UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGENICOS

LAYS ADRIANNE MENDONÇA TRAJANO SILVA

Caracterização funcional das proteínas gigantes tipo calpaína-like presente na
região do FAZ de *Trypanosoma cruzi* usando o sistema CRISPR/Cas9

Ribeirão Preto

2021

LAYS ADRIANNE MENDONÇA TRAJANO SILVA

Caracterização funcional das proteínas gigantes tipo calpaína-like presente na região do FAZ de *Trypanosoma cruzi* usando o sistema CRISPR/Cas9

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a Dr^a Munira Muhammad Abdel Baqui

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Trajano-Silva, Lays Adrienne Mendonça.

Caracterização funcional das proteínas gigantes tipo calpaína-like presente na região do FAZ de *Trypanosoma cruzi* usando o sistema CRISPR/Cas9. Ribeirão Preto, 2021.

116p : il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Munira Muhammad Abdel Baqui

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Proteínas gigantes. 3. Citoesqueleto. 4. CRISPR/Cas9.

TRAJANO-SILVA, L. A. M. **Caracterização funcional das proteínas gigantes tipo calpaína-like presente na região do FAZ de *Trypanosoma cruzi* usando o sistema CRISPR/Cas9.** 2021. 116 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

TRAJANO-SILVA, L. A. M. **Caracterização funcional das proteínas gigantes tipo calpaína-like presente na região do FAZ de *Trypanosoma cruzi* usando o sistema CRISPR/Cas9**. 2021. 116 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário unicelular que possui características biológicas e genômicas únicas. Atualmente, dois medicamentos possuem eficácia comprovada apenas na fase aguda da doença, e por não existir vacinas, a busca por métodos que possibilitem novas terapêuticas são necessárias. Neste contexto, o estudo da biologia do parasito contribui para elucidar mecanismos pelo qual o *T. cruzi* consegue sobreviver aos mais variados ambientes, e desta forma identificar alvos que podem ser utilizados como vias terapêuticas. Na família *Trypanosomatidae* foi descrita a presença de proteínas de alta massa molecular localizadas na Zona de Adesão Flagelar (FAZ) com papel importante na manutenção da forma, organização e proliferação celular. Neste contexto, proteínas gigantes (PGs) foram identificadas na região do FAZ em tripanossomatídeos, sendo caracterizadas principalmente em *T. brucei*. No entanto, em *T. cruzi* as PGs permanecem não caracterizadas. Através de espectrometria de massas (MS), identificamos seis proteínas de alta massa molecular presentes na fração do citoesqueleto de *T. cruzi*. Com 18 hits, a proteína gigante tipo Calpain-like cisteína peptidase (denominada de ClpGP), de 13.716pb, presente no cromossomo 39, haplótipo Non-Esmeraldo-like do *T. cruzi* CL Brener, foi escolhida para seguir com os estudos funcionais. Portanto, este projeto teve como objetivo de caracterizar o papel funcional da ClpGP presente no citoesqueleto de *T. cruzi*. Para analisar a distribuição da ClpGP no *T. cruzi* CL Brener epimastigota, produzimos anticorpos específicos utilizando a proteína recombinante e um peptídeo sintético, ambos construídos na região N-terminal da proteína. As análises por microscopia confocal demonstraram a localização desta proteína na região do FAZ, na porção do corpo celular, denominado de domínio FAZ intracelular. Com a recente utilização do sistema de edição gênica por CRISPR/Cas9 em tripanossomatídeos, tornou-se possível

o estudo funcional de proteínas em *T. cruzi*. O RNA guia (sgRNA) desenhado para a ClpGP também reconheceu quatro genes de Clp presentes no cromossomo 39, mas no haplótipo Esmeraldo-like. A estratégia utilizada neste estudo foi capaz de promover a edição dos cinco genes presentes nos dois haplótipos de *T. cruzi* CL Brener de uma única vez. O nocaute dos genes da Clp no *T. cruzi*, forma epimastigota, promoveu um encurtamento do corpo celular, produzindo formas semelhantes a promastigota. Além disso, foi observado mudanças na organização celular, acúmulo de microtúbulos subpeliculares e defeitos no bolso flagelar. As modificações após o nocaute não afetaram a proliferação celular dos parasitas mutantes, quando comparados ao controle. Usando o anticorpo anti-TcFAZ, que reconhece um grupo de PGs (acima de 1000kDa) presentes no FAZ, observamos que o mutante não apresenta marcação na região do FAZ em ensaios de microscopia confocal e nem por *western blotting*. A edição de cinco genes alvos, pertencentes a mesma família de proteínas, é inédito em tripanossomatídeos. Nossos resultados sugerem que as Clps podem ter um papel na manutenção e organização celular da forma epimastigota em *T. cruzi*. Também nossos dados indicam que as Clps podem estar envolvidas na mudança de forma do parasita durante o ciclo de vida, podendo ter um papel chave na adaptação e sobrevivência do parasita em seus hospedeiros. Estes achados podem fornecer respostas sobre o modo de vida do *T. cruzi* e poderá futuramente auxiliar no desenvolvimento de novas drogas alvos para combater à doença.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Proteínas gigantes; Citoesqueleto; CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

TRAJANO-SILVA, L. A. M. **Functional characterization of Calpain-like giant proteins at the FAZ region of *Trypanosoma cruzi* by CRISPR/Cas9 system.** 2021. 116 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is a unicellular protozoan with unique biological and genomic characteristics. Currently, two drugs have proven efficacy only in the acute phase of the disease, and as there are no vaccines, the search for methods that enable new therapies is necessary. In this context, the study of the parasite's biology contributes to elucidate the mechanisms by which *T. cruzi* survives in the most varied environments and thus identify targets that can be used as therapeutic pathways. In the *Trypanosomatidae* family, the presence of high molecular mass proteins located in the Flagellar Adhesion Zone (FAZ) has been described, with an essential role in the maintenance of cell shape, organization, and proliferation. In this context, giant proteins (GPs) were identified in the FAZ region in trypanosomatids, being characterized mainly in *T. brucei*. However, in *T. cruzi*, the GPs remain uncharacterized. Through mass spectrometry (MS), we identified six high molecular mass proteins present in the cytoskeletal fraction of *T. cruzi*. With 18 hits, the giant protein Calpain-like cysteine peptidase (called ClpGP), of 13,716bp, present on chromosome 39 in Non-Esmeraldo-like haplotype of *T. cruzi* CL Brener, was chosen to continue with the functional studies. Therefore, this project aimed to characterize the functional role of ClpGP present in the cytoskeleton of *T. cruzi*. To analyze the distribution of ClpGP in the *T. cruzi* CL Brener epimastigote, we produced specific antibodies using the recombinant protein and a synthetic peptide, both built in the N-terminal region of the protein. Analysis by confocal microscopy demonstrated the location of this protein in the FAZ region, in the portion of the cell body, called the intracellular FAZ domain. With the recent use of the CRISPR/Cas9 gene editing system in trypanosomatids, the functional study of proteins in *T. cruzi* became possible. The guide RNA (sgRNA) designed for ClpGP also recognized four Clp genes present on chromosome 39 but in the Esmeraldo-like haplotype. The strategy used in this study was able to promote

the editing of the five genes present in the two *T. cruzi* CL Brener haplotypes at once. The knockout of the Clp genes in *T. cruzi*, an epimastigote form, caused a shortening of the cell body, producing promastigote-like forms. Furthermore, changes in cell organization, accumulation of subpellicular microtubules, and defects in the flagellar pocket were observed. However, the modifications after the knockout did not affect the cell proliferation in the mutant parasites compared to the control. Using the anti-TcFAZ antibody, which recognizes a group of GPs (above 1000kDa) present in the FAZ, we observed that the mutant does not present labeling in the FAZ region in the confocal microscopy assays or by western blotting. The editing of five target genes belonging to the same protein family is unprecedented in trypanosomatids. Our results suggest that Clps may play a role in maintaining and cellular organization of the epimastigote form in *T. cruzi*. Our data also indicate that Clps may present function in the parasite morphology during the life cycle and may play a key role in its host adaptation and survival. These findings may provide answers about the way of life of *T. cruzi* and may help in the development of new target drugs to fight the disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; Giant proteins; Cytoskeleton; CRISPR/Cas9