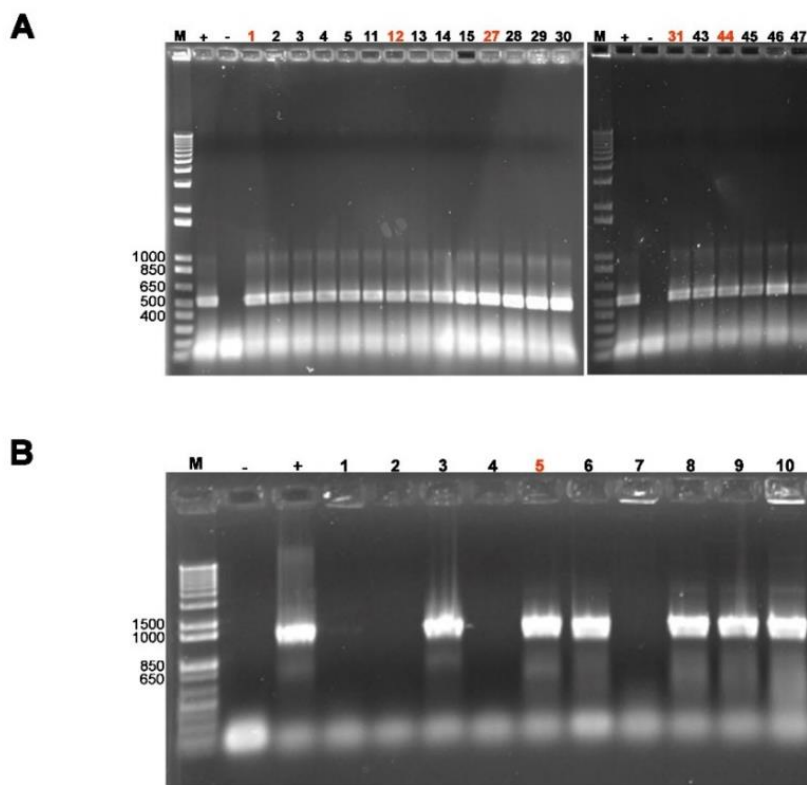


FIGURA 26. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR DE COLÔNIA PARA ANÁLISE DE CLONES DE TcNTF2L E TcHYP. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídeo. Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A) Análise de clones de TcHYP em vetores pTcGWGFNP; pTcGWGFPC, pTcGWFLAGN e pTcGWFLAGN. (+): Controle positivo da reação de amplificação utilizando como molde DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* e os oligonucleotídeos específicos de TcHYP. (-): Controle negativo da reação. 1-5: Resultado da amplificação de clones por PCR de colônia transformadas com vetor pTcGWGFP N-terminal. 11-15: Resultado da amplificação de clones por PCR de colônia transformadas com vetor pTcGWGFP C-terminal. 27-30: Resultado da amplificação de clones por PCR de colônia transformadas com vetor pTcGWFLAG N-terminal. 31-47: Resultado da amplificação de clones por PCR de colônia transformadas com vetor pTcGWFLAG C-terminal. B) (+) Controle positivo da reação de amplificação utilizando como molde DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* e os oligonucleotídeos específicos de TcNTF2L. 1-10: Resultado da amplificação de clones por PCR de colônia transformadas com vetor pTcGWGFP N-terminal. Destacados em vermelho os clones utilizados.

Após confirmação dos clones positivos, os plasmídeos foram purificados e transfectados em *T. cruzi*, conforme item 4.7.2.

Foram realizados ensaios de *Western blot*, conforme descrito no item 4.11, para a confirmação da seleção das linhagens positivas para expressão das proteínas conjugadas as etiquetas. Para esses ensaios foram utilizados os anticorpos anti-FOP e anti-API5, obtidos previamente (DOMINGUES, 2017) para identificação das proteínas recombinantes TcFOP e TcAPI5, respectivamente. Para a identificação de TcNTF2L foi utilizado o anticorpo anti-NTF2 obtido anteriormente

pele nosso grupo. E por fim, para a identificação de TcHYP foram utilizados os anticorpos anti-FLAG e anti-GFP, ambos Invitrogen. (FIGURA 27)

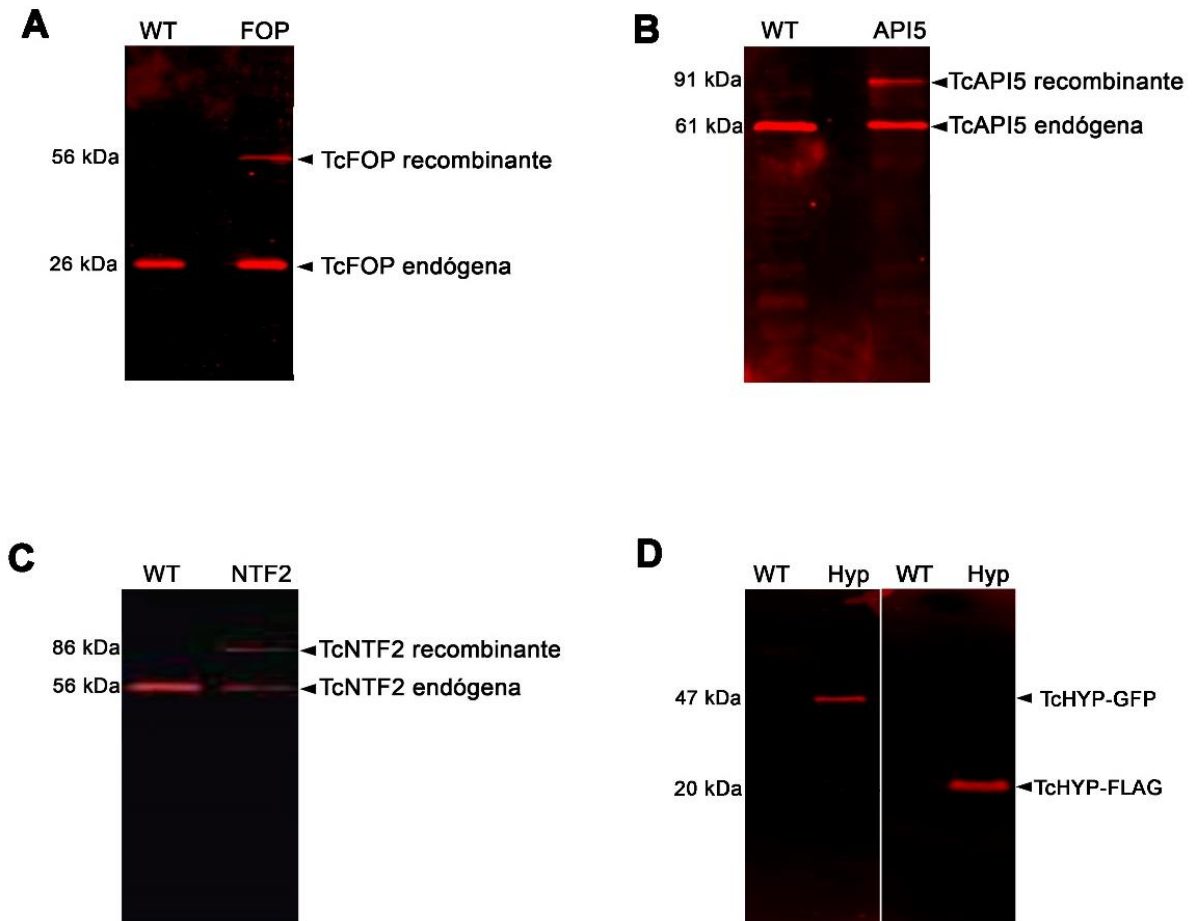


FIGURA 27. ANÁLISE POR WESTERN BLOT DOS TRANSFECTANTES EXPRESSANDO PROTEÍNAS FUSIONADA À GFP E/OU FLAG NAS EXTREMIDADES N E/OU C-TERMINAL. 5×10^6 células/canaleta. Marcador de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). (A) WT: Western blot anti-FOP (diluição 1:500) extrato proteico parasita selvagem. FOP: Western blot anti-FOP (diluição 1:500) extrato proteico parasita expressando TcFOP fusionada à GFP na extremidade N-terminal com tamanho esperado (~57 kDa). (B) WT: Western blot anti-API5 (diluição 1:500) extrato proteico parasita selvagem. API5: Western blot anti-API5 (diluição 1:500) extrato proteico parasita expressando TcAPI5 fusionada à GFP na extremidade N-terminal, com tamanho esperado (~91 kDa). (C) Western blot anti-NTF2 (diluição 1:500) extrato proteico parasita selvagem. NTF2: Western blot anti-NTF2 (diluição 1:500) extrato proteico parasita expressando TcNTF2L fusionada à GFP na extremidade N-terminal com tamanho esperado (~86 kDa). (D) WT: Western blot anti-GFP (diluição 1:500) extrato proteico parasita selvagem. HYP: Western blot anti-GFP (diluição 1:500) extrato proteico parasita expressando TcHYP fusionada à GFP na extremidade C-terminal com tamanho esperado (~47 kDa). WT: Western blot anti-FLAG (diluição 1:500) extrato proteico parasita selvagem. HYP: Western blot anti-FLAG extrato proteico parasita expressando TcHYP fusionada à FLAG na extremidade C-terminal com tamanho esperado (~20 kDa)

5.3. LOCALIZAÇÃO CELULAR DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP

Com o objetivo de avaliar a localização celular das proteínas alvo, foram utilizados anticorpos policlonais, anti-FOP e anti-API5 (DOMINGUES, 2017) e anticorpo monoclonal anti-GFP para as linhagens transfectantes expressando TcNTF2L e TcHYP fusionadas à GFP. A localização de TcHYP fusionada à etiqueta FLAG está ilustrado no ANEXO 3.

Os ensaios de imunofluorescência indireta demonstraram que TcFOP, TcAPI5 e TcHYP são proteínas nucleares, conforme demonstrado na figura 28, o sinal de fluorescência dos anticorpos primários se sobrepõe com a marcação nuclear fornecida por DAPI. Em contrapartida TcNTF2L mostra um padrão de distribuição citoplasmático.

Observamos também que a fusão de GFP, tanto na extremidade C-terminal quanto na extremidade N-terminal, das linhagens celulares de TcHYP não alteraram a localização da proteína. Portanto, passamos a utilizar nos demais experimentos apenas a linhagem expressando TcHYP fusionada à GFP na extremidade C-terminal.

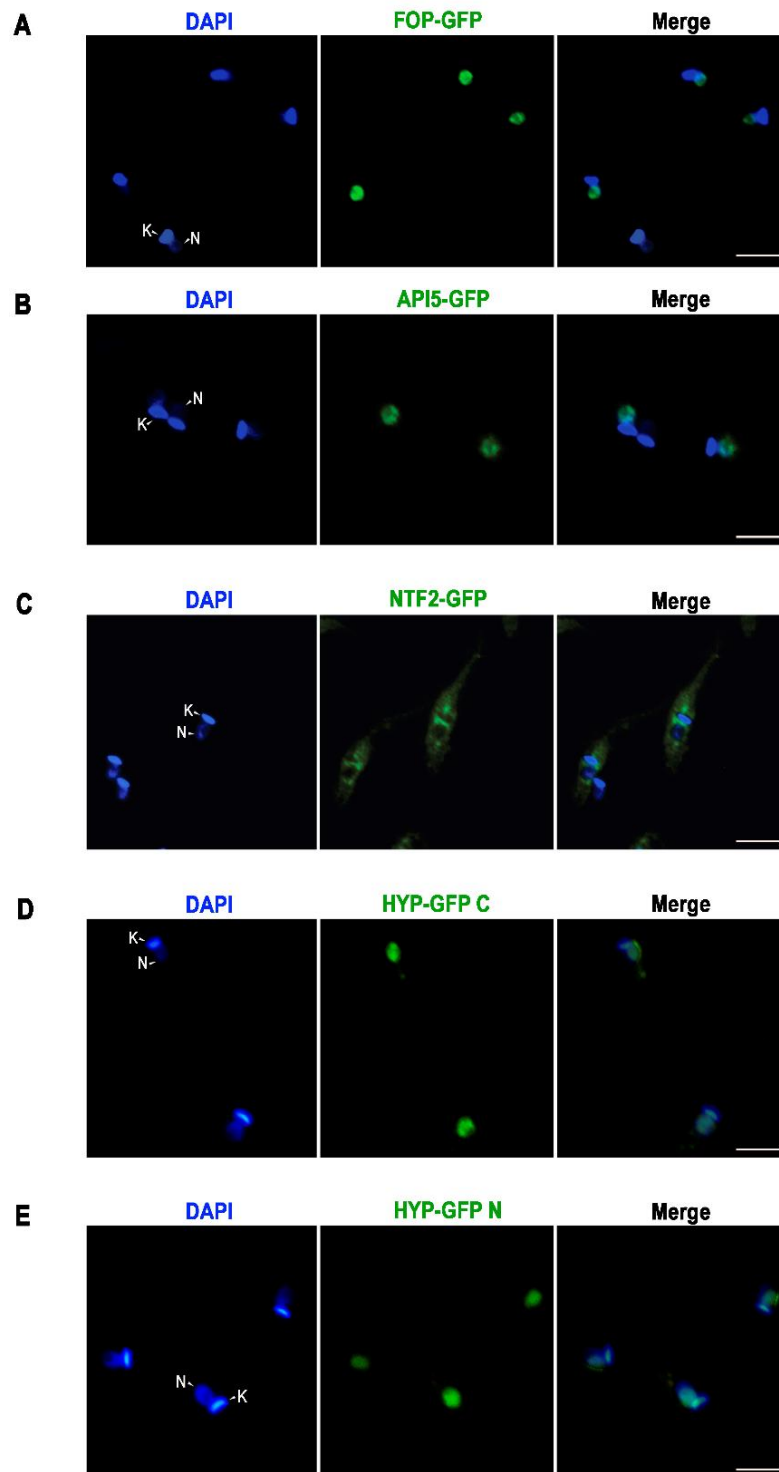


FIGURA 28. ANÁLISE DE LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALVO POR MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA. DAPI: DNA marcado com DAPI. Merge: sobreposição das imagens do material genético marcado com DAPI e localização das proteínas. A e B) Detecção de TcFOP (A) e TcAPI5 (B) foi realizada por meio de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos policlonais anti-TcFOP e anti-TcAPI5 (ambos na diluição de 1:200) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com Alexa 594 (Invitrogen, diluição de 1:600). Detecção de TcNTF2L (C), TcHYP fusionada à GFP na região C-terminal (D) e TcHYP fusionada à GFP na região N-terminal (E) foram feitas através da utilização de anticorpo monoclonal anti-GFP (Invitrogen, diluição 1:500) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com Alexa488 (Invitrogen, diluição 1:600). K: Cinetoplasto. N: Núcleo. Barra: 5 μ m.

5.3.1. *TcFOP, TcAPI5 e TcHYP colocalizam com TcSub2*

Conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo, TcSub2 é uma proteína nuclear essencial para exportação de mRNA e sobrevivência do parasita (SERPELONI *et al.*, 2011b).

Com base na informação de que TcFOP, TcAPI5 e TcHYP são proteínas nucleares e foram identificadas nos complexos proteicos de TcSub2, analisamos a possibilidade dessas proteínas possuírem um padrão de distribuição nuclear semelhante ao padrão de distribuição de TcSub2.

Para tanto, utilizamos as linhagens transfectantes de TcFOP, TcAPI5 (DOMINGUES, 2017) e TcHYP fusionadas à GFP, e o anticorpo policlonal anti-TcSub2 produzido em coelho, previamente obtido pelo nosso grupo.

Por meio de imunofluorescência indireta, com obtenção das imagens por microscopia confocal, da Plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, observamos que as proteínas alvo possuem o mesmo padrão de distribuição que TcSub2 (FIGURA 29). De acordo com os gráficos que quantificam a intensidade de fluorescência, podemos inferir que as proteínas colocalizam, indicando que TcFOP, TcAPI5 e TcHYP devem interagir direta ou indiretamente com TcSub2.

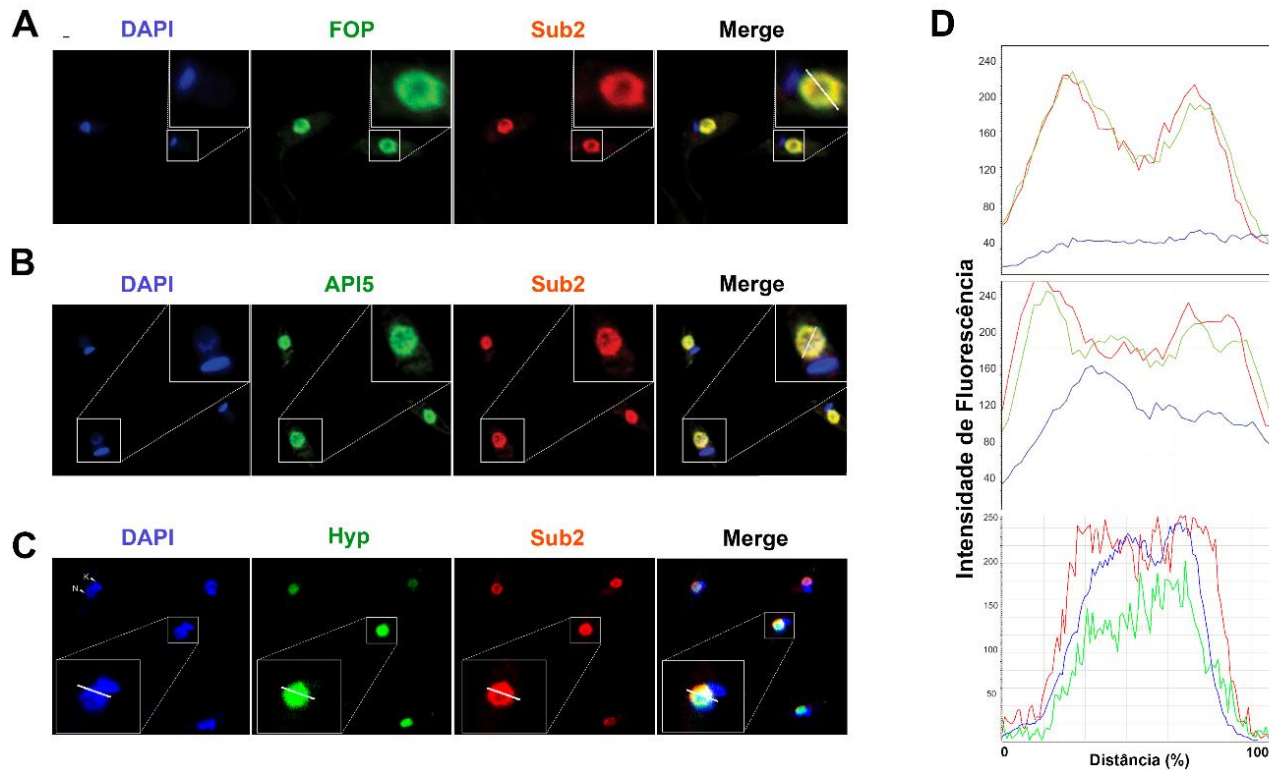


FIGURA 29. ANÁLISE DE COLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL EM *T. cruzi*. A e B) Colocalização entre TcFOP/TcAPI5 com TcSub2. DAPI: marcação do material genético. FOP/API5: detecção de TcFOP e TcAPI5 por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-TcFOP e anti-TcAPI5 (mouse, diluição 1:400) e anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:500). Sub2: detecção de TcSub2 localizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-TcSub2 (rabbit, diluição 1:600) e anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Alexa 546 (Invitrogen, diluição 1:500). MERGE: colocalização das imagens para DAPI, TcFOP ou TcAPI5 e TcSub2. Barra: 10 μ m. C) Colocalização entre TcHYP e TcSub2. DAPI: marcação do material genético. Hyp: detecção de TcHYP fusionada à GFP por imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-GFP mouse (Invitrogen, diluição 1:200). Sub2: detecção de TcSub2 localizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-TcSub2 (rabbit, diluição 1:600) e anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Alexa 546 (Invitrogen, diluição 1:500). MERGE: Colocalização das imagens para DAPI, TcHYP e TcSub2. K: cinetoplasto. N: núcleo. Barra: 10 μ m. E) Gráfico, mostrando, respectivamente, a quantificação da intensidade de fluorescência de DAPI (azul), TcFOP, TcAPI5 e TcHYP (verde), TcSub2 (vermelho).

5.3.2. *TcNTF2L* colocaliza com *TcelF4AIII*

Do mesmo modo, vimos que *TcNTF2L* é uma proteína citoplasmática que foi identificada nos complexos proteicos de *TcelF4AIII*, proteína descrita anteriormente pelo nosso grupo, como componente do EJC, que migra entre núcleo e citoplasma (INOUE *et al.*, 2014).

Também com o intuito de avaliar se o padrão de distribuição de *TcNTF2L* é semelhante ao padrão de distribuição citoplasmática observado para *TcelF4AIII*, utilizamos a linhagem de *TcelF4AIII* fusionada à PTP e o anticorpo policlonal anti-NTF2, ambos obtidos anteriormente. Conforme observado no gráfico de intensidade de fluorescência (FIGURA 30) podemos inferir que *TcNTF2L* e *TcelF4AIII* colocalizam.

Levando em consideração o fato de que *TcNTF2L* possui um domínio conservado que está presente em receptores de exportação e a sua colocalização com *TcelF4AIII*, levantamos a hipótese de que *TcNTF2L* seja um componente da via de exportação de mRNA que também possui a capacidade de migrar entre núcleo e citoplasma.

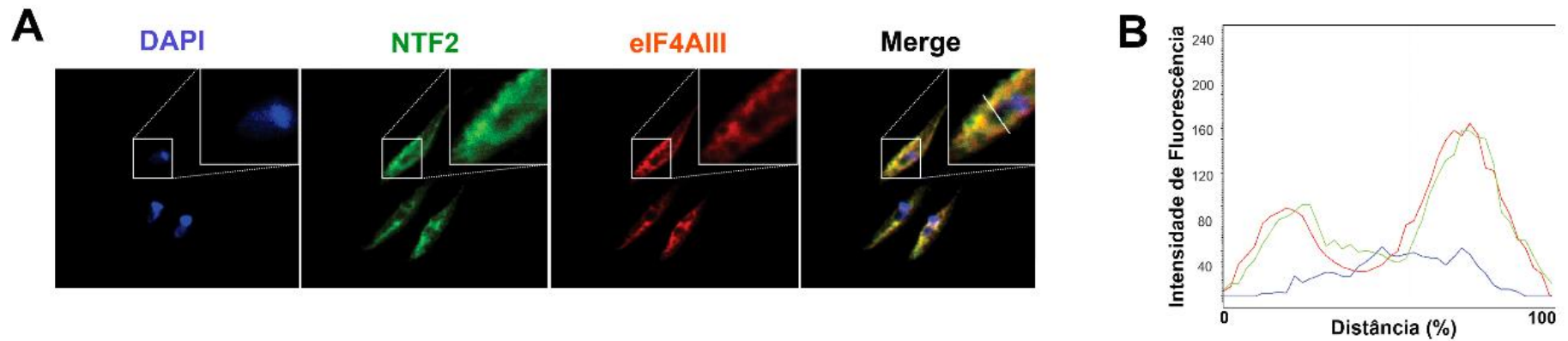


FIGURA 30. ANÁLISE DE COLOCALIZAÇÃO DE TcNtf2L E TceIF4AIII ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA CONFOCAL EM *T. cruzi*. A) Colocalização entre TcNtf2L e TceIF4AIII. DAPI: marcação do material genético. NTF2: detecção de TcNtf2L por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-TcNtf2L (mouse, diluição de 1:500) e anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição de 1:500). TceIF4AIII: detecção de TceIF4AIII por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo monoclonal anti-Proteína A (rabbit, diluição 1:500) e anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado com Alexa 546 (Invitrogen, diluição 1:500). MERGE: Colocalização das imagens para DAPI, TceIF4AIII e TcNtf2L. Barra 7.5 μ m. B) Gráfico, mostrando respectivamente, a quantificação da intensidade de fluorescência de DAPI (azul), TcNtf2L (verde), TceIF4AIII (vermelho).

5.4. ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5, TCNTF2L E TCHYP

Para ajudar na compreensão do papel biológico e confirmar a interação destas proteínas com a maquinaria de exportação de mRNA, investimos em abordagens de isolamento dos complexos proteicos por imunoprecipitação (IP) acoplada à espectrometria de massas, usando como isca as proteínas fusionadas à GFP.

Com intuito de padronizar os ensaios de IP, foram testados tampões com diferentes detergentes e sais em diferentes concentrações, visando estabelecer a melhor condição para minimizar a fragmentação dos complexos proteicos (ANEXO 4). A padronização dos ensaios de imunoprecipitação para TcFOP e TcAPI5 foram feitas anteriormente (DOMINGUES, 2017).

Observou-se melhor resultado com a utilização de tampão citrato (50 mM citrato de sódio, 20 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 10 µM CaCl₂, 0,5% Triton X-100 (para lise), 0,1% Triton X-100 (para lavagens) ambos contendo o inibidor de protease (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche).

Para TcFOP e TcAPI5 foi acrescido 10% de glicerol ao tampão citrato. Ao adicionar glicerol a uma solução proteica, ele promove a compactação da proteína e reduz a flexibilidade da mesma (VAGENENDE, YAP E TROUT, 2009). De acordo com a literatura, ensaios de *pull-down* da proteína FOP de humanos (HsCHTOP) obteve-se grande êxito com o acréscimo de glicerol ao tampão utilizado (CHANG *et al.*, 2013).

Após ensaio de imunoprecipitação, conseguimos observar em SDS-PAGE um enriquecimento nas amostras eluídas correspondentes ao tamanho de TcFOP (Figura 31A, com aproximadamente 56 kDa), TcAPI5 (Figura 31B, com aproximadamente 91 kDa), TcNTF2L (Figura 31C, com aproximadamente 87 kDa) e TcHYP (Figura 31D, com aproximadamente 47 kDa).

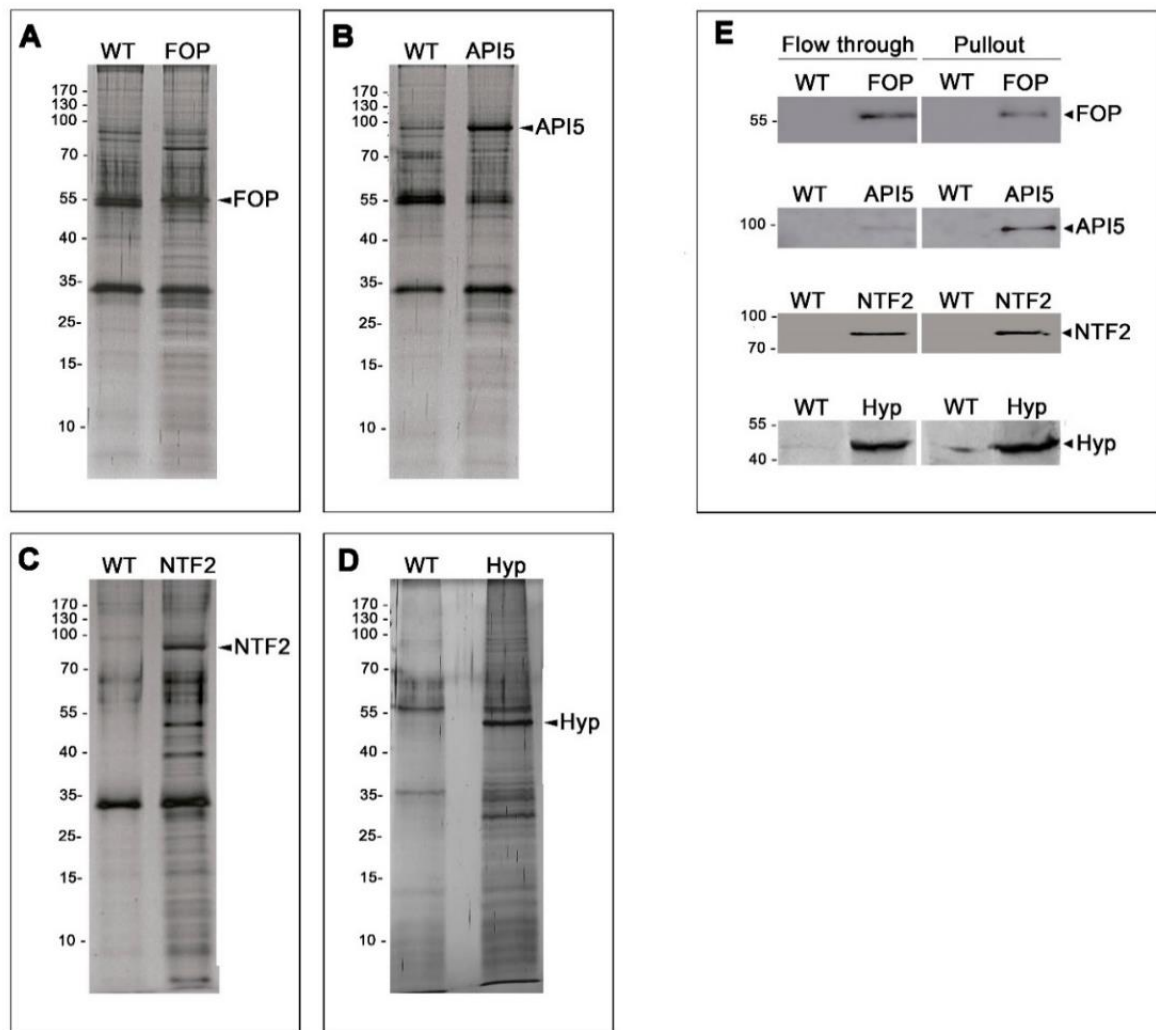


FIGURA 31. IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5 E TcNTF2L. IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5 E TcNTF2L. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 13%. (A) Imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP. WT: Extrato proteico do parasita selvagem. FOP: Extrato proteico do parasita transfectante expressando TcFOP fusionado à GFP. (B) Imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcAPI5. WT: Extrato proteico do parasita selvagem. API5: Extrato proteico do parasita transfectante expressando TcAPI5 fusionado à GFP. (C) Imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcNTF2L. WT: Extrato proteico do parasita selvagem. NTF2: Extrato proteico do parasita transfectante expressando TcNTF2L fusionado à GFP. (D) Imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcHYP. WT: Extrato proteico do parasita selvagem. Hyp: Extrato proteico do parasita transfectante expressando TcHYP fusionado à GFP. (E) Os isolados de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP foram analisados por western blot marcados com anticorpo anti-FOP mouse (TcFOP), anti-API5 mouse (TcAPI5), anti-NTF2 mouse (TcNTF2L) e anti-GFP (TcHYP). A detecção foi realizada com anticorpo secundário IgG total IRDye® (LI-COR)

5.4.1. *Fatores diretamente associados a biogênese do mRNA estão igualmente presentes nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP*

Os complexos proteicos imunoprecipitados foram submetidos à análise por espectrometria de massas, conforme descrito no item 4.10.4. Como esperado, TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP se mostraram como as proteínas mais abundantes dos respectivos complexos proteicos, ou seja, com maior número de peptídeos identificados.

Interessantemente, diversos fatores diretamente associados ao processamento, exportação, controle de qualidade e tradução de mRNA foram identificados em todos os complexos proteicos.

Com a sobreposição dos dados gerados pelas análises de espectrometria de massas, foi criado um diagrama de Venn, onde foram consideradas as proteínas identificadas nas IPs de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP com *fold change* ≥ 2 (FIGURA 32). Podemos observar no diagrama, que inúmeras proteínas se encontram presentes em dois ou mais dos complexos proteicos analisados, reforçando nossa hipótese de um “core” proteico responsável pela exportação de mRNA com a presença de proteínas conservadas e proteínas divergentes, mostrando a peculiaridade na regulação da expressão gênica destes organismos.

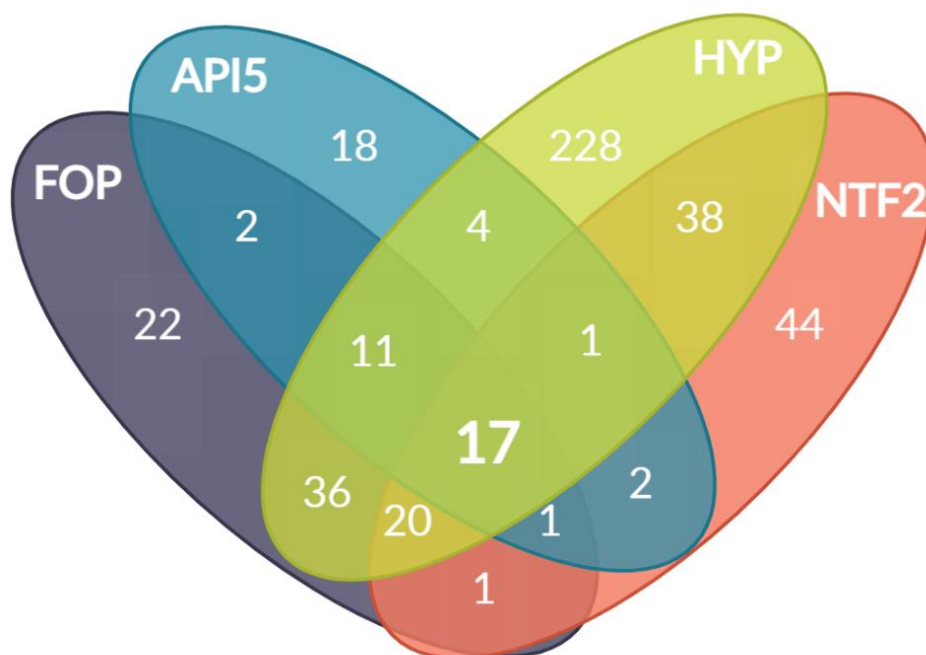


FIGURA 32. DIAGRAMA DE VENN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR IMUNOPRECIPITAÇÃO ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS. Diagrama mostrando proteínas em comum identificadas nas imunoprecipitações de FOP, API5, NTF2 e HYP *com fold change* ≥ 2 .

Com o auxílio do software Cytoscape (disponível em <https://cytoscape.org>) a partir de dados das análises das imunoprecipitações de TcSub2, TcelF4AIII (obtidos anteriormente pelo nosso grupo) juntamente com os dados das imunoprecipitações de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP identificamos um grande interatoma que ilustra as interações entre proteínas conservadas e divergentes (FIGURA 33).

Dentre as proteínas conservadas encontram-se TcSub2, TcelF4AIII, diversas proteínas de ligação ao RNA e componentes do EJC. As proteínas específicas de linhagem incluem TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP.

TcFOP, TcAPI5 e TcHYP interagem diretamente com TcSub2 e TcNTF2L parece ser uma proteína de transporte que interage com TcelF4AIII e o receptor de exportação TcMex67.

Estão presentes no interatoma proteínas associadas à cromatina, componentes de NPGs e várias proteínas de ligação ao RNA. A identificação de proteínas presentes em toda a jornada da biogênese do mRNA indica um sistema altamente integrado.

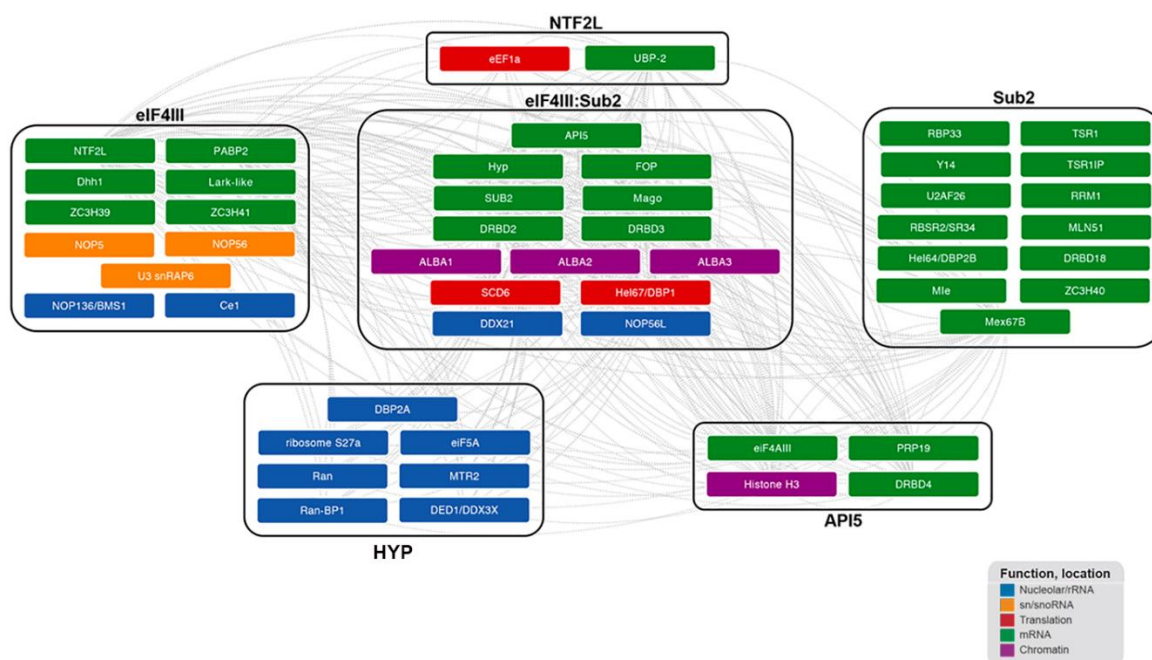


FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO INTERATOMA DO MAQUINÁRIO DE EXPORTAÇÃO DE mRNA EM *T. cruzi*. As coortes foram organizadas conforme identificadas nas imunoprecipitações dos complexos proteicos de TcSub2, TceIF4AIII, TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP, e coloridas pela função e localização previstas no TrypTag, espectrometria de massas ou evidência experimental direta. As caixas maiores representam um único interatoma. As linhas pontilhadas indicam a interações entre as proteínas identificadas. Por uma questão didática, muitas outras interações potenciais foram omitidas (INOUE *et al.*, submetido)

A tabela 6 mostra os fatores concomitantemente presentes nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP. Dentre os quais destacam-se proteínas como DRBD3 e DRBD4, ambas proteínas essenciais que possuem um importante papel no processamento de mRNA afetando sua estabilidade, aumentando ou diminuindo a meia-vida dos mRNAs alvo. A depleção destas proteínas causa uma diminuição tanto no SLRNA quanto na estrutura intermediária em Y (STERN *et al.*, 2009, revisto por CLAYTON, 2019).

Observamos também a presença de DRBD2, uma proteína de ligação ao RNA cuja sua ortóloga em leveduras (Gbp2) está envolvida no controle de qualidade e exportação de mRNAs recém processados (HACKMANN *et al.*, 2014). Em *T. cruzi*, DRBD2 parece estar envolvida na regulação do metabolismo do RNA, uma vez que foram identificadas diversas proteínas regulatórias em seus complexos proteicos imunoprecipitados (WIPPEL *et al.*, 2019).

Interessantemente, observamos também a presença de TcelF4AIII em todos os complexos proteicos analisados. Em metazoários, eIF4AIII é um componente do EJC com múltiplas funções no metabolismo de mRNA. Inoue e colaboradores (submetido) confirmaram a ortologia de TcelF4AIII com eIF4AIII (*Homo sapiens*) e Fal1 (*Saccharomyces cerevisiae*).

TABELA 6. PROTEÍNAS PRESENTES NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L E TcHYP

Proteínas em comum presentes nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP		
Proteína	Anotação TriTrypDB	<i>T. cruzi</i> CL Brener ID
NTF2	hypothetical protein, conserved	TcCLB.511367.220
eIF4AIII	ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative	TcCLB.506587.40
DRBD4	polypyrimidine tract-binding protein, putative	TcCLB.511727.160
	metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	TcCLB.509859.40
Tc38	Putative vacuolar protein	TcCLB.511287.110
ZC3H40	RNA-binding protein, putative	TcCLB.506211.60
hypothetical protein	hypothetical protein, conserved	TcCLB.510609.20
TBRGG1	Mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	TcCLB.507927.20
DRBD3	Double RNA binding domain protein 3 (fragment)	TcCLB.506649.80
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	TcCLB.511109.130
gBP21	guide RNA-binding protein of 21 kDa	TcCLB.509831.36
DRBD2	RNA-binding protein, putative	TcCLB.510755.120
MRP2	mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	TcCLB.510359.270
Dhh1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcCLB.506959.30
PABP2	polyadenylate-binding protein, putative	TcCLB.508461.140
SCD6	hypothetical protein SCD6.10	TcCLB.507093.300
	polyubiquitin, putative, degenerate	TcCLB.505169.10

Proteínas encontradas em comum nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP.

As tabelas 7, 8, 9 e 10 ilustram, de forma simplificada, a presença de outros fatores envolvidos na biogênese de RNA, representados em um ou mais dos complexos proteicos analisados (vide ANEXO 5 para tabelas filtradas para a identificação de proteínas presentes nos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP).

Dentre os dados obtidos destacamos as proteínas Sub2, um componente do complexo de TRanscrição/Exportação (TREX) que desempenha um papel essencial no recrutamento do receptor de exportação de mRNA (Mex67) (VIPAKHONE *et al.*, 2015). Tripanossomatídeos possuem três parálogos para Mex67 (KRAMER *et al.*, 2010) e interessante apenas um dos parálogos (Mex67B) foi identificado nos complexos proteicos analisados, sugerindo especificidade entre os interatores de exportação de mRNA.

Também observamos a presença da proteína MTR2, que forma o heterodímero com Mex67. Assim como componentes do complexo EJC, eIF4AIII, Magoh, Y14 e MLN51, presentes em um ou mais dos complexos proteicos analisados.

Os dados também mostram a presença de proteínas que atuam diretamente no processamento de mRNA como RRM1, U2AF26, TSR1. Proteínas *Zinc Finger* que se ligam mutuamente ao mRNA regulando o ciclo celular, como ZC3H39 e ZC3H40 (revisto por CLAYTON, 2019), também são encontradas nos complexos analisados.

Esses dados corroboram a nossa hipótese da participação efetiva de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP no “core” proteico responsável pela exportação de mRNA.

TABELA 7. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcFOP

COMPLEXO PROTEICO DE TcFOP		
Designação ¹	Localização, anotação ²	TriTryp ID
FOP	Nuclear, Zn finger CCCH	TcCLB.509033.80
Importin - beta	importin beta-1 subunit, putative	TcCLB.504105.150
eiF4AIII	Nuclear/Nucleolar ATP-dependent RNA helicase FAL1	TcCLB.506587.40
Mago	Nuclear, Mago nashi	TcCLB.506945.200
NAP	nucleosome assembly protein (NAP), putative	TcCLB.509003.10
Importin alfa	Importin subunit alpha	TcCLB.509057.20
DRBD4	polypyrimidine tract-binding protein, putative	TcCLB.511727.160
hnRNPH	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	TcCLB.511109.130
NRBD	nuclear RNA binding domain	TcCLB.511727.290
Dhh1	Cytoplasmic, ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	TcCLB.506959.30
Hel67/DDX3/DBP1	Nuclear/cytoplasmic, ATP-dependent RNA helicase Hel67/DDX3	TcCLB.506213.120
NOP5	Nucleolar, pre-snoRNA splicing protein, NOP domain	TcCLB.508277.230
ZC3H40	RNA-binding protein, putative	TcCLB.506211.60
ZC3H39	RNA-binding protein, putative	TcCLB.508895.50
DRBD3	Nuclear/cytoplasmic, double RNA-binding domain protein 3	TcCLB.506649.80
SCD6	Cytoplasmic, LSm domain, Trailer hitch protein	TcCLB.507093.300
RBP42	RNA-binding protein 42 (RNA-binding motif protein 42), putative	TcCLB.509167.140
Hyp	Unknown, low complexity regions	TcCLB.506435.150
snoRBP	Nucleolar RNA-binding protein, putative	TcCLB.507649.80
RBP2	DNA-directed RNA polymerase III subunit, putative	TcCLB.505997.210
RNA Hel II	nucleolar RNA helicase II, putative	TcCLB.506123.40
RBP42	RNA-binding protein 42 (RNA-binding motif protein 42)	TcCLB.509167.140
DBP2A	ATP-dependent RNA helicase DBP2A, putative	TcCLB.510187.290
SmD2	small nuclear ribonucleoprotein SmD2, putative	TcCLB.511189.80
DRBD2	Nuclear, Double RNA-binding domain protein 2	TcCLB.510755.120
ALBA3	ALBA3	TcCLB.510877.30
NTF2	Cytoplasmic, RNA binding, N-terminal NTF2 domain	TcCLB.511367.220
SUB2	Nuclear, ATP-dependent RNA helicase SUB2	TcCLB.508319.40
PABP2	Cytoplasmic (granules), polyadenylate-binding protein	TcCLB.508461.140
NOP56	Nucleolar, ribosomal biogenesis	TcCLB.506189.10
RRM1	RNA-binding protein, putative	TcCLB.511621.50
API5	Nuclear, mRNA binding, ARM repeats	TcCLB.511807.280
kZFP2	poly-zinc finger protein 2, putative	TcCLB.509731.10

¹Nome da proteína de acordo com o domínio conservado identificado usando INTERPRO, HMMER, PFAM ou ortólogo na base de dados NCBI. ²Localização com base em TrypTag, espectrometria de massa ou evidência experimental direta. Restrito a evidências de *T. cruzi* ou *T. brucei*, exceto no caso de ortólogos altamente conservados, onde evidências de células animais ou fúngicas são aceitas. Destacam-se proteínas associadas ao mRNA (verde), Fatores de trans-splicing (sublinhados). rRNA nucleolares (azul). Fatores de tradução (vermelho). Sn/snoRNA (laranja). Fatores associados à cromatina (roxo). Fatores específicos de tripanossomatídeos (negrito). Fatores presentes em grânulos nucleares periféricos (itálico). Adaptado de INOUE *et al.* (submetido).

TABELA 8. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcAPI5

COMPLEXO PROTEICO DE TcAPI5		
Designação¹	Localização, anotação²	TriTryp ID
API5	Nuclear, mRNA binding, ARM repeats	TcCLB.511807.280
FOP	Nuclear, Zn finger CCCH	TcCLB.509033.80
Mex67B	Cytoplasmic/nuclear Mex67B	TcCLB.506127.50
eiF4AIII	Nuclear/Nucleolar ATP-dependent RNA helicase FAL1	TcCLB.506587.40
DRBD4	polypyrimidine tract-binding protein, putative	TcCLB.511727.160
Hyp	Unknown, low complexity regions	TcCLB.506435.150
Mago	Nuclear, Mago nashi	TcCLB.506945.200
Fibrillarlin	nucleolar RNA binding protein, putative	TcCLB.508277.230
DRBD3	Nuclear/cytoplasmic, double RNA-binding domain protein 3	TcCLB.508349.39
SMD3	small nuclear ribonucleoprotein sm d3	TcCLB.508257.150
UBP-2	U-rich RNA-binding protein, mRNA destabiliser	TcCLB.507093.229
SUB2	Nuclear, ATP-dependent RNA helicase SUB2	TcCLB.508319.40
SCD6	Cytoplasmic, LSm domain, Trailer hitch protein	TcCLB.507093.300
NTF2	Cytoplasmic, RNA binding, N-terminal NTF2 domain	TcCLB.511367.220
ZC3H40	RNA-binding protein, putative	TcCLB.508895.60
Dhh1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcCLB.506959.30
PABP2	Cytoplasmic (granules), polyadenylate-binding protein	TcCLB.508461.140
PRP19	Nuclear, PRP19 domain, WD40 repeats	TcCLB.509103.10
Histone H3	Nuclear, histone H3	TcCLB.505931.50

¹Nome da proteína de acordo com o domínio conservado identificado usando INTERPRO, HMMER, PFAM ou ortólogo na base de dados NCBI. ²Localização com base em TrypTag, espectrometria de massa ou evidência experimental direta. Restrito a evidências de *T. cruzi* ou *T. brucei*, exceto no caso de ortólogos altamente conservados, onde evidências de células animais ou fúngicas são aceitas. Destacam-se proteínas associadas ao mRNA (verde), Fatores de trans-splicing (sublinhados). rRNA nucleolares (azul). Fatores de tradução (vermelho). Sn/snoRNA (laranja). Fatores associados à cromatina (roxo). Fatores específicos de tripanossomatídeos (negrito). Fatores presentes em grânulos nucleares periféricos (itálico). Adaptado de INOUE *et al.* (submetido).

TABELA 9. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcNTF2L

COMPLEXO PROTEICO DE TcNTF2L		
Designação ¹	Localização, anotação ²	TriTryp ID
NTF2	Cytoplasmic, RNA binding, N-terminal NTF2 domain	TcCLB.511367.220
<i>PABP2</i>	Cytoplasmic (granules), polyadenylate-binding protein	TcCLB.508461.140
<i>DRBD2</i>	Nuclear, Double RNA-binding domain protein 2	TcCLB.510755.120
<i>Tc38</i>	Nucleolar/cytoplasmic, RNA-binding	TcCLB.503833.50
ALBA4	DNA/RNA-binding protein Alba 4	TcCLB.510877.40
Hel67/DDX3/DBP1	Nuclear/cytoplasmic, ATP-dependent RNA helicase Hel67/DDX3	TcCLB.511285.120
<i>ZC3H41</i>	Cytoplasmic, Zn-finger and RNA helicase, ZC3H41	TcCLB.508355.330
<i>DRBD4</i>	polypyrimidine tract-binding protein, putative	TcCLB.511727.160
<i>RBP</i>	RNA-binding protein, putative	TcCLB.509317.60
eEF1a	Cytoplasmic, elongation factor 1a	TcCLB.511369.10
<i>Nonsense Reg</i>	regulator of nonsense transcripts 1	TcCLB.511317.30
<i>ZC3H39</i>	RNA-binding protein, putative	TcCLB.508895.50
<i>ZC3H40</i>	RNA-binding protein, putative	TcCLB.508895.60
PABP1	polyadenylate-binding protein 1, putative	TcCLB.506885.70
Hel67/DDX3/DBP1	Nuclear/cytoplasmic, ATP-dependent RNA helicase Hel67/DDX3	TcCLB.506213.120
<i>PUM</i>	pumilio protein, putative	TcCLB.507049.199
<i>Ran</i>	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	TcCLB.509455.80
<i>PUF6</i>	pumilio/PUF RNA binding protein 6, putative	TcCLB.510125.10
<i>snoRBP</i>	nucleolar RNA-binding protein, putative	TcCLB.507649.80
<i>ZFP2</i>	zinc finger protein 2, putative	TcCLB.503989.10
CAP - methyltransferase	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase, putative	TcCLB.508799.80
<i>RBP31</i>	RNA-binding protein, putative	TcCLB.510007.30
<i>u2af26</i>	U2 splicing auxiliary factor, putative	TcCLB.510943.60
<i>UBP-2</i>	U-rich RNA-binding protein, mRNA destabiliser	TcCLB.507093.229
Histone H2B	histone H2B, putative	TcCLB.511635.20
RNA Hel II	nucleolar RNA helicase II, putative	TcCLB.506123.40
<i>PUF2</i>	pumilio/PUF RNA binding protein 2, putative	TcCLB.511261.120
<i>eIF4AIII</i>	Nuclear/Nucleolar ATP-dependent RNA helicase FAL1	TcCLB.506587.40
<i>RRM1</i>	RNA-binding protein, putative	TcCLB.511621.50
<i>DED1</i>	ATP-dependent RNA helicase, putative	TcCLB.510661.90
Histone H2A	histone H2A, putative (fragment)	TcCLB.508321.11
PBP1	PAB1-binding protein	TcCLB.511409.10

¹Nome da proteína de acordo com o domínio conservado identificado usando INTERPRO, HMMER, PFAM ou ortólogo na base de dados NCBI. ²Localização com base em TrypTag, espectrometria de massa ou evidência experimental direta. Restrito a evidências de *T. cruzi* ou *T. brucei*, exceto no caso de ortólogos altamente conservados, onde evidências de células animais ou fúngicas são aceitas. Destacam-se proteínas associadas ao mRNA (verde), Fatores de trans-*splicing* (sublinhados). rRNA nucleolares (azul). Fatores de tradução (vermelho). Sn/snoRNA (laranja). Fatores associados à cromatina (roxo). Fatores específicos de tripanossomatídeos (negrito). Fatores presentes em grânulos nucleares periféricos (itálico). Adaptado de INOUE *et al*, (submetido).

TABELA 10. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NOS COMPLEXOS PROTEICOS DE TcHYP

COMPLEXO PROTEICO DE TcHYP		
Designação ¹	Localização, anotação ²	TriTryp ID
Hyp	Unknown, low complexity regions	TcCLB.506435.150
Mex67B	Cytoplasmic/nuclear Mex67B	TcCLB.506127.50
S27a	ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative	TcCLB.510409.39
PABP1	polyadenylate-binding protein 1, putative	TcCLB.506885.70
DED1	ATP-dependent RNA helicase, putative	TcCLB.510661.90
SUB2	Nuclear, ATP-dependent RNA helicase SUB2	TcCLB.508319.40
hnRNPH	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	TcCLB.511109.130
ZC3H40	RNA-binding protein, putative	TcCLB.508895.60
eiF4AIII	Nuclear/Nucleolar ATP-dependent RNA helicase FAL1	TcCLB.506587.40
RanBP1	Ran-binding protein 1, putative	TcCLB.507099.30
DBP2A	ATP-dependent RNA helicase DBP2A,	TcCLB.510187.290
MTR2	mRNA transport regulator MTR2, putative	TcCLB.508173.180
RiboHII	ribonuclease HII, putative	TcCLB.510287.60
eIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	TcCLB.506925.130
snoRBP	nucleolar RNA-binding protein, putative	TcCLB.507649.80
Fibrillarlin	Nucleolar RNA binding protein, putative	TcCLB.508277.230
FOP	Nuclear, Zn finger CCCH	TcCLB.509033.80
NOP56	Nucleolar, ribosomal biogenesis	TcCLB.506189.10
RNA Hel	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcCLB.507641.120
DRBD2	RNA-binding protein, putative	TcCLB.510755.120
eEF1-beta	translation elongation factor 1-beta, putative	TcCLB.509733.100;
snoRBP	nucleolar RNA-binding protein, putative	TcCLB.510859.17
NTF2	Cytoplasmic, RNA binding, N-terminal NTF2 domain	TcCLB.511367.220
PABP2	Cytoplasmic (granules), polyadenylate-binding protein	TcCLB.508461.140
eiF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-1	TcCLB.511585.190
eEF1-gamma	elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma, pseudogene), putative	TcCLB.506459.290
DRBD2	Nuclear, Double RNA-binding domain protein 2	TcCLB.510755.120
Ran	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	TcCLB.509455.80
RRM1	RNA-binding protein, putative	TcCLB.511621.50
HEL67	ATP-dependent RNA helicase HEL67	TcCLB.511285.120
eEF1-alfa	elongation factor 1-alpha, putative	TcCLB.510119.20
Histone H4	histone H4, putative	TcCLB.508203.29
Histone H3	Nuclear, histone H3	TcCLB.505931.50
Histone H2B	histone H2B, putative	TcCLB.511635.20
SCD6	Cytoplasmic, LSm domain, Trailer hitch protein	TcCLB.507093.300
DUF 1126	Repeat of unknown function (DUF1126)/EF-hand domain pair, putative	TcCLB.510797.30
NUP59	Nucleoporin NUP59	TcCLB.506301.30

¹Nome da proteína de acordo com o domínio conservado identificado usando INTERPRO, HMMER, PFAM ou ortólogo na base de dados NCBI. ²Localização com base em TrypTag, espectrometria de massa ou evidência experimental direta. Restrito a evidências de *T. cruzi* ou *T. brucei*, exceto no caso de ortólogos altamente conservados, onde evidências de células animais ou fúngicas são aceitas. Destacam-se proteínas associadas ao mRNA (verde), Fatores de trans-*splicing* (sublinhados). rRNA nucleolares (azul). Fatores de tradução (vermelho). Sn/snoRNA (laranja). Fatores associados à cromatina (roxo). Fatores específicos de tripanossomatídeos (negrito). Fatores presentes em grânulos nucleares periféricos (itálico). Adaptado de INOUE *et al*, (submetido)

5.4.2. Interação de TcNTF2L com proteínas nucleares

Nos dados apresentados na tabela 5, destacamos também a presença de NTF2 em todos os complexos proteicos analisados. Este fato chama a atenção uma vez que TcNTF2L possui uma localização citoplasmática, enquanto TcFOP, TcAPI5 e TcHYP são proteínas nucleares.

TcNTF2L possui um domínio comum (NTF2) entre receptores de transporte, o qual interage com as Nups-FG do complexo de poro nuclear mediando o transporte núcleo-citoplasmático (FRIBOURG *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2007).

Com base nos dados obtidos pelos experimentos de imunoprecipitação dos complexos proteicos, levantamos a hipótese de que TcNTF2L possa ser uma proteína, que assim como TcelF4AIII, migre entre núcleo e citoplasma.

A análise dos complexos proteicos de TcNTF2L revela que além da presença de proteínas citoplasmáticas como TcelF4AIII, DHH1, PABP2 encontram-se também proteínas nucleares, como por exemplo Histonas, e o fatores associados ao *splicing* (U2AF26) e o complexo de remodelação de cromatina (ISWI), além de TcFOP, TcAPI5 e TcHYP.

TbNTF2 (Tb927.10.2240) foi co-purificada com o componente do complexo EJC, TbY14 (BERCOVICH *et al.*, 2009). E após inibição do trans-*splicing*, observou-se a presença de TbNTF2, juntamente com PABP2, DHH1 e SCD6, em estruturas denominadas de NPGs (*Nucleus Periphery Granules*) (GOOS *et al.*, 2019), sugerindo que a associação dessas proteínas nos NPGs estaria relacionada com o controle de qualidade da exportação de mRNA.

5.5. ANÁLISE DO FENÓTIPO CAUSADO PELO SILENCIAMENTO GÊNICO EM *T. brucei* DOS GENES ORTÓLOGOS DE TcFOP (TbFOP), TcAPI5 (TbAPI5), TcNTF2L (TbNTF2) E TcHYP (TbHYP) IDENTIFICADOS EM *T. cruzi*

Para as análises de genética reversa em estudos de função de genes, o nocaute pode ser inviável se o gene possuir função essencial, logo, métodos que induzem o silenciamento da expressão de proteínas também são úteis como uma estratégia para indicar a função do gene através do fenótipo causado.

Em tripanossomatídeos, um método eficiente para indução do silenciamento de um gene seria baseado no mecanismo de RNA de interferência estabelecido em *T. brucei* (ULLU, TSCHUDI E CHAKRABORTY, 2004; KOLEV, TSCHUDI E ULLU, 2011). Em virtude da ausência de maquinaria de RNA de interferência (RNAi) em *T. cruzi* (daROCHA *et al.*, 2003), uma abordagem alternativa à análise da função gênica é o estudo do fenótipo causado pelo silenciamento de genes ortólogos de *T. brucei* por meio de RNAi. Os resultados podem gerar evidências que estejam relacionadas à funcionalidade do gene em *T. cruzi* (NARDELLI *et al.*, 2007, SERPELONI *et al.*, 2011b). Por isso, neste trabalho optamos por esta abordagem para auxiliar no estudo da função dos genes a partir dos ortólogos em *T. brucei*.

5.5.1. Obtenção das linhagens transfectantes para ensaios de RNA de interferência

Uma análise de similaridade entre as proteínas em *T. cruzi* e *T. brucei* foi feita e a figura 34 mostra o alinhamento e o índice de similaridade entre TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP e suas ortólogas em *T. brucei*, com índices de similaridade de 79%, 72%, 47% e 53%, respectivamente.

A

TcFOP MRRGDFRRRLRLDLYRNVRRVRLALDARDGRRSGRDDIAPRRYVVSERRTRLEGFGRCGYVQVRSRRFRGRDPRIRRF
TbFOP MRRDFDRRLRLDLYRNVRRVRLALDARDGRRSGRDDIAPRRYVVSERRTRLEGFGYCDRQVRSRRSRDGGRRRF

TcFOP SDRGVYRRGALDRFEREDDERLRRER----FRERRLN--EGGLRFGRLRLRSERR--ELRQLR--EDRRLRELRALR--
TbFOP SDRRLFRSSAADRFARDEDLERQLRRRERRLRLRLERLERLERLERLRRDRDLRERLPLRGGVAMGRLLRRRLVEGRRRRLQRE

TcFOP -SAQRNQGNGDRRKGKLDKELDRYKDRGGRRGGGGRRGRCAPNS--VTKEGLDAELDRFRGNG
TbFOP NDRQRPOQPPORRKLDELQRTNRRSRGGNNSAHNKKEGARRSGPMTREGLDEQLDRFRCAA

B

TcAPI5 MAPKKKNASAAAAKEETECCAPAEVTTTPPTSPQTESLPS---ACNAVELYATHLOAAVSEDFVKINDFVRELLCALSD
TbAPI5 MPVKKKVAIAKNDKEDLTTSPVMAAETTPPTASPTMQHLDTPQGTTSASELYAVLOAAVSEDFPAKINDFAELIATTFVE

TcAPI5 AECPDAPLLRVRMLEEISKYGQHRDGNALKKVTSLVKILSGSEDTQOLLVAAVQGLSSLGPVSVLDDKWEYLSREGA
TbAPI5 AEKAEPTLLRVRMLEEFAKYGQHRDGNALKKVTSLVKILSGPDNTQOLLVAAVQGLAALGPVSMDDKWEYLSREGA

TcAPI5 DVLMQVMIDEE-FAESVROAASKALDSLQTAFRPVVTKLLHWISDRETEDEDQLKERRMATLRLRKAETPSLQCCW
TbAPI5 DVLMQVMIDENGFAEPVRSAAASKALDVLVSTAFRPVVTKLLHWISDREAEEDQLKERRMAMARLRKVAQNASFRPQW

TcAPI5 TEEVQEHVLSLIVRVLPVTVQEFVQLTSTAASLPTVRAHAGVFFLKAFLAONAINTRDRLVLESLSLIGHTGATPYDITVE
TbAPI5 TEEVQEHVLSLIVRVLSAVTTEFAQLARIAASLPSVSEKKG-PLLTAFLASTKINTDRALESLSLVACHVGAVAMDITVE

TcAPI5 VLEDAGLLTPVEKNTARGMWHAKVLLLAARJATPNDIKLYNAVLEQLAHVMHDGSALENMTTLEVLLEFAVMAAGQKK
TbAPI5 MLDEAGLLSAPVDGTTVRGMWHAKVLLLAARSATPNTDILYKTLLEHVMNLIDGNTLPEYLTLEALLIATVSGQKK

TcAPI5 PVEMKYLNDARFAKCMGLAELVAOMEPLLIYAVKRLQKSSAGQKDAEVLGCHNVRVILLSAFSAKHMFTGTTESWL
TbAPI5 PLDFVKOLKDKQFTAKORNMLAAVEKVEPLLIYAVKRLVOKSSAGAKAEMLGCHNRLILSSFSSHLPMGATTESWA

TcAPI5 HKMKLPSVKHARDPAATAKATETTAGTAGAAAGOLCVLPPPEGTEEHAKKRSRGOESGYNKNVNRKGGWNGNGYKRAE
TbAPI5 HKMKLPLVLRQRE-----GLLPSAKGERSYDAQL-----AVNKRPR--TESNYRQPSNR-----GSSRDLOGR

TcAPI5 -RGGVY
TbAPI5 SRGWKY

C

TcNTF2 MLGRDITVAG----VACSFLVYYREFVKEKEVVGIVELVGESSLITYAGYNEETTVAAGRHEIAQHLGKMDDALGRK
TbNTF2 MSITQSALGREWGVVACGFLVYYREFVKEKEVPLALDDMADNSHVVYAEVNEVNAQIVRGRHEILQHLKMDAALGRK

TcNTF2 VEVRFADFTPFGGCIHIVCOGILYLRGORRAFFQVEVLAPTOYRNTYHIALDYFRVMVVEVEQIPEDSIIMTFAOVAQ
TbNTF2 VEVRFADFSPAGGSVILVITQGIYVRSRKFVTOSEVFLAPTNRNTYHIASLYFRVLEHVEMERIPESGSIIMTFAOVAQ

TcNTF2 HLLFEHERRKRMESRE-----QLRRQQ-----AAEAALRLOQ-----TEEAARRHEFHQTRGEOEPHGRHHERQ
TbNTF2 HLLGEOERRKREEPAREHFLFLQKQKEQOQQOQMLQCADAEVMVQOENDRALAEENQSEAWDKHPRGQDRRGRKDYR

TcNTF2 N---NGTRNDGY-----GNNTSNRR-----DRVEVNDDRRGD-RITDRTLIRNEGSVSR---NNRP
TbNTF2 NRAPAGARSECVEEKERAEWEMCKPDESRTNEAEDDTAGEGNERNRWEQPRRSEPHKRPVVRKRNREGRRRAEGNDQNEV

TcNTF2 ERAERNNGRYDERNERGERRWEREDGMRGEFNDNVRARDERCVL-----ECBAPONTNP-----LRSRE
TbNTF2 GRPERKDRRDAEREPRGESRRG-HWGRNEEKVDNVDTANTRVTEGDAARSTGAACAASERTRNTFNRRPRDRFRRE

TcNTF2 Q-----DSTAVAKSENGGSKPSIARFVPRSKAALEKR---LEGRAETEBENINNRNDVAVSRRVSEBAA
TbNTF2 LQQEQQPAAPADSAAAVPATSAAADNKGDAGRNDHPLPRSEANRRGPGGSKAEKNNKKEAWASEKNANNGGAAPDAAA

TcNTF2 RRETRKKTAAATAAAAATGSTDNPARGRPQFNRTGSTDVRLVVRVPRVYVTLTDIKAAVTSVLGAEPIDAYWGRSSADQV
TbNTF2 AEBNVTPAEQRKKFPRSRADKKIAGEGTRLEPRKGEPTDVRLLDAPKQNE-QLSAAIKRITGEPKPKVVPVGRG-NDIV

TcNTF2 LQIRSSNAVEQLVRDVSIVLESRISAAKFYP
TbNTF2 CQLSIESAABALLEKPPVNVNICALRVARFYP

D

TcHYP MEIIDRPLSELIKEQKIGESLRKRRGHG--QONTFRNGRCSTRNRCGNRAMGRGSRGTAGNDQGRYRREPLRFRSNGG
TbHYP MEIIDRPLSELIKEQNDIACSLRNNRRGKGNQOQRPRGGARGAVTGG--NRGVSRPRRGLGRDRFREVDRLRLSRPRDG

TcHYP RFRRLGIGHDDRRGFNSRSWRRNAIDGDDRRDRSVKSTATOR-RRKAAFERNDVRELRRREALSRARSFRSD
TbHYP FFRFRPSSYG--RVLERR---RNAVDYGDVRSRVSVKSTDYLRERRLSGSERNERDNYORRREBELSRVRSFRSD

FIGURA 34. ALINHAMENTO ENTRE ORTÓLOGAS EM *T. cruzi* E *T. brucei*. (A) Alinhamento entre TcFOP (TcCLB509033.80) e TbFOP (Tb927.6.1470), com índice de similaridade 79%. (B) Alinhamento entre TcAPI5 (TcCLB511807.280) e TbAPI5 (Tb927.7.2240), com índice de similaridade 72%. (C) Alinhamento entre TcNTF2L (TcCLB.511367.220) e TbNTF2 (927.10.2240) com índice de similaridade 47%. (D) Alinhamento entre TcHYP (TcCLB.506435.150) e TbHYP (Tb927.04.3060) com índice de similaridade de 53%. Em preto destacam-se as regiões idênticas e em cinza as regiões similares.

Com o auxílio da ferramenta RNAit da base de dados do Trypanofan - Genômica funcional de *T. brucei* (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>) (REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003), as regiões alvo do mRNA de TbFOP (546 pb), TbAPI5 (468 pb), TbNTF2 (528 pb) e TbHYP (464 pb), foram escolhidas para clonagem em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002), conforme descrito no item 4.12.4.

Vale lembrar que as clonagens de fragmentos gênicos de TbFOP e TbAPI5 em vetor p2T7-177 foram obtidas previamente (DOMINGUES, 2015).

Para confirmar a clonagem dos insertos de TbNTF2 e TbHyp, neste trabalho, em vetor p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002), fizemos uma digestão diagnóstica com enzimas de restrição (*Xba*I para TbNTF2 e *Xho*I e *Xba*I par TbHYP) cujo sítios flanqueiam o inserto. A figura 35A mostra a liberação de fragmento com tamanho aproximado de 528 pb, referente ao inserto de TbNTF2, enquanto a figura 35B mostra a liberação de fragmento com tamanho aproximado de 500 pb referente ao inserto de TbHyp.

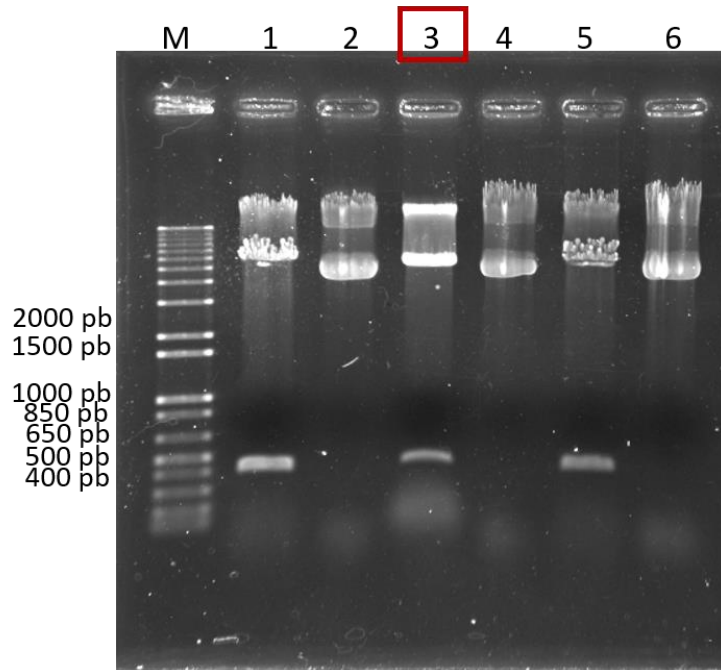
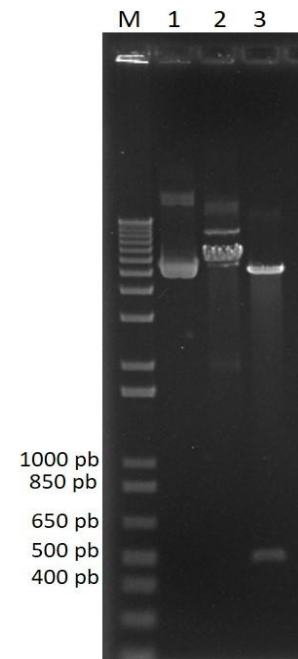
A**B**

FIGURA 35. DIGESTÃO DIAGNÓSTICA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DE CLONAGEM DE TbNTF2 E TbHyp EM VETOR p2T7-177. Gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídeos. M: Marcador de pares de bases 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) A. Digestão diagnóstica para confirmação de clonagem de inserto de TbNTF2 em vetor p2T7-177. 1: p2T7-177-TbNTF2#5 não digerido. 2: p2T7-177-TbNTF2#5 digerido com a enzima de restrição XbaI (New England BioLabs@Inc). 3: p2T7-177-TbNTF2#7 não digerido. 4: p2T7-177-TbNTF2#7 digerido com a enzima de restrição XbaI (New England BioLabs@Inc). 5: p2T7-177-TbNTF2#8 não digerido. 6: p2T7-177-TbNTF2#8 digerido com a enzima de restrição XbaI (New England BioLabs@Inc). a utilização da enzima de restrição libera inserto de aproximadamente 528 pares de bases. (B) Digestão diagnóstica para confirmação de clonagem de TbHyp em vetor p2T7-177. 1: Controle da digestão - p2T7-177-TbHyp#2 não digerido. 2: p2T7-177-TbHyp#2 digerido com NotI (New England BioLabs@Inc) para linearização do plasmídeo. 3: p2T7-177-TbHyp#2 digerido com XbaI (New England BioLabs@Inc) e XhoI (New England BioLabs@Inc) para liberação do inserto com aproximadamente 500 pb. Destacado em vermelho o clone selecionado para transfecção.

Após transfecção e seleção, por *Sorting Single Cell* conforme descrito no item 4.12.5.2, das populações clonais de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP, as quais denominamos de p2T7-177-TbFOP#2 e p2T7-177TbAPI5#4 e p2T7-177-TbNTF2#7.3 e TbHYP#2.3, que por uma questão didática nomeamos de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP.

5.5.2. Validação do ensaio de RNAi por qPCR

A eficiência do silenciamento gênico foi feita por PCR quantitativo (qPCR), onde realizamos a extração de RNA total com TRIzol® conforme instruções do fabricante, nos pontos de 24, 48 e 72 horas após indução do sistema de RNAi. As análises foram realizadas com a normalização do gene de referência 7SL, e conforme mostrado nas figuras 36A, 36B e 36C, podemos visualizar uma diminuição de aproximadamente 80% nos níveis relativos de mRNAs de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP, validando assim nosso ensaio de silenciamento gênico pela metodologia de RNA de interferência.

Para melhor avaliar o impacto do silenciamento gênico na proliferação celular usamos como abordagem a realização da curva de crescimento tipo “serrote” (descrito no item 4.12.7) a qual mantém a cultura sempre em fase exponencial de crescimento. Com isso vimos que o silenciamento gênico, tanto para TbFOP quanto para TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP não mostrou grande impacto na proliferação celular (FIGURA 36E, 36F, 36G e 36H).

Para TbAPI5 vimos que a cultura com o sistema de RNAi induzido por tetraciclina (*Induzido*) apresenta uma redução no número de células/ml em 72 horas após indução quando comparada com a cultura controle (*Não Induzido*). Entretanto, para o *knockown* de TbNTF2 e TbHYP, essa redução observa-se 48 horas após indução do sistema de RNAi (FIGURAS 37D, 37E e 37F).

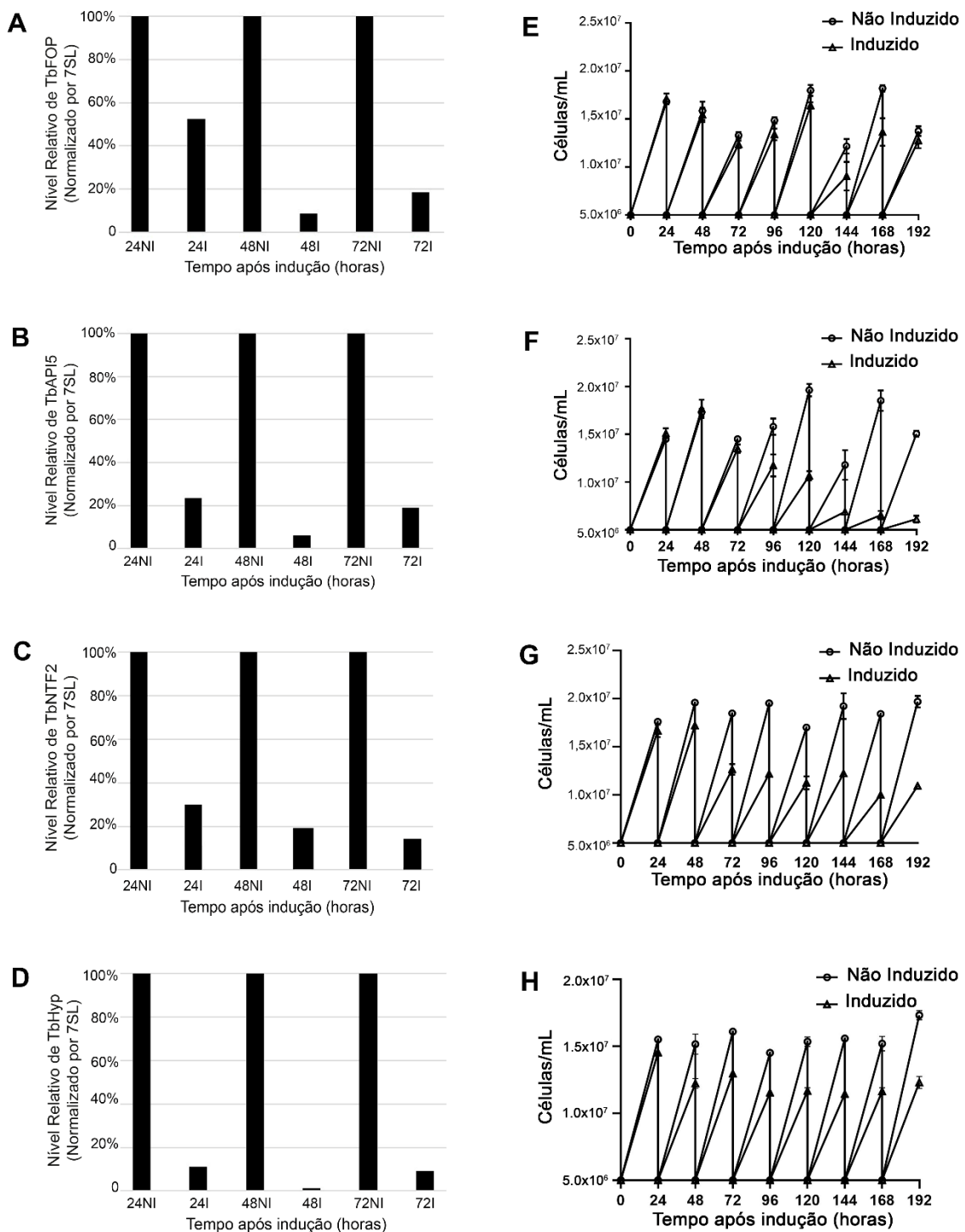


FIGURA 36. VALIDAÇÃO DO SISTEMA DE RNAi POR qPCR E SEU EFEITO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS/ML APÓS SUA INDUÇÃO. A, B, C e D) Análise por PCR em tempo real dos níveis relativos de mRNA após silenciamento gênico de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP, respectivamente. Os transcritos foram normalizados pelo 7SL RNA. E, F, G e H) Curva de crescimento das linhagens de transfectantes após indução do sistema de RNA de interferência de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP, respectivamente. A densidade celular nas culturas foi determinada pela contagem, em triplicata, no contador de partículas (Beckman Coulter, Z™ Series Coulter Counter® Cell).

5.5.3. Localização de mRNA após silenciamento gênico de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP

Visto que um dos objetivos deste trabalho é analisar o papel das proteínas alvo com relação a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma, avaliamos o efeito do silenciamento gênico na distribuição de RNAs poliadenilados, através do ensaio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando uma sonda específica para oligo(dT).

Os resultados do *knockdown* de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP mostram que nenhuma das proteínas parecem ser fundamentais para exportação global de mRNAs, uma vez que não se observou um acúmulo de mRNA no núcleo celular após o silenciamento gênico (FIGURA 37 E 38).

Apesar de o fenótipo o não ter a exportação de mRNA drasticamente afetada, não descartamos o papel destas proteínas como componentes do *core* proteico responsável por este transporte, visto a interação com alta confiabilidade destas proteínas com diferentes fatores de exportação e metabolismo de RNA.

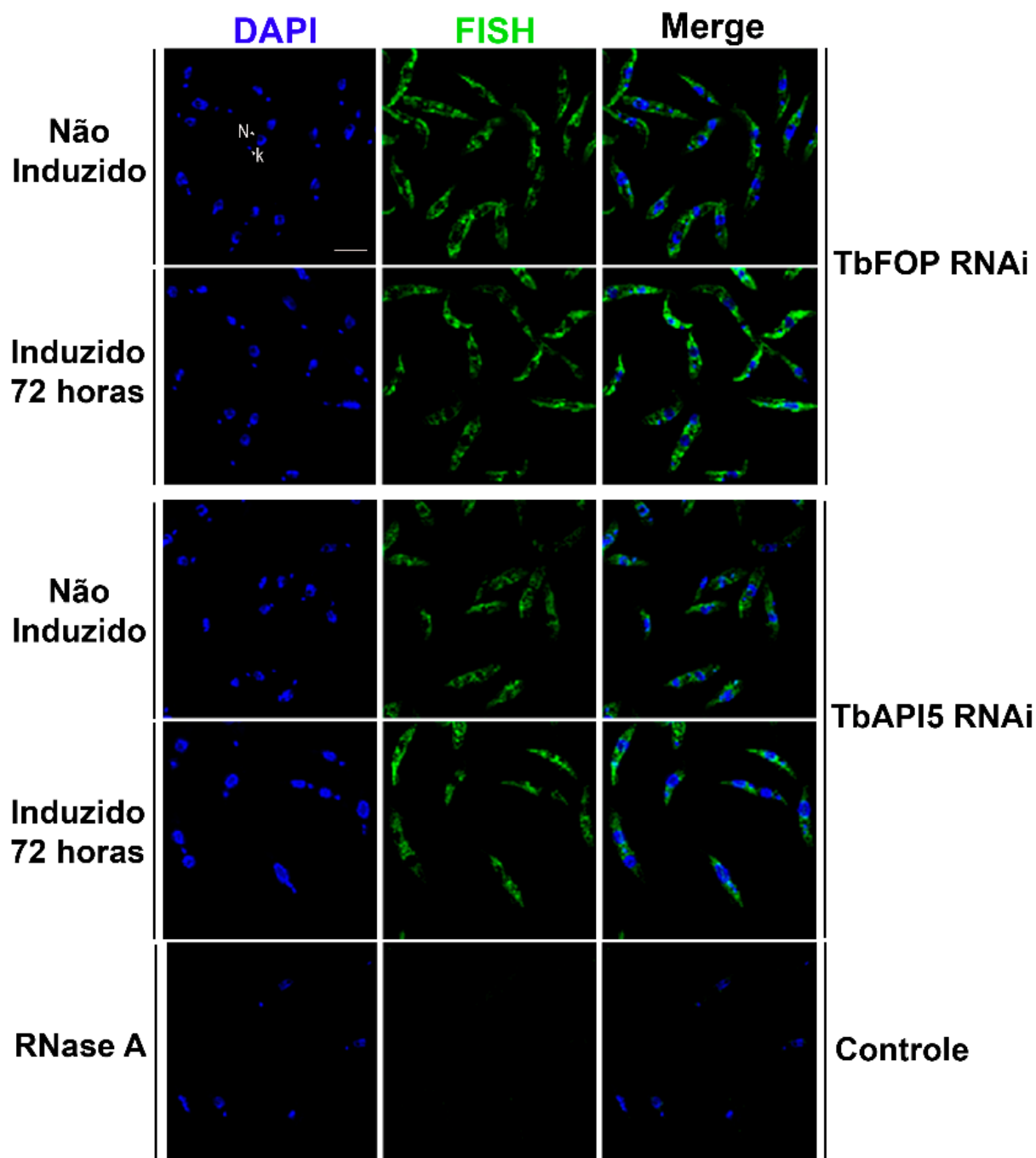


FIGURA 37. EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE TbFOP E TbAPI5 NA LOCALIZAÇÃO DE mRNA. A Localização celular dos RNAs poliadenilados foi realizado pelo método de Hibridização in situ fluorescente (FISH) em parasitas knockdown para TbAPI5 e TbFOP com sonda oligo(dT) marcada com digoxigenina. A detecção da sonda foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-DIG (SigmaAldrich, diluição 1:300) seguido por anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:600). Como controle, RNase A 100 µg/ml foi incubado com o parasita antes da hibridização da sonda (RNase A). DAPI = DNA corado com DAPI. MERGE = colocalização de imagens para DAPI e FISH. Barra = 5 µm.

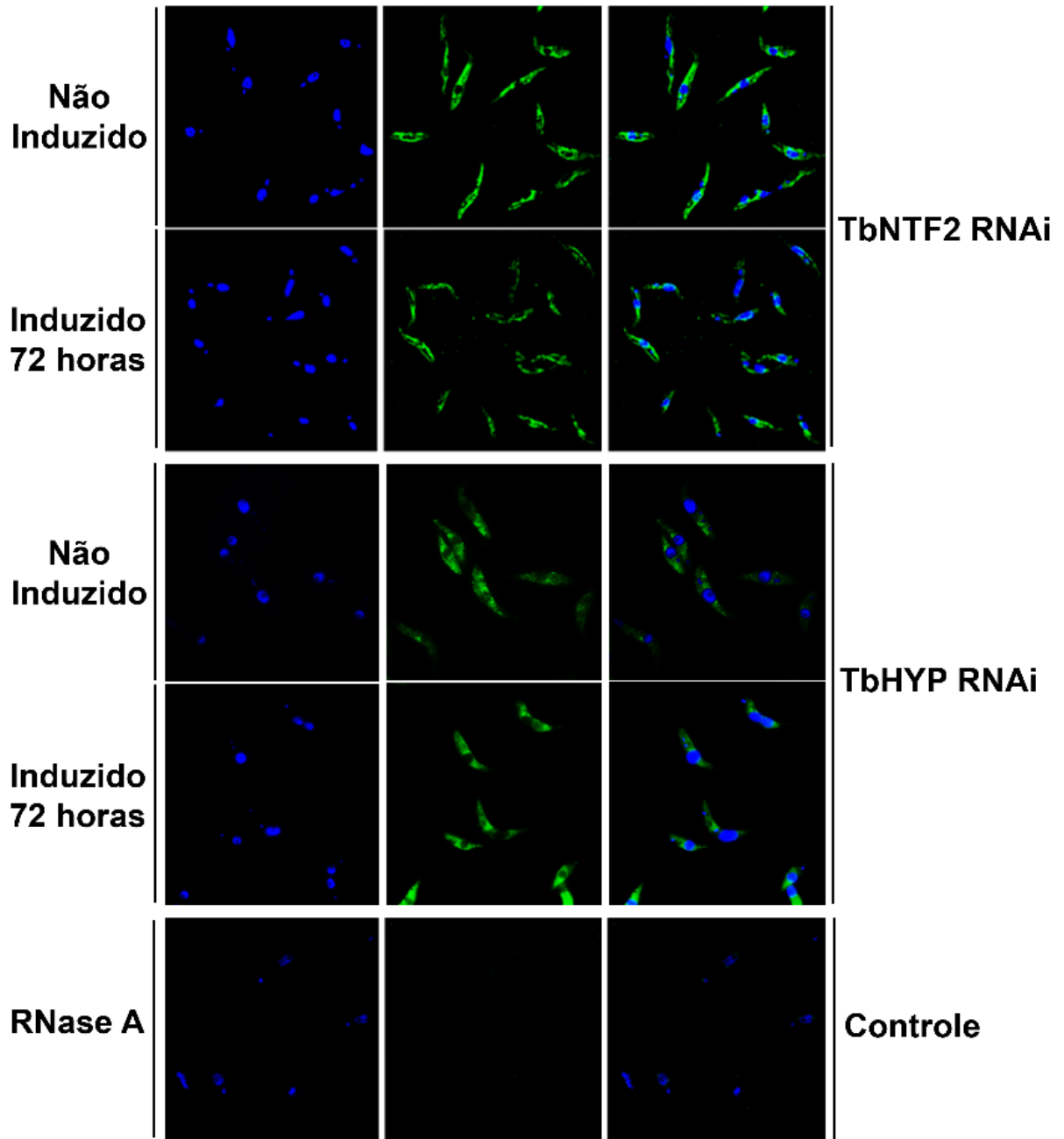


FIGURA 38. EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE TbNTF2 E TbHYP NA LOCALIZAÇÃO DE MRNA. A Localização celular dos RNAs poliadenilados foi realizado pelo método de Hibridização in situ fluorescente (FISH) em parasitas knockdown para TbNTF2 e TbHYP com sonda oligo(dT) marcada com digoxigenina. A detecção da sonda foi realizada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-DIG (SigmaAldrich, diluição 1:300) seguido por anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:600). Como controle, RNase A 100 µg/ml foi incubado com o parasita antes da hibridização da sonda (RNase A). DAPI = DNA corado com DAPI. MERGE = colocalização de imagens para DAPI e FISH. Barra = 5 µm

5.5.4. Efeito do silenciamento gênico na morfologia ultraestrutural do *Trypanosoma brucei*

Com intuito de avaliar possíveis alterações ultraestruturais devido ao silenciamento gênico de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP, amostras dos pontos de 48 e 72 horas após indução do RNAi por tetraciclina foram preparadas para ensaio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme descrito no item 4.9.1.

Como comparativo, também realizamos o ensaio para TbSub2, uma vez que se trata de uma proteína essencial para sobrevivência do parasita e para exportação de mRNA.

Conforme mostrado nas figuras 39, 40, 41, 42 e 43, o silenciamento gênico das proteínas alvo (TbSub2, TbFOP, TbAPI5, TbNTF2L e TbHYP) provocou diversas alterações ultraestruturais condizentes com os processos de autofagia e apoptose celular. Essas alterações incluem condensação da cromatina na periferia nuclear, desestruturação de núcleo e nucléolo, aumento da área do retículo endoplasmático e aumento no número de acidocalcisomas (LI E HE, 2017; 2014; LI *et al.*, 2012).

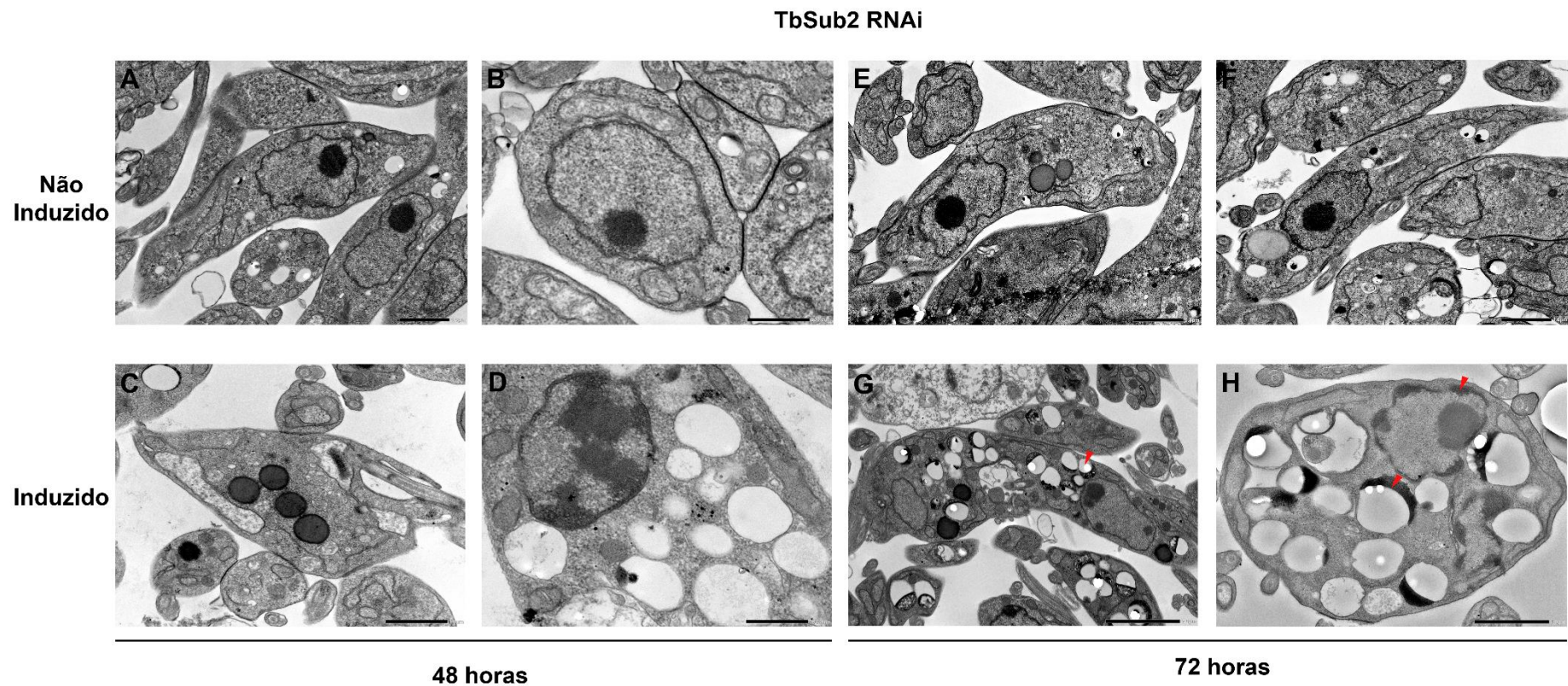


FIGURA 39. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO KNOCKDOWN DE TbSub2 EM *Trypanosoma brucei*. A-B: Cultura com sistema de RNAi não induzido 48 horas. C-D: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 48 horas. E-G: Cultura com sistema de RNAi não induzido 72 horas. F-H: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 72 horas. Barras: 1 μ m ou 500 nm.

TbAPI5 RNAi

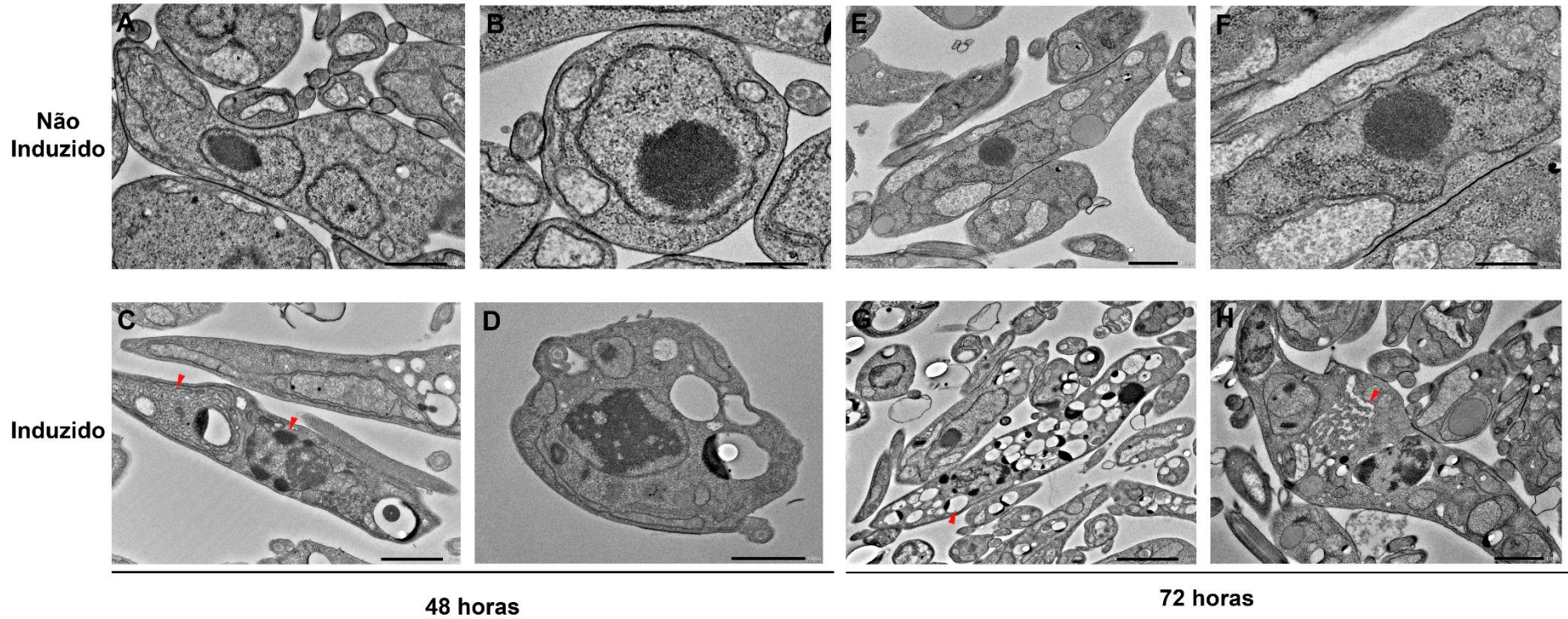


FIGURA 41. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO KNOCKDOWN DE TbAPI5 EM *Trypanosoma brucei*. A-B: Cultura com sistema de RNAi não induzido 48 horas. C-D: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 48 horas. E-G: Cultura com sistema de RNAi não induzido 72 horas. F-H: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 72 horas. Barras: 1 μ m ou 500 nm.

TbNTF2 RNAi

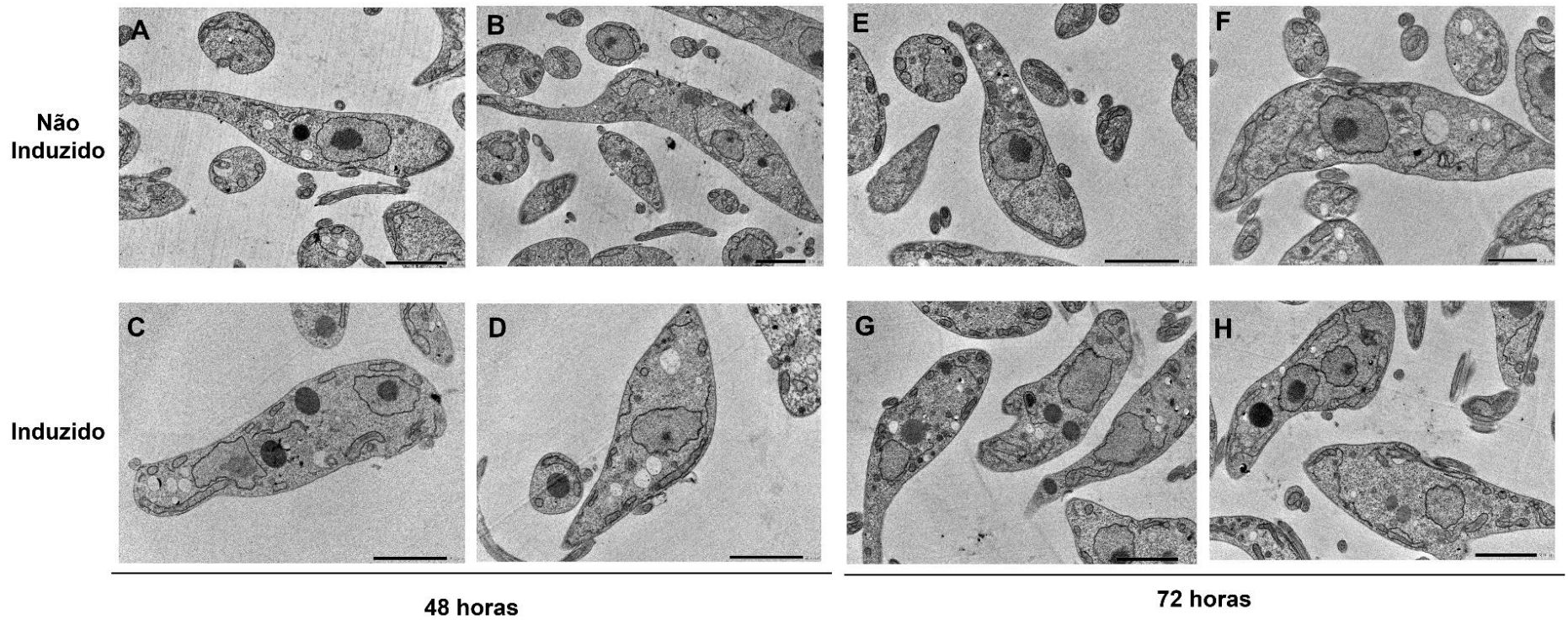


FIGURA 42. MICROSCOPIA ULTRA-ESTRUTURAL DO KNOCKDOWN DE TbNTF2L EM *Trypanosoma brucei*. A-B: Cultura com sistema de RNAi não induzido 48 horas. C-D: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 48 horas. E-G: Cultura com sistema de RNAi não induzido 72 horas. F-H: Cultura com sistema de RNAi induzido por tetraciclina 72 horas. Barras: 1µm ou 500 nm.

6. DISCUSSÃO

Os eventos pós-transcricionais são pontos majoritários para a regulação da expressão gênica em Tripanossomatídeos, dos quais os mecanismos que alteram a meia vida do RNA e a tradução são os mais estudados (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; ARAÚJO E TEIXEIRA, 2011). Dentro dos eventos pós-transcricionais, o transporte núcleo-citoplasmático do mRNA ainda não é extensamente compreendido nestes organismos. Serpeloni e colaboradores (2011a) mostraram através de análises *in silico* que entre todas as vias de transporte de RNAs, a exportação de mRNA é a menos conservada em organismos da base da árvore filogenética. Entre estes estão os tripanossomatídeos, que são protozoários flagelados evolutivamente distantes e divergentes de leveduras e humanos (MURINGI *et al.*, 2014). Com base nisso, acreditamos que estudos para identificar os fatores envolvidos com a exportação de mRNA em tripanossomatídeos podem trazer informações relevantes sobre os componentes peculiares e essenciais para a biologia destes parasitas. Além disso, por ser tratar de um evento essencial para a célula eucariótica, esta via pode conter proteínas essenciais a sobrevivência destes parasitas. Por este motivo, nosso grupo tem investido em gerar dados sobre os fatores envolvidos com a via de exportação de mRNA em tripanosomatídeos, usando como modelo o *Trypanosoma cruzi*.

Através de análises de genômica comparativa, observou-se que um componente do complexo TREX (Transcrição/Exportação), conhecido como UAP56 em humanos (Sub2 em leveduras), é o mais conservado entre os fatores envolvidos na via de exportação de mRNA (SERPELONI *et al.*, 2011a). Serpeloni e colaboradores (2011b) mostraram que a proteína ortóloga de UAP56/Sub2 em *T. cruzi* (TcSub2) é uma RNA Helicase DEAD-box nuclear e essencial para a sobrevivência do parasita, e o seu *knockdown* em *T. brucei* causa o acúmulo de RNAs poliadenilados no núcleo, demonstrando que também se trata de uma proteína essencial para a via de transcrição/exportação de mRNA.

Outra RNA helicase DEAD-box também se mostrou conservada em diferentes grupos eucarióticos, incluindo espécies de Excavata e Chromalveolata (SERPELONI *et al.*, 2011a). Posteriormente, INOUE e colaboradores (2014) mostraram que esta RNA helicase, denominada aqui de eIF4AIII, migra entre núcleo e citoplasma,

estando associada a via de exportação de mRNA, uma vez que sua migração é dependente da via de transporte mediada pelo receptor de exportação Mex67.

Com base nestes resultados, TcSub2 e TceIF4AIII foram alvos de ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas. As análises permitiram a identificação de fatores presentes em seus complexos proteicos (INOUE, 2015).

Dentre as proteínas identificadas com confiabilidade e mais abundantes nos complexos proteicos, destacam-se quatro proteínas, anotadas como hipotéticas no banco de dados TriTrypDB. Com o auxílio da ferramenta hmmscan do pacote HMMER (EDDY, 1998), buscamos prever domínios conservados presentes nestas proteínas hipotéticas para ser um indicativo da função de cada uma delas. Para fins didáticos, as proteínas foram nomeadas de acordo com o domínio conservado predito.

TcFOP possui um domínio similar ao domínio FOP *duplication* (VAN DJIK *et al.*, 2010), que é composto por uma região rica em arginina e glicina e dois motivos de ligação à UAP56/Sub2 (UBM -UAP56/Sub2 *binding motif*) na extremidade C-terminal. Esse dado faz sentido, visto que proteínas que apresentam o domínio FOP funcional têm sido associadas ao complexo TREX (Transcrição/Exportação). Em humanos por exemplo, a proteína CHTOP, que possui domínio FOP, desempenha um papel como co-adaptadora de ligação ao RNA e ativadora das atividades helicase e ATPase de Sub2/UAP56 (CHANG *et al.*, 2013). Curiosamente, o domínio FOP de tripanossomatídeos possui uma estrutura divergente com relação aos seus ortólogos, uma vez que os dois motivos UBMs estão separados pelo motivo RGG (FIGURA 43). Com base nisso, nos perguntamos se os domínios UBMs de TcFOP eram motivos funcionais para a ligação com TcSub2.



FIGURA 44. ESQUEMA DA COMPARAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS TcFOP, DE *T. cruzi* E HsCHTOP (DE HUMANOS). O domínio (em verde) FOP de tripanossomatídeos é constituído pela região RGG (rica em argina e glicina) flanqueado por dois motivos UBMs (de ligação à Uap56/Sub2), caracterizados pela sequência de aminoácidos LDXXL onde X é qualquer aminoácido). Enquanto HsCHTOP apresenta os motivos UBMs duplicados e localizados em sequência na extremidade carboxi-terminal (DOMINGUES, 2017).

Mostramos anteriormente (DOMINGUES, 2017) que a interação entre TcFOP e TcSub2 ocorre via motivo de ligação à UAP56/Sub2, indicando que apesar de ser divergente de seus ortólogos o domínio FOP de tripanossomatídeos parece ser funcional quanto à ligação com TcSub2. Vale ressaltar que confirmamos a presença de TcSub2 nos complexos proteicos de TcFOP neste trabalho.

Para TcAPI5 foi predito um domínio API5 (*Apoptosis Inhibitor 5*). Proteínas com o domínio API5 funcional estão descritas como fatores anti-apoptóticos e superexpressas em células cancerígenas (HAN *et al.*, 2012).

O papel de TcAPI5 na via de exportação ainda é pouco compreendido, porém, na planta *Oriza sativa*, já foi demonstrado que API5 interage com Sub2/UAP56 (LI *et al.*, 2011) e em *Drosophila*, com Acinus, que se trata de um componente do Complexo Junção Éxon (EJC) (RIGOU *et al.*, 2009). Recentemente, Bong e colaboradores (2020) demonstraram que em células de mamíferos API5 interage diretamente com UAP56 (Sub2 em leveduras), e o silenciamento gênico resulta no acúmulo de RNAs poliadenilados no núcleo celular, sugerindo um importante papel de API5 na exportação de mRNA. Entretanto, a depleção de API5 em *Trypanosoma brucei* não afeta a exportação de mRNA, apesar disso não podemos descartar o papel de API5 como componente da maquinaria de exportação de mRNA, uma vez que estão presentes em seus complexos proteicos inúmeras

proteínas envolvidas na biogênese de mRNA, como também sua presença altamente representativa nos complexos proteicos de TcSub2.

O domínio NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*), encontrado em TcNTF2L, está presente em diversos receptores de transporte que interagem com o complexo de poro nuclear, incluindo também o receptor de exportação Mex67 (FRIBOURG *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2007).

Entretanto, no caso da proteína com número de identificação TcCLB.506435.150, não foi possível prever qualquer domínio conservado, por este motivo, ela foi nomeada de TcHYP.

Com base na reconstrução filogenética, podemos afirmar que as proteínas descritas acima são proteínas exclusivas de Tripanossomatídeos e Eubodonida. TcFOP não foi detectada em *Angomonas deanei* e *Strigomonas culicis*, o que pode sugerir uma perda específica da linhagem dessa proteína. No caso de TcNTF2L foram identificados *hits* em outros organismos, que não se agrupam com o clado principal de cinetoplastídeos. Os dados apoiam nossa hipótese de que fatores exclusivos de cinetoplastídeos estão envolvidos em uma via divergente de exportação de mRNA. Pelo fato de estarem associadas aos complexos proteicos de TcSub2 e TcelF4AIII, propusemos, que a via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos conta com componentes conservados e divergentes.

Com intuito de confirmar a associação destas proteínas com outros fatores de exportação e entender o papel de cada uma delas no transporte núcleo-citoplasmático de mRNA, utilizamos diferentes abordagens experimentais. Para tanto, o primeiro passo foi analisar a localização celular destas proteínas. Mostramos anteriormente que TcFOP e TcAPI5 são proteínas nucleares que colocalizam com TcSub2 (DOMINGUES, 2017). TcHYP também apresenta localização nuclear e colocaliza com TcSub2. Pelos dados de proteômica, verificamos que estas proteínas são comuns e altamente representativas nos complexos proteicos tanto de TcSub2 quanto de TcelF4AIII

A proteína TcNTF2L foi identificada apenas nos dados relativos ao complexo proteico de TcelF4AIII. TcelF4AIII é uma proteína com uma localização citoplasmática, com perfil de marcação semelhante a proteínas de grânulos (INOUE *et al.*, 2015). Verificamos que TcNTF2L colocaliza com TcelF4AIII e acreditamos, que assim como TcelF4AIII, TcNTF2L possa migrar entre núcleo e citoplasma, uma

vez que encontramos em seus complexos proteicos proteínas de localização citoplasmática (como PABP1, PABP2, DHH1, SCD6) e proteínas nucleares, como o complexo de remodelação de cromatina (ISWI), o fator de *splicing* U2AF26, entre outras. Recentemente, observou-se que a ortóloga de TcNTF2L em *Trypanosoma brucei* está envolvida no metabolismo de mRNA, e após o tratamento com sinefungina (droga que inibe o *trans-splicing*), TbNTF2 fica retida em grânulos na face citoplasmática do complexo de poro nuclear, denominados de NPGs, nos quais encontram-se muitas proteínas citoplasmáticas de ligação ao RNA, porém nenhum dos principais fatores de início da tradução, inferindo que estes grânulos possuem a função de evitar que RNAs não processados adequadamente sejam traduzidos (GOOS *et al.*, 2019).

Para estudo da função gênica, o nocaute do gene, além de laborioso, poderia ser inviável, caso as proteínas possuíssem uma função essencial para a sobrevivência do parasita. Uma abordagem alternativa à análise da função gênica é o estudo do fenótipo causado pelo silenciamento de genes ortólogos de em *T. brucei*, por meio de RNA de interferência (ULLU, TSCHUDI E CHAKRABORTY, 2004; KOLEV, TSCHUDI E ULLU, 2011). Os resultados podem gerar evidências que estejam relacionadas à funcionalidade do gene em *T. cruzi* (NARDELLI *et al.*, 2007, SERPELONI *et al.*, 2011b).

Vimos que TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP possuem similaridade e boa cobertura com suas ortólogas em *T. brucei* (79%, 72%, 58% e 47% respectivamente). Por isso, geramos linhagens para RNAi das proteínas TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP.

Confirmamos a eficiência do sistema de RNA de interferência por PCR quantitativa, e observamos que o *knockdown* de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP não afetou drasticamente o processo de exportação de mRNA.

Vimos que o silenciamento gênico de TbAPI5 e TbNTF2 afeta a proliferação celular 48 horas e 96 horas, respectivamente, após a indução do sistema de RNAi por tetraciclina. O efeito tardio na proliferação celular após *Knockdown* de TbAPI5 sugere um efeito secundário resultante do impacto por meio de processos adicionais.

Já o silenciamento da expressão de TbFOP e TbHYP causou pouco impacto na proliferação celular e nenhuma das proteínas-alvo parece ser fundamental para a

exportação global de mRNA, uma vez que o acúmulo de RNAs poliadenilados no núcleo celular não foi observado por meio da metodologia de hibridização *in situ* (FISH).

Apesar de TbFOP, TbAPI5, TbNTF2 e TbHYP não serem proteínas essenciais para a via de exportação de mRNA, não descartamos o papel destes fatores como componentes do *core* proteico responsável pelo transporte núcleo-citoplasmático de mRNA, uma vez que corroboramos a associação destas proteínas com fatores, já descritos na literatura, como componentes da maquinaria de exportação de mRNA.

Confirmamos por meio de ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas que TcFOP, TcAPI5 e TcHYP estão associadas aos complexos proteicos de TcSub2 e TceIF4AIII, enquanto TcNTF2L está presente apenas nos complexos proteicos de TceIF4AIII.

A análise dos complexos proteicos de TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP confirmou a presença de inúmeros componentes associados ao processamento, exportação, controle de qualidade e tradução de mRNA, presentes em um ou mais complexos analisados. Entre estes fatores destacam-se o fator de exportação Mex67, e os fatores componentes do complexo EJC Magoh, eIF4AIII e Y14, e a RNA helicase Sub2.

Como conclusão, nosso grupo identificou proteínas conservadas e proteínas divergentes presentes na maquinaria de exportação de mRNA em tripanossomatídeos. Proteínas exclusivas de kinetoplastídeos, TcFOP, TcAPI5 e TcHYP, interagem direta ou indiretamente com TcSub2, enquanto TcNTF2L é uma proteína citoplasmática que interage com proteínas nucleares e com o receptor de exportação de mRNA Mex67. Assim sendo, propomos que a maquinaria de exportação de mRNA em kinetoplastídeos contém proteínas conservadas e fatores divergentes, algumas destas proteínas parecem ser inovações específicas da linhagem (FIGURA 44). Sugerimos que estes novos componentes provavelmente façam parte da adaptação evolutiva à transcrição policistrônica/*trans-splicing*.

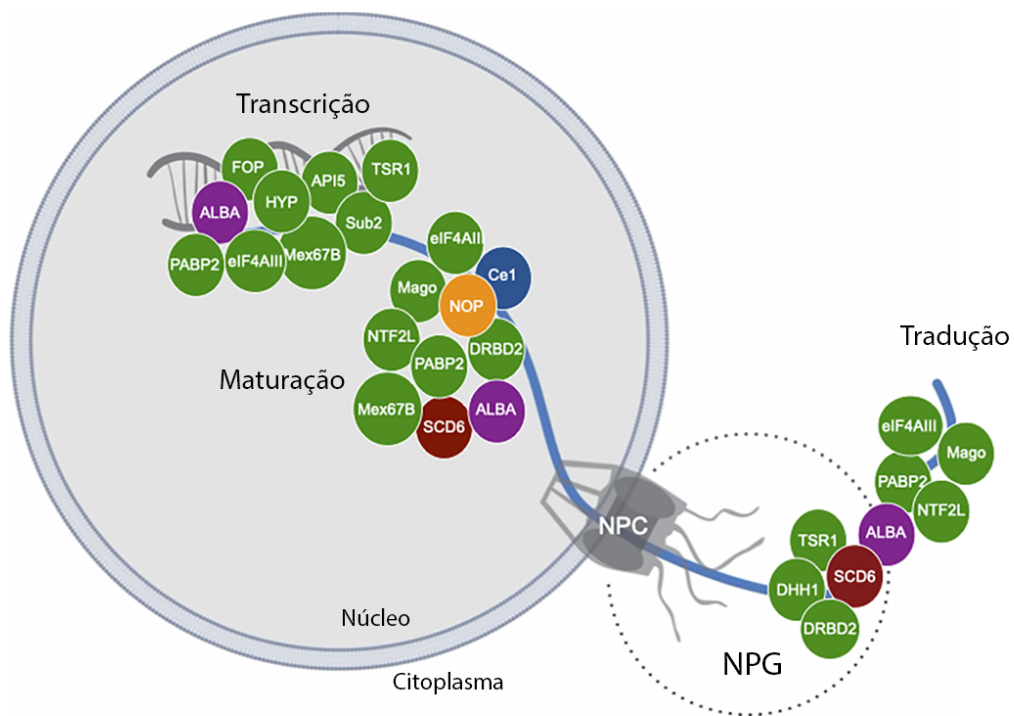


FIGURA 455. MODELO ESQUEMÁTICO DE INTERAÇÃO ENTRE A MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO E CPN. Proteínas conservadas, como TcSub2, TcelF4AIII, proteínas de ligação ao RNA, componentes do EJC e proteínas específicas de linhagem, como TcFOP, TcAPI5, TcNTF2L e TcHYP estão representadas no esquema. As proteínas nucleares TcFOP, TcAPI5 e TcHYP interagem diretamente com TcSub2. Os principais componentes do EJC estão diretamente associados ao maquinário de mRNA. TcNTF2L parece ser uma proteína de transporte que interage com TcelF4AIII e o receptor de exportação TcMex67. INOUE *et al.*, submetido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZI K.C.; LACADIE, S.; ROSBASH, M. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. **EMBO J.** v. 23, p. 2620-2631. 2004.

ALBER, F; DOKUDOVSKAYA, S; VEENHOFF, L. M; ZHANG, W; KIPPER, J. DEVOS, D. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* v. 450(7170). P. 695-701. 2007

ALBERTS, B. *et al.*,. **Molecular Biology of the Cell.** 4th ed ed. New York: Garland Science, 2002.

AEBERSOLD, R. AND M. MANN. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.** v.422. p. 198-207. 2003

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; *et al.*,. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, 2017.

ARAÚJO, P. R., & TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 106(3), 257–266. 2011.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, T.R.; KINGSTON, R.E. Current Protocols in Molecular Biology. **New York, Green Publishing Associates and Wiley & Sons.** 1987.

ALTSCHUL, S. F. *et al.*,. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. **Adv Parasitol.** 97: 1–45. 2017.

BATISTA, M. *et al.*, A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 259, jan. 2010.

BECK, M.; HURT, E. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 73–89, 2017.

BERCOVICH, N.; LEVIN, M. J.; CLAYTON, C.; VAZQUEZ, M. P. Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, n. 2, p. 190–193, 2009

BIRNBOIM, H. C; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** Nov. 1979.

BRUN, R.; SCHÖNENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Trop**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>>. Acesso em: 2021.

CHANG, C.-T., HAUTBERGUE, G. M., WALSH, M. J., VIPHAKONE, N., VAN DIJK, T. B., PHILIPSEN, S., & WILSON, S. A. Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. **The EMBO Journal**, 32(3), 473–86. 2013.

CHAVEZ, S; BEILHARZ, T; RONDON, A. G; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J.** v. 19. p. 5824–5834. 2000.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, 2019.

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

CONTRERAS, V. T. *et al.*, Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123-133, 1988.

COLE, C. N; SCARCELLI, J. J. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Curr Opin Cell Biol.**v. 18. p 299-306. 2006.

COOK, A. *et al.*, Structural biology of nucleocytoplasmic transport. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 647-671, jan. 2007.

CRONSHAW, J. M; KRUTCHINSKY, A. N; ZHANG, W; CHAIT, B. T; MATINUS, M. J. Proteomic analyseis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol.* V. 158(5). P. 915-927. 2002.

CROSS, G.; MANNING, J. Studies on ascaridoid nematodes of pythons: two new species from New Guinea. **Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 315-331, 6 abr. 1973.

CROWE, J; MASONE, B. S; RIBBE, J. One-step purification of recombinant proteins with to 6xHis tag and Ni-NTA resin. **Mol Biotechnol**. Dec. 1995

DaROCHA, W. D. *et al.*, Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 175-186, fev. 2004.

DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 18884-18894, 2003.

DE GAUDENZI, J. G; NOÉ, G. CAMPO, V.A; FRASCH, A.C; CASSOLA, A. Gene expression. Regulation in trypanosomatids. **Essays in Biochemistry**. v.51. p; 31-46. 2011

DICKMANN, A., KEHLENBACH, R. H. & FAHRENKROG, B. Nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport: from structure to function to disease. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.** 320, 171–233, 2015.

DILLON, L. A. L.; OKRAH, K.; HUGHITT, V. K.; *et al.*, Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. **Nucleic Acids Research**, 43:6799-6813, 2015.

DINGWALL C, ROBBINS J, DILWORTH SM, ROBERTS B, RICHARDSON WD. The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. **J Cell Biol.** 1988; 107(3):841–9

DOSTALOVA, A. *et al.*, The nuclear mRNA export receptor Mex67-Mtr2 of *Trypanosoma brucei* contains a unique and essential zinc finger motif. **Mol Microbiol**, v. 88, n. 4, p. 728-739, 2013.

DONIGER, T. *et al.*, A comparative genome-wide study of ncRNAs in trypanosomatids. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 615, jan. 2010.

DOMINGUES, P. F.; **Análise Funcional de um novo componente da via de exportação de RNA mensageiro em *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná. 2017

DUMAS, C. *et al.*, A novel class of developmentally regulated noncoding RNAs in *Leishmania*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 2033-2046, dez. 2006.

EDDY, S. R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 755-763, 1998.

ELLISDON, A. M., DIMITROVA, L., HURT. E., STEWART, M. Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. **Nat Struct Mol Biol**. V 19, n. 3, p: 328–336.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**. v.32. p. 1792-1797. 2004

EL-SAYED, N. M. *et al.*,. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* , Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

FANIS, P. GILLEMANS, N. AGHAJANIREFAH, A. POURFARZAD, F. DEMMERS, J. ESTEGHAMAT, F. VADLAMUDI, R. K. GROSVELD, F. PHILIPSEN, S. VAN DIJK, T. B. Five friends of methylated chromatin target of protein-arginine-methyltransferase (PRMT-1) (chttop), a complex linking arginine methylation to desumoylation. **Mol Cell Proteomics**. v. 11. p. 1263-1273. 2012

FELDHERR, C. M.; AKIN, D. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. **J Cell Sci**. 110(Pt24):3065-70. 1997

FINN, R. D. *et al.*,. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D222-30, jan. 2014.

FORLER, D; RABUT, G.; CICCARELLI, F. D.; HEROLD, A.; KÖCHER, T.; NIGGEWEG, R.; BORK, P.; ELLENBERG, J.; IZAURRALDE, E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. **Mol. Cell. Biol**. v. 24, p. 1155–1167. 2004.

FRIED, H.; KUTAY, U. Nucleocytoplasmic transport: Taking an inventory. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 8, p. 1659–1688, 2003.

FRIED, J.; PEREZ, A. G.; CLARKSON, B. D. Flow cytometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide: Properties of the Method and Mathematical Analysis of the Data. **The Journal Cell Biology**. v. 71. 1976

FUNG, H. Y. J.; CHOOK, Y. M. Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. **Seminars in Cancer Biology**, v. 27, p. 52–61, 2014.

GLISOVIC, T. *et al.*,. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1977-1986, 2008.

GOOS, C.; DEJUNG, M.; WEHMAN, A. M.; *et al.*, Trypanosomes can initiate nuclear export co-transcriptionally. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 266–282, 2019.

GOLDFARB DS, GARIEPY J, SCHOOLNIK G, KORNBERG RD. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature*. 1986; 322(6080):641–4.

GRÜNWARD, D; SINGER, R.H; ROUT, M. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. **Nature**. v. 475. p: 333-341. 2011.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 32–50, 2015.

HAN, B. G., KIM, K. H., LEE, S. J., JEONG, K. C., CHO, J. W., NOH, K. H., KIM, T. W., KIM, S. J., YOON, H. J., SUH, S.W., LEE, S., LEE, B.I. Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules. **J Biol Chem**.v. 287. P 10727-10737. 2012

HACKMANN A, WU H, SCHNEIDER U-M, MEYER K, JUNG K, KREBBER H. Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. **Nat Commun**. 5:3123. 2014.

HAUTBERGUE GM, HUNG ML, GOLOVANOV AP, LIAN LY, WILSON SA. Interações mutuamente exclusivas conduzem a transferência de mRNA de adaptadores de exportação para o TAP. *Proc Natl Acad Sci EUA A*. 2008; 105: 5154-5159.

HEATH, C. G., VIPHAKONE, N., WILSON, S. A. The role of TREX in gene expression and disease. **Biochemical Journal**. v. 473. p. 2911-2935. 2016

HOFMANN, I. *et al.*, Symplekin , a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in mRNA Biogenesis in *Xenopus laevis* Oocytes. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 5, p. 1665-1676, 2002.

HUGHES, A. L., & PIONTKIVSKA, H. Molecular phylogenetics of trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.2, n.15. 2003.

HURT, E. & BECK, M. Towards understanding nuclear pore complex architecture and dynamics in the age of integrative structural analysis. *Curr. Opin. Cell Biol*. **34**, 31–38 (2015).

INOUE, A. H., SERPELONI, M., HIRAIWA, P. M., YAMADA-OGATTA, S. F., MUNIZ, J. R. C., MOTTA, M. C. M., ÁVILA, A. R. Identification of a Novel Nucleocytoplasmic Shuttling RNA Helicase of Trypanosomes. **PLoS ONE**, 9(10), e109521. 2014.

INOUE, A. H. Exportação de mRNA em *Trypanosoma cruzi*: Análise funcional de TcelF4AIII. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15572>

ISKEN, O.; MAQUAT, L. E. Quality control of eukaryotic mRNA : safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes Dev**, v. 21, n. 15, p. 1833-1857, 2007.

JENSEN B *et al.*,.: Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics** 2009, 10:482. 3.

JIMENO, S. RONDÓN, A. G. LUNA, R. AGUILERA, A. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. **EMBO J.**v. 21. P 3526-3535. 2002

KABACHINSKI, G.; SCHWARTZ, T. U. The nuclear pore complex-structure and function at a glance.

KATAHIRA, J.; DIMITROVA, L.; IMAI, Y.; HURT, E. NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 3, p. 1894–1904, 2015.

KATAHIRA, J.; YONEDA, Y. Nucleocytoplasmic Transport of MicroRNAs and Related Small RNAs Biogenesis of miRNAs. **Traffic**, v. 12, p. 1468–1474, 2011.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 7, p. 533-543, jul. 2007.

KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat Protoc**, v. 4, n. 3, p. 363-731, jan. 2009.

KEMINER, O.; PETERS, R. Permeability of single nuclear pores. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 1, p. 217–228, 1999.

KÖHLER, A.; HURT, E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. **Nature reviews. Molecular cell biology**. v. 8, n. 10, p. 761-73. 2007.

KOLEV, N. G; TSCHUDI, C; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. **Eukaryotic Cell**. v. 10, n 9, p. 1156-1163. 2011.

KOLEV NG, FRANKLIN JB, CARMÍ S, SHI H, MICHAELI S, TSCHUDI C. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathog.** 6(9); 2010;

KRAMER, S. Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: From trypanosomes to opisthokonts. **Parasitology**, 2021.

KUGERATSKI, F.G; BATISTA, M; INOUE, A. H; RAMOS, B.D; KRIEGER, M.A; MARCHINI, F. K. pTcGW plasmid vectors 1.1 version: a versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterization. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Agosto. 2015.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. **Circulation.** v. 14, p. 1035-60. 1956

LEE BY, BACON KM, BOTTAZZI ME, HOTEZ PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 342–48.

LI, X., GAO, X., WEI, Y., DENG, L., OUYANG, Y., CHEN, G., LI, X., ZHANG, Q., WU, C. Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration *Plant Cell*.v. 23. P. 1416-1434. 2011.

LI, F. J. & HE, C. Y. Acidocalcisome is required for autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 10, 1978–1988 (2014). 127.

LI, F. J. & HE, C. Y. Autophagy in protozoan parasites: *Trypanosoma brucei* as a model. *Future Microbiol.* 12, 1337–1340 (2017).

LUI, K.; HUANG, Y. RanGTPase: A Key Regulator of Nucleocytoplasmic Trafficking. **Mol Cell Pharmacol.** 1(3): 148–156, 2009.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 327-329, 1993.

MARTINEZ-CALVILLO, S; VIZUET-DE-RUEDA, J; FLORENCIO-MARTINEZ, L. E; MANNING-CELA, R. G; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 2010.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, 2011

MASUDA, S. *et al.*,. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. **Genes Dev**, v. 19, n. 13, p. 1512-1517, 2005.

MATSUURA, Y. Mechanistic Insights from Structural Analyses of Ran-GTPase-Driven Nuclear Export of Proteins and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 10, p. 2025–2039, 2016.

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

McANDREW, M. *et al.*,. Testing Promoter Activity in the Trypanosome Genome Isolation of a Metacyclic-Type VSG Promoter , and Unexpected Insights into RNA Polymerase II Transcription. **Exp Parasitol Parasitol**, v. 76, n. 90, p. 65-76, 1998.

MOTTA, M. C. M., MARTINS, A. C. D. A., DE SOUZA, S. S. A., CATTA-PRETA, C. M. C., SILVA, R., KLEIN, C. C., ... DE VASCONCELOS, A. T. R. Predicting the Proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and Their Respective Endosymbionts Reveals New Aspects of the Trypanosomatidae Family. **PLoS ONE**, 8(4). 2013.

MURUNGI, E; BARLOW, L. D; VENKATESH, D; ADUNG'A, V. O; DACKS, J. B; FIELD, M. C; CHRISTOFFELS, A. A comparative analysis of trypanosomatid SNARE proteins. **Parasitol Int.** 63(2):341-8. 2014

MY, Z; CLARK, S. E; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Universal cloning method by TA strategy. **Biotechniques**. 19(1). 1995.

NARDELLI, S. C., AVILA, A. R., FREUND, A., MOTTA, M. C., MANHÃES, L., DE JESUS, T. C., SCHENKMAN, S., FRAGOSO, S. P, KRIEGER, M. A., GOLDENBERG, S., DALLAGIOVANNA, B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**.v. 6. P. 337-345. 2006

OBADO, S. O.; BRILLANTES, M.; URYU, K.; *et al.*,. Interactome Mapping Reveals the Evolutionary History of the Nuclear Pore Complex. **PLoS Biology**, v. 14, n. 2, p. 1–30, 2016.

OEFFINGER, M. *et al.*, Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. **Nat Methods**, v. 4, n. 11, p. 951-956, 2007.

O'LEARY, N. A, WRIGHT, M. W, BRISTER , J. R. CIUFO, S. HADDAD, D. MCVEIGH, R. RAJPUT, B. ROBBERTSE, B. SMITH-WHITE, B. AKO-ADJEI, D. ASTASHYN, A. BADRETDIN, A. BAO, Y. BLINKOVA, O. BROVER, V. CHETVERNIN, V. CHOI, J. COX, E. ERMOLAEVA, O. FARRELL, C. M. GOLDFARB, T. GUPTA, T. HAFT, D. HATCHER, E. HLAVINA, W. JOARDAR, V. S. KODALI, V. K. LI, W. MAGLOTT, D. MASTERSON, P. MCGARVEY, K. M. MURPHY, M. R. O'NEILL, K. PUJAR, S. RANGWALA, S. H. RAUSCH, D. RIDDICK, L. D. SCHOCH, C. SHKEDA, A. STORZ, S. S. SUN, H. THIBAUD-NISSEN, F. TOLSTOY, I. TULLY, R. E. VATSAN, A. R. WALLIN, C. WEBB, D. WU, W. LANDRUM, M. J. KIMCHI, A. TATUSOVA, T. DICUCCIO, M. KITTS, P. MURPHY, T. D. PRUITT, K. D. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Res.** v.44. p.733-745. 2016.

REED, R. HURT, E. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. **Cell.** v. 108. p. 523-531. 2002

REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 115-118, 25 abr. 2003

REQUENA-MÉNDEZ, A.; ALDASORO, E.; DE LAZZARI, E.; *et al.*,. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–15, 2015.

RICE, P. The European Molecular Biology Open Software Suite EMBOSS : The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet**, v. 16, n. 6, p. 276-277, 2000.

RIGOU, P. PIDDUBNYAK, V. FAYE, A. RAIN, J. C. MICHEL, L. CALVO, F. POYET, J. L. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. **EMBO J.** v. 28. p. 1576-1588. 2009

RINK, C.; WILLIAMS, N. Unique Interactions of the Nuclear Export Receptors TbMex67 and TbMtr2 with Components of the 5S Ribonuclear Particle in *Trypanosoma brucei*. **mSphere**, v. 4, n. 4, 2019.

ROUT, M. P.; AITCHISON, J. D.; SUPRAPTO, A.; *et al.*,. The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, transport mechanism. **Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 4, p. 635–651, 2000.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, S; FISCHER, T; LUO, M; ANTÚNEZ, O; BRETTSCHEIDER, S; LECHNER, J; PÉREZ-ORTÍN, J.E; REED, R; HURT, E. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. **Cell**. 116:75–86. 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 3th ed., 2001.

SCHUBERT, T., KÖHLER, A. Mediator and TREX-2: emerging links between transcription and mRNA export. **Nucleus**. v.7, p. 126-131, 2016.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SERPELONI, M.; VIDAL, N. M.; GOLDENBERG, S.; AVILA, A. R.; HOFFMANN, F. G. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011a.

SERPELONI, M.; MORAES, C. B.; MUNIZJOÃ, J. R. C.; *et al.*. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mrna transcription/export pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011b.

SIEGEL, T. N.; GUNASEKERA, K.; CROSS, G. A. M.; OCHSENREITER, T. Gene expression in *Trypanosoma brucei*: Lessons from high-throughput RNA sequencing. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 434–441, 2011.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; KEMP, L. E.; *et al.*. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes Dev**. 23: 2009.

SMIRCICH, P., EASTMAN, G., BISPO, S., DUHAGON, M. A., GUERRA-SLOMPO, E. P., GARAT, B., GOLDENBERG, S., MUNROE, D.J., DALLAGIOVANNA, B., HOLETZ, F., SOTELO-SILVEIRA, J. R. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* **BMC Genomics**. V. 16. P. 416-443. 2015.

SMIRCICH P, FORTEZA D, EL-SAYED NM, GARAT B. Genomic analysis of sequence-dependent DNA curvature in Leishmania. **PLoS One**. 8(4). 2013.

STANLEY, G. J.; FASSATI, A.; HOOGENBOOM, B. W. Biomechanics of the transport barrier in the nuclear pore complex. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 68, p. 42–51, 2017.

STEWART, M. Nuclear export of mRNA. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 35, n. 11, p. 609–617, 2010.

STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex: Bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 7, p. 490–501, 2010.

SCHMUNIS GA, YADON ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115: 14–21, 2010.

SCHWEDE, A. *et al.*,. The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, v. 37, n. 16, p. 5511-28, set. 2009.

SEGREF, A; SHARMA, K; DOYE, V; HELLWIG, A; HUBER, J. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J.* v. 16. P. 3256–3271. 1997.

STUTZ, F. IZAURRALDE, E. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.* v. 13. p. 319-327.2003

STRASSER, K; MASUDA, S; MASON, P; PFANNSTIEL, J; OPPIZZI, M. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature.* v. 417. p. 304–308. 2002

STRÄSSER, K.; HURT, E. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, v. 413, n. 6856, p. 648-652., 2001.

TAMURA, K; HARA-NISHIMURA, I. The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *Journal of Experimental Botany.* 64(4). P. 823-832. 2012.

TENG, I. F., & WILSON, S. A. Mapping Interactions between mRNA Export Factors in Living Cells. *PLoS ONE*, 8(6). 2013.

TEWARI M, YU M, ROSS B, DEAN C, GIORDANO A, RUBIN R, AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res*; v. 57: p. 4063-4069. 1997

TEWARI, R. *et al.*,. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol*, v. 20, n. 8, p. 470-481, ago. 2010.

TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: prodecure and some aplications. *Biotechnology.* 1992.

- ULLU, E; TSCHUDI, C; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**. 6(6), 509-519. 2004.
- ULLMAN, K. S; SHAH, S; POWERS, M. A.; FORBES, D. J. The nucleoporin Nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. **Mol. Biol. Cell** v. 10; p. 649–664. 1999.
- URBANIAK MD. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and and procyclic lifecycle stages. **PLoS One.**, 7: e36619, 2012.
- VAGENENDE, V, YAP, M. G. S, TROUT, B. L Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. **Biochemistry**. v 48 (46), p 11084–11096. 2009.
- VALKOV, J. D., STEWART, M. Structural basis for binding the TREX-2 complex to nuclear pores, GAL1 localization and mRNA export. *Nucleic Acids Res.* v. 42, p. 6686-6697. 2014
- VAN DIJK, T. B., GILLEMANS, N., STEIN, C., FANIS, P., DEMMERS, J., VAN DE CORPUT, M., ... PHILIPSEN, S. Friend of Prmt1, a novel chromatin target of protein arginine methyltransferases. **Molecular and Cellular Biology**, 30(1), 260–272. 2010.
- VIPHAKONE, N. HAUTBERGUE, G. M. WALSH, M. CHANG, C. T. HOLLAND, A. FOLCO, E. G. REED, R. WILSON, S. A. TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. **Nat Commun.** 3:1006. 2012
- VIPHAKONE, N., HAUTBERGUE, G. M., WALSH, M., CHANG, C., HOLLAND, A., FOLCO, E. G., ... WILSON, S. A. TREX exposes the RNA binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, **Europe PMC Funders Group** 1–24. 2013.
- VON APPEN, A. & BECK, M. Structure determination of the nuclear pore complex with three-dimensional cryo electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **428**, 2001–2010 (2016).
- WICKRAMASINGHE, V.O; LASKEY, R. A. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. **Nature Review. Molecular Cell Biology**. v.16, p. 431-440, July. 2015
- WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 125, n. 1-2, p. 211-216, 2002.

WICKRAMASINGHE, V. O.; LASKEY, R. A. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 431–442, 2015.

WIRTZ, E. *et al.*, A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 99, n. 1, p. 89-101, 15 mar. 1999

WOLYNIAK, M.J., COLE, C.N. Harnessing genomics to explore the processes and evolution of mRNA export. **RNA Biol.** v.5. p. 68–72. 2008.

WORTHEY, E. A.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; SCHNAUFER, A.; *et al.*, Leishmania major chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. **Nucleic Acids Research**, 2003, Vol. 31, No. 14, p. 4201- 4210, 2003.

XIANG, K. *et al.*, Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 729-733, 2010

ZAMANI, A. MAT JUSOH, S. A. AL-JAMAL, H. A. SUL'AIN, M. D. JOHAN, M. F. Anti-Proliferative Effects of Dendrophthoe pentandra Methanol Extract on BCR/ABL-Positive and Imatinib-Resistant Leukemia Cell Lines. **Asian Pac J Cancer Prev.** V. 17. P. 4857-4861. 2016

ZAMUDIO, J. R. *et al.*, Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. **Mol Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 1100-1110, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; *et al.*, The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZOLOTUKHIN AS, TAN W, BEAR J, SMULEVITCH S, FELBER BK. U2AF participa da ligação de TAP (NXF1) ao mRNA. **J. Biol Chem.** 2002; 277: 3935-3942

ZULLO, A. J. MICHAUD, M. ZHANG, W. GRUSBY, M, J. Identification of the small protein rich in arginine and glycine (SRAG): a newly identified nucleolar protein that can regulate cell proliferation. **J Biol Chem.** v. 284. p. 12504-11. 2009.

WORTHEY EA, MARTINEZ-CALVILLO S, SCHNAUFER A, AGGARWAL G, CAWTHRA J, FAZELINIA G. Leishmania major chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. **Nucleic Acids Res.** 2003;31(14):4201–10. doi: 10.1093/nar/gkg469.

ANEXO 1

Lista de proteínas ortólogas de TcFOP, TcAPI5 e TcNTF2L (Gene ID)			
Espécies	Orthologue proteins (accession number)		
	TcFOP	TcAPI5	TcNTF2L
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	lcl TcCLB.509033.80:mRNA-p1	lcl TcCLB.511807.280:mRNA-p1	lcl TcCLB.511367.220:mRNA-p1
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	lcl TcCLB.505807.60:mRNA-p1	Not found	Not found
<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	Not found	lcl TCDM_06825-t26_1-p1	lcl TCDM_04668-t26_1-p1
<i>Trypanosoma rangeli</i>	lcl TRSC58_01827-t26_1-p1	lcl TRSC58_05611-t26_1-p1	lcl TRSC58_04958-t26_1-p1
<i>Trypanosoma brucei</i> brucei	lcl Tb927.6.1470:mRNA-p1	lcl Tb927.7.2240:mRNA-p1	lcl Tb927.10.2240:mRNA-p1
<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense	lcl Tbg972.6.1120:mRNA-p1	lcl Tbg972.7.2490:mRNA-p1	lcl Tbg972.10.2710:mRNA-p1
<i>Trypanosoma evansi</i>	lcl TevSTIB805.6.1520-t26_1-p1	lcl TevSTIB805.7.2300-t26_1-p1	lcl TevSTIB805.10.2400-t26_1-p1
<i>Trypanosoma vivax</i>	lcl TvY486_0600880:mRNA-p1	lcl TvY486_0702080:mRNA-p1	lcl TvY486_1002260:mRNA-p1
<i>Trypanosoma congolense</i>	lcl TcIL3000_6_910.1-p1	lcl TcIL3000_7_1550.1-p1	lcl TcIL3000_10_1850.1-p1
<i>Trypanosoma grayi</i>	Not found	lcl DQ04_05031030-t26_1-p1	lcl DQ04_02151040-t26_1-p1
<i>Leishmania braziliensis</i>	lcl LbrM.30.0100:mRNA-p1	lcl LbrM.22.0290:mRNA-p1	lcl LbrM.21.0490:mRNA-p1
<i>Leishmania donovani</i>	lcl LdBPK_300090.1.1-p1	lcl LdBPK_220180.1.1-p1	lcl LdBPK_210490.1.1-p1
<i>Leishmania infantum</i>	lcl LinJ.30.0090:mRNA-p1	lcl LinJ.22.0180:mRNA-p1	lcl LinJ.21.0490:mRNA-p1
<i>Leishmania major</i>	lcl LmjF.30.0090:mRNA-p1	lcl LmjF.22.0300:mRNA-p1	lcl LmjF.21.0430:mRNA-p1
<i>Leishmania mexicana</i>	lcl LmxM.29.0090.1-p1	lcl LmxM.22.0300.1-p1	lcl LmxM.21.0430.1-p1
<i>Leishmania aethiopica</i>	lcl LAEL147_000547100.1-p1	lcl LAEL147_000337200.1-p1	lcl LAEL147_000316100.1-p1
<i>Leishmania arabica</i>	lcl LARLEM1108_300005900.1-p1	lcl LARLEM1108_220008300.1-p1	lcl LARLEM1108_210009400.1-p1
<i>Leishmania enriettii</i>	lcl LENLEM3045_300006300.1-p1	lcl LENLEM3045_220008000.1-p1	lcl LENLEM3045_210009400.1-p1
<i>Leishmania gerbilli</i>	lcl LGELEM452_300005900.1-p1	lcl LGELEM452_220008100.1-p1	lcl LGELEM452_210009600.1-p1
<i>Leishmania panamensis</i>	lcl LPAL13_300006000.1-p1	lcl LPAL13_220008000.1-p1	lcl LPAL13_210009200.1-p1

<i>Leishmania tarentolae</i>	lcl LtaP30.0140.mRNA-p1	lcl LtaP22.0310.mRNA-p1	lcl LtaP21.0440.mRNA-p1
<i>Leishmania tropica</i>	lcl LTRL590_300006000.1-p1	lcl LTRL590_220008100.1-p1	lcl LTRL590_210009800.1-p1
<i>Leishmania turanica</i>	lcl LTULEM423_300005900.1-p1	lcl LTULEM423_220008200.1-p1	lcl LTULEM423_210009600.1-p1
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	lcl EMOLV88_300005700.1-p1	lcl EMOLV88_220007800.1-p1	lcl EMOLV88_210008900.1-p1
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	lcl rna_LpyrH10_04_2610-p1	lcl rna_LpyrH10_01_0250-p1	lcl rna_LpyrH10_14_0490-p1
<i>Leptomonas seymouri</i>	lcl rna_Lsey_0017_0370-1-p1	lcl rna_Lsey_0170_0130-1-p1	lcl rna_Lsey_0021_0180-1-p1
<i>Crithidia fasciculata</i>	lcl CFAC1_260018600.1-p1	lcl CFAC1_240009500.1-p1	lcl CFAC1_260010400.1-p1
<i>Phytomonas sp. EM1</i>	tr W6KL89 W6KL89_9TRYP	tr W6KI67 W6KI67_9TRYP	tr W6KNR1 W6KNR1_9TRYP
<i>Phytomonas sp. Hart1</i>	Not found	tr W6L9M3 W6L9M3_9TRYP	tr W6LEE1 W6LEE1_9TRYP
<i>Angomonas deanei</i>	Not found	gi 528227212 gb EPY24803.1	gi 528246370 gb EPY32813.1
<i>Strigomonas culicis</i>	Not found	gi 528229270 gb EPY25679.1 , gi 528234531 gb EPY27877.1	Not found
<i>Blechomonas ayalai</i>	lcl rna_Baya_041_0210-1-p1	lcl rna_Baya_069_0240-1-p1	lcl rna_Baya_025_0320-1-p1
<i>Bodo saltans</i>	tr A0A0S4JV36 A0A0S4JV36_BODSA	tr A0A0S4JSH7 A0A0S4JSH7_BODSA	tr A0A0S4JP36 A0A0S4JP36_BODSA
<i>Perkinsella sp.</i>	Not found	Not found	gb KNH08185 , gb KNH09172
<i>Euglena gracilis</i>	Not found	Not found	lcl EG_transcript_6772
<i>Dictyostelium purpureum</i>	Not found	Not found	tr F0ZP54 F0ZP54_DICPU
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Not found	Not found	tr Q54Z21 Q54Z21_DICDI
<i>Polysphondylium pallidum GN</i>	Not found	Not found	tr D3AXJ9 D3AXJ9_POLPA, lcl PPA127794
<i>Rhizopus delemar</i>	Not found	Not found	tr I1BSX2 I1BSX2_RHIO9
<i>Emericella nidulans</i>	Not found	Not found	tr Q5ATW2 Q5ATW2_EMENI
<i>Homo sapiens</i>	Not found	Not found	sp Q13283 G3BP1_HUMAN, sp Q9UN86 G3BP2_HUMAN
<i>Takifugu rubripes</i>	Not found	Not found	tr H2TVV0 H2TVV0_TAKRU, tr H2TVV1 H2TVV1_TAKRU
<i>Gallus gallus</i>	Not found	Not found	tr Q5ZMN1 Q5ZMN1_CHICK
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Not found	Not found	gb EME27356
<i>Ostreococcus tauri</i>	Not found	Not found	tr A0A090N4W9 A0A090N4W9_OSTTA
<i>Micromonas commoda</i>	Not found	Not found	tr C1FGP0 C1FGP0_MICCC

<i>Physcomitrella patens subsp. patens</i>	Not found	Not found	tr A9RGK5 A9RGK5_PHYPA
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Not found	Not found	tr D7FJ12 D7FJ12_ECTSI
<i>Phytophthora capsici</i>	Not found	Not found	lcl 39065 Phytophthora_capsici
<i>Phytophthora infestans</i>	Not found	Not found	tr D0NFV0 D0NFV0_PHYIT
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Not found	Not found	tr A0A0G4IGY9 A0A0G4IGY9_PLABS

*Em amarelo, espécie Perkinsela. Em vermelho, seleção representativa de espécies.

ANEXO 2

Lista de proteínas ortólogas de TcHYP (Gene ID)

Especies	Proteínas ortólogas (número de acceso) TcHYP
<i>Trypanosoma cruzi</i> Brazil A4	TcBrA4_0122400
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	TcCLB.506265.130
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	TcCLB.506435.150
<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c 2017	BCY84_19046
<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c 2018	C4B63_20g45
<i>Trypanosoma cruzi</i> Sylvio X10/1	TcSYL_0196680
<i>Trypanosoma cruzi</i> TCC	C3747_25g164
<i>Trypanosoma cruzi</i> TCC	C3747_225g31
<i>Trypanosoma cruzi</i> Y C6	TcYC6_0088190
<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58	TRSC58_01572
<i>Trypanosoma brucei</i> brucei TREU927	Tb927.4.3060
<i>Trypanosoma brucei</i> gambiense DAL972	Tbg972.4.3060
<i>Trypanosoma brucei</i> Lister strain 427	Tb427.04.3060
<i>Trypanosoma brucei</i> Lister strain 427 2018	Tb427_040033100
<i>Trypanosoma evansi</i> strain STIB 805	TevSTIB805.4.3180
<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	TvY486_0402930
<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000 2019	TcIL3000.A.H_000379000
<i>Trypanosoma theileri</i> isolate Edinburgh	TM35_000014110
<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2903	LBRM2903_200020800
<i>Leishmania donovani</i> CL-SL	LdCL_340018500
<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	LINF_340018500
<i>Leishmania major</i> strain LV39c5	LMJLV39_340019400
<i>Leishmania major</i> strain SD 75.1	LMJSD75_340019500
<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	LmxM.33:497827-498360
<i>Leishmania aethiopica</i> L147	LAEL147_000716200
<i>Leishmania amazonensis</i> MHOM/BR/71973/M2269	LAMA_000740900
<i>Leishmania arabica</i> strain LEM1108	LARLEM1108_340014600
<i>Leishmania enriettii</i> strain LEM3045	LENLEM3045_340016800
<i>Leishmania gerbilli</i> strain LEM452	LGELEM452_340013500
<i>Leishmania panamensis</i> MHOM/COL/81/L13	LPAL13_200017500
<i>Leishmania tarentolae</i> Parrot-TarII	LtaP34.1370
<i>Leishmania tropica</i> L590	LTRL590_340018500
<i>Leishmania turanica</i> strain LEM423	LTULEM423_340013500
<i>Endotrypanum monterogeii</i> strain LV88	EMOLV88_340017500
<i>Leptomonas pyrrocoris</i> H10	LpyrH10_05_1630
<i>Leptomonas seymouri</i> ATCC 30220	Lsey_0130_0160
<i>Crithidia fasciculata</i> strain Cf-CI	CFAC1_290043300

<i>Phytomonas sp. isolate Hart1</i>	CCW66608.1
<i>Angomonas deanei ATCC PRA-265</i>	KV452465.1: 119033- 119476
<i>Strigomonas culicis TCC012E</i>	AUXH01000136.1: 19086- 19541
<i>Blechomonas ayalai B08-376</i>	Baya_065_0250
<i>Bodo saltans strain Lake Konstanz</i>	BSAL_66750
<i>Paratrypanosoma confusum CUL13</i>	PCON_0008480

ANEXO 3

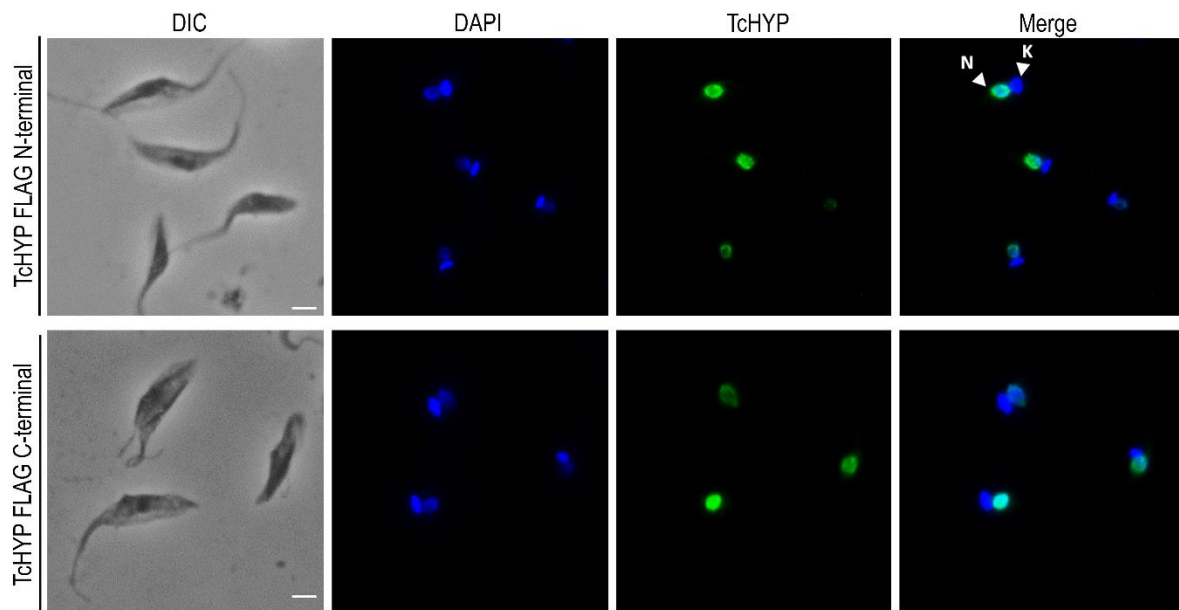


FIGURA 46. LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DE TcHYP FUSIONADA À FLAG NAS EXTREMIDADES N E C-TERMINAL EM *T. cruzi* POR IMUNOFLORESCÊNCIA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA. Detecção de TcHYP, fusionada à FLAG nas extremidades N e C-terminal, localizada por imunofluorescência indireta com o anticorpo monoclonal anti-FLAG (Invitrogen) na diluição de 1:500 e com anticorpo conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição de 1:600). MERGE: colocalização de imagens para DAPI e TcHYP. K: cinetoplasto. N: núcleo. Barra: 25 μ m.

ANEXO 4

PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS

TABELA 11. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES 1, 2 E 3 UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS DE TCFOP E TCAPI5 PARA A SUSPENSÃO DO “PÓ” DE CÉLULAS OBTIDO PELA TÉCNICA DE CRYOGRINDING

TAMPÃO 1	TAMPÃO 2	TAMPÃO 3
Na Citrato 10 mM	Na Citrato 50 mM	Na Citrato 50 mM
Hepes 20 mM	Hepes 20 mM	Hepes 20 mM
MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM
CaCl ₂ 10 µM	CaCl ₂ 10 µM	CaCl ₂ 10 µM
E64 10 µM	E64 10 µM	E64 10 µM
CHAPS 0,1%	CHAPS 0,1%	TRITON X-100 0,1%

TABELA 12. TAMPÕES UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS POR LISE POR DETERGENTE

TAMPÃO 4			TAMPÃO 5			TAMPÃO 6		
	Lise	Lavagens		Lise	Lavagens		Lise	Lavagens
Na Citrato	50mM	50mM	Hepes	20 mM	20 mM	Na Citrato	50mM	50mM
Hepes	20 mM	20 mM	NaCl	50 mM	50 mM	Hepes	20 mM	20 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	KCl	50 mM	50 mM	MgCl ₂	1 mM	1 mM
CaCl ₂	10 µM	10 µM	MgCl ₂	1 mM	1 mM	CaCl ₂	10 µM	10 µM
E64	1 µM	1 µM	CaCl ₂	10 µM	10 µM	Triton X-100	0,5%	0,1%
Triton X-100	0,5%	0,1%	Triton X-100	0,5%	0,1%	Glicerol	10%	10%
			PMSF	100 µM	100 µM	COMPLETE Mini Protease Inhibitor Coktail Tablete (Roche)	1x	1x

Utilizamos diferentes tampões para a obtenção dos complexos proteicos das proteínas alvo deste trabalho. A figura 47 ilustra os testes realizados com os tampões 1, 2 e 3, descritos na tabela 12, para a suspensão do “pó” de células obtidos pela técnica de *cryogrinding*.

Os ensaios utilizando os tampões 2 e 3 (FIGURA 47B) mostraram um padrão eletroforético diferente entre transfectantes e controle (destacados na figura) quando analisados em SDS-PAGE. No entanto, não observamos o enriquecimento das proteínas fusionadas à GFP, com tamanhos de aproximadamente de 56 kDa para TcFOP, e 91 kDa para TcAPI5.

A figura 47C, referente aos ensaios de imunoprecipitação com os tampões 2 e 3 (TABELA 12) mostra o resultado do *western blot* (utilizando anticorpo anti-GFP), onde nota-se a presença de uma banda com tamanho aproximado de 30 kDa corresponde à GFP e observa-se a ausência das bandas correspondentes as TcFOP e TcAPI5 fusionadas à GFP.

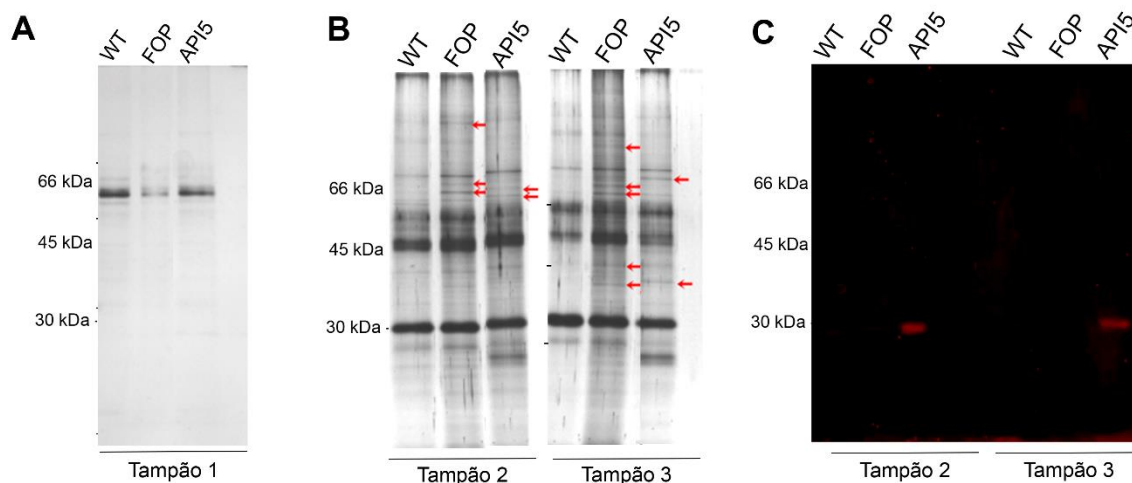


FIGURA 467. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TCFOP E TCAPI5 COM OS TAMPÕES 1, 2 E 3 PARA SUSPENSÃO DE “PÓ” DE CÉLULAS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE CRYOGRINDING. A e B) SDS-PAGE corado com solução de Nitrato de Prata apresentando frações eluídas de testes de imunoprecipitação com extrato de parasita selvagem (WT) e transfectantes expressando TcFOP (FOP) e TcAPI5 (API5) fusionadas à GFP. A composição dos tampões está descrita na tabela 2. C) Western Blot anti-GFP (diluição 1:500) do ensaio de imunoprecipitação dos complexos proteicos contendo TcFOP (FOP) e TcAPI5 com os tampões 2 e 3 (TABELA 12).

Apesar da técnica de *Cryogrinding* ser capaz de produzir extratos celulares com atividade bioquímica, a maior energia empregada para obtenção dos complexos proteicos, pode nem sempre ser benéfica e devem ser otimizadas caso a caso (STALEY, 2005). Com base nisso optamos por obter os extratos proteicos diretamente por lise por detergente utilizando os tampões 4, 5 e 6 (descritos na tabela 13). Uma vez que isso nos ajudaria a elucidar se realmente os tampões utilizados anteriormente estariam propiciando o melhor ambiente para captura por afinidade ou se a técnica utilizada para obtenção do “pó de células” (criomoagem) não estaria sendo eficaz para a obtenção dos complexos proteicos de TcFOP e TcAPI5.

Assim como os ensaios realizados com os tampões 2 e 3, observamos em SDS-PAGE que a utilização do tampão 4 (tabela 13) mostra um padrão elefororético diferente quando comparamos o parasita selvagem e parasitas transfectantes (FIGURA 48A). A figura 48B ilustra a presença de bandas com tamanhos correspondentes a TcFOP (56 kDa) e TcAPI5 (91 kDa) apenas no *flow through*, sendo ausente nas frações eluídas.

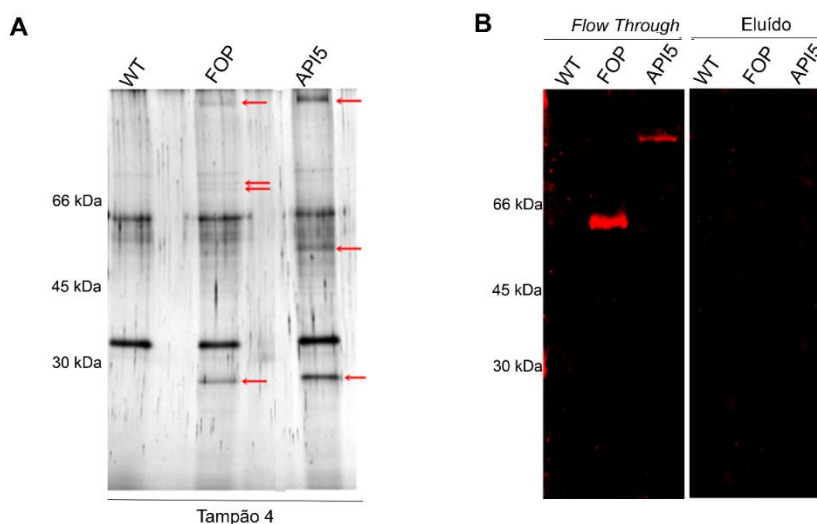


FIGURA 48. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP E TcAPI5 COM O TAMPÃO 4. A) SDS-PAGE corado com solução de nitrato de prata apresentando 1: extrato de parasita selvagem (WT), extrato de parasita transfectante expressando TcFOP fusionado à GFP (FOP) e extrato de parasita transfectante expressando TcAPI5 fusionada à GFP (API5). A composição do tampão está descrita na tabela XX. B) Western blot anti-GFP (diluição 1:500) do ensaio de imunoprecipitação por lise por detergente utilizando tampão 4 (vide tabela 8). Mostrando as frações de *Flow Through* e Eluído

Utilizando o tampão 5 (TABELA 12) observamos um padrão diferente de corrida eletroforética quando comparamos o extrato de parasita selvagem e extrato de transfectantes (FIGURA 49A). Porém, quando analisamos o *Western blot* anti-GFP (FIGURA 49 B) observamos o reconhecimento de uma proteína com massa molecular de 30 kDa nas frações eluídas dos complexos.

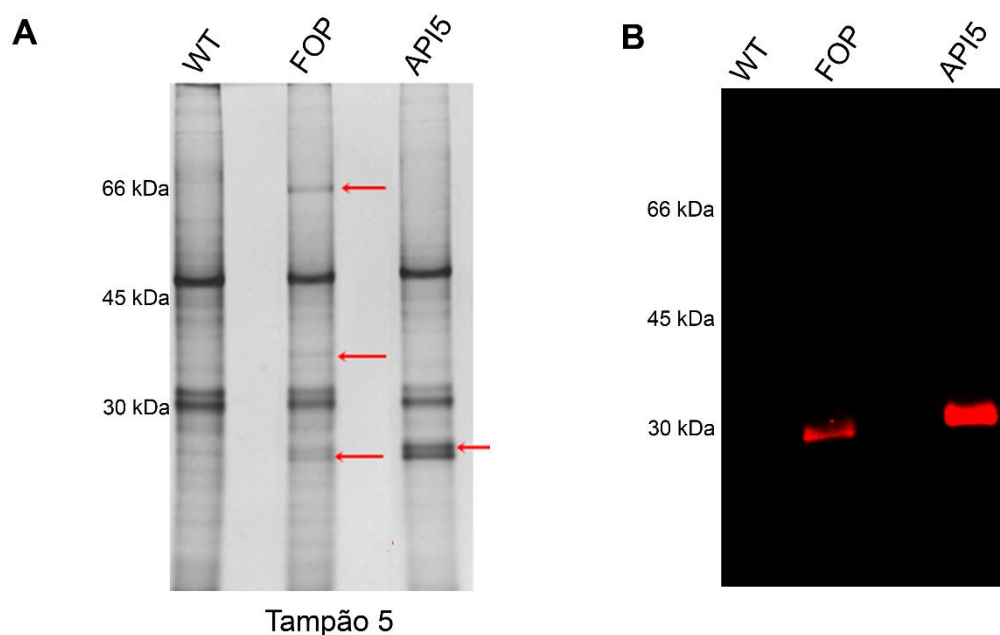


FIGURA 49. TESTE DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS CONTENDO TcFOP E TcAPI5 COM O TAMPÃO 5. A) Gel de acrilamida 13% corado com nitrato de prata mostrando os testes de imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP e TcAPI5. As setas vermelhas destacam diferentes proteínas observadas nas frações eluídas de extratos de transfectantes que não foram observadas na fração eluída do controle. B) Western blot anti-GFP (diluição 1:500) dos testes imunoprecipitação dos complexos proteicos de TcFOP e TcAPI5 mostrando banda com peso molecular de 30 kDa correspondente à GFP.

Sabe-se que a estabilidade das proteínas em solução aquosa é rotineiramente aumentada por co-solventes tais como glicerol. O glicerol é um dos polióis mais amplamente utilizados para estabilizar proteínas, que quando adicionado a uma solução proteica, promove a compactação da proteína e reduz a

flexibilidade da mesma (VAGENENDE, YAP, E TROUT, 2009). Fazendo uma busca na literatura, observamos que o glicerol havia sido utilizado com êxito para ensaios de *pulldown* da proteína FOP de humanos (HsCHTOP) (CHANG et al, 2013), então optamos por utilizar o tampão descrito na tabela 9 acrescido de glicerol na concentração final de 10%.

Após ensaio de imunoprecipitação, conseguimos observar em SDS-PAGE um enriquecimento nas amostras eluídas correspondente ao tamanho TcFOP (FIGURA 50 A) e de TcAPI5 (FIGURA 50 C). O ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos específicos anti-FOP (FIGURA 50 B) e anti-API5 (FIGURA 50 D), mostram a presença das referidas proteínas com tamanho correspondente, nas frações eluídas (*Pullout*) mostrando que as mesmas foram imunoprecipitadas e, conseqüentemente mostrando a eficiência do protocolo.

Este tampão foi utilizado para as demais ensaios de imunoprecipitação.

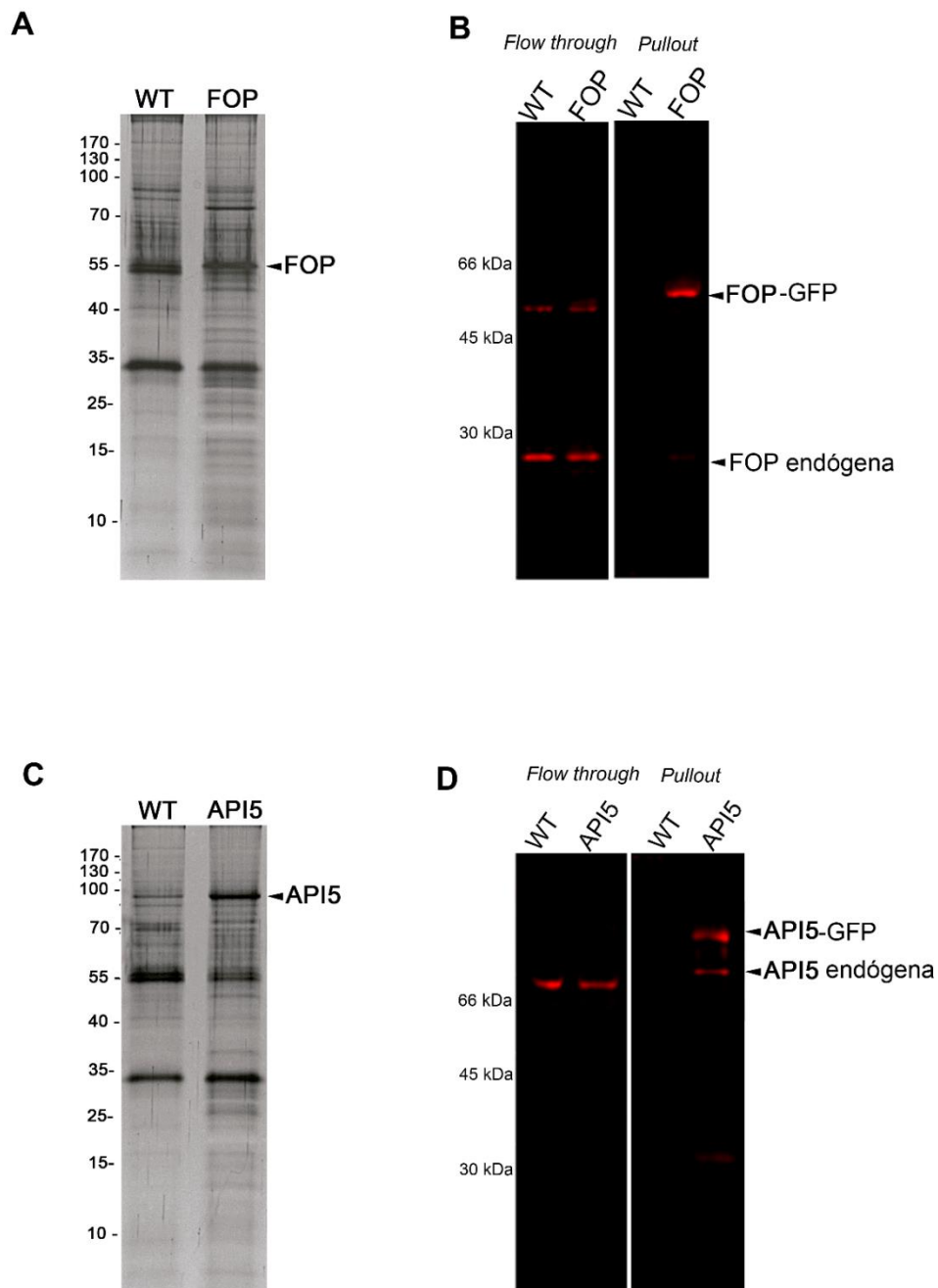


FIGURA 50. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO PADRONIZADO COM TAMPÃO 6. A) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 13% de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e parasita transfectante expressando TcFOP (FOP) fusionada à GFP. B) *Western blot* utilizando anticorpo específico anti-FOP (camundongo, 1:500). (C) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 13% de imunoprecipitação utilizando extrato proteico de parasitas selvagens (WT) e parasita transfectante expressando TcAPI5 (API5) fusionada à GFP. D) *Western blot* utilizando anticorpo específico anti-API5 (camundongo, 1:500).

ANEXO 5

TABELA 13. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 5 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcFOP

Proteína	<i>T. cruzi</i> CL Brener ID	Peptídeos únicos FOP	Peptídeos únicos WT	Média Intensidade FOP	Média Intensidade WT	Média Intensidade FOP / Média Intensidade WT
FOP	TcCLB.509033.80; TcCLB.505807.60	5,2	0	1,27E+08	0,00E+00	#DIV/0!
Importin beta-1	TcCLB.504105.150	4,6	0	1,81E+07	0,00E+00	#DIV/0!
eIF4AIII	TcCLB.506587.40	5,8	0	1,58E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503899.80; TcCLB.507513.130	4,2	0	5,01E+06	0,00E+00	#DIV/0!
NAP	TcCLB.508153.164; TcCLB.508183.20	1,8	0	2,70E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Mago	TcCLB.506945.200	2,6	0	4,88E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Importin alpha	TcCLB.509965.110	1	0	2,59E+06	0,00E+00	#DIV/0!
MLN51	TcCLB.508879.80	2,8	0	3,29E+06	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	TcCLB.509859.40; TcCLB.510515.60	2,2	0	1,40E+06	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD2	TcCLB.510755.120; TcCLB.508413.50	7,8	1,2	3,12E+07	1,15E+06	2,72E+01
GMPR	TcCLB.506519.130; TcCLB.508909.20	3,8	1	1,13E+07	5,58E+05	2,02E+01
NRBD (Lark-like)	TcCLB.511727.290; TcCLB.511727.270	2,8	0,6	6,55E+06	3,25E+05	2,01E+01
NTF2L	TcCLB.511367.220	3,4	0,6	6,39E+06	4,42E+05	1,45E+01
PABP2	TcCLB.508461.140	11,4	3,2	8,26E+07	6,02E+06	1,37E+01
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510089.110; TcCLB.510421.130	7,2	1,4	8,44E+06	6,91E+05	1,22E+01
mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	TcCLB.510359.270; TcCLB.506755.260	2	0,2	9,46E+05	1,21E+05	7,80E+00
ALBA4	TcCLB.510877.40; TcCLB.510877.30	1,8	1	7,38E+06	9,73E+05	7,58E+00
polyubiquitin, putative, degenerate	TcCLB.505169.10; TcCLB.506655.20; TcCLB.507483.4; TcCLB.506391.50	2	1,4	1,13E+07	4,36E+06	2,60E+00
Importin alfa	TcCLB.509057.20	1,4	0	2,75E+06	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD4	TcCLB.511727.160	1,4	0	1,48E+06	0,00E+00	#DIV/0!
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative (fragment)	TcCLB.457251.10; TcCLB.437545.10	0,8	0	1,17E+06	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial DEAD box protein, putative	TcCLB.511801.60	1,4	0	8,64E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TcAc2	TcCLB.503419.30:mRNA-p1;Q4CZ29	0,8	0	8,68E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Fibrillarlin	Q4E0X3;TcCLB.508277.230; TcCLB.503913.4	1,8	0	7,11E+05	0,00E+00	#DIV/0!
GAP2	TcCLB.511815.40; TcCLB.506859.70	1	0,2	3,79E+05	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial DNA topoisomerase II, putative	TcCLB.506445.60; TcCLB.508277.370	1,8	0	6,37E+05	0,00E+00	#DIV/0!
PRP19	TcCLB.509103.10; TcCLB.507801.60	1	0	4,62E+05	0,00E+00	#DIV/0!
gBP21	TcCLB.509831.36; TcCLB.506629.30	1,6	0,2	3,09E+06	6,90E+04	4,47E+01
p22 protein precursor, putative	TcCLB.509965.290; TcCLB.509053.70	2,8	0,4	3,47E+06	1,47E+05	2,36E+01
Dhh1	TcCLB.506959.30; TcCLB.510997.50	2	0,4	1,72E+06	1,47E+05	1,17E+01
SUB2	TcCLB.508319.40	1,2	0,2	6,22E+05	5,63E+04	1,10E+01
ZC3H41	TcCLB.508355.330	1,8	0,6	1,55E+06	1,59E+05	9,77E+00
Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.506443.150	1,2	0,6	1,26E+06	2,55E+05	4,93E+00
tricarboxylate carrier, putative	TcCLB.511583.40; TcCLB.510153.19	1,2	0,8	1,30E+06	3,56E+05	3,65E+00
RRM1	TcCLB.511621.50; TcCLB.509317.60	1,6	1	2,03E+06	6,64E+05	3,05E+00
ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	TcCLB.506621.30	1	0,4	4,51E+05	1,67E+05	2,70E+00
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP], glycosomal	TcCLB.508441.20; TcCLB.507547.90	2,4	0,8	1,84E+06	7,37E+05	2,49E+00
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase, putative	TcCLB.507081.130; TcCLB.503991.39	1,4	1,2	1,51E+06	6,71E+05	2,25E+00
NAP	TcCLB.509003.10	0,6	0	4,38E+06	0,00E+00	#DIV/0!
HEL67	TcCLB.506213.120	0,6	0	8,00E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503693.29; TcCLB.504125.64	0,8	0	2,21E+05	0,00E+00	#DIV/0!
carbonic anhydrase-like protein, putative	TcCLB.508817.130; TcCLB.509597.20	0,6	0	2,09E+05	0,00E+00	#DIV/0!

Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	TcCLB.509903.5	0,6	0	3,42E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.507515.40; TcCLB.508213.40	0,6	0	3,33E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Glycosomal membrane protein, putative	TcCLB.511017.50; TcCLB.509203.40	0,6	0	3,58E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504089.60; TcCLB.504001.10	1,2	0	1,80E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511287.110; TcCLB.503833.50	1,4	0	8,02E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509859.10; TcCLB.510515.30	1	0	9,86E+05	0,00E+00	#DIV/0!
poly(ADP-ribose) polymerase, putative	TcCLB.509721.60; TcCLB.510173.90	1	0	9,67E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ZC3H40	TcCLB.506211.60; TcCLB.508895.60	0,8	0	6,83E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510609.20; TcCLB.510397.10	0,6	0	6,01E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative	TcCLB.510409.39; TcCLB.508661.20; TcCLB.510293.40; TcCLB.509937.100	0,8	0,2	2,33E+06	1,53E+05	1,52E+01
HEL67	TcCLB.511285.120:mRNA-p1;Q4DH96	0,6	0	3,08E+07	2,63E+06	1,17E+01
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.511885.50	0,6	0,2	1,87E+05	2,09E+04	8,94E+00
NOP56	TcCLB.503773.50; TcCLB.506189.10; TcCLB.511573.58	0,6	0,4	2,29E+05	4,55E+04	5,03E+00
TCCB	TcCLB.511827.100; TcCLB.510535.100	0,8	0,4	7,17E+05	2,00E+05	3,58E+00
metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	TcCLB.507689.30; TcCLB.507689.50	0,6	0,4	2,36E+05	8,72E+04	2,70E+00
T-complex protein 1, theta subunit, putative	TcCLB.506247.50	0,8	0,4	2,13E+05	9,14E+04	2,33E+00
HAL	TcCLB.506247.220	1,8	1,4	1,53E+06	6,96E+05	2,20E+00
glucosamine-6-phosphate isomerase, putative	TcCLB.511025.50; TcCLB.511531.50	0,8	0,4	3,63E+05	1,66E+05	2,19E+00
chaperone DNAJ protein, putative	TcCLB.510575.200; TcCLB.510243.30	2	1	1,72E+06	8,14E+05	2,12E+00
ZC3H39	TcCLB.508895.50; TcCLB.506211.70	0,8	0	4,78E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	TcCLB.507927.20; TcCLB.509047.80	0,4	0	1,70E+05	0,00E+00	#DIV/0!
FAZ4	TcCLB.510735.90; TcCLB.506147.110	0,4	0	3,25E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NADH dehydrogenase, putative	TcCLB.508717.20; TcCLB.506839.70	0,8	0	2,62E+05	0,00E+00	#DIV/0!
snoRBP	TcCLB.507649.80	0,4	0	1,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
orotidine-5-phosphate decarboxylase/urotate phosphoribosyltransferase, putative	TcCLB.509899.110; TcCLB.507059.60	0,8	0	2,52E+05	0,00E+00	#DIV/0!
RNA Hel II	TcCLB.506123.40; TcCLB.508205.20	0,4	0	9,53E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509857.60	0,4	0	2,00E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TcHyp	TcCLB.506435.150; TcCLB.506265.130	0,6	0	1,60E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Mitochondrial carrier protein, putative	TcCLB.509127.50; TcCLB.508737.150	0,6	0	1,45E+05	0,00E+00	#DIV/0!
fibrillar, putative	TcCLB.511287.150; TcCLB.506211.250	0,4	0	8,23E+04	0,00E+00	#DIV/0!
3-ketoacyl-CoA thiolase, putative	TcCLB.510507.20; TcCLB.509463.30	0,4	0	7,67E+04	0,00E+00	#DIV/0!
DBP2B	TcCLB.510187.290; TcCLB.508547.110; TcCLB.508973.50	0,4	0	4,92E+04	0,00E+00	#DIV/0!
HsIV	TcCLB.510719.260; TcCLB.506275.20	0,4	0,2	6,69E+04	0,00E+00	#DIV/0!
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative	TcCLB.507107.40; TcCLB.509261.30	0,4	0	6,33E+04	0,00E+00	#DIV/0!
trifunctional enzyme alpha subunit, mitochondrial precursor-like protein	TcCLB.509701.10; TcCLB.508981.39	0,6	0	4,61E+04	0,00E+00	#DIV/0!
inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	TcCLB.511301.110; TcCLB.507211.40	1,4	0,2	1,09E+06	2,68E+04	4,06E+01
receptor for activated C kinase 1, putative	TcCLB.511211.130; TcCLB.511211.120	1,8	0,6	9,33E+05	2,25E+05	4,15E+00
heat shock protein, putative	TcCLB.504153.310	0,4	0,2	9,32E+04	3,58E+04	2,61E+00
API5	TcCLB.511807.280	0,6	0,2	1,01E+05	4,16E+04	2,43E+00
fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative	TcCLB.510301.20; TcCLB.504163.50; TcCLB.504163.40; TcCLB.510301.10	0,4	1	1,23E+06	5,73E+05	2,15E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.510733.50; TcCLB.506147.190	0,4	0	2,32E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD3	TcCLB.506649.80; TcCLB.508349.39	0,4	0	1,52E+05	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510091.110; TcCLB.503603.10	0,6	0	1,51E+05	0,00E+00	#DIV/0!

heat shock protein, putative (fragment)	TcCLB.506301.11	0,2	0	7,25E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503823.100	0,2	0	2,77E+05	0,00E+00	#DIV/0!
STI1	TcCLB.506321.290	0,2	0	5,77E+04	0,00E+00	#DIV/0!
surface protease GP63 (pseudogene), putative	TcCLB.505955.30; TcCLB.511213.30	0,2	0	2,07E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506493.40; TcCLB.510121.120	0,4	0	1,66E+05	0,00E+00	#DIV/0!
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor, putative	TcCLB.510105.170; TcCLB.509717.20	0,2	0	4,26E+04	0,00E+00	#DIV/0!
CMGC/CLK family protein kinase, putative	TcCLB.510421.150	0,2	0	4,79E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506211.130	0,2	0	1,36E+05	0,00E+00	#DIV/0!
chaperone DNAJ protein, putative	TcCLB.510743.100; TcCLB.510659.210	0,2	0	7,98E+04	0,00E+00	#DIV/0!
citrate synthase, putative	TcCLB.511277.110; TcCLB.509801.30	0,2	0	2,11E+04	0,00E+00	#DIV/0!
DNA-directed RNA polymerase III subunit, putative	TcCLB.505997.210; TcCLB.511417.40	0,2	0	1,00E+05	0,00E+00	#DIV/0!
hnRNPH	TcCLB.511109.130; TcCLB.504157.10	0,2	0	4,38E+04	0,00E+00	#DIV/0!
RBP42	TcCLB.509167.140	0,2	0	8,07E+04	0,00E+00	#DIV/0!
aldehyde dehydrogenase, putative (fragment)	TcCLB.509065.9	0,2	0	4,53E+04	0,00E+00	#DIV/0!
MCP12	TcCLB.509805.190; TcCLB.503939.20	0,2	0	6,57E+04	0,00E+00	#DIV/0!
POMP30	TcCLB.507017.20; TcCLB.505807.150	0,2	0	4,13E+04	0,00E+00	#DIV/0!
squalene monooxygenase, putative	TcCLB.509589.20	0,2	0	4,07E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511925.10; TcCLB.508375.70; TcCLB.507091.20; TcCLB.511643.4	0,2	0,2	3,91E+04	0,00E+00	#DIV/0!
small nuclear ribonucleoprotein SmD2, putative	TcCLB.511189.80; TcCLB.508667.49	0,2	0	3,57E+04	0,00E+00	#DIV/0!
fibrillarin, putative	TcCLB.510105.50; TcCLB.509715.40	0,2	0	3,28E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.507963.90; TcCLB.507031.20	0,2	0	5,64E+03	0,00E+00	#DIV/0!
SCD6	TcCLB.507093.300	0,4	0,2	1,48E+05	3,05E+04	4,87E+00
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.410923.20; TcCLB.507555.80	0,2	0	4,04E+05	8,39E+04	4,81E+00
nucleoside phosphorylase, putative	TcCLB.509569.100	0,2	0,2	5,35E+04	2,30E+04	2,33E+00
CYP51	TcCLB.510101.50; TcCLB.506297.260	0,2	0,2	8,72E+04	4,16E+04	2,10E+00
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.504769.170; TcCLB.510631.11	0	0	2,81E+05	1,35E+05	2,08E+00

TABELA 14. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 7 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcAPI5

Protein	<i>T. cruzi</i> CL Brener ID	Peptídeos únicos API5	Peptídeos únicos WT	Média Intensidade API5	Média Intensidade WT	Média Intensidade API5 / Média Intensidade WT
API5	TcCLB.511807.280	7,143	0	1,01E+08	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD2	TcCLB.510755.120; TcCLB.508413.50	4,286	1,429	1,33E+07	1,08E+06	1,23E+01
NTF2L	TcCLB.511367.220	2,429	1	4,83E+06	5,22E+05	9,24E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.510407.40; TcCLB.509937.190	1	0,714	2,99E+08	8,59E+07	3,48E+00
PABP2	TcCLB.508461.140	5,571	3,714	1,98E+07	7,00E+06	2,82E+00
polyubiquitin, putative, degenerate	TcCLB.505169.10; TcCLB.506655.20; TcCLB.507483.4; TcCLB.506391.50	2,429	2	1,61E+07	6,76E+06	2,39E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.510953.40; TcCLB.509005.60	1,714	0	4,11E+06	0,00E+00	#DIV/0!
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative (fragment)	TcCLB.457251.10; TcCLB.437545.10	0,714	0	4,71E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TcAc2	TcCLB.503419.30; TcCLB.509105.70	0,857	0,714	9,81E+05	4,03E+05	2,43E+00
SUB2	TcCLB.508319.40; TcCLB.511139.40	1	0,143	1,21E+06	4,02E+04	3,02E+01
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	TcCLB.506959.30; TcCLB.510997.50	1,143	0,429	6,37E+05	1,81E+05	3,52E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.511245.200	0,429	0,143	1,45E+06	4,43E+05	3,27E+00
gBP21	TcCLB.509831.36; TcCLB.506629.30	0,571	0,286	4,85E+05	1,52E+05	3,18E+00
FOP	TcCLB.509033.80; TcCLB.505807.60	0,429	0	1,22E+07	0,00E+00	#DIV/0!
eIF4AIII	TcCLB.506587.40; TcCLB.511199.9	1	0	6,98E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511287.110; TcCLB.503833.50	0,857	0,143	1,67E+06	9,63E+04	1,74E+01
UBP1	TcCLB.507093.229; TcCLB.507093.220	0,429	0,143	8,78E+05	5,40E+04	1,63E+01
Uncharacterized protein	TcCLB.508175.30; TcCLB.509149.40; TcCLB.509149.60; TcCLB.508175.329	0,429	0,143	3,15E+05	5,52E+04	5,70E+00
mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	TcCLB.510359.270; TcCLB.506755.260	1	0,286	1,15E+06	2,86E+05	4,02E+00
serine peptidase, Clan SJ, family S16, putative	TcCLB.510265.20	0,286	0	1,33E+05	5,16E+04	2,58E+00
TCCB	TcCLB.511827.100; TcCLB.510535.100	0,429	0,286	2,97E+05	1,43E+05	2,07E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.503975.40	0,286	0,143	2,53E+05	9,27E+04	2,73E+00
mitochondrial carrier protein, putative, frameshift	TcCLB.507007.99	0,143	0	1,00E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504089.60; TcCLB.504001.10	0,571	0	1,71E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Mex67B	TcCLB.506127.50; TcCLB.508271.30	0,857	0	7,18E+05	0,00E+00	#DIV/0!
dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	TcCLB.506521.9	0,143	0	6,25E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD4	TcCLB.511727.160	0,857	0	5,33E+05	0,00E+00	#DIV/0!

TcHyp	TcCLB.506435.150; TcCLB.506265.130	0,429	0	4,89E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Mago	TcCLB.506945.200	0,286	0	4,43E+05	0,00E+00	#DIV/0!
MLN51	TcCLB.508879.80	0,286	0	2,54E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Fibrillarin	TcCLB.508277.230; TcCLB.503913.4	0,429	0	1,56E+05	0,00E+00	#DIV/0!
POMP30	TcCLB.507017.20; TcCLB.505807.150	0,286	0	1,55E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Mucin-associated surface protein (MASP) (pseudogene)	TcCLB.503497.10	0,143	0	1,29E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510609.20; TcCLB.510397.10	0,143	0	1,24E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD3	TcCLB.508349.39; TcCLB.506649.80	0,143	0	1,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
transaldolase, putative	TcCLB.507889.10; TcCLB.503477.20	0,286	0	1,02E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510101.350; TcCLB.507765.130	0,286	0	9,17E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508479.380	0,143	0	8,93E+04	0,00E+00	#DIV/0!
survival of motor neuron (SMN)-like protein	TcCLB.511715.30; TcCLB.508445.40	0,143	0	7,92E+04	0,00E+00	#DIV/0!
ubiquitin-like protein, putative	TcCLB.506737.70; TcCLB.511855.20	0,143	0	7,23E+04	0,00E+00	#DIV/0!
POMP27	TcCLB.504057.40	0,143	0	6,87E+04	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	TcCLB.507927.20	0,143	0	5,33E+04	0,00E+00	#DIV/0!
threonyl-tRNA synthetase, putative	TcCLB.511181.80; TcCLB.508299.80	0,286	0	4,84E+04	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplastid kinetochore protein 4, putative	TcCLB.511575.70	0,143	0	4,79E+04	0,00E+00	#DIV/0!
HsIV	TcCLB.510719.260; TcCLB.506275.20	0,143	0,143	3,81E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510101.330; TcCLB.507765.149	0,286	0	3,52E+04	0,00E+00	#DIV/0!
protein tyrosine phosphatase, putative	TcCLB.511635.40	0,143	0	3,47E+04	0,00E+00	#DIV/0!
pyruvate kinase 2, putative	TcCLB.511281.60	0,143	0	2,56E+04	0,00E+00	#DIV/0!
SMD3	TcCLB.508257.150	0,143	0	2,07E+04	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	TcCLB.509859.40; TcCLB.510515.60	1	0,286	7,77E+05	9,20E+04	8,45E+00
ZC3H40	TcCLB.508895.60; TcCLB.506211.60	0,429	0,143	4,67E+05	7,78E+04	6,00E+00
SCD6	TcCLB.507093.300	0,286	0,143	1,19E+05	2,02E+04	5,87E+00
mitochondrial phosphate transporter, putative	TcCLB.509551.30	0,286	0	3,36E+05	6,08E+04	5,53E+00
nucleoside phosphorylase, putative	TcCLB.509569.100	0,143	0,143	1,12E+05	2,73E+04	4,08E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.504089.70; TcCLB.504001.20	0,286	0,143	5,94E+05	1,83E+05	3,24E+00
hnRNPH	TcCLB.511109.130; TcCLB.504157.10	0,286	0,143	2,16E+05	8,15E+04	2,65E+00

TABELA 15. LISTA LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 4 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcNTF2

Protein	<i>T. cruzi</i> CL Brener ID	Peptídeos únicos NTF2	Peptídeos únicos WT	Média Intensidade NTF2	Média Intensidade WT	Média Intensidade NTF2 / Média Intensidade WT
NTF2L	TcCLB.511367.220	12,25	4,5	4,44E+09	8,82E+07	5,03E+01
GMPR	TcCLB.508909.20; TcCLB.506519.130	8,25	0	1,58E+08	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	TcCLB.509859.40; TcCLB.510515.60	9,5	0	1,44E+08	0,00E+00	#DIV/0!
hnRNPH	TcCLB.511109.130; TcCLB.504157.10	6,75	0	1,02E+08	0,00E+00	#DIV/0!
NRBD (Lark-like)	TcCLB.511727.290; TcCLB.511727.270	5,25	0	1,02E+08	0,00E+00	#DIV/0!
tryparedoxin peroxidase, putative	TcCLB.509445.10; TcCLB.507259.10; TcCLB.505983.9; TcCLB.487507.10; TcCLB.504839.44; TcCLB.504839.28	4,75	0	9,58E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Dhh1	TcCLB.506959.30; TcCLB.510997.50	8,25	0	8,88E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Nonsense Reg (upf1)	TcCLB.511317.30	5	0	3,42E+07	0,00E+00	#DIV/0!
ZC3H40	TcCLB.508895.60; TcCLB.506211.60	5,75	0	2,62E+07	0,00E+00	#DIV/0!
GRP78A	TcCLB.506585.40	3,75	0	1,06E+07	0,00E+00	#DIV/0!
gBP21	TcCLB.509831.36; TcCLB.506629.30	1,75	0	8,68E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509793.50	1	0	2,22E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Tc38	TcCLB.503833.50; TcCLB.511287.110	8,5	1,5	1,24E+09	6,09E+06	2,04E+02
PABP2	TcCLB.508461.140	19,5	4,5	2,40E+09	2,20E+07	1,09E+02
DRBD2	TcCLB.510755.120; TcCLB.508413.50	11,75	4	1,61E+09	1,60E+07	1,00E+02
MtHSP70	TcCLB.507029.30	4,75	0,25	1,46E+07	1,76E+05	8,26E+01
eEF1-alfa	TcCLB.511367.360; TcCLB.510119.20; TcCLB.511369.20; TcCLB.511367.370; TcCLB.510119.9; TcCLB.511369.10; TcCLB.511369.30	7,25	2	8,57E+07	8,15E+06	1,05E+01
polyubiquitin, putative, degenerate	TcCLB.505169.10; TcCLB.506655.20; TcCLB.507483.4; TcCLB.506391.50	1,75	1,75	2,61E+07	1,30E+07	2,01E+00
ZC3H41	TcCLB.508355.330; TcCLB.508357.9	12,25	0	3,21E+08	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD4	TcCLB.511727.160	8,75	0	1,39E+08	0,00E+00	#DIV/0!
TRRM1	TcCLB.509317.60	1,5	0	1,17E+08	0,00E+00	#DIV/0!
receptor for activated C kinase 1, putative	TcCLB.511211.130; TcCLB.511211.120	7,25	0	6,23E+07	0,00E+00	#DIV/0!
ZC3H39	TcCLB.506211.70; TcCLB.508895.50	3	0	2,67E+07	0,00E+00	#DIV/0!
PABP1	TcCLB.506885.70	5,75	0	2,58E+07	0,00E+00	#DIV/0!
RBP42	TcCLB.509167.140	1,5	0	2,28E+07	0,00E+00	#DIV/0!
HSP100	TcCLB.506821.20; TcCLB.508807.10	3,5	0	2,13E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510101.350; TcCLB.507765.130	1,5	0	2,06E+07	0,00E+00	#DIV/0!
DRBD3	TcCLB.508349.39; TcCLB.506649.80	2,75	0	1,87E+07	0,00E+00	#DIV/0!
MKT1	TcCLB.506945.70; TcCLB.506835.110	6	0	1,78E+07	0,00E+00	#DIV/0!
SCD6	TcCLB.507093.300	2	0	1,49E+07	0,00E+00	#DIV/0!
UMSBP2	TcCLB.507639.20; TcCLB.503781.90; TcCLB.507639.30; TcCLB.503781.80	1,5	0	1,10E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510131.30; TcCLB.506931.20	2	0	8,96E+06	0,00E+00	#DIV/0!
SRPK	TcCLB.506945.220	2	0	7,49E+06	0,00E+00	#DIV/0!

Uncharacterized protein	TcCLB.503719.39; TcCLB.503757.30	1,25	0	7,01E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PUM	TcCLB.507049.199	0,75	0	6,16E+06	0,00E+00	#DIV/0!
GAP2	TcCLB.511815.40; TcCLB.506859.70	2,25	0	5,83E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Helicase, putative	TcCLB.510655.30; TcCLB.510753.9	3	0	5,77E+06	0,00E+00	#DIV/0!
inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	TcCLB.511301.110; TcCLB.507211.40	2,75	0	5,59E+06	0,00E+00	#DIV/0!
MHEL61	TcCLB.511801.60	2,5	0	5,46E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (fragment)	TcCLB.509903.5	0,75	0	5,00E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510729.220; TcCLB.506885.200	1,75	0	4,84E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PUF6	TcCLB.510125.10	1,75	0	4,46E+06	0,00E+00	#DIV/0!
snoRBP	TcCLB.507649.80	1,75	0	4,22E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.506443.150; TcCLB.508577.30; TcCLB.510643.50; TcCLB.398009.10; TcCLB.507591.9	1	0	4,13E+06	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative, degenerate	TcCLB.509047.80; TcCLB.507927.20	1,5	0	3,70E+06	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplast DNA-associated protein, putative	TcCLB.511039.10; TcCLB.509791.120	1,5	0	3,36E+06	0,00E+00	#DIV/0!
CAP - methyltransferase	TcCLB.508799.80; TcCLB.506773.120	1,5	0	3,35E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RBP31	TcCLB.510007.30; TcCLB.505165.10; TcCLB.507885.10; TcCLB.505007.10	1,25	0	3,35E+06	0,00E+00	#DIV/0!
cysteine peptidase (pseudogene), putative	TcCLB.460197.10; TcCLB.508595.50; TcCLB.509401.20; TcCLB.507537.10	0,75	0	3,29E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503899.80; TcCLB.507513.130	1,5	0	2,99E+06	0,00E+00	#DIV/0!
GAP1	TcCLB.506235.20; TcCLB.413977.10	1,5	0	2,77E+06	0,00E+00	#DIV/0!
KH1	TcCLB.509791.189	0,75	0	2,60E+06	0,00E+00	#DIV/0!
UBP-2	TcCLB.507093.229; TcCLB.507093.220	0,75	0	2,32E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.508139.135; TcCLB.508039.10; TcCLB.509085.90; TcCLB.511773.110; TcCLB.507801.210; TcCLB.504049.20; TcCLB.509307.10; TcCLB.509485.70	0,75	0	2,17E+06	0,00E+00	#DIV/0!
J3	TcCLB.511367.138	1,25	0	1,83E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PUF2	TcCLB.511261.120; TcCLB.507831.110	1,5	0	1,59E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.459199.10; TcCLB.511929.30; TcCLB.510083.30; TcCLB.507611.10; TcCLB.504109.200; TcCLB.507625.10	1	0	1,50E+06	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplastid-specific phospho-protein phosphatase, putative	TcCLB.506465.50; TcCLB.505193.10	1,5	0	1,41E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RRM1	TcCLB.511621.50	0,75	0	1,01E+06	0,00E+00	#DIV/0!
orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase (pseudogene), putative	TcCLB.506747.10; TcCLB.507059.60	0,75	0	9,01E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510515.30; TcCLB.509859.10	1	0	6,87E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509569.180; TcCLB.508989.90	1	0	4,61E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509059.20	0,75	0	3,17E+05	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510089.110	0,75	0	1,25E+08	1,46E+05	8,55E+02
mitochondrial DNA topoisomerase II, putative	TcCLB.506445.60; TcCLB.508277.370	5,5	0,25	1,16E+07	2,52E+04	4,61E+02
HEL67	TcCLB.511285.120; TcCLB506213.120	1	0,5	3,64E+08	2,22E+07	1,64E+01
HEL67	TcCLB.506213.120	0,75	0,5	8,56E+06	5,53E+05	1,55E+01

Ran	TcCLB.509455.80; TcCLB.503539.30	2	0,5	4,97E+06	5,70E+05	8,72E+00
ATP-dependent Clp protease subunit heat shock protein 100 (HSP100), putative (fragment)	TcCLB.508665.14	2,25	0	1,11E+07	1,27E+06	8,68E+00
histone H2B, putative	TcCLB.511635.20; TcCLB.511635.10	1	0,25	1,89E+06	2,44E+05	7,77E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.511001.90	0,75	0,25	2,22E+06	2,89E+05	7,69E+00
mucln TcMUC (pseudogene), putative	TcCLB.508021.20	0,5	0	2,64E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504089.60; TcCLB.504001.10	1,5	0	2,35E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Histone H3	TcCLB.505931.50; TcCLB.507817.9; TcCLB.507817.18; TcCLB.505931.40; TcCLB.509471.86; TcCLB.509471.77; TcCLB.509471.68; TcCLB.509471.59	0,75	0	1,50E+07	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510609.20; TcCLB.510397.10	2	0	1,24E+07	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	TcCLB.510359.270; TcCLB.506755.260	1,5	0	8,05E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504089.70; TcCLB.504001.20	0,75	0	6,86E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508965.100; TcCLB.509007.10	0,5	0	5,48E+06	0,00E+00	#DIV/0!
ZFP2	TcCLB.503989.10; TcCLB.401469.10	0,5	0	3,69E+06	0,00E+00	#DIV/0!
kZFP2	TcCLB.509731.10; TcCLB.507639.10	0,5	0	3,26E+06	0,00E+00	#DIV/0!
delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	TcCLB.509351.10; TcCLB.510943.50	1	0	2,13E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RNA Hel II	TcCLB.506123.40; TcCLB.508205.20	1	0	1,72E+06	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510421.130	0,5	0	1,62E+06	0,00E+00	#DIV/0!
eIF4AIII	TcCLB.506587.40; TcCLB.511199.9	0,75	0	1,34E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509857.60	0,75	0	1,26E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.507105.50	0,5	0	8,76E+05	0,00E+00	#DIV/0!
HSP60	TcCLB.507641.290; TcCLB.507641.280; TcCLB.507641.300; TcCLB.510187.551; TcCLB.510187.420	1	0	7,49E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DED1	TcCLB.510661.90; TcCLB.510741.180	0,5	0	5,13E+05	0,00E+00	#DIV/0!
heat shock 70 kDa protein, putative (fragment)	TcCLB.506135.9	0,5	0	3,69E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511295.50; TcCLB.506481.20	0,5	0	1,82E+05	0,00E+00	#DIV/0!
trans-sialidase, Group V, putative	TcCLB.510363.250	0,5	0	6,43E+04	0,00E+00	#DIV/0!
ALBA4	TcCLB.510877.40	0,5	0	5,21E+08	1,85E+05	2,81E+03
PGFS	TcCLB.508461.80; TcCLB.506147.9	0,75	0,25	7,15E+05	4,27E+04	1,67E+01
u2af26	TcCLB.510943.60; TcCLB.503577.20	1	0,25	2,42E+06	1,87E+05	1,29E+01
mitochondrial malate dehydrogenase, putative	TcCLB.507883.109; TcCLB.506195.110	0,5	0,25	1,06E+05	2,11E+04	5,01E+00
ALBA3	TcCLB.510877.30	0,25	0	6,05E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504985.10	0,25	0	2,82E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.509259.180	0,25	0	2,76E+06	0,00E+00	#DIV/0!
JBP2	TcCLB.508859.74	0,25	0	1,76E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506247.250	0,25	0	1,66E+06	0,00E+00	#DIV/0!
KH1	TcCLB.508719.70	0,25	0	1,32E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.507787.140; TcCLB.507625.70	0,5	0	1,27E+06	0,00E+00	#DIV/0!
trans-sialidase (pseudogene), putative	TcCLB.508521.90	0,25	0	1,23E+06	0,00E+00	#DIV/0!

Uncharacterized protein	TcCLB.510729.210; TcCLB.506885.204	0,5	0	1,17E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506289.240; TcCLB.506289.200; TcCLB.506289.130	0,25	0	1,00E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508815.40	0,25	0	8,52E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509219.50; TcCLB.509265.50	0,25	0	5,78E+05	0,00E+00	#DIV/0!
heat shock protein 85, putative	TcCLB.509643.130; TcCLB.509105.14; TcCLB.507713.30; TcCLB.509105.150	0,75	0	5,60E+05	0,00E+00	#DIV/0!
histone H2A, putative (fragment)	TcCLB.508321.11; TcCLB.511817.180; TcCLB.511817.171; TcCLB.511817.161; TcCLB.511817.151; TcCLB.511817.140; TcCLB.511809.140; TcCLB.511809.135; TcCLB.509207.20; TcCLB.509207.11; TcCLB.508321.21	0,25	0	5,00E+05	0,00E+00	#DIV/0!
trans-sialidase (pseudogene), putative	TcCLB.508303.120	0,25	0	4,97E+05	0,00E+00	#DIV/0!
PBP1	TcCLB.511409.10; TcCLB.509571.4	0,5	0	4,74E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ATPF1A	TcCLB.510395.10	0,25	0	4,65E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508269.40	0,25	0	4,60E+05	0,00E+00	#DIV/0!
tcgt1	TcCLB.510329.130	0,25	0	4,06E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ubiquitin-protein ligase- like, putative	TcCLB.508971.50	0,25	0	4,02E+05	0,00E+00	#DIV/0!
trans-sialidase, putative	TcCLB.475133.10; TcCLB.509629.10; TcCLB.511779.60	0,25	0	3,12E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Basal body protein	TcCLB.508411.30	0,25	0	1,43E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508811.30; TcCLB.503415.30	0,25	0	1,38E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504883.70:pseudogenic_transcript- p1	0,25	0	1,32E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503999.80	0,25	0	1,10E+05	0,00E+00	#DIV/0!
trans-sialidase (pseudogene), putative	TcCLB.509525.20	0,25	0	9,49E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508257.100; TcCLB.469435.10	0,25	0	9,44E+04	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplast DNA- associated protein, putative	TcCLB.510593.49	0,25	0	5,44E+04	0,00E+00	#DIV/0!
surface protease GP63 (pseudogene), putative	TcCLB.506185.10:pseudogenic_transcript- p1	0,25	0	5,01E+04	0,00E+00	#DIV/0!
ISWI	TcCLB.507265.15; TcCLB.509213.170	0,25	0	3,41E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Mucin-associated surface protein (MASP) (pseudogene)	TcCLB.506613.110:pseudogenic_transcript -p1	0,25	0	2,86E+04	0,00E+00	#DIV/0!
HSP70	TcCLB.511211.170	0	0	8,96E+07	2,03E+06	4,40E+01
heat shock protein 70 (hsp70), putative	TcCLB.511211.160	0	0	6,21E+06	4,82E+05	1,29E+01

TABELA 16. LISTA FILTRADA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE 7 RÉPLICAS TÉCNICAS INDEPENDENTES DOS ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcHYP

Protein	<i>T. cruzi</i> CL Brener ID	Peptídeos únicos HYP	Peptídeos únicos WT	Média Intensidade HYP	Média Intensidade API5	Média Intensidade HYP / Média Intensidade WT
TcHyp	TcCLB.506435.150; TcCLB.506265.130	5	0	3,36E+08	0,00E+00	#DIV/0!
Mex67B	TcCLB.506127.50; TcCLB.508271.30	7	0	1,48E+08	0,00E+00	#DIV/0!
p22 protein precursor, putative	TcCLB.509965.290; TcCLB.509053.70	6	0	1,22E+08	0,00E+00	#DIV/0!
GMPR	TcCLB.508909.20; TcCLB.506519.130	4	0	1,59E+07	7,96E+04	2,00E+02
NRBD (Lark-like)	TcCLB.511727.290; TcCLB.511727.270	4	0	3,37E+07	1,91E+05	1,77E+02
Uncharacterized protein	TcCLB.510609.20; TcCLB.510397.10	1	0	2,63E+06	2,46E+04	1,07E+02
DRBD4	TcCLB.511727.160	3	0	5,90E+06	1,03E+05	5,74E+01
histone H2A, putative	TcCLB.509207.11; TcCLB.511817.180	2	1	1,24E+07	4,01E+05	3,09E+01
NTF2L	TcCLB.511367.220	3	1	1,50E+07	5,03E+05	2,97E+01
mitochondrial malate dehydrogenase, putative	TcCLB.507883.109; TcCLB.506195.110	3	1	6,44E+06	2,44E+05	2,64E+01
heat shock protein 85, putative	TcCLB.509643.130; TcCLB.509105.140; TcCLB.507713.30; TcCLB.509105.150	11	5	1,09E+08	5,29E+06	2,06E+01
PABP2	TcCLB.508461.140	11	5	1,30E+08	9,65E+06	1,35E+01
eIF4A1	TcCLB.511585.190; TcCLB.510155.180	4	1	4,91E+06	4,04E+05	1,22E+01
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510089.110; TcCLB.510421.130	8	1	1,97E+07	1,64E+06	1,20E+01
DRBD2	TcCLB.510755.120; TcCLB.508413.50	6	2	2,24E+07	2,32E+06	9,69E+00
Ran	TcCLB.509455.80; TcCLB.503539.30	3	1	9,21E+06	9,69E+05	9,50E+00
RRM1	TcCLB.511621.50; TcCLB.509317.60	2	1	7,94E+06	9,77E+05	8,13E+00
eEF1-alfa	TcCLB.510119.20; TcCLB.511367.360; TcCLB.511367.370; TcCLB.511369.20; TcCLB.510119.9; TcCLB.511369.10; TcCLB.511369.15	7	6	6,64E+07	9,78E+06	6,78E+00
Histone H4	TcCLB.508203.29; TcCLB.510351.11; TcCLB.508203.56; TcCLB.508203.47	4	2	2,69E+07	4,73E+06	5,68E+00
Histone H3	TcCLB.505931.50; TcCLB.507817.9	1	1	2,69E+07	4,84E+06	5,57E+00
Histone H2B	TcCLB.511635.20; TcCLB.511635.10	2	1	3,87E+07	7,90E+06	4,91E+00
polyubiquitin, putative, degenerate	TcCLB.505169.10; TcCLB.506655.20; TcCLB.507483.4	2	1	2,50E+07	5,52E+06	4,52E+00
alpha tubulin, putative	TcCLB.411235.9	8	7	1,32E+08	4,66E+07	2,83E+00
pyruvate phosphate dikinase, putative	TcCLB.506297.190; TcCLB.510101.140	17	11	8,52E+07	3,40E+07	2,51E+00
HEL67	TcCLB.511285.120	1	0	9,53E+07	1,40E+07	6,82E+00
ZC3H41	TcCLB.508355.330; TcCLB.508357.9	6	0	1,61E+07	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	TcCLB.510359.270; TcCLB.506755.260	2	0	5,03E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Fibrillarlin	TcCLB.508277.230; TcCLB.503913.4	2	0	1,45E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PFK	TcCLB.508153.340	1	0	7,30E+05	0,00E+00	#DIV/0!
MHEL61	TcCLB.511801.60	4	0	5,46E+06	7,49E+04	7,29E+01
Dhh1	TcCLB.506959.30; TcCLB.510997.50	4	0	9,09E+06	2,11E+05	4,31E+01
inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	TcCLB.511301.110; TcCLB.507211.40; TcCLB.511351.9	3	0	2,46E+06	6,42E+04	3,84E+01
Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.506443.150	1	1	3,16E+06	1,04E+05	3,06E+01

ZC3H39	TcCLB.508895.50; TcCLB.506211.70	2	0	3,03E+06	1,84E+05	1,65E+01
HSP60	TcCLB.507641.290; TcCLB.507641.280; TcCLB.510187.420; TcCLB.507641.300	8	4	4,30E+07	3,44E+06	1,25E+01
PGFS	TcCLB.508461.80; TcCLB.507617.9	5	3	4,60E+07	4,11E+06	1,12E+01
MtHSP70	TcCLB.507029.30	8	3	2,80E+07	3,27E+06	8,57E+00
tryparedoxin peroxidase, putative	TcCLB.509445.10; TcCLB.507259.10; TcCLB.505983.9; TcCLB.487507.10	4	2	2,96E+07	4,54E+06	6,53E+00
chaperone DNAJ protein, putative	TcCLB.510575.200; TcCLB.510243.30	2	1	1,82E+06	3,67E+05	4,96E+00
ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative	TcCLB.510409.39; TcCLB.508661.20; TcCLB.510293.40; TcCLB.509937.100	1	0	9,99E+06	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial DNA topoisomerase II, putative	TcCLB.506445.60; TcCLB.508277.370	5	0	9,77E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511287.110; TcCLB.503833.50	2	0	7,31E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PABP1	TcCLB.506885.70	3	0	5,92E+06	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	TcCLB.509859.40; TcCLB.510515.60	2	0	3,57E+06	0,00E+00	#DIV/0!
CYP	TcCLB.510947.50; TcCLB.509499.10	1	0	3,46E+06	0,00E+00	#DIV/0!
fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative	TcCLB.510301.20; TcCLB.504163.50; TcCLB.504163.40; TcCLB.510301.10	1	0	2,94E+06	0,00E+00	#DIV/0!
SUB2	TcCLB.508319.40	2	0	2,62E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509793.50	1	0	2,49E+06	0,00E+00	#DIV/0!
ZC3H40	TcCLB.508895.60; TcCLB.506211.60	1	0	2,40E+06	0,00E+00	#DIV/0!
nascent polypeptide associated complex subunit, putative	TcCLB.510579.70; TcCLB.510241.60	1	0	1,82E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	TcCLB.509903.5	1	0	1,59E+06	0,00E+00	#DIV/0!
NOP56	TcCLB.506189.10; TcCLB.503773.50; TcCLB.511573.58	2	0	1,13E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RBSR2/SR34	TcCLB.508209.39; TcCLB.503919.30	1	0	1,08E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509857.60	1	0	9,81E+05	0,00E+00	#DIV/0!
fibrillarlin, putative	TcCLB.511287.150; TcCLB.506211.250	1	0	7,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
heat shock protein, putative (fragment)	TcCLB.506301.11	1	0	3,59E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DJ-1 family protein, putative	TcCLB.509047.40; TcCLB.507927.60	1	0	2,60E+05	0,00E+00	#DIV/0!
trifunctional enzyme alpha subunit, mitochondrial precursor-like protein, putative	TcCLB.509701.10; TcCLB.508981.39	1	0	8,80E+04	0,00E+00	#DIV/0!
tricarboxylate carrier, putative	TcCLB.511583.40; TcCLB.510153.19	1	0	8,79E+04	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial carrier protein, putative	TcCLB.509127.50; TcCLB.508737.150	1	0	3,52E+04	0,00E+00	#DIV/0!
elongation factor 2, putative	TcCLB.510963.90; TcCLB.508169.20	7	1	2,15E+07	4,35E+05	4,94E+01
Enolase	TcCLB.504105.140	3	0	5,27E+06	1,26E+05	4,20E+01
Peroxiredoxin	TcCLB.509499.14	1	0	1,98E+06	6,03E+04	3,28E+01
D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	TcCLB.510099.120; TcCLB.506263.10	4	0	9,63E+06	4,99E+05	1,93E+01
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	TcCLB.509065.70; TcCLB.509065.60; TcCLB.506943.60; TcCLB.506943.50	2	1	8,74E+06	5,40E+05	1,62E+01
amidinotransferase, putative	TcCLB.508693.50; TcCLB.505989.110	2	0	3,67E+06	2,42E+05	1,51E+01
Uncharacterized protein	TcCLB.510679.40; TcCLB.511439.40	3	0	4,63E+06	3,90E+05	1,19E+01
eEF1-gamma	TcCLB.506459.290; TcCLB.510163.20	1	0	1,77E+06	1,56E+05	1,13E+01
serine peptidase, Clan SC,	TcCLB.509695.220;	1	1	3,28E+06	2,97E+05	1,11E+01

Family S10, putative	TcCLB.509695.210; TcCLB.508671.20					
succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative	TcCLB.508479.340	1	1	4,06E+06	4,36E+05	9,30E+00
ATPB	TcCLB.509233.180	3	1	3,33E+06	3,98E+05	8,36E+00
Glutamate dehydrogenase (NAD(P)(+))	TcCLB.508111.30; TcCLB.507875.20	6	3	2,50E+07	3,65E+06	6,85E+00
KH1	TcCLB.508719.70	1	0	2,83E+06	4,24E+05	6,68E+00
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative (fragment)	TcCLB.457251.10; TcCLB.437545.10	1	0	2,31E+06	3,59E+05	6,45E+00
GRP78A	TcCLB.506585.40	6	2	1,14E+07	2,14E+06	5,31E+00
GAP2	TcCLB.511815.40; TcCLB.506859.70	2	0	1,60E+06	3,41E+05	4,70E+00
SCD6	TcCLB.507093.300	1	0	3,16E+06	6,74E+05	4,69E+00
GAP1	TcCLB.506235.20; TcCLB.413977.10	1	0	1,38E+06	4,54E+05	3,03E+00
ALBA4	TcCLB.510877.40	0	0	3,18E+05	0,00E+00	#DIV/0!
gBP21	TcCLB.509831.36; TcCLB.506629.30	2	0	8,56E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP], glycosomal	TcCLB.508441.20; TcCLB.507547.90	2	0	5,76E+06	0,00E+00	#DIV/0!
14-3-3-I	TcCLB.511589.130; TcCLB.508851.180	1	0	4,45E+06	0,00E+00	#DIV/0!
HSP110	TcCLB.507831.60	1	0	4,05E+06	0,00E+00	#DIV/0!
P23	TcCLB.507007.70; TcCLB.509551.70	0	0	2,54E+06	0,00E+00	#DIV/0!
S-adenosylhomocysteine hydrolase, putative	TcCLB.511589.200; TcCLB.511229.50	2	0	3,07E+06	0,00E+00	#DIV/0!
CYPA	TcCLB.506925.300	1	0	2,63E+06	0,00E+00	#DIV/0!
14-3-3-II	TcCLB.511167.90; TcCLB.506775.80	1	0	2,20E+06	0,00E+00	#DIV/0!
TXN1	TcCLB.509997.30	1	0	2,69E+06	0,00E+00	#DIV/0!
HAL	TcCLB.506247.220	2	0	2,88E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	TcCLB.507681.20; TcCLB.507767.10	1	0	1,98E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Cystathione gamma lyase, putative (Fragment)	TcCLB.510739.19	0	0	1,92E+06	0,00E+00	#DIV/0!
hnRNPH	TcCLB.511109.130; TcCLB.504157.10	1	0	2,41E+06	0,00E+00	#DIV/0!
MCP5	TcCLB.511289.70; TcCLB.506211.160	1	0	1,88E+06	0,00E+00	#DIV/0!
cystathione gamma lyase, putative	TcCLB.510661.250; TcCLB.510741.10	1	0	1,92E+06	0,00E+00	#DIV/0!
urocanate hydratase, putative	TcCLB.504045.110	1	0	2,18E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Thioredoxin-like, putative	TcCLB.511239.110	1	0	1,56E+06	0,00E+00	#DIV/0!
hypothetical protein, conserved	TcCLB.510131.30; TcCLB.506931.20	1	0	2,06E+06	0,00E+00	#DIV/0!
isocitrate dehydrogenase, putative	TcCLB.506925.319	1	0	1,74E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Rab1A	TcCLB.503715.30	1	0	4,49E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509859.10	1	0	1,60E+06	0,00E+00	#DIV/0!
mASAT	TcCLB.510945.70	1	0	1,40E+06	0,00E+00	#DIV/0!
snoRBP	TcCLB.507649.80	1	0	1,54E+06	0,00E+00	#DIV/0!
receptor for activated C kinase 1, putative	TcCLB.511211.130; TcCLB.511211.120	1	0	1,43E+06	0,00E+00	#DIV/0!
T-complex protein 1, delta subunit, putative	TcCLB.509695.200	1	0	1,16E+06	0,00E+00	#DIV/0!
ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	TcCLB.506621.30; TcCLB.511555.80	1	0	1,19E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PPase1	TcCLB.511385.30; TcCLB.510773.20	1	0	7,53E+05	0,00E+00	#DIV/0!
FOP	TcCLB.509033.80; TcCLB.505807.60	0	0	1,31E+06	0,00E+00	#DIV/0!
EF-Tu	TcCLB.511277.70; TcCLB.506357.40	1	0	1,21E+06	0,00E+00	#DIV/0!

arginine kinase	TcCLB.507241.30; TcCLB.482369.29	1	0	1,17E+06	0,00E+00	#DIV/0!
upf1	TcCLB.511317.30	1	0	1,15E+06	0,00E+00	#DIV/0!
TR	TcCLB.503555.30; TcCLB.484299.10; TcCLB.504507.5	1	0	1,05E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Mitochondrial processing peptidase, beta subunit, putative	TcCLB.511181.50	1	0	9,74E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506579.20	0	0	1,10E+06	0,00E+00	#DIV/0!
MtHSP70	TcCLB.510733.50; TcCLB.506147.190	0	0	9,68E+05	0,00E+00	#DIV/0!
glycosomal membrane protein, putative	TcCLB.507009.10; TcCLB.510669.20; TcCLB.508461.570	1	0	7,23E+05	0,00E+00	#DIV/0!
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic, putative	TcCLB.510187.60; TcCLB.510105.230; TcCLB.511235.20; TcCLB.508537.10; TcCLB.508979.71; TcCLB.509717.80	1	0	8,33E+05	0,00E+00	#DIV/0!
LA	TcCLB.511367.60	1	0	8,57E+05	0,00E+00	#DIV/0!
snoRBP	TcCLB.510859.17; TcCLB.507649.70; TcCLB.510859.10	1	0	8,40E+05	0,00E+00	#DIV/0!
R27-2 protein, putative	TcCLB.510247.10; TcCLB.506491.20; TcCLB.443971.10	1	0	6,40E+05	0,00E+00	#DIV/0!
enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, putative	TcCLB.508153.130; TcCLB.508185.10	1	0	7,97E+05	0,00E+00	#DIV/0!
kZFP2	TcCLB.509731.10; TcCLB.507639.10	1	0	7,71E+05	0,00E+00	#DIV/0!
RISP	TcCLB.510759.120; TcCLB.506999.90	0	0	6,30E+05	0,00E+00	#DIV/0!
nucleosome assembly protein, putative	TcCLB.507963.79; TcCLB.507031.29	0	0	7,08E+05	0,00E+00	#DIV/0!
peptide methionine sulfoxide reductase, putative	TcCLB.509611.180; TcCLB.510855.10	1	0	6,15E+05	0,00E+00	#DIV/0!
HA2Z	TcCLB.511323.40; TcCLB.507979.4	1	0	5,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase, putative	TcCLB.509899.110; TcCLB.507059.60	1	0	6,60E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Aminotransferase class IV, putative	TcCLB.506559.410	1	0	5,69E+05	0,00E+00	#DIV/0!
cytosolic nonspecific dipeptidase, putative	TcCLB.510257.80; TcCLB.509213.120	1	0	5,95E+05	0,00E+00	#DIV/0!
T-complex protein 1, eta subunit, putative	TcCLB.508461.410	1	0	5,52E+05	0,00E+00	#DIV/0!
UMP-CMP kinase, mitochondrial, putative	TcCLB.508501.250	1	0	4,90E+05	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	TcCLB.507689.30	0	0	4,39E+05	0,00E+00	#DIV/0!
fibrillarin, putative	TcCLB.510105.50; TcCLB.509715.40	0	0	4,88E+05	0,00E+00	#DIV/0!
sterol 24-c-methyltransferase, putative	TcCLB.510185.10; TcCLB.505683.10; TcCLB.504191.10	1	0	4,70E+05	0,00E+00	#DIV/0!
MCP1	TcCLB.504153.160	1	0	4,11E+05	0,00E+00	#DIV/0!
glutamic-pyruvic transaminase, putative	TcCLB.506529.430	0	0	3,66E+05	0,00E+00	#DIV/0!
CYP51	TcCLB.510101.50; TcCLB.506297.260	1	0	4,25E+05	0,00E+00	#DIV/0!
alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative	TcCLB.505807.110; TcCLB.503815.10	1	0	4,17E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ATOM69	TcCLB.511803.40	1	0	4,03E+05	0,00E+00	#DIV/0!
cysteine peptidase, putative	TcCLB.509401.30; TcCLB.509429.329; TcCLB.508595.40; TcCLB.510889.261; TcCLB.506529.550; TcCLB.507537.20; TcCLB.507537.10	0	0	2,88E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ADP-ribosylation factor, putative (fragment)	TcCLB.419417.4; TcCLB.509539.50	1	0	2,80E+05	0,00E+00	#DIV/0!
PAS-domain containing phosphoglycerate kinase, putative	TcCLB.506945.20; TcCLB.506835.70	1	0	2,72E+05	0,00E+00	#DIV/0!
co-chaperone GrpE, putative	TcCLB.507929.20	0	0	2,61E+05	0,00E+00	#DIV/0!

kinetoplast DNA-associated protein, putative	TcCLB.509793.30; TcCLB.508719.40	0	0	2,47E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.503421.50; TcCLB.507167.240; TcCLB.508631.20	0	0	2,43E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Protein of unknown function (DUF667), putative	TcCLB.511367.290	1	0	2,06E+05	0,00E+00	#DIV/0!
cysteine peptidase inhibitor, putative	TcCLB.511907.200; TcCLB.506801.80	0	0	1,62E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NADH dehydrogenase, putative	TcCLB.508717.20; TcCLB.506839.70	0	0	1,31E+05	0,00E+00	#DIV/0!
HSP100	TcCLB.506821.20; TcCLB.506617.90; TcCLB.508807.10	0	0	1,17E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506625.240	0	0	4,86E+04	0,00E+00	#DIV/0!
GRP170	TcCLB.508457.20; TcCLB.506885.440	0	0	1,07E+08	5,30E+04	2,01E+03
DRBD3	TcCLB.506649.80; TcCLB.508349.39	1	0	1,20E+06	2,27E+04	5,27E+01
RNA Hel II	TcCLB.506123.40; TcCLB.508205.20	1	0	2,02E+06	4,69E+04	4,31E+01
Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative (Fragment)	TcCLB.511261.160	0	0	7,81E+05	2,46E+04	3,18E+01
AKR	TcCLB.511287.49; TcCLB.506213.50	2	0	2,39E+06	7,63E+04	3,13E+01
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase, putative	TcCLB.507081.130; TcCLB.503991.39	1	0	1,93E+06	6,60E+04	2,92E+01
metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	TcCLB.510837.20; TcCLB.510837.9	0	0	3,51E+06	1,23E+05	2,85E+01
tyrosine aminotransferase	TcCLB.510187.30:mRNA-p1;TcCLB.510187.40:mRNA-p1;TcCLB.510187.50:mRNA-p1;TcCLB.511461.20:mRNA-p1;TcCLB.510795.10:mRNA-p1;Q4CVI0;TcCLB.510565.11:mRNA-p1;Q4DPG7	2	0	5,88E+06	2,25E+05	2,61E+01
calpain-like cysteine peptidase, putative	TcCLB.508675.29; TcCLB.506983.48; TcCLB.506983.39	1	0	3,48E+06	1,84E+05	1,89E+01
mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	TcCLB.507927.20; TcCLB.509047.80	1	0	4,40E+06	2,56E+05	1,72E+01
heat shock 70 kDa protein, putative (fragment)	TcCLB.506135.9; TcCLB.503721.39	1	1	2,70E+06	2,01E+05	1,35E+01
glycosomal malate dehydrogenase, putative	TcCLB.511293.69; TcCLB.506503.69	1	0	1,80E+06	1,47E+05	1,23E+01
ATPF1A	TcCLB.510609.40; TcCLB.503617.40	1	0	1,34E+06	1,18E+05	1,13E+01
MKT1	TcCLB.506945.70; TcCLB.506835.110	1	0	2,73E+05	2,50E+04	1,09E+01
glycerate kinase, putative	TcCLB.509139.10; TcCLB.508741.170	1	0	1,73E+06	1,72E+05	1,00E+01
PAR3	TcCLB.509617.20	2	0	2,48E+06	2,51E+05	9,90E+00
ATPF1A	TcCLB.510395.10	1	1	3,39E+06	4,66E+05	7,29E+00
10 kDa heat shock protein, putative	TcCLB.509505.70; TcCLB.509505.30; TcCLB.508209.90; TcCLB.508209.120; TcCLB.508209.100; TcCLB.509505.50	1	0	2,44E+06	3,58E+05	6,82E+00
leucine rich repeat protein, putative	TcCLB.508707.310	1	1	3,15E+06	9,89E+05	3,19E+00
flagellar calcium-binding 24 kDa protein (fragment)	TcCLB.507891.56; TcCLB.509391.10	0	1	1,99E+06	8,69E+05	2,29E+00
NDPK1	TcCLB.508707.200	1	0	6,30E+05	2,91E+05	2,17E+00
ALBA3	TcCLB.510877.30	0	0	2,99E+07	7,62E+05	3,93E+01
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.509485.70; TcCLB.509307.10; TcCLB.504049.20	0	0	2,97E+06	0,00E+00	#DIV/0!
HMGS	TcCLB.511903.40; TcCLB.511071.50	1	0	3,37E+06	0,00E+00	#DIV/0!
cystathionine beta-synthase, putative	TcCLB.508175.360; TcCLB.510381.10	1	0	3,61E+06	0,00E+00	#DIV/0!
1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene	TcCLB.506629.200	0	0	2,54E+06	0,00E+00	#DIV/0!

dioxygenase, putative						
DED1	TcCLB.510661.90	0	0	3,14E+06	0,00E+00	#DIV/0!
PKAC2	TcCLB.508461.280; TcCLB.508461.310	1	0	2,96E+06	0,00E+00	#DIV/0!
glutamic--pyruvic transaminase, putative	TcCLB.510889.140; TcCLB.510889.120; TcCLB.506529.420	0	0	2,32E+06	0,00E+00	#DIV/0!
heat shock protein, putative	TcCLB.504153.310	1	0	2,23E+06	0,00E+00	#DIV/0!
eIF4AIII	TcCLB.506587.40	1	0	2,22E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503899.80; TcCLB.507513.130	1	0	2,19E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RanBP1	TcCLB.507099.30	1	0	2,17E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	TcCLB.510105.170; TcCLB.509717.20	1	0	2,02E+06	0,00E+00	#DIV/0!
TAC102	TcCLB.509207.40	0	0	1,94E+06	0,00E+00	#DIV/0!
DBP2A	TcCLB.510187.290	0	0	1,89E+06	0,00E+00	#DIV/0!
MTR2	TcCLB.508173.180	0	0	1,78E+06	0,00E+00	#DIV/0!
EIF5A	TcCLB.506925.130; TcCLB.506925.120	1	0	1,55E+06	0,00E+00	#DIV/0!
ribonuclease HII, putative	TcCLB.510287.60; TcCLB.503891.70	1	0	1,59E+06	0,00E+00	#DIV/0!
ARF1	TcCLB.510755.60; TcCLB.510755.50; TcCLB.508415.50; TcCLB.508415.40	1	0	9,74E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TcAc2	TcCLB.509105.70	0	0	1,48E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509007.10; TcCLB.508965.100	0	0	1,37E+06	0,00E+00	#DIV/0!
GCVL-2	TcCLB.511025.110; TcCLB.507089.270	1	0	1,21E+06	0,00E+00	#DIV/0!
RNA Hel	TcCLB.507641.120	1	0	1,13E+06	0,00E+00	#DIV/0!
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	TcCLB.507831.70	1	0	1,08E+06	0,00E+00	#DIV/0!
iron superoxide dismutase, putative	TcCLB.511019.90; TcCLB.508445.20; TcCLB.511715.10	0	0	6,91E+05	0,00E+00	#DIV/0!
eEF1-beta	TcCLB.509733.100; TcCLB.507671.30; TcCLB.506201.39	0	0	8,91E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Phosphotransferase	TcCLB.511067.30; TcCLB.511903.120	1	0	9,30E+05	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	TcCLB.510091.110; TcCLB.503603.10	1	0	9,11E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.510355.150	0	0	9,01E+05	0,00E+00	#DIV/0!
hexokinase, putative	TcCLB.510121.20; TcCLB.508951.20	1	0	8,14E+05	0,00E+00	#DIV/0!
aconitase, putative	TcCLB.511277.290	1	0	6,18E+05	0,00E+00	#DIV/0!
malic enzyme	TcCLB.508647.280; TcCLB.505183.30	0	0	6,65E+05	0,00E+00	#DIV/0!
SRPK	TcCLB.506945.220	0	0	7,78E+05	0,00E+00	#DIV/0!
spermidine synthase, putative	TcCLB.510339.50; TcCLB.510337.40; TcCLB.504033.130; TcCLB.503855.20	0	0	6,69E+05	0,00E+00	#DIV/0!
J2	TcCLB.511627.110	1	0	4,93E+05	0,00E+00	#DIV/0!
pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative	TcCLB.509067.70; TcCLB.511023.10	1	0	6,25E+05	0,00E+00	#DIV/0!
METK1	TcCLB.510445.50; TcCLB.506945.160	1	0	6,93E+05	0,00E+00	#DIV/0!
VCP	TcCLB.509733.170	1	0	6,74E+05	0,00E+00	#DIV/0!
T-complex protein 1, theta subunit, putative	TcCLB.506247.50	1	0	5,19E+05	0,00E+00	#DIV/0!
T-complex protein 1, beta subunit, putative	TcCLB.508357.90	0	0	6,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
threonyl-tRNA synthetase, putative	TcCLB.511181.80	0	0	5,62E+05	0,00E+00	#DIV/0!
P5CDH	TcCLB.510943.50; TcCLB.509351.10	1	0	4,56E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NADP-dependent alcohol hydrogenase, putative	TcCLB.504339.19; TcCLB.509331.210; TcCLB.508677.80; TcCLB.504425.60	1	0	5,58E+05	0,00E+00	#DIV/0!

arginine N-methyltransferase, putative	TcCLB.510311.140; TcCLB.508153.1110	0	0	5,43E+05	0,00E+00	#DIV/0!
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative	TcCLB.510663.70; TcCLB.507011.269; TcCLB.510737.10	0	0	5,37E+05	0,00E+00	#DIV/0!
translationally controlled tumor protein (TCTP), putative	TcCLB.510065.30; TcCLB.506207.50	0	0	5,35E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NAP	TcCLB.509003.10; TcCLB.506563.100	0	0	5,13E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511319.20; TcCLB.510055.50	1	0	5,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NAP	TcCLB.508153.164	0	0	4,92E+05	0,00E+00	#DIV/0!
cytochrome-b5 reductase, putative	TcCLB.506821.210; TcCLB.503873.10	0	0	4,25E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Domain of unknown function (DUF4379), putative	TcCLB.510329.30	0	0	4,82E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.504193.30	0	0	4,76E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Glutamate dehydrogenase, putative (Fragment)	TcCLB.509445.39	1	0	4,33E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504153.280	1	0	4,65E+05	0,00E+00	#DIV/0!
2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase, putative	TcCLB.503935.20; TcCLB.506025.60	0	0	4,63E+05	0,00E+00	#DIV/0!
mitochondrial RNA binding protein, putative	TcCLB.509895.20	0	0	4,57E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Importin alfa	TcCLB.509057.20	0	0	4,56E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506817.10	0	0	4,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
chaperonin alpha subunit, putative	TcCLB.511531.40; TcCLB.511025.70	1	0	4,35E+05	0,00E+00	#DIV/0!
cytochrome c oxidase subunit 10, putative	TcCLB.510783.49; TcCLB.509961.9; TcCLB.508651.20; TcCLB.455721.9	0	0	4,26E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Glutamate dehydrogenase, putative (Fragment)	TcCLB.505843.10	0	0	4,20E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ALBA2	TcCLB.504089.70; TcCLB.504001.20	0	0	4,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal, putative	TcCLB.510889.221; TcCLB.506529.508	0	0	3,96E+05	0,00E+00	#DIV/0!
transaldolase, putative	TcCLB.507889.10; TcCLB.503477.20	1	0	3,95E+05	0,00E+00	#DIV/0!
PUF6	TcCLB.510125.10	0	0	3,95E+05	0,00E+00	#DIV/0!
NADH-dependent fumarate reductase, putative	TcCLB.503849.60; TcCLB.510215.10; TcCLB.510213.110; TcCLB.503849.80	1	0	3,41E+05	0,00E+00	#DIV/0!
metallo-peptidase, Clan MG, Family M24	TcCLB.511289.30	0	0	3,83E+05	0,00E+00	#DIV/0!
alcohol dehydrogenase, putative	TcCLB.511277.60; TcCLB.506357.50	1	0	3,79E+05	0,00E+00	#DIV/0!
hd phosphohydrolase family protein	TcCLB.511017.40; TcCLB.509203.30	0	0	1,59E+04	0,00E+00	#DIV/0!
3-ketoacyl-CoA thiolase, putative	TcCLB.510507.20; TcCLB.509463.30	0	0	3,75E+05	0,00E+00	#DIV/0!
2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	TcCLB.511899.40; TcCLB.511071.140	0	0	2,41E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504109.100	0	0	3,38E+05	0,00E+00	#DIV/0!
LPG3	TcCLB.506989.190; TcCLB.503811.10	0	0	3,32E+05	0,00E+00	#DIV/0!
STI1	TcCLB.506321.290	0	0	3,26E+05	0,00E+00	#DIV/0!
WD domain, G-beta repeat, putative	TcCLB.510065.40; TcCLB.506207.40	0	0	3,26E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TAC102	TcCLB.508321.40	0	0	3,24E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.509915.60; TcCLB.483389.10; TcCLB.509787.10	0	0	3,12E+05	0,00E+00	#DIV/0!

MLN51	TcCLB.508879.80	0	0	2,96E+05	0,00E+00	#DIV/0!
API5	TcCLB.511807.280	0	0	2,88E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504047.20; TcCLB.504045.120	0	0	2,86E+05	0,00E+00	#DIV/0!
GTP-binding elongation factor Tu family, putative	TcCLB.507715.40; TcCLB.511115.20	1	0	2,75E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508269.40; TcCLB.503971.50	0	0	2,74E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509961.30; TcCLB.508331.50; TcCLB.509963.10; TcCLB.508425.31; TcCLB.507153.55; TcCLB.507391.20	0	0	2,69E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DNA repair and recombination helicase protein PIF1, putative	TcCLB.507513.20; TcCLB.506729.40	0	0	2,58E+05	0,00E+00	#DIV/0!
PDI2	TcCLB.507611.370; TcCLB.507723.189; TcCLB.506247.10	0	0	2,56E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Mago	TcCLB.506945.200	0	0	2,52E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.505937.80	0	0	2,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
nucleoside phosphorylase, putative	TcCLB.509569.100	0	0	2,42E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.508285.10; TcCLB.506421.10; TcCLB.505997.60	0	0	2,38E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.510403.50	0	0	1,95E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.507503.70	0	0	2,20E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506859.240; TcCLB.511817.20	0	0	2,06E+05	0,00E+00	#DIV/0!
HslV	TcCLB.510719.260; TcCLB.506275.20	0	0	2,05E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Nop53 (60S ribosomal biogenesis), putative	TcCLB.510657.90	0	0	2,02E+05	0,00E+00	#DIV/0!
citrate synthase, putative	TcCLB.511277.110; TcCLB.509801.30	0	0	1,91E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ubiquitin-activating enzyme E1, putative	TcCLB.508043.30; TcCLB.504427.250	0	0	1,30E+05	0,00E+00	#DIV/0!
centromere/microtubule binding protein cbf5, putative	TcCLB.511145.70; TcCLB.504069.90	0	0	1,82E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Heat shock protein, putative (Fragment)	TcCLB.511263.9	0	0	1,07E+05	0,00E+00	#DIV/0!
protein disulfide isomerase, putative	TcCLB.509505.10; TcCLB.508209.140	0	0	1,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit, putative	TcCLB.510359.310; TcCLB.503819.30	0	0	1,79E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ATP-dependent RNA helicase, putative	TcCLB.506435.120; TcCLB.506265.100	0	0	1,79E+05	0,00E+00	#DIV/0!
rRNA biogenesis protein, putative	TcCLB.506479.50; TcCLB.503803.10	0	0	1,79E+05	0,00E+00	#DIV/0!
nucleolar GTP-binding protein 1, putative	TcCLB.510431.160	1	0	1,78E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510947.30; TcCLB.509497.20	0	0	1,78E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.508461.550	1	0	1,68E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Aminopeptidase	TcCLB.511051.70	0	0	9,74E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506481.20	0	0	1,67E+05	0,00E+00	#DIV/0!
importin alpha, putative	TcCLB.509965.110	0	0	1,65E+05	0,00E+00	#DIV/0!
EIF3B	TcCLB.511303.60; TcCLB.509177.68	0	0	1,58E+05	0,00E+00	#DIV/0!
arl3	TcCLB.507951.170; TcCLB.504433.10	0	0	1,51E+05	0,00E+00	#DIV/0!
TSR1	TcCLB.509607.30; TcCLB.503715.10	0	0	1,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplast polyadenylation/uridylation factor 2, putative	TcCLB.511725.120	0	0	1,50E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511363.4; TcCLB.508899.54	0	0	1,47E+05	0,00E+00	#DIV/0!

short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative	TcCLB.509717.90; TcCLB.510105.240	0	0	9,29E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative (Fragment)	TcCLB.503749.5	0	0	1,41E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	TcCLB.504131.170	0	0	1,36E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.507787.140; TcCLB.507625.70	0	0	1,31E+05	0,00E+00	#DIV/0!
DNAK protein, putative	TcCLB.509543.50; TcCLB.511257.10	0	0	1,29E+05	0,00E+00	#DIV/0!
aldehyde dehydrogenase, putative (fragment)	TcCLB.506943.4; TcCLB.509065.9	0	0	1,28E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Pyruvate kinase	TcCLB.511281.60	0	0	1,27E+05	0,00E+00	#DIV/0!
arginase, putative	TcCLB.507963.20; TcCLB.507031.90	0	0	1,16E+05	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.506407.100; TcCLB.506195.210	0	0	1,11E+05	0,00E+00	#DIV/0!
ruvB-like DNA helicase, putative	TcCLB.508693.80; TcCLB.505989.82	0	0	9,85E+04	0,00E+00	#DIV/0!
TDP1	TcCLB.507951.114; TcCLB.504431.64	0	0	9,82E+04	0,00E+00	#DIV/0!
kinetoplast DNA-associated protein, putative	TcCLB.511039.10; TcCLB.509791.120	0	0	9,66E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Calreticulin	TcCLB.509011.40	0	0	2,91E+04	0,00E+00	#DIV/0!
proteasome alpha 7 subunit, putative	TcCLB.511165.70; TcCLB.503613.20	0	0	9,25E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.509799.60; TcCLB.504137.110	0	0	9,23E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.510729.220	0	0	9,16E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Hel64/DBP2B	TcCLB.508547.110; TcCLB.508973.50	0	0	9,08E+04	0,00E+00	#DIV/0!
POMP24	TcCLB.510317.7; TcCLB.508153.460	0	0	8,78E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511237.100; TcCLB.506413.70	0	0	8,38E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Chaperonin TCP20, putative	TcCLB.509583.10	0	0	7,15E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Ankyrin repeats (3 copies), putative	TcCLB.507529.50	0	0	6,90E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.504047.50	0	0	6,32E+04	0,00E+00	#DIV/0!
VDAC	TcCLB.508737.210	0	0	6,22E+04	0,00E+00	#DIV/0!
cysteine peptidase, putative	TcCLB.509429.320; TcCLB.507603.270; TcCLB.508595.50; TcCLB.510073.17; TcCLB.507603.260	0	0	5,95E+04	0,00E+00	#DIV/0!
conserved protein, unknown function (fragment)	TcCLB.511427.19:mRNA-p1;Q4CTZ7;TcCLB.504209.10:mRNA-p1;Q4CMX1	0	0	5,54E+04	0,00E+00	#DIV/0!
RNA-binding protein, putative	TcCLB.509569.120; TcCLB.508989.30	0	0	5,38E+04	0,00E+00	#DIV/0!
PSP1 C-terminal conserved region, putative	TcCLB.511717.130; TcCLB.506223.40	0	0	4,94E+04	0,00E+00	#DIV/0!
2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative	TcCLB.507017.40	0	0	4,16E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Threonyl-tRNA synthetase, putative	TcCLB.508299.80	0	0	3,60E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Aspartate carbamoyltransferase, putative	TcCLB.508375.30; TcCLB.511923.110; TcCLB.511643.30; TcCLB.507091.50	0	0	3,53E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.511031.10; TcCLB.511529.50	0	0	3,47E+04	0,00E+00	#DIV/0!
ATP-dependent RNA helicase, putative	TcCLB.507663.50	0	0	3,36E+04	0,00E+00	#DIV/0!
CCR4-NOT transcription complex subunit 2, putative	TcCLB.509399.160; TcCLB.510073.70	0	0	3,21E+04	0,00E+00	#DIV/0!
PUF2	TcCLB.511261.120; TcCLB.507831.110	0	0	3,16E+04	0,00E+00	#DIV/0!
asparagine synthetase a, putative	TcCLB.503899.90; TcCLB.503625.10	0	0	3,10E+04	0,00E+00	#DIV/0!
RUVBL	TcCLB.510877.60	0	0	2,92E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Uncharacterized protein	TcCLB.503893.40; TcCLB.503703.30	0	0	2,50E+04	0,00E+00	#DIV/0!

Uncharacterized protein	TcCLB.508153.990	0	0	2,50E+04	0,00E+00	#DIV/0!
ATP-dependent RNA helicase, putative	TcCLB.510741.180	0	0	1,90E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Sphingosine kinase	TcCLB.507515.120	0	0	1,79E+04	0,00E+00	#DIV/0!
Mucin-associated surface protein (MASP) (pseudogene)	TcCLB.510555.10	0	0	9,05E+03	0,00E+00	#DIV/0!
Male sterility protein, putative	TcCLB.511909.10; TcCLB.510721.10	0	0	7,20E+03	0,00E+00	#DIV/0!
PFR2	TcCLB.511215.119; TcCLB.508961.79	1	0	2,95E+06	3,86E+04	7,65E+01
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	TcCLB.510421.320; TcCLB.510091.80	1	0	1,26E+06	2,91E+04	4,33E+01
Uncharacterized protein	TcCLB.511295.50	1	0	2,61E+06	9,85E+04	2,65E+01
methylthioadenosine phosphorylase, putative	TcCLB.506789.280; TcCLB.508387.20	1	0	1,56E+06	7,70E+04	2,03E+01
actin 3, putative (fragment)	TcCLB.510127.79; TcCLB.510571.30; TcCLB.510571.39; TcCLB.510573.10	1	0	1,66E+06	9,64E+04	1,72E+01
TcAc2	TcCLB.503419.30	0	0	1,02E+06	1,13E+05	9,07E+00
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.459199.10	0	0	1,07E+07	1,19E+06	8,98E+00
GGG2	TcCLB.509105.90; TcCLB.503419.50	0	0	2,01E+05	2,30E+04	8,74E+00
AKB1	TcCLB.506211.220; TcCLB.511287.180	0	0	3,21E+05	6,23E+04	5,16E+00
DUF 1126	TcCLB.510797.30	1	0	1,90E+05	4,37E+04	4,35E+00
Uncharacterized protein	TcCLB.503521.10; TcCLB.506359.99	0	0	1,25E+05	3,21E+04	3,89E+00
idi1	TcCLB.506883.9; TcCLB.408799.19	0	0	1,95E+05	5,23E+04	3,72E+00
chaperonin containing t-complex protein, putative	TcCLB.511725.250	1	1	5,65E+05	1,82E+05	3,11E+00
acyl-CoA dehydrogenase, putative	TcCLB.508827.40	0	0	2,54E+04	1,00E+04	2,54E+00
NUP59	TcCLB.506301.30	0	0	8,93E+05	4,15E+05	2,15E+00
UMSBP2	TcCLB.507639.20	0	0	6,07E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.505919.80; TcCLB.509259.160; TcCLB.509725.80	0	0	2,20E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.504769.170; TcCLB.509427.50	0	0	1,37E+06	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.509219.20; TcCLB.511019.13	0	0	6,72E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.507555.80; TcCLB.503861.10; TcCLB.511587.30; TcCLB.509429.4	0	0	6,18E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.511773.110; TcCLB.508039.10; TcCLB.510307.220; TcCLB.509871.10	0	0	4,43E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.511101.19; TcCLB.506675.90; TcCLB.510175.200; TcCLB.507611.110; TcCLB.510005.41; TcCLB.506003.10	0	0	2,09E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	TcCLB.510543.60; TcCLB.510631.11; TcCLB.510543.10	0	0	1,57E+05	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.506843.100	0	0	8,59E+04	0,00E+00	#DIV/0!
retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	TcCLB.503447.40; TcCLB.511577.180; TcCLB.504505.20; TcCLB.509329.20; TcCLB.506431.20; TcCLB.506283.10; TcCLB.506847.30	0	0	7,36E+04	0,00E+00	#DIV/0!
nucleoside phosphorylase, putative	TcCLB.508989.9	0	0	5,03E+05	3,01E+04	1,67E+01
HSP70	TcCLB.511211.170	0	0	6,58E+07	7,46E+06	8,83E+00
heat shock protein 70 (hsp70), putative	TcCLB.511211.160	0	0	4,97E+06	1,05E+06	4,72E+00
chaperone protein ClpB1, putative	TcCLB.508665.14; TcCLB.509127.10	0	0	6,67E+05	2,17E+05	3,08E+00