

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Angela Moreira Bezerra

**Análise do perfil de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante a
deleção de genes codificantes de proteínas envolvidas em modificações
químicas m¹A e m⁵C em mRNAs**

Recife

2022

Angela Moreira Bezerra

Análise do perfil de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante a deleção de genes codificantes de proteínas envolvidas em modificações químicas m¹A e m⁵C em mRNAs

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Ciências.

Orientador:

Dr. Antônio Mauro Rezende

Coorientador:

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Dr. Danielle Maria Nascimento Moura

Recife

2022

Angela Moreira Bezerra

Análise do perfil de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante a deleção de genes codificantes de proteínas envolvidas em modificações químicas m¹A e m⁵C em mRNAs

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Ciências.

Aprovado em: 19/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antônio Mauro Rezende

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Oswaldo Pompilio de Melo Neto

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Rubens Lima do Monte Neto

Instituto René Rachou/Fiocruz (MG)

Valéria Pereira Hernandez

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Rafael de Freitas e Silva

Universidade de Pernambuco campus Garanhuns

A toda as pessoas acometidas por Leishmaniose, na esperança da ciência alcançar uma estratégia terapêutica mais eficiente para essa doença.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fazer forte durante essa trajetória. À minha família, meus pais, Sueli e José João por serem minha inspiração de perseverança, e por não medirem esforços para investir na minha educação mesmo em situações tão difíceis. Aos meus avós e a minha irmã, Maria Alany.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Antônio, pela orientação, paciência, ensinamentos e compreensão para me guiar nesta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus coorientadores, Dr. Christian Robson de Souza Reis, pelo cuidado que teve comigo e todos os ensinamentos que obtive com ele durante este trabalho, compartilhando seu conhecimento sempre. E a Dra. Danielle Maria Nascimento Moura, por todas as sugestões e ensinamentos, alguém em que me espelho como profissional e pessoa, pois além de tudo, é um ser humano fantástico.

Aos meus companheiros de laboratório Sthefanny, Hemilly, Giovana, Yallen e João e aos meus amigos de vida Carol, Cassia, Alex, Bia e Romero.

A amiga e secretária do nosso Programa de Pós-Graduação, Carol, por toda sua dedicação e disponibilidade em sempre nos ajudar ao longo desse período.

À agência de fomento FACEPE, pelo apoio financeiro que tem dado a ciência brasileira, e pelo financiamento da minha bolsa de mestrado. Por fim, agradeço a todos os que foram envolvidos de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho.

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza”

Marie Curie

RESUMO

BEZERRA, Angela Moreira. Análise do perfil de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante a deleção de genes codificantes de proteínas envolvidas em modificações químicas m¹A e m⁵C em mRNAs. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia e Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Os Diferentes homólogos das proteínas responsáveis por catalisar as modificações químicas m¹A e m⁵C em mRNAs foram identificadas em espécies de tripanosomatídeos, entretanto seu papel é desconhecido nestes protozoários. Assim, com o intuito de entender o papel dessas proteínas nesses parasitos, o presente estudo teve por objetivo principal analisar o perfil global de expressão gênica em *Leishmania mexicana* após o nocaute gênico das proteínas TRMT61A (associada à modificação m¹A) e a proteína NSUN2 (associada à modificação m⁵C). Desta maneira, o trabalho teve início com a obtenção de linhagens de *Leishmania mexicana* contendo deleção dos genes de interesse. O nocaute de uma cópia gênica do TRMT61A indicou resultados de enriquecimento significativos de mRNAs relacionados à iniciação da tradução, como os codificantes de proteínas do complexo eIF3. Esse resultado sugere, preliminarmente, que a diminuição da modificação m¹A causada pelo nocaute parcial da TRMT61A gerou uma compensação na expressão das proteínas na maquinaria de tradução para manter os níveis de tradução do transcriptoma geral. O nocaute em NSUN2 mostrou impacto em mRNAs de adenosina kinase, indicando que a diminuição de m⁵C causa efeito em aspectos que diz respeito ao metabolismo de purinas. A caracterização funcional dessas proteínas que modificam mRNAs em tripanosomatídeos é fundamental para compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica nestes protozoários e, de forma adicional, podem contribuir no desenvolvimento de estratégias de controle utilizando alvos moleculares específicos.

Palavras chaves: metiltransferase; mRNA; regulação gênica; *Leishmania mexicana*.

ABSTRACT

BEZERRA, Angela Moreira. Analysis of the gene expression profile in *Leishmania mexicana* through the deletion of genes coding for proteins involved in m1A and m5C chemical transformations into mRNAs. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology and Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Osvaldo Cruz, Recife, 2022.

Different protein homologs for catalyzing m1A and m5C chemical modifications in mRNAs have been identified in trypanosomatid species, however their role is unknown in these protozoans. Thus, with the intention of understanding the role of these proteins in these parasites, the main objective of the present study was to analyze the global profile of gene expression in *Leishmania mexicana* after the gene knockout of the TRMT61A proteins (associated with the m1A modification) and the NSUN2 protein (associated with modified m5C). In this way, the work began with the obtaining of strains of *Leishmania mexicana* containing deletion of the genes of interest. Knockout of a gene copy of TRMT61A indicated exciting enrichment results for mRNAs related to translation initiation, such as the proteins encoding the eIF3 complex. This result preliminarily suggests that the decrease in m1A modification caused by the partial knockout of TRMT61A generated an interpretation in the expression of the proteins in the translation machinery to maintain the levels of translation of the general transcriptome. The NSUN2 knockout showed an impact on adenosine kinase mRNAs, indicating that a decrease in m5C has an effect on aspects related to purine metabolism. The functional characterization of these proteins that modify mRNAs in trypanosomatids is essential for understanding the regulatory controls of gene expression in these protozoa and, additionally, may contribute to the development of control strategies using specific molecular targets.

Keywords: methyltransferase; mRNA; gene regulation; mexican *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	As principais classes morfológicas de tripanossomatídeos.....	16
Figura 2 -	Ciclo de vida da Leishmania.....	19
Figura 3 -	Transcrição policistrônica e o processamento de mRNA em tripanossomatídeos.....	21
Figura 4 -	Esquema representativo dos possíveis complexos de iniciação da tradução eIF4F.....	22
Figura 5 -	Representação esquemática de modificações químicas recorrentes em mRNA.....	24
Figura 6 -	Modificação química m ¹ A.....	25
Figura 7 -	Representação esquemática de alteração m ⁵ C, demonstrando a adição do grupamento metil na base nitrogenada.....	27
Figura 8 -	Presença dos domínios Gcd10p e GCD14 em <i>T. brucei</i>	28
Figura 9 -	Homólogos de NSUN2 em <i>T. brucei</i>	30
Figura 10 -	Representação da PCR dos fragmentos recombinantes....	30
Figura 11 -	Representação da reação de amplificação dos cassetes de RNA guia 5' e RNA guia 3'.....	31
Figura 12 -	Representação do silenciamento gênico mediado pela técnica CRISPR Cas9.....	38
Figura 13 -	Seleção das linhagens nocauteadas.....	39
Figura 14 -	Representação do esquema de PCR para confirmação das linhagens nocauteadas.....	41
Figura 15 -	Obtenção dos fragmentos recombinantes.....	43
Figura 16 -	Obtenção dos cassetes de RNA guia 5' e 3'.....	43
Figura 17 -	PCRs de confirmação das linhagens nocauteadas.....	45
Figura 18 -	Curvas de crescimento das linhagens nocauteadas,,.....	46
Figura 19 -	Extração de RNA total para biblioteca do ensaio de sequenciamento.....	48
Figura 20 -	Análise de componentes principais (PCA) do perfil de expressão gênica.....	50
Figura 21 -	MA plot de genes expressos diferencialmente.....	52

Figura 22 - Gráfico da análise de enriquecimento do genes
diferencialmente expressos..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes alvos selecionados para o silenciamento gênico....	34
Tabela 2 -	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos recombinantes.....	35
Tabela 3 -	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cassetes de RNA guia.....	35
Tabela 4 -	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação da integração dos fragmentos recombinantes	40
Tabela 5 -	Informações sobre a qualidade dos dados do sequenciamento.....	48
Tabela 6 -	Informações sobre as bibliotecas sequenciadas do RNA seq do controle e das linhagens modificadas.....	49
Tabela 7 -	Análise de expressão diferencial.....	51
Tabela 8 -	Genes associados aos GO termos enriquecidos aos processos biológicos das condições analisadas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSD	Blasticidina
Cas9	Proteína associado ao CRISPR
DKO	Duplo nocaute
LCM	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	RNA mensageiro
m ¹ A	Metiladenina
m ⁵ C	Metilcitidina
PAC	Puomicina
pb	Pares de base
rRNA	RNA ribossômico
RBP	Proteína de ligação ao RNA
RRM	Motivo de reconhecimento do RNA
SKO	Mono nocaute
sgRNA	RNA guia
snRNA	Pequeno RNA nuclear
tRNA	RNA transportador
T7 RNA	T7 RNA polimerase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FAMÍLIA TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	15
2.2	O GÊNERO LEISHMANIA E SEUS ASPECTOS GERAIS.....	15
2.3	ASPECTOS MOLECULARES DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	17
2.3.1	Transcrição policistrônica	17
2.3.2	Processamento do mRNA: trans-splicing, cap4, poliadenilação	18
2.4	CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	19
2.5	EPITRANSCRIPTÔMICA.....	22
2.6	MODIFICAÇÃO QUÍMICA m ¹ A.....	23
2.7	MODIFICAÇÃO QUÍMICA m ⁵ C.....	25
2.8	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	27
2.9	EDIÇÃO GÊNICA POR MEIO DO SISTEMA CRISPR -Cas9.....	29
3	JUSTIFICATIVA	32
4	PERGUNTA CONDUTORA	32
5	HIPÓTESE	32
6	OBJETIVOS	33
6.1	OBJETIVO GERAL.....	33
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
7	METODOLOGIA	34
7.1	AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES E CASSETES DE sgRNA PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-Cas9.....	34
7.2	CULTIVO DE PARASITAS	36
7.3	TRANSFECCÃO	37
7.4	SELEÇÃO CLONAL DAS LINHAGENS SELECIONADAS.....	38
7.5	EXTRAÇÃO DO DNA GÊNOMICO DAS LINHAGENS E CONFIRMAÇÃO DAS DELEÇÕES.....	38
7.6	CURVA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGEM MODIFICADAS	40
7.7	EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE mRNA e SEQUENCIAMENTO.....	40
7.8	ANÁLISE DE DADOS DO RNA SEQ.....	41
8	RESULTADOS	42
8.1	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES E sgRNA E sgRNA 5' E 3'.....	42
8.2	OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES.....	44
8.3	CONFIRMAÇÃO DAS DELEÇÕES POR PCR CONVENCIONAL.....	44
8.4	ANÁLISE DE CURVA DE CRESCIMENTO.....	45
8.5	ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO.....	47
8.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL.....	49
8.7	ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO.....	54
9	DISCUSSÃO	57
10	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	APÊNDICE – ARTIGO.....	68

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses compõem um grupo de doenças infecciosas negligenciadas que apresentam um quadro epidemiológico crítico devido à sua ampla distribuição global, com prevalência em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Américas. Protozoários do gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial, são responsáveis pela doença, e podem atingir pele, mucosas e órgãos internos como fígado, baço e medula óssea, se apresentando sob diferentes formas clínicas. As manifestações clínicas decorrentes do processo patogênico são determinadas por mecanismos de escape desenvolvidos pelo parasito contra a ação do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado.

Para o controle dessas estratégias de escape, adaptação e sobrevivência nos diferentes hospedeiros, sendo vertebrado ou invertebrado, o parasito depende de uma regulação gênica eficiente para modular os níveis de ativação dos genes que codificam as proteínas necessárias para a diferenciação celular em seu ciclo de vida. A regulação da expressão gênica em espécies do gênero *Leishmania* ocorre majoritariamente no estágio pós-transcricional, diferente de outros eucariotos cuja regulação na transcrição é fundamental na regulação da expressão gênica.

Neste contexto, a regulação dos mRNAs via modificações bioquímicas pode ser fundamental para compreensão de mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos. A presença de diferentes populações de mRNAs com modificações químicas pode ser fundamental nos processos regulatórios que permitem a sobrevivência do parasito. Entre algumas das modificações químicas identificadas nas moléculas de mRNAs de diversos organismos, destacam-se: N1-metiladenosina (m¹A), N6-metiladenosina (m⁶A), e N5-metilcitidina (m⁵C).

A presença dessas modificações podem afetar potencialmente os processos que envolvem os mRNAs tais como: *splicing*, transporte, armazenamento, meia vida do mRNA e a tradução dessas moléculas em proteínas. Um exemplo de tais efeitos é a interação do fator YTHDF1, uma proteína que reconhece a modificação m⁶A, com o complexo proteico de

iniciação da tradução eIF3. Essa interação é responsável por recrutar o complexo eIF3, promovendo assim a tradução. No geral, as proteínas associadas às modificações químicas no mRNAs são proteínas de ligação ao RNA (RBPs), e podem ser classificadas como: “escritoras”, que são responsáveis por adicionar modificações químicas; “leitoras”, as que reconhecem; e “apagadores”, que removem as respectivas modificações.

Em tripanossomatídeos, recentemente foram identificadas prováveis proteínas escritoras para modificações químicas, dentre elas, as proteínas TRMT6 e TRMT61A, que interagem para formação de um complexo heterodimérico responsável pela adição da modificação m¹A, e a proteína NSUN2, possivelmente responsável pela adição da modificação m⁵C. Além disso, a modificação m⁶A foi identificada em mRNAs de *T. brucei*, estando enriquecida na cauda poli-A dos transcritos da glicoproteína de superfície (VSG). Essa modificação mostrou ser importante para a estabilidade destes mRNAs. Esses achados evidenciam a participação dos mecanismos epitranscriptômicos na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos, o que até então era desconhecido. Entretanto, muitos pontos ainda precisam ser explorados para entender de forma holística o papel dessas modificações químicas na dinâmica dos mecanismos da expressão gênica nos tripanossomatídeos.

Portanto, diante do potencial importância que os estudos no campo da epitranscriptômica possam ter, e das evidências de que os tripanossomatídeos possuem tanto modificações químicas em seus transcritos quanto componentes da maquinaria proteica responsável por essas modificações. O presente estudo teve como objetivo principal analisar o impacto no perfil global de expressão gênica de *Leishmania mexicana* mediante a deleção dos genes codificantes das proteínas TRMT6, TRMT61A e NSUN2. Essa proposta visa ampliar o conhecimento da epitranscriptômica nos tripanossomatídeos, principalmente no que se refere ao papel dessas proteínas na regulação da expressão gênica global.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários flagelados caracterizados como parasitos intracelulares e extracelulares que divergiram precocemente na linha evolutiva eucariótica, apresentando características morfológicas e moleculares que os diferenciam dos demais eucariotos. Estes parasitos se reproduzem por fissão binária e possuem um ciclo de vida digenético, que ocorre em insetos vetores e em diferentes espécies de mamíferos hospedeiros (MORAIS, 2019; PEREIRA, 2015; REY, 2011).

Esta família *Trypanosomatidae* é classificada a partir da presença de uma organela especial, o cinetoplasto, que compacta e organiza o DNA mitocondrial (kDNA) em uma complexa rede de maxicírculos e minicírculos estabilizada por proteínas semelhantes a histonas, conhecidas como KAP (*kinetoplast associated protein*) (CALDERANO, 2008). O diâmetro da organela, além do espaçamento entre microtúbulos sub-peculiares e outros fatores bioquímicos e morfológicos, são utilizados como parâmetros de diferenciação entre diferentes espécies deste grupo de organismos (COELHO, 2010). Dentre os tripanossomatídeos, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* se destacam como responsáveis por doenças negligenciadas de impacto mundial, e segundo a OMS, milhões de novos casos surgem anualmente (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018). <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>

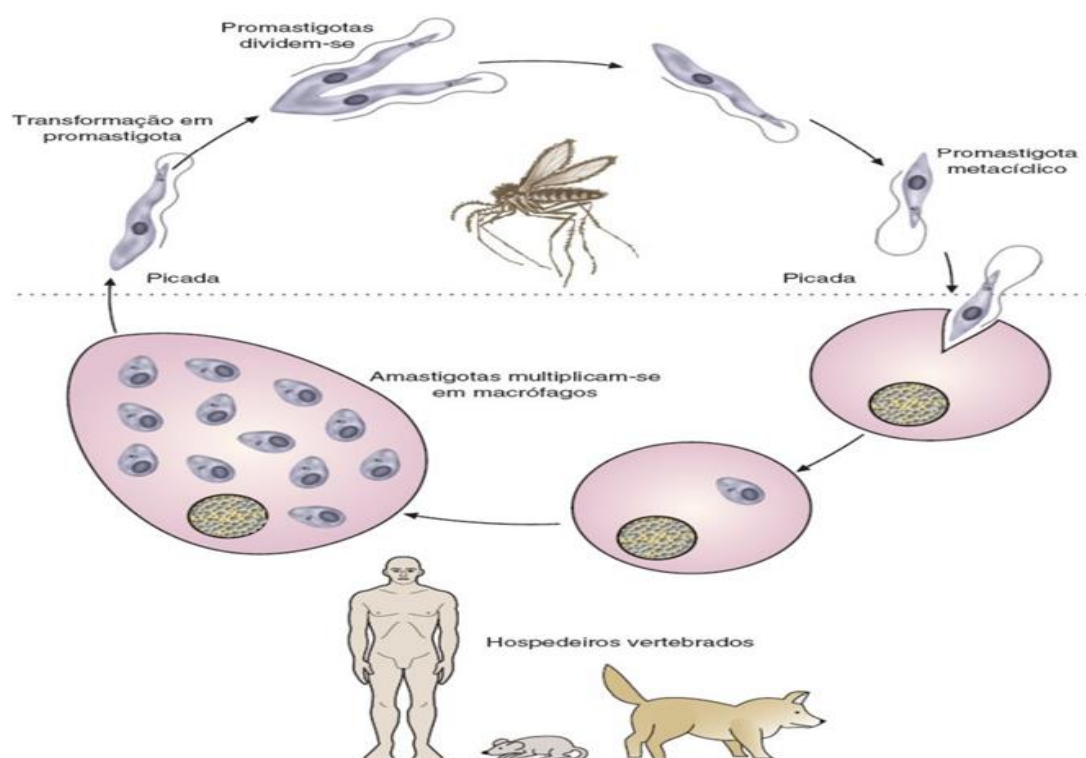
2.2 O GÊNERO LEISHMANIA: ASPECTOS GERAIS

Das 54 espécies identificadas de *Leishmania*, dois subgêneros (*Leishmania* e *Vianna*) atuam como agentes causadores de doenças em humanos e outros mamíferos (DAWIT; GIRMA; SIMENEW, 2013). As enfermidades, conhecidas como leishmanioses, são transmitidas a hospedeiros vertebrados através da picada de fêmeas infectadas de insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* no novo mundo (América) e do gênero *Phlebotomus* no velho mundo (Europa, África e Ásia) (GUIMARARES, 2016).

As leishmanioses são conhecidas como algumas das principais doenças endêmicas nas américas e negligenciadas a nível mundial, compreendendo cerca de 1,6 milhões de casos anuais (SILVEIRA *et al.*, 2016). A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral (LV), potencialmente fatal, causada pelas espécies *Leishmania donovani* (velho mundo) e *Leishmania infantum* e *Leishmania mexicana* (novo mundo). Nas Américas, no período de 2001-2016, foram reportados cerca de 55.530 casos de LV, com média anual de 3.457 ocorrências (AQUINO, 2018; OPAS, 2018).

A depender do hospedeiro que parasitam, protozoários do gênero *Leishmania* intercalam entre duas formas morfológicas básicas: promastigotas (trato digestivo de insetos vetores) e amastigotas (parasitos de células fagocíticas do sistema mononuclear de hospedeiros vertebrados) (Figura 1). Na conformação de amastigota, os protozoários do gênero *Leishmania* assumem aspecto ovoide ou esférico, com diâmetro estimado de 2,5 – 5,0 μm , ausência de flagelo externo aparente e cinetoplasto localizado nas proximidades no núcleo. Na forma promastigota adotam aspecto lanceolado, exibem estrutura flagelada e móvel, possuem maior diâmetro (5-15 μm) e apresentam cinetoplasto localizado entre núcleo e região anterior (ANVERSA *et al.*, 2018; MORAIS, 2019; PEREIRA, 2015).

Figura 1 – Ciclo da Leishmania



Formas evolutivas da *Leishmania*: Promastigota e Amastigota. Esquema representativo do ciclo de vida da *Leishmania*, indicando as formas evolutivas intracelulares (amastigota) e extracelulares (promastigotas) em seus respectivos hospedeiros. Fonte: FERREIRA, 2021.

2.3 ASPECTOS MOLECULARES DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os mecanismos de adaptação dos tripanossomatídeos advêm principalmente de processos associados à regulação da expressão gênica, que nestes organismos ocorrem a níveis pós-transcricionais, e são controlados por elementos presentes de forma preferencial na região 3' não traduzidas (3'-UTR) dos transcritos e por ação de diferentes proteínas de ligação ao RNA, as RPBs (*RNA Binding Proteins*) (AQUINO, 2018; DE GAUDENZI *et al.*, 2011).

Os diferentes tipos de RNA do gênero *Leishmania* são transcritos a partir de cópias conservadas das diferentes RNA polimerases eucarióticas. Os pré-RNAs ribossomais são, em sua maioria, transcritos a partir da ação da RNA polimerase I (RNAPI). Apesar da escassez de promotores para a RNAPII, que reflete na ausência de fatores de transcrição típicos, o promotor do precursor da sequência SL (Spliced Leader) atua no processo de maturação das moléculas de mRNA. A RNAPIII, por sua vez, está envolvida na síntese de RNAs transportadores (tRNA) e pequenos RNAs nucleares (snRNA) (PADILLA-MEJÍA *et al.*, 2014).

Os mecanismos de regulação gênica típicos dos tripanossomatídeos envolvem três mecanismos principais: 1 - O processo de edição de RNAs relativos aos genes que codificam ao cinetoplasto; 2 – Ausência de controle individual da iniciação da transcrição (promotores) para genes nucleares (LANTORNO *et al.*, 2017); 3 ausência da regulação da iniciação da transcrição mediada por RNA polimerase II, indicando que os eventos de regulação da expressão gênica ocorrem a níveis pós-transcricionais (FERNANDÉZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010).

2.3.1 Transcrição policistrônica

Os genes codificadores de proteínas nos tripanosomatídeos estão organizados em sequências que são controladas por um único promotor, havendo assim a transcrição de múltiplos genes em uma única molécula de mRNA, o que caracteriza uma transcrição do tipo policistrônica. Essa molécula de pré-mRNA contém então sequências codificantes distintas (DE GAUDENZI

et al., 2011). Esse mecanismo se assemelha com os *operons* bacterianos, contudo, nos tripanossomatídeos, os genes codificados na mesma molécula de mRNA não possuem relação funcional entre si (KAMER, 2012).

Os tripanossomatídeos possuem três tipos de RNA polimerase, sendo a RNA polimerase I responsável pela transcrição dos genes de RNA ribossômico. Em *T. brucei*, além do rRNA, a RNA polimerase I transcreve mRNAs dos genes referentes às proteínas de superfície, como as glicoproteínas de superfície (VSGs) dos estágios sanguíneos, (TEIXEIRA et al; 2012). A RNA polimerase II está associada com a transcrição dos mRNAs e do RNA *Spliced Leader* (SL-RNA) que são utilizados durante o processo de maturação dos mRNAs. A RNA polimerase III transcreve os RNAs transportadores (tRNAs), o rRNA 5S e os pequenos RNAs nucleares (snRNAs). Vale ressaltar que até o momento, o conhecimento sobre as regiões regulatórias para RNA polimerase II está associado apenas ao promotor para transcrição do RNA SL (REQUENA, 2011).

2.3.2 Processamento do mRNA: trans – splicing, cap4, poliadenilação

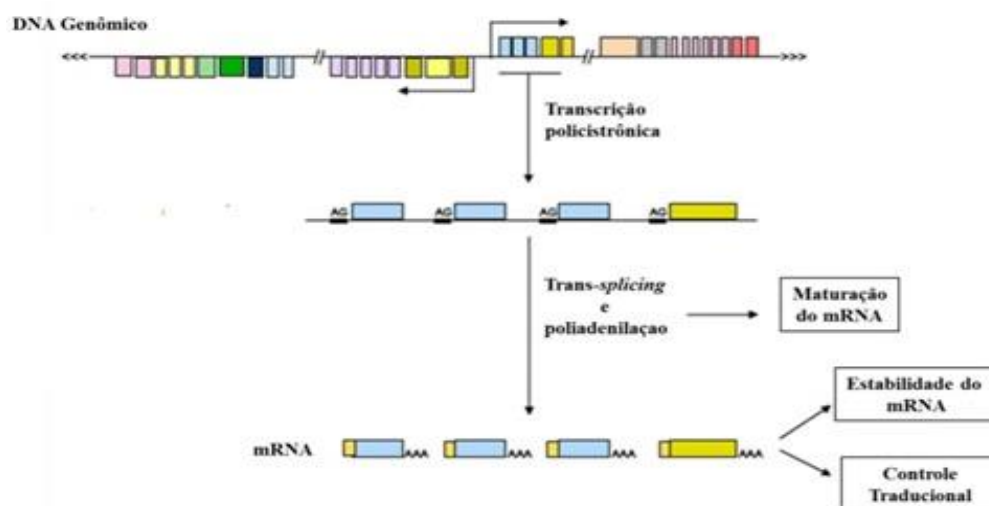
A presença de uma região rica em pirimidinas (20 resíduos) entre diferentes genes codificantes em um mRNA precursor policistrônico funciona como sinal de início para o processo de maturação do mRNA em tripanossomatídeos. No processo de *cis-splicing*, convencional aos eucariotos, os íntrons são retirados da fita de pré-mRNA a partir de duas reações de trans-esterificação em sequências parcialmente conservadas, que dão origem a uma estrutura de laço a ser desramificada e rapidamente degradada (GUNZL, 2010; SULAMIT, 2012). Em tripanossomatídeos, uma estrutura intermediária em ‘Y’ é formada a partir das reações de trans-esterificação no processo de *trans-splicing* e são adicionados na extremidade 5’ da molécula de RNA uma sequência de 39 nucleotídeos (SL) e uma estrutura cap4 (7-metil-guanosina) (KRAMER; CARRINGTON, 2011; LIANG; HARITAN; MICHAELI, 2003; ZICK *et al.*, 2005).

O cap é uma estrutura envolvida na estabilidade dos mRNAs maduros e na delimitação de sua extremidade 5’. Em eucariotos, o cap é formado pela ação conjunta de três enzimas (RNA trifosfatase, guanililtransferase e guanina N-7 metiltransferase) e pode apresentar metilações no m7GTP (adicionado ao

primeiro nucleotídeo do transcrito a partir de ponte trifosfato) e nos nucleotídeos 1 e 2 do mRNA. Nos tripanossomatídeos, metilações são vistas no m⁷GTP, nos quatro primeiros nucleotídeos da sequência SL e nas bases nitrogenadas do primeiro e quarto nucleotídeos da molécula de mRNA (AQUINO, 2018; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

A poliadenilação é um processo genético que visa conferir estabilidade a moléculas de RNA e evitar sua degradação por exonucleases. Em eucariotos, a presença de sequência consenso AAUAAA fornece sinal para a enzima poli-A polimerase (PAP) sintetizar uma cauda de 10 resíduos de adenosina na extremidade 3' do RNA alvo. O processo é facilitado pela ação da proteína de ligação à cauda poli-A (PABP). Até então, não existem sequências consenso de referência descritas para sinal de poliadenilação em tripanossomatídeos. Ao invés disso, a poliadenilação ocorre a uma distância entre 100 e 400 nucleotídeos após o sinal de processamento (KERWITZ *et al.*, 2003, KOLEV *et al.*, 2010).

Figura 2 – Transcrição policistrônica e o processamento de mRNA em tripanossomatídeos



Transcrição e processamento de mRNA em Tripanossomatídeos. O pré-mRNA policistrônico dos tripanossomatídeos é processado pelo mecanismo de trans-splicing. A partir deste ponto, os pré-mRNAs são separados e editados com sequências específicas nas regiões 5' e 3'. Com estas etapas, o mRNA se torna maduro e pronto para ser utilizado na síntese de proteínas. Fonte: Adaptado de LONDOÑO, 2015.

2.4 CONTROE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Devido ao caráter policistrônico do genoma dos tripanossomatídeos, a falta de relação funcional entre os genes de uma mesma unidade policistrônica torna complexa a compreensão de mecanismos individuais relativos à determinação da abundância e modulação da degradação mRNAs isolados. Estes processos parecem ser regulados por sequências nas extremidades 3' UTR dessas moléculas, como os sítios de sinal de adenilação, elementos ARE (regiões ricas em AU – que se ligam a RBPs com motivos de ligação ao RNA) e uma grande família de retroposons denominados SIDERs (*Short Interspersed Degenerated Retroposons*), que afetam a estrutura da cromatina, metabolismo do pré-mRNA e aspectos do metabolismo do RNA (CLAYTON, 2019; FERNANDÉZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010; PEREIRA, 2008; TERRÃO, 2017).

Apesar da escassez de promotores para a RNA Polimerase II e de fatores de transcrição regulatórios no genoma dos tripanossomatídeos, a etapa de iniciação da tradução nestes organismos parece ser regulada por meio de processos químicos como metilação e acetilação das histonas, que atuam respectivamente condensando e descondensando estas estruturas (FERNANDÉZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010). As estruturas cap, regiões 3'-UTR e 5'-UTR, ORF e cauda poli-A contribuem de forma única para uma tradução de maior eficiência nos mRNAs maduros (PEREIRA, 2008).

O processo de tradução é altamente conservado entre os eucariotos superiores. Este mecanismo biológico é dividido em quatro etapas distintas (Iniciação, Alongamento, Terminação e Reciclagem de ribossomos), com destaque para a fase de iniciação da tradução que é um alvo para grande variedade de sinais regulatórios, sendo caracterizada como a etapa de regulação da expressão gênica mais complexa nos tripanossomatídeos. Este processo em eucariotos envolve a participação de vários fatores de iniciação da tradução (eIFs), que atuam sob a forma de diferentes complexos proteicos (FREIRE, 2017).

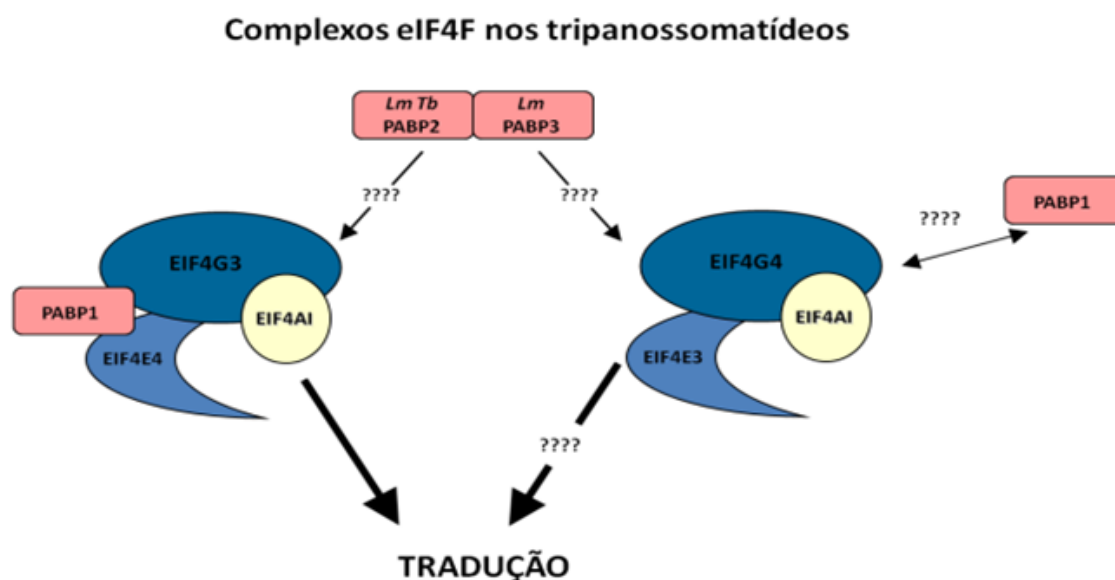
O complexo eIF3 é caracterizado como o maior dentre estes agrupamentos proteicos envolvidos na iniciação da tradução eucariótica (sendo formado por até 13 polipeptídios) e a grande maioria de suas subunidades se mostra conservada em tripanossomatídeos. Um estudo abordando o super

grupo Excavata - protistas unicelulares que divergiram precocemente dos demais eucariotos - relataram a ausência de ortólogos relativos a algumas subunidades do complexo eIF3 em *T. vaginalis* e *G. duodenalis*, reforçando a evolução e diferenciação gênica precoce sofrida pelos tripanossomatídeos, que também pertencem ao supergrupo (REZENDE, 2014).

Na maioria dos eucariotos, o processo de iniciação da tradução também depende da interação entre o complexo eIF4F (composto pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G), o cap e a PABP. Cerca de seis variantes da subunidade eIF4E e cinco da eIF4G foram relatados em tripanossomatídeos, indicando uma maior complexidade de caminhos dependentes de cap para controlar a acessibilidade e capacidade de tradução do mRNA nestes organismos (FREIRE, 2017).

Até o momento, foram relatados dois possíveis complexos eIF4F distintos e vinculados diretamente à tradução em tripanossomatídeos (Figura 3). O complexo formado pelos homólogos eIF4G3, eIF4E4, eIF4A1 e PABP1 se mostrou envolvido com o processo de iniciação da tradução nestes organismos e o complexo composto por eIF4G4 e eIF4E3, que possivelmente interagem com eIF4A1 e homólogos de PABP e que ainda não teve seu papel elucidado (DOS SANTOS RODRIGUES *et al.*, 2018; DE MELO NETO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2013; MOURA, 2015).

Figura 3 – Esquema representativo dos possíveis complexos de iniciação da tradução eIF4F



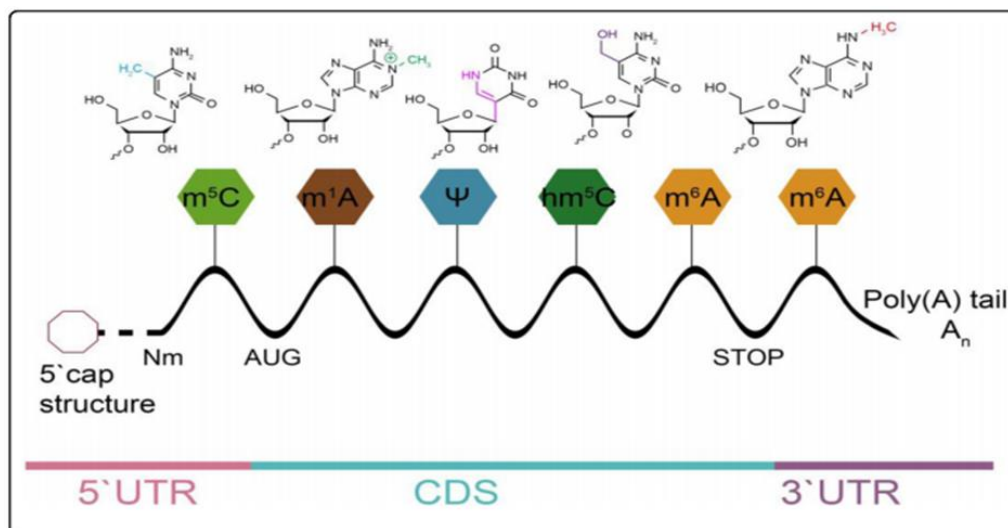
À esquerda formado pelos homólogos EIF4G3, EIF4E4, EIF4A1 e PABP1, envolvido com o processo de iniciação da tradução, e à direita formado pelas proteínas EIF4G4, EIF4E3 e, possivelmente, EIF4A1, com papel ainda não bem caracterizado. Fonte: XAVIER, 2015.

2.5 EPITRANSCRIPTÔMICA

O campo de estudo da epitranscriptômica pode ser definido como sendo o estudo das modificações bioquímicas nas moléculas de RNA (SCHAEFER; KAPOOR; JANTSCH, 2017). Nos últimos anos, estudos nessa área têm se mostrado mais frequentes, principalmente devido aos avanços das tecnologias de sequenciamento de ácidos nucleicos (HELM; MOTORIN, 2017). A partir da inovação dessas técnicas, mais de 100 tipos de modificações foram identificadas na estrutura de diferentes populações de RNA, incluindo N6-metiladenosina (m^6A), inosina (I), 5-metilcitosina (m^5C), pseudouridina (Ψ), 5-hidroximetilcitosina (hm^5C) e N1-metiladenosina (m^1A) (SONG; YI, 2017).

As modificações estão presentes nas diversas moléculas de RNA não codificantes e codificantes, como ncRNA, rRNA, tRNA e mRNA. O mRNA desempenha um papel central no processo de tradução, e estudos recentes revelaram que algumas das modificações presentes nessa molécula são reversíveis (Figura 4). Essa característica sugere a participação dessas modificações no processo dinâmico da regulação da expressão gênica. Assim, as modificações químicas presentes no transcriptoma dos organismos são atualmente entendidas como componentes de grande importância para regulação da expressão gênica (REJAN, 2022).

Figura 4 – Representação esquemática de modificações químicas recorrentes em mRNA



Fonte: HU *et al.*, 2019.

Essas modificações são conhecidas por serem resultantes da ação de proteínas que interagem com o RNA, e estas são conhecidas como RBPs e influenciam de forma determinante processos diretamente ligados ao controle da expressão gênica, tais como tradução, estabilidade do mRNA, *splicing*, transporte do mRNA, entre outros. As RBPs podem ser classificadas como escritoras, isto é, aquelas enzimas responsáveis por inserir as modificações; como leitoras, que são aquelas que reconhecem e se ligam nas sequências com o nucleotídeo modificado; e apagadoras, responsáveis por retirar as modificações (KADUMURI; JANGA, 2018). Assim, podemos vislumbrar um mecanismo complexo e dinâmico na regulação das modificações do mRNA que irão, em determinadas instâncias, impactar a regulação da expressão gênica. Dentre alguns dos mecanismos de regulação envolvidos com a presença ou ausência destas modificações, é possível citar: alteração o sítio de início da tradução de um determinado mRNA; interferência no pareamento de bases (afetando o dobramento do mRNA nas proximidades do códon de iniciação e facilitando a iniciação da tradução); proteção da molécula de RNA contra enzimas como DCP2 e transporte das moléculas de RNA para o núcleo (KUMAR; MOHAPATRA, 2021; MAUER *et al.*, 2017; DOMINISSINI *et al.*, 2012).

Um fato interessante que vem sendo discutido em alguns estudos é a presença de mutações nessas proteínas, o que potencialmente podem levar ao desenvolvimento de doenças, incluindo câncer, disfunções cardiovasculares, metabólicas, congênitas e neurológicas (JONKHOUT *et al.*, 2017; KADUMURI; JANGA, 2018). Esses estudos destacam mais ainda a importância de compreender os mecanismos e aspectos biológicos que envolvem modificações químicas no transcriptoma.

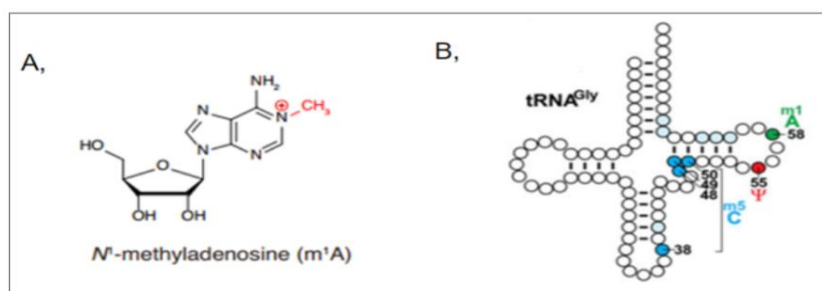
2.6 MODIFICAÇÃO QUÍMICA m¹A

As modificações químicas m¹A e m⁵A estão entre as mais frequentes nos estudos de epitranscriptoma, portanto daremos ênfase a esses dois tipos,

principalmente por já existir evidências das possíveis enzimas envolvidas nas suas adições em moléculas de mRNA de tripanossomatídeos (MARAN et al., 2021). A modificação m^1A se caracteriza pela adição reversível de um grupamento metil na posição N-1 em adenosinas de moléculas de tRNA e mRNA (Figura 4), cujo efeito específico é desfazer estruturas secundárias e promover mudança de carga eletrostática positiva sob condições fisiológicas de estresse. Isso significa que a molécula de RNA, inicialmente carregada negativamente, passa a ter carga positiva e pode então interagir com outros RNAs e proteínas de carga oposta (ZHANG; JIA, 2018).

m^1A foi melhor descrita em moléculas de tRNA, e nestas ocorre na posição 58, sendo esta última conservada nos três domínios da vida e utilizada como referência nos estudos com metiltransferases associadas à modificação. Em humanos, os genes tRNA methyltransferase 61A (TRMT61A) e tRNA methyltransferase 6 (TRMT6) codificam, respectivamente, uma subunidade catalítica responsável pela adição do grupo metil a adenosinas e uma subunidade crucial para a ligação com moléculas de pré-tRNA, que juntas formam o complexo que funciona como RBP escritora para m^1A no núcleo celular. Já para o material genético mitocondrial, o complexo varia (Figura 5). Estes complexos proteicos parecem também estar relacionados à instalação da modificação em moléculas de mRNA (CHUJO; SUZUKI, 2012; OZANICK *et al.*, 2005; VANDEVIER, 2017; ZHANG; JIA, 2018).

Figura 5 – Modificação química m^1A



a, estrutura química da modificação m^1A na base nitrogenada adenina. b, posição de m^1A no tRNA. Fonte: Adaptado de XIONG et al., 2019; KHODDAMI et al., 2019.

Em mRNAs, a alteração m^1A foi encontrada em regiões próximas a códons de início canônicos e não canônicos, além do sítio de *splicing* mais à

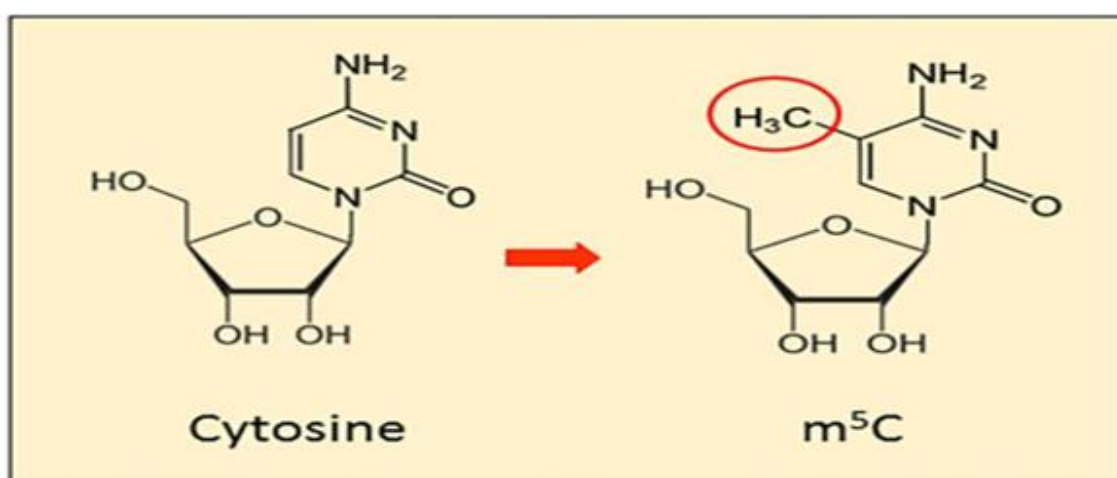
montante (DOMINISSINI *et al.*, 2016; KADUMURI; JANGA, 2018). A molécula de mRNA que contém a modificação m¹A causa

A molécula portadora de m¹A apresenta distúrbios no pareamento de Watson-Crick, o que leva a desincorporações no processo de transcriptase reversa (RT) e possibilita sua localização a partir de técnicas de sequenciamento. Sua contribuição para o processo de tradução parece estar relacionada com a predileção por seu surgimento em transcritos sem íntrons em seus 5'-UTR, que compartilham estruturas secundárias próximas ao códon de início e do 5'-cap e influenciam na tradução ao induzir uma maior expressão de eIF4E) (CENIK *et al.*, 2017; ROUNDTREE *et al.*, 2017).

2.7 MODIFICAÇÃO QUÍMICA m⁵C

Estudos realizados com bactérias, arqueas e células eucarióticas indicaram a presença de metilação em citosinas de diferentes classes de RNA, além de apontar maior prevalência da modificação em regiões 3'-UTR, 5'-UTR e nas proximidades dos códons de início de mRNA. O processo de metilação não interfere no pareamento Watson-Crick, mas seu teor hidrofóbico pode afetar o empilhamento de bases (arranjo helicoidal adotado devido as interações interatômicas) (HARCOURT; KIETRYS; KOOL, 2017; TRIXIL; LUSSER, 2019) (Figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática da alteração m⁵C, demonstrando a adição do agrupamento metil na base nitrogenada



Fonte: ROMANO *et al.*, 2018.

As metiltransferases responsáveis pela instalação da m⁵C são as proteínas da família NOL1/NOP2/SUN, composta de três membros conservados em eucariotos (NSUN2-3 e NSUN5) e quatro membros presentes apenas em eucariotos superiores (NSUN1, 4, 6 e 7) (BOHNSACK; HOBARTNER; BOHNSACK, 2019).

Uma particularidade da modificação m⁵C é que o seu mecanismo de adição do grupo metil na posição N-5 de citosinas foi descrito a partir de estudos de cristalografia de proteínas. As proteínas da família NSUN mostraram se utilizar de cisteínas localizadas em seu domínio VI para promover um ataque nucleofílico ao carbono 6 de citosinas presentes nas moléculas de RNA. Ao final do processo, outro domínio destas proteínas, IV, também se utiliza de uma cisteína que funciona como base para dissociar o RNA de sua RBP (BOHNSACK; HOBARTNER; BOHNSACK, 2019; LIU; SANTI, 2000).

No caso específico das moléculas de mRNA animal, a metiltransferase de atuação é a NSUN2. De fato, estudos envolvendo esta RBP escritora mostraram que a mesma tem funções relativas ao controle do ciclo celular (indução da via apoptótica quando em depleção) e ao desenvolvimento, diferenciação e proliferação de células-tronco ao causar um retardamento na ativação das mesmas (POPIS; BLANCO; FRYE, 2016; YANG *et al.*, 2017).

Além disso, foi reportado que alterações no nível de expressão de NSUN2 repercutem no nível global da modificação e que em ensaios de expressão gênica monitorada por genes repórteres (luciferase, β -Galactosidase e GFP), a atividade repórter gênica é drasticamente inibida em quadros de superexpressão de NSUN2 e aumentada quando a expressão dessa enzima é nocauteada, indicando que a modificação m⁵C adicionada por NSUN2 pode ter papel na inibição gênica. A eficiência da tradução foi então determinada a partir da quantificação da atividade dos genes repórter. Neste estudo, foram realizadas construções repórteres e os fragmentos relativos aos reguladores p21 e CDK1 foram transcritos *in vitro* e metilados (ou deixados sem tratamento) (TRIXIL; LUSSER, 2019).

A proteína ALYREF foi recentemente caracterizada como leitora para a modificação m⁵C em moléculas de mRNA, sendo visto também que os

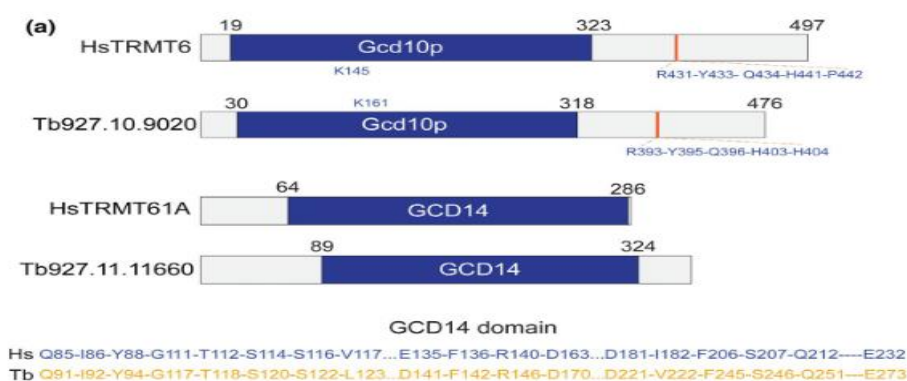
complexos mRNA-ALYREF apresentam regiões ricas em m⁵C nas proximidades de seus códons de início e em porções de conteúdo CG elevado (YANG *et al.*, 2017). Além disso, embora RBPs apagadoras não tenham sido descritas até então, a modificação m⁵C parece apresentar um perfil dinâmico a ponto de ser oxidada em uma forma alternativa, 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), através de proteínas da família TET (ten-eleven translocases) (GOMES, 2016).

2.8 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

A modificação m⁶A já identificada em *T. brucei*, é enriquecida na cauda poli-A dos transcritos de glicoproteína de superfície variante (VSG). Essa modificação mostrou ser importante para a estabilidade dos mRNAs de VSG, pois com a ausência do motivo 16 Mer (5'-TGATATATTTTAACAC-3') necessário para a inclusão de m⁶A, houve um decaimento na meia vida desses transcritos (VIEGAS *et al.*, 2020); (CHIKNE *et al.*, 2016)

Por meio de análise *in silico*, o heterodímero TRMT6/TRMT61A, associado a esta modificação, foi encontrado em espécies de tripanossomatídeos compartilhando entre 23 e 30 % de similaridade quando comparado aos homólogos humanos. As subunidades que compõem esse complexo heterodimérico apresentam conservação dos domínios Gcd10p e GCD14 (Figura 7a) que são importantes para a atividade catalítica dessas proteínas. Além disso, por meio de modelagem estrutural, foi possível observar que esse heterodímero em *T. brucei* é semelhante aos homólogos humanos (MARAN *et al.*, 2021).

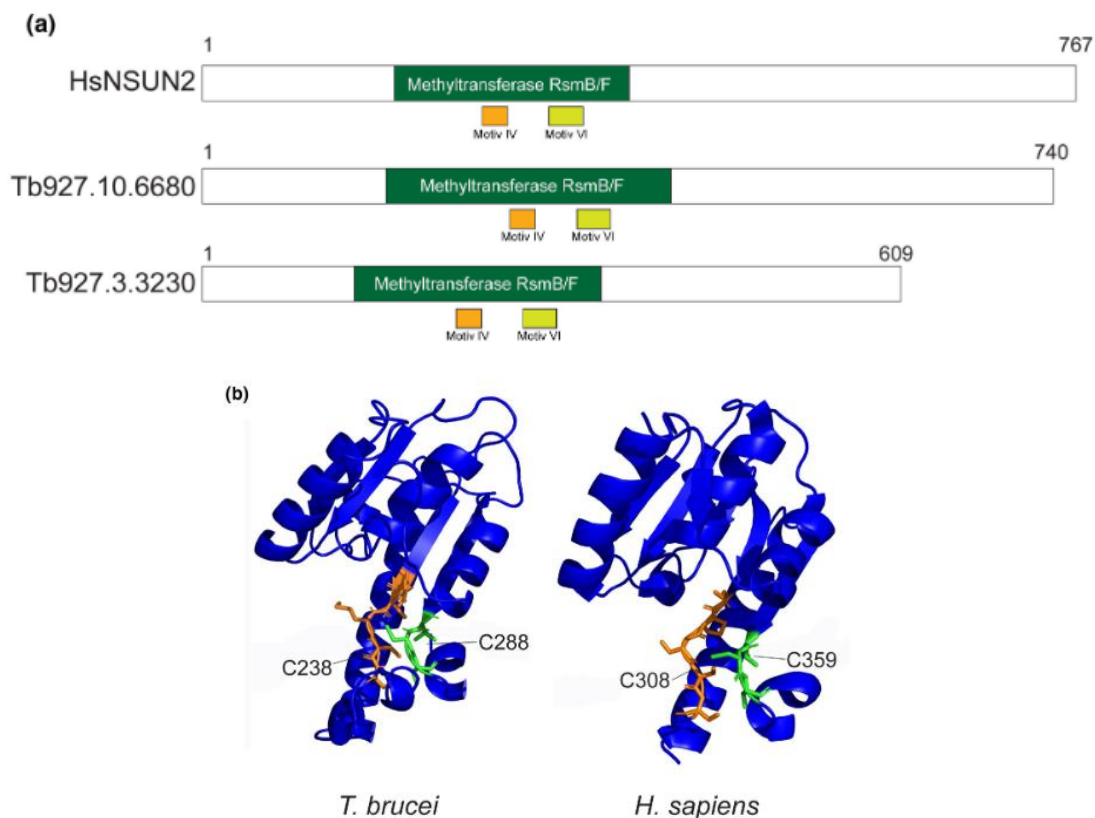
Figura 7 – Presença dos domínios Gcd10p e Gcd14 em *T. brucei*



Escritores homólogos de m1A em *T. brucei*. (a) Conservação da estrutura do domínio entre subunidades homólogas do complexo TRMT6/61A de *T. brucei* e *H. sapiens*. Os aminoácidos do domínio GCD14 importantes para a atividade enzimática estão destacados (roxo e laranja). Fonte: Adaptado de MARAN et al., 2021.

Em relação à modificação química m^5C , a proteína escritora NSUN2 para esta modificação, por meio de análise *in silico*, também foi identificada em espécies de tripanossomatídeos. A análise apresentou conservação de domínio catalítico de rRNA metiltransferase RsmB/F e motivo RRM de ligação a RNA (Figura 8a). E além disso, as cisteínas que são necessárias para a atividade catalítica dessa metiltransferase são conservadas em *T. brucei* quando comparado ao homólogo humano (Figura 8b). E o gene que codifica para esta metiltransferase contém duas cópias no genoma de em *L. mexicana* (MARAN et al., 2021). Apesar desses estudos terem evidenciado aspectos importantes sobre as modificações químicas em tripanossomatídeos, evidenciando que estes parasitos possuem maquinaria de proteínas necessárias para adição das modificações, o conhecimento ainda é escasso. Assim, existe uma necessidade de melhor compreender a importância biológica dessas modificações no perfil global de transcritos de mRNA para esses organismos.

Figura 8 – Homólogo de NSUN2 em *T. brucei*



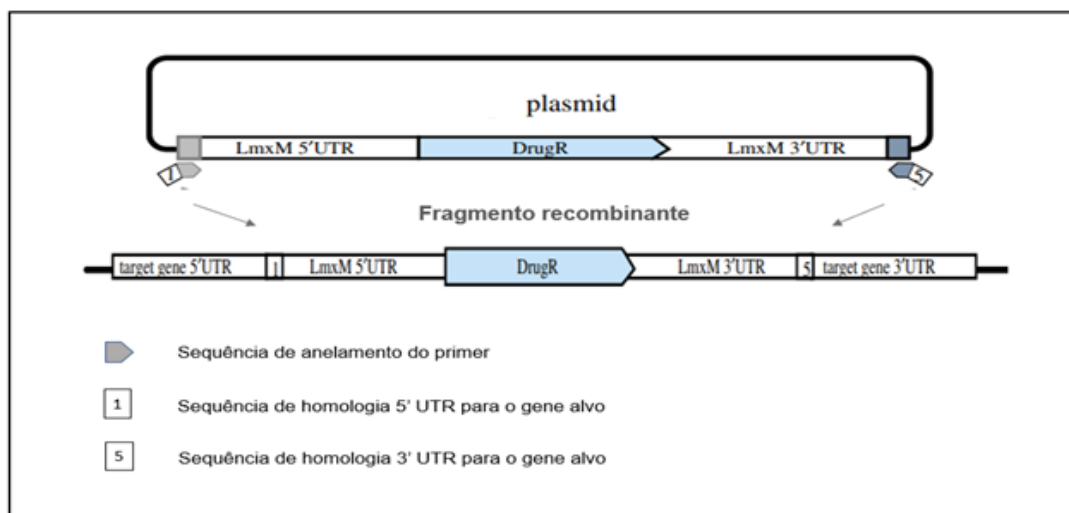
Ortólogos NSUN2 em *T. brucei*. (a) Estrutura de domínio de ortólogos humanos e de *T. brucei* NSUN2. Os principais motivos Motif IV e VI, incluindo os resíduos de cisteína (C238 e C288, respectivamente), importantes para a atividade da metiltransferase são conservados nos *T. brucei* orthologs. (b) *T. brucei* previsto e estrutura da proteína NSUN2 humana destacando os motivos IV (laranja) e VI (verde) e a chave dos resíduos de cisteína para a atividade enzimática. Fonte: MARAN *et al*, 2021.

2.9 EDIÇÃO GÊNICA POR MEIO DO SISTEMA CRISPR-CAS9

A aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 em *Leishmania* através da ferramenta LeishGEdit (<http://www.leishgedit.net/>), apresentou sucesso e possibilitou, de forma mais eficiente, realizar deleção de genes alvos nas espécies destes parasitos. Esta ferramenta possibilita desenhar iniciadores com braços de homologia (HF) de 30 nucleotídeos (muito menores que os HF de 100-300 nucleotídeos requeridos por recombinação homóloga).

Neste sistema o primeiro passo é obter uma linhagem celular transgênica expressando a enzima Cas9 e a T7 RNA polimerase, que são elementos importantes para a realização do nocaute gênico no momento da transfecção. Portanto, essa linhagem é obtida pela transfecção de *Leishmania* sp com o plasmídeo pTB007 para expressão epissomal ou integração no locus de β -tubulina para induzir de forma estável a expressão simultânea de T7 RNA polimerase e Cas9. Para confirmar a obtenção da linhagem transgênica, o plasmídeo contém marca de resistência ao antibiótico higromicina, que então permite o crescimento da célula em meio de cultura contendo esse antibiótico. Assim, é possível fazer a seleção dos transfectados e em paralelo PCR convencional para amplificar a sequência integrativa (BENEKE *et al.*, 2017). Um dos elementos que participa do nocaute gênico são os fragmentos recombinantes que se integram por recombinação homóloga na região do gene alvo. Esses fragmentos recombinantes são gerados por PCR convencional utilizando os plasmídeos PT como molde, os quais contêm a marca de resistência e região regulatória 5'UTR e 3'UTR para garantir a expressão robusta desse gene de resistência. Além disso, 30 nucleotídeos para recombinação homóloga a montante e jusante do DNA alvo são adicionados durante a amplificação pelos iniciadores 1 e 5 (Figura 9) (BENEKE *et al.*, 2017).

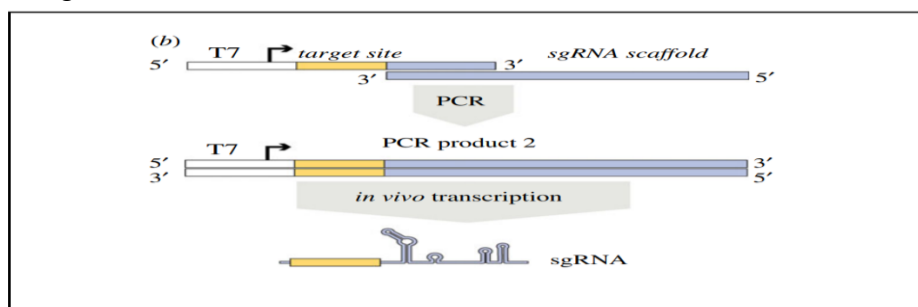
Figura 9 – Representação da PCR dos fragmentos recombinantes



Amplificação do fragmento recombinante através dos primers 1 e 5. Fragmento recombinante após a amplificação e representação de sua inserção do locus do gene alvo. Fonte: Adaptado de (BENEKE et al., 2017).

Os RNAs guias são outros elementos importantes na aplicação da técnica, e são transcritos na célula a partir de cassetes gênicos que são produzidos e transfectados na linhagem transgênica T7/Cas9. A produção dos cassetes acontece por meio de PCR convencional usando um par de iniciadores senso e antisenso, no qual o iniciador senso contém uma sequência promotora para a RNA polimerase, uma sequência referente ao gene alvo e uma sequência que se complementa ao iniciador antisenso. O iniciador antisenso contém uma sequência chamada de *scaffold*, que após a transcrição é a região no RNA-guia a qual a enzima Cas9 reconhece. Assim, os iniciadores *senso* e *antisense* se anelam formando uma estrutura que deixa as extremidades 3' livre e a *Taq* DNA polimerase a partir dessas extremidades estende as fitas formando os cassetes (Figura 10) (BENEKE et al., 2017)

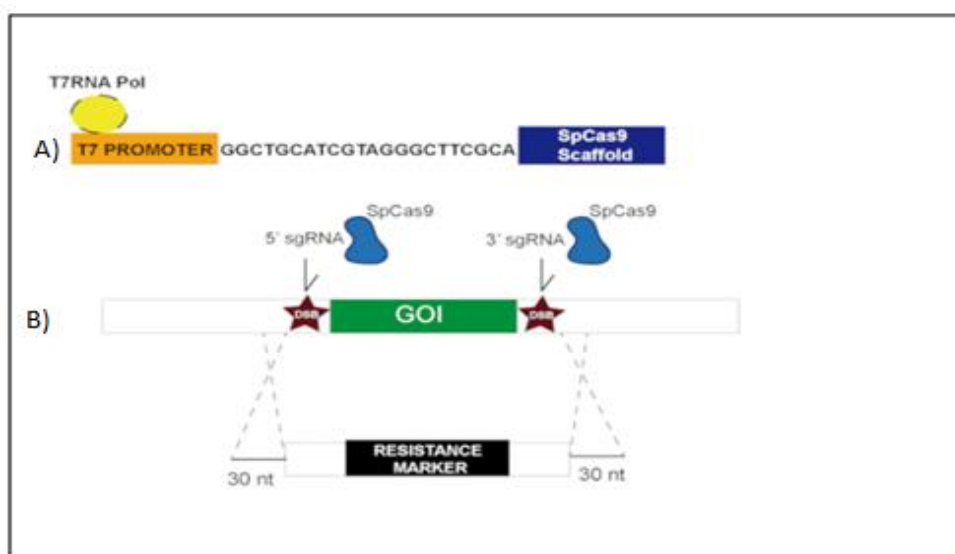
Figura 10 – Representação da reação de amplificação dos cassetes de RNAguia 5' e RNAguia 3'



Estratégia para entrega de RNA guia: O PCR sendo produzido usando o oligonucleotídeo *sense* que codifica o promotor T7, 20 nucleotídeos ao sítio alvo e uma sequência complementar ao oligonucleotídeo *antisense*. O produto resultante dessa PCR é transfectado na célula T7/Cas9 que transcreve o RNA guia. Fonte: Adaptado de (BENEKE et al., 2017).

A partir da obtenção dos fragmentos recombinantes e os cassetes de RNA guia, esses são transfectados na célula transgênica T7/Cas9 e o silenciamento gênico mediado por CRISPR acontece da seguinte maneira: os cassetes de RNA guia 5' e 3' ao serem transfectados na célula são reconhecidos pela T7 RNA polimerase na região promotora que transcreve o RNA guia. Uma vez que o RNA guia contém uma sequência para o gene alvo, este se alinha na sequência alvo e recruta a Cas9, que através de sua atividade de endonuclease, quebra as fitas de DNA na região do gene alvo, e esse gene é deletado. No local onde a sequência foi retirada os fragmentos recombinantes se integram por recombinação homóloga, e assim o nocaute do gene alvo é realizado (Figura 11).

Figura 11 – Representação do silenciamento gênico mediado pela técnica CRISPR Cas9



a) T7RNA polimerase expressando o RNA guia. b) Reparo mediado pelos fragmentos recombinantes. Fonte: Adaptado de (MARAN et al., 2021).

3 JUSTIFICATIVA

Em eucariotos, diferentes proteínas de ligação ao RNA com função de metiltransferase possuem relação direta com processos de regulação da expressão gênica como transporte, meia-vida, estabilidade, estrutura, tradução e desenvolvimento das diferentes classes de moléculas de RNA, entretanto há poucos relatos descritos na literatura a respeito desse contexto de metilação no transcriptoma em tripanossomatídeos. A partir da identificação recente de genes de tripanossomatídeos homólogos a genes humanos de RBPs responsáveis pela adição das modificações químicas M^1A e M^5C em moléculas de RNA. Este projeto tem relevância para com a construção e disseminação de conhecimento a respeito da biologia básica destes parasitos ao delimitar a caracterização fenotípica de células com o silenciamento de genes cuja proteína codificada possivelmente possui atividade de metiltransferase e potencial protagonismo na regulação da expressão gênica neste grupo de protozoários, cuja principal etapa de regulação é a pós-transcricional, o que os difere de humanos e abre portas para novas abordagens terapêuticas perante estes microrganismos que causam impactos para saúde pública.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Genes referente a metiltransferase TRMT61A/TRMT6 e NSUN2 humanas também possuem papel na definição do perfil de metilação em mRNA para as modificações químicas m^1C e m^5C em tripanossomatídeos?

5 HIPÓTESE

Os genes das proteínas responsáveis pela adição das modificações químicas m^1A e m^5C em mRNAs de tripanossomatídeos apresentam funções dos processos pós transcricionais, logo, fazem parte do processo de regulação gênica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Analisar o perfil global de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante o silenciamento gênico de RBPs envolvidas nas modificações químicas m¹A e m⁵C.

6.2 Objetivos específicos

- 1 - Produzir linhagens mutantes com os genes codificante das proteínas alvos deletados
- 2 - Analisar o fenótipo de crescimento e morfologia de linhagens de *L. mexicana* resultantes da deleção dos genes codificantes das proteínas TRMT6, TRMT61A e NSUN2.)
- 3 – Sequenciar o transcriptoma das linhagens selvagem, T7/Cas9 e mutantes
- 4 – Avaliar a mudança global no perfil de expressão gênica

7 METODOLOGIA

7.1 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES E CASSETES DE sgRNAs PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA CRISPR-Cas9

Selecionamos os genes que codificam as subunidades do complexo heterodimérico TRMT6/TRMT61A associado à modificação química m¹A e os genes que codificam as duas proteínas identificadas como homólogas de NSUN2, que está associada à modificação química m⁵C (Tabela 1). Os dois genes foram denominados de NSUN2 2170 e NSUN2 2540.

Tabela 1 - Genes alvos selecionados para o silenciamento gênico

ID Gene	Tamanho do gene (pb)	Proteína	Cromossomo	Número de domínios
<i>LmxM.36.5780</i>	1395	TRMT6	36	9
<i>LmxM.28.2400</i>	1062	TRMT61A	28	9
<i>LmxM.36.2170</i>	2289	NSUN2	36	8
<i>LmxM.08_29.2540</i>	1905	NSUN2	8	8

pb: pares de base. Fonte: A autora, 2022.

Os fragmentos recombinantes e RNAs guia 5' e 3' necessários para aplicação da técnica CRISPR-Cas9, foram obtidos por reações de PCR convencional (Tabelas 2 e 3). A primeira reação para amplificação dos fragmentos recombinantes foi composta por: Taq DNA polimerase (5 U), dNTPs (125 µM), iniciado sense (2 µM), iniciador *antisense* (2 µM), MgCl₂ (25 mM), tampão 10x, 30 ng do plasmídeo PGL2662 (MARAN et al., 2021) contendo a marca de resistência para blastomicina e 30 ng do plasmídeo PGL2667 (MARAN et al., 2021) com gene que confere resistência a puromicina. . O volume final de

reação foi igual a 40 uL. Os passos da PCR foram 3 minutos a 94 °C seguidos por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 65 °C, 2 minutos e 15 segundos a 72 °C e 7 minutos a 72 °C. Dois microlitros do produto de amplificação foram corridos em gel de agarose a 1% para avaliar a presença do produto de tamanho esperado

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos recombinantes

Gene	Sentido	Sequência
Trmt6 - <i>LmxM.36.5780</i>	<i>Sense</i>	CAAACCGATAGGCATCTTTCCGGCATAACCCA gtataatgcagacctgctgc
	<i>Antisense</i>	TACAGAGCGGAAGAGGTGCATGGGGCGCAC ccaatttgagagacctgctgc
Trmt61A- <i>LmxM.28.2400</i>	<i>Sense</i>	CGCCGACTCCCCCGGCTCGTTCCTACTATC gtataatgcagacctgctgc
	<i>Antisense</i>	GGGCGAGCGCGCTTAGAGAATGCAGAAAGA ccaatttgagagacctgctgc
Nsun2- <i>LmxM.08_29.2540</i>	<i>Sense</i>	AAGCACACGCGGCGTGTCTTCCGGAGTCCC gtataatgcagacctgctgc
	<i>Antisense</i>	GAGAGAGGCGGTTGGAGATGCGCCGTGCCA ccaatttgagagacctgctgc
Nsun2- <i>LmxM.36.2170</i>	<i>Sense</i>	CACACCTGCACCGAACACATCTGCGTGAC gtataatgcagacctgctgc
	<i>Antisense</i>	GGGGCGTGGGGCGTCGCTATTCAGCCCC ccaatttgagagacctgctgc

Sequência de homologia em letras maiúsculas e local de ligação do iniciador em letras minúsculas. Fonte: A autora, 2022.

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cassetes de RNA guia

Gene	Sentido	Sequência
	o	

sgRNA universal	Sense	aaaagcaccgactcgggtgccacttttcaagttgataacggact agcctt attttaacttgctatttctagctctaaaac
5'sgRNA - <i>LmxM.36.5780</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggCGACGTCACA ACT TCTGATC gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA - <i>LmxM.36.5780</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggGGCGGGACGCAGA AGAGCAT gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA - <i>LmxM.28.2400</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggTGTGTGCGCGTTG ACGCGAG gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA - <i>LmxM.28.2400</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggGAGAGCGAGAGAC GGCGACA gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA- <i>LmxM.08_29.2540</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggGCTACCAACTCAG AGAGGAA gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA- <i>LmxM.08_29.2540</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggAAAGACGACCAAT GCAGCAG gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA- <i>LmxM.36.2170</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggACGCACGGCGCGG TAATTGA gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA- <i>LmxM.36.2170</i>	Sense	gaaattaatacgcactcactataggCAGCAGTGAGGTT CTTTTCC gttttagagctagaaatagc

Parte inicial em minúsculo da sequência indica a região promotora da T7 RNA Pol, em letras maiúsculas ao gene alvo e a parte final em minúsculo indica a região de ligação da Cas9. Fonte: A autora, 2022.

A PCR para construção dos cassetes de RNAs guias 5' e 3' foi composta por: Taq DNA polimerase (5 U), dNTP (250 µM), primers (2 µM), MgCl₂ (25 mM), Buffer 10x e com o seguinte programa de temperatura para todas as PCRs: desnaturação inicial a 95 por 30 seg, B: 35 ciclos de 95 °C por 10 segundos, anelamento a 60 °C durante 30 segundos e extensão de 72 °C por 2 15 segundos; extensão final de 72 °C por 10 minutos.

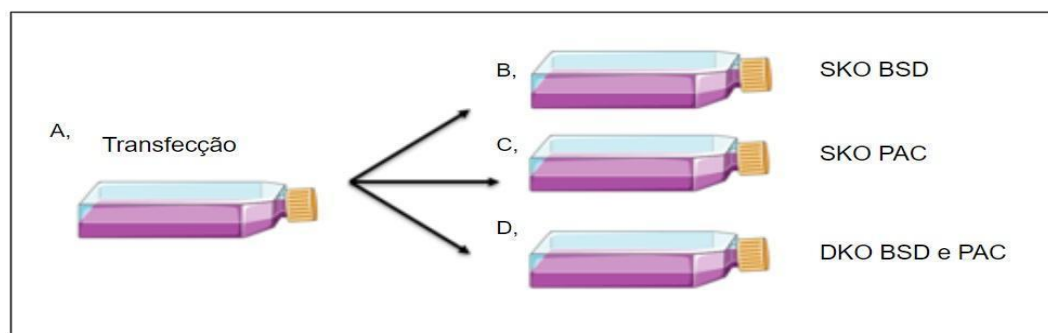
7.2 CULTIVO DE PARASITOS

Para realizar o nocaute gênico através da técnica CRISPR-Cas9, primeiramente foi necessário a utilização de células expressando a T7 RNA pol e a nuclease Cas9. Portanto, células de *L. mexicana* T7/Cas9, na sua fase promastigota, foram cultivadas em meio M199, a 28 °C, suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg de higromicina para a manutenção dos transgenes. O crescimento dos parasitos foi monitorado por contagem na câmara de Neubauer. As culturas obtidas foram utilizadas para transfecção com fragmentos recombinantes e cassete e RNAs guias necessários para aplicação da técnica (MARAN et al., 2021).

7.3 TRANSFECÇÃO

A etapa de transfecção consistiu na utilização das formas promastigotas de *L. mexicana* expressando T7/Cas9 durante o crescimento exponencial. Assim, 1×10^7 células foram centrifugadas a 2500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 200 µL utilizando o produto de amplificação resultante das PCRs (18 µL de sgRNA 5', 18 µL sgRNA 3', 38 µL fragmento recombinante - Blasticidina, 38 µL fragmento recombinante- Puromicina) e 88 µL do tampão de transfecção (Cytomix 3x: 200 mM Na₂HPO₄, 70 mM NaH₂PO₄, 15 mM KCL e 150 mM HEPES pH 7.4). Após a ressuspensão, a solução foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm, e submetida à eletroporação no programa X-001 do equipamento Nucleofector (Lonza). Uma cubeta com células e o tampão sem DNA foi incluída como o controle negativo. Posteriormente, o conteúdo resultante da transfecção foi adicionado em uma garrafa de 25 cm² contendo 10 mL de meio M199 suplementado com 10 % de SFB em temperatura ambiente, e por fim a garrafa foi incubada a 28 °C na estufa. No dia seguinte, as culturas foram divididas em três garrafas, e os antibióticos foram adicionados, sendo 20 µg de blasticidina (BSD) e 50 µg de Puromicina(PAC) para seleção das linhagens com deleção de uma única cópia gênica (SKO - *single knock out*) e deleção das cópias gênicas nos pares de cromossomos (DKO - *double knock out*) conforme a (Figura 12) e mantidas durante todo ciclo de vida (cinco dias).

Figura 12 – Seleção das linhagens nocauteadas



Esquema representativo das etapas de seleção das culturas transfectadas. a) garrafa da transfecção. b) garrafa da seleção da linhagem SKO para Blastomicina (BSD). c) Seleção da linhagem SKO para Puromicina. D) Seleção da linhagem DKO para Blastomicina e Puromicina. Fonte; A autora, 2022.

7.4 SELEÇÃO CLONAL DAS LINHAGENS SELECIONADAS

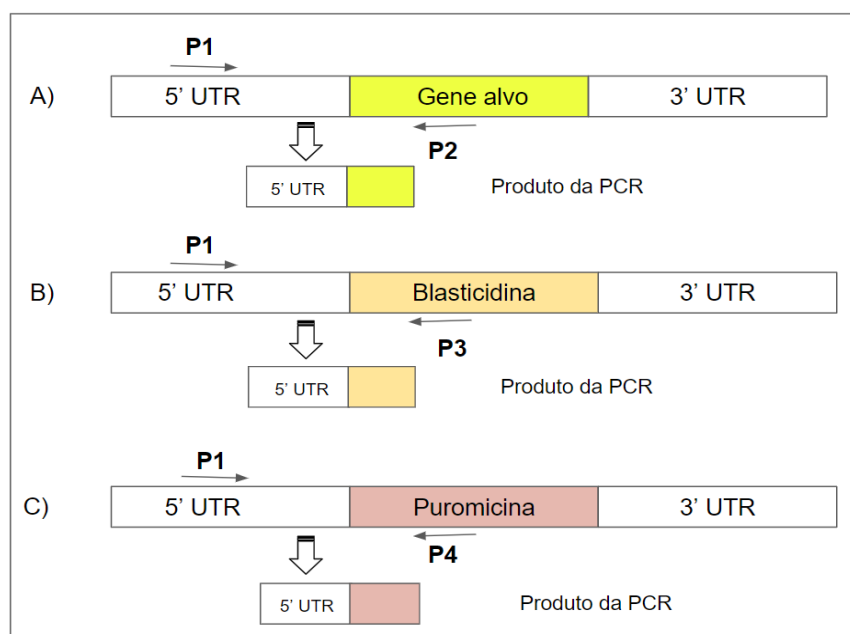
A partir das linhagens selecionadas após a transfecção, foi realizada uma etapa de seleção de clones. Durante o crescimento dessas células, foi realizada uma amostragem com densidade de 1×10^5 células/mL, e essas células foram transferidas para um tubo contendo 1 mL de PBS. A partir desse tubo, foram transferidos 100 μ L da solução para outros três tubos com 900 μ L de PBS, e assim foi feita uma diluição seriada com densidade inicial de 1×10^5 e final de 1×10^2 . Posteriormente, 1 mL da solução do tubo final com a densidade de 1×10^2 foi transferido para um falcon de 50 mL contendo 17 mL de meio M199, 2 mL de SFB (10 %), 20 μ g de blastomicina, 50 μ g de puromicina, esse conteúdo do falcon foi transferido para um recipiente se com o auxílio de uma pipeta multicanal as células foram distribuídas em placas. As placas foram vedadas com plástico filme e incubadas na estufa a 28 °C. Após 7 dias de observação houve crescimento de parasitos em alguns poços que foram selecionados como clones. Para cada linhagem foram selecionados 3 clones e cada clone foi passado para uma garrafa com 10 mL de meio M199 contendo os antibióticos de seleção, com o intuito de fazer a extração do DNA e realizar o PCR de confirmação dos genes supostamente nocauteados.

7.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS LINHAGENS E CONFIRMAÇÃO DAS DELEÇÕES

Após seleção clonal de cada linhagem mutante, as células foram cultivadas em 10 mL de meio M199 contendo os antibióticos de seleção. Ao atingir o crescimento exponencial, 1×10^8 células foram coletadas em um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 3.500 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 1 mL de PBS 1X, esse conteúdo foi transferido para um tubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado por 2 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 500 uL de DNAzol seguido de homogeneização até desfazer o pellet. Adicionou-se 500 uL de etanol 100% e o tubo foi mantido em temperatura ambiente por 2 minutos. Após esse tempo formou-se uma membrana branca, material que contém o DNA, e esse material foi recolhido com uma alça de inoculação e mergulhado de 3 a 5X em etanol 70 %. Por fim, o material que ficou retido na alça secou por 3 minutos e foi transferido para um tubo com 200 uL de água autoclavada.

Com a obtenção dos DNAs genômicos das linhagens, estes foram utilizados para a confirmação da integração dos fragmentos recombinantes, que ocorreu pela amplificação a partir de um par de iniciadores, onde o *sense* se anela na região 5' UTR do gene alvo a uma distância de 223 pb, e o *antisense* se anela na região interna do gene, nesse caso, o iniciador é variável de acordo com cada condição, podendo ocorrer amplificação a partir do gene alvo ou das marcas de resistência blasticidina e puromicina, conforme ilustrado no esquema da figura 13.

Figura 13 – Representação do esquema de PCR para confirmação das linhagens nocauteadas



a) amplificação do gene alvo. b) amplificação do fragmento recombinante com a marca de resistência blasticidina. c) amplificação do fragmento recombinante com a marca de resistência puromicina. Fonte: A autora, 2022.

Tabela 4 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação da integração dos fragmentos recombinantes

Gene	Sentido	Sequência
LmexTRMT6	5 UTR	CGTGCTCTCGGCCACACATA
LmexTRMT6	Gene interno	ACGCGCTCCACCTTGAAGAG
LmexTRMT61A	5 UTR	TCGTTTCGTTGCCGTACCTGG
LmexTRMT61A	Gene interno	CGCCTCCACTACCTTCTTGCC
LmexNSUN2.2540	5 UTR	CGATGCACGTTGCACATGCTC
LmexNSUN2.2540	Gene interno	GCTCCACCTGCAGCAGGAGA
LmexNSUN2.2170	5 UTR	TTCTGCTGCTGTCGTCGTCG
LmexNSUN2.2170	Gene interno	TGCCAGCGATCGGATACCAC

Fonte: A autora, 2022.

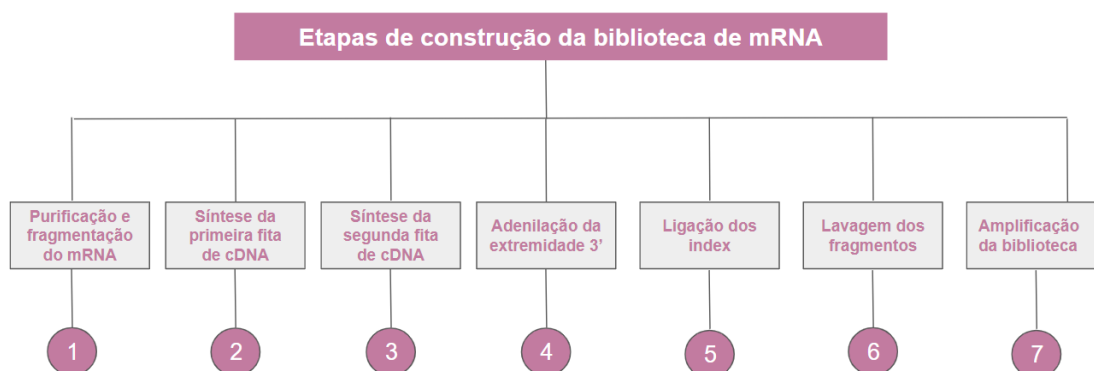
7.6 CURVA DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS MODIFICADAS

Para analisar o fenótipo de crescimento e morfologia resultante da deleção dos genes alvos em cada linhagem modificada, foram feitas curvas de crescimento. Na análise foram incluídos um clone de TRMT61A *LmxM.28.2400*, três clones dos dois genes de NSUN2 *LmxM.08_29.2540/ LmxM.36.2170* e a linhagem controle T7/Cas9. As células em fase estacionária de cultivo foram repassadas numa concentração inicial de 1×10^4 em meio M199 pH 7,2 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBV), 50 ug de puromicina e 20 ug de blasticina para as linhagens DKO de NSUN2 e com apenas 20 ug de blasticidina para SKO de TRMT61A. As curvas foram feitas em triplicata com contagem em câmara de Neubauer a cada 24 horas por 5 dias, totalizando 96 horas.

7.7 EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE mRNA E SEQUENCIAMENTO

O RNA total das quatro linhagens modificadas, em triplicatas, e das duas linhagens controle, em quadruplicatas, foi extraído usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, com posterior tratamento com DNase I (Promega). A pureza e a concentração do RNA foram avaliadas usando Qubit™ RNA IQ Assay Kits. A integridade do RNA foi avaliada através do Qubit e por eletroforese em gel de agarose. As bibliotecas do sequenciamento do tipo *paired-end* foram preparadas a partir do RNA total usando o kit *Stranded mRNA Prep* (Illumina), seguindo os procedimentos padrão, conforme as etapas da Figura 14 e em seguida foram sequenciadas usando o kit sp v 1.5 de 100 ciclos (Illumina) no sequenciador Illumina NovaSeq™6000 do IAM-FIOCRUZ.

Figura 14 - Fluxograma das etapas de construção da biblioteca de mRNA



Fonte: A autora, 2022.

7.8 ANÁLISE DE DADOS DO RNA SEQ

A qualidade das *reads* sequenciadas foi verificada aplicando a ferramenta FASTQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Para facilitar a visualização e comparação, as análises de qualidade foram compiladas em um único resultado utilizando a ferramenta MULTIQC (EWELS et al., 2016). Cada biblioteca foi então mapeada contra o genoma de referência de *L. mexicana*,

cepa MHOMGT2001U1103 utilizando a ferramenta STAR (DOBIN et al., 2013), a qual também foi utilizada para produzir o relatório de contagem das leituras de sequenciamento para cada gene do genoma. Os dados das contagens de genes foram carregados no ambiente R, e estruturados em uma matriz, que foi transformada para a escala log₂ usando a função transformação *rlog* do pacote DESeq2. Essa matriz foi utilizada como entrada para a função *prcomp* para realizar a análise de componentes principais (PCA). A função *plot* foi então aplicada para plotar a primeira e a segunda componentes principais calculados de cada amostra. O pacote R DESeq2 foi utilizado para realizar a análise global de expressão diferencial relativa, considerando apenas os genes representados por pelo menos cinco leituras para todas as réplicas de pelo menos uma condição (controle ou linhagem modificada). A razão de expressão (*Fold Change*) dos genes entre a condição controle e linhagem modificada foi obtida por meio de uma escala simétrica transformando essa razão pela função logarítmica com base 2 ($\text{Log}_2 \text{Fold Change}$). Assim, um valor de *log2foldchange* igual a 2, representa uma razão de expressão de 4 vezes de diferença. Além disso, os mesmos dados também foram usados para criar um MA plot usando o function plot, onde os genes diferencialmente expressos foram destacados.

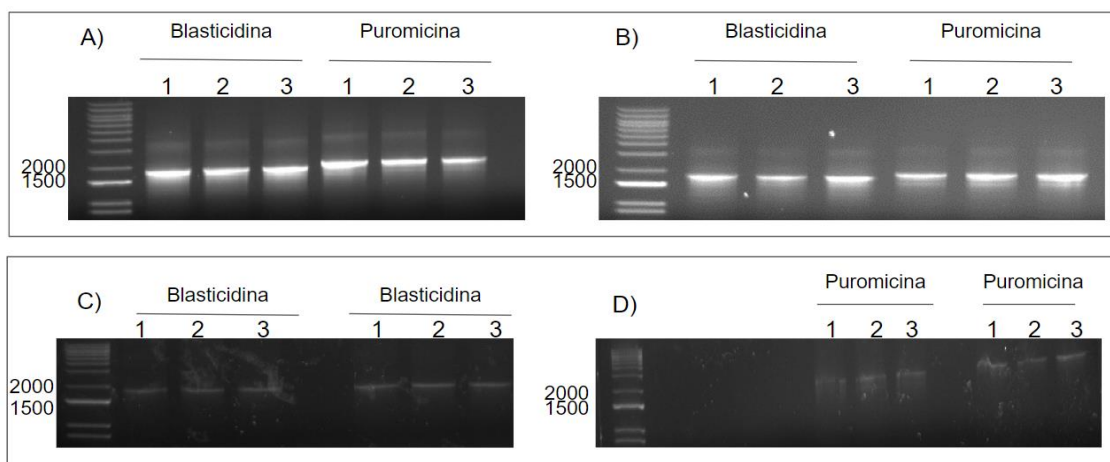
No intuito de analisar funcionalmente o impacto global dos genes diferencialmente expressos, optamos em realizar uma análise de enriquecimento funcional através da base de dados String (<https://string-db.org/>). utilizando vocabulários controlados (ontologias) sobre vias metabólicas (KEEG), processo biológico e componente celular, ambas ontologias do consórcio Gene Ontology. Essa análise possibilita identificar se há termos das ontologias citadas acima com uma frequência e ordenamento, em função da razão de expressão ($\text{log}_2\text{FoldChange}$), não esperados para lista de genes identificados como diferencialmente expressos, comparando com a frequência desses termos no genoma do organismo alvo.

8 RESULTADOS

8.1 OBTENÇÃO OS FRAGMENTOS RECOMBINANTES E sgRNAs 5' e 3'

Através da técnica de PCR, foram obtidos cassetes de deleção gênica compostos das regiões 5'-UTR e 3'-UTR dos genes alvo e região correspondente ao gene de resistência (com suas respectivas regiões UTRs) para todos os alvos do estudo. Os fragmentos recombinantes com a marca de resistência possuíam tamanhos esperados de 1700 e 1800 pares de bases para blastomicina e puromicina, respectivamente. O perfil da presente eletroforese pode ser visto na Figura 15.

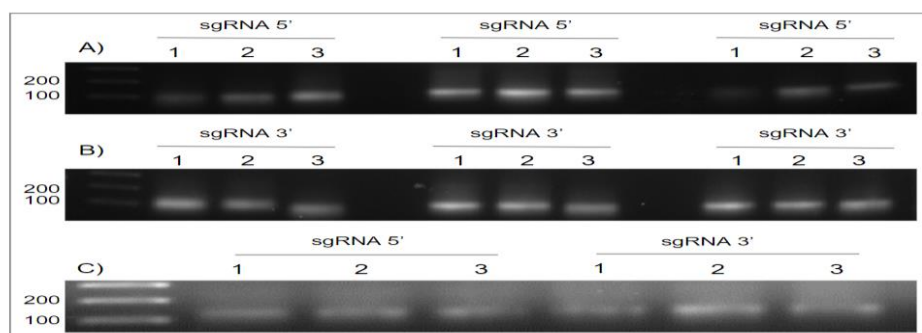
Figura 15 – Obtenção dos fragmentos recombinantes



a) Fragmentos recombinantes com a marca de resistência blastomicina e puromicina para deleção do gene TRMT6. b) Amplificação dos fragmentos recombinantes com a marca de resistência blastomicina e puromicina para deleção do gene TRMT61A. c) Amplificação dos fragmentos recombinantes com a marca de resistência blastomicina para deleção dos genes NSUN2 2170 e NSUN2 2540. d) Amplificação dos fragmentos recombinantes com a marca de puromicina para deleção dos genes NSUN2 2170 e NSUN2 2540. Fonte: A autora, 2022.

Os cassetes de RNA guia para transcrição nas células expressando a T7/Cas9 também amplificaram no tamanho esperado entre 100 a 200 pb, para todos os alvos, conforme é possível observar na Figura 16.

Figura 16 – Obtenção dos cassetes de RNA guia 5' e 3'



Amplificação dos cassetes de sgRNA 5' respectivamente dos genes TRMT61A, NSUN2 2170 e NSUN2 2540. (B) Amplificação dos cassetes de sgRNA 3' respectivamente dos genes TRMT61A, NSUN2 2170 e NSUN2 2540. (C) Amplificação dos cassetes de sgRNA 5' e sgRNA 3' do gene TRMT6.

8.2 OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES

As células de *L. mexicana* submetidas ao silenciamento gênico por meio da técnica CRISPR-Cas9 foram selecionadas através de suas marcas de resistência a antibióticos. Para os genes codificantes das proteínas TRMT6 e TRMT61A, somente as linhagens com uma única cópia deletada (SKO) com marca de resistência à blasticidina foram recuperadas. Três tentativas independentes de deleção dos genes TRMT6 e TRMT61A foram realizadas, contudo não foi possível recuperar nenhuma linhagem de duplo nocaute (DKO) para esses genes. Já para os genes NSUN2 2170 e NSUN2 2540, foi possível recuperar células SKO com marcas de resistência de blasticidina ou puromicina, bem como células DKO com marcas de resistência a ambos os antibióticos simultaneamente.

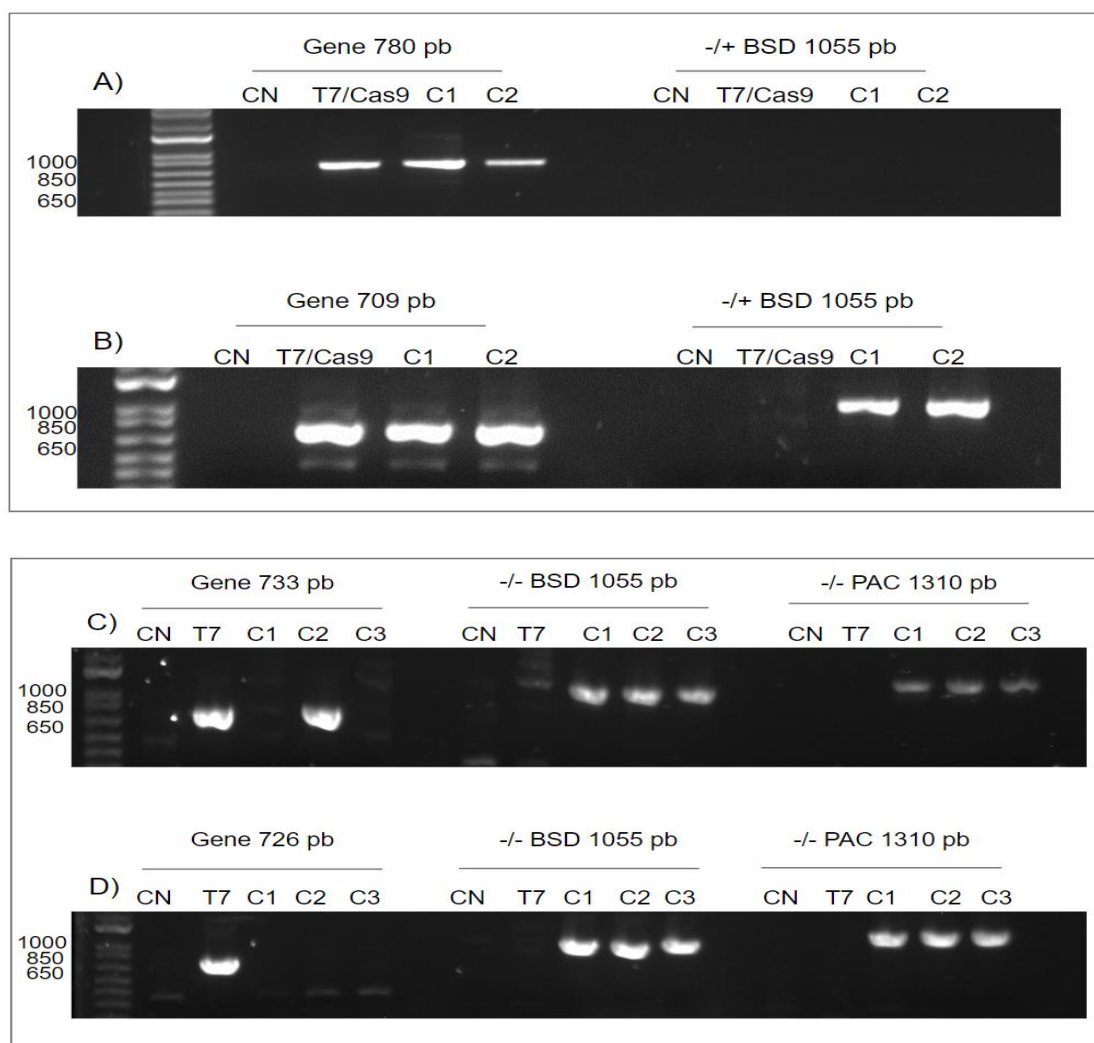
8.3 CONFIRMAÇÃO DAS DELEÇÕES POR PCR CONVENCIONAL

As três condições de confirmação por PCR ilustradas na (Figura 13) foram avaliadas na linhagem T7/Cas9, utilizada como controle, e nos clones das linhagens modificadas, no caso, SKO do gene de TRMT6, SKO do gene de TRMT61A, e DKO dos genes de NSUN2. Para os clones SKO de TRMT6 (Figura 17a), apesar do crescimento após seleção com antibiótico blasticidina, que foi a marca de resistência utilizada no fragmento recombinante, não houve amplificação para PCR de confirmação dessa marca nos clones (Figura 17a), apenas do gene, o que é esperado por se tratar da deleção apenas de uma cópia do gene. A partir deste resultado a linhagem não foi incluída no ensaio de sequenciamento.

A linhagem SKO de TRMT61A apresentou amplificação para o gene alvo, o que é esperado devido à presença da outra cópia. Além disso, essa mesma linhagem também apresentou amplificação para a marca de resistência blasticidina, conforme pode ser observado na (Figura 17b). Nas linhagens DKO

NSUN2 (ID *LmxM.36.2170* e ID *LmxM.08_29.2540*), não houve amplificação para o gene específico na maioria dos clones, exceto no clone dois (C2) da linhagem com dupla deleção para o gene NSUN2 *LmxM.36.2170*. Todos os demais clones para linhagens DKO apresentaram uma amplificação positiva para ambas marcas de resistência (blastocidina e puromicina), como pode ser observado nas Figuras 17c e 17d.

Figura 17 – PCRs de confirmação das linhagens nocauteadas

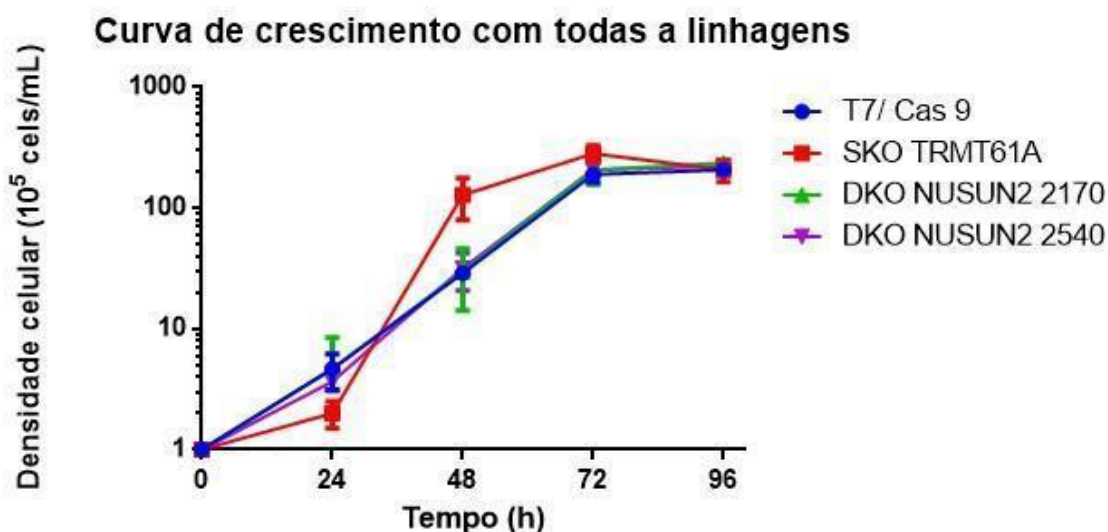


a) Amplificação do gene de TRMT6 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastocidina. b) Amplificação do gene de TRMT61A e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastocidina. c) Amplificação do gene de NSUN2 2170 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastocidina e puromicina. d) Amplificação do gene de NSUN2 2540 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastocidina e puromicina. Fonte: A Autora, 2022.

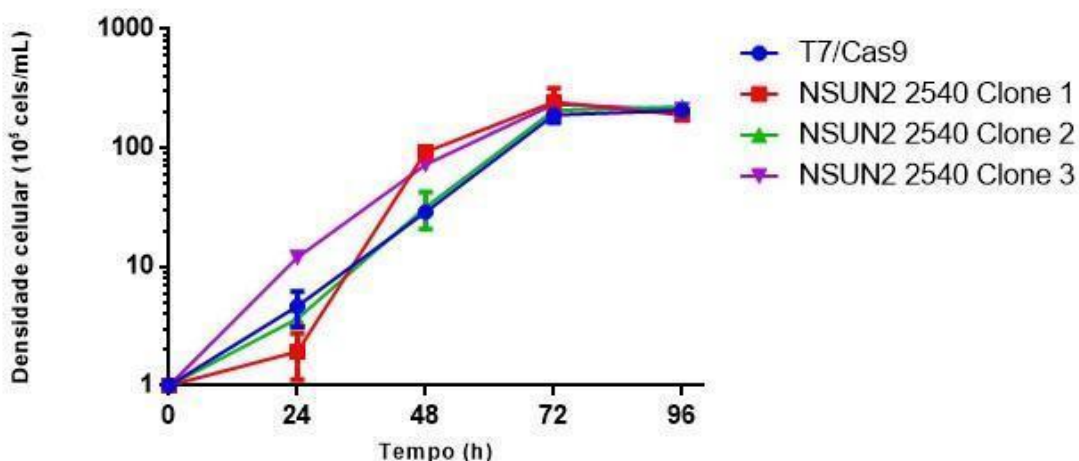
8.4 ANÁLISE DE CURVA DE CRESCIMENTO

Em paralelo à realização das PCRs de confirmação, as linhagens mutantes foram avaliadas quanto ao crescimento e comparadas com a linhagem controle usada para transfecção (T7/Cas9). O crescimento celular foi observado por meio de contagens diárias em câmara de Neubauer para determinação da densidade celular. Apesar de um perfil ligeiramente diferente da linhagem SKO TRMT61A, não foram verificadas mudanças importantes nem na morfologia, nem no crescimento das linhagens quando comparadas à linhagem controle, conforme ilustra o gráfico das curvas de crescimento (Figura 18).

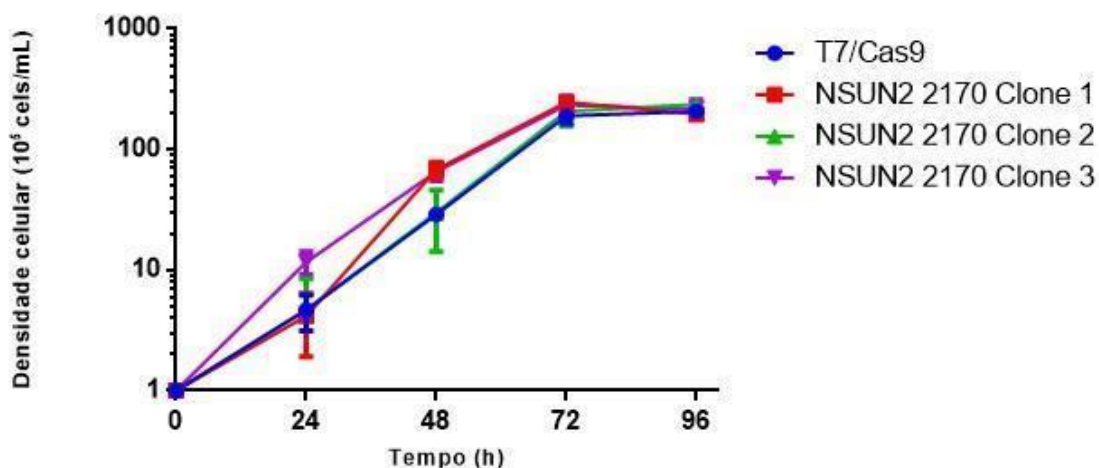
Figura 18 – Curvas de crescimento das linhagens nocauteadas



Curva de crescimento *L.mexicana* linhagem Nsun2 2540 C1,C2 e C3.



Curva de crescimento *L.mexicana* linhagem Nsun2 2170 C1,C2 e C3.



Curvas em triplicata com valores de densidade celular plotados a partir de contagem a cada 24 horas, do momento 0 a 96 horas. Cada uma das linhagens é representada por suas respectivas cores e formas, conforme legenda do gráfico. Fonte: A autora, 2022.

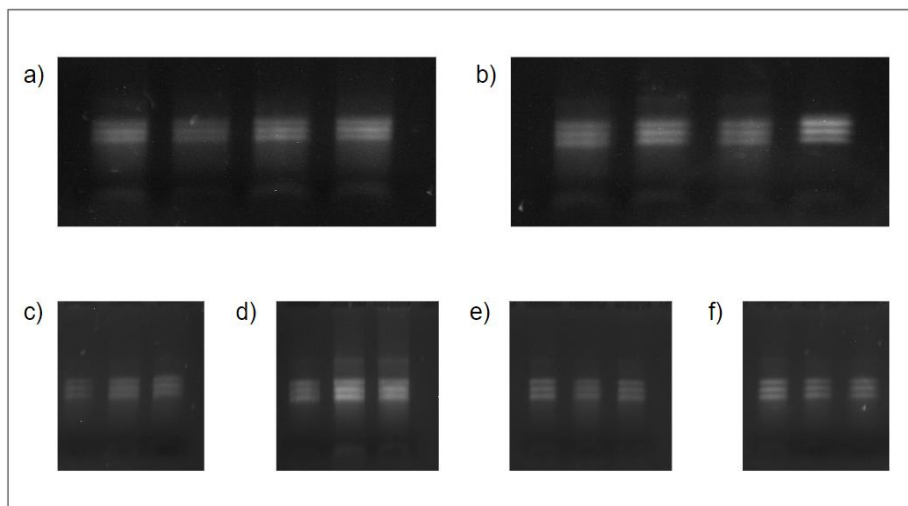
8.5 ENSAIO DE SEQUENCIAMENTO

As células de *L. mexicana* que foram submetidas à deleção gênica por meio da técnica CRISPR Cas9, e que tiveram confirmação da deleção de uma cópia ou de ambas dos genes alvos do estudo foram selecionadas para o sequenciamento de seus transcriptomas. As linhagens selecionadas foram: um clone SKO de TRMT61A ID *LmxM.28.2400*, um clone DKO do gene ID *LmxM.08_29.2540* codificante de NSUN2 e dois clones DKO do ID *LmxM.36.2170* também codificante de NSUN2. Uma vez que não conseguimos confirmar a integração do fragmento recombinante de blasticidina para o gene codificante de TRMT6 ID *LmxM.36.5780*, linhagens provenientes dessa deleção não foram incluídas no ensaio de sequenciamento. Estes clones das linhagens modificadas e da linhagem WT e T7Cas9 foram submetidos à extração de RNA total (Figura 19), seguida de sequenciamento do transcriptoma total (RNA-Seq).

Um total de 453.937.475 leituras foram produzidas, e posteriormente elas foram mapeadas contra o genoma de referência de *L. mexicana*. Essa análise rendeu 41.118 genes que corresponderam ao limite de representação de pelo menos cinco leituras de cada uma das três réplicas para as amostras no controle e/ou das linhagens modificadas. Observamos que, em média, todas as bases tiveram escores de Phred superiores a 30 (Tabela 5), portanto, a remoção de leituras de baixa qualidade não foi necessária. As informações referentes aos

dados do sequenciamento e da biblioteca estão apresentadas nas Tabelas 5 e 6. O número de leituras entre as réplicas de uma forma geral foi uniforme.

Figura 19 – Extração de RNA total para biblioteca do ensaio de sequenciamento



Imagens de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com Sybr Safe (Invitrogen). a) Extração em quadruplicata de RNA total de WT. b) extração em quadruplicata de RNA total de T7/Cas9. c) extração em triplicata de RNA total de TRMT61A. d) extração em triplicata de RNA total de NSUN2 2540. e) extração em triplicata de RNA total de NSUN2 2170 C1. f) extração em triplicata de RNA total de NSUN2 2170 C3. Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5- Informações sobre a qualidade dos dados do sequenciamento

Amostra	Número de pares de leituras	Número de bases com score de Phred igual ou acima de 30	Porcentagem de base com Phred igual ou acima de 30	
			R1	R2
WT T1	28.5	2703.5	94.3%	91.7%
WT T2	30.7	2919.4	94.7%	91.9%
WT T3	30.0	2875.2	94.1%	91.8%
WT T4	36.7	3486.4	94.2%	91.8%
T7/Cas9 T1	30.4	2 891.6	94.2%	92.1%
T7/Cas9 T2	33.7	3 199.1	93.4%	92.7%
T7/Cas9 T3	28.6	2 701.5	94.1%	91.3%
T7/Cas9 T4	31.2	2 967.4	94.2%	92.1%
TRMT61A T1	27.1	2 566.3	94.4%	91.5%
TRMT61A T2	19.8	1 857.4	92.5%	91.6%
TRMT61A T3	25.0	2 342.2	90.5%	93.2%
NSUN2 2540 T1	27.4	2 602.5	93.9%	92.6%
NSUN2 2540 T2	28.2	2 682.9	94.5%	92.1%
NSUN2 2540 T3	27.7	2 622.6	94.3%	91.6%
NSUN2 2170 C1 T1	28.3	2 659.9	93.7%	90.8%
NSUN2 2170 C1 T2	26.6	2 577.7	94.4%	91.3%

NSUN2 2170 C1 T3	31.4	2 986.6	93.1%	93.1%
NSUN2 2170 C3 T1	29.2	2 768.5	93.6%	92.4%
NSUN2 2170 C3 T2	30.6	2 899.5	93.4%	92.7%
NSUN2 2170 C3 T3	28.9	2 739.1	94.2%	91.8%

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 6 - Informações sobre as bibliotecas sequenciadas do RNA-seq do controle e das linhagens modificadas

Amostra	Total de leituras	Total de mapeamento inequívoco	%	Total de mapeamento múltiplo	%	Total de leituras não mapeadas %	Total de genes utilizados na comparação relativa
WT	126.246.514	92.700.900	73	27.365.528	89	13,51	8218
T7/Cas9	123.943.367	89.810.176	72	26.075.791	84	20,28	8218
TRMT61A	71.825.675	50.821.792	70	12.848.319	53,2	31,03	8223
NSUN2 2540	83.220.589	61.654.937	74	15.413.772	55,6	17,62	8212
NSUN2 2170 C1	86.342.687	60.703.662	70	16.429.509	57	28,6	8234
NSUN2 2170 C3	88.605.157	64.259.975	73	18.789.686	63,6	14,58	8227

Fonte: A autora, 2022.

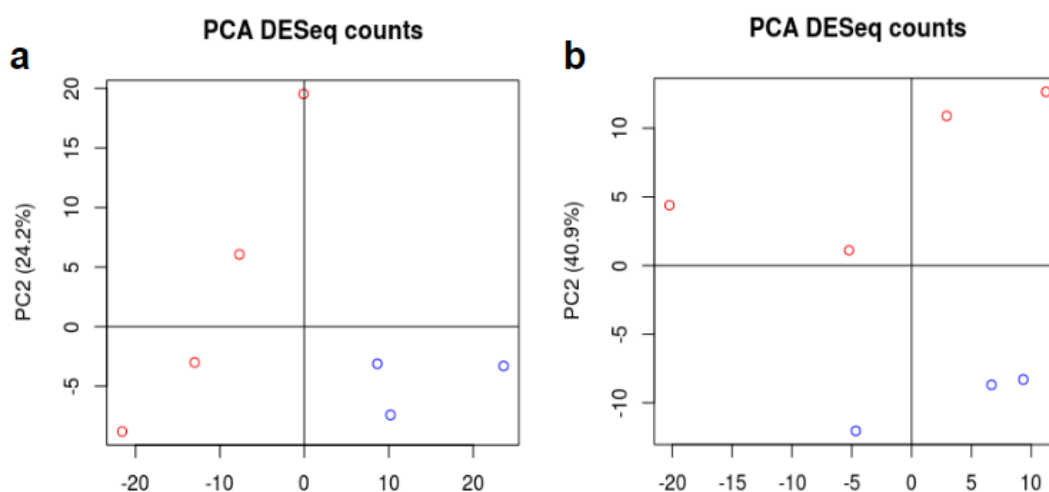
8.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

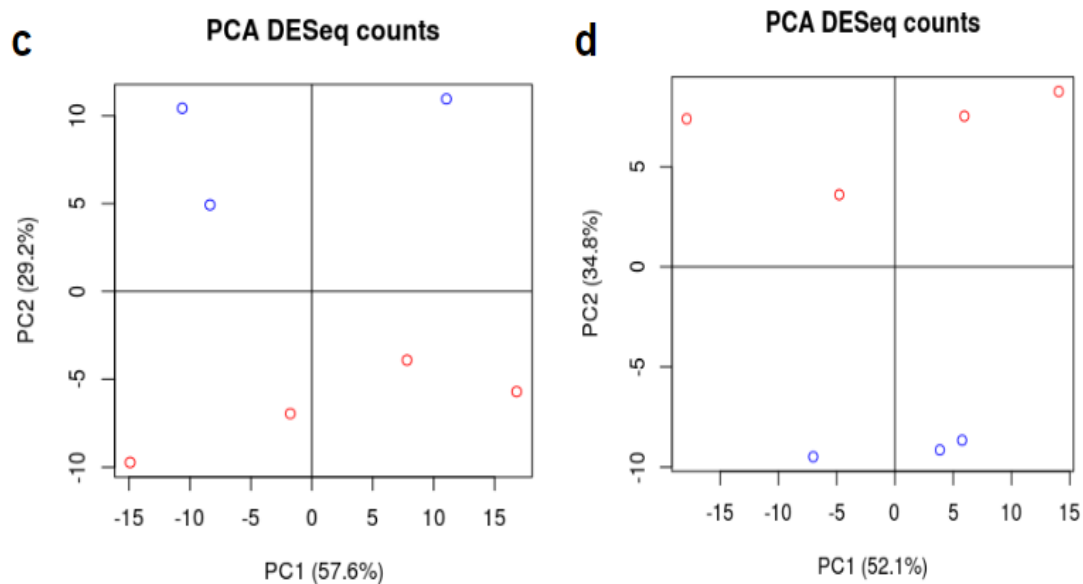
Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando a contagem de leituras para cada gene predito do genoma de referência de *L. mexicana*. Foram observados dois conjuntos distintos de expressão gênica consistentemente reproduzidos com as réplicas biológicas (Figura 20). Em seguida os dados globais de expressão diferencial foram gerados por meio das análises realizadas utilizando o pacote DeSeq2 no ambiente de programação R. Para comparar o perfil global de expressão diferencial das linhagens mutantes, primeiramente foi realizado uma análise comparativa da linhagem WT com a T7/Cas9, como não foi observado diferença entre as duas linhagens, a T7/Cas9 foi escolhida para prosseguir como controle comparativo com as linhagens mutantes.

As análises mostraram genes diferencialmente expressos em relação a linhagem controle, com valores absolutos de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e P valor corrigido por FDR de 5% (False Discovery Ration) igual ou menor a 0,05 nas condições analisadas. E a análise em si, do controle T7/Cas9 entre as linhagens

modificadas indicaram no geral, que a deleção parcial e total de genes potencialmente relacionados a modificações químicas de RNAs, causou um impacto global na expressão gênica, principalmente na condição relativa à TRMT61A, onde um total de 442 genes foram diferencialmente expressos Tabela 7, e o gene ID *LmxM.32.1760*, de adenosina deaminase, aparece com uma diferença de 8 vezes, ou seja possivelmente está sendo reprimido em TRMT61A. A segunda análise que se destaca na Tabela 7 é o da condição T7/Cas9 vs NUN2 2540 com um total 236 genes dos quais os IDs *LmxM.24.1830*, *LmxM.04.0130*, referente a proteína hipotética, apresentaram diferença de aproximadamente 4 vezes, indicando uma repressão na linhagem nocauteada. Ambos os clones na análise de T7/Cas9 vs NSN2 2170 apresentaram um quantitativo menor de genes com diferença. Esses resultados condizem com a representação gráfica do MA plot (Figura 21) que destaca dentro das distribuições de genes os que estão sendo diferencialmente expressos. E tanto o gráfico b e c da Figura 21 que respectivamente representam a análise T7/Cas9 vs TRMT61A e T7/Cas9 vs NSUN2 2540 mostram um agrupamento maior de genes que estão sendo diferencialmente expressos para mais e para menos.

Figura 20 – Análise de componentes principais (PCA) do perfil de expressão gênica





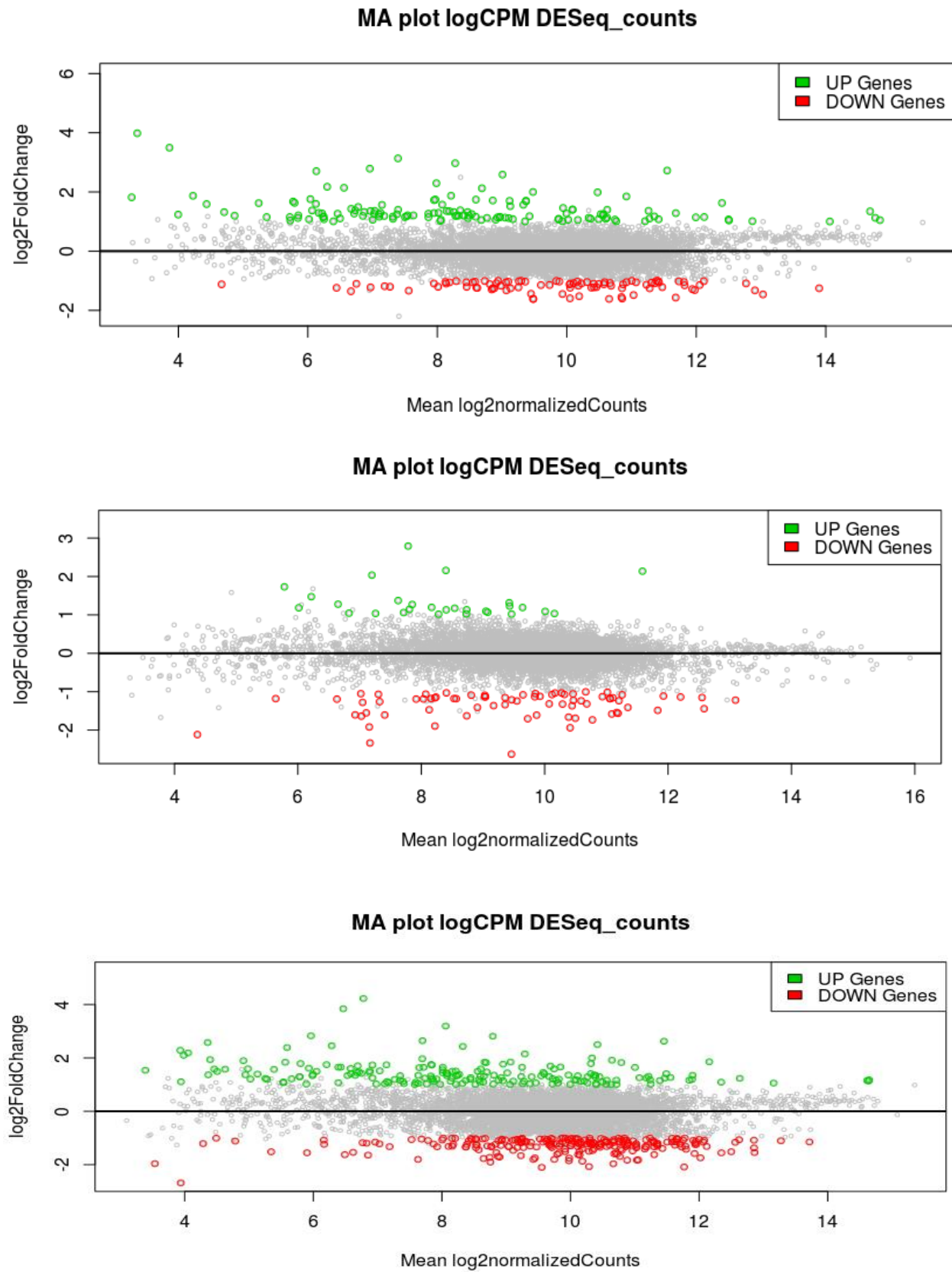
a) Análise dos dados de T7/Cas9 vs linhagem TRMT61A. b) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2540. c) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2170 C1 d) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2170 C3. Fonte: A autora, 2022

Tabela 7- Análise de expressão diferencial

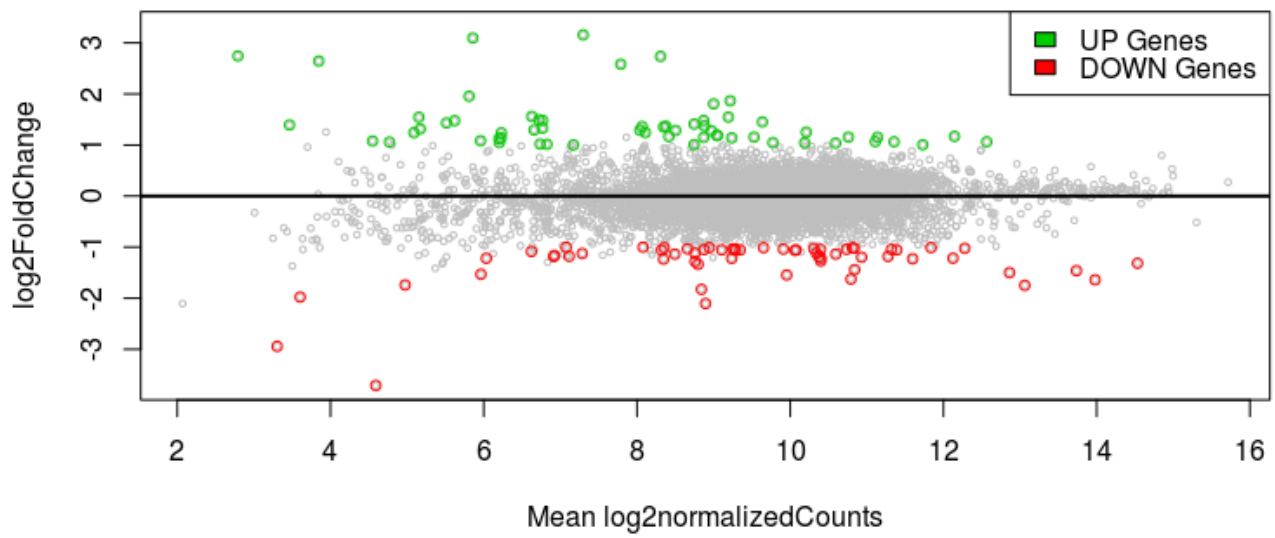
Amostra	Total de genes utilizados na comparação relativa	Total de genes diferencialmente expressos	Total de genes reprimidos	Total de genes superexpressos
T7/Cas9 vs WT	8223	104	75	29
T7/Cas9 vs TRMT61A	8218	442	248	194
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	8212	236	93	143
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C1	8234	122	62	60
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	8227	146	75	71

Fonte: A autora, 2022.

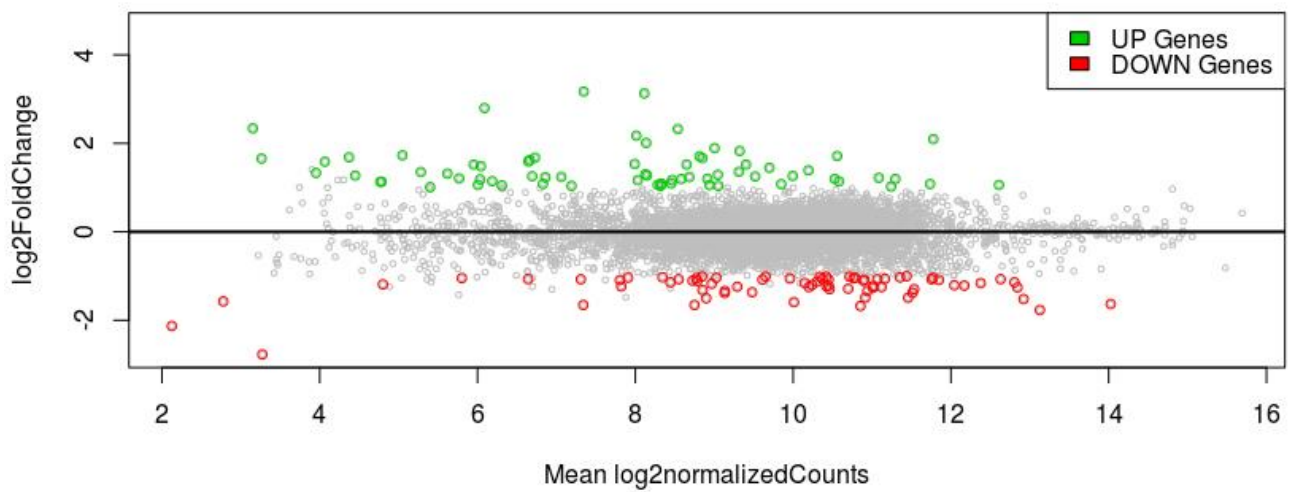
Figura 21 – MA plot de genes expressos diferencialmente



MA plot logCPM DESeq_counts



MA plot logCPM DESeq_counts



Genes regulados para cima e para baixo estão marcados em verde e vermelho, respectivamente. a) Análise dos dados de T7/Cas9 vs WT. b) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem TRMT61A. c) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2540. d) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2170 C1. e) Análise dos dados de T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2170 C3 Fonte: A autora, 2022.

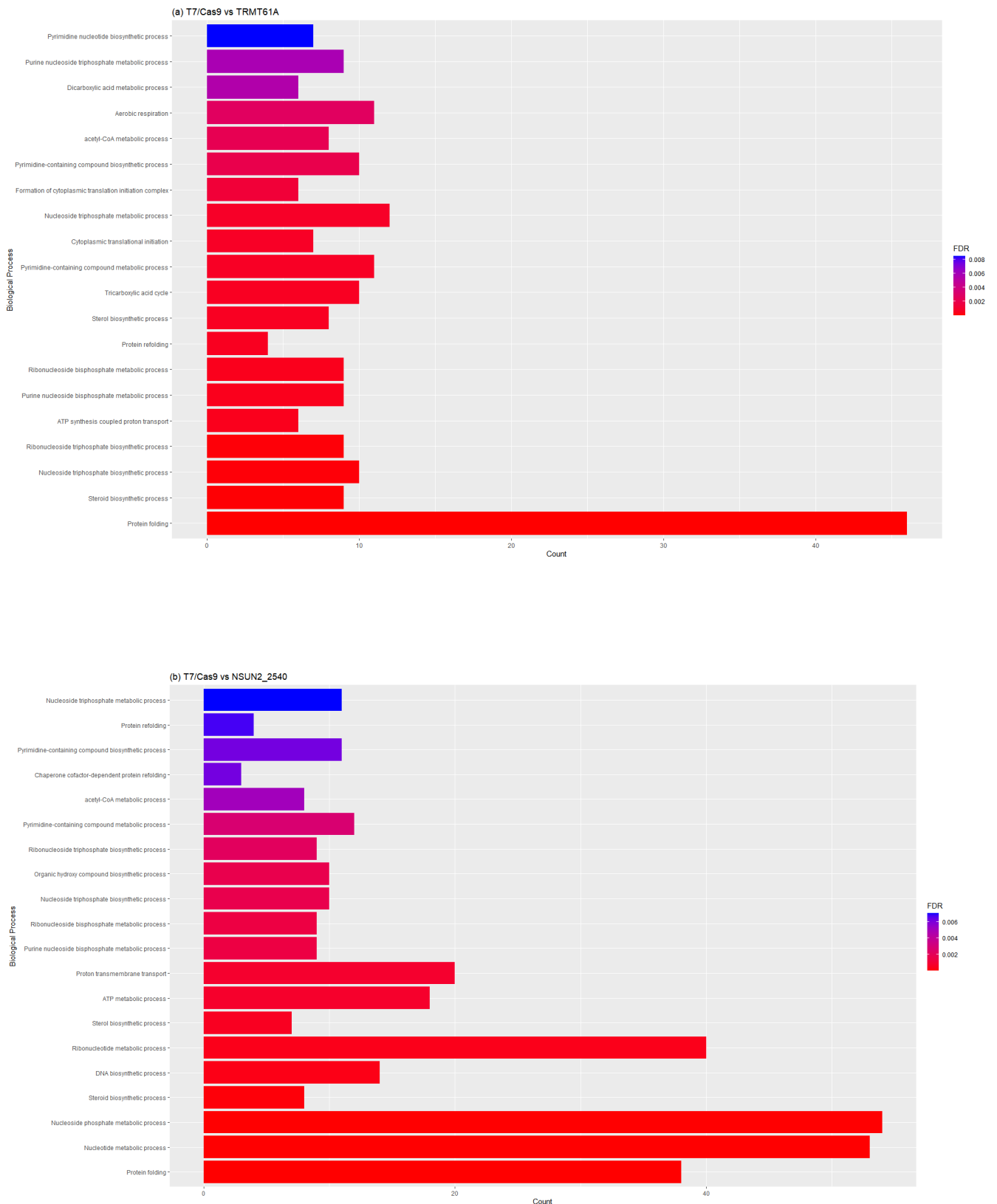
8.7 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO

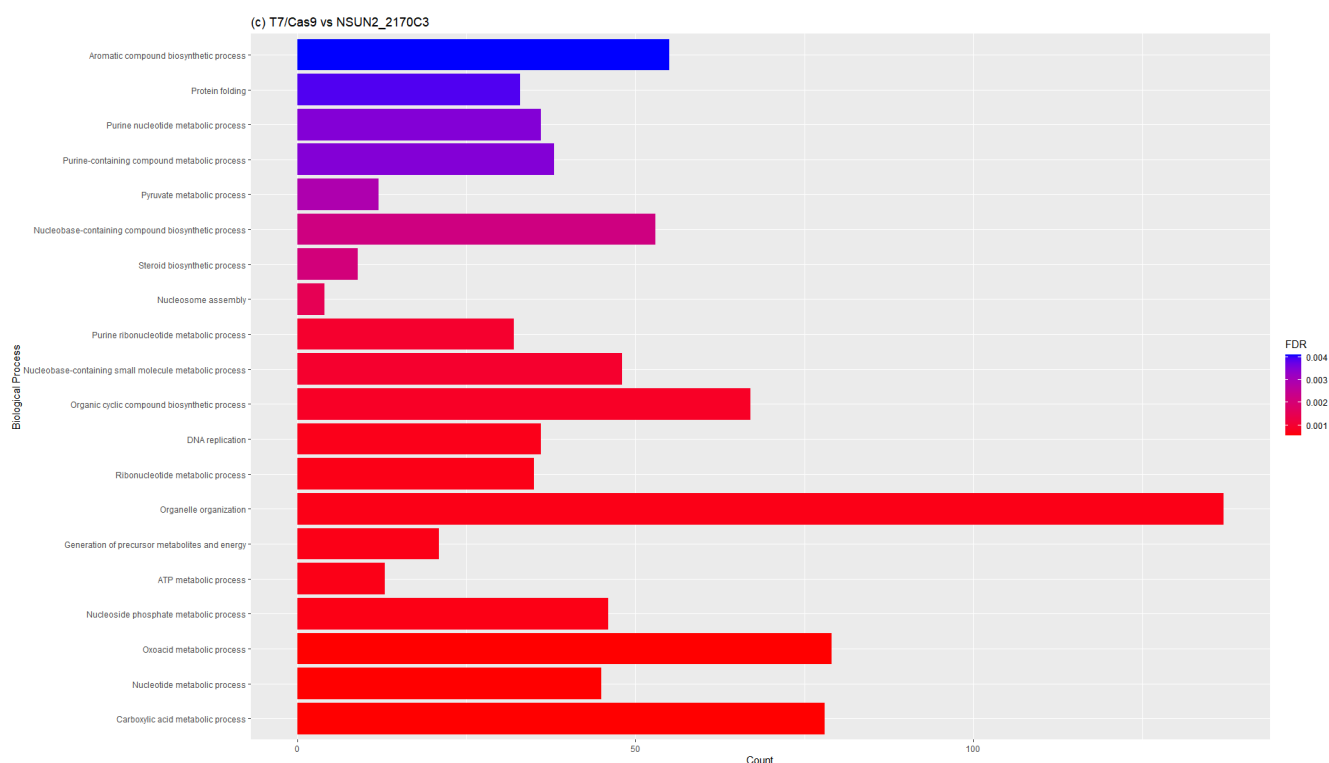
A ferramenta STRING (<https://string-db.org/>) foi utilizada para realizar análise funcional de enriquecimento. Assim, as ontologias relativas a Processo Biológico, foram avaliadas para os genes diferencialmente expressos das condições analisadas, no caso, T7/Cas9, usado como controle, comparado às linhagens modificadas. Para a condição T7/Cas9 vs TRMT61A, o termo Formação do complexo citoplasmático de iniciação da tradução (Figura 22 a) foi o terceiro no rank associado a uma lista de seis ID de genes (Tabela 8) que sofreram impacto, o ID *LmjF.36.3880* fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade i, foi o que apresentou uma maior diferença, estando mais expresso aproximadamente de 3 vezes na linhagem modificada em relação ao controle. Em quarta posição do ranking aparece o termo "Processo de biossíntese de ribonucleosídeo trifosfato" associado a uma lista de quatro genes (Tabela 8). Outros termos associados a metabolismo de nucleotídeos estão presente com uma certa frequência expondo genes, como o ID *LmjF.26.0460* ATPase subunidade 9 entre outros apresentados na tabela.

Para as demais condições avaliadas o clone1 da NSUN2 2170 não apresentou elementos biológicos suficientes para o entendimento biológico, portanto esta condição não foi incluída nas representações gráficas. Para as condições de T7/Cas9 vs NSUN2 2540 e NSUN2 2170 C3 termos GO de processos biológico foram mais atribuídos, principalmente a processos de metabolismo de nucleotídeos, como podemos observar Processo metabólico do ribonucleosídeo bisfosfato, Processo de biossíntese de ribonucleosídeo trifosfato (Figura 22 b) Processos metabólico de ribonucleotídeos, processo metabólico de nucleotídeos (Figura 22c). E com uma frequência de genes associados à ATPase e proteínas hipotéticas (Tabela 8). Todos os genes apresentados na tabela citada anteriormente apresentaram uma diferença de expressão

aproximadamente de 3 vezes mais expressos na linhagem modificada em relação ao controle.

Figura 22 – Gráficos da análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos





a) Análise de enriquecimento da condição T7/Cas9 vs TRMT61A. b) Análise de enriquecimento T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2540. c) Análise de enriquecimento T7/Cas9 vs linhagem NSUN2 2170 C3. Fonte: A autora, 2022.

Tabela 8- Genes associados aos GO termos enriquecidos aos processos biológicos das condições analisadas

Condição avaliada	ID Gene	Descrição	Diferença de expressão
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmxM.36.3880	eIF-3 subunidade i	≅ 3 vezes
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmxM.36.6980	eIF-3 subunidade c	≅ 3 vezes
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmxM.29.3040	eIF-3 subunidade d	≅ 3 vezes
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmxM.26.0460	ATPase subunidade 9	4 vezes
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmxM.18.0020	Mevalonato-difosfato	3 vezes
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmxM.25.1180	ATPase	≅ 3 vezes
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmxM.24.2110	Proteína hipotética	≅ 3 vezes

T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmxM.24.2110	Proteína hipotética	\cong 3 vezes
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmxM.29.0880	Kinase adenosina	\cong 3 vezes
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmxM.25.1180	ATPase	\cong 3 vezes

Fonte: A autora, 2022.

9 DISCUSSÃO

Estudos de epitranscriptômica permitiram identificar a presença de modificações químicas, tais como m¹A e m⁵C, na estrutura de mRNAs, e os aspectos funcionais dessas modificações estão relacionados ao metabolismo desta molécula, que inclui processamento, estabilidade, transporte e tradução, na qual essas modificações têm participação crucial (SARKAR et al., 2021). Esses processos são classificados de mecanismos pós-transcricionais, logo, a presença de modificações químicas na estrutura do mRNA tem mostrado ser um meio alternativo para a regulação gênica pós-transcricional (RAJAN & LEIDEL, 2019). Esse fato motiva o estudo deste contexto em tripanossomatídeos, tendo em vista que estes parasitas possuem os mecanismos pós-transcricionais como a via mais comum para a regulação gênica, principalmente durante a tradução dos mRNAs (CLAYTON, 2019)

A deposição e função dessas modificações químicas são mediadas pela ação de proteínas, e dentre elas, o complexo hetedímero TRMT61A/TRMT6 faz a adição de m¹A nos mRNAs (ZACCARA et al., 2019). Recentemente esse complexo, por meio de análises *in silico*, foi identificado em espécies de tripanossomatídeos (MARAN, et al., 2021). Estes parasitos geralmente são diplóides, e neste trabalho, foram feitas tentativas para deletar as uma ou duas cópias e desses genes homólogos na espécie *L. mexicana*. A transfecção foi realizada três vezes, de forma independente, e apresentou o mesmo resultado, não sendo possível recuperar nenhuma linhagem com dupla deleção dos genes codificantes para o heterodímero. Assim, apenas linhagens com a deleção de um único alelo foram obtidas, o que sugere uma possível essencialidade para esses genes na espécie estudada. Além disso, observações fenotípicas dessas

linhagens não apresentaram diferença perceptível em comparação com o controle do tipo selvagem durante o crescimento.

Um trabalho em *Arabidopsis thaliana* mostrou resultado similar ao apresentado aqui, o que reforça a sugestão da essencialidade desses genes, tendo em vista que não recuperaram linhagem mutante homocigótica, apenas heterocigótica para TRMT61A, e também não observaram fenótipos diferenciados resultantes da deleção (ASLAM et al., 2021).

Apesar da deleção de TRMT61A não causar efeitos no fenótipo de crescimento e morfologia das promastigotas de *L. mexicana*, nossos resultados de análise global de expressão diferencial para esse gene foi o que mais se destacou, com o maior quantitativo de genes diferencialmente expressos. Estudos em outros organismos mostram que deletar ou causar mutagênese nos genes dessas proteínas, levam a consequências quanto à diferenciação celular e estabilidade de tRNA (LIU et al., 2022); (OZANICK et al., 2007).

A modificação m¹A está distribuída ao longo da estrutura do mRNA com maior prevalência na região 5'UTR, que é uma região importante para a iniciação da tradução, indicando que esta modificação tem participação nesse processo (LI et al., 2016). No presente estudo a análise de enriquecimento funcional com os genes diferencialmente expressos na linhagem com o gene codificante de TRMT61A deletado parcialmente apresentou termos de processo biológico que difere da análise do controle indicando que existem processos que foram impactados pela deleção, mesmo que parcial, desse gene. Entre estes termos, podemos destacar o termo de formação do complexo citoplasmático de iniciação da tradução. E a lista de genes que foram impactados trouxe o gene com ID *LmjF.36.3880*, descrito como fator de iniciação da tradução eucariótica eIF-3 subunidade i. Este fator está envolvido na síntese proteica de um repertório especializado de mRNAs e, juntamente com outros fatores de iniciação, estimula a ligação do mRNA e metionil-tRNA_i ao ribossomo 40S, e inicia a tradução de um subconjunto de mRNAs envolvidos na proliferação celular (BLAZIER et al., 2021). A subunidade i é a que apresenta o maior número de interações do complexo eIF-3 e está presente em espécies de tripanossomatídeos, como *L. major* e *T. brucei* (REZENDE et al., 2014; MELEPPATTU et al., 2015).

Um outro tipo de modificação química, a m⁶A, participa da tradução onde a proteína YTHDF1 reconhece a modificação na estrutura do mRNA e interage com o fator de iniciação da tradução eIF3 que se associa-se ao eIF4G através da estrutura de loop formada pelo complexo de ligação ao quepe 5' e promove a tradução (MAYER et al., 2015). A modificação m¹A pode desempenhar um papel semelhante a este na tradução, pois proteínas com domínio YTHD reconhecem m¹A (JIN et al., 2022). E o presente estudo indica que o nocaute parcial de TRMT61A e conseqüentemente redução da modificação m¹A gerou uma compensação na expressão de proteínas da maquinaria de síntese proteica, tendo em vista que o mRNA do eIF-3 foi up-regulado, para manter os níveis da tradução do transcriptoma geral de *Leishmania mexicana*.

Quanto à modificação química m⁵C, esta é catalisada pela enzima NOP2/SUN RNA metiltransferase, que é um membro da família 2 (NSUN2) (KHODDAMI & CAIRNS, 2013). Homólogos dessa metiltransferase também foram identificados em espécies de tripanossomatídeos (MARAN et al., 2021) e a modificação m⁵C foi encontrada em amostra de RNA total de *T. brucei* (MILITELLO et al., 2014). Esses achados evidenciam que esses parasitos dispõem de um contexto de metilação no transcriptoma associados à essa modificação.

Existem dois genes homólogos de NSUN2 no genoma de *L. mexicana*, com cópias localizadas em cromossomos diferentes, e para estes também foram feitas tentativas independentes de deleção das duas cópias desses genes (NSUN2 36.2170) e (NSUN2 08_29.2540). Diferentemente do observado para TRMT6/TRMT61A, foi possível obter linhagens com a deleção das duas cópias para cada homólogo individual, e, apesar da dupla deleção gênica, as curvas de crescimento dessas linhagens não apresentaram efeitos no crescimento.

Também utilizando a metodologia de CRISPR/Cas, o gene da NSUN2 foi nocauteado em *Plasmodium yoelii* com sucesso na obtenção de DKO sem efeitos aparentes no crescimento (LIU et al, 2022). Apesar desses achados darem suporte aos nossos resultados, vale ressaltar que existe uma diferença, porque *Plasmodium yoelii* contém apenas um gene para NSUN2 e a *L. mexicana* é diploide e contém dois genes de NSUN2 com domínios conservados para

atividade de metiltransferase (MARAN et al., 2021) então há uma possibilidade que mesmo com o DKO que obtivemos em um gene, o outro gene relacionado que não foi deletado possa estar complementando a função. Portanto, mais investigações são necessárias para estabelecer de forma mais precisa sobre a essencialidade desses genes em *Leishmania*.

Por meio da análise de enriquecimento, observamos uma frequência de termos relacionados a metabolismo de nucleotídeos presente nas linhagens ao qual a NSUN2 foi deletada. Entre os genes impactados estão ID *LmjF.04.0280* adenosina monofosfato e ID *LmjF.06.0860* timidilato sintase. Os nucleotídeos são fundamentais para diversos processos biológicos e estão sendo sintetizados constantemente, como por exemplo, quando as células proliferam e necessitam da síntese de nucleotídeos para a replicação de DNA e produção dos RNAs (WARNER et al., 2014). Apesar desse resultado diferir do que a os trabalhos mostram de mais comum quanto a função m⁵C, que inclui a estabilização de mRNA, aumento na meia-vida, e exportação dos transcritos para tradução no citoplasma (YANG et al., 2017); (ROUDTREEN et al., 2017); (ZHÃO et al., 2016) nosso achado indica que de alguma forma, ao qual precisa ser explorada, a ausência da modificação química m⁵C via falta do homólogo NSUN2 que adiciona essa modificação causa algum efeito em aspectos associados à síntese dos nucleotídeos na espécie estudada.

Novos estudos fazendo deleções simultâneas para os dois genes codificantes de NSUN2 em uma única rodada de transfecção deverão ser conduzidos para obter uma informação mais precisa sobre a essencialidade desses genes. Assim como, novas tentativas de nocaute para o gene da TRMT6 já que não confirmamos linhagem com indicativo de nocaute. Além disso, será importante realizar novas curvas de crescimento para a linhagens mutantes, uma estratégia seira em condições de estresse para dessa forma tentar observar algum impacto no fenótipo. Caracterizar funcionalmente essas proteínas com intuito de identificar com quais parceiros essas proteínas interagem em *L. mexicana*.

10 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou informações importantes a respeito da essencialidade do gene homólogo responsável pela modificação química m¹A em *Leishmania mexicana*. A deleção parcial deste homólogo impacta no perfil global de expressão gênica em processos biológicos relacionados ao complexo de iniciação da tradução deste parasito.

O fato de m¹A está presente em regiões regulatórias como 5'UTR de mRNAs em alguns organismos, e que sua presença tem relação com a tradução, nossos achados indicam que provavelmente a *L. mexicana* possui seus processos pós-transcricionais com a participação dessa modificação, principalmente a tradução, e a proteína TRMT61A tem um papel importante na biologia deste parasito.

Apesar de não termos concluído a respeito da essencialidade do homólogo NSUN2, o nocaute total para um dos genes desta proteína apresentou efeitos em processos biológicos relacionados ao metabolismo de nucleotídeos, que até então esse aspecto não tinha sido evidenciado em outros organismos.

Nosso estudo de epitranscriptoma em *Leishmania*, permitiu a ampliação deste contexto de metilação em transcriptoma, que até então é pouco explorado em tripanossomatídeos. Portanto, o presente estudo agrega conhecimento sobre a biologia base destes parasitos, principalmente no que se refere a informações associadas a tradução e regulação da expressão gênica. Tendo em vista também que por se tratar de um grupo de parasitos com impacto para saúde pública compreender esses processos epi-transcriptômicos regulatórios pode abrir possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando essas proteínas como um alvo.

REFERÊNCIAS

ANVERSA, L. *et al.* **Human leishmaniasis in Brazil: A general review.** Rev. Assoc. Med. Bras. São Paulo, v. 64, n. 3, p. 281-289, Mar. 2018.

Aslam, M., Huang, X., Yan, M., She, Z., Lu, X., Fakher, B., Chen, Y., Li, G., & Qin, Y. **TRM61 is essential for Arabidopsis embryo and endosperm**

development. *Plant Reproduction*, 35(1), 31–46. 2022
<https://doi.org/10.1007/s00497-021-00428-x>.

ARGY, N. et al. **Congenital leishmaniasis in a newborn infant whose mother was coinfecting with leishmaniasis and HIV.** *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 9, n. 2, p. 277–280, 2020.

AQUINO, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de. **Caracterização preliminar de homólogos de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PABP) em *Leishmania mexicana*.** (Dissertação em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 109f., 2018.

BOCCALETTO, P. et al. **MODOMICS: A database of RNA modification pathways.** 2017 update. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, p. D303–D307, 1 jan. 2018.

BOHNSACK, K. E.; HÖBARTNER, C.; BOHNSACK, M. T. **Eukaryotic 5-methylcytosine (M5C) RNA methyltransferases: Mechanisms, cellular functions, and links to disease Genes** MDPI AG, 1 fev. 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis *The Lancet.***, 15 set. 2018.

BUTENKO, A. et al. **Evolution of metabolic capabilities and molecular features of diplomonads, kinetoplastids, and euglenids.** *BMC Biology*, v. 18, n. 1, 2 mar. 2020.

CANTACESSI, C. et al. **The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics Trends in Parasitology** Elsevier Ltd, 1 mar. 2015.

CHIKNE, V. et al. **A pseudouridylation switch in rRNA is implicated in ribosome function during the life cycle of *Trypanosoma brucei*.** *Scientific Reports*, v. 6, 4 maio 2016.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. **Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes Saliva of hematophagous animals: source of new anticoagulants Rev. bras. hematol. hemoter.** [s.l: s.n.].

Coots, R. A., Liu, X. M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., & Qian, S. B. **m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation.** *Molecular Cell*, 68(3), 504-514.2017. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>

CLAYTON, C. **Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription.** *Open Biology*, v. 9, n. 6, 1 jun. 2019.

CLS, A. et al. **MI73-CH07-Gull Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes MI73-CH07-Gull.** 2019.

DAWIT, G; GIRMA, Z; SIMENEW, K. **A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis.** J Bacteriol Parasitol, n^o4, p.166., 2013.

DE GAUDENZI, J. G. et al. **Gene expression regulation in trypanosomatids.** Essays in Biochemistry, v. 51, n. 1, p. 31–46, 2011.

Designed Research; G, Q. Z. G., & Performed Research; M, Y. Z. L. (2022). *The Pennsylvania State University.* <https://doi.org/10.1073/pnas.2110713119/-/DCSupplemental>.

DOS SANTOS RODRIGUES, F. H. et al. **The Leishmania PABP1–eIF4E4 interface: a novel 5'–3' interaction architecture for trans-spliced mRNAs.** Nucleic acids research, v. 47, n. 3, p. 1493-1504, 2018.

DOMINISSINI, D. *et al.* **The dynamic N(1)-methyl adenosine methylome in eukaryotic messenger RNA.** Nature, v.530, 441–446, 2016.

FINER-MOORE, J. et al. **Crystal Structure of the Human tRNA m1A58 Methyltransferase-tRNA³Lys Complex: Refolding of Substrate tRNA Allows Access to the Methylation Target.** Journal of Molecular Biology, v. 427, n. 24, p. 3862–3876, 4 dez. 2015.

FREIRE, E. *et al.* **The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in Trypanosoma brucei and Other Trypanosomatids.** Pathogens, v. 6, n. 4, p. 55, 27 out., 2017

GILBERT, W. V; BELL, T. A.; SCHAENING, C. **Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function “...mRNA modifications have the potential to affect most posttranscriptional steps in gene expression.”** Downloaded from. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>.

GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso. **Avaliação da susceptibilidade de Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de Leishmania (Leishmania) mexicana.** (Tese em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 84f, 2016.

GROZHIK, A. V.; JAFFREY, S. R. **Distinguishing RNA modifications from noise in epitranscriptome maps**Nature Chemical Biology.Nature Publishing Group, 14 fev. 2018.

GRUNEBAST, J.; CLOS, J. **Leishmania: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription**Computational and Structural Biotechnology JournalElsevier B.V., 1 jan. 2020.

HANDLER, M. Z. et al. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management**Journal of the American Academy of DermatologyMosby Inc., 1 dez. 2015.

HELM, M.; MOTORIN, Y. **Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: Predict and validate** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, 1 maio 2017.

HIRVE, S. et al. **Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent – A Systematic Literature Review.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, 4 ago. 2016.

JACKSON, A. P. et al. **Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism.** *Current Biology*, v. 26, n. 2, p. 161–172, 25 Jan. 2016.

Jin, H., Huo, C., Zhou, T., & Xie, S. (2022). **Review m1A RNA Modification in Gene Expression Regulation.** In *Genes* (Vol. 13, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13050910>.

JONKHOUT, N. et al. **The RNA modification landscape in human disease** **Running title: The RNA modification landscape in human disease.** [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. Disponível em: <<http://mods.rna.albany.edu>>.

KADUMURI, R. V.; JANGA, S. C. **Epitranscriptomic Code and Its Alterations in Human Disease** *Trends in Molecular Medicine* Elsevier Ltd, 1 out. 2018.

KARAMYSHEVA, Z. N.; GUARNIZO, S. A. G.; KARAMYSHEV, A. L. **Regulation of translation in the protozoan parasite leishmania** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, 2 abr. 2020.

KAUFER, A. et al. **The evolution of trypanosomatid taxonomy** *Parasites and Vectors* BioMed Central Ltd., 8 jun. 2017.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. **New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review** *Dermatologic Clinics* W.B. Saunders, 2015.

KHODDAMI, V. et al. **Transcriptome-wide profiling of multiple RNA modifications simultaneously at single-base resolution.** *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2019, 116, 6784–6789.

KUMAR, A. **Transmission of leishmaniasis from human to other vertebrates: a rapid zoonotic evolution** *International Microbiology*. Springer, 19 set. 2019.

LI, X. et al. **Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N1-methyladenosine methylome.** *Nature Chemical Biology*, v. 12, n. 5, p. 311–316, 1 maio 2016.

MARAN, S. R. et al. **Epitranscriptome machinery in Trypanosomatids: New players on the table?** *Molecular Microbiology*, v. 115, n. 5, p. 942–958, 1 maio 2021.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; NEPOMUCENO-MEJÍA, T. **Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa.** *Cells*, v. 8, n. 5, p. 421, 8 maio 2019.

MASLOV, D. A. et al. **Recent advances in trypanosomatid research: Genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution.** *Parasitology*, v. 146, n. 1, p. 1–27, 1 jan. 2019.

Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., Pestova, T. v., Qian, S. B., & Jaffrey, S. R. (2015). **5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation.** *Cell*, 163(4), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>

Militello, K. T., Chen, L. M., Ackerman, S. E., Mandarano, A. H., & Valentine, E. L. (2014). **A map of 5-methylcytosine residues in Trypanosoma brucei tRNA revealed by sodium bisulfite sequencing.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.12.003>

MICHAELI, S. **The response of trypanosomes and other eukaryotes to ER stress and the spliced leader RNA silencing (SLS) pathway in Trypanosoma brucei** **Critical**. *Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* Taylor and Francis Ltd, 4 maio 2015.

MORAIS, Rayana Carla Silva. **Ensaio de duplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de espécies de Leishmania relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana** (Tese em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães. Recife, 129 f., 2019.

MOURA, D. M. N. et al. **Two related trypanosomatid eiF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation.** *RNA Biology*, 2015.

OPAS. Organização Pan Americana de Saúde. **Leishmanioses: Informe epistemológicos das Américas.** Informe epistemológico, nº1, 8 p., 2018.

Ozanick, S. G., Bujnicki, J. M., Sem, D. S., & Anderson, J. T. (2007). **Conserved amino acids in each subunit of the heteroligomeric tRNA m1A58 Mtase from Saccharomyces cerevisiae contribute to tRNA binding.** *Nucleic Acids Research*, 35(20), 6808–6819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm574>.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.

PADILLA-MEJÍA, N. E. *et al.* **The Selenocysteine tRNA Gene in *Leishmania major* Is Transcribed by both RNA Polymerase II and RNA Polymerase III.** *Eukaryotic Cell*, 14(3), 216–227, 2014.

PEREIRA, Mariana Marques Coutelo. **Análise da expressão e investigação de mecanismos envolvidos com o controle da atividade de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*.** (Dissertação em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 120f., 2008.

PEREIRA, M. M.C. **The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture.** *Molecular & Biochemical Parasitology* 190 (2013) 82– 86.

PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. **MRNA splicing in trypanosomes.** *International Journal of Medical Microbiology*, out. 2012.

REQUENA, J. M. **Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*.** *Frontiers in Bioscience*. [s.l: s.n.].

REZENDE, A. M. *et al.* **The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates—identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis.** *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 1175, 2014.

RODRIGUES, V. *et al.* **Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection** *Parasites and Vectors*. BioMed Central, 1 mar. 2016.

Ranjan, N., & Leidel, S. A. (2019). **The epitranscriptome in translation regulation: mRNA and tRNA modifications as the two sides of the same coin?** In *FEBS Letters* (Vol. 593, Issue 13, pp. 1483–1493). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13491>

Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., & He, C. (2017). **Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation.** In *Cell* (Vol. 169, Issue 7, pp. 1187–1200). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>

Roundtree, I. A., & He, C. (2016). **RNA epigenetics - chemical messages for posttranscriptional gene regulation.** In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 30, pp. 46–51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.024>

SAFRA, M. *et al.* **The m1A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution.** *Nature*, v. 551, n. 7679, p. 251–255, 9 nov. 2017.

Sarkar, A., Gasperi, W., Begley, U., Nevins, S., Huber, S. M., Dedon, P. C., & Begley, T. J. (2021). **Detecting the epitranscriptome.** In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 6). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wrna.1663>

SILVEIRA, F. T. *et al.* **Reverdo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais.** Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua , v. 7, n. esp, p. 15-22, dez. 2016

SCHAEFER, M.; KAPOOR, U.; JANTSCH, M. F. **Understanding RNA modifications: The promises and technological bottlenecks of the “epitranscriptome”**Open Biology. Royal Society of London, , 2017.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. **Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis**International. Journal of Molecular Sciences MDPI AG, 18 jun. 2017.

SONG, J.; YI, C. **Chemical Modifications to RNA: A New Layer of Gene Expression Regulation.** ACS Chemical BiologyAmerican Chemical Society , 17 fev. 2017.

TRIXL, L.; LUSSER, A. **The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark**Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. Blackwell Publishing Ltd, 1 jan. 2019.

VIEGAS, I. J. *et al.* **N6-methyladenosine in poly(A) tails stabilize VSG transcripts.** bioRxiv, 2020.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. **The limits on trypanosomatid morphological diversity.** PLoS ONE, v. 8, n. 11, 19 nov. 2013.

YANG, Y. *et al.* **Dynamic transcriptomic m6A decoration: Writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism**Cell. Research Nature Publishing Group, 1 jun. 2018.

ZHANG, C.; JIA, G. **Reversible RNA Modification N1-methyladenosine (m1A) in mRNA and tRNA**Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Beijing Genomics Institute, 1 jun. 2018.

ZHAO, B. S.; ROUNDTREE, I. A.; HE, C. **Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications**Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group, 19 dez. 2016.

Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). **Reading, writing and erasing mRNA methylation.** In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 10, pp. 608–624). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>.

APÊNDICE A - ARTIGO

Análise do perfil de expressão gênica em *Leishmania mexicana* mediante o silenciamento gênico de RBPs envolvidas nas modificações químicas m¹A e m⁵C.

Angela Moreira Bezerra¹; Antonio Mauro Rezende¹; Christian Robson de Souza Reis¹; Danielle Maria Nascimento Moura¹

¹Instituto Aggeu Magalhães, IAM/FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Modificações químicas presentes em mRNAs e as proteínas que as reconhecem participam da regulação da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais em tripanosomatídeos. Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam o controle gênico predominantemente nesses mecanismos, principalmente na etapa de tradução. Diferentes homólogos das proteínas responsáveis por catalisar as modificações químicas m¹A e m⁵C nos mRNAs foram identificadas em espécies de tripanosomatídeos, entretanto seu papel é desconhecido nestes protozoários. Assim, com o intuito de entender o papel dessas proteínas nesses parasitas, o presente estudo teve por objetivo analisar o perfil global de expressão gênica em *Leishmania mexicana* após o silenciamento gênico das proteínas TRMT61A (associada a modificação m¹A e a proteína NSUN2 (associada a modificação m⁵C). Desta maneira, o trabalho teve início com a obtenção de linhagens de *Leishmania mexicana* contendo com deleção de uma cópia do gene codificante da proteína TRMT61A e ou as duas cópias da proteína NSUN2 através da técnica CRISPR/Cas9. A análise do transcriptoma das células com nocaute de uma cópia do gene TRMT61A demonstrou genes diferencialmente expressos, frente ao controle. Os principais genes que tiveram sua expressão na célula com nocaute de uma cópia gênica do TRMT61A indicou resultados de enriquecimento significativos de mRNAs relacionados a iniciação da tradução, como os codificantes de proteínas dos complexos eIF4F e eIF3 de *Leishmania mexicana*. Os resultados sugerem,

preliminarmente, que a diminuição da modificação m¹A causada pelo nocaute parcial da TRMT61A gerou uma compensação na expressão das proteínas na maquinaria de tradução para manter os níveis de tradução do transcriptoma geral. A caracterização funcional das proteínas que modificam mRNAs em tripanosomatídeos é fundamental para compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica nestes protozoários e, de forma adicional, podem contribuir no desenvolvimento de estratégias de controle utilizando alvos moleculares específicos.

Palavras chaves: epi-transcriptômica, mRNA, tradução, tripanossomatídeos.

Introdução

Os protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae* divergiram precocemente na linha evolutiva eucariótica, o que lhes confere particularidades moleculares, bioquímicas e genéticas em comparação aos demais eucariotos. Dentre seus vários representantes, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* se destacam no cenário médico e veterinário por estarem relacionados a doenças negligenciadas de grande impacto na saúde pública a nível global (MORAIS, 2019; PEREIRA, 2015; REY, 2011).

Os tripanossomatídeos são caracterizados pela ausência de regiões promotoras para RNA polimerase II e pela falta de fatores de transcrição. O genoma destes organismos é transcrito policistronicamente, uma vez que uma única molécula de pré-mRNA dá origem a diversos mRNAs maduros individuais para expressão de proteínas correspondentes. A regulação da expressão gênica ocorre principalmente a nível pós-transcricional, mediante mecanismos de estabilização dos mRNAs e da regulação da tradução. Estas etapas pós-transcricionais mostram-se complexas, ainda existindo lacunas quanto a existência de possíveis novas vias de regulação e expressão gênica (PADILLA-MEJÍA *et al.*, 2014).

Recentemente, devido aos avanços nas técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos, os diferentes destinos das moléculas de RNA e seus processos regulatórios vêm sendo associados, também, a presença ou ausência de modificações químicas covalentes em seus nucleotídeos (KADUMURI; JANGA,

2018). Até hoje, mais de 170 alterações já foram descritas em diversos eucariotos, de leveduras a mamíferos, e as mesmas parecem surgir a partir da interação das diferentes classes de RNA como alvo, e de proteínas específicas, as RBPs como modificadoras dos nucleotídeos (KUMAR; MOHAPATRA, 2021; MAUER et al., 2017; DOMINISSINI *et al.*, 2012).

Dentre as modificações mais frequentes em moléculas humanas de mRNA estão a m¹A e m⁵C (DELAUNAY & FRYE, 2019). Atualmente, sabe-se que a presença destas modificações parece afetar processos envolvidos na regulação da expressão gênica como o transporte, meia-vida, estabilidade, estrutura e desenvolvimento das moléculas de mRNA nestes organismos (SCHIMMEL, 2018).

Apesar de já descritas em estudos com diferentes populações de RNA em organismos distintos, ainda não há relatos dos efeitos destas modificações em mRNAs de tripanossomatídeos. A partir da identificação de genes de *Leishmania mexicana* homólogos aos genes de RBPs responsáveis pela adição de m¹A e m⁵C em RNAs humanos, o presente trabalho visa investigar o impacto do silenciamento destes genes para o perfil fenotípico dos tripanossomatídeos, tendo como modelo de estudo a *Leishmania mexicana*.

Metodologia

Para a deleção dos genes alvo, visando avaliar a viabilidade das linhagens celulares obtidas, bem como o processo de regulação da expressão gênica em *L. mexicana*, foi utilizada a estratégia CRISPR-Cas9 seguindo recomendações de artigo previamente publicado na literatura. Os iniciadores para amplificação de DNA doador e sgRNA para a transfecção foram desenhados a partir da plataforma LeishGedit (<http://www.leishgedit.net>). A partir do sucesso da aplicação da técnica de CRISPR-Cas9 em procedimentos de integração de fragmentos de DNA em *Leishmania*, esta ferramenta consegue desenhar primers com braços de homologia (HF) de 30 nucleotídeos (muito menores que os HF de 100-300 nucleotídeos requeridos por recombinação homóloga)(BENEKE *et al.*, 2017).

Cultivo Celular

Para rezaização da transfecção, células promastigotas de *L. mexicana*, expressando T7 RNA polimerase e Cas9 (CRISPR associated protein 9), na sua fase procíclica, foram cultivadas a 26°C em meio M199. As células foram mantidas com o antibiótico higromicina, na concentração de 50 ug / mL.

Deleção gênica por CRISPR – Cas9: Construção de cassete de integração e templates de sgRNA.

Foram construídos, através da técnica de PCR, dois cassetes gênicos para deleção das duas cópias dos genes de interesse em *L. mexicana* através de um único passo de transfecção.

O cassete BSD (deleção da primeira cópia) foi construído com a utilização de iniciadores específicos associados ao plasmídeo pTBLAST como DNA molde e é constituído de 30 nucleotídeos (NT) da região 5'UTR do gene alvo, marca de resistência à blastidina (com suas respectivas regiões 5' e 3' UTR) e 30nt da região 3'UTR do gene alvo. Para a deleção da segunda cópia dos genes de interesse, foram construídos os cassetes PAC, sendo constituído de 30nt da região 5'UTR do gene alvo, marca de resistência à puomicina (com suas respectivas regiões 5' e 3' UTR) e 30nt da região 3'UTR do gene alvo (BENEKE *et al.*, 2017).

A primeira reação para amplificação dos fragmentos recombinantes foi composta por: Taq DNA polimerase (5U), dNTPs (125 µM), iniciador *forward* (2 µM), iniciador *reverse* (2 µM), MgCl₂ (25mM), tampão 10x, 30ng do plasmídeo PGL2662 (MARAN *et al.*, 2021) contendo a marca de resistência para blastidina e 30ng do plasmídeo PGL2667 (MARAN *et al.*, 2021) que contém a marca para puomicina. Os passos da PCR foram 5 minutos a 94°C seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 2 minutos e 15 segundos a 72°C e 7 minutos a 72°C. Dois microlitros da reação foram corridos em gel de agarose a 1% para avaliar a presença do produto esperado.

Por fim, foram construídos fragmentos que contém o promotor da T7 RNA polimerase e o DNA codificante para o RNA guia, funcionando como templates para os sgRNAs em processo de transcrição *in vivo* (BENEKE *et al.*, 2017).

Para a amplificação dos templates de sgRNA, foi utilizado um mix de reação de 20µl composto por 1µl (100pmol) de primer forward ou reverse e de primer G00 (primer que contém região de ligação a Cas9), 1µl de Platinum Taq Polymerase High Fidelity, 1µl de dNTP (10mM), 2µl de buffer (10x), 3µl de MgCl₂ e 11µl de solvente (H₂O). A configuração da PCR foi de 30 segundos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 72°C. Trinta microlitros foram corridos em gel de agarose a 0,8% para avaliar o sucesso da amplificação.

Transfecção

Na etapa de transfecção, alíquotas de células de *L. mexicana* foram ressuspensas em tampão, incubadas com o DNA plasmidial dos vetores produtos de PCR precipitados, submetidas à eletroporação e selecionadas com os antibióticos adequados. As células foram eletroporadas utilizando o *Amaza Nucleofector IIb*. Após o choque, o material foi repassado para uma garrafa de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de meio M199 (GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, EUA) suplementado e incubado a 26°C, por 24 horas. Em seguida, foi realizada a pré-seleção dos transfectantes, onde foi adicionado 5 ml de meio M199 à cultura juntamente com a metade da quantidade do antibiótico utilizado para manutenção da linhagem. Após 24 horas, 1 ml das células pré-selecionadas foram transferidas para uma garrafa de cultura contendo 10 ml de meio M199 juntamente com a concentração total (quadro 4) do antibiótico utilizado. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 5 a 10 dias até que as células selecionadas se tornassem viáveis para um repasse celular.

Extração do DNA genômico das linhagens e confirmação das deleções por PCR convencional.

O DNA das linhagens modificadas foram extraídas para a realização da confirmação. Após seleção clonal de cada linhagem mutante, as células foram cultivadas em 10 mL de meio M199 contendo os antibióticos de seleção. Ao atingir o crescimento exponencial, 1×10^8 células foram coletadas em um tubo

cônico de 15mL e centrifugadas por 5 minutos a 3.500 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em 1 mL de PBS 1X, esse conteúdo foi transferido para um tubo de 1,5 mL, o qual foi centrifugado por 2 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 500 ul de DNAzol seguido de homogenização até desfazer o pellet. Adicionou-se 500 ul de etanol 100% e o tubo foi mantido em temperatura ambiente por 2 minutos. Após esse tempo formou-se uma membrana branca, material que contém o DNA, e esse material foi recolhido com uma alça de inoculação e mergulhado de 3 a 5X em etanol 70%. Por fim, o material que ficou retido na alça secou por 3 minutos e foi transferido para um tubo com 200 ul de água autoclavada. Com a obtenção dos DNAs genômicos das linhagens, estes foram utilizados para a confirmação da integração dos fragmentos recombinantes.

Extração de RNA, construção de biblioteca de mRNA e sequenciamento.

O RNA total das quatro linhagens modificadas, em triplicatas, e das duas linhagens controle, em quadruplicatas, foi extraído usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, com posterior tratamento com DNase I (Promega). A pureza e a concentração do RNA foram avaliadas usando Qubit™ RNA IQ Assay Kits. A integridade do RNA foi avaliada através do Qubit e por eletroforese em gel de agarose. As bibliotecas do sequenciamento do tipo *paired-end* foram preparadas a partir do RNA total usando o kit *Stranded mRNA Prep* (Illumina), seguindo os procedimentos padrão, quantificadas e em seguida foram sequenciadas usando o kit sp v 1.5 de 100 ciclos (Illumina) no sequenciador Illumina NovaSeq™6000 do IAM-FIOCRUZ.

Análise de dados do RNA seq.

A qualidade das reads sequenciadas foi verificada aplicando a ferramenta FASTQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Para facilitar a visualização e comparação, as análises de qualidade foram compiladas em um único resultado utilizando a ferramenta MULTIQC (EWELS et al., 2016). Cada biblioteca foi então mapeada contra o genoma de referência de *L. mexicana*, cepa MHOMGT2001U1103 utilizando a ferramenta STAR (DOBIN et al., 2013),

a qual também foi utilizada para produzir o relatório de contagem das leituras de sequenciamento para cada gene do genoma. Os dados das contagens de genes foram carregados no ambiente R, e estruturados em uma matriz, que foi transformada para a escala \log_2 usando a função transformação *rlog* do pacote DESeq2. Essa matriz foi utilizada como entrada para a função *prcomp* para realizar a análise de componentes principais (PCA). A função *plot* foi então aplicada para plotar a primeira e a segunda componentes principais calculados de cada amostra. O pacote R DESeq2 foi utilizado para realizar a análise global de expressão diferencial relativa, considerando apenas os genes representados por pelo menos cinco leituras para todas as réplicas de pelo menos uma condição (controle ou linhagem modificada). A razão de expressão (*Fold Change*) dos genes entre a condição controle e linhagem modificada foi obtida através de uma escala simétrica transformando essa razão pela função logarítmica com base 2 (\log_2 Fold Change). Assim, um valor de *log2foldchange* igual a 2, representa uma razão de expressão de 4 vezes de diferença. Além disso, os mesmos dados também foram usados para criar um MA plot usando o function plot, onde os genes diferencialmente expressos foram destacados.

No intuito de analisar funcionalmente o impacto global dos genes diferencialmente expressos utilizando vocabulários controlados (ontologias) sobre vias metabólicas (KEEG), processo biológico e componente celular, ambas ontologias do consórcio Gene Ontology, optamos em realizar uma análise de enriquecimento funcional através da base de dados String (<https://string-db.org/>). Essa análise possibilita identificar se há termos das ontologias citadas acima com uma frequência e ordenamento, em função da razão de expressão (\log_2 FoldChange), não esperados para lista de genes identificados como diferencialmente expressos, comparando com a frequência desses termos no genoma do organismo alvo.

Resultados

Obtenção dos fragmentos recombinantes e cassetes de sgRNA.

Através da técnica de PCR, foram obtidos cassetes de deleção gênica compostos das regiões 5'-UTR e 3'-UTR dos genes alvo e região correspondente

ao gene de resistência (com suas respectivas regiões UTRs). Além disso, foram construídos templates para expressão endógena dos sgRNAs 5' e 3'. O perfil da presente eletroforese pode ser visto na (Figura suplementar 1)

Obtenção de linhagens mutantes

As células de *L. mexicana* submetidas ao silenciamento gênico por meio da técnica CRISPR Cas9 foram selecionadas através de suas marcas de resistência a antibióticos. Para os genes codificantes das proteínas TRMT6 e TRMT61A, somente as linhagens com uma única cópia deletada (SKO) com marca de resistência à blasticidina foram recuperadas. Três tentativas independentes de deleção dos genes TRMT6 e TRMT61A foram realizadas, contudo não foi possível recuperar nenhuma linhagem de duplo nocaute (DKO) para esses genes. Já para os genes NSUN2 2170 e NSUN2 2540, foi possível recuperar células SKO com marcas de resistência de blasticidina ou puromicina, bem como células DKO com marcas de resistência a ambos os antibióticos simultaneamente.

Confirmação das deleções por PCR convencional.

As três condições de confirmação por PCR ilustradas na (Figura 13) foram avaliadas na linhagem T7/Cas9, utilizada como controle, e nos clones das linhagens modificadas, no caso, SKO do gene de TRMT6, SKO do gene de TRMT61A, e DKO dos genes de NSUN2. Para os clones SKO de TRMT6 (Figura 14A), apesar do crescimento após seleção com antibiótico blasticidina, que foi a marca de resistência utilizada no fragmento recombinante, não houve amplificação para PCR de confirmação dessa marca nos clones (Figura 14 A), apenas do gene, o que é esperado por se tratar da deleção apenas de uma cópia do gene. A partir deste resultado a linhagem não foi incluída no ensaio de sequenciamento.

A linhagem SKO de TRMT61A apresentou amplificação para o gene alvo, o que é esperado devido à presença da outra cópia. Além disso, essa mesma linhagem também apresentou amplificação para a marca de resistência

blastocidina, conforme pode ser observado na Figura complementar 14 B. Nas linhagens DKO NSUN2 (ID LmxM.36.2170 e ID LmxM.08_29.2540), não houve amplificação para o gene específico na maioria dos clones, exceto no clone dois (C2) da linhagem com dupla deleção para o gene NSUN2 LmxM.36.2170. Todos os demais clones para linhagens DKO apresentaram uma amplificação positiva para ambas marcas de resistência (blastocidina e puromicina), como pode ser observado nas (Figuras complementar 1C e 1D)

Análise de crescimento

Em paralelo à realização das PCRs de confirmação, as linhagens mutantes foram avaliadas quanto ao crescimento celular e comparadas com a linhagem controle usada para transfecção (T7/Cas9). O crescimento celular foi observado através de contagens diárias para determinação da densidade celular. Apesar de um perfil ligeiramente diferente da linhagem SKO TRMT61A, não foram verificadas mudanças importantes nem na morfologia, nem no crescimento das linhagens quando comparadas à linhagem controle, conforme ilustra o gráfico das curvas de crescimento (Figura complementar 2)

Ensaio de sequenciamento

As células de *L. mexicana* que foram submetidas à deleção gênica por meio da técnica CRISPR Cas9, e que tiveram confirmação da deleção de uma cópia ou de ambas dos genes alvos do estudo foram selecionadas para o sequenciamento de seus transcriptomas. As linhagens selecionadas foram: um clone SKO de TRMT61A ID LmxM.28.2400, um clone DKO do gene ID LmxM.08_29.2540 codificante de NSUN2 e dois clones DKO do ID LmxM.36.2170 também codificante de NSUN2. Uma vez que não conseguimos confirmar a integração do fragmento recombinante de blastocidina para o gene codificante de TRMT6 ID LmxM.36.5780, linhagens provenientes dessa deleção não foram incluídas no ensaio de sequenciamento. Estes clones das linhagens

modificadas e da linhagem WT e T7Cas9 foram submetidos à extração de RNA total, seguida de sequenciamento do transcriptoma total (RNA-Seq).

Um total de 453.937.475 leituras foram produzidas, e posteriormente elas foram mapeadas contra o genoma de referência de *L. mexicana*. Essa análise rendeu 41.118 genes que corresponderam ao limite de representação de pelo menos cinco leituras de cada uma das três réplicas para as amostras no controle e/ou das linhagens modificadas. Observamos que, em média, todas as bases tiveram escores de Phred superiores a 30, portanto, a remoção de leituras de baixa qualidade não foi necessária. As informações referentes aos dados do sequenciamento e da biblioteca estão apresentadas nas.

Análise de expressão diferencial.

Os dados globais de expressão diferencial foram gerados através das análises realizadas utilizando o pacote DeSeq2 no ambiente de programação R. Para comparar o perfil global de expressão diferencial das linhagens mutantes, primeiramente foi realizada uma análise comparativa da linhagem WT com a T7/Cas9, onde 104 genes foram identificados com diferença de expressão, como não foi observado diferença entre as duas linhagens a T7/Cas9 foi escolhida para prosseguir como controle comparativo com as linhagens mutantes.

As análises mostraram genes diferencialmente expressos em relação a linhagem controle, com valores absolutos de $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e Pvalor corrigido por FDR de 5% (*False Discovery Ration*) igual ou menor a 0,05 nas condições analisadas. E a análise em si, do controle T7/Cas9 entre as linhagens modificadas indicaram no geral, que a deleção parcial e total de genes potencialmente relacionados a modificações químicas de RNAs, causou um impacto global na expressão gênica, principalmente na condição relativa a TRMT61A, onde um total de 442 genes foram diferencialmente expressos Tabela 7, e o gene ID LmxM.32.1760, de adenosina deaminase, aparece com uma diferença de 8 vezes mais superexpresso na linhagem controle comparada a modificada, ou seja possivelmente está sendo reprimido em TRMT61A. A segunda análise que se destaca na Tabela 7 é o da condição T7/Cas9 vs NUN2

2540 com um total 236 genes diferencialmente expressos com uma frequência dos LmxM.24.1830, LmxM.04.0130 referente a proteína hipotética sendo superexpressos aproximadamente 4 vezes a mais na T7/Cas9 em relação a NSUN2 2540. Ambos os clones na análise de T7/Cas9 vs NSUN2 2170 apresentaram um quantitativo menor de genes com diferença. Esses resultados condizem com a representação gráfica do MA plot Figura suplementar 3 que destaca dentro das distribuição de genes os que estão sendo diferencialmente expressos. E tanto o gráfico b e c da Figura suplementar 3 que respectivamente representam a análise T7/Cas9 vs TRMT61A e T7/Cas9 vs NSUN2 2540 mostram um agrupamento maior de genes que estão sendo diferencialmente expressos para mais e para menos.

Análise de enriquecimento

A ferramenta STRING (<https://string-db.org/>) foi utilizada para realizar análise funcional de enriquecimento. Assim, as ontologias relativas a Processo Biológico, foram avaliadas para os genes diferencialmente expressos das condições analisadas, no caso, T7/Cas9, usado como controle, comparado às linhagens modificadas. Para a condição T7/Cas9 vs TRMT61A, o termo Formação do complexo citoplasmático de iniciação da tradução (Figura 18 a) foi o terceiro no rank associado a uma lista de seis ID de genes (Tabela 8) que sofreram impacto, o ID LmjF.36.3880 fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade i, foi o que apresentou uma maior diferença, estando mais expresso aproximadamente de 3 vezes na linhagem modificada em relação ao controle. Em quarta posição do ranking aparece o termo "Processo de biossíntese de ribonucleosídeo trifosfato" associado a uma lista de quatro genes (Tabela suplementar 3). Outros termos associados a metabolismo de nucleotídeos estão presente com uma certa frequência expondo genes, como o ID LmjF.26.0460 ATPase subunidade 9 entre outros apresentados na tabela.

Para as demais condições avaliadas o clone1 da NSUN2 2170 não apresentou elementos biológicos suficientes para o entendimento biológico, portanto esta condição não foi incluída nas representações gráficas. Para as condições de T7/Cas9 vs NSUN2 2540 e NSUN2 2170 C3 termos GO de processos biológico foram mais atribuídos, principalmente a processos de

metabolismo de nucleotídeos, como podemos observar Processo metabólico do ribonucleosídeo bisfosfato, Processo de biossíntese de ribonucleosídeo trifosfato (Figura suplementar 4 b) Processos metabólico de ribonucleotídeos, processo metabólico de nucleotídeos (Figura suplementar 4 C). E com uma frequência de genes associados a ATPase e proteínas hipotéticas (Tabela suplementar 4). Todos os genes apresentados na tabela citada anteriormente apresentaram uma diferença de expressão aproximadamente de 3 vezes mais expressos na linhagem modificada em relação ao controle.

Discussão

Estudos de epitranscriptômica permitiram identificar a presença de modificações químicas, tais como m¹A e m⁵C, na estrutura de mRNAs, e os aspectos funcionais dessas modificações estão relacionados ao metabolismo desta molécula, que inclui processamento, estabilidade, transporte e tradução, na qual essas modificações têm participação crucial (SARKAR et al., 2021). Esses processos são classificados de mecanismos pós-transcricionais, logo, a presença de modificações químicas na estrutura do mRNA tem mostrado ser um meio alternativo para a regulação gênica pós-transcricional (RAJAN & LEIDEL, 2019). Esse fato motiva o estudo deste contexto em tripanossomatídeos, tendo em vista que estes parasitas possuem os mecanismos pós-transcricionais como a via mais comum para a regulação gênica, principalmente durante a tradução dos mRNAs (CLAYTON, 2019)

A deposição e função dessas modificações químicas são mediadas pela ação de proteínas, e dentre elas, o complexo heterodímero TRMT61A/TRMT6 faz a adição de m¹A nos mRNAs (ZACCARA et al., 2019). Recentemente esse complexo, por meio de análises *in silico*, foi identificado em espécies de tripanossomatídeos (MARAN, et al., 2021). Estes parasitas são diplóides, e neste trabalho, foram feitas tentativas para deletar as uma ou duas cópias e desses genes homólogos na espécie *L. mexicana*. A transfecção foi realizada três vezes, de forma independente, e apresentou o mesmo resultado, não sendo possível recuperar nenhuma linhagem com dupla deleção dos genes codificantes para o heterodímero. Assim, apenas linhagens com a deleção de um único alelo foram obtidas, o que sugere uma possível essencialidade para

esses genes na espécie estudada. Além disso, observações fenotípicas dessas linhagens não apresentaram diferença perceptível em comparação com o controle do tipo selvagem durante o crescimento.

Um trabalho em *Arabidopsis thaliana* mostrou resultado similar ao apresentado aqui, o que reforça a sugestão da essencialidade desses genes, tendo em vista que não recuperaram linhagem mutante homozigótica, apenas heterozigótica para TRMT61A, e também não observaram fenótipos diferenciados resultantes da deleção (ASLAM et al., 2021).

Apesar da deleção de TRMT61A não causar efeitos no fenótipo de crescimento e morfologia das promastigotas de *L. mexicana*, nossos resultados de análise global de expressão diferencial para esse gene foi o que mais se destacou, com o maior quantitativo de genes diferencialmente expressos. Estudos em outros organismos mostram que deletar ou causar mutagênese no genes dessas proteínas, levam a consequências quanto à diferenciação celular e estabilidade de tRNA (LIU et al., 2022); (OZANICK et al., 2007).

A modificação m¹A está distribuída ao longo da estrutura do mRNA com maior prevalência na região 5'UTR, que é uma região importante para a iniciação da tradução, indicando que esta modificação tem participação nesse processo (LI et al., 2016). No presente estudo a análise de enriquecimento funcional com os genes diferencialmente expressos na linhagem com o gene codificante de TRMT61A deletado parcialmente apresentou termos de processo biológico que difere da análise do controle indicando que existem processos que foram impactados pela deleção, mesmo que parcial, desse gene. Entre estes termos, podemos destacar o termo de formação do complexo citoplasmático de iniciação da tradução. E a lista de genes que foram impactados trouxe o gene com ID LmjF.36.3880, descrito como fator de iniciação da tradução eucariótica eIF-3 subunidade i. Este fator está envolvido na síntese protéica de um repertório especializado de mRNAs e, juntamente com outros fatores de iniciação, estimula a ligação do mRNA e metionil-tRNA_i ao ribossomo 40S, e inicia a tradução de um subconjunto de mRNAs envolvidos na proliferação celular (BLAZIER et al., 2021). A subunidade i é a que apresenta o maior número de interações do

complexo eIF-3 e está presente em espécies de tripanossomatídeos, como *L. major* e *T. brucei* (REZENDE et al., 2014); (MELEPPATTU et al., 2015)

Um outro tipo de modificação química, a m⁶A, participa da tradução onde a proteína YTHDF1 reconhece a modificação na estrutura do mRNA e interage com o fator de iniciação da tradução eIF3 que se associa-se ao eIF4G através da estrutura de loop formada pelo complexo de ligação ao quepe 5' e promove a tradução (MAYER et al., 2015). A modificação m¹A pode desempenhar um papel semelhante a este na tradução, pois proteínas com domínio YTHD reconhecem m¹A (JIN et al., 2022). E o presente estudo indica que o nocaute parcial de TRMT61A e conseqüentemente redução da modificação m¹A gerou uma compensação na expressão de proteínas da maquinaria de síntese proteica, tendo em vista que o mRNA do eIF-3 foi up regulado, para manter os níveis da tradução do transcriptoma geral da *Leishmania*.

Quanto à modificação química m⁵C, esta é catalisada pela enzima NOP2/SUN RNA metiltransferase, que é um membro da família 2 (NSUN2) (KHODDAMI & CAIRNS, 2013). Homólogos dessa metiltransferase também foram identificados em espécies de tripanossomatídeos (MARAN et al., 2021) e a modificação m⁵C foi encontrada em amostra de RNA total de *T. brucei* (MILITELLO et al., 2014). Esses achados evidenciam que esses parasitas dispõem de um contexto de metilação no transcriptoma associados a essa modificação.

Existem dois genes homólogos de NSUN2 no genoma de *L. mexicana*, com cópias localizadas em cromossomos diferentes, e para estes também foram feitas tentativas independentes de deleção das duas cópias desses genes (NSUN2 36.2170) e (NSUN2 08_29.2540). Diferentemente do observado para TRMT6/TRMT61A, foi possível obter linhagens com a deleção das duas cópias para cada homólogo individual, e, apesar da dupla deleção gênica, as curvas de crescimento dessas linhagens não apresentaram efeitos no crescimento.

Também utilizando a metodologia de CRISPR/Cas, o gene da NSUN2 foi nocauteado em *Plasmodium yoelii* com sucesso na obtenção de DKO sem efeitos aparentes no crescimento (LIU et al, 2022). Apesar desses achados

darem suporte aos nossos resultados, vale ressaltar, que existe uma diferença, porque *Plasmodium yoelli* contém apenas um gene para NSUN2 e a *L. mexicana* é diploide e contém dois genes de NSUN2 com domínios conservados para atividade de metiltransferase (MARAN et al., 2021) então há uma possibilidade que mesmo com o DKO que obtivemos em um gene, o outro gene relacionado que não foi deletado possa estar complementando a função. Portanto, mais investigações são necessárias para estabelecer de forma mais precisa sobre a essencialidade desses genes em *Leishmania*.

Por meio da análise de enriquecimento, observamos uma frequência de termos relacionados a metabolismo de nucleotídeos presente nas linhagens ao qual a NSUN2 foi deletada. Entre os genes impactados estão ID LmjF.04.0280 adenosina monofosfato e ID LmjF.06.0860 timidilato sintase. Os nucleotídeos são fundamentais para diversos processos biológicos e estão sendo sintetizados constantemente, como por exemplo, quando as células proliferam e necessitam da síntese de nucleotídeos para a replicação de DNA e produção dos RNAs (WARNER et al., 2014). Apesar desse resultado diferir do que os trabalhos mostram de mais comum quanto a função m⁵C, que inclui a estabilização de mRNA, aumento na meia-vida, e exportação dos transcritos para tradução no citoplasma (YANG et al., 2017); (ROUDTREEN et al., 2017); (ZHÃO et al., 2016) nosso achado indica que de alguma forma, ao qual precisa ser explorada, a ausência da modificação química m⁵A via falta do homólogo NSUN2 que adiciona essa modificação causa algum efeito em aspectos associados à síntese dos nucleotídeos na espécie estudada.

Novos estudos fazendo deleções simultâneas para os dois genes codificantes de NSUN2 em uma única rodada de transfecção deverão ser conduzidos para obter uma informação mais precisa sobre a essencialidade desses genes. Assim como, novas tentativas de nocaute para o gene da TRMT6 já que não confirmamos linhagem com indicativo de nocaute. Além disso, será importante realizar novas curvas de crescimento para as linhagens mutantes em condições de estresse para observar algum impacto no fenótipo. Caracterizar funcionalmente essas proteínas com intuito de identificar com quais parceiros essas proteínas interagem em *L. mexicana*.

Referências

- Aslam, M., Huang, X., Yan, M., She, Z., Lu, X., Fakher, B., Chen, Y., Li, G., & Qin, Y. (2022). TRM61 is essential for Arabidopsis embryo and endosperm development. *Plant Reproduction*, 35(1), 31–46. <https://doi.org/10.1007/s00497-021-00428-x>
- Coots, R. A., Liu, X. M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., & Qian, S. B. (2017). m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Molecular Cell*, 68(3), 504-514.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>
- Designed Research; G, Q. Z. G., & Performed Research; M, Y. Z. L. (2022). *The Pennsylvania State University*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110713119/-/DCSupplemental>
- Jin, H., Huo, C., Zhou, T., & Xie, S. (2022). Review m1A RNA Modification in Gene Expression Regulation. In *Genes* (Vol. 13, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13050910>
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., Pestova, T. v., Qian, S. B., & Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>
- Militello, K. T., Chen, L. M., Ackerman, S. E., Mandarano, A. H., & Valentine, E. L. (2014). A map of 5-methylcytosine residues in *Trypanosoma brucei* tRNA revealed by sodium bisulfite sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.12.003>
- Ozanick, S. G., Bujnicki, J. M., Sem, D. S., & Anderson, J. T. (2007). Conserved amino acids in each subunit of the heterologomeric tRNA m1A58 Mtase from *Saccharomyces cerevisiae* contribute to tRNA binding. *Nucleic Acids Research*, 35(20), 6808–6819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm574>
- Blazie SM, Takayanagi-Kiya S, McCulloch KA, Jin Y. Eukaryotic initiation factor EIF-3.G augments mRNA translation efficiency to regulate neuronal activity. *Elife*.

2021 Jul 29;10:e68336. doi: 10.7554/eLife.68336. PMID: 34323215; PMCID: PMC8354637.

Meleppattu S, Kamus-Elimeleh D, Zinoviev A, Cohen-Mor S, Orr I, Shapira

M. The eIF3 complex of Leishmania-subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. Nucleic Acids Res. 2015 Jul 27;43(13):6222-35. doi: 10.1093/nar/gkv564. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26092695; PMCID: PMC4513851.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos recombinantes.

Gene	Sentido	Sequência 5' - 3'
Trmt6 - LmxM.36.5780	<i>Forward</i>	CAAACCGATAGGCATCTTTCGGCATAACCCA gtataatgcagacctgtgc
	<i>Reverse</i>	TACAGAGCGGAAGAGGTGCATGGGGCGCAC ccaatttgagagacctgtgc
Trmt61A- LmxM.28.2400	<i>Forward</i>	CGCCGACTCCCCCGGCTCGTTCACTATC gtataatgcagacctgtgc
	<i>Reverse</i>	GGGCGAGCGCGCTTAGAGAATGCAGAAAGA ccaatttgagagacctgtgc
Nsun2-LmxM.08_29.2540	<i>Forward</i>	AAGCACACGCGGCGTGTCTTCCGGAGTCCC gtataatgcagacctgtgc
	<i>Reverse</i>	GAGAGAGGCGGTTGGAGATGCGCCGTGCCA ccaatttgagagacctgtgc
Nsun2-LmxM.36.2170	<i>Forward</i>	CACACCTGCACCGAACACATCTGCGTGAC gtataatgcagacctgtgc
	<i>Reverse</i>	GGGGGCGTGGGGGCGTCGCTATTCAGCCCC ccaatttgagagacctgtgc

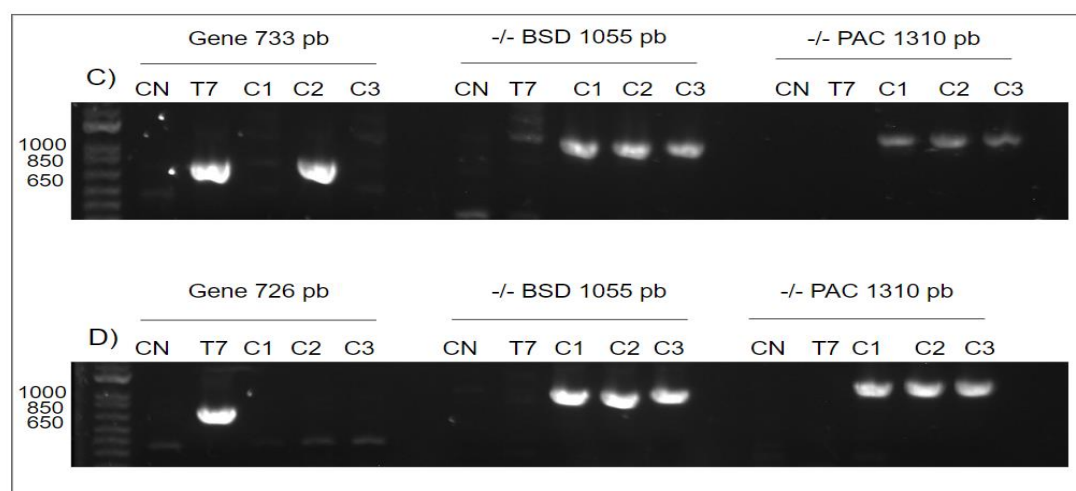
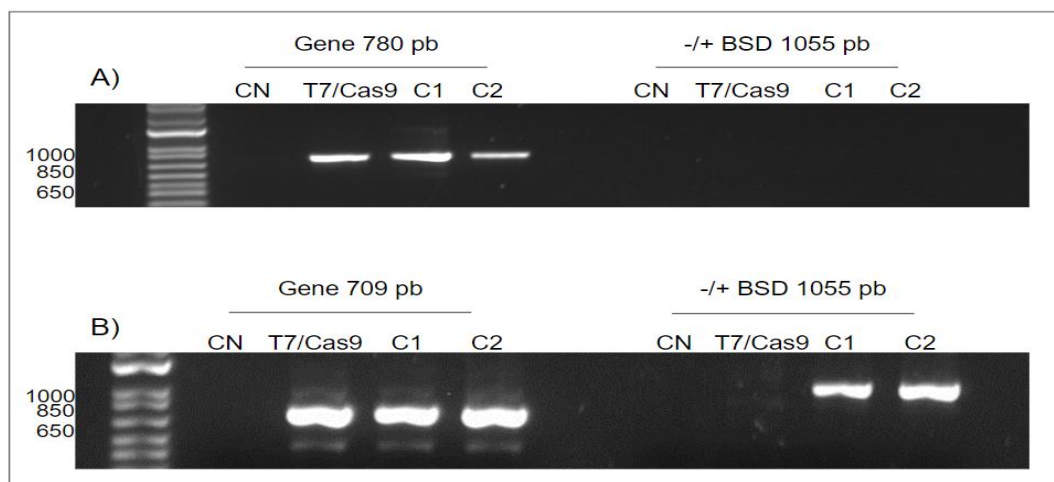
Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cassetes de RNA guia.

Gene	Sentido	Sequência
sgRNA universal	Reverse	aaaagcaccgactcggcgccactttttcaagttgataacggactagcctt atTTaacttgctatttctagctctaaaac
5'sgRNA - LmxM.36. 5780	Forward	gaaattaatac gactcactataggCGACGTCACA ACTTCTGATC gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA - LmxM.36. 5780	Forward	gaaattaatac gactcactataggGGCGGGACGCAGAAAGAGCAT gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA - LmxM.28.2400	Forward	gaaattaatac gactcactataggTGTGTGCGCGTTGACGCGAG gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA - LmxM.28.2400	Forward	gaaattaatac gactcactataggGAGAGCGAGAGACGGCGACA gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA- LmxM.08_29.2540	Forward	gaaattaatac gactcactataggGCTACCAACTCAGAGAGGAA gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA- LmxM.08_29.2540	Forward	gaaattaatac gactcactataggAAAGACGACCAATGCAGCAG gttttagagctagaaatagc
5'sgRNA-LmxM.36.2170	Forward	gaaattaatac gactcactataggACGCACGGCGCGGTAATTGA gttttagagctagaaatagc
3'sgRNA-LmxM.36.2170	Forward	gaaattaatac gactcactataggCAGCAGTGAGGTTCTTTTCC gttttagagctagaaatagc

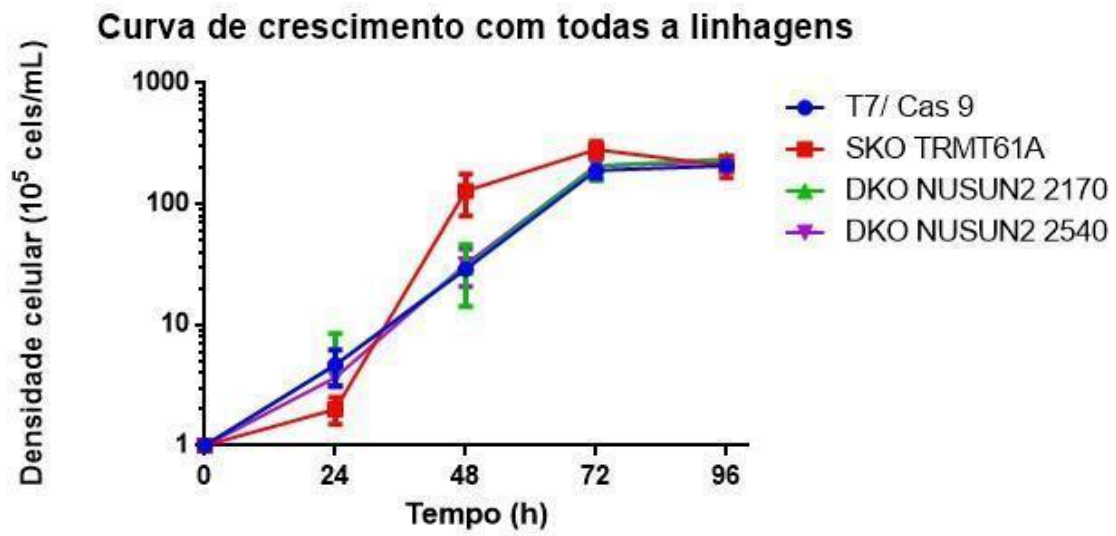
Fonte: A autora, 2022.

Figura 1 – PCRs de confirmação das linhagens nocauteadas.

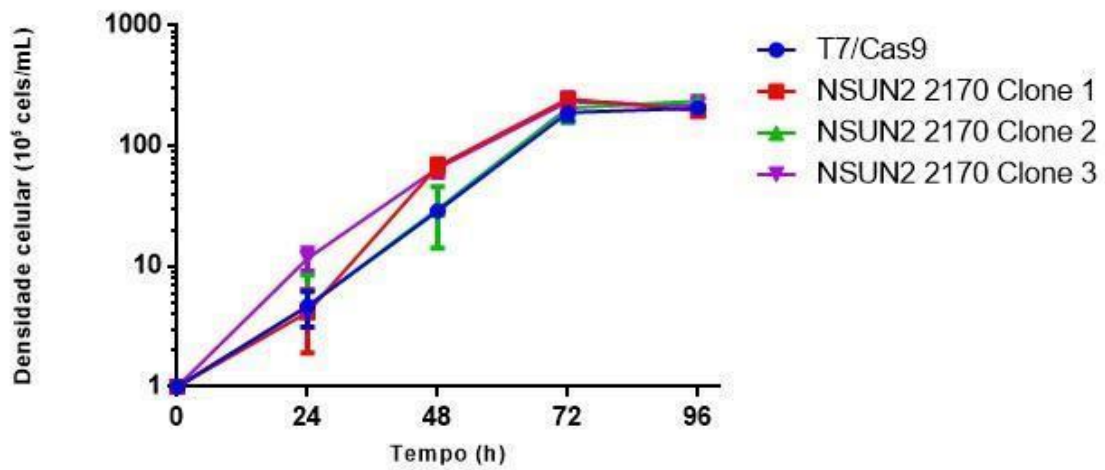


Amplificação do gene de TRMT6 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastidina. B: Amplificação do gene de TRMT61A e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastidina. C: Amplificação do gene de NSUS2 2170 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastidina e puomicina. D: Amplificação do gene de NSUS2 2540 e do fragmento recombinante com marca de seleção para blastidina e puomicina. Fonte: A Autora, 2022.

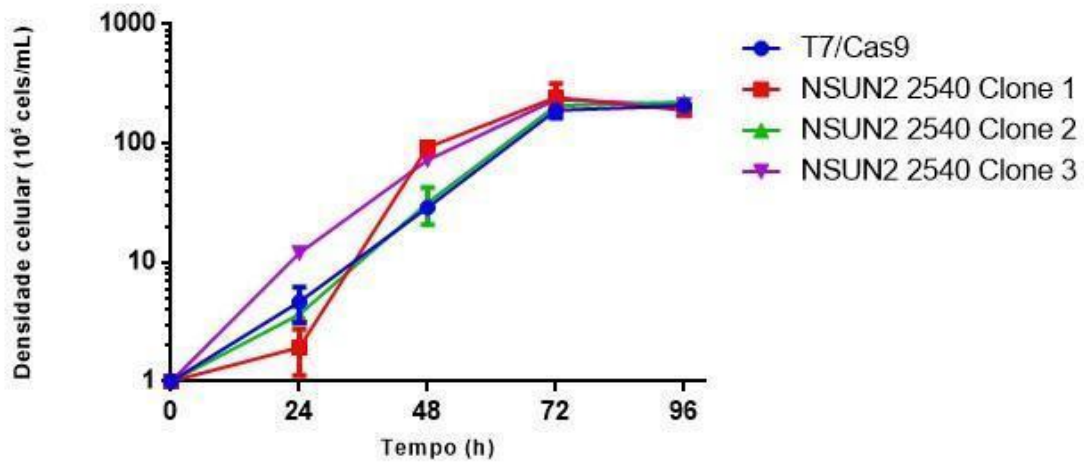
Figura 2 – Curvas de crescimento das linhagens nocauteadas.



Curva de crescimento *L.mexicana* linhagem Nsun2 2170 C1,C2 e C3.

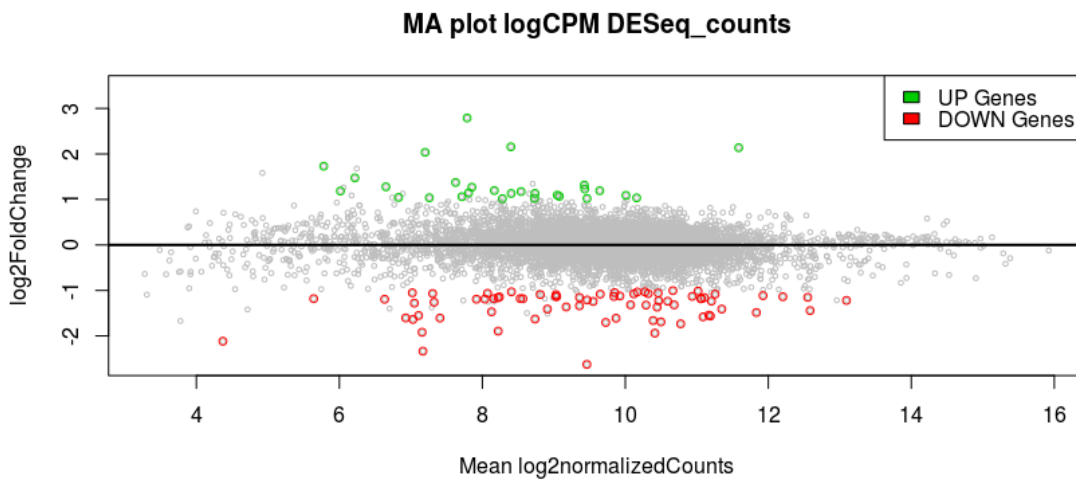


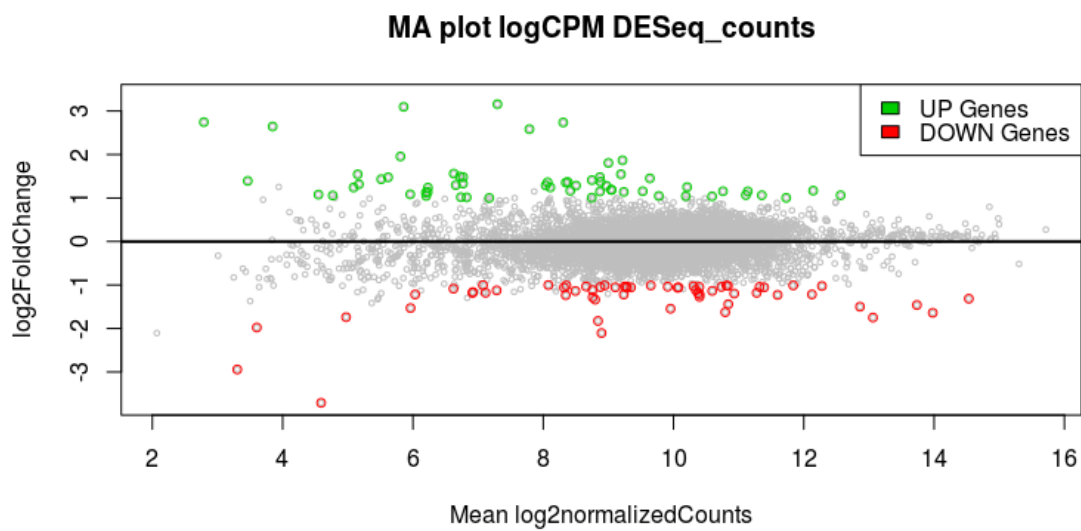
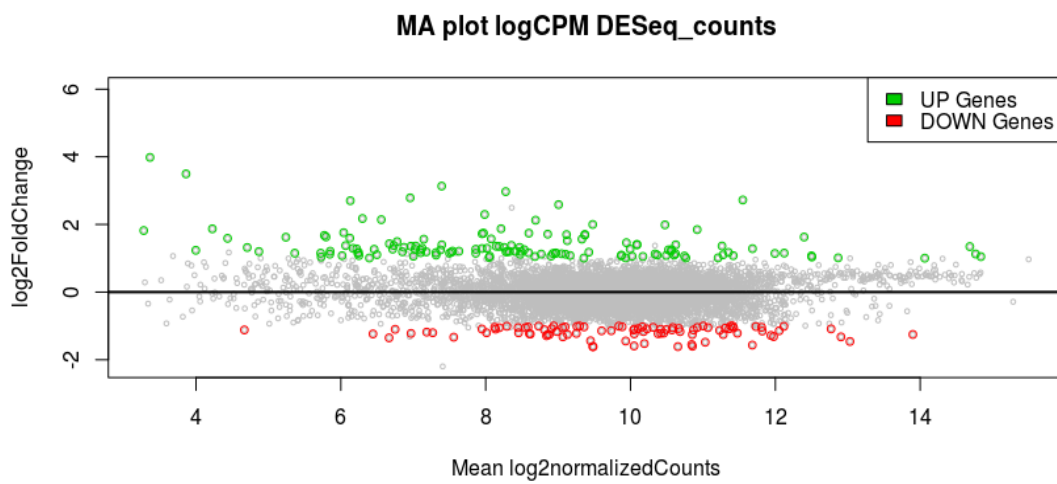
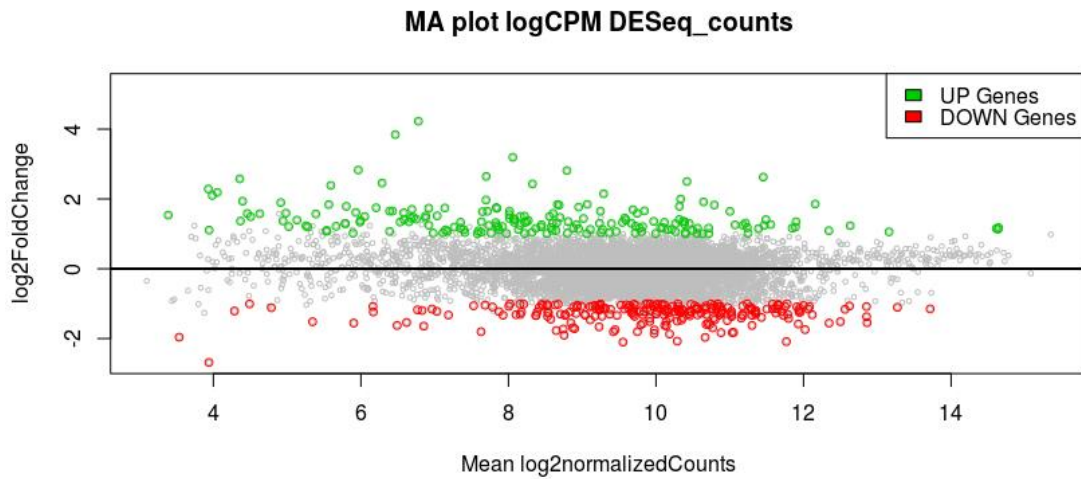
Curva de crescimento *L.mexicana* linhagem Nsun2 2540 C1,C2 e C3.



Curvas em triplicata com valores de densidade celular plotados a partir de contagem a cada 24 horas, do momento 0 a 96 horas. Cada uma das linhagens é representada por suas respectivas cores e formas, conforme legenda do gráfico. Fonte: A autora, 2022.

Figura 3 - MA plot de genes expressos diferencialmente.





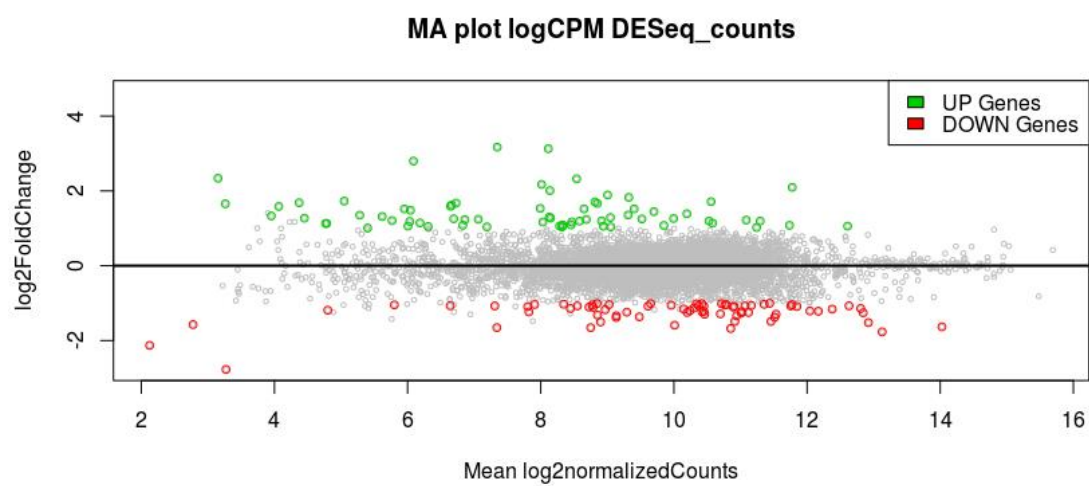
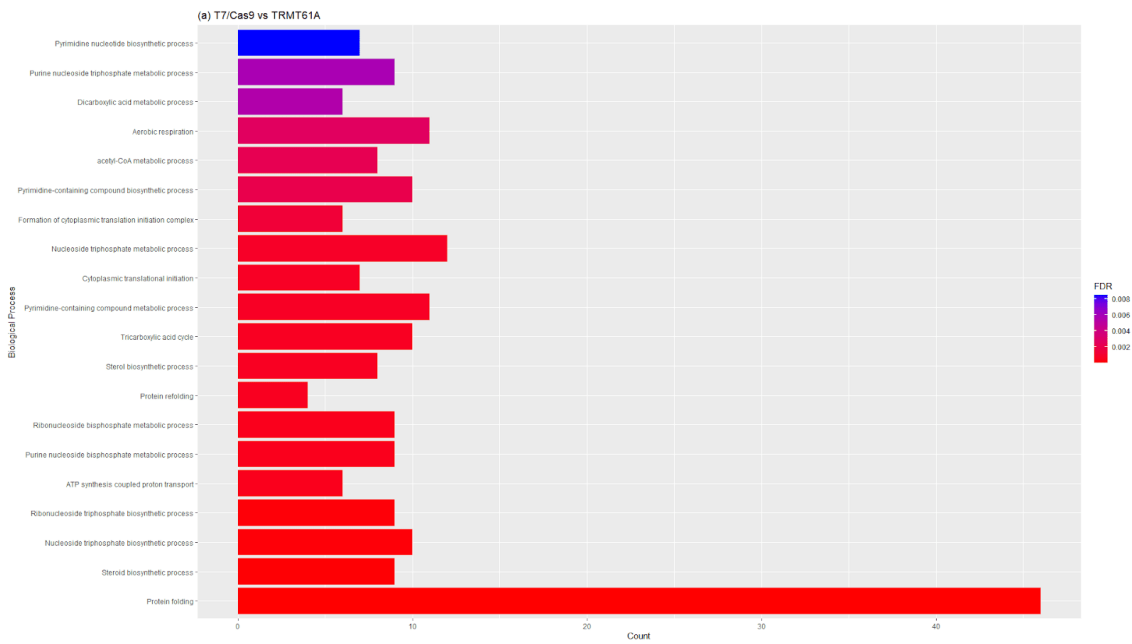
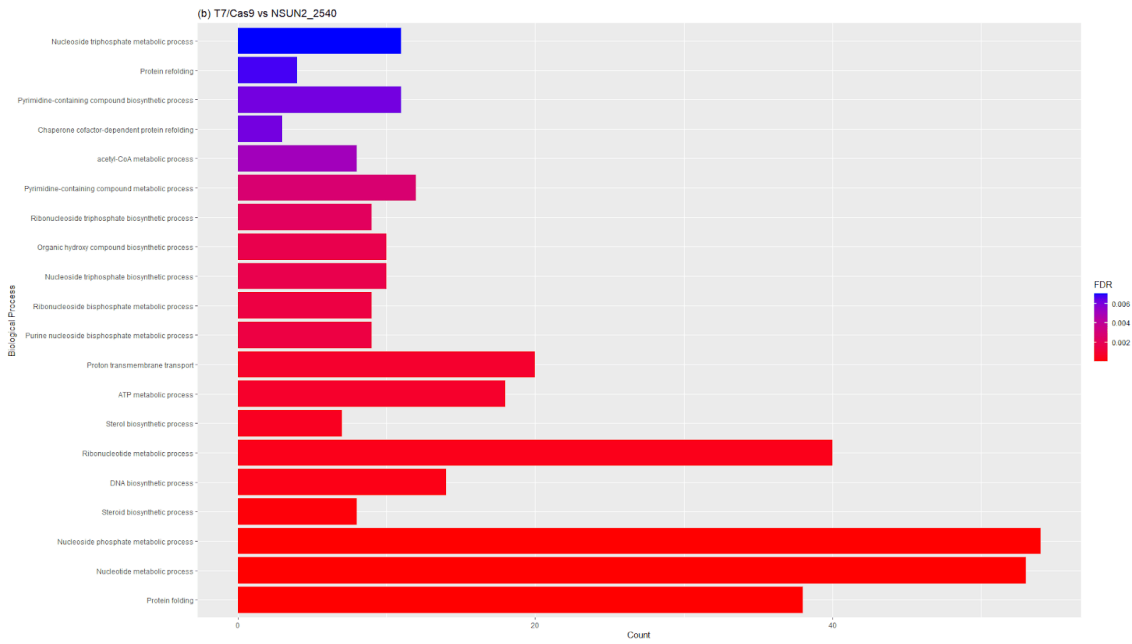
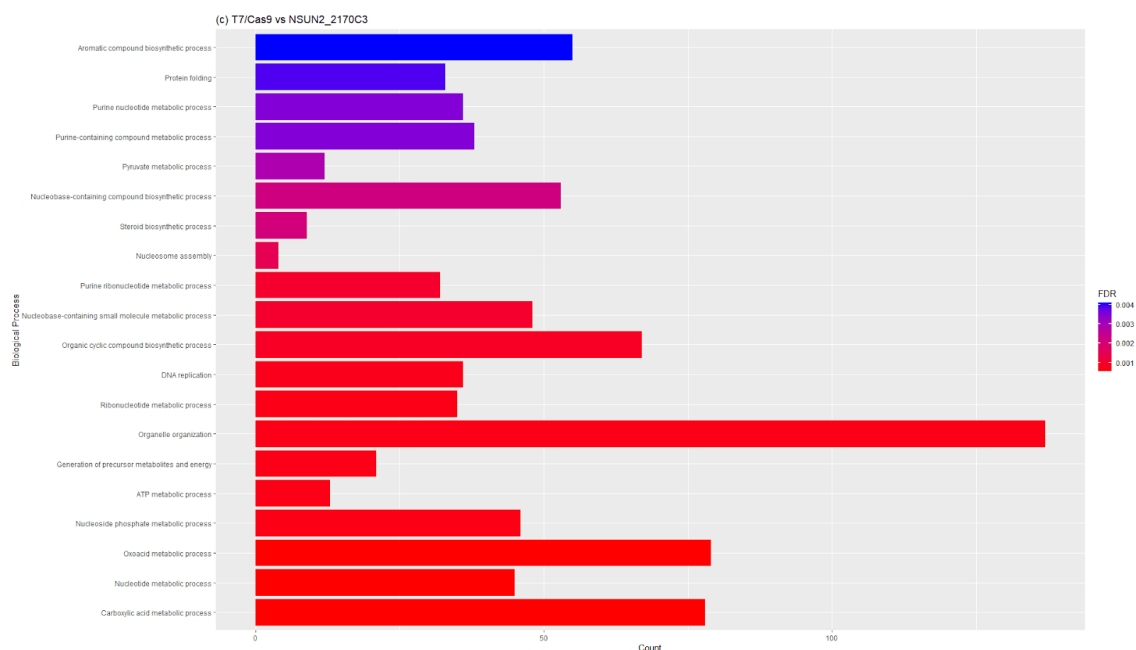


Figura 4- Gráficos da análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos.





a) Análise de enriquecimento da condição T7/Cas9 vs TRMT61A. b) Análise de enriquecimento da condição T7/Cas9 vs a linhagem TRMT61A. c) Análise de enriquecimento T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2540. d) Análise de enriquecimento T7/Cas9 vs a linhagem NSUN2 2170C3 Fonte: A autora, 2022.

Tabela 8 - Genes associados aos GO termos enriquecidos aos processos biológicos das condições analisadas.

Condição avaliada	ID Gene	Descrição
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmjF.36.3880	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade i
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmjF.36.6980	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade 8
T7/Cas9 vs TRMT61A	LmjF.30.3040	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade 7
	LmjF.26.0460	ATPase subunidade 9
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmjF.18.0020	Mevalonato-difosfato descarboxilase putativa
T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmjF.25.1180	Subunidade beta da atpase transportadora de h+ tipo F

T7/Cas9 vs NSUN2 2540	LmjF.24.2110	Proteína hipotética
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmjF.24.2110	Proteína hipotética
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmjF.25.1180	Kinase adenosina
T7/Cas9 vs NSUN2 2170 C3	LmjF.25.1180	Subunidade beta da atpase transportadora de h+ tipo F
