BERNARDO PEREIRA MOREIRA

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei*

Ribeirão Preto
2016

BERNARDO PEREIRA MOREIRA

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei*

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

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

Ribeirão Preto
2016

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.

Moreira, Bernardo Pereira.

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei*. Ribeirão Preto, 2016.

178 p : il. ; 30 cm

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

Orientador: Muhammad Abdel Baqui, Munira.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. Proteínas gigantes. 3. Citoesqueleto. 4. RNA de interferência.

MOREIRA, B. P. **Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei***. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos brasileiros e brasileiras que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profª. Munira M. A. Baqui, pela oportunidade de trabalhar no laboratório e pela orientação durante o curso;

Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e a todos professores que contribuíram para o meu crescimento profissional;

Aos amigos do laboratório: Lígia Carolina, Camila Ferezin e Camila Gachet pela amizade, companheirismo, e discussões no desenvolvimento do projeto;

À técnica do laboratório, Carol Kobori, pela amizade e todos serviços prestados;

A todos os técnicos do departamento que auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos deste trabalho, em especial à Elizabete Rosa Milani pelos ensinamentos de microscopia;

Aos amigos e companheiros de outros laboratórios do departamento pelo apoio e amizade;

Às secretárias Gabriela, Camila, Lúcia e demais funcionários pelo auxílio e serviços prestados durante todo o doutorado;

À Drª Tansy Hammarton pela orientação durante meu doutorado sanduiche na Escócia;

À FAPESP, CNPq, CAPES e FAEPA pelas bolsas de estudo e pelo suporte financeiro;

À Camilla, pelo carinho e apoio durante todos esses anos e pela assistência durante o desenvolvimento do projeto;

À minha mãe, meu pai e minha irmã pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões tomadas;

Aos que não citei, as razões do esquecimento são tantas e, certamente, alheias ao meu profundo agradecimento pelas suas contribuições.

Science is more than a body of knowledge. It is a way of thinking...

Carl Sagan

Resumo

MOREIRA, B. P. **Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei***. 2016. 178 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da Tripanossomíase Africana Humana. Este protozoário é um parasita extracelular que possui um único flagelo e um citoesqueleto de alta estabilidade, responsável por vários processos celulares como motilidade, morfologia, infectividade e divisão celular. Em todos os gêneros da família Trypanosomatidae foram descritas proteínas de alto peso molecular (500-3500 kDa) as quais, além do papel estrutural, podem estar envolvidas na organização e regulação do citoesqueleto e seus constituintes. Este projeto teve como objetivo caracterizar no âmbito celular, bioquímico e molecular as proteínas gigantes de *T. brucei* e determinar os seus papéis funcionais na biologia do parasito. A partir do isolamento do citoesqueleto de *T. brucei* e análise por SDS-PAGE, produzimos anticorpos contra as proteínas gigantes que serviu como ferramenta para realização de *Western Blotting* (WB) e imunofluorescência no estudo das propriedades moleculares destas proteínas. O sequenciamento por espectrometria de massas foi utilizado para determinação da sequência primária parcial destas proteínas e identificação dos genes em no banco de dados TriTrypDB. Aqui, mostramos que as proteínas de alta massa molecular se localizam em estruturas essenciais para a regulação do citoesqueleto como na zona de adesão flagelar (FAZ), bem como no complexo tripartido responsável pela adesão do flagelo ao cinetoplasto. A espectrometria de massas revelou 19 novas proteínas de alta massa molecular ainda não estudadas em *T. brucei* dentre as quais 2 foram caracterizadas funcionalmente: FAZ10 e Tb927.8.3540. Para investigar os seus papeis biológicos utilizamos o modelo de silenciamento gênico por RNA de interferência. O silenciamento da proteína FAZ10 levou ao destacamento do flagelo, ao reposicionamento incorreto dos núcleos e cinetoplastos, e mais importante ao erro na definição do local de ingressão do sulco de clivagem durante a citocinese, em formas procíclicas e sanguícolas de *T. brucei*. Por sua vez, a proteína Tb927.8.3540 é responsável pela estabilização do citoesqueleto de microtúbulos e formação do FAZ e flagelo. Quando ausente nas células, estas adquirem um formato esférico com a presença de um flagelo internalizado. Em ambos os casos, as células induzidas apresentam inibição da proliferação celular e o acúmulo de células multinucleadas na cultura. O estudo funcional das proteínas gigantes revelou que elas possuem um papel central na morfogênese do *T. brucei*, agindo diretamente na organização e formação de estruturas do citoesqueleto, na manutenção da adesão flagelar, e no direcionamento da citocinese.

Palavras chave: *Trypanosoma brucei*. Proteínas gigantes. Citoesqueleto.

Abstract

MOREIRA, B. P. **Cellular and molecular characterization of *Trypanosoma brucei* cytoskeletal giant proteins**. 2016. 178 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Trypanosoma brucei, the causative agent of sleeping sickness or Human African Trypanosomiasis (HAT), has been used as experimental model for cellular, biochemical and molecular studies. This is an extracellular protozoan parasite that has a single flagellum and a highly stable cytoskeleton, responsible for many cellular processes such as motility, morphology, infectivity and cell division. In Trypanosomatidae family, a novel class of High Molecular Weight Proteins (HMWPs; 500-3500 kDa) has been described, which besides their structural role, may play a role in cytoskeleton organization and regulation. Trypanosomatids cytoskeletons contain abundant HMWPs, but many of their biological functions are still unclear. Here, we aimed to describe the cellular and molecular properties of these proteins, and to determine their functional roles in the parasite biology. SDS-PAGE was used to analyze *T. brucei* cytoskeletons. Also, the HMWP bands were injected in mouse in order to produce polyclonal antibodies, which were used as a molecular tool in Western Blotting (WB) and immunofluorescence analysis. Here we show that the high molecular weight proteins are located on essential structures for the regulation of the cytoskeleton such as the flagellar adhesion zone (FAZ) and the tripartite complex, which connects the flagellum to the kinetoplast. Detergent-extracted cytoskeletons were also analyzed by gradient SDS-PAGE and the HMWP bands were sent to mass spectrometry analysis. We able to identify 19 new high molecular weight proteins most of which are uncharacterized so far in *T. brucei*. Here, we report the characterization of two giant proteins: FAZ10 and Tb927.8.3540. To investigate their biological roles we used a model of gene silencing by RNA interference (RNAi). Our data showed that FAZ10 is an essential giant cytoskeletal protein in both procyclic and bloodstream parasite life cycle stages, since its depletion led to defects in cell morphogenesis, flagellum attachment and kinetoplast and nucleus positioning. More importantly, ablation of FAZ10 impaired the timing and placement of the cleavage furrow during cytokinesis, resulting in premature or asymmetrical cell division. In turn, the Tb927.8.3540 protein is responsible for the stabilization and regulation of the microtubule cytoskeleton as well as the flagellum and FAZ. In its absence, cells acquire a spherical shape together with an internalized flagellum. In both cases, the resulting phenotype results in inhibition of cell proliferation and accumulation of multinucleated cells in culture. The functional study of the giant proteins revealed that they have a central role in morphogenesis of *T. brucei*, acting directly on the organization and regulation of cytoskeletal structures, such as the flagellum and the FAZ.

Keywords: *Trypanosoma brucei*. Giant proteins. Cytoskeleton.

Lista de Figuras

Figura 1: [A] Representação esquemática da distribuição do *Trypanosoma brucei gambiense* (em verde) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (em vermelho) na África subsaariana. Reproduzido de KENNEDY (2013). [B] Número de casos de THA registrados na África entre 1940 e 2010. Adaptado de LEJON; BENTIVOGLIO e FRANCO (2013). 17

Figura 2: Formas tripomastigotas do *T. b. rhodesiense* em lâmina de esfregaço de sangue periférico. Fotografia de Jean Jannin (WHO/CPE). 19

Figura 3: Morfotipos básicos dos tripanossomatídeos, que servem como parâmetro para a classificação taxonômica do grupo. A – amastigota, EN – endomastigota, C – coanomastigota, OM – opistomastigota, P – promastigota, O – opistomorfo, E – epimastigota e T – tripomastigota. Reproduzido de MASLOV et al. (2013). 22

Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. Imagem de Alexander J. de Silva e Melanie Moser da Biblioteca Pública de Imagens de Saúde do Centro de Controle de Doenças (CDC). 24

Figura 5: Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*. Representação simplificada das principais organelas presente nesta célula: 1. Núcleo, 2. Cinetoplasto, 3. Bolso flagelar, 4. Corpo basal e corpúsculo pró-basal, 5. Flagelo, 6. Golgi, 7. Lisossomo, 8. Endossomos, 9. Mitocôndria, 10. Citoesqueleto de microtúbulos e 11. Glicossomos. Adaptado de MATTHEWS (2005). 27

Figura 6: Morfologia ultra estrutural do *Trypanosoma brucei*. [A-D] Seções ultrafinas do *T. brucei* visualizado por microscopia eletrônica de transmissão. N – núcleo, K – cinetoplasto, BF – bolso flagelar, AXO – axonema, CBF – colar do bolso flagelar. Elaborado pelo autor. 29

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão do citoesqueleto de *T. brucei* após extração com detergente. FG – flagelo, spMT – microtúbulos subpeliculares, N – núcleo, BB – corpo basal, FAZ – zona de adesão flagelar. Elaborado pelo autor. 31

Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do flagelo isolado de *T. brucei*. AXO – Axonema, BB – corpo basal, TZ – zona de transição, PFR – bastão paraflagelar. Adaptado de SUBOTA et al. (2014). 32

Figura 9: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal do flagelo de *T. brucei* [A] e esquema ilustrativo dos domínios do PFR [B]. PD – domínio proximal; ID – domínio intermediário; DD – domínio distal. Adaptado de PORTMAN e GULL (2010). 33

Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de seções ultrafinas de *T. brucei* evidenciando o flagelo e a zona de adesão flagelar cortados longitudinalmente [A] ou transversalmente [B]. Setas brancas [A] indicam os complexos juncionais presentes ao longo do FAZ. AXO – axonema; PFR – bastão paraflagelar; FAZ – zona de adesão flagelar; spMT – Microtúbulos subpeliculares. Elaborado pelo autor [A] ou adaptado de SUNTER e GULL (2016) [B]. 35

Figura 11: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do citoesqueleto de diversos membros da família Trypanosomatidae. M – miofibrila como marcador padrão. Setas brancas indicam as proteínas gigantes. Adaptado de BAQUI et al. (2000b). 38

Figura 12: Mapa circular do vetor plasmideal pGEX-4T-1. As clonagem foram feitas na região *poli-linker in frame* com a sequência codante da GST. 54

Figura 13: Esquema do vetor pNATx^{TAG} com os sítios de restrição disponíveis para clonagem do fragmento de interesse na região X. 55

Figura 14: [A] Mapa esquemático do vetor p2T7-177. O vetor contém dois promotores T7 regulados pelo operador da tetraciclina (TetO), uma região 177 (177-targeting) com sítio único de clivagem por NotI, o gene de resistência a ampicilina (AmpR), e o marcador de seleção fleomicina (BLEO). [B] Desenho do background genético da linhagem 29-13 contendo a T7RNAP e a TETR selecionados por NEO e HYG, respectivamente. [C] Esquema do operador da tetraciclina: o repressor TetR se liga no sítio TetO inibindo a transcrição do gene de interesse pela T7 RNAP. Na presença de tetraciclina ou doxiciclina, esta se liga ao repressor tetR inibindo sua ligação ao promotor tetO que permanece livre permitindo a transcrição pela T7RNAP. 58

Figura 15: Desenho experimental do método de diluição limitante. Para cada transfecção, foram feitas duas diluições (200 células/mL e 5 células/mL) que foram plaqueadas e incubadas em cultura por pelo menos duas semanas. Os clones isolados foram congelados e analisados independentemente. 61

Figura 16: Placa de cultura de 96 poços após método de diluição limitante das células transfectadas. Após 2 semanas, alguns poços apresentaram crescimento (amarelo) e estes clones foram transferidos para garrafas de cultura e congelados. 61

Figura 17: Proteínas gigantes do citoesqueleto total de *T. brucei* PCF analisado por SDS-PAGE. [A] Foi adicionado em cada canaleta a quantidade de proteína referente a 1-3x10^7 parasitos. M - marcador proveniente da miofibrila de músculo esquelético de coelho. Corado com *Coomassie blue*. [B] WB da amostra do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 e revelado com peroxidase HRP conjugado ao anticorpo secundário..... 67

Figura 18: Detecção das proteínas de alto peso molecular nas frações do citoesqueleto de *T. brucei*. [A] Representação básica do protocolo de obtenção das frações do citoesqueleto. [B] SDS-PAGE em gel de gradiente 2,5%-12,5% das frações do citoesqueleto. M – marcador, S1 – sobrenadante da lise celular, P1 – citoesqueleto, S2 – fração solúvel em 1M NaCl, F1 – flagelo. Corado com *Coomassie blue*. [C-D] WB das amostras produzidas em [B] usando anti-PG1 ou anti-PG2. 68

Figura 19: Avaliação da reatividade e especificidade dos antissoros produzidos contra as proteínas de alta massa molecular. [A] Solubilização do citoesqueleto total de *T. brucei* para ensaio de imunoprecipitação. WB foi utilizado para confirmar a solubilização das proteínas usando anticorpos contra as proteínas gigantes (anti-PG1 e anti-PG2), proteína do bastão paraflagelar (anti-PFR) e β-tubulina (anti-βTUB). [B] WB da imunoprecipitação das proteínas gigantes usando anti-PG1 e anti-PG2..... 69

Figura 20: Distribuição celular das proteínas gigantes no citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta das proteínas de alta massa molecular usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizado por microscopia confocal [A] ou microscópio de epifluorescência [B]. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 5 µm. 70

Figura 21: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* BSF usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar núcleo e cinetoplasto. Barra = 5 µm..... 71

Figura 22: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. [A-B] Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG1 e anti-AcetTUB (tubulina acetilada) ou anti-PFR (PFR). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM. [C-D] Imunofluorescência tripla da distribuição da marcação dos anticorpos usados em A e B com avaliação da distribuição de fluorescência na estrutura. A distribuição da fluorescência corresponde ao segmento demarcado pela reta xzy. DAPI foi usado para visualizar os núcleos e os cinetoplastos. [E] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* marcado com anti-PG1 (PG1) e L3B2 (FAZ1). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM. 73

Figura 23: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG2 (verde) e anti-Morn1 (TbMORN1, vermelho) [A, B] ou YL1/2 (tubulina tirosinada, vermelho) [C, D]. Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barra = 10 µM [A, C] e 5 µM [B, D]. 74

Figura 24: Análise da reatividade cruzada dos antissoros anti-PG1 e anti-PG2 em *T. brucei* (Tb) *T. cruzi* (Tc) e *L. major* (Lm). [A] WB das amostras do citoesqueleto usando anti-PG1. [B] WB das amostras do lisado total (S, fração solúvel; P, *pellet*) usando anti-PG2. [C] Imunofluorescência do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm. 76

Figura 25: Propriedades moleculares da proteína gigante FAZ10. [A] Representação esquemática da estrutura da FAZ10. Ela apresenta uma região C-terminal (N-term), duas regiões *coiled-coil* (CC) separadas por uma região central e uma região C-terminal (C-term). [B] Representação da sequência repetitiva consenso presente nas proteínas gigantes de tripanossomas. [C] FAZ10 de *T. brucei* apresenta um único ortólogo em outras espécies de Trypanosoma. As caixas representam regiões repetitivas dentro da sequência e ao lado está representado o tamanho e número destas sequencias. 81

Figura 26: Análise comparativa da sequência da proteína gigante Tb927.8.3540 de *T. brucei* com seus respectivos ortólogos. Essa proteína possui um peptídeo sinal de ancoragem transmembrana, e um domínio C-terminal não citosólico. Os ortólogos encontrados em outros parasitas apresentam estruturas semelhantes como mostrado pelo alinhamento das sequências. 82

Figura 27: Confirmação das clonagens no vetor pGEX-4T-1. O gel mostra bandas correspondente aos tamanhos das regiões N- e C-terminal da FAZ10 e Tb927.8.3540. A reação de digestão enzimática foi realizada com duas enzimas de restrição (EcoRI e XhoI) e as reações foram analisadas em gel 1% agarose. Brometo de etídio foi utilizado para visualização do DNA. O padrão utilizado foi o 1 kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen). 83

Figura 28: Expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST. Lisado total (solúvel e insolúvel) de *E. coli* induzida com ou não com IPTG. Setas indicam as bandas resultantes da indução. Os géis foram corados com *Coomassie blue*. Canaletas: M, Marcador; Ins., Fração insolúvel; S., Fração solúvel. 84

Figura 29: Confirmação da expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto. WB usando anti-GST (1:10000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo. N-term, N-terminal; C-term, C-terminal. 85

Figura 30: Purificação de GST-FAZ10 C-terminal. [A] Análise por SDS-PAGE das frações da purificação por coluna de afinidade da proteína GST-FAZ10 C-terminal visualizado com

Coomassie blue. [B] WB da proteína recombinante usando anti-GST. Canaletas: M - marcador, 0h-2h - lisado sem ou com indução por IPTG, E1-3 - frações de eluição da purificação. 85

Figura 31: Distribuição celular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo especifico (1:50) produzido em camundongo contra as regiões N- e C-terminais da FAZ 10 [A, verde] e Tb927.8.3540 [B, verde]. Núcleos e cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barras = 10 µm. 86

Figura 32: Fracionamento do citoesqueleto de *T. brucei* e análise de WB utilizando anticorpo anti-FAZ10, anti-PFR e anti-βTUB. S1, fração solúvel do lisado celular; P1, citoesqueleto total; S2, fração solúvel do citoesqueleto; P2, flagelo isolado. 87

Figura 33: Imunoprecipitação da proteína FAZ10. Imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-FAZ10, visualizada pelo método de coloração por prata e confirmada por WB usando anti-FAZ10. IP, imunoprecipitação. 87

Figura 34: Fusão da cauda myc às proteínas gigantes. Clonagem de 900 bp da região c-terminal sem o códon de parada da proteína FAZ10 [A, B] e Tb927.8.3540 [C, D]. Os fragmentos (setas) foram amplificados por PCR [A, C], subclonados no vetor pNAT, e a clonagem foi confirmada por digestão enzimática [B, D]. 88

Figura 35: Confirmação das linhagens expressoras das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc. [A, C] WB do lisado total de *T. brucei* 29-13 PCF utilizando anti-myc, anti-FAZ10 e anti-PFR nas linhagens 29-13 e FAZ10:myc [A] ou Tb927.8.3540:myc [C]. [B, D] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* utilizando anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar o núcleo e cinetoplasto. Barras = 5 µm. 89

Figura 36: Imunomarcação do citoesqueleto de T. brucei PCF. As células FAZ10:myc foram preparadas e marcadas com anti-FAZ10 e anti-myc. Os anticorpos secundários conjugados a partículas de ouro utilizados foram anti-IgG de camundongo (15 nm) e anti-IgG de coelho (6 nm). Setas indicam a distribuição coincidente de anti-FAZ10 e anti-myc. Barras = 100 nm. 90

Figura 37: Clonagem dos fragmentos de FAZ10 e Tb927.8.3540 para ensaio de RNAi. [A] Amplificação por PCR dos fragmentos dos genes da FAZ10 (1) e Tb927.8.3540 (2) com tamanhos de 575 e 429 bp (setas), respectivamente. [B] Confirmação da clonagem dos fragmentos (setas) no vetor p2T7-177 por digestão enzimática. (1) p2T7-177+FAZ10; (2) p2T7-177+ Tb927.8.3540. [C] Linearização dos vetores com enzima NotI. (1) p2T7-177+FAZ10, (2) p2T7-177+FAZ10 linearizado, 3 - p2T7-177+Tb927.8.3540 e 4 - p2T7-177+Tb927.8.3540 linearizado. 91

Figura 38: Confirmação do silenciamento da FAZ10. [A] WB usando anti-FAZ10 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. PFR foi usado como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-FAZ10 em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barras = 10 µm. 93

Figura 39: Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína FAZ10. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. Todas as imagens representam células aberrantes observadas a partir de 24 horas após a indução do silenciamento. 94

Figura 40: Avaliação do silenciamento de FAZ10 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou não (-dox) para o silenciamento da FAZ10.

[B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleo (N) e cinetoplasto (K) antes e após a indução do RNAi da FAZ10. 95

Figura 41: Avaliação da adesão flagelar em células PCF de *T. brucei* silenciadas para FAZ10. [A] Proporção de células com defeitos na adesão flagelar após a indução do RNAi. [B] Tipos de destacamento flagelar durante as primeiras 48 horas de indução do silenciamento da FAZ10. [C] Imagem de célula 2N2K prestes a se dividir. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 µm. [D] Proporção de células 2N2K prestes a gerar *zoids*, contendo ou não defeito na adesão flagelar. 96

Figura 42: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF. Células da linhagem FAZ10 RNAi induzidas (+ dox) ou controle (- dox) foram marcadas com anti-FAZ1 [A] ou anti-PFR [B] para visualização da zona de adesão flagelar e do bastão paraflagelar, respectivamente. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm. 97

Figura 43: Silenciamento de FAZ10 afeta a organização da estrutura flagellar. [A] MET de seções transversais ultrafinas de células de *T. brucei* controle, não induzidas ou induzidas para o silenciamento da FAZ10. O colchete marca a distância entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR. Barra = 100 nm. [B] Gráfico da distância (nm) entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR (*one-way* ANOVA *** P < 0.0001). [C] Imagens dos flagelos duplicados de células selvagem (WT), células FAZ10 RNAi não induzidas (-dox) ou induzidas (+ dox) com doxiciclina. Setas indicam a orientação da estrutura AXO-PFR. Barra = 500 nm. [D] Proporção de células contendo flagelos duplicados na mesma orientação ou orientação oposta, como visto em [C]. [E] MET de células FAZ10 RNAi PCF após 96 horas de indução mostrando os flagelos opostos e desorganização dos microtúbulos subpeliculares (seta branca). AXO, axonema; PFR, bastão paraflagelar; MtQ, quarteto de microtúbulos do FAZ. Barra = 500 nm. 98

Figura 44: Desenho esquemático de *T. brucei* PCF durante a progressão do ciclo celular com ênfase para a duplicação e posicionamento dos núcleos (N) e cinetoplastos (K). Elaborado pelo autor. 99

Figura 45: Posicionamento dos núcleos e cinetoplastos em células PCF silenciadas para a FAZ10. [A] Gráfico de coordenadas da posição dos cinetoplastos (K posterior e K anterior) e do N anterior (círculo cinza claro) em relação ao N posterior em células 2N2K controle (-dox) ou induzidas (+dox). Os posicionamentos dos N e K foram medidos como descrito nos Materiais e Métodos. [B] Proporção dos diferentes fenótipos de N e K em células 2N2K induzidas (+dox) ou não (-dox) com doxiciclina, visualizadas por DAPI. n > 90 por experimento. Barra = 5 µm. 100

Figura 46: FAZ10 é necessária para o correto inserção do sulco de clivagem em *T. brucei* PCF. [A] Proporção de células 2N2K (-dox ou + dox) durante a citocinese com sulco de clivagem correto ou incorreto. n > 70 células/experimento. [B] Imagem de célula induzida marcada com DAPI mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem. Barra = 5 µm. [C] Proporção de células 2N2K com defeito na adesão flagellar correlacionado com a presença ou ausência do sulco de clivagem incorreto em células com ou sem indução do RNAi. n > 50 células/experimento. [D] Imagem de célula 2N2K induzida marcada com DAPI (azul) mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem com o flagelo aderido ao corpo celular. Barra = 5 µm. 101

Figura 47: [A] Microscopia confocal do citoesqueleto de células 2N2K marcadas com anti-β-TUB e DAPI com evidência para o posicionamento incorreto do sulco de clivagem em células induzidas com doxiciclina. *Inset*/seta branca mostra o detalhe do sulco de clivagem cortando o N anterior. Barra = 5 µm. [B-C] Imagens de MEV de células induzidas ou não com doxiciclina.

As imagens representam a formação da dobra de divisão (i) e a ingressão do sulco de clivagem (ii), indicado pelas pontas de setas. Barra = 2 µm..... 103

Figura 48: Silenciamento da FAZ10 em *T. brucei* BSF. [A] WB usando anticorpo anti-FAZ10 em lisado celular total de células não induzidas (-tet) ou induzidas (48 e 96 horas, + tet) das linhagens FAZ10:myc e FAZ10:myc RNAi. Anti-EF1α foi usado como controle. [B] Imunofluorescência de citoesqueleto de células FAZ10:myc RNAi não induzidas (- tet) ou induzidas (+ tet) usando anticorpo anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 µm. [C] Curva de crescimento acumulativa de células FAZ10 RNAi na presença (+ tet) ou ausência (- tet) de tetraciclina. [D] Células FAZ10 RNAi marcadas com DAPI após indução com tetraciclina. Setas indicam o flagelo totalmente ou parcialmente destacado. Barra = 5 µm. [E] Quantificação de células FAZ10 RNAi com flagelo destacado após indução do silenciamento com tetraciclina. n > 500 células/ponto. [F-G] Quantificação dos núcleos (N) e cinetoplastos (K) em células FAZ10 RNAi antes e durante indução com tetraciclina. n > 150 células/ponto. [H] Epifluorescência de células induzidas coradas com DAPI após 8 horas de indução com tetraciclina. Barra = 5 µm. 105

Figura 49: Análise de WB de amostras do fracionamento do citoesqueleto da linhagem expressora de Tb927.8.3540:myc utilizando anticorpo anti-myc. 106

Figura 50: Silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] WB contra a cauda myc fusionada a Tb927.8.3540 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. A β-Tubulina foi usada como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-myc em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barra = 10 µm. 107

Figura 51: Avaliação do silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento. [B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleos (N) e/ou cinetoplastos (K) antes e após a indução do RNAi. 108

Figura 52: Efeito do silenciamento de Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína Tb927.8.3540. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. As imagens representam células controle (- dox) e células induzidas (+ dox) observadas após 96 horas de indução do silenciamento. Barra = 10 µm. [B] Proporção de células na cultura que apresentaram formato arredondado ou esférica. 109

Figura 53: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF silenciado para Tb927.8.3540. O anticorpo anti-βTUB (verde) foi utilizado para marcar os microtúbulos subpeliculares e DAPI (azul)foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 10 µm. 110

Figura 54: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo L3B2 foi usado para marcar a FAZ1 (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 µm. 111

Figura 55: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo anti-PFR foi usado para marcar PFR (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 µm. 112

Figura 56: Microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de T. brucei silenciados para a proteína gigante Tb927.8.3540. [A] Corte transversal de uma célula esférica com o flagelo extracelular adjacente ausente. No detalhe, a presença do axonema formado intracelularmente (1 e 2, setas brancas) sem a estrutura paraflagelar. Barra = 1 µm. [B] Corte transversal de flagelos, aderidos (esquerda) ou não (direita) ao corpo celular, sem a estrutura paraflagelar. Barra = 100 nm. 113

Figura 57: MEV de células Tb927.8.3540 RNAi induzidas. É possível observar diferentes estágios de modificação da morfologia celular com o flagelo internalizado [A] ou externo e destacado do corpo celular [B]. Barra = 1 µm. 114

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de WB. 47

Tabela 2: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de imunofluorescência e Microscopia Confocal. 49

Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação das regiões N- e C-terminais das ORFs candidatas. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição EcoRI e XhoI, respectivamente. 52

Tabela 4: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição HindIII e XbaI, respectivamente. 56

Tabela 5: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição SpeI e HindIII, respectivamente. 59

Tabela 6: Lista dos genes de *T. brucei* obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 1 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos. 78

Tabela 7: Lista dos genes de *T. brucei* obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 2 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos. 79

Lista de Abreviaturas e Siglas

AXO	Axonema
BF	Bolso Flagelar
BSF	Formas Sanguícolas
CBF	Colar do Bolso Flagelar
ClpGM6	Proteína do Tipo Calpaína GM6
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
FAZ	Zona de Adesão Flagelar
FLAM	Membro Flagelar
GST	*Glutathione S-transferase*
K ou kDNA	Cinetoplasto
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LFT	Fatores Líticos de Tripanossomas
MAP	Proteína Associada a Microtúbulos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MtQ	Quarteto de Microtúbulos
N	Núcleo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCF	Formas Procíclicas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFR	Bastão Paraflagelar
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SBF	Soro fetal bovino
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SNC	Tripanossomíase Humana Africana
spMT	Microtúbulos Subpeliculares
TBS	Tampão Tris-Salino
TCA	Complexo de Adesão Tripartido
VSG	Glicoproteína Variante de Superfície
WB	*Western Blotting*

Lista de Símbolos, Unidades e Medidas

L	Litro
mL	Mililitro ($x10^{-3}$)
µL	Microlitro ($x10^{-6}$)
>	Maior
g	Grama
mg	Miligrama ($x10^{-3}$)
µg	Micrograma ($x10^{-6}$)
ng	Nanograma ($x10^{-9}$)
m	Metro
mm	Milímetro ($x10^{-3}$)
µm	Micrômetro ($x10^{-6}$)
nm	Nanômetro ($x10^{-9}$)
%	Porcentagem
ºC	Grau Celsius
Da	Dalton
kDa	Quilo Dalton ($x10^{3}$)
M	Molar
mM	Milimolar ($x10^{-3}$)
µM	Micromolar ($x10^{-6}$)
bp	Pares de bases
kbp	Quilo Pares de bases
RPM	Rotações por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Volts
kV	Quilo Volts
u	Unidade
OD	Densidade Ótica
min	Minuto
s	Segundo
µF	Micro Faraday ($x10^{-6}$)

Sumário

1. Introdução 16

1.1. Tripanossomíase - doença e epidemiologia 16

1.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento 17

1.3. Biologia celular dos tripanossomatídeos 20

1.4. Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* e interação parasita-hospedeiro 23

1.5. Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei* 26

1.6. O citoesqueleto do *Trypanosoma brucei* 29

1.7. Proteínas de alta massa molecular 36

1.8. RNA de interferência em tripanossomatídeos 39

2. Objetivo 41

2.1. Objetivos específicos 41

3. Materiais e Métodos 42

3.1. Cultivo dos parasitas 42

3.2. Extração do citoesqueleto e do flagelo 42

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 43

3.4. Produção de anticorpos policlonais 44

3.5. Imunoprecipitação das proteínas de alta massa molecular 45

3.6. Western Blotting 45

3.7. Imunofluorescência e Microscopia Confocal 47

3.8. Espectrometria de Massas 50

3.9. Extração de DNA genômico 51

3.10. PCR e clonagem dos vetores plasmidiais 51

3.11. Expressão e purificação das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto 54

3.12. Clonagem das proteínas gigantes à cauda myc 55

3.13. Clonagem para silenciamento das proteínas gigantes por RNAi 56

3.14. Transfecção do *Trypanosoma brucei*.....59

3.15. Preparação do lisado celular total 61

3.16. Análise do ciclo celular e avaliação da adesão flagelar 62

3.17. Medições morfogênicas 62

3.18. Imunomarcação e Microscopia eletrônica.....63

3.19. Bioinformática 64

4. Resultados 66

4.1. Detecção das proteínas gigantes no citoesqueleto de *T. brucei* 66

4.2. Localização celular das proteínas gigantes de *T. brucei*.....69

4.3. Caracterização dos anticorpos anti-PG1 e anti-PG2 contra proteínas gigantes de outros tripanossomatídeos.....75

4.4. Identificação das proteínas gigantes por espectrometria de massas em *T. brucei*.....77

4.5. Caracterização *in silico* das proteínas gigantes da Zona 1 80

4.6. Clonagem e produção de anticorpos contra as proteínas candidatas.....82

4.7. Caracterização dos anticorpos contra as proteínas candidatas do citoesqueleto de *T. brucei*.....86

4.8. Clonagem e geração das linhagem para expressão das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc 88

4.9. Clonagem dos vetores para estudo por RNA de interferência 90

4.10. Caracterização funcional da proteína FAZ10.....91

4.11. Caracterização funcional da proteína gigante Tb927.8.3540.....106

5. Discussão.....115

5.1. Propriedades moleculares das proteínas gigantes 115

5.2. Distribuição celular das proteínas gigantes.....116

5.3. Identificação das proteínas gigantes.....117

5.4. Papel da FAZ10 na biologia do *Trypanosoma brucei*.....120

5.5. Papel da Tb927.8.3540 na biologia do *Trypanosoma brucei* 123

5.6. As proteínas gigantes dos tripanossomatídeos 126

6. Conclusão 128

Bibliografia 129

Anexos 142

1. Introdução

1.1. Tripanossomíase - doença e epidemiologia

A Doença do Sono ou Tripanossomíase Humana Africana (THA) é uma doença parasitária infecciosa causada pelo protozoário extracelular *Trypanosoma brucei*. A transmissão ocorre por meio da picada do inseto vetor, mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.*)*. A doença ocorre predominantemente na África subsaariana e pode se apresentar de duas formas em humanos; podendo ser causada por duas subespécies do parasita: *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*. Cada forma possui uma distribuição geográfica, número de casos, meios de transmissão, evolução clínica e forma de tratamento diferentes (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). A forma predominante da doença é causada pelo *T. b. gambiense*, presente nas porções oeste e central do continente africano, (**Fig. 1A**) e é responsável por aproximadamente 98% dos casos registrados. Esta forma causa uma doença crônica que se desenvolve ao longo dos anos de forma branda e lenta em humanos e se caracteriza pela presença de uma baixa quantidade de parasitas na circulação sanguínea. O *T. b. rhodesiense*, ao contrário, é predominantemente zoonótico podendo ocorrer acidentalmente em humanos. Por isso, é responsável por pouco menos de 2% do casos registrados. Esta forma ocorre na região leste do continente africano (**Fig. 1A**) e causa uma doença aguda e caracterizada por uma alta parasitemia. Por ser predominantemente uma zoonose, o *T. b. rhodesiense* causa um grande impacto na economia local, uma vez que é o causador da Tripanossomíase Africana Animal ou Nagana, decorrente da infecção do gado e consequente dano à pecuária local (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

Atualmente, a THA está distribuída em mais de 300 focos ou áreas localizadas podendo afetar cerca de 24 países da África subsaariana (FRANCO et al., 2014). Descoberta no início do século XX, esta doença era considerada uma epidemia que afligia centenas de milhares de pessoas. Após uma melhora temporário por volta dos anos 40, fatores como fome, guerras, a crítica situação socioeconômica local e a diminuição no investimento de medidas de controle da doença contribuíram para o retorno da mesma a níveis altos nas décadas seguintes, até o final dos anos 90

quando foram registrados cerca de 300 mil casos (WHO, 1998; KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; FRANCO et al., 2014). A partir dos anos 2000, esforços conjuntos de organizações governamentais e outras agências tanto na detecção como tratamento da doença ajudaram a diminuir consideravelmente novos casos da doença para menos que 10 mil casos por ano pela primeira vez (**Fig. 1B**) (WHO, 2006; FRANCO et al., 2014).

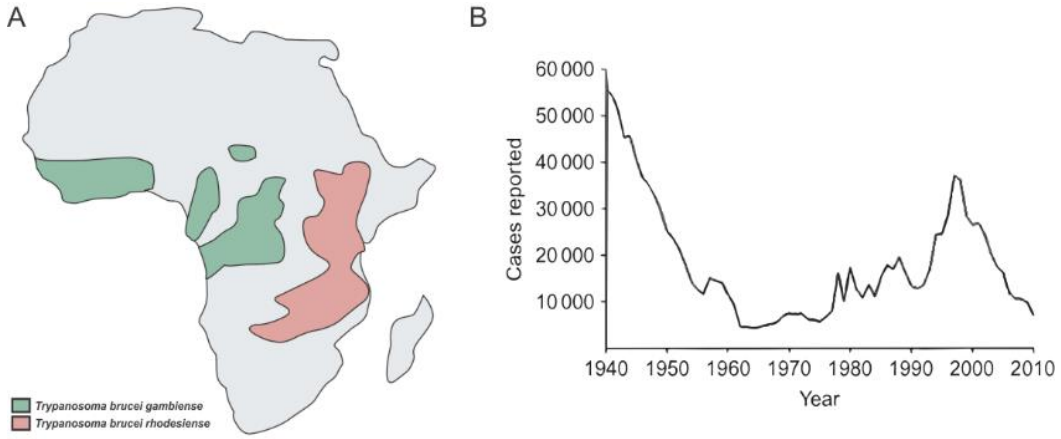


Figura 1: [A] Representação esquemática da distribuição do *Trypanosoma brucei gambiense* (em verde) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (em vermelho) na África subsaariana. Reproduzido de KENNEDY (2013). [B] Número de casos de THA registrados na África entre 1940 e 2010. Adaptado de LEJON; BENTIVOGLIO e FRANCO (2013).

1.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento

O desenvolvimento clínico das duas formas da THA diferem consideravelmente. A THA causada pelo *T. b. gambiense* se desenvolve lentamente e pode apresentar períodos latentes podendo o curso da doença demorar até 3 anos para se completar. Por outro lado, a THA causada por *T. b. rhodesiense* se desenvolve rapidamente de forma aguda podendo levar a morte em até 2 meses, antes mesmo do indivíduo manifestar os sintomas neurológicos (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013; FRANCO et al., 2014). Clinicamente, a THA apresenta dois estágios de evolução da doença: inicial e tardio. O primeiro é chamado de Estágio Hemolinfático, pois se caracteriza pela presença de parasitas na corrente sanguínea e vasos linfáticos. Os sintomas e sinais clínicos deste estagio podem ser: dores de cabeça, enjoos, febre intermitente, fraqueza, linfadenopatia, anemia, distúrbios cardíacos e endócrinos, dores musculares e nas juntas e hepatoesplenomegalia (LEJON;

BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013). Após um período variável de tempo, a doença se desenvolve para o estágio tardio ou Estágio Meningoencefálico. Este se caracteriza pela passagem dos parasitas através da barreira hematoencefálica atingindo o sistema nervosa central (SNC) causando severo dano neurológico. Os sintomas incluem principalmente distúrbios do sono, motivo pela qual a doença recebe o nome comum, mas também incluem transtornos psiquiátricos, convulsões, coma, falha generalizada dos órgãos e consequentemente a morte (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013). Após a infecção, por ambas subespécies de *T. brucei*, a THA é considerada geralmente fatal se não tratada apropriadamente, apesar de casos individuais de cura espontânea da infecção já terem sido registados (JAMONNEAU et al., 2012; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013).

Levando em consideração a variedade de sintomas nas duas formas da doença, torna-se muito difícil um diagnóstico rápido e preciso. Não obstante, muitos dos sintomas da THA também são confundidos com sintomas de outras doenças endêmicas. Sintomas do primeiro estágio da THA podem ser confundidos com febre tifoide, hepatite e tuberculose, enquanto o segundo estágio e geralmente confundido com neurosífilis, tumor cerebral, brucelose e infecções decorrentes do HIV (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Esta definição e muito importante pois os diferentes estágios da doença requerem diferentes tratamentos, que são baseados em drogas bastante tóxicas para o organismo (KENNEDY, 2013).

Usualmente, o diagnóstico da THA envolve 3 etapas que são conduzidos de seguinte maneira: (1) *screening*, (2) confirmação e (3) definição do estágio da doença. O *screening* se dá geralmente em áreas endêmicas a fim de se identificar focos onda a população está infectada. Na maioria dos casos, é utilizado um teste sorológico simples e barato que pode ser empregado em regiões isoladas e sem infraestrutura adequada. O exemplo mais comum é o CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*) (CHAPPUIS et al., 2005; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Outro teste sorológico que pode ser empregado é o LATEX/*T. b. gambiense*, que foi desenvolvido como alternativa para o CATT (BUSCHER et al., 1999). Apesar do custo superior, ainda são opções para o diagnóstico da doença alguns métodos como: o cultivo *in vitro* e inoculação animal do parasita a partir do sangue de pacientes, ensaio de PCR, avaliação de distúrbios do sono por meio da polisonografia e ainda técnicas

de imagem como ressonância magnética (MRI) (CHAPPUIS et al., 2005; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

O segundo estágio do diagnóstico da THA se baseia na confirmação da infecção por evidência direta da presença do parasite no organismo. O diagnóstico parasitológico é realizado pelo exame microscópico do sangue, do aspirado de linfonodos periféricos ou do líquido cefalorraquidiano (LCR) (**Fig. 2**). Somente em casos bem iniciais da infecção, e possível detectar também a presença dos parasitas na punção do cancro tripanossômico, que é uma induração ou inchaço edematoso resultante da proliferação de parasitas no local da picadura da mosca Tsé-tsé. Este cancro se forma nos primeiros 3 dias e desaparece após três semanas (CHAPPUIS et al., 2005; KENNEDY, 2006; 2013). Apesar de simples e barata, esta técnica tem baixa sensibilidade e requer bastante tempo para detectar os parasitas (cerca de 1 parasita/200 campos de observação no microscópio) (CHAPPUIS et al., 2005; KENNEDY, 2006; 2013).

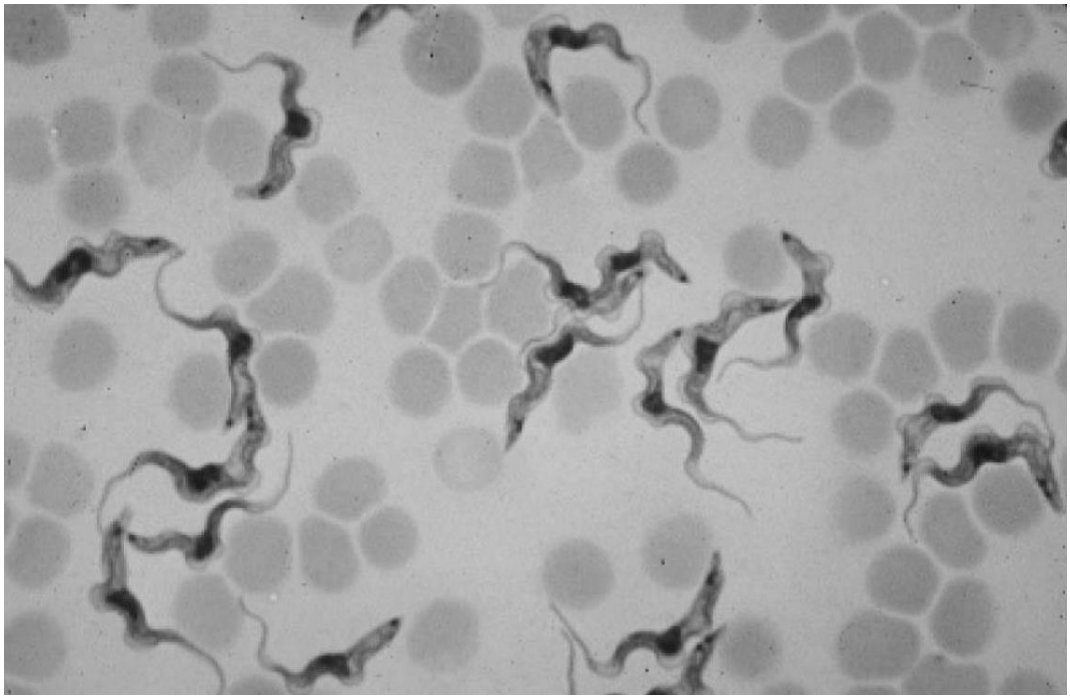


Figura 2: Formas tripomastigotas do *T. b. rhodesiense* em lâmina de esfregaço de sangue periférico. Fotografia de Jean Jannin (WHO/CPE).

A terceira etapa do diagnóstico e talvez a mais importante é a definição do estágio de evolução da doença. Este passo e vital para o paciente pois diferentes tratamentos são administrados em função da sua definição (estágio inicial ou tardio)

(KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Na falta de sinais clínicos claros e testes indicando qual estágio a THA se encontra, esta etapa se baseia no exame do LCR por meio da punção lombar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o segundo estágio da THA e caracterizado pela presença no LCR de um ou mais dos seguintes: (1) alto número de glóbulos brancos (> 5 células/µL) e/ou (2) parasitas (tripanossomas).

O tratamento para a THA e uma tarefa difícil e a eficácia do mesmo é variável (70-95% de cura) e dependente da droga e da região afetada. Atualmente, das drogas antitripanossômicas registradas, quatro são usadas em larga escala e a bastante tempo: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina; e todas estão disponibilizadas gratuitamente no Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas da OMS (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Apesar disso o desenvolvimento de novas drogas é ainda necessário, visto que nenhuma vacina contra a THA foi desenvolvida. Há também o interesse de desenvolver compostos com menor toxicidade do que as drogas existentes e que possam combater as duas formas da doença de maneira mais eficaz (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

Considerando a diminuição expressiva de novos casos registrados desde o início dos anos 2000, a eliminação da THA passou a ser considerada possível. Entretanto, como já foi observado, a situação precária da região aliada a sua instabilidade econômica e sociopolítica, pode levar a re-emergência da doença caso haja diminuição na vigilância, prevenção e controle da mesma frente ao atual panorama de redução de casos.

1.3. Biologia celular dos tripanossomatídeos

A ordem Kinetoplastida engloba um grupo diverso e complexo de protistas flagelados de vida livre ou parasitária. Dentro deste grupo, os parasitas obrigatórios são reunidos na família Trypanosomatidae, a qual reúne alguns dos principais protozoários causadores de doenças parasitárias em humanos, como o *T. cruzi* (doença de Chagas), o *T. brucei* (doença do sono) e a *Leishmania spp*. (leishmanioses tegumentar e visceral); dentre outros parasitas de invertebrados e plantas. Adicionalmente, os tripanossomatídeos também podem ser classificados quanto ao número de hospedeiros que cada espécie infecta ao longo do seu ciclo de vida, sendo

considerados monoxênicos aqueles que possuem somente um hospedeiro definitivo (invertebrado) ou dixênicos aqueles que infectam um hospedeiro definitivo (vertebrados ou plantas) e um intermediário (invertebrados) (REY, 2008).

Os primeiros relatos de tripanossomatídeos foram documentados em 1851 por Burnett e alguns anos depois, os primeiros gêneros (*Leptomonas* e *Herpetomonas*) foram estabelecidos. Estes eventos foram seguidos por uma enorme quantidade de publicações na primeira metade do século XX quando diversas novas espécies foram identificadas, embora a microscopia ótica fosse a única ferramenta para identificação e classificação de novas espécies. Porém, somente após 1960, que um sistema de taxonomia baseado exclusivamente na morfologia e ciclo de vida foi proposto por HOARE e WALLACE (1966). O último catálogo de tripanossomatídeos publicado na década de 90 incluía 350 espécies (PODLIPAEV, 1990) sendo que este número hoje se aproxima de 400 (MASLOV et al., 2013). Inicialmente adotou-se o sistema taxonômico baseado nos morfotipos de cada organismo durante o ciclo de vida, o que facilitou a separação e classificação de vários novos gêneros. Os morfotipos foram discriminados de acordo com a forma celular e também com a posição relativa do cinetoplasto e do flagelo na célula, totalizando oito morfotipos diferentes: amastigota, promastigota, coanomastigotas, endomastigotas, opistomastigotas, opistomorfo, epimastigotas e tripomastigotas (**Fig. 3**). No caso do *T. brucei*, ocorrem apenas os morfotipos epimastigota e tripomastigota, com algumas variações na forma celular dependendo do estágio do ciclo de vida.

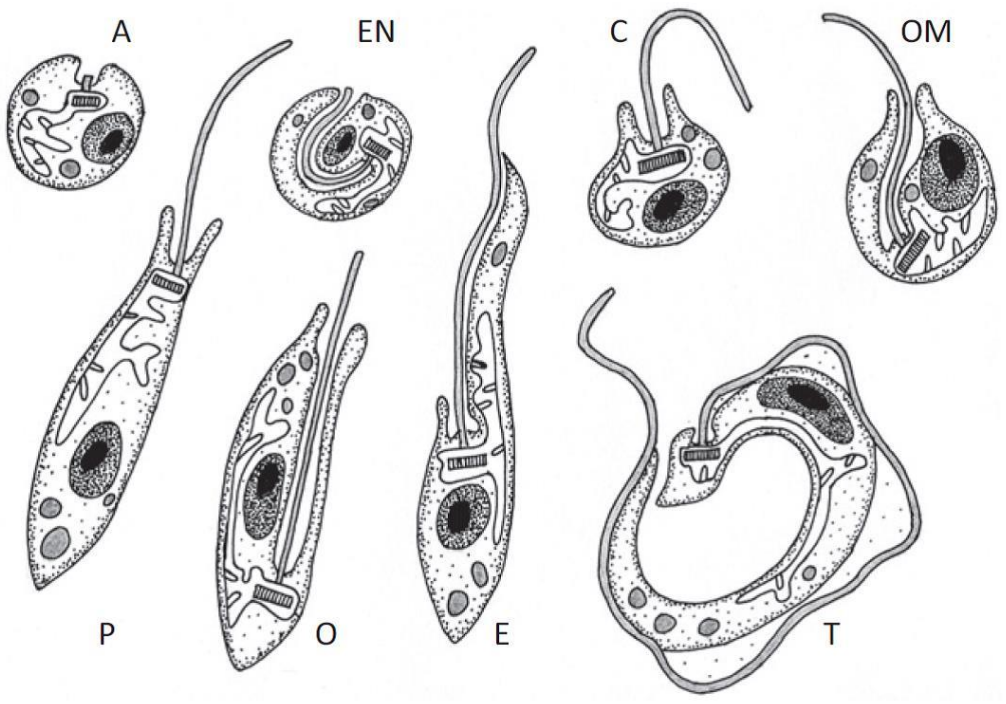


Figura 3: Morfotipos básicos dos tripanossomatídeos, que servem como parâmetro para a classificação taxonômica do grupo. A – amastigota, EN – endomastigota, C – coanomastigota, OM – opistomastigota, P – promastigota, O – opistomorfo, E – epimastigota e T – tripomastigota. Reproduzido de MASLOV et al. (2013).

Entretanto, devido aos problemas clássicos dos sistemas taxonômicos como a falta de caracteres e critérios, não se possuía um entendimento suficientemente claro dos elementos responsáveis pela biologia evolutiva deste grupo; nem mesmo com o avanço dos estudos de ultraestrutura. Sendo assim, novas ferramentas foram incorporadas para auxiliar a classificação e separação dos táxons (gênero e espécies) da família Trypanosomatidae. Com os avanços da era genômica e a disponibilidade de diversos estudos filogenéticos foi possível mudar o conhecimento acerca da sistemática e aspectos evolutivos do grupo em questão (MASLOV et al., 2013). Dentre as análises utilizadas para este fim podemos citar os estudos filogenéticos baseados nos genes das subunidades menores e maiores do RNA ribossômico (rRNA), gene do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (GAPDH) e também do gene da proteína *heat-shock* (HSP) (MASLOV et al., 1996; HAMILTON et al., 2004; SIMPSON, A. G.; ROGER, 2004). Estas ferramentas foram mais tarde aperfeiçoadas após o completo sequenciamento do genoma de diversos parasitas e disponibilidade de vários marcadores para classificação do grupo (BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005a; IVENS et al., 2005). Apesar dos recentes avanços a taxonomia deste

grupo é considerada confusa e não somente novos estudos e análises robustos estão sendo publicados como também novos táxons estão sendo criados para tentar explicar a complexidade deste grupo em conjunto com o catalogação de novas espécies (VOTYPKA et al., 2015).

1.4. Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* e interação parasita-hospedeiro

Mais de trinta espécies e subespécies da mosca Tsé-tsé do gênero *Glossina* são responsáveis pela transmissão de diferentes espécies de tripanossomas. Por serem organismos hematófagos, estes insetos são capazes de hospedar e transmitir uma variedade de parasitas, incluindo o *T. brucei*. As moscas Tsé-tsé recém formadas são infectadas a partir do momento que se alimentam de um hospedeiro vertebrado infectado, maneira pela qual os parasitas alcançam o trato digestivo da mosca. Após uma série de eventos celulares, incluindo diferenciação, multiplicação e migração dos parasitas dentro do trato digestório da mosca, é que estes se tornam aptos a infectar um novo hospedeiro. Acredita-se que apenas 0,1% das moscas possuem uma infecção no estágio necessário para transmitir o parasita durante o repasto sanguíneo.

No curso do ciclo de vida do *T. brucei*, a infecção e transmissão da doença no ser humano se inicia quando (1) uma mosca Tsé-tsé infectada pica o indivíduo, durante o repasto sanguíneo. Essas formas infectivas do parasita chamados de tripomastigotas metacíclicos podem atingir a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, dando início ao estágio humano do ciclo de vida. A partir deste ponto (2) os parasitas se diferenciam em longos e esguios tripomastigotas sanguícolas, (3) que se multiplicam e (4) colonizam os fluidos corporais, sangue e linfa, e eventualmente o LCR durante o estágio mais avançado da doença. Eventualmente, (5) o indivíduo infectado pode ser picado por uma mosca Tsé-tsé, que pode ingerir os parasitas dando continuidade ao ciclo de vida do mesmo. Uma vez que os parasitas atingem o intestino do inseto vetor, (6) os tripomastigotas sanguícolas diferenciam-se em tripomastigotas procíclicos. Estes, ao saírem do intestino e enquanto migram em direção as glândulas salivares, (7) se transformam na forma epimastigota, considerada a forma reprodutiva do parasito no hospedeiro invertebrado. Nas glândulas salivares (8) os parasitas se multiplicam e iniciam sua transformação em tripomastigotas metacíclicos. O parasita permanece neste estágio até atingir a

corrente sanguíneo de um hospedeiro vertebrado, completando assim o seu ciclo de vida (**Fig. 4**).

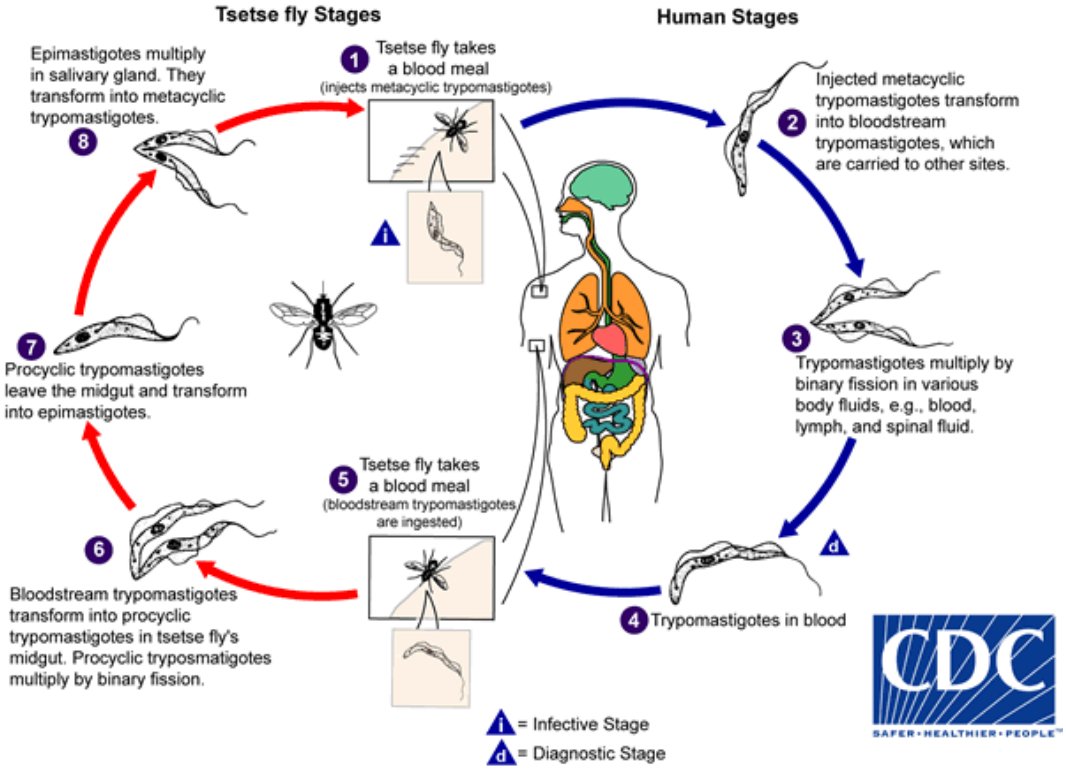


Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. Imagem de Alexander J. de Silva e Melanie Moser da Biblioteca Pública de Imagens de Saúde do Centro de Controle de Doenças (CDC).

Nem todas as espécies de tripanossomas são patogênicas ao ser humano. Na verdade, várias espécies que infectam outros animais, e também o *T. b. brucei*, são suscetíveis a fatores líticos que estão presentes no soro humano. Estes fatores são chamados de Fatores Líticos de Tripanossomas (LFT) e são os responsáveis diretos pelo combate a infecção por estes parasitas. Existem dois tipos de LFTs: o LFT-1 que e uma partícula lipoproteica de alta densidade (RIFKIN, 1978) e o LFT-2 que faz parte de um complexo de ligação a proteínas séricas (RAPER et al., 1999). Em relação ao parasita patogênico, o *T. b. rhodesiense* possui um gene codante para uma proteína resistente ao soro, chamado SRA. A proteína SRA se liga ao LFT-1 tornando então, o parasita resistente à lise. Por outro lado, o *T. b. gambiense* não possui o gene SRA. Entretanto, esta subespécie desenvolveu resistência ao LFT-1 usando outros mecanismos, como a perda da expressão de receptores haptoglobinas/hemoglobinas (HpHbR) que são necessários para a ligação e captação de LFT-1 pelo parasita

(KENNEDY, 2013). E justamente por serem parasitas extracelulares, ou seja, que não necessitam uma célula hospedeira para invadir e se multiplicar, é que o *T. brucei* está constantemente interagindo com fatores do sangue e soro naturais da defesa do hospedeiro.

Além disso, os tripanossomas patogênicos apresentam outros mecanismos de defesa. As formas tripomastigotas sanguícolas do *T. brucei* são caracterizadas pela alta expressão de glicoproteínas variantes de superfície (VSG). As VSGs recobrem toda a superfície da célula do parasita e agem como um importante mecanismo de defesa para o mesmo (PAYS, 2006). As células do indivíduo infectado respondem à infecção por *T. brucei* produzindo anticorpos específicos contra as VSGs para eliminar o parasita e consequentemente, levam a diminuição da parasitemia. Entretanto, por um mecanismo chamado de variação antigênica (HORN, 2014), uma pequena população dos parasitas é capaz de trocar toda sua capa de VSG, tornando-a irreconhecível para os anticorpos produzidos. Isto leva a uma proliferação de parasitas resistentes até que novos anticorpos sejam produzidos contra as novas VSGs. Com isto, o parasita e o sistema imune do hospedeiro permanecem repetidamente nesta ação recíproca, o que torna o organismo incapaz de eliminar a infecção. Além disso, a produção excessiva e acumulação sistêmica de imunoglobulinas pode levar a uma desregulação do organismo culminando na produção de auto anticorpos (KAZYUMBA et al., 1986).

Adicionalmente, as VSGs também estão associadas a disfunções na produção de citocinas. Por parte do sistema imunológico do hospedeiro, há a produção de altos níveis de citocinas inflamatórias como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina 1 beta (IL-1β), e também de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10), tanto no sangue como no LCR (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Outras moléculas relacionadas à interação parasita-hospedeiro incluem também as quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo hospedeiro, e a prostaglandina D2, produzida pelo parasita (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Geralmente, estas reações imunes exacerbadas não levam a proteção do organismo, mas ao desenvolvimento de desordens imunopatológicas.

1.5. Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*

Os tripanossomas são protozoários unicelulares flagelados pertencentes ao filo Euglenozoa, porém se distinguem dos outros grupos por apresentarem uma estrutura peculiar chamada cinetoplasto, e por isso são agrupados na ordem Kinetoplastida. Neste grupo, os tripanossomas pertencem a família Trypanosomatidae, que agrupa exclusivamente os parasitas obrigatórios. Os tripanossomas apresentam morfologia e comportamento diferentes dependendo de cada fase do ciclo de vida e hospedeiro em que se encontram. A célula ao mesmo tempo que organizada deve ser capaz de apresentar uma plasticidade responsável pelas constantes mudanças morfológicas necessárias e por outros processos biológicos como motilidade, alimentação e reprodução. O *T. brucei* apresenta uma organização celular mais simples que os eucariotos superiores entretanto os vários aspectos da sua biologia são igualmente importantes, haja vista que embora o organismo unicelular deva responder somente ao ambiente à sua volta para sobreviver, os processos celulares devem ser coordenados para uma rápida adaptação celular aos estímulos. Esta adaptação requer transformações estágio específicas e envolve mudanças morfológicas, alterações na expressão gênica, no posicionamento de organelas, no tráfico de proteínas e coordenação do ciclo celular.

A arquitetura celular do *T. brucei* é baseada em uma célula alongada de 15 a 30 µm de comprimento e que possui um único flagelo que emerge de uma invaginação da membrana plasmática e permanece parcialmente aderido ao corpo celular. As principais organelas se apresentam em cópia única, como o núcleo (1), cinetoplasto (2) e mitocôndria (9). A célula ainda apresenta as organelas básicas para o tráfico de proteínas, processos de endocitose/exocitose e metabolismo celular, que incluem o Aparato de Golgi (6), os lisossomos (7), os endossomos (8) e os glicossomos (11). Há ainda importantes estruturas que são vitais para a biologia dos tripanossomas. São elas o bolso flagelar (3), o corpo basal e corpúsculo pró-basal (4), o flagelo (5) e os microtúbulos subpeliculares (10) (**Fig. 5**). Em termos de orientação, a célula apresenta uma região anterior, referente a porção distal do flagelo e uma região posterior, correspondente ao lado onde há o bolso flagelar (3) (**Fig. 5**). Esta polarização é importante para a organização celular, principalmente no que diz respeito à disposição das organelas cópia única, que estão localizadas na região centro-posterior da célula.

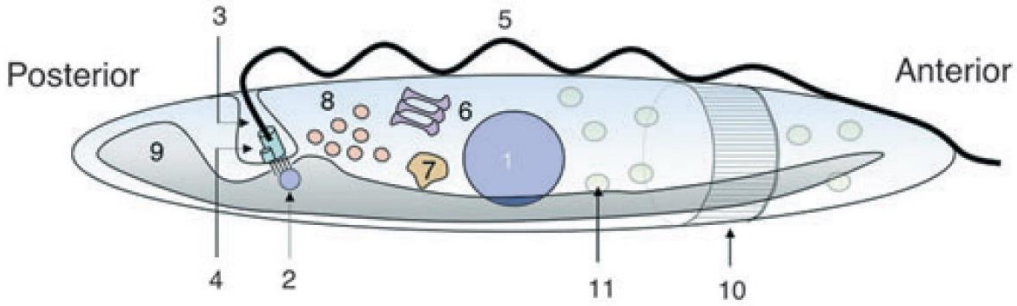


Figura 5: Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*. Representação simplificada das principais organelas presente nesta célula: 1. Núcleo, 2. Cinetoplasto, 3. Bolso flagelar, 4. Corpo basal e corpúsculo pró-basal, 5. Flagelo, 6. Golgi, 7. Lisossomo, 8. Endossomos, 9. Mitocôndria, 10. Citoesqueleto de microtúbulos e 11. Glicossomos. Adaptado de MATTHEWS (2005).

No que diz respeito ao material genético, a célula interfásica de *T. brucei* apresenta um núcleo central contendo o DNA genômico e um DNA mitocondrial chamado de cinetoplasto (kDNA ou K). O núcleo, localizado na região centro-posterior, possui um diâmetro de até 2,5 µm em um formato esférico (**Figs. 5 e 6A**). Sabe se que este organismo contém 11 pares de cromossomos megabases, 1 a 5 cromossomos intermediários e por volta de 100 mini cromossomos. Os cromossomos megabases são diploides enquanto as duas últimas classes de cromossomos são consideradas haploides e contem principalmente sequências repetitivas e relacionadas ao processo de variação antigênica e produção das VSGs (ERSFELD, 2011). O genoma do *T. brucei* foi sequenciado por BERRIMAN et al. (2005), sendo que dos 9068 genes anotados, incluem-se aproximadamente 900 pseudogenes, 1700 genes específicos de *T. brucei* e 806 genes para VSGs nas regiões subteloméricas. Além disso, os genes estão organizados em grandes regiões policistrônicas e são ausentes de íntrons (BERRIMAN et al., 2005).

O cinetoplasto por sua vez está contido dentro da única mitocôndria da célula (**Figs. 5 e 6B**). Este é composto por uma enorme malha de grandes (maxicírculos) e pequenos (minicírculos) círculos de DNA altamente condensados. Os maxicírculos são basicamente homólogos do DNA mitocondrial que variam de 20 a 40 kbp em tamanho, e transcrevem rRNAs e codificam proteínas, em sua maioria envolvidos com o metabolismo mitocondrial (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Os minicírculos compreendem 90% do kDNA com tamanho variando de 0,5 a 2,9 kbp. A principal função destes é transcrever pequenos RNAs responsáveis pela maquinaria de edição

de RNA da célula. Na célula, o kDNA está posicionado adjacente ao bolso flagelar e juntamente aos corpo e corpúsculo basais formam a estrutura base para a formação do flagelo (**Figs. 5 e 6B**) (SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

A estrutura mais posterior da célula é o bolso flagelar (BF) (**Figs. 5 e 6C**), uma invaginação da membrana plasmática correspondente ao sítio de saída do flagelo e facilmente observado por microscopia eletrônica. O BF possui uma localização específica a qual está intimamente relacionada com componentes do citoesqueleto e diversas organelas, principalmente o Aparato de Golgi (OVERATH; ENGSTLER, 2004; FIELD; CARRINGTON, 2009). O BF apresenta subdomínios e posicionamento específico: a membrana do BF forma um microambiente com um conjunto de proteínas e moléculas específicas e o lúmen desta organela está preenchido por uma matriz rica em carboidratos variados e com função ainda não detalhada (FIELD; CARRINGTON, 2009). No local de saída do flagelo onde a membrana se invagina para formar o bolso está uma estrutura chamada de colar do bolso flagelar (CBF) (**Fig. 6C, D**). O CBF atua como uma barreira física contra a entrada e saída de moléculas do lúmen e como uma estrutura de estabilização da arquitetura do BF e do flagelo. O principal componente do CBF é a *Bilbo1*, a qual foi caracterizada como essencial para a formação do BF e pelo seu funcionamento, uma vez que o *knockdown* de *Bilbo1* por RNAi (RNAi) impede a formação do BF, e causa o rompimento do sistema de tráfego vesicular, e posicionamento errôneo do novo flagelo durante a citocinese (BONHIVERS et al., 2008). A membrana do BF apresenta uma composição particular, com a presença de proteínas de superfície específicas desta região como a SRA (VANHAMME et al., 2003), receptores de transferrina (STEVERDING et al., 1995), receptores de LDL (PAL et al., 2002), CRAM (QIAO et al., 2006), HPHBR (VANHOLLEBEKE et al., 2008), entre outros. Esta composição reflete o alto grau de endocitose/exocitose que ocorre no BF, haja vista que este compartimento é o único local em que esses processos ocorrem. Além disso, este compartimento é essencial para o endereçamento de proteínas, já que a retenção de determinadas moléculas e o direcionamento de outras para a membrana pelicular ou flagelar é vital para a biologia do parasita. Não menos importante, o BF também é necessário em processos de evasão da resposta imune, como na reciclagem das VSG em formas sanguícolas do *T. brucei* (FIELD; CARRINGTON, 2009).

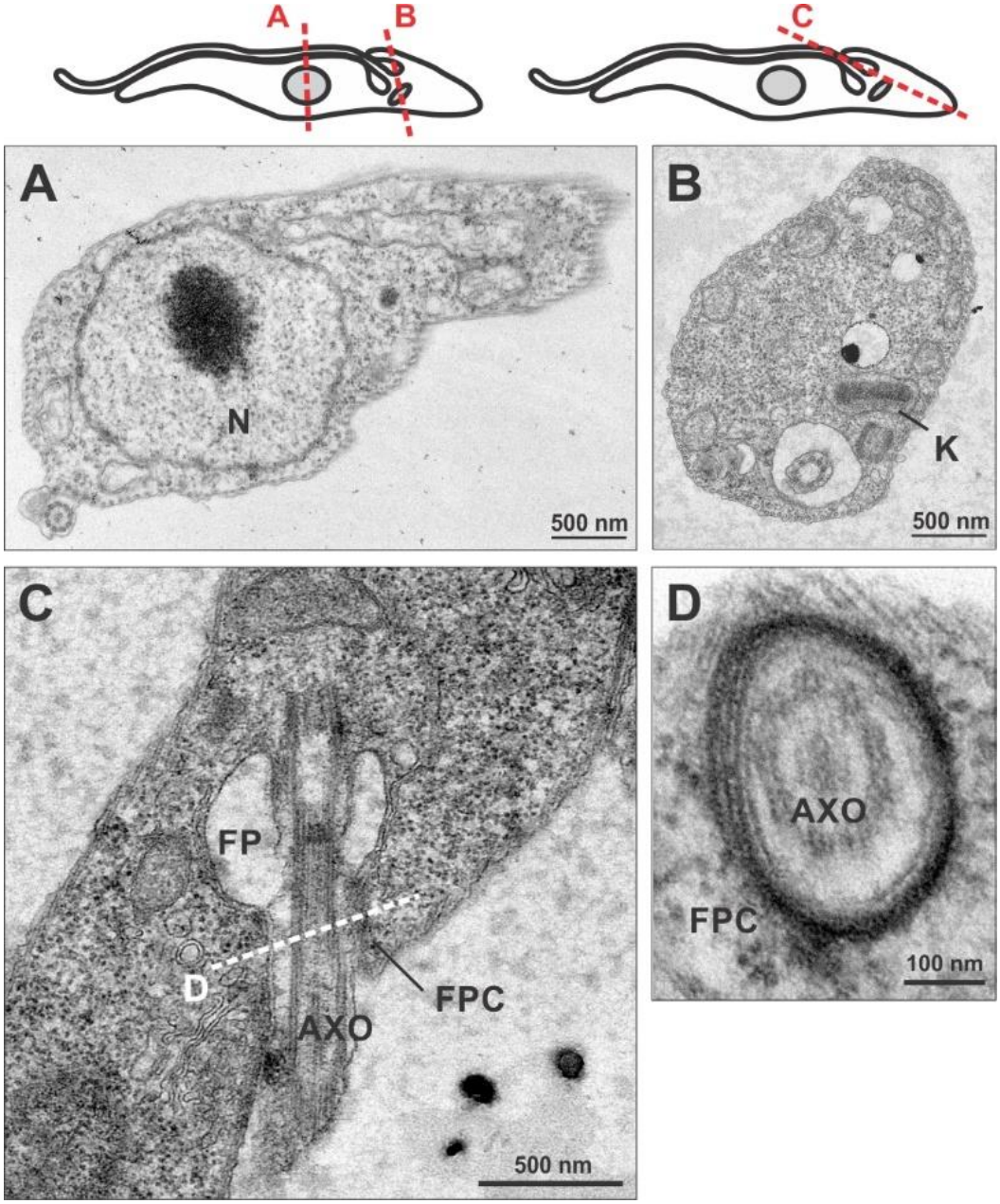


Figura 6: Morfologia ultra estrutural do *Trypanosoma brucei*. [A-D] Seções ultrafinas do *T. brucei* visualizado por microscopia eletrônica de transmissão. N – núcleo, K – cinetoplasto, BF – bolso flagelar, AXO – axonema, CBF – colar do bolso flagelar. Elaborado pelo autor.

1.6. O citoesqueleto do *Trypanosoma brucei*

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica, em constante estado de reorganização e participa de vários processos celulares. Na maioria dos eucariotos, o citoesqueleto é composto principalmente por três tipos de filamentos: microtúbulos, filamentos intermediários e os microfilamentos de actina, que formam uma rede interconectada que permeia o espaço citoplasmático das células (ALBERTS;

WILSON; HUNT, 2008). Entretanto, o citoesqueleto do *T. brucei* é composto majoritariamente de microtúbulos além de compreender uma vasta gama de proteínas acessórias com diversas funções, dentre elas as proteínas associadas a microtúbulos (MAP), proteínas do bastão paraflagelar (PFR), proteínas da zona de adesão flagelar (FAZ), e proteínas motoras do flagelo; e esta complexidade é responsável pela funcionalidade de toda a célula (**Fig. 7**). Vale ressaltar que o *T. brucei*, assim como outros tripanossomatídeos, não possuem filamentos intermediários e até o momento sabe-se que a actina não forma filamentos nestes organismos (GULL, 1999).

Grande parte dos microtúbulos constituem uma grande malha que percorrem toda a célula em forma de feixes paralelos adjacentes e conectados entre si e à membrana plasmática pelicular, sendo denominados de citoesqueleto de membrana ou de microtúbulos subpeliculares (spMT) (GULL, 1999) (**Figs. 5 e 7**). Esta estrutura apresenta uma orientação polarizada refletida pela organização dos seus heterodímeros (α- e β-tubulina), onde as extremidades “menos” estão direcionados para a região posterior da célula e as extremidades “mais” para a região anterior (ROBINSON et al., 1995). Este arranjo de microtúbulos é o principal responsável pela morfogênese celular nos diferentes estágios do ciclo de vida, é capaz de fornecer um arcabouço para a ancoragem e posicionamento exato das várias organelas intracelulares, e ajuda a direcionar a citocinese no processo de divisão celular. No caso do último, o citoesqueleto da célula filha se forma interdigitalmente aos microtúbulos pré-existentes de forma que a herança desta estrutura é semiconservativa (SHERWIN; GULL, 1989). Alternativamente, outra parte dos microtúbulos da célula é usada para a formação do axonema no flagelo.

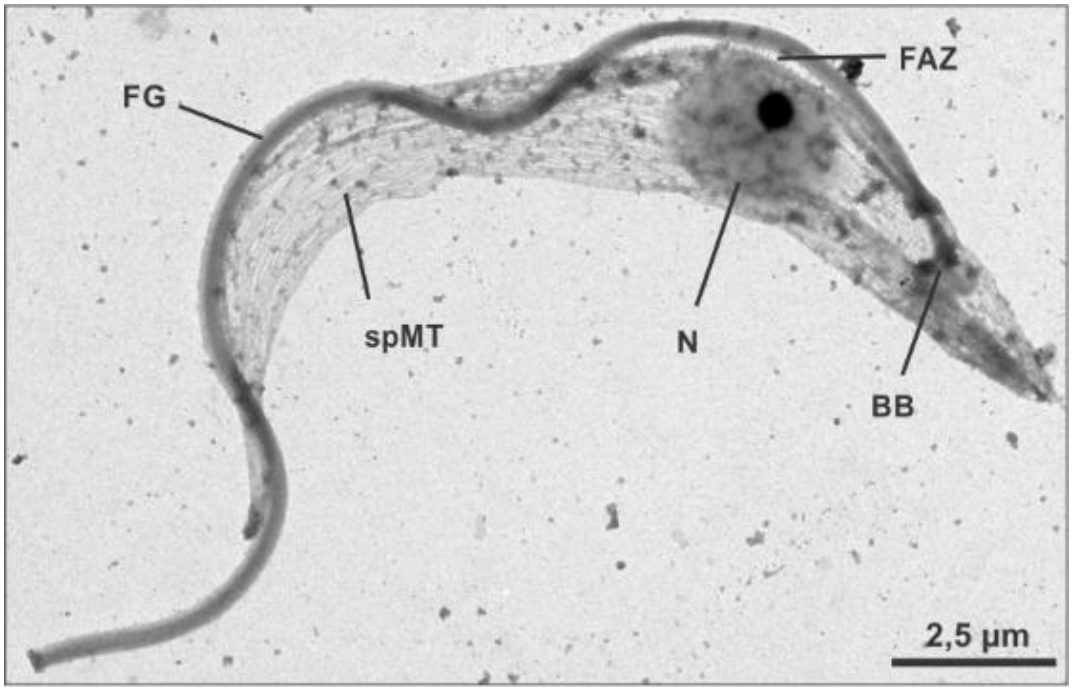


Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão do citoesqueleto de *T. brucei* após extração com detergente. FG – flagelo, spMT – microtúbulos subpeliculares, N – núcleo, BB – corpo basal, FAZ – zona de adesão flagelar. Elaborado pelo autor.

O flagelo é a estrutura mais proeminente e representa o motor mecanoquímico da célula, composto pelo axonema, PFR e proteínas motoras (BASTIN et al., 2000) (**Figs. 7 e 8A**). O axonema se forma na região anterior do BF onde o corpo basal, composto por 9 pares de microtúbulos sem o par central, associado ao corpúsculo pró-basal, servem como base para sua formação. O arranjo inicial de 9 pares sem o par central é chamado de zona de transição. Posteriormente se inicia o axonema propriamente dito com a formação clássica (9+2) de 9 pares de microtúbulos mais 2 microtúbulos centrais. A partir daí, o axonema emerge do BF e adjacente ao PFR se estende ao longo de todo corpo celular (**Fig. 8A**). O citoesqueleto flagelar está fortemente aderido à célula em diferentes porções: a base, na região anterior, está conectada ao corpo basal-cinetoplasto; a porção inicial dentro do BF está associado ao *bilobe*; enquanto toda sua porção extracelular (axonema + PFR) está conectada ao corpo celular pelo FAZ (**Fig. 8A**).

Na base do BF está o corpo basal (**Figs. 7 e 8**), que está fisicamente ligado ao cinetoplasto. As duas estruturas possuem uma complexa zona de transição composta de fibras estruturais que se conectam ao axonema. Para esclarecer a ligação física entre o cinetoplasto e o corpo basal através da membrana da mitocôndria, foram

realizados estudos com leishmanias lisadas hipotonicamente onde foi mostrado que a mitocôndria se tornava uma organela grande e inchada contendo o cinetoplasto, e geralmente estava associada ao corpo basal (SIMPSON, L., 1972). Estas observações, em conjunto com estudos da replicação do cinetoplasto (ROBINSON; GULL, 1991), serviram como evidência para esclarecer a presença deste complexo, que é chamado de complexo de adesão tripartido (TCA).

O axonema, localizado ainda dentro do BF, está associada a uma estrutura chamada *bilobe*. Ele está presente no CBF e se estende parcialmente até a porção exterior do BF (MORRISWOOD et al., 2009). O *bilobe* está intimamente associado ao citoesqueleto flagelar, ligado à base do flagelo e ao CBF, porém sua função ainda não está totalmente elucidada apesar de ter sido demonstrada sua relação com a biogênese do aparato de Golgi (HE; PYPAERT; WARREN, 2005). Estruturalmente, o *bilobe* apresenta-se em forma de anzol no qual o gancho está localizado adjacente ao CBF e a haste direcionada à região anterior da célula. Algumas proteínas foram caracterizadas como componentes do *bilobe*, como TbCentrin2, TbCentrin4, TbMORN1 e TbLRRP1, porém somente as duas últimas são exclusivas desta estrutura (ZHOU et al., 2010; ESSON et al., 2012).

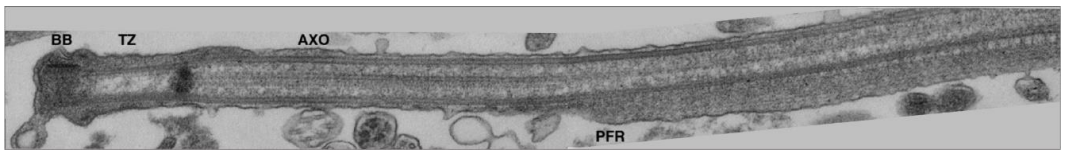


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do flagelo isolado de *T. brucei*. AXO – Axonema, BB – corpo basal, TZ – zona de transição, PFR – bastão paraflagelar. Adaptado de SUBOTA et al. (2014).

A porção externa do flagelo, é composta pelo axonema e PFR (**Figs. 8 e 9**). O PFR foi identificado pela primeira vez por VICKERMAN (1962) como a estrutura adjacente ao axonema exclusivamente na porção extracelular, sendo que ambas estruturas, axonema e PFR, estão envoltos inteiramente pela membrana celular. Por isso, esta estrutura está presente em formas morfológicas como epimastigotas e tripomastigotas, mas não em formas amastigotas do parasita. A principal função do PFR é fornecer sustentação ao axonema e mantê-lo aderido ao corpo celular, mas as implicações para as vantagens desta estrutura são diversas, desde o auxílio no batimento flagelar e motilidade celular como no auxílio para adesão na célula

hospedeira quando dentro do hospedeiro invertebrado (PORTMAN; GULL, 2010). Estudos iniciais identificaram duas principais e mais abundantes proteínas do PFR: PFR1 e PFR2. Desde então, e com o auxílio de estudos de proteoma e técnicas de bioquímica, bioinformática e imunologia, uma grande variedade de novas proteínas foram identificadas como componentes do PFR, já totalizando mais de 40 proteínas (PORTMAN; GULL, 2010). Estruturalmente, o PFR é uma estrutura complexa, trilaminar e entrelaçada com três domínios bem definidos: proximal, intermediário e distal (**Fig. 9**). O domínio proximal está conectado ao axonema, enquanto o distal é responsável pela adesão ao corpo celular.

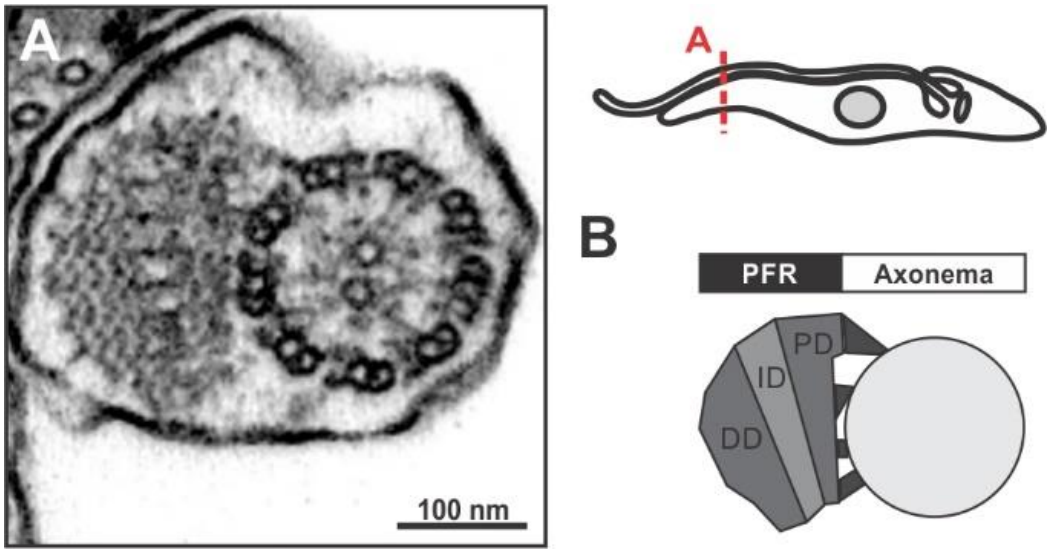


Figura 9: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal do flagelo de *T. brucei* [A] e esquema ilustrativo dos domínios do PFR [B]. PD – domínio proximal; ID – domínio intermediário; DD – domínio distal. Adaptado de PORTMAN e GULL (2010).

A maneira pela qual o PFR, e todo o flagelo, se aderem lateralmente ao corpo celular é realizado por uma estrutura chamada de zona de adesão flagelar (FAZ). Nas formas de tripanossomatídeos com flagelos aderidos, há um complexo sistema de conexões de membrana, composto por uma rede de longos e densos filamentos, e microtúbulos especializados que definem o FAZ ao longo de todo o corpo celular adjacente ao flagelo (GULL, 1999) (**Fig. 10**). O FAZ foi descrito como essencial para a morfogênese do parasita, sendo a principal estrutura responsável pela adesão flagelar (VAUGHAN et al., 2008; ROTUREAU et al., 2014), alterações morfológicas da célula (ZHOU et al., 2011; SUN et al., 2013; HAYES et al., 2014; SUNTER et al.,

2015a), e também essencial para o processo de citocinese durante a divisão celular (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002).

Estruturalmente o FAZ é organizado em cinco domínios estruturais principais: 1) FAZ flagelar, 2) FAZ intracelular, 3) FAZ filamento, 4) Quarteto de microtúbulos (MtQ) e 5) domínio de ligação MtQ-FAZ (**Fig. 10**). Apesar de apresentar domínios específicos, os componentes do FAZ ainda não estão totalmente caracterizados quanto à organização e disposição estrutural, e por isso estes 5 domínios foram subdivididos em oito zonas de acordo com a composição das proteínas atualmente descritas (SUNTER; GULL, 2016). Estas zonas se sobrepõe justamente para levar em consideração a limitação no que diz respeito à caracterização do FAZ. Basicamente, o filamento do FAZ presente no corpo celular (Zonas 5 e 6), por meio de conexões (Zona 8) está fisicamente associado um quarteto de microtúbulos subpeliculares (MtQ) (Zona 7), que por sua vez e estão associados a uma porção de retículo endoplasmático liso (**Fig. 10**). O filamento por sua vez está fisicamente conectado (Zona 4) aos complexos juncionais de membrana que se estendem até a membrana flagelar passando pelo domínio do FAZ intracelular (Zonas 2 e 3). Estes complexos juncionais são formados por botões adesivos intermembranares de aproximadamente 30 nm de diâmetro presentes do lado citoplasmático de cada membrana e espaçados por algo em torno de 122 nm de distância entre si (**Fig. 10A**). Do lado flagelar, os filamentos que irradiam destes complexos juncionais se conectam à região distal do PFR para fornecerem a adesão necessária para o flagelo (Zona 1) (**Fig. 10**).

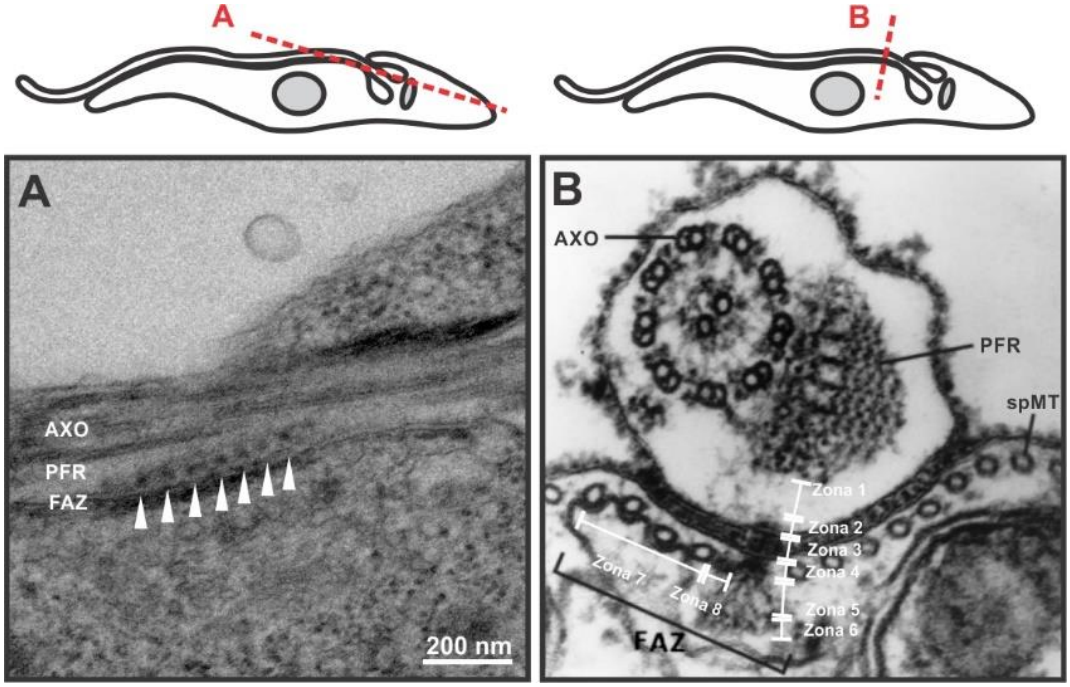


Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de seções ultrafinas de *T. brucei* evidenciando o flagelo e a zona de adesão flagelar cortados longitudinalmente [A] ou transversalmente [B]. Setas brancas [A] indicam os complexos juncionais presentes ao longo do FAZ. AXO – axonema; PFR – bastão paraflagelar; FAZ – zona de adesão flagelar; spMT – Microtúbulos subpeliculares. Elaborado pelo autor [A] ou adaptado de SUNTER e GULL (2016) [B].

No que diz respeito à sua composição, o FAZ apresenta uma grande variedade de proteínas. O primeiro componente identificado do FAZ de *T. brucei* foi a glicoproteína de superfície FLA1, homóloga à proteína GP72 presente no FAZ de *T. cruzi* (NOZAKI; HAYNES; CROSS, 1996). Mais tarde foi demonstrado que esta proteína era requerida para a adesão flagelar, citocinese e sua ausência levava à formação de células com fenótipo multinucleado, que embora realizavam mitose eram incapazes de separar-se em células filhas e acabavam morrendo (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002). Posteriormente, foi realizada a investigação de parceiros moleculares da FLA1, onde uma nova proteína ligadora de FLA1, chamada FLA1BP, foi identificada em formas procíclicas de *T. brucei* (SUN et al., 2013). Estas duas proteínas interagem de maneira que formam um zíper molecular que atua na adesão do flagelo ao corpo celular. FLA1 está ancorada na membrana do corpo celular enquanto FLA1BP está ancorada na membrana flagelar, e ambas estão voltadas para o espaço intracelular. A interação destas proteínas é essencial para a biogênese e adesão do flagelo e consequente formação e elongação do FAZ. A segunda proteína descrita na zona de adesão flagelar foi a FAZ1. Por meio do uso da técnica de RNAi,

foi realizado o silenciamento da expressão desta proteína o que acarretou no destacamento parcial do flagelo, formando alças ao longo da sua estrutura (VAUGHAN et al., 2008).

Os últimos anos, a partir de diversas técnicas de biologia molecular, bioquímica, bioinformática, e microscopia de alta resolução foi possível identificar uma grande quantidade de proteínas presentes no FAZ, sendo que atualmente a estrutura compreende mais de 30 proteínas (**Anexo 1**). Em 2015, por meio de técnicas de proteoma a partir da imunoprecipitação de FAZ1, e aliada a estudos de bioinformática foram identificadas nove proteínas novas do FAZ (FAZ2-10) (SUNTER et al., 2015b). Vale também ressaltar o estudo de proteoma do flagelo intacto de *T. brucei*, onde foi caracterizada uma família de proteínas flagelares associadas ao PFR (FLAM1, 2, 4, 5 e 7), o axonema (FLAM6), à porção distal do flagelo (FLAM8) e ao FAZ (FLAM3) (SUBOTA et al., 2014). Estudos posteriores mostraram que o silenciamento de FLAM3 por RNAi causa defeitos na motilidade e na morfogênese deste organismo (ROTUREAU et al., 2014). Das proteínas do FAZ recentemente descritas, uma que merece destaque é a proteína do tipo calpaína GM6 (ClpGM6). Esta é uma proteína de alta massa molecular localizada no domínio FAZ flagelar e foi demonstrada ser essencial para a morfogênese do *T. brucei*. Na sua ausência, formas tripomastigotas do parasita adquiriram uma morfologia do tipo epimastigota, com evidentes alterações no posicionamento do cinetoplasto e flagelo (HAYES et al., 2014). Apesar de muitas proteínas do FAZ terem sido identificadas nos últimos anos, grande parte ainda não foi caracterizada quanto a sua função biológica nos tripanossomatídeos.

1.7. Proteínas de alta massa molecular

Proteínas de alta massa molecular foram inicialmente descritas em músculo estriado de vertebrados e estão geralmente associadas a proteínas do citoesqueleto (WANG, K.; MCCLURE; TU, 1979; WANG, K.; WILLIAMSON, 1980; WANG, K., 1984). A titina, de massa molecular de cerca de 3800 kDa, confere propriedades de elasticidade passiva às fibras musculares e participa junto com a nebulina (900 kDa) e a obscurina (870 kDa) na montagem, estabilização e organização dos sarcômeros (LABEIT; KOLMERER, 1995; KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS; BLOCH, 2005; WITT et al., 2006). Além do seu papel celular como proteína estrutural e

sinalizadora, as proteínas gigantes também estão relacionadas a várias doenças dependendo do tipo de mutação que pode ocorrer nos seus genes (PELIN et al., 1999; HERMAN et al., 2012). A nível celular, outras proteínas gigantes do citoesqueleto de vertebrados também foram descritas, dentre elas as enaptinas ou nesprinas (~1000 kDa) (ZHANG et al., 2002; PADMAKUMAR et al., 2004), e as plectinas (~500 kDa) (SVITKINA; VERKHOVSKY; BORISY, 1996) que basicamente são elementos do citoesqueleto com domínios de ligação a outros parceiros celulares, como actina principalmente. As titinas e proteínas do tipo titina são componentes essenciais das células de vertebrados, entretanto proteínas gigantes também foram descritas em várias classes de invertebrados e denominadas de mini-titinas, de peso molecular de aproximadamente 500 a 900 kDa. Dentre elas podemos citar a projectina em *Drosophila* e abelhas (SAIDE, 1981; AYME-SOUTHGATE et al., 1991), a twitchina em *Caenorhabditis elegans* (BENIAN et al., 1989) e a conectina em lagostas (MANABE et al., 1993). Apesar dos papéis estruturais destas proteínas gigantes, as titinas e proteínas do tipo titina estão sendo cada vez mais estudadas pelas suas propriedades quinases e participações na sinalização celular, o que ressalta a importância destes componentes na biologia de vários organismos.

Em protozoários também já foram descritas proteínas gigantes. Em *Plasmodium falciparum* e *P. chabaudi* foram descritas duas proteínas, Pf11-1 e Pf332, de aproximadamente 1000 kDa e 2500 kDa respectivamente, que são sintetizadas pelo parasita durante seu estágio intraeritrocítico e exportadas para o citoplasma das hemácias onde regulam o processo de citoaderência da célula hospedeira (PETERSEN et al., 1990; MATTEI; HINTERBERG; SCHERF, 1992; GARCIA; ABRAHAMSON, 1995). Também no citoesqueleto de organismos de todos os gêneros da família Trypanosomatidae foram identificadas proteínas gigantes de alto massa molecular (**Fig. 11**). Em *T. cruzi*, proteínas gigantes (700-2500 kDa) estão associadas à região do FAZ e próximas ao MtQ do citoesqueleto subpelicular (RUIZ-MORENO et al., 1995). Em *Phytomonas serpens*, a proteína gigante Ps3500 (3500 kDa) foi identificada na zona de adesão flagelar, na extremidade anterior do citoesqueleto de microtúbulos na região do BF o que sugere sua participação na ligação desta estrutura com a membrana do flagelo (BAQUI et al., 1996). Em *Crithidia luciliae thermophila* foi descrita uma fosfoproteína gigante, chamada Ct2300 (2300 kDa), situada entre o vacúolo contrátil e a bolsa flagelar deste organismo onde sugere-se que participe do

processo osmorregulatório como uma proteína periférica de membrana (BAQUI et al., 2000a). Adicionalmente, também nos gêneros *Phytomonas*, *Leptomonas* e Le*i*shmania foram identificadas proteínas gigantes, Ps3500 (3500 kDa), Ls2500 (2500 kDa) e Lt1200 (1200 kDa) respectivamente, com localização predominante na região anterior das formas promastigotas, especificamente na região do BF, porém com função ainda desconhecida. Estas proteínas ainda compartilham propriedades físico-químicas como termoestabilidade além de coimunoprecipitarem com a tubulina, características inerentes aos componentes da família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (BAQUI et al., 2000b).

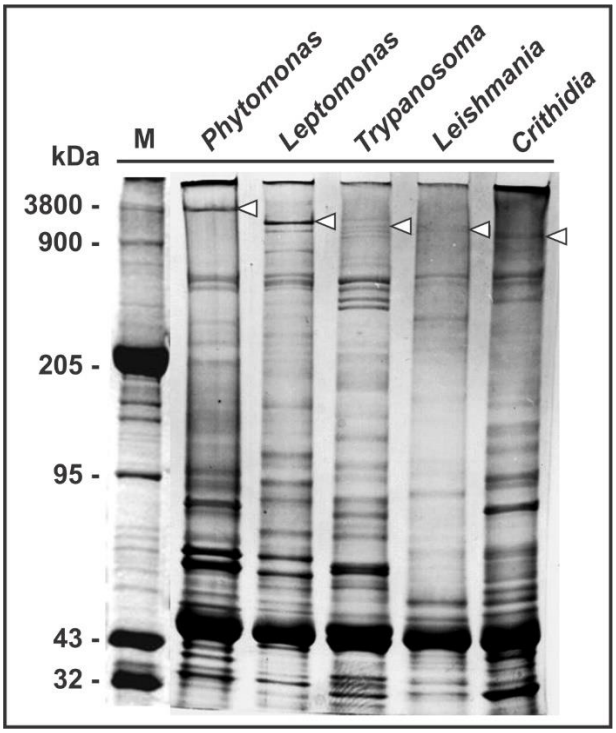


Figura 11: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do citoesqueleto de diversos membros da família Trypanosomatidae. M – miofibrila como marcador padrão. Setas brancas indicam as proteínas gigantes. Adaptado de BAQUI et al. (2000b).

Recentemente, duas proteínas de massa molecular elevada foram também identificadas e caracterizadas em *T. brucei*. A ClpGM6 e a FLAM3 são proteínas do FAZ flagelar que possuem massa molecular de aproximadamente 503 e 660 kDa, respectivamente (HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014). Outro exemplo, a FAZ10, identificada por MORRISWOOD et al. (2013) e caracterizada pelo nosso grupo (MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3**), foi inicialmente anotada como

um gene codante para uma proteína de massa aparente de 502 kDa (ASLETT et al., 2010).

Apesar dos recentes avanços na identificação e caracterização de proteínas dos protozoários, muitas delas ainda possuem função desconhecida, em especial as proteínas de alta massa molecular. O tamanho exacerbado desta proteínas é um obstáculo e causa limitações no uso de diversas técnicas de biologia celular e molecular para o estudo das mesmas. Portanto, faz-se necessária a utilização de metodologias alternativas capazes de fornecer informações sobre a função destas proteínas e a importância destas na biologia dos diversos organismos.

1.8. RNA de interferência em tripanossomatídeos

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo celular endógeno que age no controle pós-transcricional de RNA mensageiros (mRNA) por meio da inibição da tradução ou degradação dos mesmos por homologia entre as sequências. Este mecanismo é disparado pela presença de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) de origem endógena ou exógena, sendo chamados de pequenos RNAs de interferência (siRNA) ou micro RNAs (miRNA) dependendo das suas origens e características. Resumidamente, o mecanismo se baseia na formação de dsRNA para a degradação de mRNA complementares. Este dsRNA é processado pela enzima DICER, que cliva o dsRNA em siRNA de 20 a 25 nucleotídeos de tamanho. Este por sua vez, aciona o complexo RISC, onde uma fita antissenso do siRNA e o mRNA alvo complementar se unem para uma subsequente degradação do último pela atividade de nuclease de RISC (HANNON, 2002).

O fenômeno do RNAi foi observado na natureza pela primeira vez quando pesquisadores tentaram intensificar a cor de flores de petúnias pela introdução e superexpressão de um gene desta planta. Surpreendentemente eles observaram uma cossupressão resultando em flores brancas ou variegadas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Posteriormente, FIRE et al. (1998) injetaram moléculas senso e antissenso de dsRNA em *C. elegans* e viram que as mesmas foram suficientes para silenciar o gene homólogo. Este trabalho rendeu-lhes o Prêmio Nobel de Medicina de 2006. A maquinaria de RNAi já foi descrita em diversos organismos como mamíferos, invertebrados, fungos, plantas e protozoários parasitas. O RNAi em *T. brucei* foi

descrito pela primeira vez durante um estudo sobre processamento de mRNA nesta espécie (NGO et al., 1998). Neste trabalho eles observaram que dsRNA derivado a partir das sequências que codificam para o gene da α-tubulina, fazia com que as células de *T. brucei* se arredondassem, fenótipo conhecido como “FAT”. Curiosamente este foi um dos primeiros relatos da presença de RNAi em células eucarióticas após estudos em plantas e vermes. Vários tripanossomatídeos possuem maquinaria de RNAi endógena, incluindo *T. brucei spp.* e *T. congolense* (INOUE et al., 2002), entretanto o RNAi está ausente em *T. cruzi* e *Leishmania spp*.

A combinação de ferramentas genéticas disponíveis, com o genoma sequenciado, e várias questões a serem respondidas na biologia dos tripanossomas, fazem a utilização de RNAi como ferramenta molecular nestes organismos altamente relevante. Além da relevância de *T. brucei* para a saúde humana, este organismo bem como outros parasitas evolutivamente relacionados (e.g. *Leishmania*) são excelentes modelos para o estudo de processos intracelulares de células eucarióticas.

2. Objetivo

Identificar e caracterizar as propriedades celulares e moleculares das proteínas de alta massa molecular do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei* e investigar a importância das mesmas na biologia dos tripanossomatídeos.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar as proteínas gigantes do citoesqueleto de *T. brucei* por espectrometria de massas;
- Produzir anticorpos específicos contra as proteínas gigantes;
- Utilizar métodos de microscopia ótica e eletrônica para determinar a localização das proteínas gigantes nos tripanossomatídeos;
- Caracterizar o papel funcional das proteínas gigantes pelo modelo do RNA de interferência.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo dos parasitas

Para o cultivo de *T. brucei* foram usadas formas tripomastigotas procíclicos (PCF) da cepa 427 cultivados em meio SDM-79 (LGC Bio, São Paulo, BRA) suplementado com 7,5 mg/L de hemina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SBF) (Life Technologies – Califórnia, EUA) em estufa a 28 °C, como descrito por BRUN e SCHONENBERGER (1979). Formas tripomastigotas sanguícolas (BSF) foram cultivadas em meio HMI-9 (Life Technologies) suplementadas com 20% de SBF em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 (HIRUMI; HIRUMI, 1989). Para os ensaios de RNAi foram usadas as linhagens 29-13 de PCF ou 90-13 de BSF (WIRTZ et al., 1999). As mesmas condições de cultivo foram utilizadas porém com um SBF livre de tetraciclina (Clontech, Takara Bio Company, California, EUA).

Para cultivo de *T. cruzi* na forma epimastigota, os parasitas foram cultivados em meio LIT (5 g infusão de fígado (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA); 5 g triptose (BD Biosciences); 4 g NaCl (Sigma-Aldrich); 0,4 g KCl (Sigma-Aldrich); 2 g glicose (Sigma-Aldrich); 8 g de Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich), pH 7,2 contendo 10 mg de hemina bovina por 1 L de solução) à 28 °C contendo 10% SBF e 0,1 g/L de estreptomicina e ampicilina (Life Technologies). Para cultivo de *L. major* na forma promastigota, os parasitas foram cultivados em meio LIT à 26 °C contendo 10% SBF e 0,1 g/L de estreptomicina e ampicilina.

3.2. Extração do citoesqueleto e do flagelo

A extração do citoesqueleto total e isolamento do flagelo foram realizados segundo BAQUI et al. (2000b). Pelo menos 10^9 parasitas foram coletados por centrifugação, lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) e ressuspendidos em tampão de lise (50 mM HEPES (Sigma-Aldrich) pH 6,9; 0,1 mM EDTA (Sigma-Aldrich); 5 mM EGTA (Sigma-Aldrich); 2 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich)) contendo 1% de detergente não-iônico (NP-40, Sigma-Aldrich) na presença de inibidores de proteases e fosfatases (2 µg/ml aprotinina (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml antipaína (Sigma-Aldrich),

0,5 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 10 µM leupeptina (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich), 0,5 mM benzamidina (Sigma-Aldrich), 1 mM Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich), e 5 mM NaF (Sigma-Aldrich)). O *pellet* contendo o citoesqueleto foi coletado por centrifugação a 10000 RPM à 4 ºC por 10 minutos e lavado com PBS na presença de inibidores de proteases e fosfatases. Posteriormente a amostra foi tratada com 5 µg/mL de DNAse I (Sigma-Aldrich) mais 1 mM $MgCl_2$ em PBS durante 5 minutos no gelo. A amostra foi centrifugada nas mesmas condições citadas e o sobrenadante proveniente da lise celular e o *pellet* do citoesqueleto foram coletados. Para as análises por SDS-PAGE, foram adicionados ao *pellet* do citoesqueleto tampão de amostra (100 mM Tris (Sigma-Aldrich) pH 8,0; 4% SDS (Bio-Rad Laboratories); 20% glicerol (Sigma-Aldrich); 200 mM DTT; 0,002% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)) na proporção de 10 µL para cada $1x10^7$ parasitos. Ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra 4X na mesma proporção citada anteriormente para o *pellet*. Para obtenção da fração enriquecida em flagelo, o *pellet* do citoesqueleto foi ressuspendido em tampão de alta força iônica (50 mM Tris pH 7,2; 1 M NaCl) contendo inibidores de proteases e fosfatases e incubado no gelo por 45 minutos. O *pellet* referente ao flagelo e o sobrenadante do citoesqueleto solubilizado foram coletados após centrifugação a 10000 RPM. O *pellet* foi ainda lavado com PBS uma vez antes de ser adicionado tampão de amostra na mesma proporção usada para o citoesqueleto. Ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra 4X na mesma proporção que o sobrenadante da lise celular.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas as amostras de proteína provenientes dos parasitas, lisado total ou citoesqueleto, foram submetidas à análise por SDS-PAGE em gel de gradiente 2,5%-12,5% acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) sem o gel de empilhamento (GRANZIER; WANG, 1993; BAQUI et al., 1996). Os géis foram corados com *Coomassie blue* (Bio-Rad Laboratories) ou pelo método da coloração por prata, e o marcador utilizado em todos as análises foi a miofibrila de músculo esquelético de coelho preparado em nosso laboratório, segundo GRANZIER e WANG (1993). A bandas deste marcador são referentes aos seguintes tamanhos: 3800 kDa (titina), 900

kDa (nebulina), 205 kDa (miosina), 95 kDa (α-actinina), 43 kDa (actina) e 23 kDa (tropomiosina).

Amostras provenientes da expressão heteróloga de proteínas em procariotos foram submetidas ao fracionamento por SDS-PAGE (12% gel de separação e 4% gel de empilhamento de acrilamida/bis-acrilamida), segundo SAMBROOK e RUSSELL (2001). Os marcadores utilizados foram descriminados em cada experimento, e os géis foram corados com *Coomassie blue*.

3.4. Produção de anticorpos policlonais

Para produção de anticorpos contra as proteínas gigantes, amostras do citoesqueleto de *T. brucei* foram analisadas por SDS-PAGE e as bandas referentes às regiões de proteínas de alto massa molecular foram recortadas diretamente do gel. Cada pedaço foi emulsificado em PBS e Adjuvante Completo de Freud (EMD Millipore, Massachusetts, EUA) e injetado via subcutânea em camundongos machos da linhagem Balb/C de 6 a 8 semanas de idade. Em intervalos de dezoito dias o processo foi repetido mais duas vezes utilizando-se Adjuvante Incompleto de Freud (EMD Millipore). Dezoito dias após a terceira imunização os camundongos foram anestesiados por via inalatória (Isofluorano, Baxter International, Illinois, EUA) e o sangue coletado e imediatamente processado. A amostra de sangue foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, seguida de incubação à 37 ºC por duas horas e à 4 ºC *overnight*. Posteriormente a amostra foi centrifugada 10000 RPM e o soro foi recuperado e estocado a -20 ºC. A atividade do soro foi determinada por imunofluorescência e *Western Blotting* (WB).

Os procedimentos com animais, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 014/2012) estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (**Anexo 2**).

3.5. Imunoprecipitação das proteínas de alta massa molecular

Para ensaios de imunoprecipitação foi utilizada amostra de flagelo purificado obtido como descrito no tópico de extração de citoesqueleto e isolamento do flagelo. O *pellet* do flagelo foi solubilizado na proporção de 500 µL de tampão por 10^9 parasitos em tampão RIPA (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% deoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich); 1% NP-40) na presença de inibidores de proteases e fosfatases como descrito anteriormente. Após 10 minutos no gelo, a amostra foi submetida à sonicação por três vezes de 20 segundos a 70% de amplitude e incubada no gelo por 30 minutos. Após a centrifugação a 10000 RPM por 10 minutos a 4 ºC, o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi coletado e 200 µL desta fração foi diluída em 1 volume de tampão NETN (20 mM Tris-Cl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40).

Para a imunoprecipitação, a amostra foi incubada com anticorpo pré-imune de camundongo (fração denominada *pre-clear*) por 1 a 2 horas à 4ºC com agitação em aparelho Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, DEU). Posteriormente foram adicionados 30 µL de Proteína A-sepharose (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, GRB) e a amostra foi incubada por 1 hora sob as mesmas condições. Após centrifugação a 12000 RPM por 2 minutos, ao sobrenadante foi adicionado os antissoros das proteínas gigantes (anti-PG1, 1:25; anti-PG2, 1:25; anti-FAZ10, 1:50) e a amostra foi incubada *overnight* a 4 ºC sob agitação. Então foi adicionado 50 µL de Proteína A-sepharose e a amostra (IP) foi incubada por 1 hora sob as mesmas condições. A amostra foi centrifugada a 12000 RPM por 2 minutos e o sobrenadante foi retirado. Os *pellet*s de Proteína A-sepharose (*pre-clear* e IP) foram lavados mais quatro vezes com tampão NETN, sendo uma delas com o tampão contendo 500 mM de NaCl. Ao *pellet* final foi adicionado 80 µL de tampão de amostra 2X e com incubação a 95 ºC por 5 minutos antes de ser analisado por SDS-PAGE.

3.6. Western Blotting

As amostras proteicas analisadas inicialmente por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories) no equipamento PowerPac HC (Bio-Rad, Califórnia, EUA) por 2 horas a 70 V em tampão de

transferência (156 mM Tris; 1,21 M glicina (Bio-Rad Laboratories)) em banho de gelo. Após a membrana ser corada com solução Ponceau S (Sigma-Aldrich) para verificação do processo de transferência, ela foi lavada três vezes com água milli-Q ou tampão TBST (200 mM Tris; 1,37 M NaCl; 0,05% Tween20 (Sigma-Aldrich)) e bloqueada com solução TBST contendo 5% de leite em pó desnatado por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com TBST e incubada durante 1 hora e meia sob leve agitação com anticorpo primário (**Tab. 1**) diluído no mesmo tampão. A membrana foi novamente lavada por três vezes com TBST antes de ser incubada com o anticorpo secundário (**Tab. 1**) correspondente conjugado com HRP (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) por 1 hora sob as mesmas condições anteriores. Por último, a membrana foi lavada duas vezes com TBST. A reação de revelação foi realizada com o reagente ECL TM (GE Healthcare) em sala escura e o resultado adquirido em filme fotográfico Hyper-filmTM MP (GE Healthcare).

Tabela 1: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de WB.

Nome	Antígeno	Diluição	Origem	Referência
anti-PG1	Proteínas de alta massa molecular da Zona 1	1:3000	Lab. Prof.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-PG2	Proteínas de alta massa molecular da Zona 2	1:1000	Lab. Prof.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-βTUB	β-tubulina	1:10000	SIGMA	-
anti-PFR	PFR	1:1000	Lab. Prof. Dr. Sérgio Shenckman	-
anti-FAZ10	Região C-terminal FAZ10	1:500	Lab. Prof.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-EF1α	EF1α	1:10000	Millipore	-
anti-c-myc 9E10	c-Myc *tag*	1:1000	Lab. Dr. Ramanujan Hegde	-
Anti-GST	GST *tag*	1:10000	Millipore	-
Goat anti-IgG	IgG camundongo	1:12000	Thermo Fisher Scientific	-

3.7. Imunofluorescência e Microscopia Confocal

A imunofluorescência indireta do citoesqueleto total foi realizada como descrito por BAQUI et al. (2000a). Os parasitas foram coletados em fase exponencial de

crescimento, lavados duas vezes com PBS e depositados sobre lâminas de vidro tratadas com 0,01% poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). A fixação foi realizada com 3,6% de paraformaldeído (EM Sciences, Norte Vancouver, CAN) por 10 minutos e a permeabilização foi feita com 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 5 minutos, ambas em PBS e a temperatura ambiente. Após o bloqueio com 2% BSA (Sigma-Aldrich) em PBS por 30 minutos, os parasitas foram incubados com anticorpos primários e em seguida com os anticorpos secundários (**Tab. 2**) conjugados a fluoróforos, sob as mesmas condições do bloqueio. O núcleo e o cinetoplasto foram marcados com DAPI (Thermo Scientific) e as preparações foram visualizadas no Microscópio de Epifluorescência DMI4000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, DEU; Laboratório do Prof. Marcelo D. Gomes, Departamento de Bioquímica, FMRP/USP) ou no Microscópio Confocal SP5 Leica (Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal/LMMC, Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP).

Para amostras provenientes dos ensaios de RNAi, com a finalidade de visualização dos fenótipos, contagem dos núcleos e cinetoplastos, avaliação do destacamento do flagelo e medição da distância dos núcleos e cinetoplastos, os parasitos foram depositados em lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina, fixados com 3,6% de paraformaldeído e corados com DAPI. As lâminas foram montadas para visualização no microscópios citados acima.

Tabela 2: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de imunofluorescência e Microscopia Confocal.

Nome	Antígeno	Diluição	Origem	Referência
anti-PG1	Proteínas de alta massa molecular da zona 1	1:300	Lab. Dr.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-PG2	Proteínas de alta massa molecular da zona 2	1:300	Lab. Dr.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-AcetTUB	Tubulina acetilada	1:400	Sigma-Aldrich	-
anti-β-TUB	β-tubulina	1:500	Sigma-Aldrich	-
L3B2	FAZ1	1:5	Lab. Dr. Keith Gull	(KOHL; SHERWIN; GULL, 1999)
anti-PFR	PFR	1:200	Lab. Dr. Sérgio Shenckman	-
anti-FAZ10	Região C-terminal FAZ10 / N-terminal	1:50	Lab. Dr.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-Tb927.8.3540	Região C-terminal FAZ10 / N-terminal	1:50	Lab. Dr.ª Munira M. A. Baqui	Este trabalho
anti-TbMorn1	TbMorn1	>1:2500	Lab. Dr. Bruce Morriswood	(MORRISWOOD et al., 2009)
YL1/2	Tubulina tirosinada	1:600	Millipore	-
anti-myc 4E6	Myc tag	1:300	Millipore	-

continua

continuação

Tabela 2: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de imunofluorescência e Microscopia Confocal.

Nome	Antígeno	Diluição	Origem	Referência
AlexaFluor 488	IgG camundongo / coelho	1:500	Life Technologies	-
AlexaFluor 594	IgG camundongo / coelho / rato	1:500	Life Technologies	-
AlexaFluor 633	IgG camundongo	1:500	Life Technologies	-

3.8. Espectrometria de Massas

Para determinação da sequência primária de aminoácidos por espectrometria de massas, as zonas de interesse do gel foram recortadas e lavadas com PBS três vezes por 5 minutos. As amostras foram sequenciadas por Veritas Biotecnologia Ltda., Incubadora Supera - Campus USP em Ribeirão Preto, Brasil.

As bandas foram submetidas à digestão tríptica para análise por espectrometria de massas avançada segundo protocolo da empresa. Inicialmente as bandas foram extensivamente lavadas com solução de 50 mM bicarbonato de amônio contendo 50% de acetonitrila, sendo em seguida lavadas com acetonitrila 100%. Foram adicionados 25 mg de DTT (GE Healthcare) para a redução das pontes de dissulfeto das proteínas. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, a amostra foi alquilada com 75 mg de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro. As bandas foram então secas no aparelho *speed-vac* e incubadas com 0,2 µg de tripsina (Promega, Wiscosin, EUA) diluída em bicarbonato de amônio 50 mM. A digestão foi mantida a 37°C, durante a noite. A extração dos peptídeos resultantes foi realizada inicialmente com solução de acetonitrila 50% / ácido fórmico 2%, seguida de re-extração com acetonitrila 100% / ácido fórmico 2%, por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação a cada 15 minutos.

As amostras processadas conforme descrito acima, foram secas e analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ-ORBITRAP (Thermo-Finnigan, California, EUA) acoplado a um sistema de cromatografia de *nanoflow* (LC-MS/MS), disponível em parceiro da Veritas no exterior. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo CPAS (*Computational Proteomics Analysis System*) (RAUCH et al., 2006). Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade foram então agrupados em proteínas, utilizando-se o algoritmo *Protein Prophet* e foi gerada uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 2,0%. O banco de dados utilizado foi o TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/) (ASLETT et al., 2010).

3.9. Extração de DNA genômico

Um total de 10^8 parasitos foram coletados por centrifugação (500 g, 10 min, 4°C) e lavados com PBS por duas vezes. Posteriormente, foram ressuspendidos em 1 mL de DNAzol (Invitrogen, Califórnia, EUA) e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, após centrifugação a 13000 RPM, o sobrenadante foi coletado, lavado com 500 µL de 100% etanol (Sigma-Aldrich), com posterior lavagem com 70% etanol. Após secagem o *pellet* foi eluído em 50µL de tampão TE (10 mM Tris-Cl; pH 8,0; 0,1 mM EDTA).

3.10. PCR e clonagem dos vetores plasmidiais

O primeiro passo para a clonagem dos genes de interesse foi o desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação das mesmas usando o programa DNAStar EditSeq (Lasergene, Madinson, EUA), e os sítios de restrição EcoRI e XhoI foram adicionados nas sequências *forward* e *reverse*, respectivamente (**Tab. 3**). Todos os fragmentos de interesse são de 750 pares de bases exceto para o Tb927.8.3540 C-terminal que possui somente 500 pares de base, devido a existência de um sítio de clivagem para a trombina no final da sua sequência.

Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação das regiões N- e C-terminais das ORFs candidatas. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição EcoRI e XhoI, respectivamente.

Gene	Região/Sentido	Sequência 5'-3'
FAZ10	N-terminal / *Forward*	CGGAATTCATGGCAACCGCCGAAGGCCA
FAZ10	N-terminal / *Reverse*	GC**CTCGAG**GTCAGTACCGGACCTCGACC
FAZ10	C-terminal / *Forward*	CGGAATTCAGCGAAGAGAACGCTGCCC
FAZ10	C-terminal / *Reverse*	GC**CTCGAG**TCAATGGTGCGCCCACGGC
Tb927.08.3540	N-terminal / *Forward*	CGGAATTCATGAGCTATACTAATCAGTGCG
Tb927.08.3540	N-terminal / *Reverse*	GC**CTCGAG**CTTGGTCGACGACGGTTGCA
Tb927.08.3540	C-terminal / *Forward*	CGGAATTCACAGCGCTTTCGGGAAATGACA
Tb927.08.3540	C-terminal / *Reverse*	GC**CTCGAG**TCATTTGCTTTCGATTGAGGCG

A reação de amplificação pela PCR foi realizada sob as seguintes condições: tampão de amplificação 10X, 10 mM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados), 10mM de oligonucleotídeos iniciadores (*forward* e *reverse*), 500 ng de DNA genômico de *T. brucei*, 2 unidades de Taq Polimerase (Promega) e a reação foi ajustada com água ultra pura para 50 µL. Foi usado o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) e a temperatura de pareamento foi ajustada para cada par de oligonucleotídeos e o programa padronizado foi o seguinte: 95 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, temperatura de pareamento por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto finalizando com um passo de 5 minutos a 72 °C. Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato (40 mM Tri, pH 8,5; 2 mM EDTA; 20 mM ácido acético) e brometo de etídio foi utilizado para a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados por meio do kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, GER), dosados no espectrofotômetro BioSpectrometer Kinetics (Eppendorf, Hamburgo, GER) e 100 ng de cada fragmento foram usados na reação de ligação para subclonagem no sistema TOPO (Invitrogen).

A reação de ligação foi realizada a temperatura ambiente por 15 minutos de acordo com o fabricante e foi usada para a transformação de bactérias DH5α cálcio-competentes. Para cada transformação, um tubo contendo 150 µL de bactéria competente foi incubado com 10 µL da reação de ligação por 30 minutos no gelo. A

transformação foi feita por choque térmico incubando as bactérias por 90 segundos à 42°C seguidos de incubação por 2 minutos no gelo. Posteriormente foram adicionados 800 µL de meio SOC em cada tubo e as culturas incubadas a 37 °C por 90 minutos para recuperação das bactérias e expressão do marcador de seleção. Finalmente 150 µL de cada cultura foram plaqueadas em LB sólido contendo 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), 2% de X-Gal (Sigma-Aldrich) e 20% de IPTG (Sigma-Aldrich). Após 16-18 horas as colônias transformantes recombinantes foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina.

Para a retirada dos fragmentos do vetor TOPO foram realizados ensaios de digestão enzimática com as duas enzimas de restrição inseridas nos oligonucleotídeos inicialmente (EcoRI e XhoI) (**Tab. 3**). A reação foi realizada sob as seguintes condições: tampão de digestão 10X, 5 u de cada enzima de restrição, 3 µg de DNA plasmideal e o volume ajustado com água ultra pura. A reação foi incubada a 37 °C por 4 horas para digestão completa do DNA e os fragmentos liberados foram separados em gel de agarose 1 % e purificados a partir do gel através do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). O mesmo procedimento de digestão enzimática dupla e purificação foi usado para a preparação do vetor pGEX-4T-1 (**Fig. 12**). Após a purificação, as amostras foram dosadas no espectrofotômetro e a reação de ligação de cada fragmento no vetor foi escalonada na proporção 3:1 (fragmento:vetor) em tampão de ligação adicionando-se 5 u de enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). As reações foram incubadas a 15 °C overnight e purificadas antes de serem utilizadas na transformação de bactérias. A purificação foi feita do seguinte modo: primeiramente foi adicionado 0,1 volume de acetado de sódio 3 M pH 5,5 e 3 volumes de etanol 100% seguida de incubação a -20 °C durante a noite. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 14000 RPM por 40 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O *pellet* foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado (sem ressuspender o *pellet*) e em seguida foi feita mais uma centrifugação a 10000 RPM por 5 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado à temperatura ambiente até secar. Finalmente o *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de água ultra pura e 10 µL do vetor ligado ao fragmento foram usados na transformação de bactérias cálcio competentes.

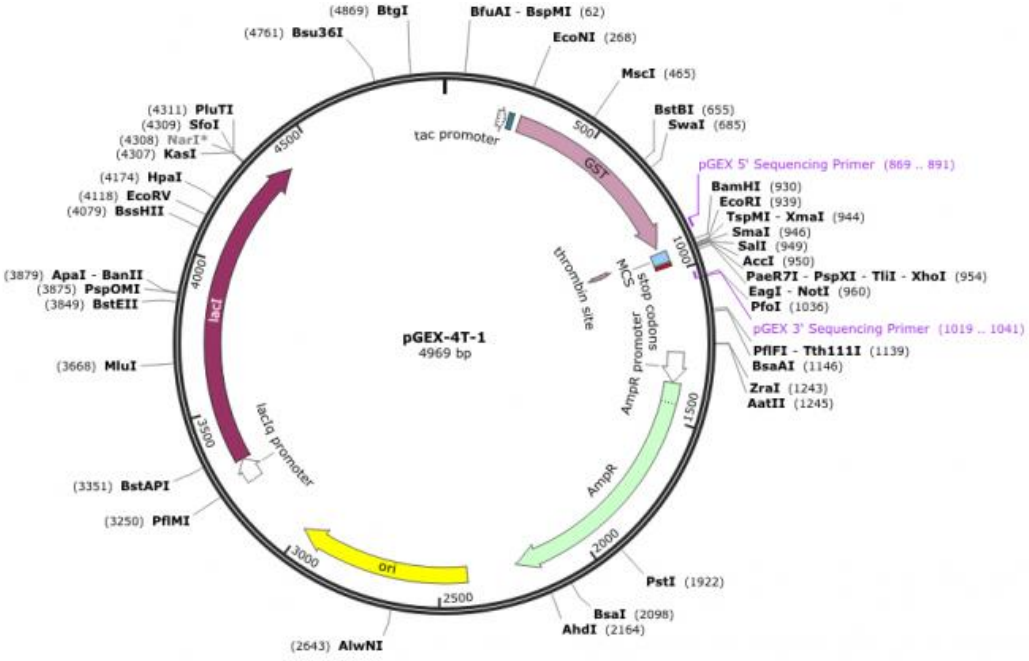


Figura 12: Mapa circular do vetor plasmideal pGEX-4T-1. As clonagem foram feitas na região *poli-linker in frame* com a sequência codante da GST.

3.11. Expressão e purificação das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto

Os vetores pGEX-4T-1 contendo os fragmentos das proteínas de interesse fusionadas a GST foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* BL21star cálcio-competentes. Para padronização da expressão foi realizado o seguinte protocolo: inicialmente foi feito um pré-inóculo de uma colônia em 3 mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubado a 37 °C, *overnight* a 180 RPM. Posteriormente, 500 µL foram inoculados em 50 mL de LB líquido contendo ampicilina e incubados sob as mesmas condições até a cultura alcançar a fase logarítmica com OD (densidade ótica) igual ou inferior a 0,6. Neste momento foi adicionado 0,2 mM de IPTG à cultura e a mesma incubada por 4 horas. Ao término da incubação, a cultura foi coletada, medida a sua OD e centrifugadas por 1 minuto a 10000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% NP-40) gelado na proporção de 1 mL de tampão para cada 10 mL de meio adicionando-se coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich). Em seguida foi adicionado 0,5 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich) e

a amostra incubada no gelo por 30 minutos antes do processo de sonicação (70%, pulso de 2 segundos por 1 min e 30 s). A amostra foi incubada no gelo por 30 minutos e o processo de sonicação foi repetido sob as mesmas condições. Finalmente as amostras de proteínas recombinantes foram centrifugadas a 12000 RPM por 15 minutos à 4 °C e o sobrenadante separado do *pellet*. Foi adicionado tampão de amostra nas duas frações, que foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE (12%).

3.12. Clonagem das proteínas gigantes à cauda myc

Para fusionar a cauda myc (12 c-MYC – EQKLISEEDL) na região C-terminal das proteínas de interesse foi utilizado o vetor plasmideal pNATx^{TAG} (**Fig. 13**). Este vetor possibilita a marcação *in situ* de genes com uma cauda de myc para expressão constitutiva em *T. brucei*.

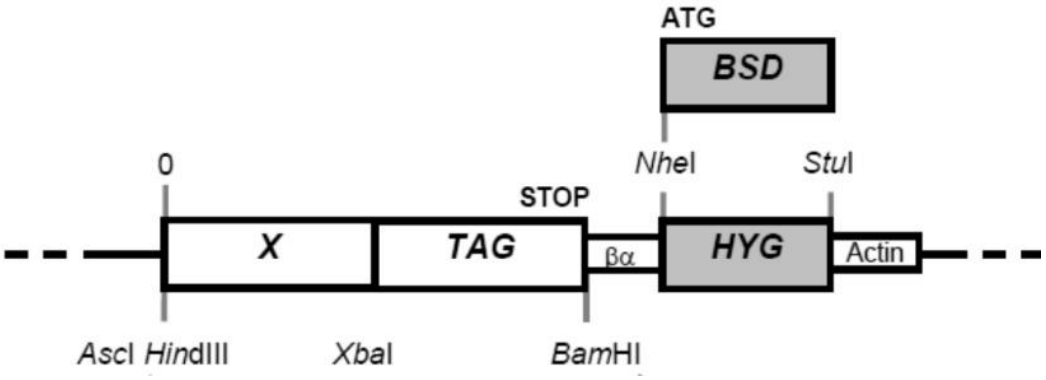


Figura 13: Esquema do vetor pNATx^{TAG} com os sítios de restrição disponíveis para clonagem do fragmento de interesse na região X.

O primeiro passo para a clonagem dos genes de interesse envolveu o desenho dos pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação da região C-terminal dos genes de interesse sem o códon de parada. Os oligonucleotídeos selecionados para amplificação de fragmentos da FAZ10 e Tb927.8.3540 estão descritos na Tabela 4. Os procedimentos para a PCR, purificação das reações, análise em gel de agarose, ensaios de digestão enzimática e ligação dos fragmentos ao vetor foram realizados como descritos acima na seção “PCR e Clonagem dos vetores plasmidiais”.

Tabela 4: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição HindIII e XbaI, respectivamente.

Gene	Região/Sentido	Sequência 5'-3'
FAZ10:myc C-term	*Forward*	CGCAAGCTTGACAAAAAGTTCCGTGACG
FAZ10:myc C-term	*Reverse*	CGC**TCTAGA**ATGGTGCGCCCATGGCCCT
Tb927.08.3540:myc C-term	*Forward*	CCCAAGCTTTTCCACTTCTGCCTAATTAA
Tb927.08.3540:myc C-term	*Reverse*	CCC**TCTAGA**TTTGCTTTCGATTGAGGC

Após a finalização da clonagem, o vetor deve ser linearizado em sítio único de restrição dentro da sequência clonada. Uma vez linearizado, o vetor é integrado ao genoma do parasita por recombinação homóloga, resultando na integração da sequência clonada com myc no locus nativo. O procedimento de transfecção das células é o mesmo utilizado para geração das linhagens de RNAi, descrito abaixo no tópico "Transfecção do *Trypanosoma brucei*".

3.13. Clonagem para silenciamento das proteínas gigantes por RNAi

Para a estratégia de silenciamento por RNAi, escolhemos o modelo que utiliza o vetor plasmideal p2T7-177 (WICKSTEAD; ERSFELD; GULL, 2002) e as linhagens 29-13 (PCF) ou 90-13 (BSF) de *T. brucei*. O vetor p2T7-177 é caracterizado pela presença de promotores T7 orientados em direção oposta, flanqueando a região de clonagem e controlados pelo operador da tetraciclina (tetO) (**Fig. 14A**). Por sua vez, as linhagens parentais contem vetores integrados estavelmente no seu genoma que são necessários para a expressão da T7 polimerase de bacteriófago (T7RNAP) bem como do repressor do operador da tetraciclina (tetR) (**Fig. 14B-C**).

Uma vez que o fragmento (de aproximadamente 500 bp) do gene de interesse é clonado neste vetor, o mesmo é linearizado em um sítio único para NotI, o qual está localizado dentro da sequência 177-*targeting*. Esta sequência corresponde a uma região do genoma do *T. brucei* onde o vetor será integrado. A transfecção dos parasitos é feita por eletroporação e dentro da célula o vetor linearizado é integrado

por recombinação homóloga no genoma, exatamente na região presente no vetor. Após a seleção dos clones transformantes positivos, o silenciamento do gene de interesse é feito por meio da adição da tetraciclina ou doxiciclina ao meio de cultura. Uma vez adicionada à cultura, a droga se liga nos dois tetR flanqueadoras do fragmento do gene de interesse, liberando os dois promotores teto. Com isso a T7RNAP fará a transcrição bidirecional do fragmento, o qual acarretará na geração de fitas duplas de RNA complementares ao RNA mensageiro do gene de interesse que será silenciado pela maquinaria endógena do RNAi do parasita.

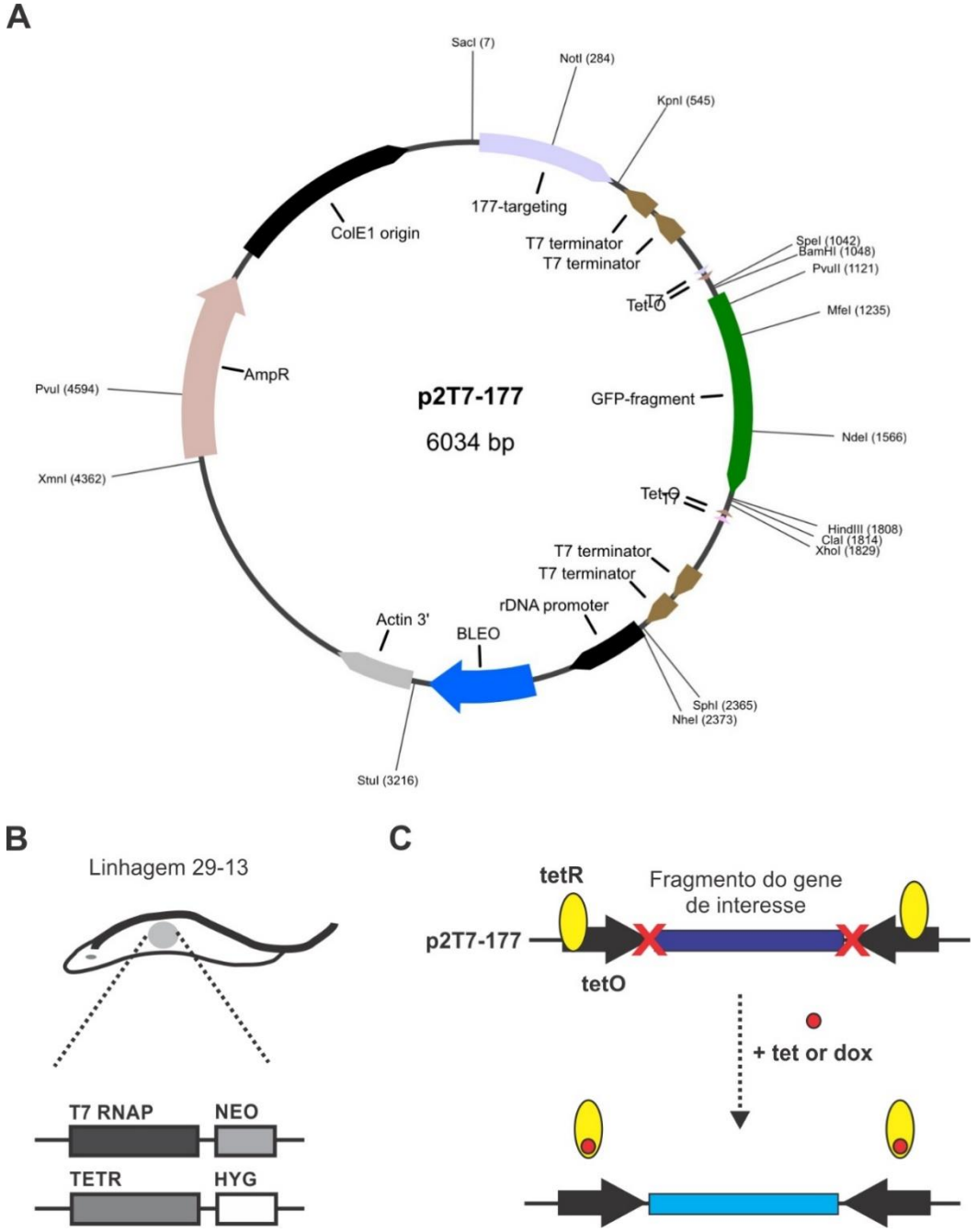


Figura 14: [A] Mapa esquemático do vetor p2T7-177. O vetor contém dois promotores T7 regulados pelo operador da tetraciclina (TetO), uma região 177 (177-targeting) com sítio único de clivagem por NotI, o gene de resistência a ampicilina (AmpR), e o marcador de seleção fleomicina (BLEO). [B] Desenho do background genético da linhagem 29-13 contendo a T7RNAP e a TETR selecionados por NEO e HYG, respectivamente. [C] Esquema do operador da tetraciclina: o repressor TetR se liga no sítio TetO inibindo a transcrição do gene de interesse pela T7 RNAP. Na presença de tetraciclina ou doxiciclina, esta se liga ao repressor tetR inibindo sua ligação ao promotor tetO que permanece livre permitindo a transcrição pela T7RNAP.

O primeiro passo para a clonagem dos genes de interesse compreendeu o uso da ferramenta RNAit (http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/software/RNAit.html)

(REDMOND; VADIVELU; FIELD, 2003), o qual faz a escolha da melhor região alvo do silenciamento além de gerar o par de oligonucleotídeos específicos para amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 nucleotídeos. Os oligonucleotídeos selecionados para amplificação de fragmentos da FAZ10 e Tb427.8.3540 estão descritos na Tabela 5. Os procedimentos experimentais para a PCR, purificação das reações, análise em gel de agarose, ensaios de digestão enzimática e ligação dos fragmentos ao vetor foram realizados como descritos na seção "PCR e Clonagem dos vetores plasmidiais".

Tabela 5: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição SpeI e HindIII, respectivamente.

Gene	Região/Sentido	Sequência 5'-3'
FAZ10 RNAi	*Forward*	CGCACTAGTCCGACCTACATACAGCGGTT
FAZ10 RNAi	*Reverse*	CGC**AAGCTT**TGATGAAGAGCAACGTGGAG
Tb427.08.3540 RNAi	*Forward*	CGCACTAGTAGCACAAGTTCCGTTGCTTT
Tb427.08.3540 RNAi	*Reverse*	CGC**AAGCTT**GTAGATGGCACCATAGCCGT

3.14. Transfecção do *Trypanosoma brucei*

Para transformação da linhagem 29-13 ou 90-13 de *T. brucei* com os vetores de interesse, tanto para silenciamento por RNAi como para expressão endógena das proteínas fusionadas ao myc, foram utilizados 7,5 µg de vetor linearizado para cada eletroporação. A cultura de tripanossomas foi mantida na fase exponencial e 3 a $6x10^7$ células foram usadas por transfecção. As células foram coletas por centrifugação (500 g, 4 °C, 10 min) e lavadas uma vez com tampão *Cytomix* (0,1 M tampão fosfato pH 7,6; 25 mM HEPES; 2 mM EGTA; 120 mM KCl; 0,15 mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich); 5 mM $MgCl_2$; 0,5% glicose; 100 µg/mL BSA; 1 mM hipoxantina (Sigma-Aldrich)). As células foram ressuspendidas em 500 µL de *Cytomix*, transferidas para cubetas de

eletroporação de 4 mm previamente resfriadas no gelo e então adicionados 5 a 10 µg do vetor plasmideal linearizado. Imediatamente as células foram submetidas a eletroporação no aparelho BioRad Gene Pulser II com a seguinte configuração: 1500 V e 25 µF, 2 pulsos. Também foi realizada uma transfecção controle sem DNA. Imediatamente, as células foram transferidas para 10 mL de meio SDM-79 pré-aquecido (28 °C) e incubadas por 12 horas antes de se adicionar as drogas para seleção dos transformantes, dependendo dos vetores utilizados: G418 (15 µg/mL, SIGMA) e Higromicina (50 µg/mL, SIGMA), Zeocina (10 µg/mL, Invitrogen) ou fleomicina (10 µg/mL, Life Technologies), e Blasticidina (10 µg/mL); dependendo dos vetores utilizados. As células foram cultivadas por aproximadamente 7 dias onde se observou uma diferença significativa no crescimento das células transformadas em comparação às células controle (transformada sem DNA). O último passo foi a seleção clonal dos transfectantes e para isso foi realizado a técnica de diluição limitante (**Fig. 15**). Para cada cultura transformada, foi realizada a contagem da densidade celular e realizada uma diluição limitante de 200 células/mL em um volume total de 20 mL de meio condicionado (SDM-79 contendo 15% SBF e 40% de meio SDM-79 usado e filtrado) pré-aquecido a 28 °C. Desta primeira diluição foram retirados 500 µL e diluídos em 19,5 mL de meio condicionante pré-aquecido resultando em uma concentração de 5 células/mL. Para cada diluição foram aliquotados 200 µL por poço em uma placa de 96 poços. As placas foram seladas com Parafilm® e incubadas em estufa a 28 ou 37 °C por duas a três semanas para crescimento dos clones. Assim que foi observado o crescimento dos clones por meio da mudança de cor do meio de cultura nos poços da placa (**Fig. 16**), estes foram transferidos para placas com poços maiores adicionando-se meio de cultura até atingir volume suficiente para transferir para garrafas de cultura.

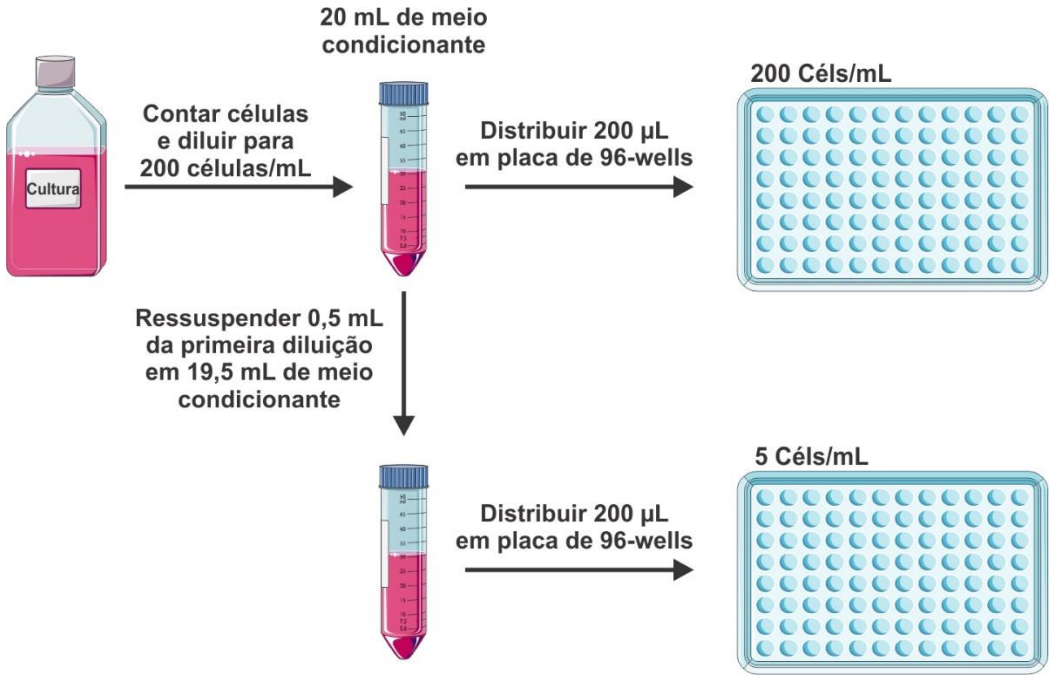


Figura 15: Desenho experimental do método de diluição limitante. Para cada transfecção, foram feitas duas diluições (200 células/mL e 5 células/mL) que foram plaqueadas e incubadas em cultura por pelo menos duas semanas. Os clones isolados foram congelados e analisados independentemente.

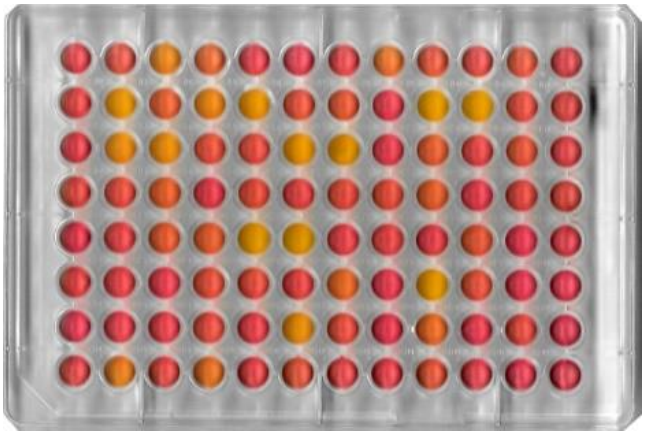


Figura 16: Placa de cultura de 96 poços após método de diluição limitante das células transfectadas. Após 2 semanas, alguns poços apresentaram crescimento (amarelo) e estes clones foram transferidos para garrafas de cultura e congelados.

3.15. Preparação do lisado celular total

Nos experimentos de indução do RNAi, amostras proteicas das culturas foram obtidas por meio do lisado celular total. As células foram centrifugadas, lavadas uma vez com tampão PBS, e ressuspendidas em tampão de amostra para análise em SDS-PAGE no equivalente a 25 µL de tampão para cada $5x10^6$ células. A amostra foi

vortexada, aquecida a 95 °C por 5 minutos e estocadas a –20 °C até o uso. Para ensaios de SDS-PAGE e WB, o equivalente a $5x10^6$ células foram utilizadas por canaleta.

3.16. Análise do ciclo celular e avaliação da adesão flagelar

A densidade da cultura foi monitorada diariamente por meio do hemocitômetro (Câmara de Neubauer). Para as curvas de crescimento, as culturas foram iniciadas com $1x10^6$ células por mL e foram diluídas para esta concentração toda vez que atingissem aproximadamente de 2 a $4x10^6$ células por mL.

A análise do ciclo celular foi realizada pela contagem de células nos diferentes estágios do ciclo celular. O preparo das amostras está descrito na seção "Imunofluorescência e microscopia confocal". Pelo menos 300 células foram contadas em cada ponto do experimento.

Para avaliação do destacamento do flagelo, as mesmas amostras utilizadas na análise do ciclo celular foram utilizadas na contagem de células contendo flagelo destacado ou aderido ao corpo celular. Pelo menos 300 células foram contadas em cada ponto do experimento.

3.17. Medições morfogênicas

Imagens de imunofluorescência de células marcadas com DAPI foram utilizadas para calcular o posicionamento dos núcleos e cinetoplastos em forma de coordenadas, e as medições foram realizadas por meio do software ImageJ (Rasband, W.S., NIH, Bethesda, Maryland, EUA, http://imagej.nih.gov/ij/). Para este cálculo, foram utilizados somente células 2N2K (2 núcleos e 2 cinetoplastos) antes ou no início do processo citocinese. Inicialmente foi traçado um eixo X conectando os núcleos posterior e anterior. O eixo y foi traçado em cima do núcleo posterior transversalmente ao eixo x. A partir daí foram obtidas para cada célula as coordenadas (x, y) do posicionamento dos cinetoplastos anterior e posterior, a distância entre os dois núcleos, e também o comprimento da célula. As coordenadas foram plotadas no gráfico cartesiano e o comprimento da célula e a distância entre os dois núcleos foram plotados como a média de todos os eventos.

3.18. Imunomarcação e Microscopia eletrônica

Para a imunomarcação do citoesqueleto de *T. brucei*, o procedimento foi realizado segundo (ROBINSON; GULL, 1991; BAQUI et al., 1996). Os parasitas foram depositados sobre telas de níquel cobertas com *formvar*-carbono e 0,01% de poli-L-lisina por 30 minutos. Inicialmente centrifugamos $5x10^7$ células por 5 minutos a 800 g e foram feitas duas lavagens com PBS 1X e ressuspendidas em 500 µL do mesmo tampão. As telas foram colocadas sobre gotas de 50 µL de parasitos por 10 minutos. Posteriormente, as telas contendo os parasitas aderidos foram lavadas com tampão PEME (100 mM PIPES (Sigma-Aldrich) pH 6,9, 1 mM $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich), 0,1 mM EDTA, 2 mM EGTA) contendo 1% de NP-40 na presença de inibidores de proteases por 3 minutos. Este passo foi repetido uma vez e então as grades foram fixadas com 3,7% de paraformaldeído e 0,01% de glutaraldeído em tampão PEME por 15 minutos. Em seguida, as telas foram lavadas com 20 mM de glicina em PBS por 15 minutos e bloqueadas com 2% BSA em PBS por 1 hora. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário (anti-FAZ10, 1:5 e/ou anticorpo anti-myc (coelho), 1:10 fornecido por Dr Ramanujan Hegde, Cambridge, UK) diluído em tampão de bloqueio por 1 hora. As grades foram lavadas pelo menos cinco vezes por 5 minutos com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal (anti-IgG de camundongo 6 nm, ou anti-IgG de coelho 15 nm, 1:40, EMS, Hatfield, EUA) do mesmo modo. Após mais 5 lavagens as telas foram refixadas com 2,5% glutaraldeído por 15 minutos e coradas negativamente com 2% de molibdato de amônio (Sigma-Aldrich) pH 6,9 por 2 minutos.

Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de cortes ultrafinos, os parasitas foram fixados em 2% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) e 2% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich), pós fixados em 1% tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich), e bloqueados com 2% de acetato de uranila em 0,1 M de acetato de sódio (pH 5,0). As amostras foram desidratadas em etanol, posteriormente em óxido de propileno e em seguida incubadas em resina (Embed 812, EM Sciences). Cortes ultrafinos foram coletados em Pioloform (Ted Pella, Redding, EUA) e grades cobertas com carbono. O contraste foi feito com acetato de uranila e citrato de chumbo (MOREIRA, J. E. et al., 1991). As telas obtidas nos dois procedimentos descritos acima foram observadas em microscópio eletrônico

Philips 100XC (LMME, Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP) ou a 120 kV em microscópio eletrônico Tecnai G2 (Laboratório de Ultraestrutura Celular e Molecular, Departamento de Patologia e Medicina Forense, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos parasitas, o procedimento foi realizado segundo SANT'ANNA et al. (2005). Resumidamente, as células foram fixadas em 2,5% glutaraldeído em PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente as células foram tratadas com tetróxido de ósmio e depositas em laminas pré tratadas com poli-L-lisina. Após três lavagens com PBS, as células foram desidratadas em concentrações progressivas de álcool (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A amostra desidratada foi levada para uma câmara isolada e CO_2 líquido foi injetado à 4 °C com posterior aquecimento até 40 °C. As amostras foram então impregnadas com ouro e as imagens foram adquiridas no microscópio Jeol JSM-6610 LV (LMME, Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

3.19. Bioinformática

A busca por ortólogos das proteínas gigantes foi realizada através do banco de dados TriTrypDB. Para análise dos padrões de repetição da FAZ10, foram construídas expressões regulares na ferramenta RegExr v2.0 (http://www.regexr.com/) para procurar, identificar e separar padrões repetitivos nas sequencias obtidas. A similaridade entre as sequencias foi analisada por BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (ALTSCHUL et al., 1990) e para o alinhamento usamos o Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (SIEVERS et al., 2011). A análise filogenética foi realizada no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007) e a árvore foi obtida usando o método de *Neighbor-joining* com 5000 replicações *bootstrap*, segundo GALETOVIC et al. (2011). As sequencias consenso foram representadas por logos produzidas pelo WebLogo version 2.8.2 (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) (CROOKS et al., 2004). Para análise da estrutura das proteínas foram usados os programas COILS (LUPAS; VAN DYKE;

STOCK, 1991), CDD (Conserved Domain Database) (MARCHLER-BAUER et al., 2013), e TMHMM (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004).

4. Resultados

4.1. Detecção das proteínas gigantes no citoesqueleto de *T. brucei*

A identificação das proteínas gigantes de *T. brucei* foi realizada inicialmente fracionando o citoesqueleto que é bastante estável, após a lise do parasita com detergente. As amostras do citoesqueleto de procíclicos de *T. brucei* foram analisadas em gel de gradiente linear (2,5% a 12,5%) de poliacrilamida (SDS-PAGE); onde foi observado a presença de proteínas de alta massa molecular dividas em duas zonas de baixa mobilidade eletroforética (**Fig. 17A**). A Zona 1 representa as bandas de proteínas com baixa mobilidade no gel, correspondendo aos tamanhos aproximado de 2000-4000 kDa. As bandas da Zona 2 possuem proteínas que migram no gel com tamanho aproximado de 500 kDa. Estes valores da massa molecular são baseados na migração da titina presente na miofibrila e que usamos de rotina no laboratório (**Fig. 17A**).

Posteriormente, produzimos anticorpos contra as bandas de proteínas de alta massa molecular. As bandas foram cortadas do gel e usadas para a imunização de camundongos e produção de soros policlonais. Estes soros foram utilizados em análises por WB para determinação da especificidade dos mesmos, e em ensaios de imunofluorescência para determinar a localização celular das proteínas gigantes em *T. brucei*. Os soros produzidos foram chamados de anti-PG1 e anti-PG2, de acordo com as bandas recortadas do gel (**Fig. 17B**). Como observado, os soros produzidos foram capazes de reconhecer as bandas referentes às suas respectivas zonas do gel em ensaios de WB sendo que os mesmos apresentaram boa reatividade e especificidade quando usados contra amostras do citoesqueleto total de *T. brucei*.

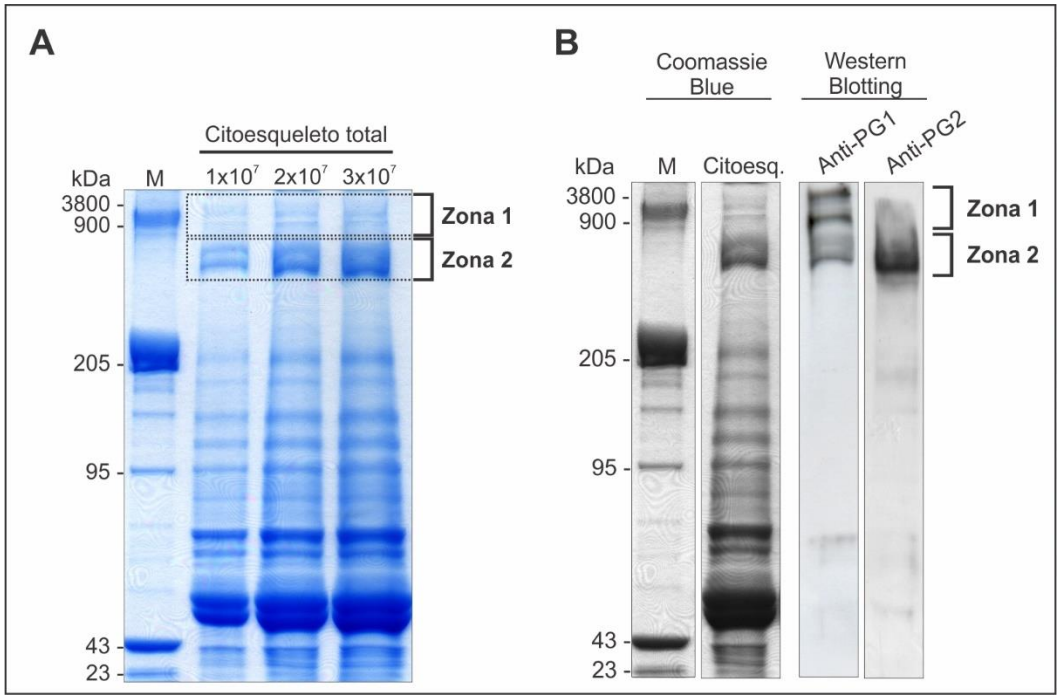


Figura 17: Proteínas gigantes do citoesqueleto total de *T. brucei* PCF analisado por SDS-PAGE. [A] Foi adicionado em cada canaleta a quantidade de proteína referente a 1-3x10^7 parasitos. M - marcador proveniente da miofibrila de músculo esquelético de coelho. Corado com *Coomassie blue*. [B] WB da amostra do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 e revelado com peroxidase HRP conjugado ao anticorpo secundário.

Posteriormente, fizemos um isolamento de diferentes frações da preparação do citoesqueleto (**Fig. 18A**). Para se obter o citoesqueleto total dos parasitas é necessária a utilização de um tampão de lise contendo detergente. Após centrifugação obtivemos o *pellet* do citoesqueleto (P1) e a fração solúvel em detergente do lisado celular (S1). O citoesqueleto foi então solubilizado em tampão de alta força iônica (S2) e com isso o flagelo (P2) foi isolado desta fração (**Fig. 18A**). Estas amostras foram analisadas por SDS-PAGE (**Fig. 18B**). A partir disto, foi realizado o WB destas frações para avaliar em qual delas se encontrariam as proteínas reconhecidas por anti-PG1 e anti-PG2. Como observado, anti-PG1 reconheceu bandas na fração P1 e P2, além da marcação de uma banda na fração S2. Não foi detectada marcação na fração S1 por anti-PG1 (**Fig. 18C**). Enquanto isso, anti-PG2 reconheceu proteínas na região de 500kDa correspondentes à Zona 2 n as frações do citoesqueleto P1 e P2, além de duas bandas de aproximadamente 95 kDa na fração S1 (**Fig. 18D**).

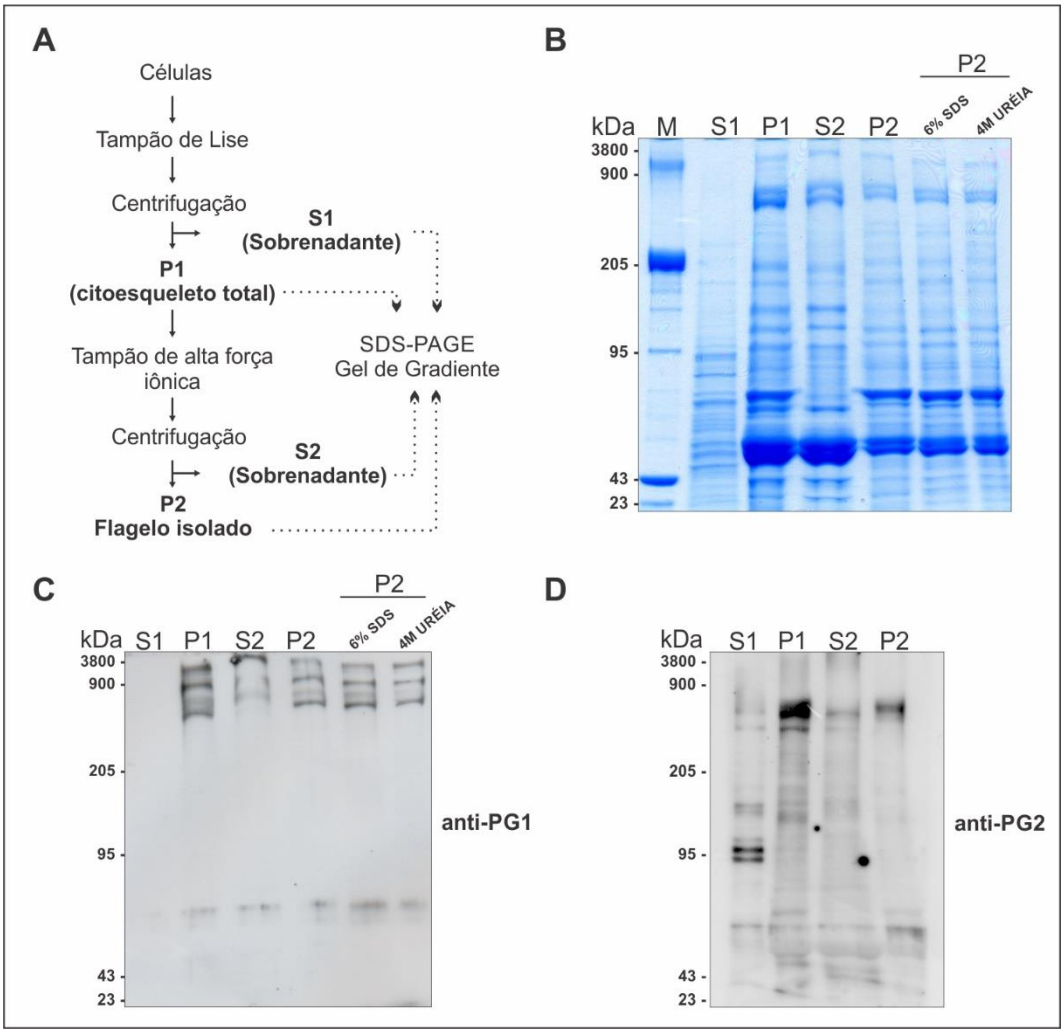


Figura 18: Detecção das proteínas de alto peso molecular nas frações do citoesqueleto de *T. brucei*. [A] Representação básica do protocolo de obtenção das frações do citoesqueleto. [B] SDS-PAGE em gel de gradiente 2,5%-12,5% das frações do citoesqueleto. M – marcador, S1 – sobrenadante da lise celular, P1 – citoesqueleto, S2 – fração solúvel em 1M NaCl, F1 – flagelo. Corado com *Coomassie blue*. [C-D] WB das amostras produzidas em [B] usando anti-PG1 ou anti-PG2.

Para ensaio de imunoprecipitação (IP) foi necessário solubilizar o citoesqueleto em condições não desnaturantes. Para isso, solubilizamos o citoesqueleto em tampão RIPA seguido de sonicação, e o sobrenadante (solúvel) foi utilizado para a IP. Foi realizado WB para comprovar a solubilidade das proteínas do citoesqueleto inclusive das proteínas de alta massa molecular (**Fig. 19A**). A amostra solúvel foi utilizada para imunoprecipitação usando os antissoros anti-PG1 e anti-PG2, na qual ambos imunoprecipitaram as proteínas específicas correspondentes às bandas detectadas por WB (**Fig. 19B**). Anti-PFR e anti-βTUB foram usados como controle das frações solubilizadas.

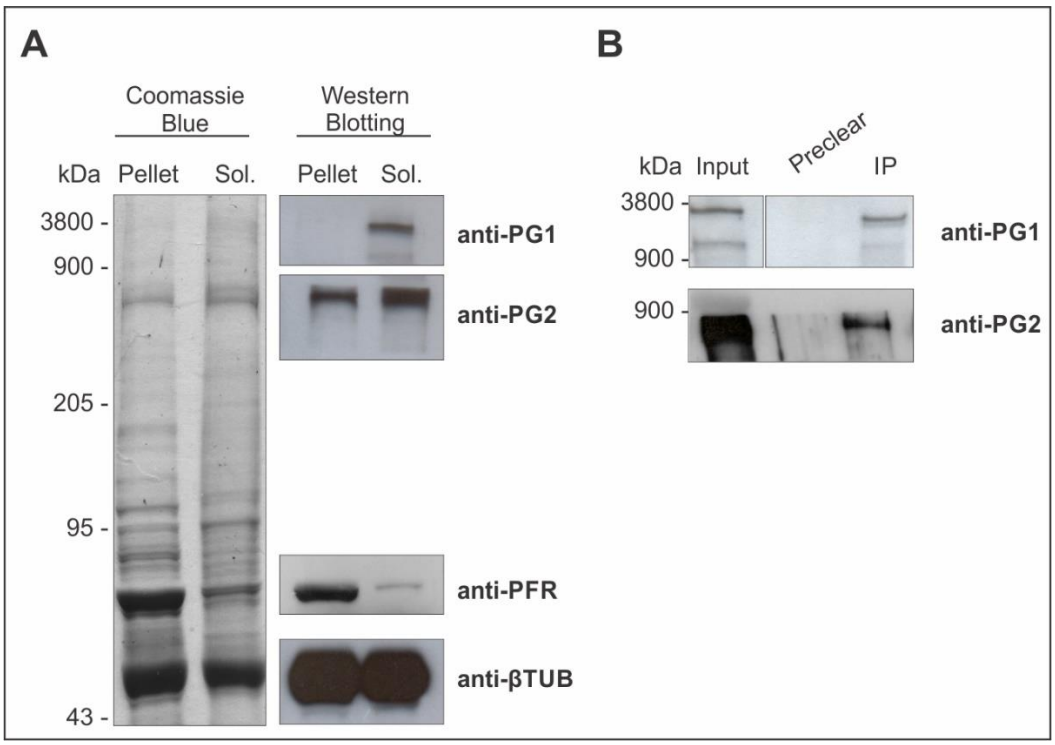


Figura 19: Avaliação da reatividade e especificidade dos antissoros produzidos contra as proteínas de alta massa molecular. [A] Solubilização do citoesqueleto total de *T. brucei* para ensaio de imunoprecipitação. WB foi utilizado para confirmar a solubilização das proteínas usando anticorpos contra as proteínas gigantes (anti-PG1 e anti-PG2), proteína do bastão paraflagelar (anti-PFR) e β-tubulina (anti-βTUB). [B] WB da imunoprecipitação das proteínas gigantes usando anti-PG1 e anti-PG2.

4.2. Localização celular das proteínas gigantes de *T. brucei*

Nos ensaios de imunolocalização do citoesqueleto nas formas procíclicas e sanguícolas de *T. brucei*, os soros anti-PG1 e anti-PG2 marcaram regiões celulares específicas. Anti-PG1 marcou a região de adesão flagelar, local entre o corpo do parasita e o flagelo, estendendo-se desde a base do flagelo no BF até sua porção distal, porém a marcação é ausente na ponta livre do flagelo (**Fig. 20A**). Por sua vez, anti-PG2 apresentou marcação especificamente adjacente ao cinetoplasto (**Fig. 20B**). Em ambos os casos, a marcação está presente nas estruturas duplicadas durante a divisão celular (**Fig. 20A, B**).

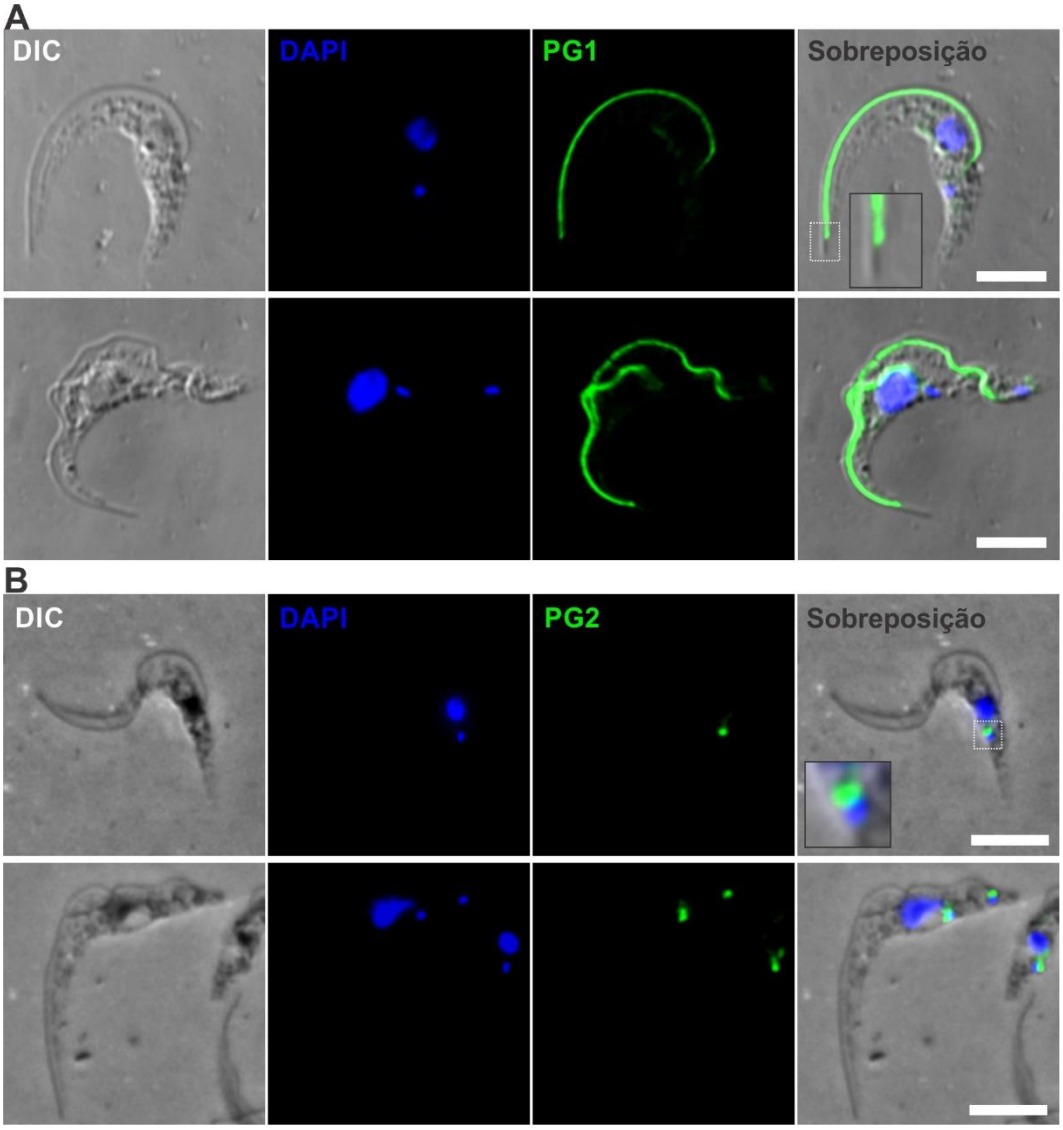


Figura 20: Distribuição celular das proteínas gigantes no citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta das proteínas de alta massa molecular usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizado por microscopia confocal [A] ou microscópio de epifluorescência [B]. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 5 µm.

As marcações observadas nas formas sanguícolas apresentaram a mesma distribuição visualizadas nas formas procíclicas do parasita. O anti-PG1 marcou a região de adesão flagelar, localizada entre o flagelo e o corpo celular, enquanto anti-PG2 marcou uma região adjacente ao cinetoplasto (**Fig. 21**).

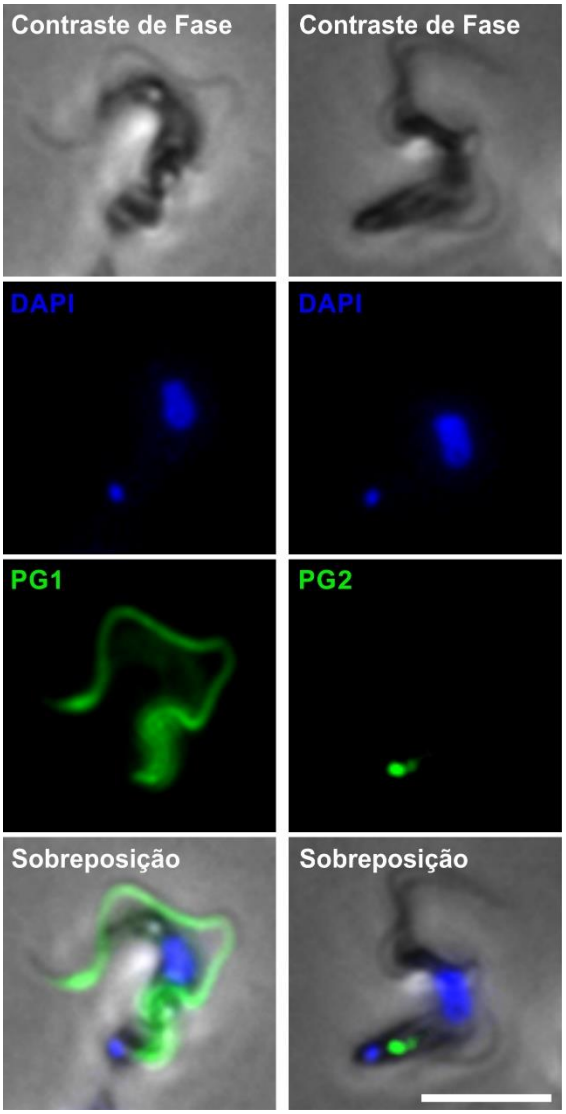


Figura 21: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* BSF usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar núcleo e cinetoplasto. Barra = 5 µm.

Com o objetivo de investigar detalhadamente a distribuição das proteínas gigantes no citoesqueleto evidenciadas pelos dois anticorpos, realizamos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre os antissoros policlonais produzidos contra as proteínas de alta massa molecular (anti-PG1 e anti-PG2) e os anticorpos específicos contra estruturas específicas do citoesqueleto de *T. brucei*. No caso de anti-PG1 que marca na zona de adesão flagelar, utilizamos anti-tubulina acetilada, para visualizarmos os microtúbulos do axonema e corpo celular, ou anti-PFR para visualizarmos o PFR. A marcação de anti-PG1, embora distribuída ao longo do flagelo não se co-localiza com os microtúbulos do axonema nem do corpo celular situando-se entre estas duas estruturas (**Fig. 22A**). Por sua vez, o anti-PFR também não

apresenta co-localização com a anti-PG1 apesar da distribuição ser próxima (**Fig. 22B**). Detalhadamente, a análise por microscopia confocal da marcação tripla entre estes três anticorpos (anti-PG1, anti-PFR e anti-AcetTUB) revelou que anti-PG1 está distribuída entre o PFR e os microtúbulos subpeliculares do corpo celular (**Fig. 22C, D**). Esta disposição indica que anti-PG1 marca a região da zona de adesão flagelar, uma vez que a marcação entre anti-PG1 e L3B2 (FAZ1) se co-localizam (**Fig. 22E**).

Para anti-PG2 que apresenta uma distribuição adjacente ao cinetoplasto, avaliamos a sua distribuição em relação aos anticorpos anti-MORN1, específico para a proteína TbMorn1 situada no *bilobe*, e ao anticorpo YL1/2, o qual em *T. brucei* identifica um agregado de tubulina tirosinada presente na região do TCA do flagelo. A marcação de anti-PG2 está localizada entre o cinetoplasto e TbMorn1 (**Fig. 23A, B**). Quando foi feito a dupla marcação utilizando o anticorpo YL1/2, podemos observar a co-localização entre os dois anticorpos, o que sugere que anti-PG2 marca exclusivamente proteínas do complexo de adesão tripartido ou TCA, responsável por conectar a base do flagelo ao cinetoplasto por meio de fibras que atravessam a membrana do bolso flagelar e citosol até a membrana da mitocôndria (**Fig. 23C, D**).

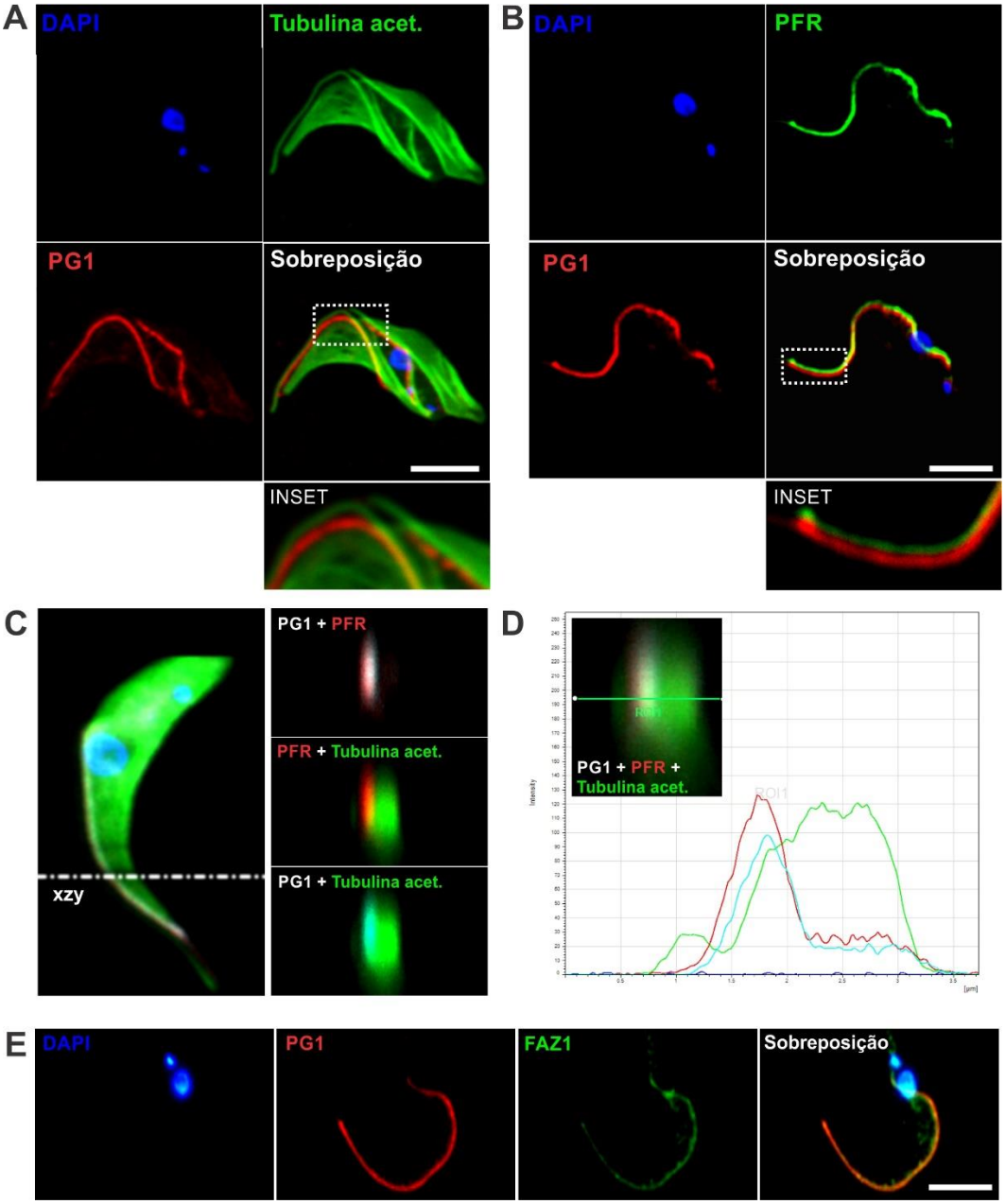


Figura 22: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. [A-B] Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG1 e anti-AcetTUB (tubulina acetilada) ou anti-PFR (PFR). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM. [C-D] Imunofluorescência tripla da distribuição da marcação dos anticorpos usados em A e B com avaliação da distribuição de fluorescência na estrutura. A distribuição da fluorescência corresponde ao segmento demarcado pela reta xzy. DAPI foi usado para visualizar os núcleos e os cinetoplastos. [E] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* marcado com anti-PG1 (PG1) e L3B2 (FAZ1). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM.

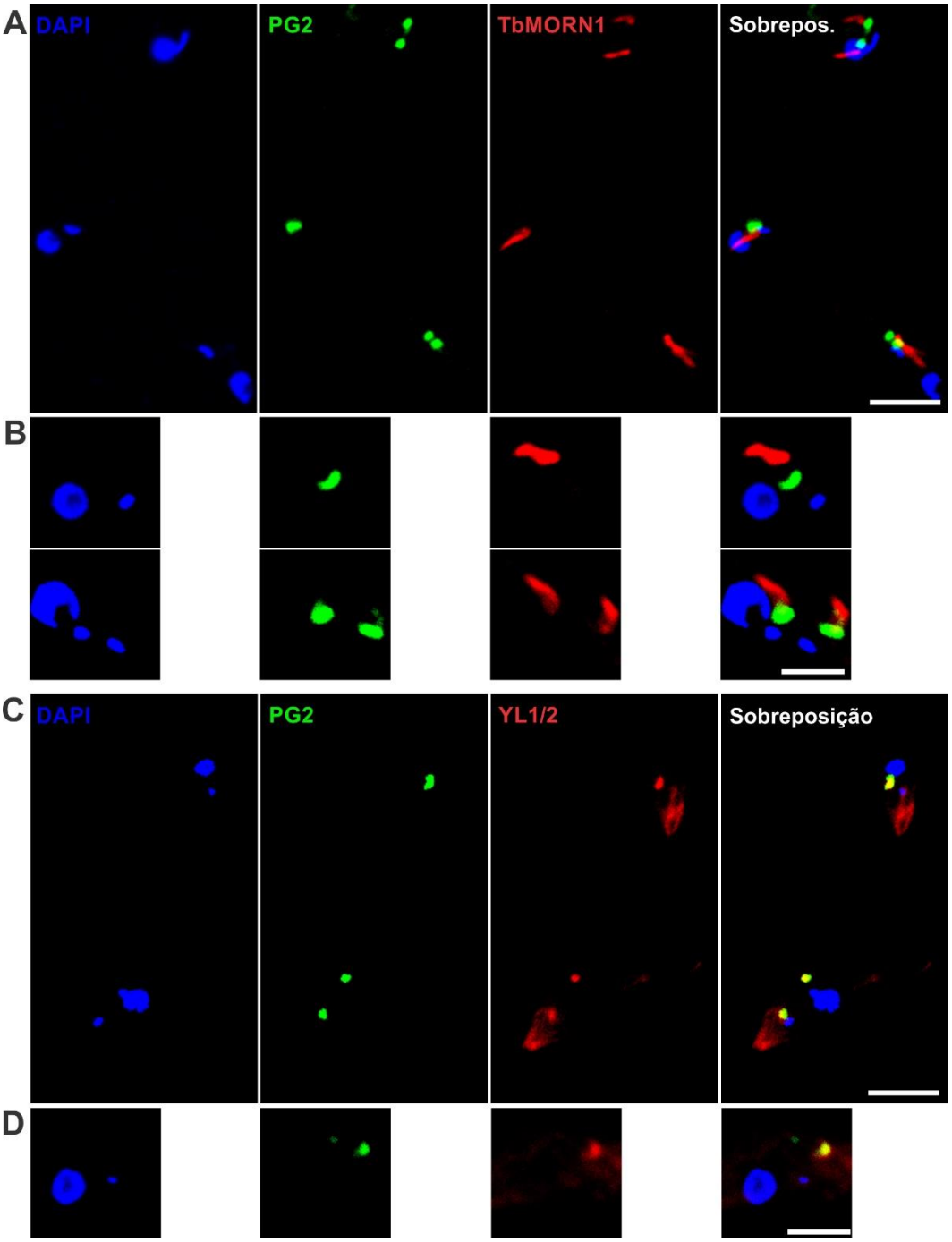


Figura 23: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG2 (verde) e anti-Morn1 (TbMORN1, vermelho) [A, B] ou YL1/2 (tubulina tirosinada, vermelho) [C, D]. Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barra = 10 µM [A, C] e 5 µM [B, D].

4.3. Caracterização dos anticorpos anti-PG1 e anti-PG2 contra proteínas gigantes de outros tripanossomatídeos

Analisamos se os anticorpos anti-PG1 e anti-PG2 apresentam reatividade cruzada contra as proteínas gigantes em outros tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*). O anticorpo anti-PG1 não possui reatividade cruzada contra as proteínas do citoesqueleto de *T. cruzi* e *L. major* tanto por WB quanto por imunofluorescência (**Fig. 24A, C**). Por outro lado, o anticorpo anti-PG2 reconheceu uma banda específica na fração solúvel (S) do lisado total de *T. cruzi.* Adicionalmente, a imunofluorescência em *T. cruzi* revelou uma distribuição de anti-PG2 adjacente ao cinetoplasto, semelhante ao observado em *T. brucei* (**Fig. 24B, C**).

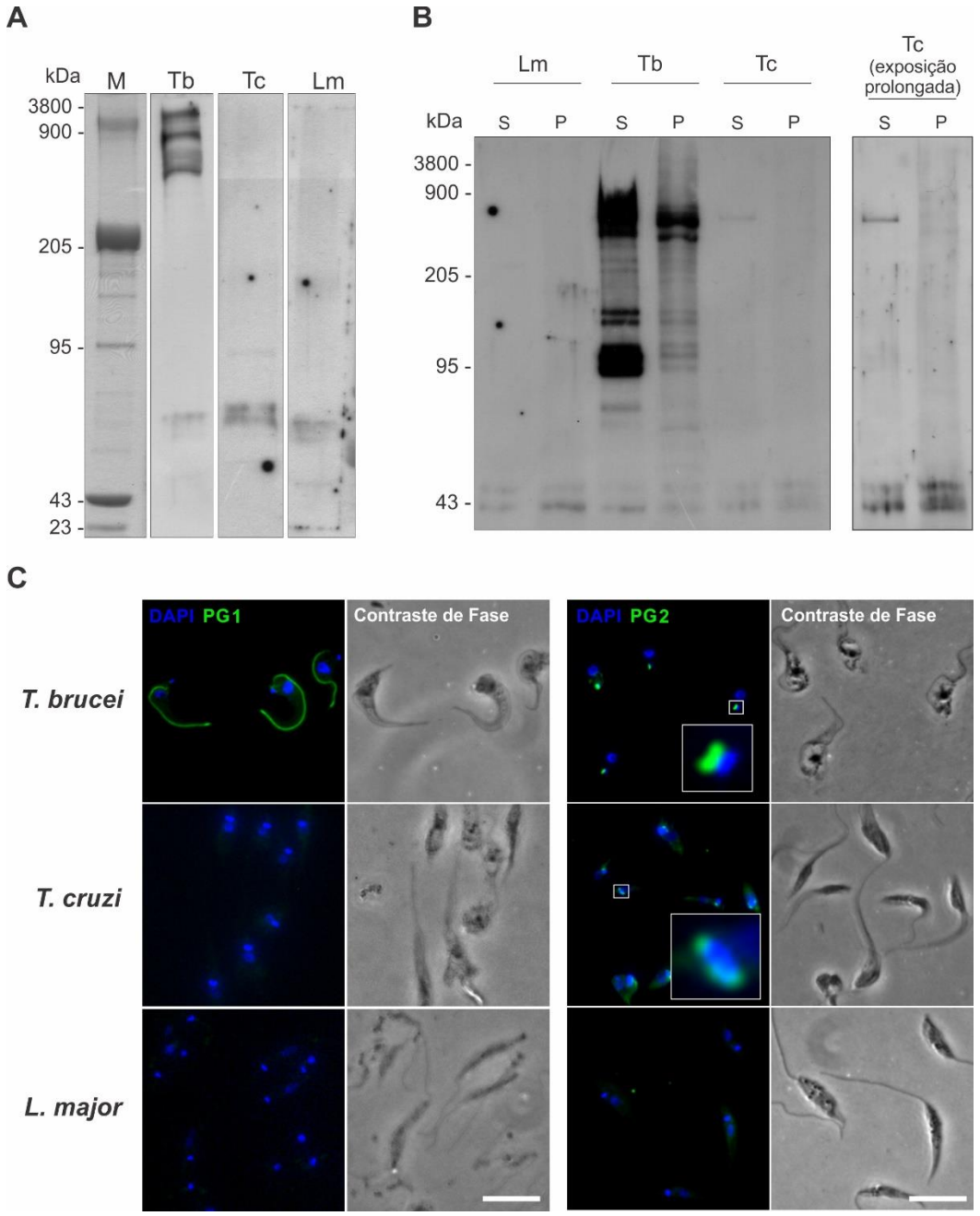


Figura 24: Análise da reatividade cruzada dos antissoros anti-PG1 e anti-PG2 em *T. brucei* (Tb) *T. cruzi* (Tc) e *L. major* (Lm). [A] WB das amostras do citoesqueleto usando anti-PG1. [B] WB das amostras do lisado total (S, fração solúvel; P, *pellet*) usando anti-PG2. [C] Imunofluorescência do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm.

4.4. Identificação das proteínas gigantes por espectrometria de massas em *T. brucei*

As proteínas de alta massa molecular correspondentes às Zona 1 e Zona 2 (**Fig. 17)** foram cortadas diretamente do gel de eletroforese e enviadas para determinação de sua sequência primária parcial através da espectrometria de massas (MS) e identificação no banco de dados. A análise revelou um número significativo de proteínas candidatas, todas com alto valor de confiabilidade (> 0,8; taxa de erro menor que 2%). As proteínas foram listadas em ordem decrescente de abundância (estimada pela contagem de peptídeos totais e únicos obtidos por proteína). Para a busca da identidade das proteínas gigantes pelo perfil de peptídeos obtidos, o resultado foi cruzado com o banco de dados do TriTrypDB e as sequências com peptídeos correspondentes foram listadas (**Tabs. 6 e 7**). A maioria das proteínas são desconhecidas ou ainda não foram caracterizadas, com exceção daquelas em que foram encontradas referências na literatura sobre sua função em tripanossomatídeos (**Tabs. 6 e 7**).

Tabela 6: Lista dos genes de *T. brucei* obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 1 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos.

GENE ID	MM (kDa)	Replicata 1		Replicata 2		Descrição	Referência
		Pep. tot.	Pep. ún.	Pep. tot.	Pep ún.		
Tb927.7.3330 Tb427.07.3330	502	278	76	306	87	FAZ10	(MORRISWOOD et al., 2013) Este trabalho.
Tbg972.8.3230 (Tb927.8.3540)	685 (105)	249	80	239	83	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb427tmp.57.0008	822	90	36	118	39	ClpGM6	(HAYES et al., 2014)
Tb427.10.11080, Tbg972.10.13390	115	73	20	71	19	Antígeno I17	Este trabalho
Tbg972.5.1560, Tb427.05.1120, Tb927.5.1120	295	29	13	26	13	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb427.10.10360, Tb927.10.10360	369	28	5	26	5	Proteína associada aos microtúbulos, hipotética	Este trabalho
Tbg972.4.2000	1422	22	22	22	19	Proteína, hipotética (fragmento), pseudogene	Este trabalho
Tb427.08.4780, Tb927.8.4780, Tbg972.8.4590	468	15	8	16	8	FLAM3	(ROTUREAU et al., 2014)
Tb427.06.3150, Tbg972.6.2940	501	15	10	16	11	Hidina, componente flagelar	(DAWE et al., 2007)
Tb427.10.15750	197	15	31	23	30	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb927.11.10660, Tb427tmp.01.2430, Tbg972.11.11950	450	6	4	7	4	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tbg972.9.450, Tb09.160.0650, Tb427tmp.160.0650	479	5	3	6	4	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb427.07.7400, Tb927.7.7400, Tbg972.7.8700	247	-	-	5	3	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb427.04.870, Tb927.4.870, Tbg972.4.670	510	5	2	-	-	Cadeia pesada da dineína, hipotética	Este trabalho
Tb427.10.970, Tb927.10.970, Tbg972.10.1070	203	6	3	3	3	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho

Tabela 7: Lista dos genes de *T. brucei* obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 2 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos.

Gene ID	PM (kDa)	Replicata 1		Descrição	Referência
		Pep. tot.	Pep. ún.		
Tb927.11.8160, Tb427tmp.01.0390, Tbg972.11.9320	474	310	117	Cadeia pesada de dineína, putativo	Este trabalho
Tb427.02.5270, Tb927.2.5270, Tbg.972.2.3300	486	266	109	TbIAD3, braço interno da dineína 3	(WEI et al., 2014)
Tbg972.4.670	527	257	111	TbDNAH10, dineína F cadeia pesada alfa	(SPRINGER et al., 2011)
Tb427.07.920	468	238	88	TbIAD5-1, cadeia pesada de dineína do axonema, putativo	(WEI et al., 2014)
Tb427tmp.01.3010, Tbg972.11.12540	480	238	96	TbIAD5-2 braço interno da dineína	(WEI et al., 2014)
Tbg972.8.2990, Tb427.08.3250, Tb927.8.3250	535	235	106	Cadeia pesada da dineína, putativo	Este trabalho
Tb427.10.5350, Tb927.10.5350, Tbg972.10.6530	474	222	96	Cadeia pesada de dineína, putativo	Este trabalho
Tb427.08.4780, Tbg972.8.4590	468	63	26	FLAM3, membro flagelar 3	(ROTUREAU et al., 2014)
Tb427tmp.52.0002, Tbg972.11.14310	434	53	33	Proteína hipotética, conservada	Este trabalho
Tb427.06.3150, Tbg972.6.2940	501	46	28	Hidina, componente flagelar	(DAWE et al., 2007)
Tb927.3.930, Tbg972.3.580	531	37	30	Cadeia pesada de dineína	(MONNERAT et al., 2009)
Tb927.11.3250, Tb427tmp.02.0760, Tbg972.11.3620	531	31	24	Cadeia pesada de dineína, putativo	Este trabalho
Tb427.10.2880, Tb927.10.2880, Tbg972.10.3590	303	19	14	Proteína de canal de cálcio, putativa	Este trabalho
Tb427.10.15730, Tb927.10.15730	383	15	10	Domínio SPRY/Repetições de Ankyrin, putativo	Este trabalho
Tbg972.4.2000	1422	14	8	Proteína, hipotética (fragmento), pseudogene	Este trabalho
Tbg972.11.17330, Tb427tmp.01.7095, Tb927.11.15450	178	11	5	Proteína hipotética	Este trabalho
Tbg972.11.1180, Tb11.47.0036, Tb427tmp.47.0036, Tb11.57.0008, Tb427tmp.57.0008, Tbg972.11.1200	822	90	36	ClpGM6, proteína do tipo calpaína GM6	(HAYES et al., 2014)

4.5. Caracterização *in silico* das proteínas gigantes da Zona 1

Em seguida, focamos na caracterização das proteínas gigantes da Zona 1 (**Fig. 17 e Tab. 6**). Como estratégia inicial, baseamos no número de peptídeos obtidos na análise de espectrometria de massas e no tamanho predito em massa molecular para a escolha de três proteínas candidatas (**Tab. 6**). Foram escolhidas as proteínas Tb927.7.3330 ou FAZ10, Tb927.8.3540 (Tbg972.8.3230) e Tb427tmp.57.0008 ou ClpGM6. Esta última foi descartada posteriormente devido à sua recente caracterização celular por HAYES et al. (2014).

Para investigar as propriedades moleculares da FAZ10, nos baseamos no banco de dados do TriTrypDB. A *FAZ10* possui uma sequência de 13005 pares de bases localizados no cromossomo 7 e codifica para uma proteína gigante (PM ≥ 502 kDa, pI 4.62). A estrutura desta proteína é caracterizada por uma região N-terminal, um primeiro domínio *coiled-coil* (CC), uma região central, um segundo domínio *coiled-coil* (CC) e uma região C-terminal (**Fig. 25A**). Além disso, a FAZ10 contém 52 repetições quase idênticas de 35 aminoácidos distribuídos nas duas regiões distintas da proteína (**Fig. 25A-C**). Ortólogos do gênero *Trypanosoma*, exibiram o mesmo padrão de repetição porém com variação na quantidade de nucleotídeos e de repetições. Ainda, estes padrões apresentaram uma divergência de até 57% entre as espécies (**Fig. 25B**). As duas regiões repetitivas são exclusivamente *coiled-coil*, como predito pelo programa COILS (LUPAS; VAN DYKE; STOCK, 1991) e análises pela ferramenta CDD (*Conserved Domain Database*) (MARCHLER-BAUER et al., 2013) predisseram estruturas semelhantes às caudas de miosina para estas regiões. Adicionalmente, análises por TMHMM (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004) não detectaram nenhuma hélice transmembrana ou outro motivo de importância relevante.

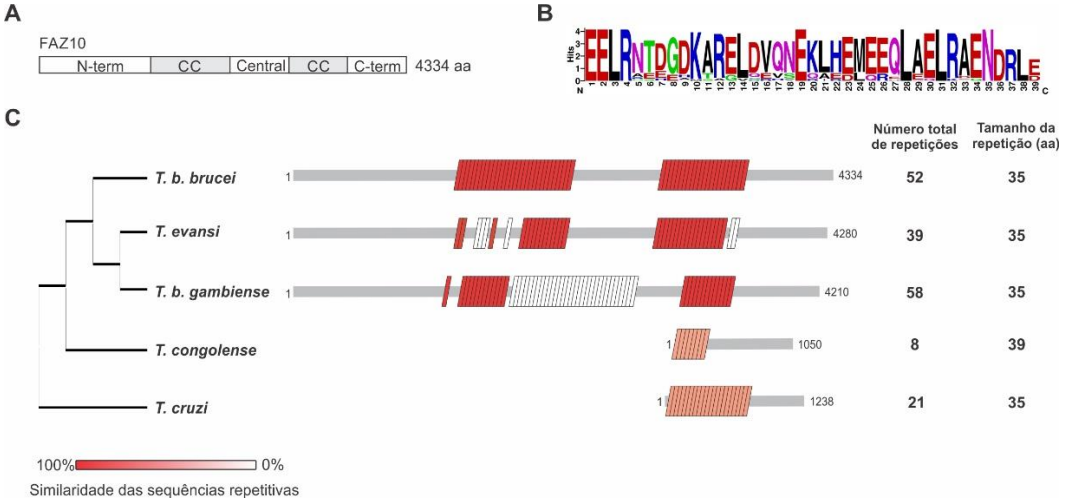


Figura 25: Propriedades moleculares da proteína gigante FAZ10. [A] Representação esquemática da estrutura da FAZ10. Ela apresenta uma região C-terminal (N-term), duas regiões *coiled-coil* (CC) separadas por uma região central e uma região C-terminal (C-term). [B] Representação da sequência repetitiva consenso presente nas proteínas gigantes de tripanossomas. [C] FAZ10 de *T. brucei* apresenta um único ortólogo em outras espécies de Trypanosoma. As caixas representam regiões repetitivas dentro da sequência e ao lado está representado o tamanho e número destas sequencias.

Para a segunda candidata, o resultado do sequenciamento detectou uma proteína gigante de *T. brucei* gambiense (Tbg972.8.3230, 685 kDa). Entretanto, por motivos de disponibilidade do organismo e biossegurança, e de ferramentas de biologia molecular, realizamos os experimentos em *T. brucei* (Tb927.8.3540), em que a respectiva proteína possui massa molecular predita de 105 kDa. Estruturalmente, Tb927.8.3540 possui um peptídeo sinal de ancoragem transmembrana conservado sendo que todo o restante da proteína apresenta um domínio não citosólico, o que indica que está exposto extracelularmente. Ortólogos detectados em outros tripanossomatídeos apresentam semelhanças estruturais apesar de uma divergência na similaridade entre as sequências (**Fig. 26**). Além disso, nenhum domínio descrito ou conhecido foi identificado como semelhante aos domínios de Tb927.8.3540.

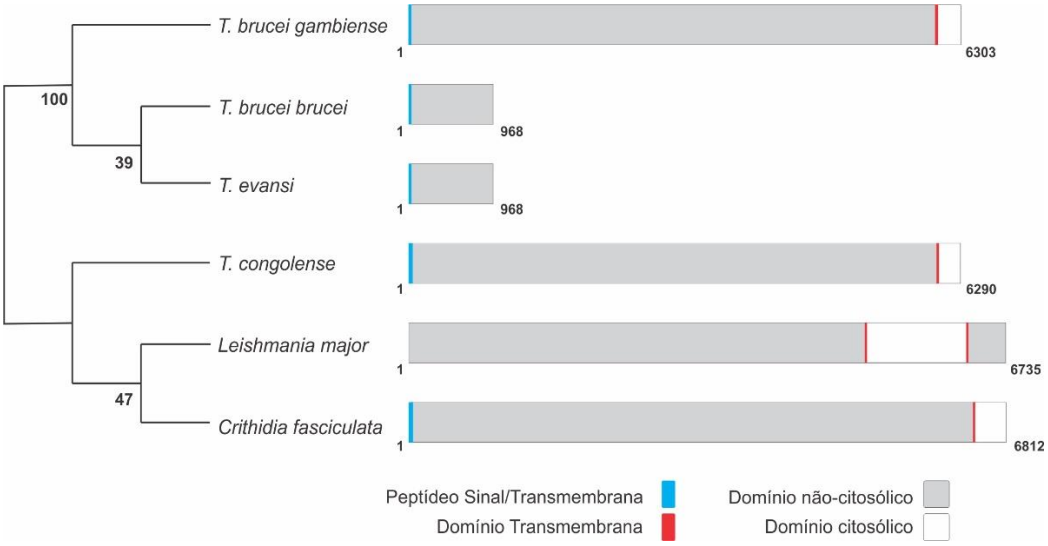


Figura 26: Análise comparativa da sequência da proteína gigante Tb927.8.3540 de *T. brucei* com seus respectivos ortólogos. Essa proteína possui um peptídeo sinal de ancoragem transmembrana, e um domínio C-terminal não citosólico. Os ortólogos encontrados em outros parasitas apresentam estruturas semelhantes como mostrado pelo alinhamento das sequências.

4.6. Clonagem e produção de anticorpos contra as proteínas candidatas

Para a caracterização das proteínas gigantes acima citadas, clonamos as regiões (N-) amino e (C-) carbóxi terminal de cada uma das candidatas escolhidas no vetor plasmideal pGEX-4T-1 para expressão em sistema procarioto. Em seguida, a purificação da proteína recombinante, a qual é facilitada pela adição de uma *tag* inicial de GST, foi realizada em coluna de glutationa. Como estratégia, foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação destas regiões com adição de sítios de restrição únicos para facilitar a clonagem direcionada no vetor pGEX-4T-1 (**Tab. 3**). A correta inserção dos fragmentos no vetor foi confirmada por digestão enzimática (**Fig. 27**), sequenciamento das construções, e verificação da inserção no mesmo quadro de leitura com a sequência codante para a GST.

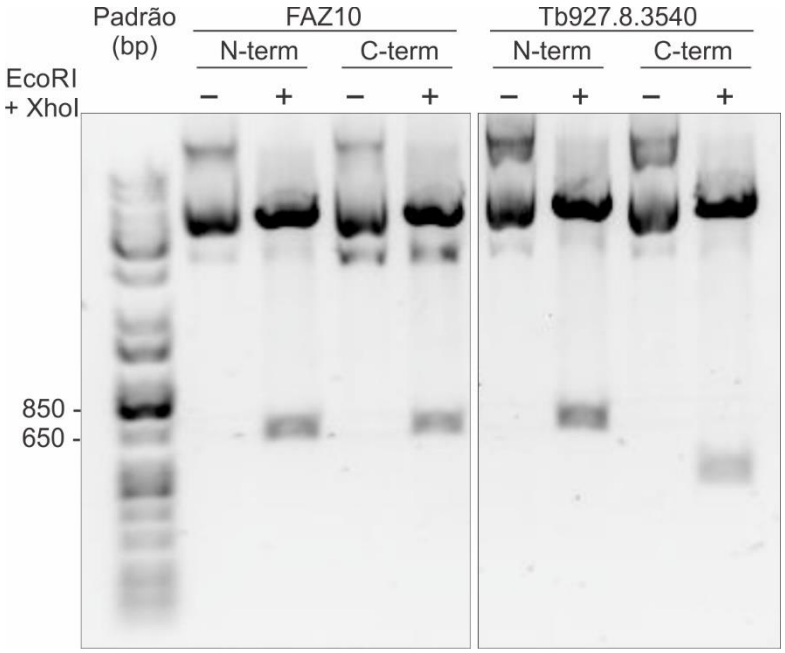


Figura 27: Confirmação das clonagens no vetor pGEX-4T-1. O gel mostra bandas correspondente aos tamanhos das regiões N- e C-terminal da FAZ10 e Tb927.8.3540. A reação de digestão enzimática foi realizada com duas enzimas de restrição (EcoRI e XhoI) e as reações foram analisadas em gel 1% agarose. Brometo de etídio foi utilizado para visualização do DNA. O padrão utilizado foi o 1 kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen).

Posteriormente, os vetores clonados foram usados na transformação de bactérias *E. coli* BL21star para a expressão das respectivas construções. Todas as construções foram expressadas após indução com 0,2 mM de IPTG (**Fig. 28**). Somente a porção C-terminal da FAZ10 permaneceu na fração solúvel do lisado celular, enquanto as demais permaneceram na fração insolúvel. Adicionalmente, a confirmação da expressão das proteínas recombinantes fusionadas a GST também foi feita por WB utilizando anticorpo anti-GST (**Fig. 29**).

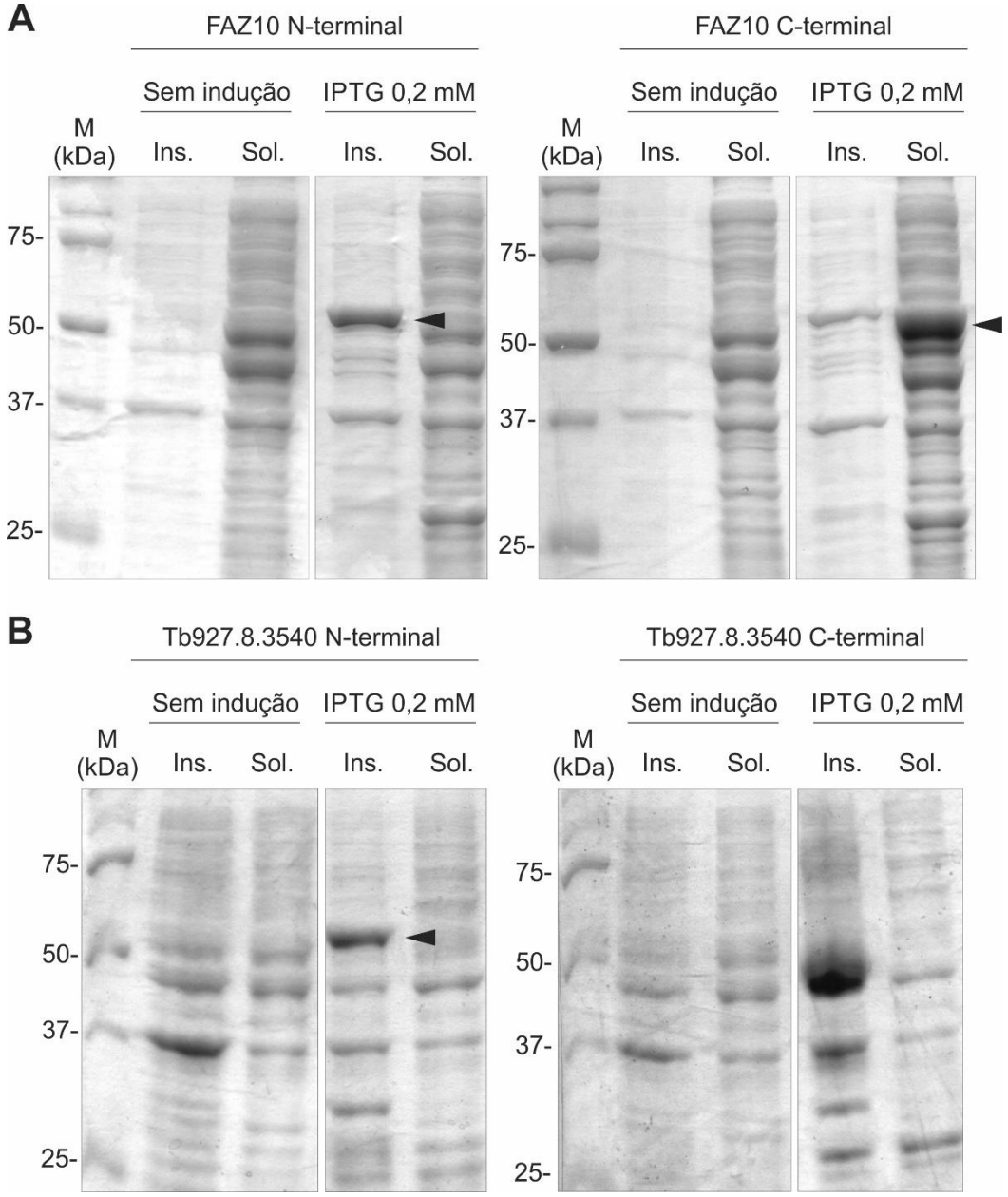


Figura 28: Expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST. Lisado total (solúvel e insolúvel) de *E. coli* induzida com ou não com IPTG. Setas indicam as bandas resultantes da indução. Os géis foram corados com *Coomassie blue*. Canaletas: M, Marcador; Ins., Fração insolúvel; S., Fração solúvel.

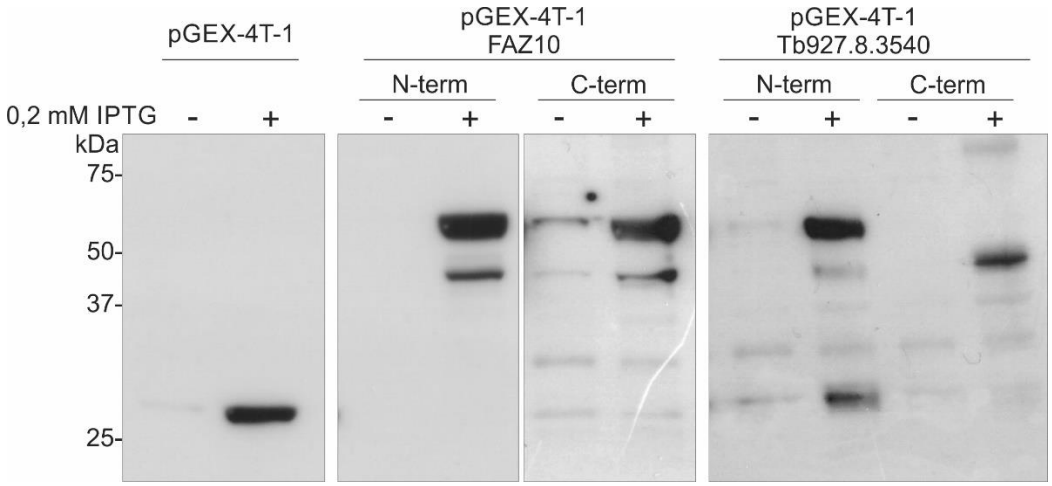


Figura 29: Confirmação da expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto. WB usando anti-GST (1:10000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo. N-term, N-terminal; C-term, C-terminal.

A construção C-terminal solúvel da GST-FAZ10 foi purificada usando-se uma coluna de afinidade de *Glutationa-sepharose* (**Fig. 30**). A proteína recombinante purificada foi injetada em camundongos Balb/C para a produção do antissoro como descrito no tópico "Produção de anticorpos policlonais" (Material e Métodos). Para todas as construções que apresentaram-se insolúveis, a proteína recombinante foi recortada diretamente do gel e injetada em camundongos Balb/C para a produção de antissoro específico para cada uma destas proteínas.

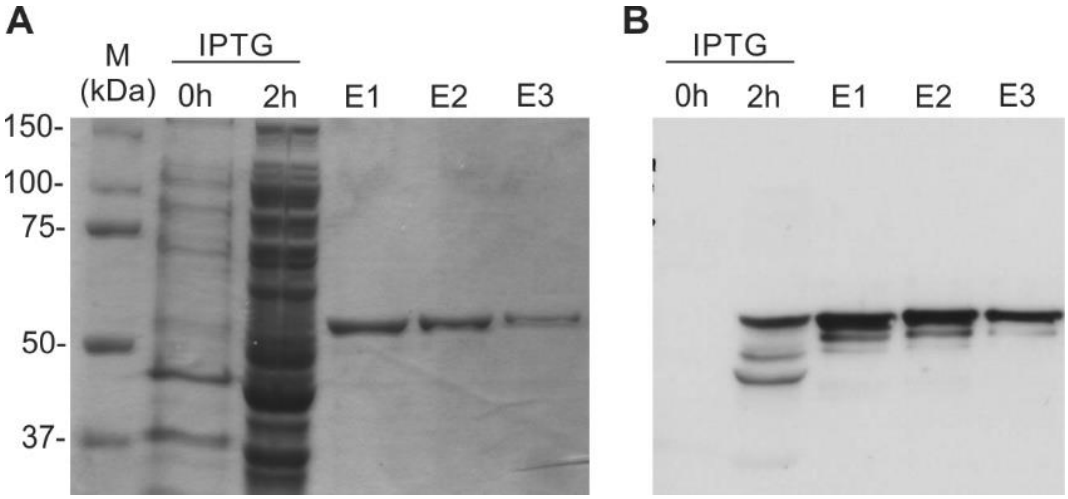


Figura 30: Purificação de GST-FAZ10 C-terminal. [A] Análise por SDS-PAGE das frações da purificação por coluna de afinidade da proteína GST-FAZ10 C-terminal visualizado com *Coomassie blue*. [B] WB da proteína recombinante usando anti-GST. Canaletas: M - marcador, 0h-2h - lisado sem ou com indução por IPTG, E1-3 - frações de eluição da purificação.

4.7. Caracterização dos anticorpos contra as proteínas candidatas do citoesqueleto de *T. brucei*

Os antissoros produzidos contra as regiões N- e C-terminais de cada proteína candidata foram utilizados para a avaliar a localização de cada uma em amostras do citoesqueleto de *T. brucei*. Como observado, as marcações para as proteínas selecionadas apresentaram uma distribuição similar ao que foi visto para o antissoro policlonal anti-PG1 produzido inicialmente (**Fig. 31)**. Esta região é denominada FAZ e compreende uma estrutura entre o corpo celular e o flagelo, que vai desde o bolso flagelar na porção posterior até a porção anterior da célula mas não na ponta livre do flagelo. Nenhuma marcação foi observada para o antissoro da região N-terminal da FAZ10 (**Fig. 31A)**.

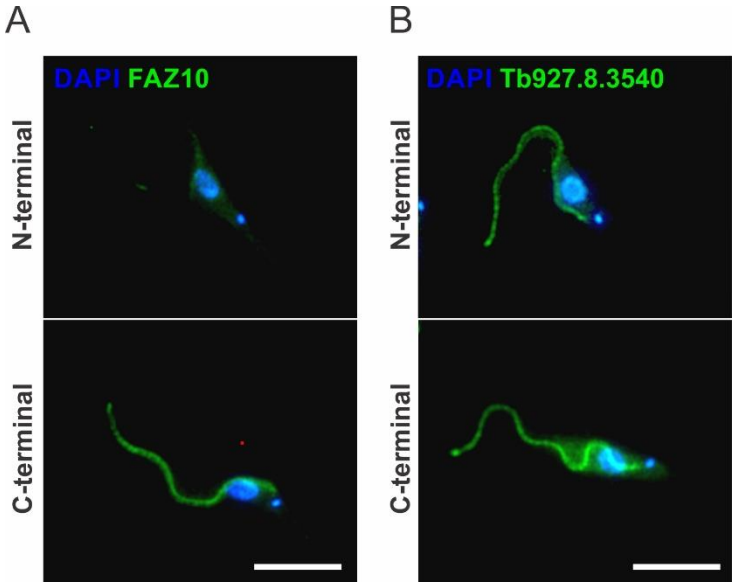


Figura 31: Distribuição celular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo especifico (1:50) produzido em camundongo contra as regiões N- e C-terminais da FAZ 10 [A, verde] e Tb927.8.3540 [B, verde]. Núcleos e cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barras = 10 µm.

Adicionalmente, anti-FAZ10 (C-terminal) foi utilizado para investigar em qual fração do citoesqueleto está presente a proteína FAZ10. A análise de WB das frações do citoesqueleto revelou que a FAZ10 está fortemente associada ao flagelo após solubilização com 1M NaCl (**Fig. 32**).

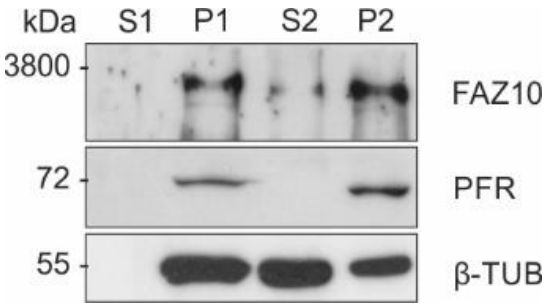


Figura 32: Fracionamento do citoesqueleto de *T. brucei* e análise de WB utilizando anticorpo anti-FAZ10, anti-PFR e anti-βTUB. S1, fração solúvel do lisado celular; P1, citoesqueleto total; S2, fração solúvel do citoesqueleto; P2, flagelo isolado.

Além disso, o anticorpo anti-FAZ10 apresentou alta especificidade ao imunoprecipitar a proteína FAZ10 (**Fig. 33**). A confirmação da imunoprecipitação foi verificada por WB (**Fig. 33**).

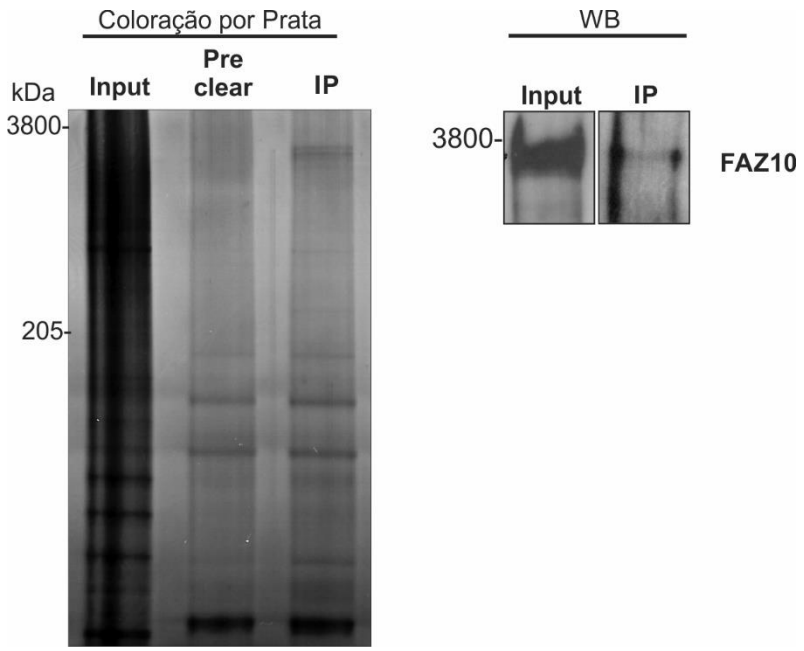


Figura 33: Imunoprecipitação da proteína FAZ10. Imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-FAZ10, visualizada pelo método de coloração por prata e confirmada por WB usando anti-FAZ10. IP, imunoprecipitação.

4.8. Clonagem e geração das linhagem para expressão das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc

Para auxiliar nos experimentos de microscopia em análises de co-localização e ensaios de WB, utilizamos a estratégia de acoplar a *tag* myc à região C-terminal das proteínas gigantes FAZ10 e Tb927.8.3540 para obter linhagens expressando constitutivamente FAZ10:myc e Tb927.8.3540:myc. Fragmentos de 900 bp da região C-terminal sem o códon de parada foram amplificados (**Fig. 34A, C**), clonados no vetor pNAT-myc e confirmados por digestão enzimática (**Fig. 34B, D**).

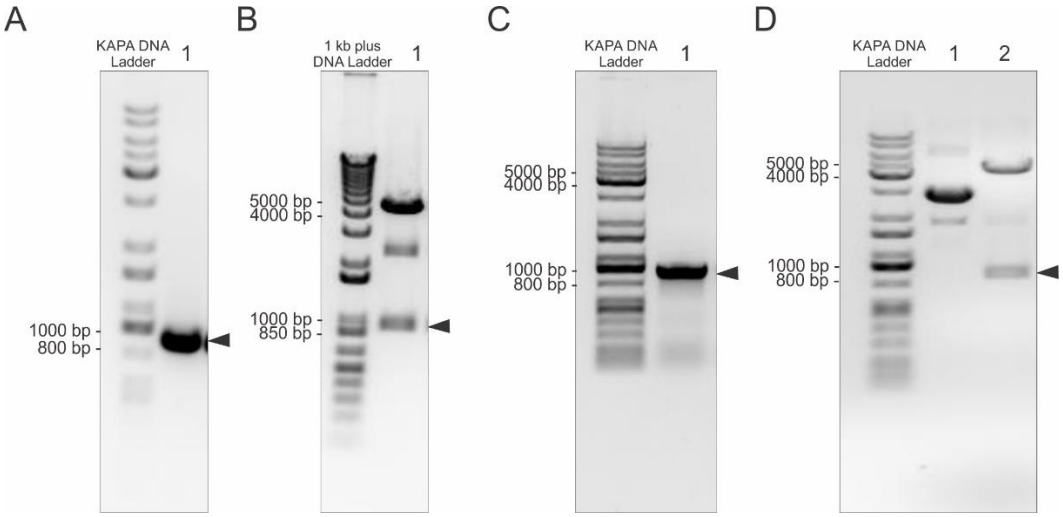


Figura 34: Fusão da cauda myc às proteínas gigantes. Clonagem de 900 bp da região c-terminal sem o códon de parada da proteína FAZ10 [A, B] e Tb927.8.3540 [C, D]. Os fragmentos (setas) foram amplificados por PCR [A, C], subclonados no vetor pNAT, e a clonagem foi confirmada por digestão enzimática [B, D].

Após a clonagem, os vetores foram linearizados em sítio único e transfectados no parasita, como descrito no tópico "Transfecção do *Trypanosoma brucei*" (Materiais e Métodos). A confirmação da correta inserção e expressão da *tag* foi feita por WB e imunofluorescência. As linhagens obtidas foram capazes de expressar constitutivamente as proteínas fusionadas à cauda myc, como mostrado por WB (**Fig. 35A, C**) e por imunofluorescência (**Fig. 35B, D**). Embora a proteína FAZ10 apresentou a mesma localização que sua forma nativa, a proteína Tb928.8.3540 perdeu sua distribuição ao longo do FAZ (**Fig. 35D**).

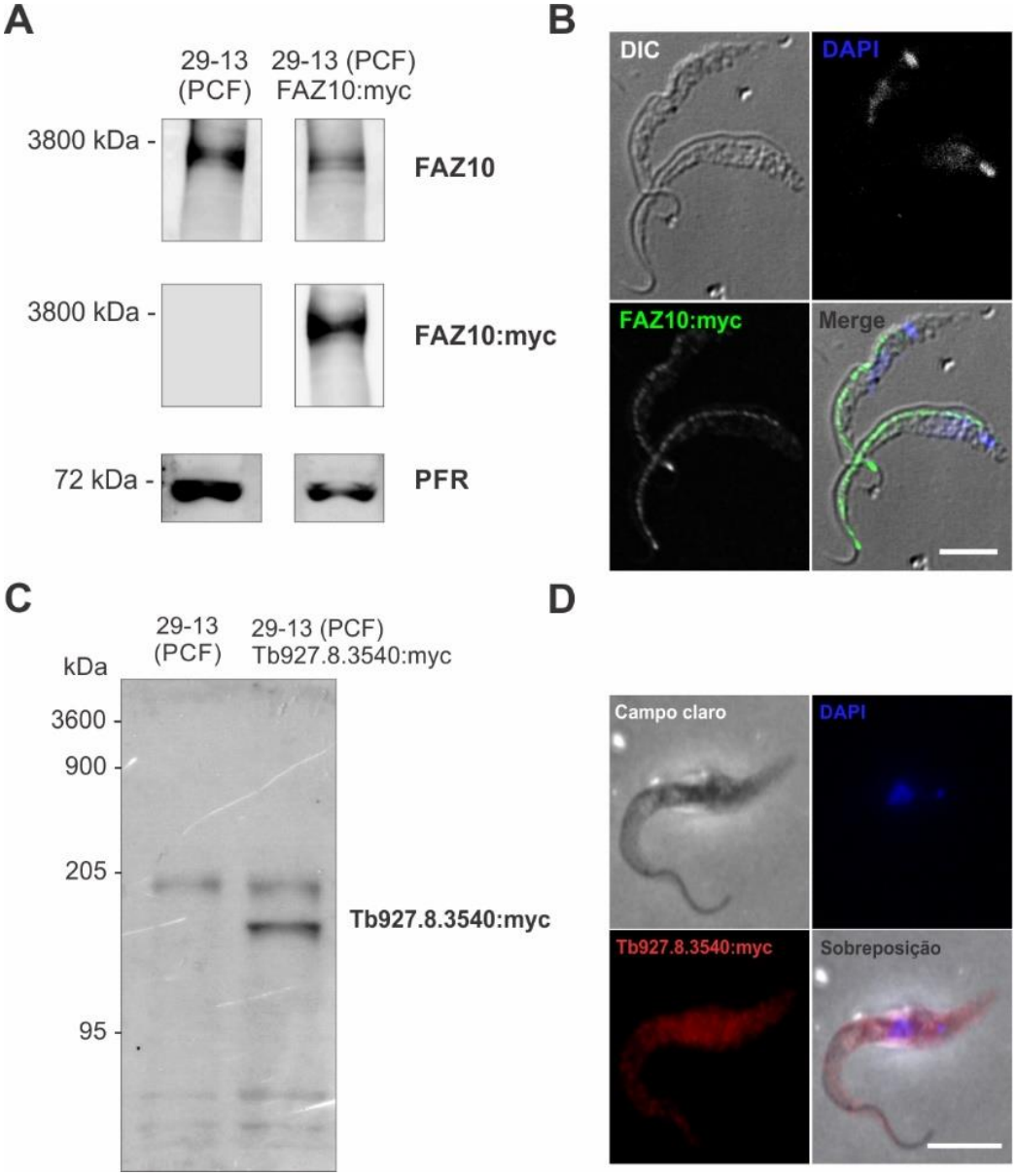


Figura 35: Confirmação das linhagens expressoras das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc. [A, C] WB do lisado total de *T. brucei* 29-13 PCF utilizando anti-myc, anti-FAZ10 e anti-PFR nas linhagens 29-13 e FAZ10:myc [A] ou Tb927.8.3540:myc [C]. [B, D] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* utilizando anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar o núcleo e cinetoplasto. Barras = 5 µm.

Em seguida, para detalhar a localização de FAZ10, realizamos a imunomarcação do citoesqueleto de células da linhagem FAZ10:myc utilizando anti-myc e anti-FAZ10. Os dois anticorpos marcaram igualmente a estrutura específica entre o corpo celular e o PFR, referente à zona de adesão flagelar. Esta marcação correspondeu aos botões de adesão que existem neste local. Estes botões possuem aproximadamente 30 nm de espessura e estão distantes aproximadamente 122 nm entre si ao longo de todo o FAZ (**Fig. 36**).

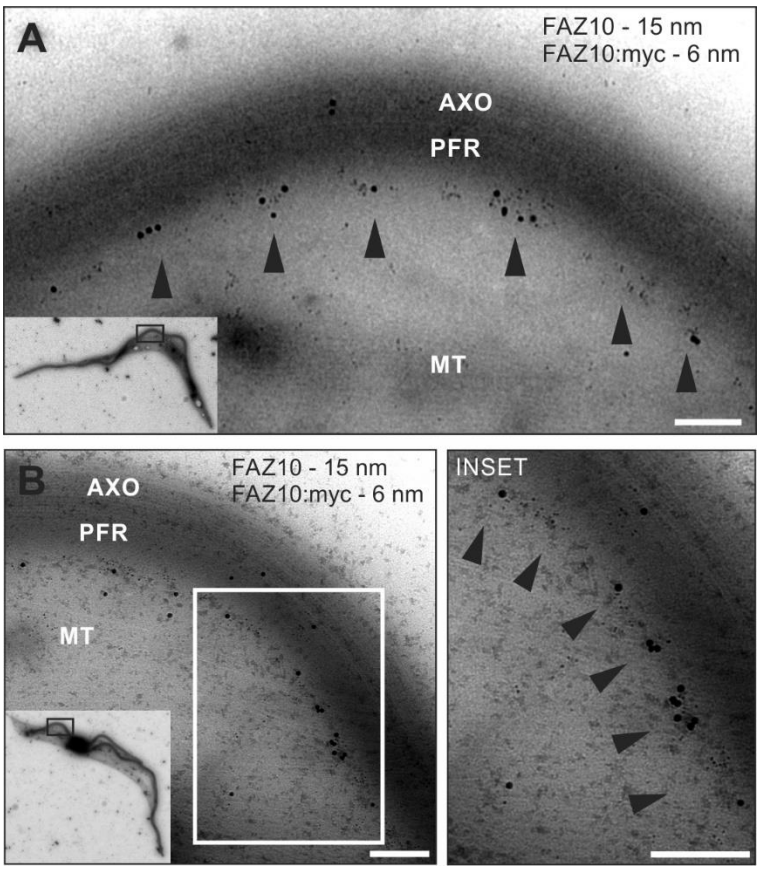


Figura 36: Imunomarcação do citoesqueleto de T. brucei PCF. As células FAZ10:myc foram preparadas e marcadas com anti-FAZ10 e anti-myc. Os anticorpos secundários conjugados a partículas de ouro utilizados foram anti-IgG de camundongo (15 nm) e anti-IgG de coelho (6 nm). Setas indicam a distribuição coincidente de anti-FAZ10 e anti-myc. Barras = 100 nm.

4.9. Clonagem dos vetores para estudo por RNA de interferência

Com o objetivo de caracterizar o papel funcional das proteínas gigantes na biologia do *T. brucei*, utilizamos o modelo de *knockdown* do gene de interesse por meio do mecanismo de RNAi presente neste organismo. Neste modelo é usado a linhagem celular 29-13 de *T. brucei* e um vetor plasmideal chamado p2T7-177 (Fig. 14A). Inicialmente utilizamos o programa RNAit para gerar os pares de oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos fragmentos no vetor p2T7-177 (**Tab. 5**). Os fragmentos amplificados correspondem a regiões de aproximadamente 500 bp presentes nas sequencias codantes da FAZ10 e da Tb927.8.3540. Ambos os pares funcionaram corretamente amplificando apenas o fragmento de interesse (**Fig. 37A**). Após a purificação dos fragmentos, os mesmos foram digeridos com enzimas de

restrição específicas e ligados ao vetor p2T7-177. A clonagem foi confirmada por digestão enzimática (**Fig. 37B**) e sequenciamento de nucleotídeos. Os vetores foram linearizados em sítio único para a enzima NotI (**Fig. 37C**) antes de serem usados na transfecção dos parasitas por eletroporação nos parasitas, como descrito no tópico "Transfecção do *Trypanosoma brucei*" (Materiais e Métodos).

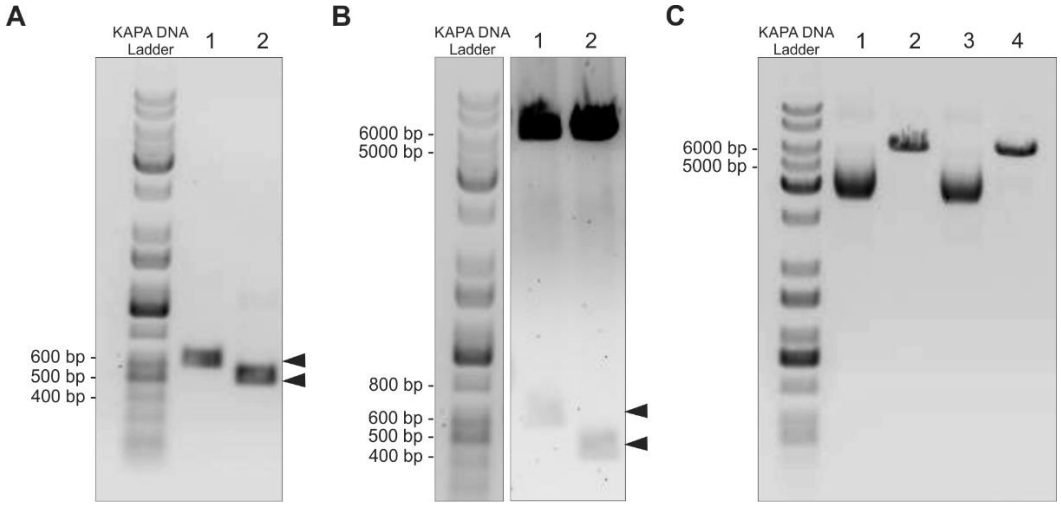


Figura 37: Clonagem dos fragmentos de FAZ10 e Tb927.8.3540 para ensaio de RNAi. [A] Amplificação por PCR dos fragmentos dos genes da FAZ10 (1) e Tb927.8.3540 (2) com tamanhos de 575 e 429 bp (setas), respectivamente. [B] Confirmação da clonagem dos fragmentos (setas) no vetor p2T7-177 por digestão enzimática. (1) p2T7-177+FAZ10; (2) p2T7-177+ Tb927.8.3540. [C] Linearização dos vetores com enzima NotI. (1) p2T7-177+FAZ10, (2) p2T7-177+FAZ10 linearizado, 3 - p2T7-177+Tb927.8.3540 e 4 - p2T7-177+Tb927.8.3540 linearizado.

Nos experimentos descritos abaixo, para cada uma das proteínas gigantes estudadas (FAZ10 ou Tb927.8.3540) foram geradas linhagens capazes de expressar constitutivamente a proteína de interesse acoplada à cauda myc (FAZ10:myc ou Tb927.8.3540:myc), e/ou de permitir o silenciamento da proteína de interesse por RNAi (FAZ10:myc RNAi ou Tb927.8.3540:myc RNAi).

4.10. Caracterização funcional da proteína FAZ10

O silenciamento da FAZ10 em células PCF FAZ10 RNAi foi realizado através da indução por doxiclina por tempos determinados, e após 72 horas de indução, os níveis proteicos desta proteína diminuíram quase que totalmente, como mostrado por WB (**Fig. 38A**). Consequentemente, houve o desaparecimento da marcação de anti-FAZ10 após o silenciamento, como visualizado por imunofluorescência (**Fig. 38B**).

O primeiro passo para caracterizar o fenótipo decorrente do silenciamento da FAZ10 foi estudar a morfologia destas células através de microscopia de campo claro de células fixadas e marcadas com DAPI para visualização dos núcleos e cinetoplastos (**Fig. 39**). Observações após a indução do RNAi foram mostradas na Figura 37, como (1) o destacamento parcial ou total do novo flagelo da célula filha em formação (**Fig. 39A-B, D-H**), (2) o posicionamento incorreto dos pares de cinetoplastos e núcleos após a duplicação dos mesmos (**Fig. 39A, C-D**), (3) erro na definição do plano de clivagem das células filhas (4) (**Fig. 39D-G**) e um aumento expressivo na quantidade de células multinucleadas ou com número de núcleo/cinetoplasto diferente da usual, bem como no aparecimento de células anucleadas contendo apenas 1 cinetoplasto, chamadas *zoids* (**Fig. 39G-I**).

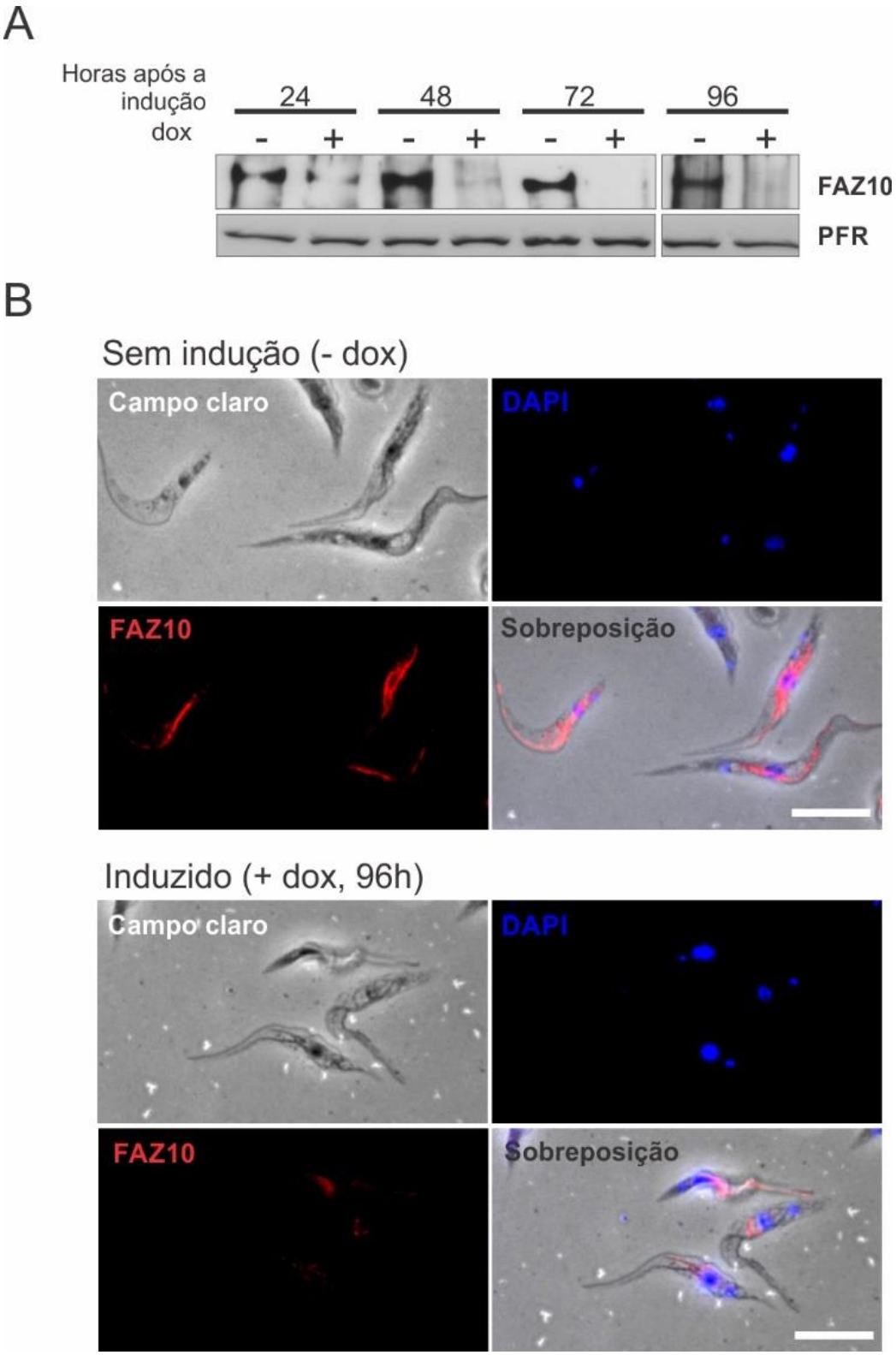


Figura 38: Confirmação do silenciamento da FAZ10. [A] WB usando anti-FAZ10 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. PFR foi usado como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-FAZ10 em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barras = 10 µm.

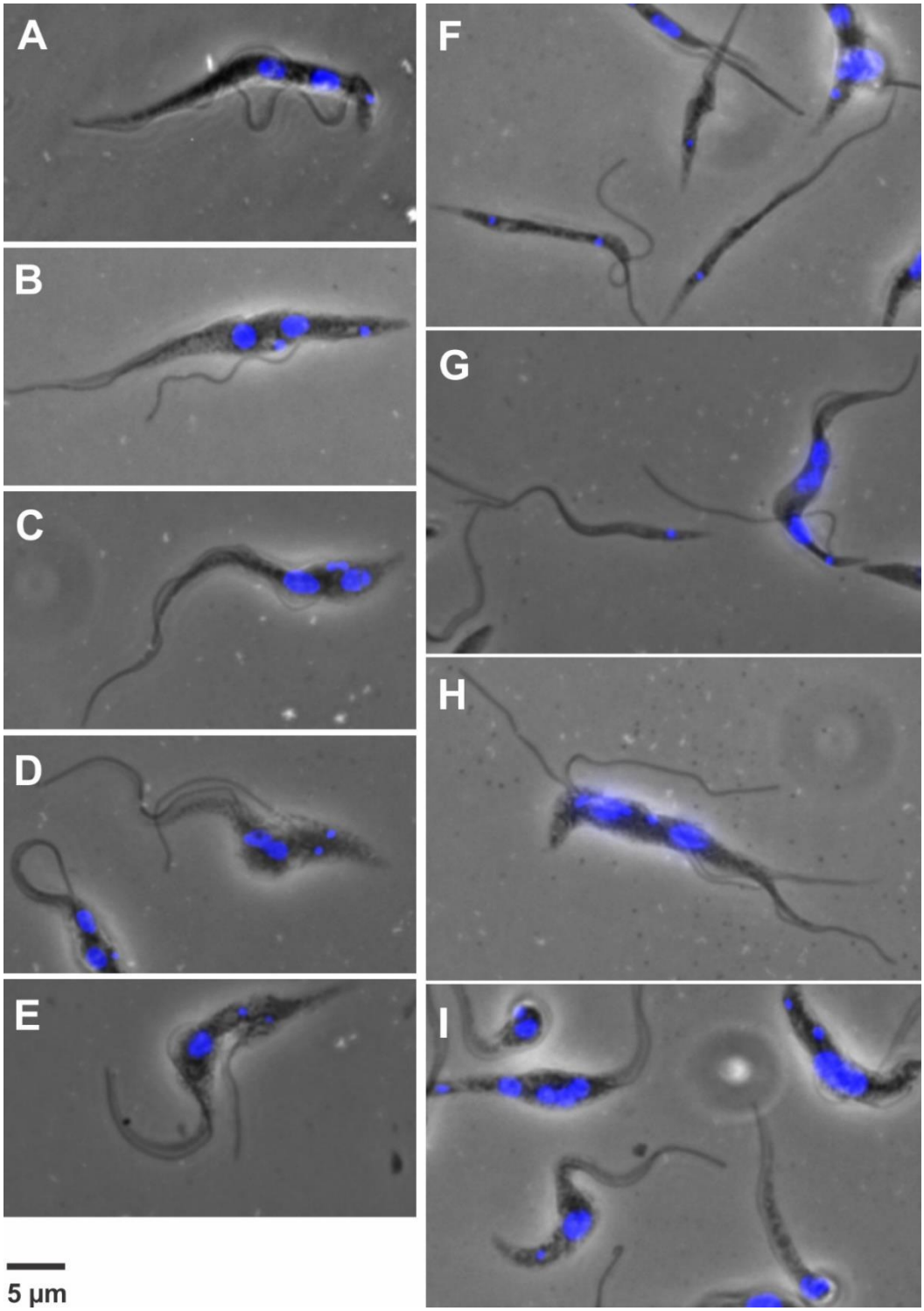


Figura 39: Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína FAZ10. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. Todas as imagens representam células aberrantes observadas a partir de 24 horas após a indução do silenciamento.

Para detalhar as consequências do silenciamento da FAZ10 para a célula, avaliamos a curva de crescimento celular após a indução do RNAi, e a proporção de

células contendo as diferentes quantidades de núcleos e cinetoplastos. As células induzidas para o silenciamento da FAZ10 cresceram menos do que as células controle, mostrando que a FAZ10 é necessária para a proliferação celular (**Fig. 40A**). Quando avaliamos as quantidades de núcleos (N) e cinetoplastos (K) nas células, observamos que houve um aumento considerável na proporção de células 0N1K (*zoids*), que são células anucleadas que contém somente um cinetoplasto (**Figs. 39F-G, 40B**). Células 2N1K e 1N0K, ou com diferente acúmulo incorreto de DNA, também apresentaram um leve crescimento na população após a indução do RNAi (**Fig. 40B, Outro**).

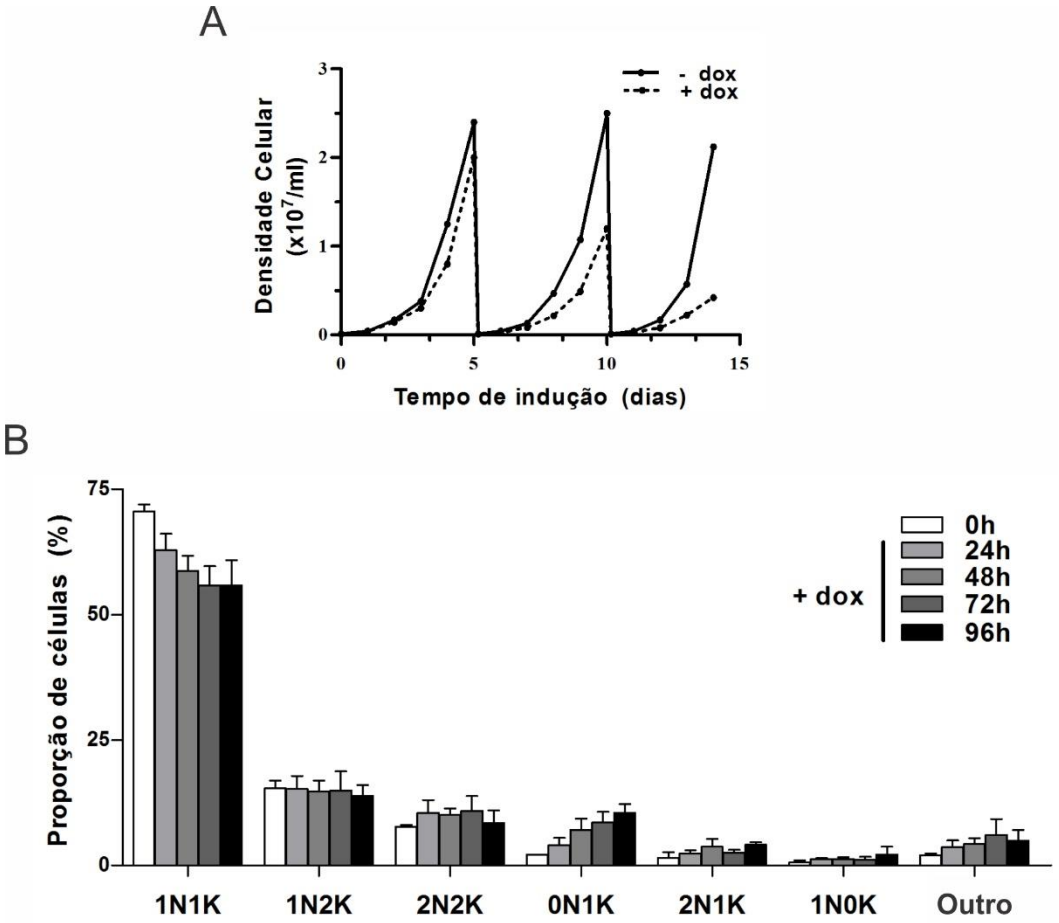


Figura 40: Avaliação do silenciamento de FAZ10 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou não (-dox) para o silenciamento da FAZ10. [B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleo (N) e cinetoplasto (K) antes e após a indução do RNAi da FAZ10.

O destacamento do flagelo como defeito decorrente do silenciamento de FAZ (**Fig. 41**) foi investigado durante o tempo de indução e este fenótipo foi quantificado

através da contagem da proporção de células contendo problemas na adesão flagelar. Aproximadamente 20% da população de células induzidas apresentaram algum defeito na adesão flagelar como o destacamento total ou parcial do mesmo (**Fig. 41A**). O número de células contendo o flagelo totalmente destacado do corpo celular foi o fenótipo mais observado após a indução (**Fig. 41B**). Para investigar se o destacamento do flagelo estaria relacionado com o aparecimento das células *zoids* (0N1K) na cultura induzida, avaliamos a adesão flagelar de células 2N2K que estavam se dividindo e que estavam gerando os *zoids* (**Fig. 41C**). A análise revelou que o destacamento do flagelo não é a única causa responsável pelo erro durante a divisão celular, visto que cerca de 75% das células 2N2K que estavam prestes a formar *zoids* apresentavam o flagelo aderido ao corpo celular (**Fig. 41D**).

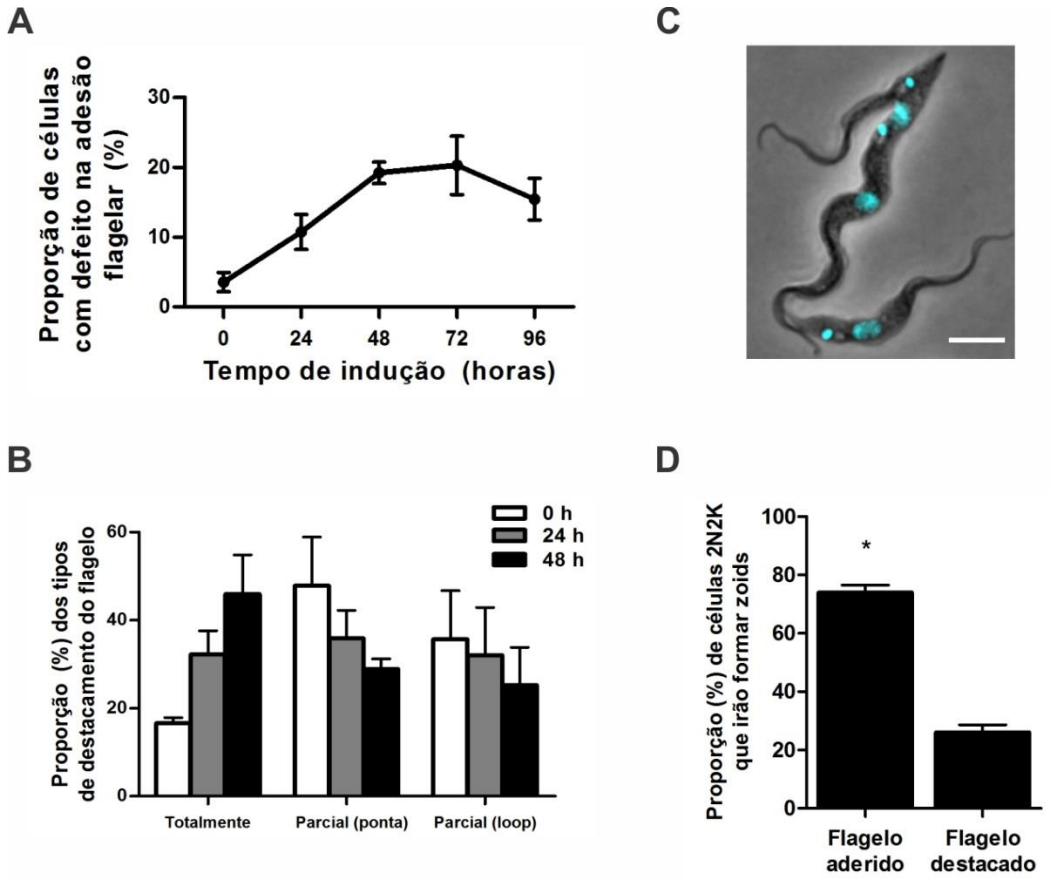


Figura 41: Avaliação da adesão flagelar em células PCF de *T. brucei* silenciadas para FAZ10. [A] Proporção de células com defeitos na adesão flagelar após a indução do RNAi. [B] Tipos de destacamento flagelar durante as primeiras 48 horas de indução do silenciamento da FAZ10. [C] Imagem de célula 2N2K prestes a se dividir. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 µm. [D] Proporção de células 2N2K prestes a gerar *zoids*, contendo ou não defeito na adesão flagelar.

Para verificar se os defeitos observados na adesão flagelar ocorreram como consequência de uma má formação de estruturas do citoesqueleto, analisamos as proteínas FAZ1 e PFR, das estruturas do FAZ e PFR, respectivamente. Nenhuma alteração na distribuição destas proteínas foi observada, indicando que a falta da FAZ10 não impediu a formação das estruturas flagelares (**Fig. 42**).

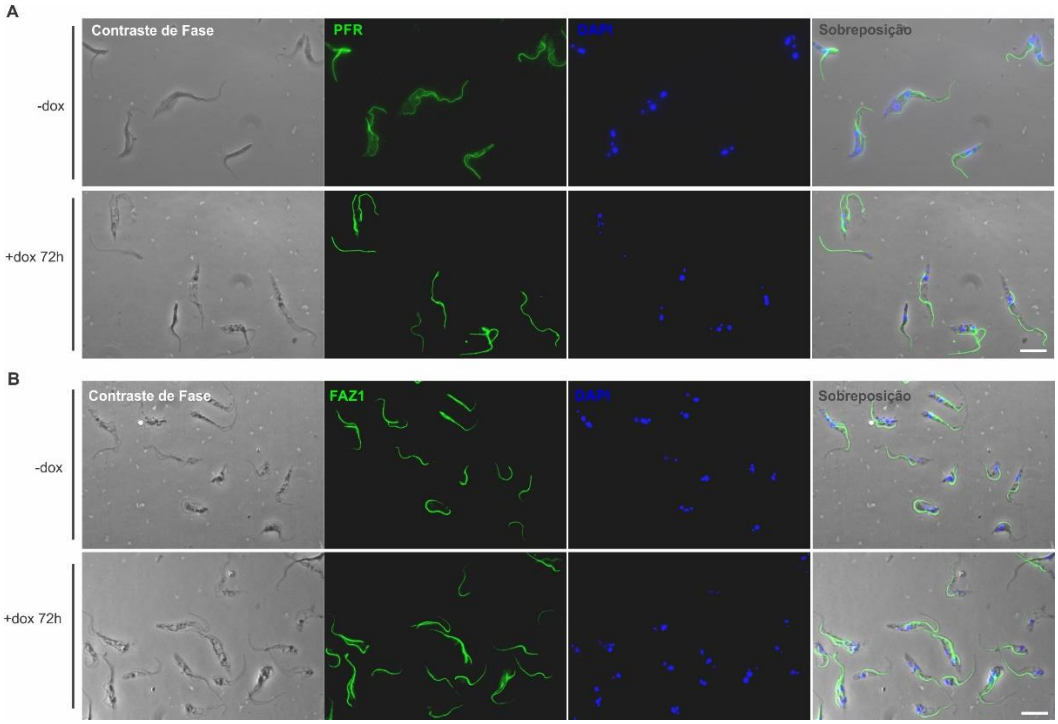


Figura 42: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF. Células da linhagem FAZ10 RNAi induzidas (+ dox) ou controle (- dox) foram marcadas com anti-FAZ1 [A] ou anti-PFR [B] para visualização da zona de adesão flagelar e do bastão paraflagelar, respectivamente. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm.

Para investigar se os defeitos na adesão flagelar ocorreram como consequência de alguma má formação do citoesqueleto flagelar, a ultraestrutura flagelar e sua ligação ao citoesqueleto de microtúbulos através do FAZ foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de cortes ultrafinos de parasitas silenciados ou não para a FAZ10. Aas imagens revelaram um aumento na distância entre o domínio proximal do PFR e o filamento do FAZ intracelular (**Fig. 43A**). A medição da separação entre estas duas estruturas revelou um aumento médio de 36% ($p < 0,001$) na distância entre as mesmas (**Fig. 43B**). Adicionalmente, observamos células em divisão cuja estrutura do axonema-PFR de um dos flagelos não estava mais orientada corretamente como nas células controle ou selvagem (**Fig. 43C**). A contagem deste

evento revelou que aproximadamente 20% das células apresentavam um flagelo com orientação oposta (**Fig. 43D**). Como visto, uma das estruturas flagelares estava direcionada incorretamente, o que poderia ocorrer como consequência de uma fraca adesão flagelar causada pelo silenciamento de FAZ10. Além destes efeitos, o arranjo dos microtúbulos subpeliculares também apresentaram desorganização (**Fig. 43E**).

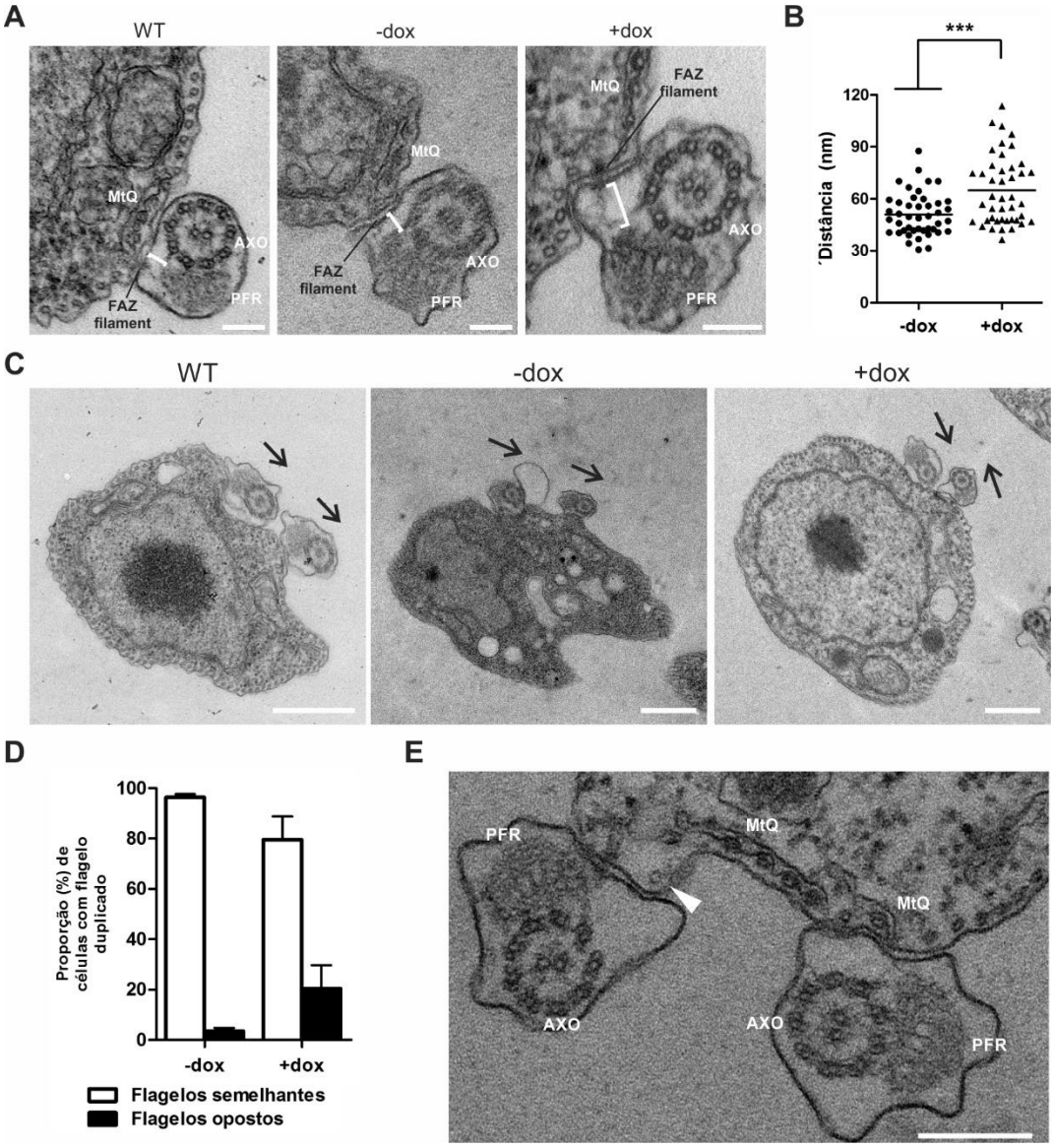


Figura 43: Silenciamento de FAZ10 afeta a organização da estrutura flagellar. [A] MET de seções transversais ultrafinas de células de *T. brucei* controle, não induzidas ou induzidas para o silenciamento da FAZ10. O colchete marca a distância entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR. Barra = 100 nm. [B] Gráfico da distância (nm) entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR (*one-way* ANOVA *** P < 0.0001). [C] Imagens dos flagelos duplicados de células selvagem (WT), células FAZ10 RNAi não induzidas (-dox) ou induzidas (+ dox) com doxiciclina. Setas indicam a orientação da estrutura AXO-PFR. Barra = 500 nm. [D] Proporção de células contendo flagelos duplicados na mesma orientação ou orientação oposta, como visto em [C]. [E] MET de células FAZ10 RNAi PCF após 96 horas de indução mostrando os flagelos opostos e desorganização dos

microtúbulos subpeliculares (seta branca). AXO, axonema; PFR, bastão paraflagelar; MtQ, quarteto de microtúbulos do FAZ. Barra = 500 nm.

Um segundo efeito observado em células FAZ10 RNAi induzidas foi o posicionamento incorreto dos núcleos (N) e cinetoplastos (K) durante a divisão celular. Normalmente, em formas procíclicas o cinetoplasto e o núcleo se dividem e os pares destas organelas duplicadas reposicionam-se alternadamente (K anterior, N anterior, K posterior, N posterior) à medida que o flagelo cresce e o sulco de clivagem se forma (**Fig. 44**).

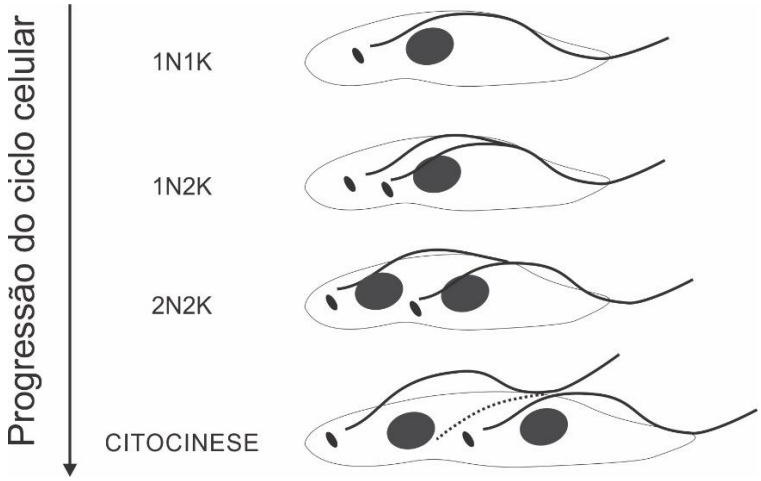


Figura 44: Desenho esquemático de *T. brucei* PCF durante a progressão do ciclo celular com ênfase para a duplicação e posicionamento dos núcleos (N) e cinetoplastos (K). Elaborado pelo autor.

Este reposicionamento dos núcleos e cinetoplastos foi avaliado em células 2N2K por meio do rastreamento das coordenadas da posição de cada organela em relação ao N posterior. Esta análise revelou que a linhagem silenciada para a FAZ10 apresentava de forma geral uma perda no posicionamento normal dos pares de cinetoplastos e de núcleos em relação as células controle (**Fig. 45A**). Este reposicionamento incorreto dos pares N e K levou à formação de diferentes fenótipos nas células induzidas, apresentando diferentes configurações no posicionamento destas organelas (**Fig. 45B**).

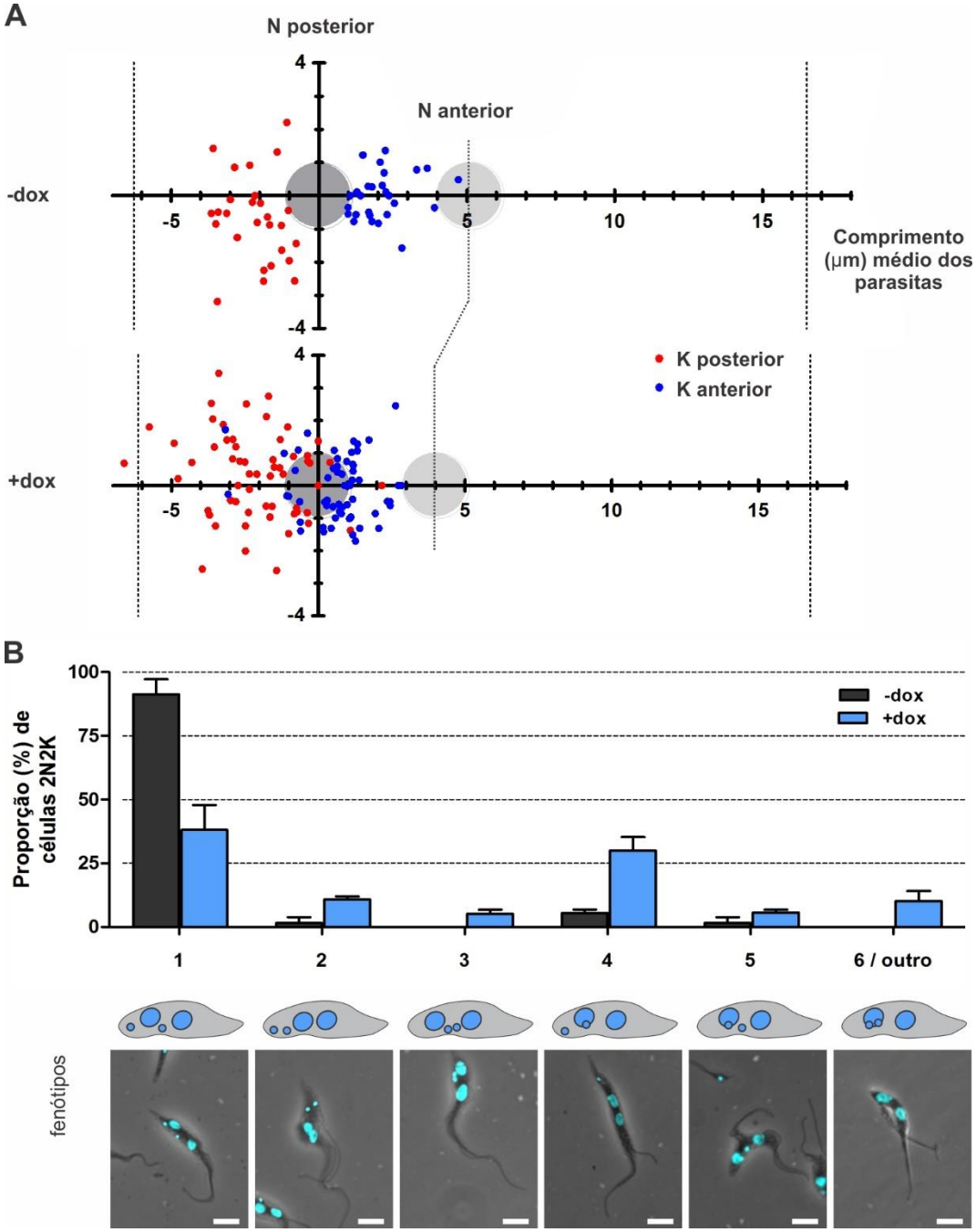


Figura 45: Posicionamento dos núcleos e cinetoplastos em células PCF silenciadas para a FAZ10. [A] Gráfico de coordenadas da posição dos cinetoplastos (K posterior e K anterior) e do N anterior (círculo cinza claro) em relação ao N posterior em células 2N2K controle (-dox) ou induzidas (+dox). Os posicionamentos dos N e K foram medidos como descrito nos Materiais e Métodos. [B] Proporção dos diferentes fenótipos de N e K em células 2N2K induzidas (+dox) ou não (-dox) com doxiciclina, visualizadas por DAPI. n > 90 por experimento. Barra = 5 µm.

Outro defeito fenotípico observado decorrente do silenciamento da FAZ10 foi a falha na ingressão do sulco de clivagem em células 2N2K durante a citocinese. Após a indução do RNAi, cerca de 55% das células em divisão apresentavam um sulco de

clivagem iniciado em local errado, ocasionando a divisão incorreta das células filhas) (**Fig. 46A, B**). A nossa hipótese para este evento era de que o destacamento do flagelo fosse o principal responsável pela ingressão incorreta do sulco de clivagem durante a citocinese. Enquanto em células não induzidas (-dox) a maioria das clivagens incorretas durante a citocinese são decorrente da falta da adesão do flagelo, em células 2N2K silenciadas para a FAZ10, a maioria (~68%) apresentavam flagelo aderido ao corpo celular durante a divisão celular (**Fig. 46 C, D**). Isto sugere que apenas a falta de FAZ10 já é suficiente para causar o erro na ingressão do sulco de clivagem durante a citocinese.

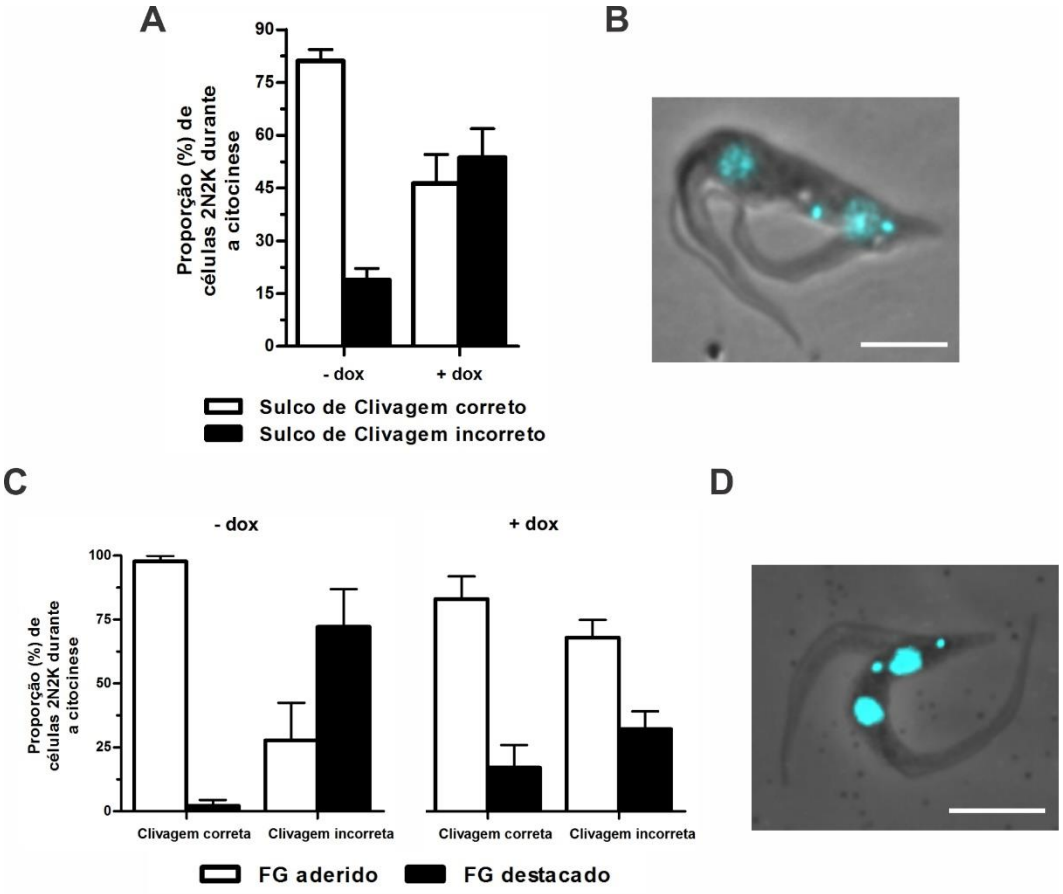


Figura 46: FAZ10 é necessária para o correto inserção do sulco de clivagem em *T. brucei* PCF. [A] Proporção de células 2N2K (-dox ou + dox) durante a citocinese com sulco de clivagem correto ou incorreto. n > 70 células/experimento. [B] Imagem de célula induzida marcada com DAPI mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem. Barra = 5 µm. [C] Proporção de células 2N2K com defeito na adesão flagellar correlacionado com a presença ou ausência do sulco de clivagem incorreto em células com ou sem indução do RNAi. n > 50 células/experimento. [D] Imagem de célula 2N2K induzida marcada com DAPI (azul) mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem com o flagelo aderido ao corpo celular. Barra = 5 µm.

Adicionalmente, a divisão incorreta durante a citocinese foi analisada através da marcação dos microtúbulos do citoesqueleto de células 2N2K com anticorpo anti-β-tubulina confirmando os dados anteriores (**Fig. 47A**). Também foi observado que o sulco de clivagem ingressou em local incorreto e seccionou o núcleo anterior **(Fig. 47A**). Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a formação e ingressão do sulco de clivagem foram observadas com maiores detalhes. Em células não induzidas, a dobra de divisão se forma a partir de uma invaginação da membrana do corpo celular (i) com a ingressão do sulco de clivagem no sentido anterior-posterior (ii) (**Fig. 47B**). Em células silenciadas para FAZ10, a definição do local de invaginação incorreto resulta em uma divisão completamente assimétrica das células filhas (**Fig. 47B**). Em alguns casos foi possível observar células sofrendo uma citocinese alternativa, no sentido da região posterior para a região anterior (**Fig. 47C**).

Estes dados indicam que FAZ10 participa no mecanismo de definição do local de inserção do sulco de clivagem durante a citocinese e a falta desta proteína afeta o processo de citocinese por meio do posicionamento incorreto das organelas (N e K) e pela formação em local incorreto do sulco de clivagem.

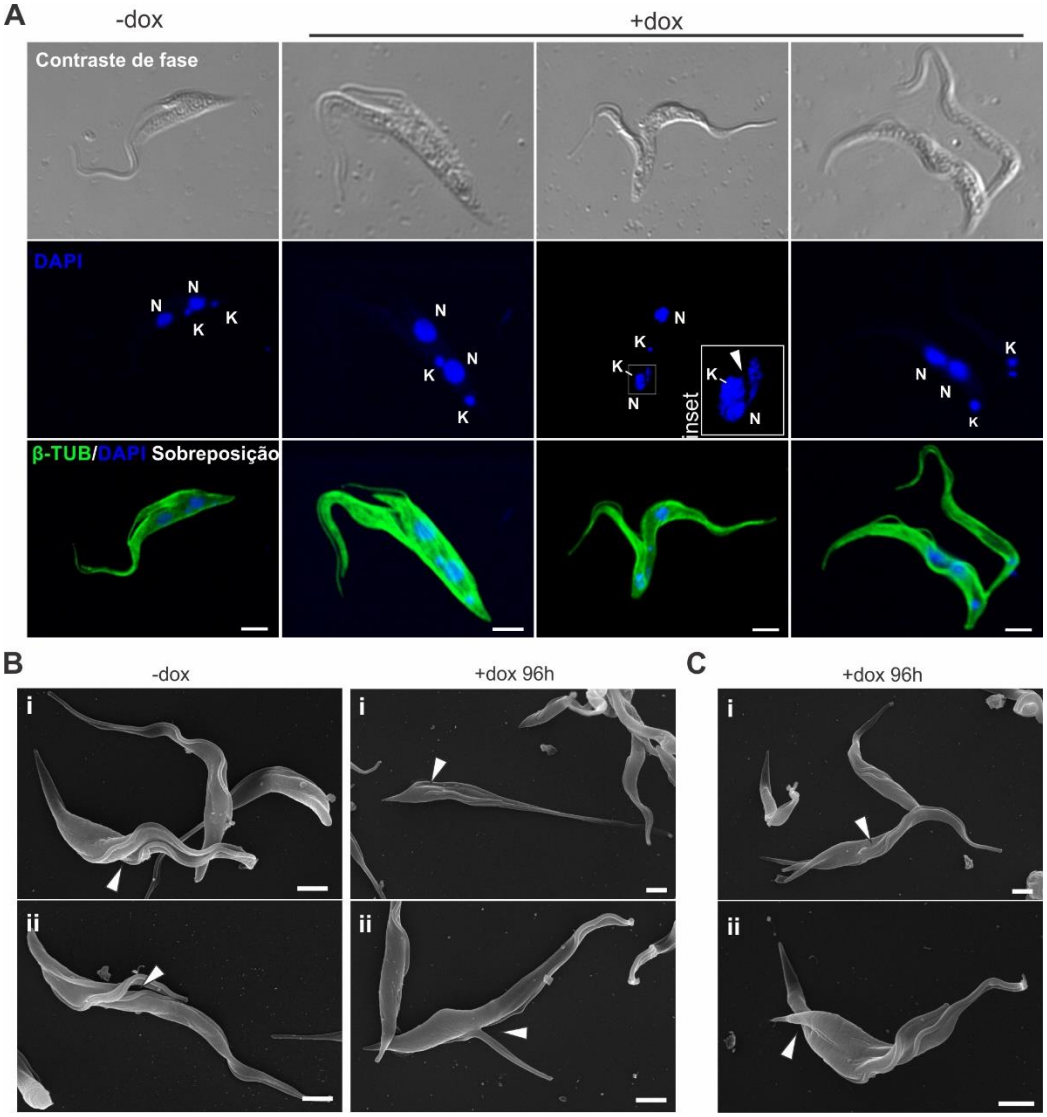


Figura 47: [A] Microscopia confocal do citoesqueleto de células 2N2K marcadas com anti-β-TUB e DAPI com evidência para o posicionamento incorreto do sulco de clivagem em células induzidas com doxiciclina. *Inset*/seta branca mostra o detalhe do sulco de clivagem cortando o N anterior. Barra = 5 µm. [B-C] Imagens de MEV de células induzidas ou não com doxiciclina. As imagens representam a formação da dobra de divisão (i) e a ingressão do sulco de clivagem (ii), indicado pelas pontas de setas. Barra = 2 µm.

Para investigar a função da FAZ10 em formas sanguícolas (BSF) de *T. brucei*, nós geramos a linhagem FAZ10:myc RNAi. Esta linhagem expressa constitutivamente a FAZ10 acoplada à *tag* myc e permite a indução do silenciamento desta proteína pelo modelo já descrito para PCF. A indução do silenciamento em BSF resultou no depleção da FAZ10:myc a partir de 48 horas de tratamento com tetraciclina, como mostrado por WB e imunofluorescência (**Fig. 48A, B**). De maneira semelhante à PCF, a FAZ10 está localizada na estrutura do FAZ da célula (**Fig. 48B**). O *knockdown* da FAZ10 também impediu o crescimento destas células a partir de 24 horas após a

indução (**Fig. 48C**), o que resultou no acúmulo de células com tamanho e forma celular aberrante (**Fig. 48D**) e também com defeitos na adesão flagelar (**Fig. 48D**). Defeitos na adesão desta organela foram contabilizados e aumentaram com o tempo de indução do silenciamento chegando a aproximadamente 30% da população (**Fig. 48E**). Ao avaliarmos as células para acúmulo de DNA, podemos notar um aumento significativo de células multinucleadas (Outro) a partir de 24 horas de indução (**Fig. 48F, G**). Como em PCF, células *zoids* (0N1K) foram observadas, mas neste caso decorrentes da divisão prematura de células 1N2K que ainda não tinham completado a mitose (**Fig. 48H**).

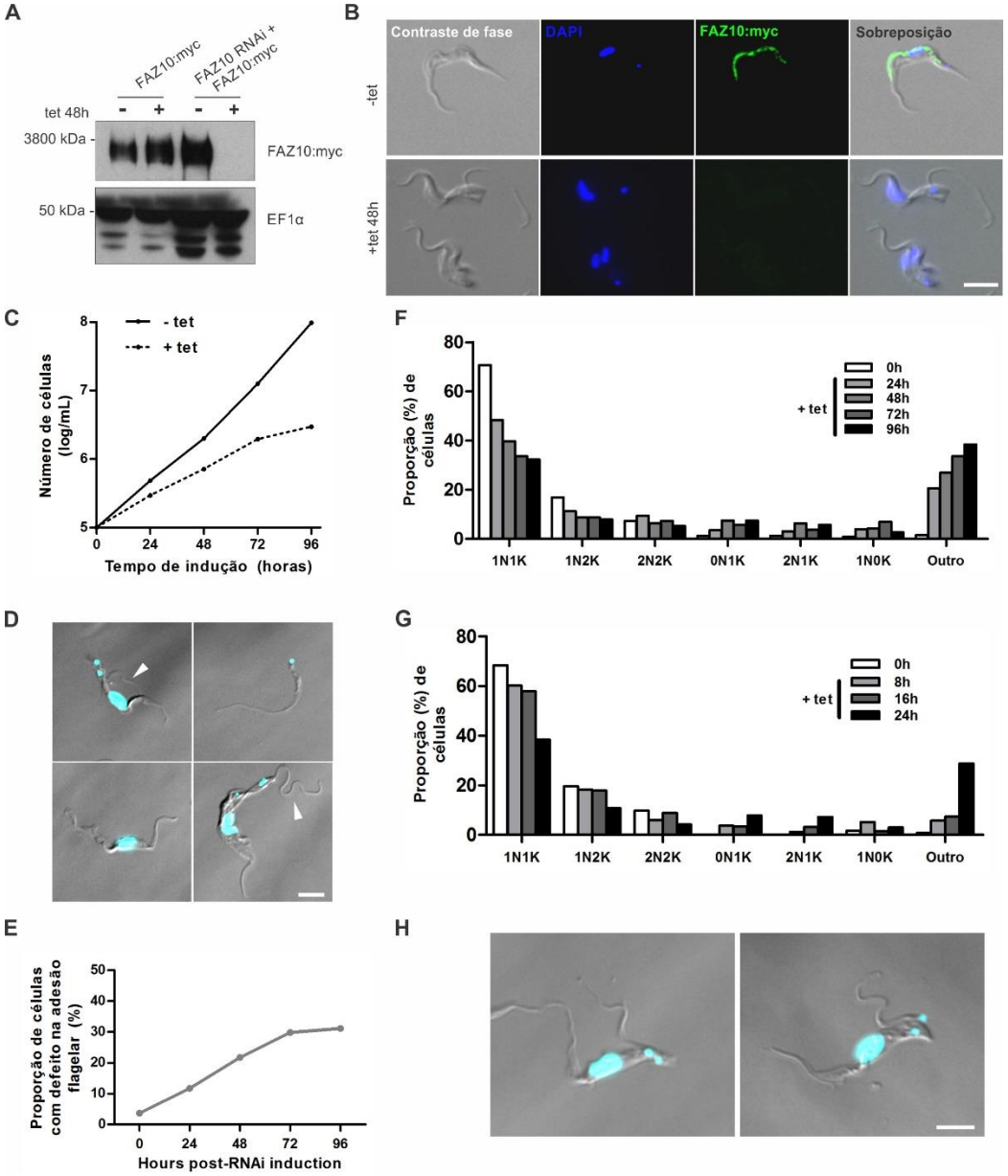


Figura 48: Silenciamento da FAZ10 em *T. brucei* BSF. [A] WB usando anticorpo anti-FAZ10 em lisado celular total de células não induzidas (-tet) ou induzidas (48 e 96 horas, + tet) das linhagens FAZ10:myc e FAZ10:myc RNAi. Anti-EF1α foi usado como controle. [B] Imunofluorescência de citoesqueleto de células FAZ10:myc RNAi não induzidas (- tet) ou induzidas (+ tet) usando anticorpo anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 µm. [C] Curva de crescimento acumulativa de células FAZ10 RNAi na presença (+ tet) ou ausência (- tet) de tetraciclina. [D] Células FAZ10 RNAi marcadas com DAPI após indução com tetraciclina. Setas indicam o flagelo totalmente ou parcialmente destacado. Barra = 5 µm. [E] Quantificação de células FAZ10 RNAi com flagelo destacado após indução do silenciamento com tetraciclina. n > 500 células/ponto. [F-G] Quantificação dos núcleos (N) e cinetoplastos (K) em células FAZ10 RNAi antes e durante indução com tetraciclina. n > 150 células/ponto. [H] Epifluorescência de células induzidas coradas com DAPI após 8 horas de indução com tetraciclina. Barra = 5 µm.

4.11. Caracterização funcional da proteína gigante Tb927.8.3540

O primeiro passo após a obtenção da linhagem Tb927.8.3540:myc RNAi, foi a realização do fracionamento do citoesqueleto para detecção da proteína Tb927.8.3540. A análise de WB realizada usando anti-myc revelou que Tb927.8.3540:myc está presente no citoesqueleto total (P1) associada aos microtúbulos subpeliculares devido à sua propriedade de ser completamente solubilizada após tratamento com tampão de alta força iônica (**Fig. 49**). Nenhuma marcação foi observada na fação do flagelo (P2).

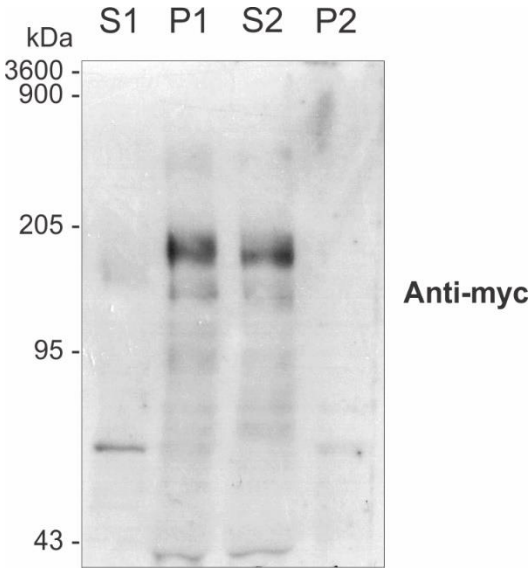


Figura 49: Análise de WB de amostras do fracionamento do citoesqueleto da linhagem expressora de Tb927.8.3540:myc utilizando anticorpo anti-myc.

Posteriormente, o silenciamento da Tb927.8.3540 foi confirmado por WB e imunofluorescência. Os níveis proteicos desta proteína diminuíram após 48 horas de indução porém a indução por tempo prolongado não foi suficiente para silenciar totalmente a expressão desta proteína (**Fig. 50A**). A imunofluorescência da proteína Tb927.8.3540:myc revelou uma distribuição por todo o corpo celular (**Fig. 50B**). A perda da localização na região flagelar, como foi visto para os anticorpos produzidos contra as regiões N- e C-terminais de Tb927.8.3540, pode ser explicado pela presença da cauda myc. Além disso, a indução do silenciamento foi suficiente para eliminar a marcação com anti-myc nas células (**Fig. 50B**).

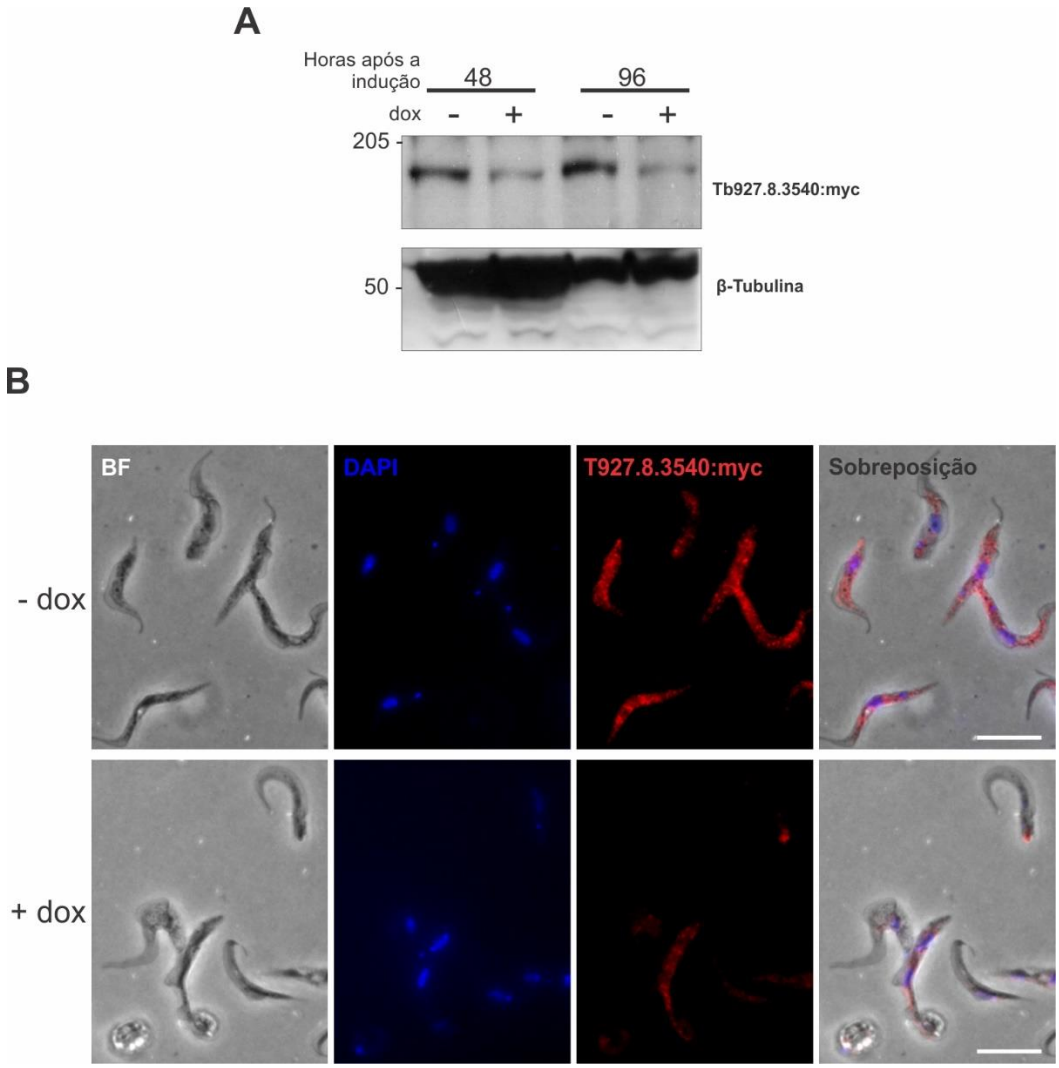


Figura 50: Silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] WB contra a cauda myc fusionada a Tb927.8.3540 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. A β-Tubulina foi usada como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-myc em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barra = 10 µm.

Para caracterizar do fenótipo avaliamos a proliferação celular após a indução do silenciamento. A falta de Tb927.8.3540 foi suficiente para inibir a proliferação celular após algumas passagens da cultura (**Fig. 51A**). A contagem dos N e K revelaram que as células silenciadas apresentaram pouco acúmulo de DNA ou separação incorreta dos mesmos. Cerca de 15% da cultura após 96 horas de indução apresentaram quantidades incorretas de N e K (0N1K, 2N1K, 1N0K e Outro) (**Fig. 51B**).

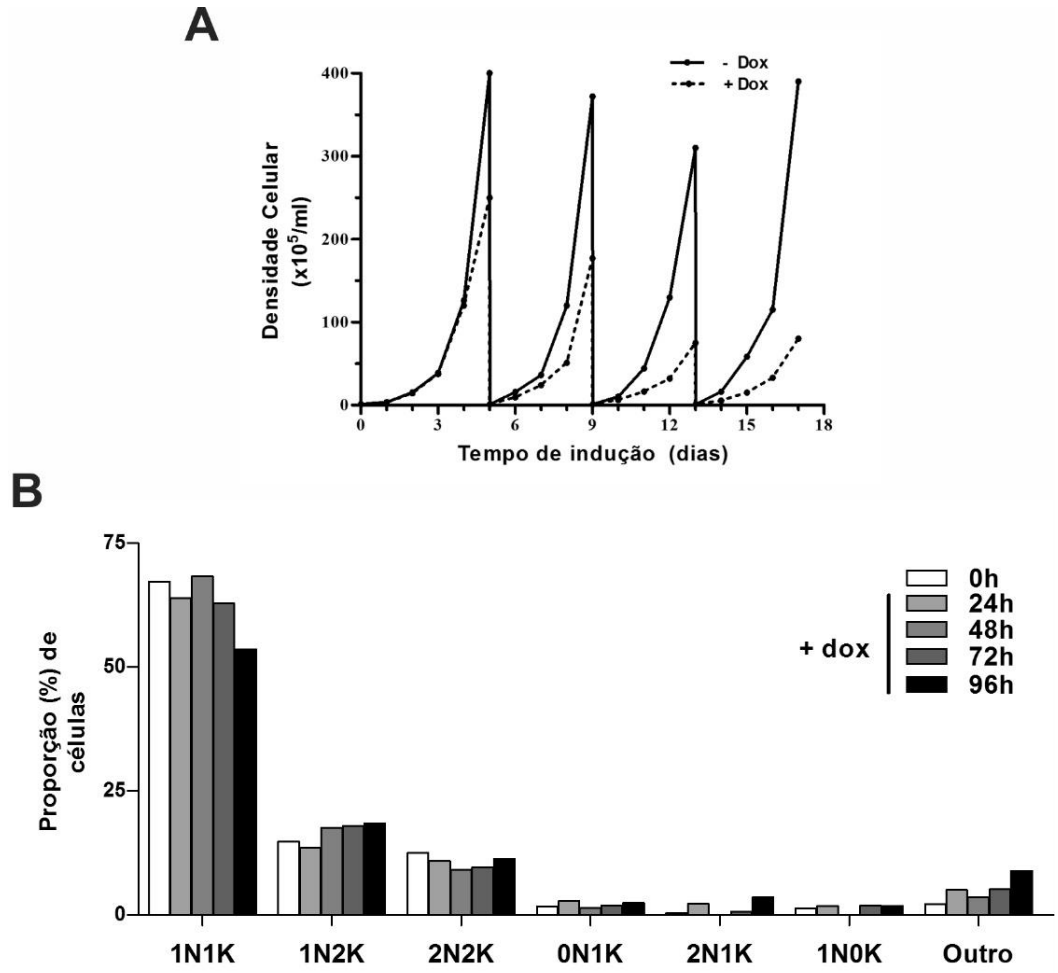


Figura 51: Avaliação do silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento. [B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleos (N) e/ou cinetoplastos (K) antes e após a indução do RNAi.

Para observar o fenótipo decorrente do silenciamento da Tb927.8.3540, foram realizadas análises por microscopia de campo claro de células fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. O principal efeito decorrente do silenciamento desta proteína foi modificação morfológica das células procíclicas tripomastigotas alongadas em células com formas arredondadas semelhante a formas amastigotas ou endomastigotas (**Fig. 52A)**. Após a quantificação dessas células arredondadas, observamos que aproximadamente 35% da população adquiriram esta morfologia após a indução do RNAi (**Fig. 52B**).

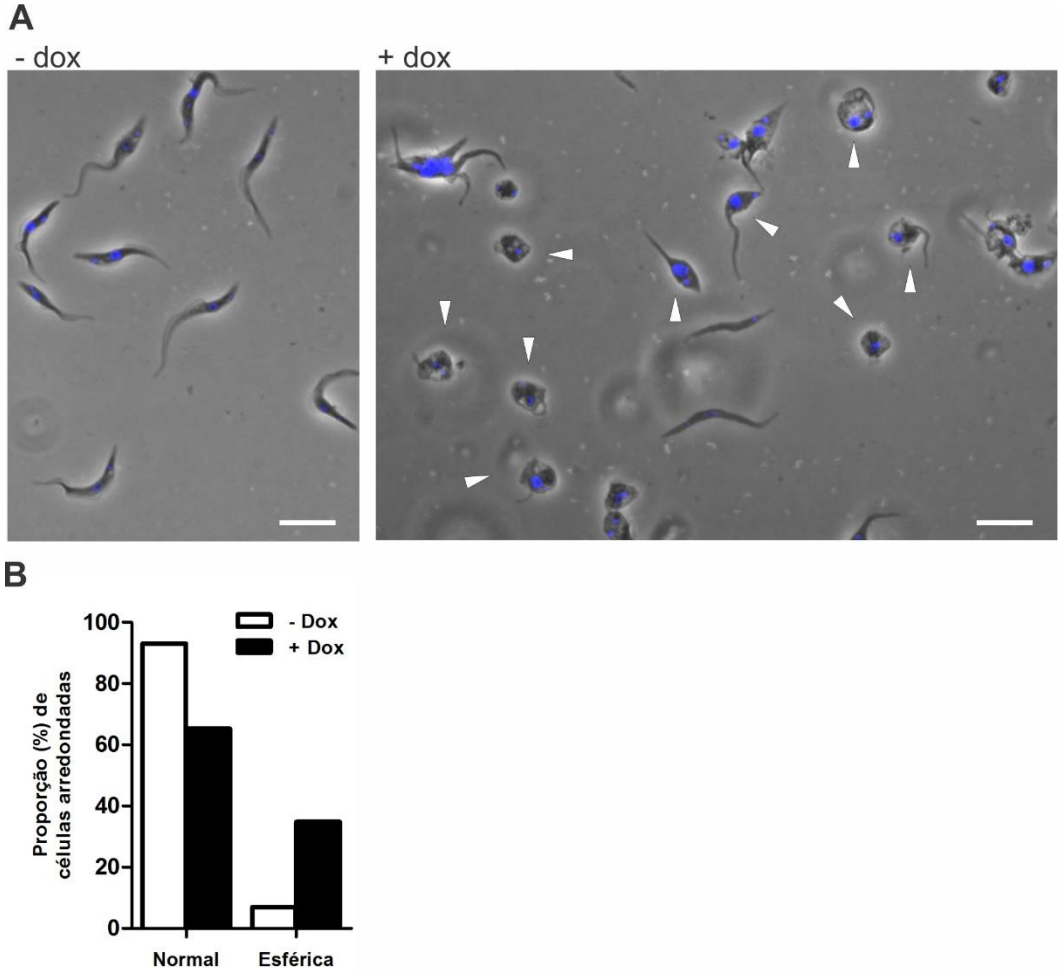


Figura 52: Efeito do silenciamento de Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína Tb927.8.3540. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. As imagens representam células controle (- dox) e células induzidas (+ dox) observadas após 96 horas de indução do silenciamento. Barra = 10 µm. [B] Proporção de células na cultura que apresentaram formato arredondado ou esférica.

Ao observamos citoesqueletos de células induzidas através da marcação da β-tubulina por imunofluorescência (**Fig. 53**), vimos que a célula encurtou seu tamanho (i e ii), o citoesqueleto de tubulina dobrou sobre si mesmo (iii e iv), e o flagelo diminuiu de tamanho internalizando-se (v e vi) (**Fig. 53**).

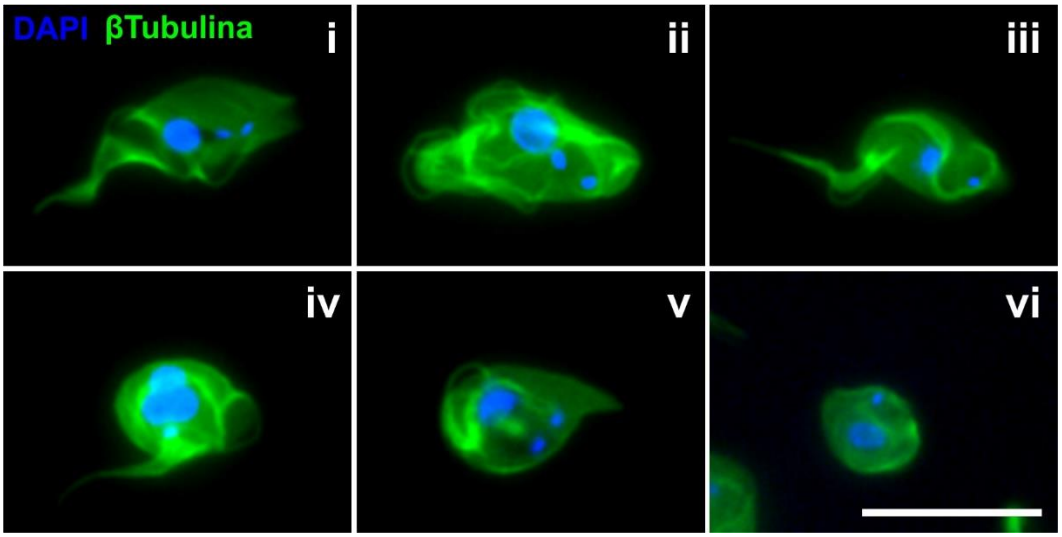


Figura 53: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF silenciado para Tb927.8.3540. O anticorpo anti-βTUB (verde) foi utilizado para marcar os microtúbulos subpeliculares e DAPI (azul)foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 10 µm.

Posteriormente, avaliamos a integridade de estruturas do citoesqueleto nas células silenciadas para Tb927.8.3540. Utilizamos os anticorpos L3B2 e anti-PFR para avaliar a presença do FAZ e do PFR nestas células. A marcação para a FAZ1 presente na zona de adesão flagelar foi perdida ou sua distribuição ficou bastante reduzida nas células após a indução do silenciamento (**Fig. 54**). O mesmo efeito foi observado para o PFR, com uma marcação ausente ou menor nas células arredondadas (**Fig. 55**).

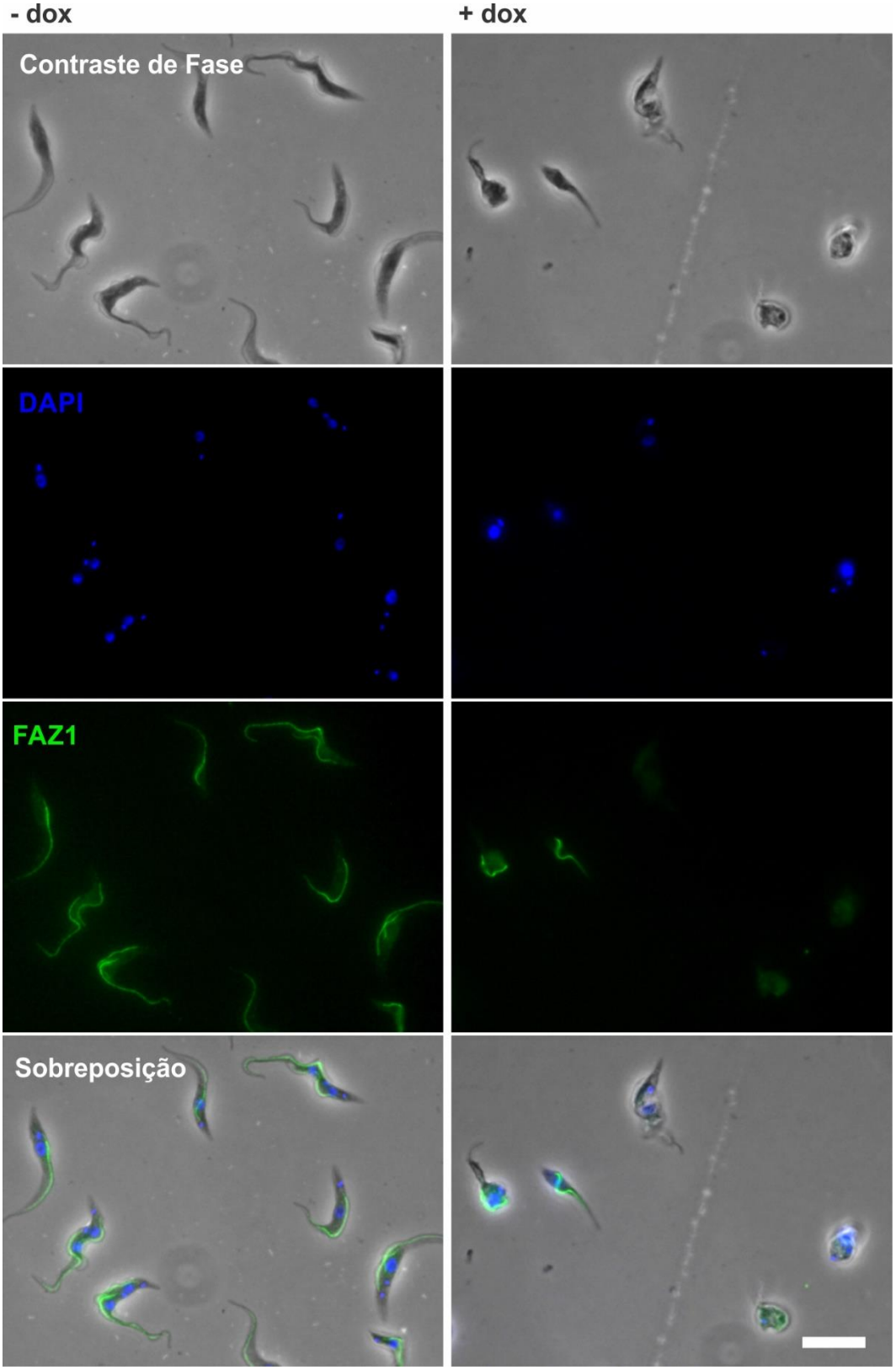


Figura 54: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo L3B2 foi usado para marcar a FAZ1 (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 µm.

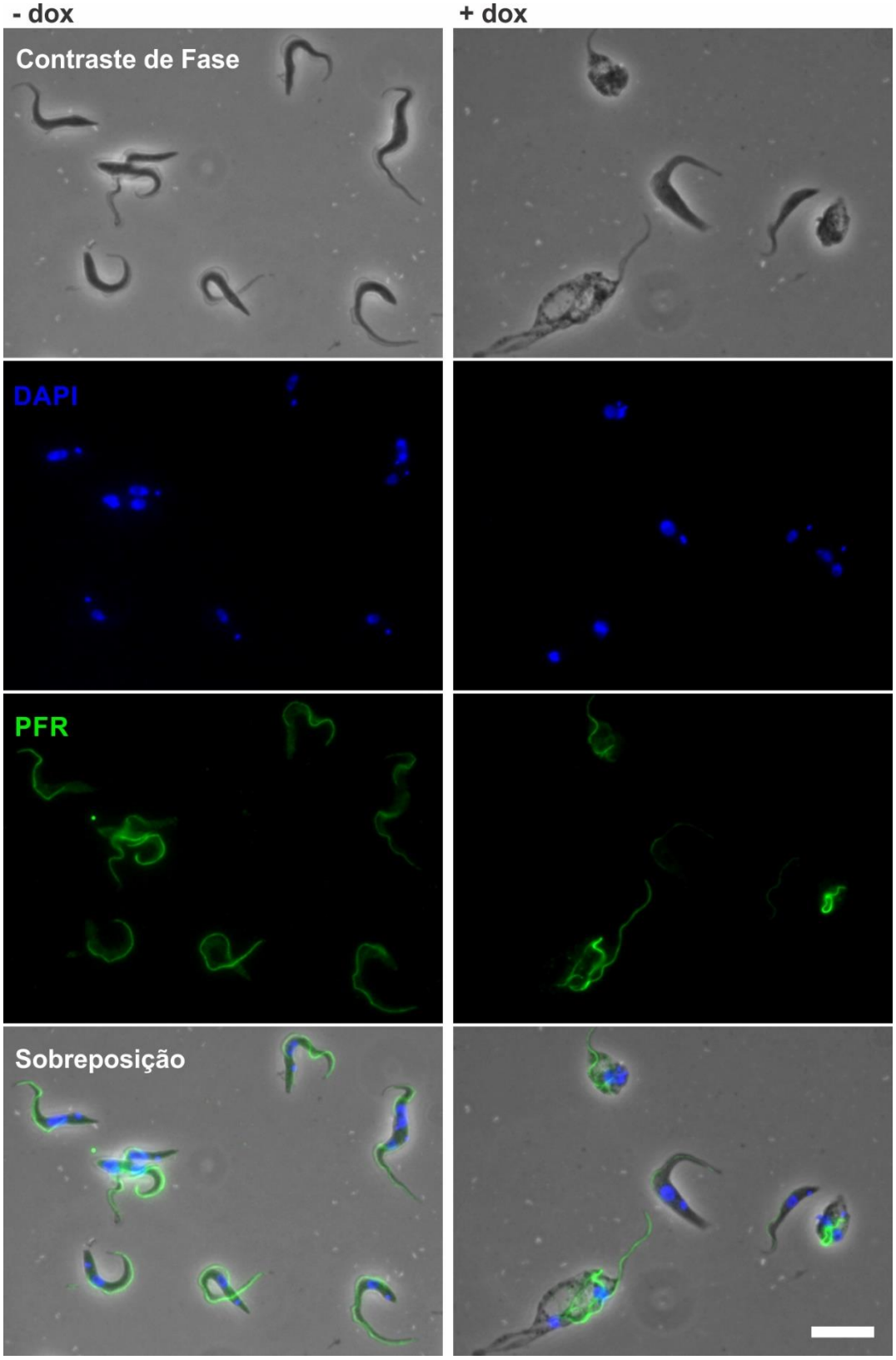


Figura 55: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo anti-PFR foi usado para marcar PFR (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 µm.

Análises por MET revelaram que células induzidas apresentaram uma forma arredondada sem o flagelo aderido lateralmente (**Fig. 56A**). Neste caso, as células também apresentaram o axonema formado intracelularmente, com a estrutura paraflagelar ausente (**Fig. 56A, setas**). Adicionalmente, flagelos extracelulares, foram observados com o PFR e o FAZ ausentes (**Fig. 56B**) indicando a possível falha na formação destas estruturas.

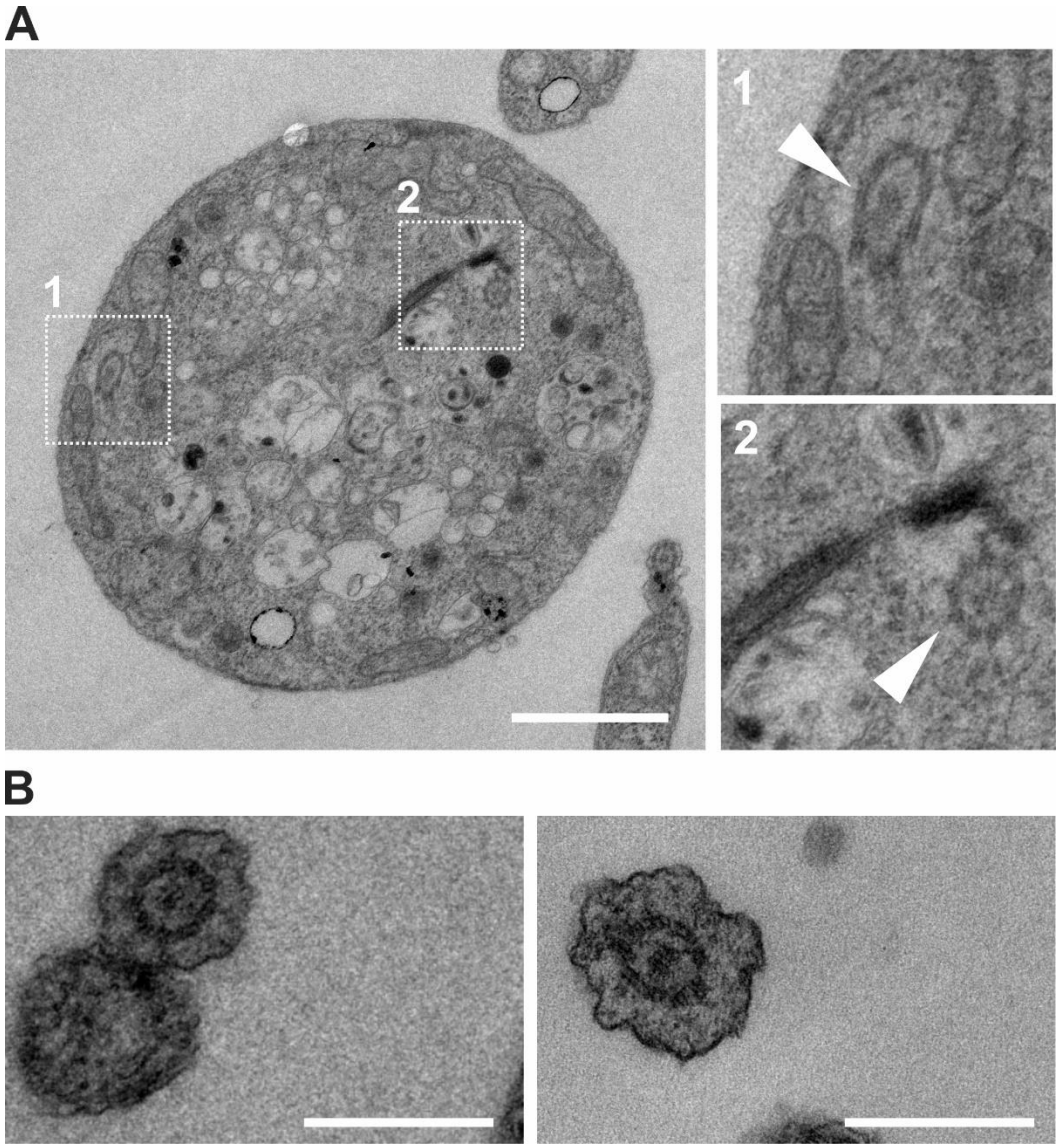


Figura 56: Microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de T. brucei silenciados para a proteína gigante Tb927.8.3540. [A] Corte transversal de uma célula esférica com o flagelo extracelular adjacente ausente. No detalhe, a presença do axonema formado intracelularmente (1 e 2, setas brancas) sem a estrutura paraflagelar. Barra = 1 µm. [B] Corte transversal de flagelos, aderidos (esquerda) ou não (direita) ao corpo celular, sem a estrutura paraflagelar. Barra = 100 nm.

Ao analisar detalhadamente estas células silenciadas por MEV, observamos dois tipos de transformação que ocorreram nas células. A primeira, em que o flagelo da célula induzida se torna internalizado e a célula gradualmente se torna arredondada (**Fig. 57A**), e uma segunda onde o flagelo se destaca totalmente do corpo flagelar da célula e permanece aderido somente pela porção proximal enquanto a célula adquire o formato arredondado (**Fig. 57B**).

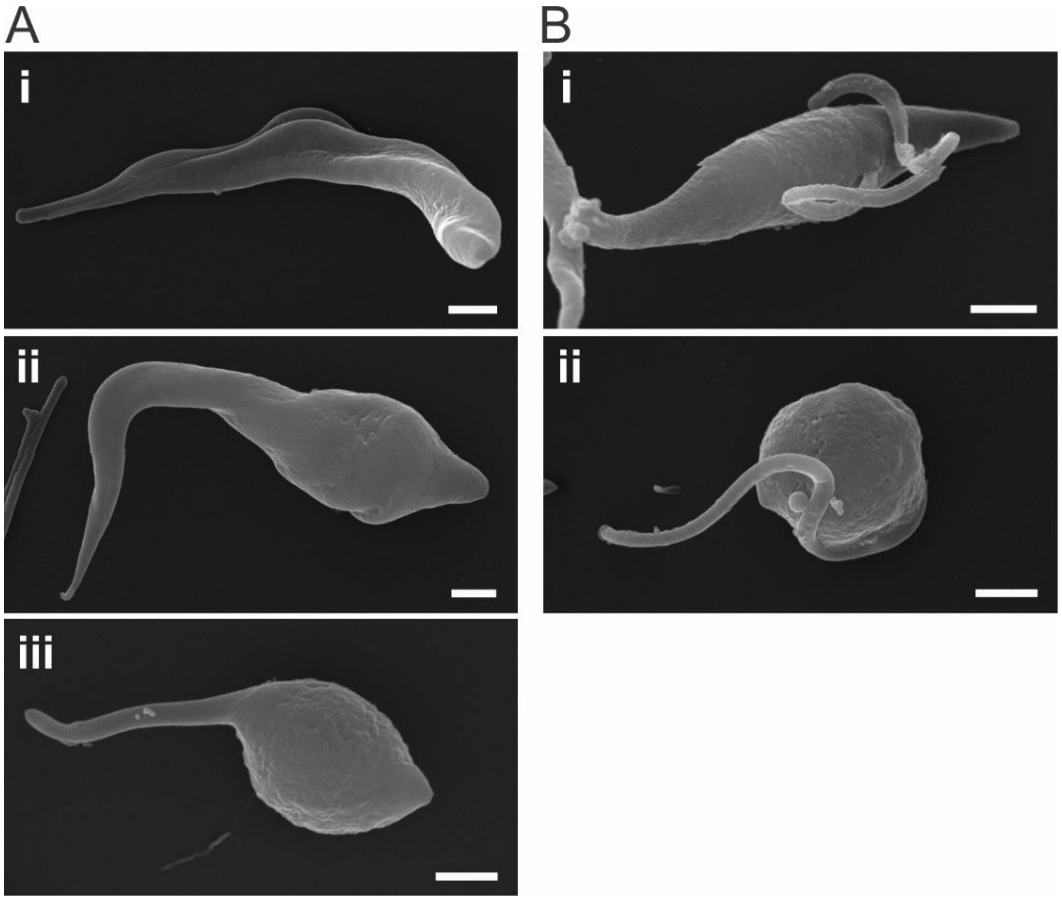


Figura 57: MEV de células Tb927.8.3540 RNAi induzidas. É possível observar diferentes estágios de modificação da morfologia celular com o flagelo internalizado [A] ou externo e destacado do corpo celular [B]. Barra = 1 µm.

5. Discussão

5.1. Propriedades moleculares das proteínas gigantes

Proteínas de alta massa molecular começaram a ser estudadas a partir dos primeiro trabalhos que descreveram componentes do músculo estriado de vertebrados, geralmente associados ao citoesqueleto e com função essencial para o funcionamento dos sarcômeros (WANG, K.; MCCLURE; TU, 1979; WANG, K.; WILLIAMSON, 1980; WANG, K., 1984). Em todos os gêneros da família Trypanosomatidae foi demonstrada a ocorrência de proteínas de alta massa molecular, e esta nova classe de proteínas, similar ao que se tem descrito para a família das titinas, pode exercer funções catalíticas específicas bem além de somente um papel estrutural (BAQUI et al., 2000a; BAQUI et al., 2000b). Não se deve desconsiderar, porém, que estas diferenças podem estar relacionadas com o estágio do ciclo de vida e adaptações celulares de cada espécie de protozoário. Com base nisto, este trabalho teve como proposta principal a identificação e caracterização das proteínas de alta massa molecular presentes no citoesqueleto de *T. brucei*.

A análise das proteínas do citoesqueleto de *T. brucei* por SDS-PAGE em gel de gradiente permitiu resolver as proteínas de alta massa molecular. Esta abordagem já foi utilizada para estudar proteínas gigantes de diversos tripanossomatídeos (RUIZ-MORENO et al., 1995; BAQUI et al., 1996; BAQUI et al., 2000a; BAQUI et al., 2000b) e eucariotos superiores (WANG, K., 1982; GRANZIER; WANG, 1993). Atualmente as ferramentas moleculares para sequenciamento e bancos de dados do genoma completo de diversos organismos tem auxiliado na determinação de características gerais das diferentes proteínas, incluindo o tamanho do gene. Entretanto, como visto neste trabalho, apesar do banco de dados TriTrypDB indicar uma massa predita para as proteínas gigantes de *T. brucei*, as análises de eletroforese mostraram que as proteínas aqui estudadas na verdade possuem massa molecular superior ao que foi indicado. No caso da FAZ10, este tamanho chegou a ser 4 vezes maior.

Os resultados de SDS-PAGE, WB e imunoprecipitação revelaram que as proteínas gigantes migraram como um par de bandas de baixa mobilidade eletroforética. Isto já foi descrito para outras proteínas de tripanossomatídeos

sugerindo que este comportamento deve ser uma característica comum de proteínas de elevado peso molecular (BAQUI et al., 1996; BAQUI et al., 2000b; VAUGHAN et al., 2008; HAYES et al., 2014; MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3**). No nosso caso, uma vez que todos os procedimentos para extrair o citoesqueleto e as etapas subsequentes para isolar os flagelos foram conduzidos na presença de vários inibidores de proteases e fosfatases, podemos excluir a possibilidade de que essas bandas adicionais são produtos da degradação durante o processo de extração. Ainda assim, não se pode descartar a possibilidade de que as duas ou mais bandas poderiam representar diferentes modificações pós-traducionais decorrentes da síntese proteica. Outra explicação seria o fato de que isso poderia representar variação alélica devido à heterogeneidade no número de repetições dentro das suas sequências (KOHL; SHERWIN; GULL, 1999; VAUGHAN et al., 2008).

Recentes avanços em técnicas de sequenciamento, proteoma e análises em larga escala permitiram um rápido avanço na identificação e caracterização de componentes do citoesqueleto de *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005b; BROADHEAD et al., 2006; ZHOU et al., 2010; URBANIAK; GUTHER; FERGUSON, 2012; GHEIRATMAND et al., 2013; SUBOTA et al., 2014; SUNTER et al., 2015b). Inicialmente, a ferramenta molecular que nos permitiu estudar as proteínas gigantes foram os anticorpos policlonais produzidos por nós em camundongos. É necessário realçar que anticorpos comerciais específicos para tripanossomatídeos não estão disponíveis no mercado. Além disso, já foi descrito para outras proteínas de alta massa molecular relacionadas ao citoesqueleto dos tripanossomatídeos, que a presença do alto número de motivos repetitivos em suas sequências primárias tornam essas proteínas bons imunógenos (MULLER et al., 1992; COTRIM et al., 1995; BAQUI et al., 1996; VAUGHAN et al., 2008; GALETOVIC et al., 2011).

5.2. Distribuição celular das proteínas gigantes

O citoesqueleto dos tripanossomatídeos é uma estrutura celular altamente estável e composta de proteínas essenciais para os diversos processos celulares. Os microtúbulos subpeliculares formam o arcabouço do corpo celular, enquanto o flagelo é uma organela mecanosensória ligada ao longo de todo o corpo celular através de uma estrutura especializada formada por filamentos que medeia a adesão,

denominada zona de adesão flagelar ou FAZ (ROBINSON et al., 1995; GULL, 1999; SUNTER; GULL, 2016). O flagelo é a maior estrutura do citoesqueleto e de alta complexidade molecular, além de ser composto por mais de 300 proteínas diferentes, das quais a maioria ainda não foram completamente caracterizadas (LANGOUSIS; HILL, 2014). Além disso, diversas outras proteínas conectam os principais componentes do citoesqueleto entre si, de forma semelhante ao que fazem os filamentos intermediários nas células de eucariotos superiores (KOSTER et al., 2015).

Vários estudos de identificação e caracterização de proteínas de alta massa molecular mostraram que estas se localizam principalmente nas regiões de conexão dos elementos do citoesqueleto (RUIZ-MORENO et al., 1995; BAQUI et al., 1996; BAQUI et al., 2000a; VAUGHAN et al., 2008; GALETOVIC et al., 2011; ESSON et al., 2012; SUNTER et al., 2015a). Estas regiões compreendem o flagelo, o FAZ, e o bolso flagelar; locais estes constituídos majoritariamente de proteínas responsáveis pela organização e regulação do citoesqueleto. Estas observações são reforçadas pelos nossos dados de espectrometria de massas das proteína, onde identificamos algumas proteínas já conhecidas e que estão localizadas nestas estruturas (HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014; SUNTER et al., 2015a). Outro exemplo, é o complexo tripartido que conecta a região proximal do flagelo ao cinetoplasto (OGBADOYI; ROBINSON; GULL, 2003), onde foi mostrada a marcação com o anticorpo anti-PG2. Adicionalmente, a semelhança na distribuição da marcação de anti-PG1 e anti-PG2 entre as formas procíclicas e sanguícolas do *T. brucei* indicam que estas proteínas são elementos importantes do citoesqueleto independentemente da forma do ciclo de vida do parasita. Por último, anti-PG1 e anti-PG2 apresentaram alta especificidade contra o citoesqueleto de *T. brucei* e falta de, ou baixa reatividade quando utilizados contra outras espécies de tripanossomatídeos. Em *Leishmania* entretanto, apesar da estrutura do FAZ ser muito mais discreta neste organismo, esta espécie codifica diversas proteínas homólogas do FAZ de *T. brucei* (WHEELER; SUNTER; GULL, 2016).

5.3. Identificação das proteínas gigantes

Na análise por espectrometria de massas das proteínas gigantes de *T. brucei* com maior tamanho (Zona 1), dentre as 15 candidatas detectadas, 3 já foram

caracterizadas e reportadas na literatura: a proteína do tipo calpaína GM6 (HAYES et al., 2014), a FLAM 3 (ROTUREAU et al., 2014), e a hidina (DAWE et al., 2007). A ClpGM6 (Tb11.57.0008) é uma proteína localizada na região do FAZ e está envolvida na manutenção da morfologia celular de *T. brucei*. A falta desta proteína leva à transformação de formas tripomastigotas do parasita em formas epimastigota-*like.* Estas células são caracterizadas pela alteração do posicionamento do núcleo e cinetoplasto, diminuição do FAZ e aumento do flagelo livre, semelhante à forma epimastigota (HAYES et al., 2014). A proteína FLAM3 também foi caracterizada como componente do FAZ e está envolvida na arquitetura desta estrutura e manutenção da adesão flagelar (ROTUREAU et al., 2014; SUBOTA et al., 2014; SUNTER et al., 2015a). A terceira candidata descrita é a hidina, que ao contrário das ClpGM6 e FLAM3, não é um componente do FAZ e está localizada no flagelo fazendo a conexão entre os microtúbulos do axonema. Na sua ausência, o par central de microtúbulos desestabiliza-se e é perdido, acarretando na perda da motilidade pelos parasitas (DAWE et al., 2007). Ainda, nossa principal candidata detectada foi a proteína FAZ10, que já tinha sido previamente identificada por MORRISWOOD et al. (2013), e teve seu papel funcional caracterizado por nós (MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3**). Aqui, mostramos que a FAZ10 é essencial para a adesão flagelar, para o posicionamento das organelas, e mais importante para direcionar o local de ingressão do sulco de clivagem durante a citocinese de *T. brucei*. Adicionalmente, a proteína Tb927.8.3540 também foi caracterizada no presente estudo como essencial para a regulação da morfologia do citoesqueleto, organização dos microtúbulos subpeliculares e formação do FAZ. Sem esta proteína, as células se tornam esféricas e adquirem um flagelo intracelular.

Estes exemplos demonstram que as proteínas gigantes apresentam um papel regulatório central na organização do citoesqueleto de *T. brucei*. Além disso, 9 outras proteínas de alta massa molecular não caraterizadas foram identificadas aqui pela primeira vez, o que realça a importância do estudo destas proteínas no contexto do citoesqueleto e da biologia deste parasita.

Em relação às proteínas gigantes referentes à Zona 2, das 17 candidatas detectadas, 8 já foram caracterizadas ou reportadas na literatura. Além das proteínas candidatas descritas acima (ClpGM6, FLAM3 e hidina), as proteínas TbIAD3, TbDNAH10, TbIAD5-1, TbIAD5-2 e Tb927.3.930 foram identificadas e caracterizadas

como importantes proteínas para manutenção da motilidade celular (MONNERAT et al., 2009; SPRINGER et al., 2011; WEI et al., 2014). A TbIAD5-1 é um braço interno de dineína que conecta os pares de microtúbulos do axonema. Foi mostrado que esta proteína interage com TbCentrin3, e tanto a falta de TbCentrin3 como de TbIAD5-1 levaram à perda da estabilidade do axonema e consequentemente da motilidade dos parasitas (WEI et al., 2014). Entretanto, outros braços de dineína como TbIAD5-2 e TbIAD3 não foram afetadas pelo *knockdown* de TbCentrin3, apesar de se localizarem no axonema (WEI et al., 2014). Por sua vez, TbDNAH10 também foi identificada como componente do complexo do braço interno de dineína. Apesar da sua falta não levar afetar estruturalmente o axonema, e o silenciamento de TbDNAH10 ocasionou a perda da motilidade celular (SPRINGER et al., 2011). Por último, em um estudo pela busca de reguladores do ciclo celular, MONNERAT et al. (2009) identificaram a proteína Tb927.3.930, porém sua localização celular não foi demonstrada. Porém, a indução do silenciamento desta proteína levou à perda da motilidade celular e ao acúmulo de células multinucleadas incapazes de se dividir.

A abundância de proteínas contendo domínios de dineína obtidas nas nossas análises, pode refletir em partes as observações sobre distribuição da marcação com o anticorpo anti-PG2, o qual marca adjacente ao copo e corpúsculo basal. Este local é dependente de uma séries de conexões e proteínas do citoesqueleto que organizam e regulam o axonema, FAZ, corpo basal e bolso flagelar (GULL, 1999). As centrinas TbCentrin1, TbCentrin2 e TbCentrin4 foram descritas nestes locais e sabe-se que estas regulam a duplicação e segregação do corpo basal, a organização do *bilobe*, a duplicação do aparato de Golgi, e a progressão da citocinese (HE; PYPAERT; WARREN, 2005; SELVAPANDIYAN et al., 2007; SHI et al., 2008; SELVAPANDIYAN et al., 2012; WANG, M.; GHEIRATMAND; HE, 2012). Assim como TbCentrin3 interage com TbIAD5-1, a abundância de proteínas com domínios de dineína obtidos nas nossas análises, pode indicar uma possível interação destas com as centrinas de *T. brucei*. Não obstante, proteínas motoras estão fortemente associadas à estabilização do axonema, essenciais para o batimento flagelar, motilidade e citocinese (RALSTON et al., 2006; SPRINGER et al., 2011; WEI et al., 2014).

Do mesmo modo, o estudo das outras 8 novas proteínas de alta massa molecular detectadas por nós podem ajudar a elucidar o papel das proteínas gigantes na organização e regulação do citoesqueleto de *T. brucei*.

5.4. Papel da FAZ10 na biologia do *Trypanosoma brucei*

Nós descrevemos aqui o papel funcional da proteína FAZ10 (Tb927.7.3330) de *T. brucei*, previamente identificada na zona de adesão flagelar (MORRISWOOD et al., 2013; SUNTER et al., 2015b). A FAZ10, no nosso entendimento, é a proteína que apresenta a maior massa molecular investigada e caracterizada até hoje em *T. brucei* (MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3**). Diversos estudos descreveram proteínas de alta massa molecular em tripanossomatídeos, compreendendo tamanhos de 500 a 3500 kDa; e enquanto os papéis de várias dessas proteínas não estão esclarecidos, a maioria delas estão relacionadas com o citoesqueleto, principalmente no flagelo e no FAZ. Interessante notar que as proteínas que foram caracterizadas até o momento, quase sempre estão intimamente relacionadas com a morfogênese celular (HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014).

Apesar da ORF Tb927.7.3330 codificar uma proteína de 502 kDa, como descrito no TriTrypDB, caracterizamos a sua massa molecular baseada na migração eletroforética e identificação por WB, o que correspondeu a aproximadamente 2000 kDa, tamanho quatro vezes maior do que o anotado no banco de dados. O *knockdown* por RNAi reforçou estas observações, uma vez que a respectiva banda da proteína desapareceu do gel após o silenciamento. Além disso, a proteína FAZ10:myc apresentou o mesmo padrão de migração no gel de gradiente. Visto que esta proteína apresenta uma abundância de padrões repetitivos na sua sequência é possível que estas regiões podem não estar corretamente anotadas devido aos problemas técnicos inerentes de sequenciamento e anotação em banco de dados.

Outros exemplos de proteínas que também foram detectadas como um *doublet* de bandas proteicas de baixa mobilidade eletroforética foram em *Phytomonas, Leptomonas* e *Leishmania* (BAQUI et al., 2000b), e também em eucariotos superiores (LABEIT; KOLMERER, 1995). Um padrão similar foi também observado para FAZ1, FLAM3 e ClpGM6 (VAUGHAN et al., 2008; HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014), e observações não publicadas do nosso grupo sugerem que este comportamento é uma característica comum de proteínas de alta massa molecular. Também devemos considerar os efeitos da proteólise durante o processo de preparação de amostras, modificações pós-traducionais e variações genéticas como discutido anteriormente.

Em respeito à sua localização, a FAZ10 está fortemente associada ao flagelo e não possui domínios transmembrana. Nós sugerimos que esta proteína deve fazer parte do domínio intracelular do FAZ especificamente como parte dos grampos intermembranares, como mostrado por MET do citoesqueleto de *T. brucei*. A indicação de que o fenótipo de uma proteína do FAZ pode estar relacionado com sua localização nos diferentes domínios desta estrutura, como proposto por SUNTER e GULL (2016), reforça nossa hipótese. Além disso, o silenciamento da FAZ10 também resultou no distanciamento entre o domínio distal do PFR e os complexos juncionais do domínio intracelular do FAZ, indicando que FAZ10 deve mesmo agir na conexão destas estruturas.

Nossos dados sugerem que a FAZ10 possui várias funções biológicas. Primeiramente, FAZ10 é necessária para a adesão flagelar visto que seu *knockdown* levou a cerca de 20% e 30% de células apresentando flagelo destacado em parasitas PCF e BSF, respectivamente; proporções similares à observada em células silenciadas para a FAZ1 (VAUGHAN et al., 2008). Como sabe-se que várias proteínas do FAZ também participam da adesão flagelar, podemos afirmar com base nos nossos dados que essas proteínas não são suficientes para compensar totalmente a ausência de FAZ10 (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002; VAUGHAN et al., 2008; SUN et al., 2013; ROTUREAU et al., 2014).

Tem sido bem caracterizado que a interação flagelo/FAZ é crucialmente importante para o reposicionamento das organelas após a duplicação das mesmas (ZHOU et al., 2011; SUN et al., 2013; HAYES et al., 2014). A formação e elongação do flagelo/FAZ da célula filha provê a força necessária para o movimento do novo corpo basal e cinetoplasto em direção à extremidade posterior da célula (ABSALON et al., 2007). No presente estudo, nós observamos que a segregação dos núcleos e cinetoplastos duplicados foi significantemente comprometida em células 2N2K após o silenciamento da FAZ10. Nossa hipótese é de que após a indução, o flagelo/FAZ recém formado exerce menor tração necessária para o reposicionamento das organelas duplicadas, resultando em células aberrantes. Entretanto, um papel direto no posicionamento de organelas independentemente da adesão flagelar não pode ser totalmente ignorado, haja visto que observamos células 2N2K exibindo posicionamento incorreto do N e K, porém não apresentava flagelo destacado do corpo celular. Em outros casos, o silenciamento da proteína associada ao

citoesqueleto AIR9 (MAY et al., 2012) ou da fosfatase PP1-3 (GALLET et al., 2013) resultaram em defeitos no posicionamento de organelas na falta de defeitos diretos na adesão flagelar.

Os dados obtidos aqui também demonstraram um papel direto da FAZ10 na citocinese. Uma causa possível da inibição da citocinese é o defeito na adesão flagelar. Por exemplo, células silenciadas para FAZ1 embora conseguem formar um FAZ aberrante, apresentam defeitos na segregação de núcleos e defeitos durante a citocinese (VAUGHAN et al., 2008). De forma similar à FAZ10, o knockdown de FLA1 leva ao destacamento do flagelo, resultando no impedimento da citocinese e à formação de células multinucleadas (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002). Deve-se notar que o destacamento flagelar nem sempre leva à inibição da citocinese. O silenciamento de FLA1BP causa o destacamento do flagelo mas não afeta a divisão celular (SUN et al., 2013). Entretanto, nossos dados indicam que o destacamento flagelar é um efeito independente do papel de FAZ10 no direcionamento da citocinese. Nestes casos, células 2N2K exibiram posicionamento incorreto do sulco de clivagem que levaram à divisão completamente assimétrica, apesar da célula de ter os dois flagelos aderidos ao corpo celular. Ainda, fomos capazes de registrar células PCF silenciadas para FAZ10 que apresentaram um processo alternativo de citocinese, onde o sulco de clivagem ingressa a partir da extremidade posterior da célula e não da extremidade anterior como ocorre normalmente. Adicionalmente, no silenciamento de FAZ10 em BSF, observamos células com flagelo aderido que sofreram citocinese prematura e desigual. Portanto, FAZ10 parece ser necessária para a determinação do posicionamento do sulco de clivagem e da coordenação temporal para ingressão do mesmo, independente do seu papel na adesão flagelar. Esta função é similar ao que foi descrito para MOB1, a qual afeta a coordenação e o posicionamento do sulco de clivagem, quando silenciada em *T. brucei* (HAMMARTON et al., 2005), e para AIR9 a qual tem o mesmo papel em BSF *T. brucei* (MAY et al., 2012). Além disso, as indicações de que a FAZ10 pode participar na inibição da via de citocinese alternativa (posterior-anterior) de alguma maneira, sugerem uma cooperação desta com as proteínas CIF1/CIF2, já que a FAZ10 foi identificada como vizinho e possível parceiro molecular de CIF1 (ZHOU; HU; LI, 2016).

Em conjunto, nossos dados indicam que a depleção de FAZ10 resulta em diversos fenótipos. É possível que estes fenótipos sejam mediados pela

desestabilização de outras proteínas do citoesqueleto após silenciamento da FAZ10. Vários estudos já mostraram que a arquitetura do FAZ depende de um diverso número de proteínas com diferentes papeis funcionais e com diferentes localizações específicas no citoesqueleto, principalmente na estrutura FAZ/flagelo (ABSALON et al., 2007; VAUGHAN et al., 2008; ZHOU et al., 2011; HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014; HU; ZHOU; LI, 2015; SUNTER; GULL, 2016).

Como mostrado para FAZ10, suas funções na adesão flagelar e posicionamento de organelas são comuns para diversas proteínas do FAZ. Entretanto, FAZ10 é a primeira proteína do FAZ a ser diretamente relacionada com o controle temporal e espacial da definição do sulco de clivagem durante a citocinese. Dado à sua natureza bioquímica e molecular, é tentador especular que FAZ10 deve agir como um alicerce para moléculas regulatórias no local de início da citocinese. Estudos para caracterização dos parceiros moleculares de FAZ10 são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual esta proteína age na biologia do parasita.

5.5. Papel da Tb927.8.3540 na biologia do *Trypanosoma brucei*

Aqui, identificamos a proteína gigante de *T. b. gambiense*, Tbg972.8.3230, de massa molecular predita em torno de 685 kDa. Porém o ortólogo correspondente em *T. b. brucei* (Tb927.8.3540) possui massa predita de 105 kDa. Quando fusionada à cauda myc, nossos ensaios de RNAi e WB revelaram uma proteína com tamanho praticamente duas vezes maior (190 kDa), similar ao observado para a FAZ10. Apesar de apresentar uma massa bem menor do que as proteínas identificadas no presente trabalho, a Tb927.8.3540 apresenta uma similaridade da sequência primária muito alta à Tbg972.8.3230, correspondendo à região N-terminal da proteína maior. Isto pode ser devido a algum problema técnico no sequenciamento e anotação do gene no banco de dados. Alternativamente, durante o processo evolutivo, esta proteína pode ter perdido ou ganhado parte da sua sequência nas diferentes espécies, haja vista que estas apresentam domínios semelhantes como uma ou duas hélices transmembranas e domínio não-citosólico.

É importante ressaltar que por motivos de biossegurança, e acesso às linhagens para desenvolvimento da técnica de RNAi, investigamos somente o papel da proteína Tb927.8.3540 e não da sua correspondente em *T. b. gambiense*.

Em relação à sua localização celular, quando utilizamos o anticorpo gerado contra a região amino ou carbóxi terminal de Tb927.8.3540, a proteína apresentou uma distribuição ao longo da zona de adesão flagelar de *T. brucei*. Considerando que Tb927.8.3540 foi detectada na fração total do citoesqueleto e a proteína é solubilizada quando o mesmo é tratado com 1M NaCl, podemos sugerir que Tb927.8.3540 está associada ao FAZ da célula. Recentemente, foi sugerido que o FAZ apresenta diferentes domínios estruturais: domínio FAZ flagelar, FAZ intracelular, FAZ filamento, quarteto de microtúbulos e domínio de ligação FAZ-MtQ (SUNTER; GULL, 2016). Sabe-se que o FAZ, ou pelo menos os domínios do corpo celular, são solubilizados quando o citoesqueleto é tratado sob condições severas (1M NaCl), resultando na perda de marcação para algumas proteínas, como FAZ1 e FLA1 por exemplo (ROTUREAU et al., 2014). Levando em consideração o fato de que Tb927.8.3540 é solubilizada junto citoesqueleto de microtúbulos e não está presente na fração flagelar, reforçamos a hipótese de que esta proteína está ligada a elementos do FAZ intracelular ou ao FAZ citoplasmático (FAZ filamento, quarteto de microtúbulos ou domínio de ligação FAZ-MtQ). Entretanto, a proteína fusionada à cauda myc na porção C-terminal (Tb927.8.3540:myc) apresentou localização dispersa por toda a célula. Nós sugerimos que a cauda myc possa ter ocasionado a perda da localização de Tb927.8.3540, possivelmente devido ao bloqueio de um domínio de interação da proteína. O fato de que o vetor com a tag possa ter integrado em local errado foi descartada pois a expressão de Tb927.8.3540:myc foi confirmada por WB, e o silenciamento por RNAi foi eficiente, onde observamos a diminuição nos níveis proteicos de Tb927.8.3540:myc e consequentemente na sua distribuição celular.

O FAZ é definido hoje como uma grande rede de fibras e filamentos interconectados que aderem o flagelo ao longo de todo o corpo celular (SHERWIN; GULL, 1989; GULL, 1999). Esta estrutura é um regulador chave da morfogênese celular, haja vista que perda do ou impedimento da formação da mesma acarreta efeitos como destacamento do flagelo e alterações na forma e tamanha da célula (VAUGHAN et al., 2008; ZHOU et al., 2011; SUN et al., 2013; ROTUREAU et al., 2014; HU; ZHOU; LI, 2015). Ainda, a maioria das proteínas do FAZ apresentam em suas sequências diversos domínios e padrões repetitivos, que são importantes para a formação do mesmo, para interação entre as proteínas, e para localização celular (ZHOU et al., 2011; SUN et al., 2013; SUNTER et al., 2015b; SUNTER; GULL, 2016).

A Tb927.8.3540, apesar de não conter repetições em sua sequência, apresenta um peptídeo sinal de ancoragem transmembrana. A presença de um domínio não citosólico sugere que esta proteína possa associar-se ao FAZ com sua porção C-terminal voltada para a região intracelular, entre o flagelo e o corpo. Outra possibilidade, seria a interação com o quarteto de microtúbulos, já que estes são adjacentes ao retículo endoplasmático, onde Tb927.8.3540 poderia estar ancorada. Exemplos de proteínas do FAZ que apresentam domínio transmembrana e estão ancoradas na membrana plasmática ou do retículo endoplasmático incluem a FLA1, FLA2, FLA3, FLA1BP, FAZ5 e TbVAP (NOZAKI; HAYNES; CROSS, 1996; LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002; LACOMBLE et al., 2012; SUN et al., 2013; WOODS et al., 2013; SUNTER et al., 2015b).

Nossa análise funcional da Tb927.8.3540 revelou que esta proteína é essencial para manter a estabilidade do citoesqueleto do *T. brucei* PCF e na falta desta houve a perda da morfologia normal da célula. Até o momento, este é o primeiro caso reportado de internalização do flagelo de *T. brucei*. Ao invés da forma alongada, estas se tornaram arredondadas ou esféricas em conjunto com a perda do flagelo extracelular. O fenótipo de perda da morfologia e arredondamento da célula mais clássico em *T. brucei* é o fenótipo “FAT”, onde através da inibição da expressão do gene *TUB*, que codifica para a tubulina, as células adquirem uma forma esférica (NGO et al., 1998; LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002). Além disso, aliada ao severo dano na formação de estruturas do citoesqueleto (PFR e FAZ), o *knockdown* da tubulina leva ao bloqueio da citocinese e formação de células multinucleadas. Aqui, vimos que a falta de Tb927.8.3540 leva à perda da morfologia e impedimento na formação correta de estruturas como o FAZ e PFR, acarretando na internacionalização do flagelo. Entretanto, não há um acúmulo exagerado de células multinucleadas o que pode indicar que a duplicação e segregação de organelas ficou prejudicada ou inibida, assim como a citocinese. O fato de que apenas 40% das células da cultura adquiriram este fenótipo podem explicar os resultados obtidos. Ao contrário, como visto para a depleção da tubulina, cerca de 90% da cultura adquiriu o fenótipo observado (NGO et al., 1998). Além disso, houve um pequeno aumento de células contendo quantidades incorretas de N e K. Consequentemente, o tempo de indução prolongado foi suficiente para impedir a proliferação celular nas passagens subsequentes da cultura.

Para proteínas que de alguma forma participam da estrutura do FAZ, e que, assim como Tb927.8.3540, apresentam um domínio transmembrana, foi reportado diversos efeitos morfológicos decorrente do silenciamento das mesmas. A falta da proteína FLA1 leva ao destacamento flagelar inibindo a citocinese (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002). No caso da proteína ligadora de FLA1, FLA1BP, o *knockdown* leva ao destacamento do flagelo e encurtamento do FAZ, sem no entanto bloquear a citocinese (SUN et al., 2013). Diferentemente de FLA1 e FLA1BP, TbVAP está localizada na membrana do retículo endoplasmático associado ao MtQ, e na sua ausência a quantidade de retículo associado ao FAZ reduz drasticamente. A depleção de Tb927.8.3540, além de afetar a formação do FAZ, causa efeitos como a desestabilização do citoesqueleto de microtúbulos e internalização do flagelo.

Uma característica comum dos tripanossomas e de vários outros protozoários, é que o citoesqueleto destes organismos não se despolimerizam durante a mitose. Ao contrário, como mostrado por SHERWIN e GULL (1989), as células filhas recebem um arranjo completo do citoesqueleto de microtúbulos de maneira semiconservativa. A mudança na morfologia e volume celular já foi estudada e caracterizada como um processo normal de adaptação do parasita nos diferentes estágios do ciclo de vida (ROTUREAU; SUBOTA; BASTIN, 2011). Porém, nenhuma destas formas inclui uma forma esférica com flagelo internalizado ou destacado, como visualizado neste trabalho. Aqui, sugerimos que a desestabilização, ou perda parcial ou total do FAZ, levou a desorganização do citoesqueleto do corpo celular como um todo, o que foi crucial para a má formação das células filhas.

5.6. As proteínas gigantes dos tripanossomatídeos

Dados do nosso grupo mostram que as proteínas gigantes estão presentes em todos os gêneros de tripanossomatídeos, e análises do proteoma completo de diversos protozoários mostram que existem um número elevado de proteínas de alta massa molecular nestes organismos. Considerando que em eucariotos superiores e, como mostrado aqui, em *Trypanosoma brucei,* as proteínas gigantes são geralmente componentes do citoesqueleto, é necessário investigar o papel de cada uma delas na biologia e contexto de cada protozoário.

Visto a relação das estruturas do citoesqueleto com a divisão celular, citocinese, aderência, locomoção, endocitose/exocitose e mudanças morfológicas, ainda restam muitas perguntas sem respostas sobre a compreensão da biologia destes organismos, como por exemplo, quais proteínas determinam o sulco de clivagem na divisão celular e como o FAZ influencia no remodelamento do citoesqueleto e reposicionamento de organelas entre os diferentes estágios no ciclo de vida dos parasitas.

6. Conclusão

No presente trabalho identificamos 19 novas proteínas de alta massa molecular no citoesqueleto do *Trypanosoma brucei*, sendo duas delas relacionadas com ou com o processo de citocinese, ou com a regulação do citoesqueleto de microtúbulos. Utilizando ferramentas de silenciamento pós-transcricional por RNAi, realizamos a caracterização funcional das proteínas FAZ10 e Tb927.8.3540 em formas procíclicas e sanguícolas do *T. brucei*.

Dentre as proteínas gigantes caracterizadas, a FAZ10 está localizada na zona de adesão flagelar, associada ao citoesqueleto flagelar, e possui papel essencial na adesão flagelar, no posicionamento de organelas, e mais importante atua na definição do local de ingressão do sulco de clivagem durante a citocinese. A Tb927.8.3540 por sua vez, é uma proteína presente na zona de adesão flagelar, possivelmente associada ao citoesqueleto de microtúbulos. Além disso, esta proteína possui papel fundamental na organização do citoesqueleto do corpo celular, formação do FAZ e na regulação da localização flagelar de *T. brucei*.

Bibliografia

ABSALON, S. et al. Basal body positioning is controlled by flagellum formation in Trypanosoma brucei. **PLoS One,** v. 2, n. 5, p. e437, 2007.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of The Cell**. 5th. 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol,** v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res,** v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan 2010.

AYME-SOUTHGATE, A. et al. Drosophila has a twitchin/titin-related gene that appears to encode projectin. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 88, n. 18, p. 7973-7, Sep 15 1991.

BAQUI, M. M. et al. A giant phosphoprotein localized at the spongiome region of Crithidia luciliae thermophila. **J Eukaryot Microbiol,** v. 47, n. 6, p. 532-7, Nov-Dec 2000a.

BAQUI, M. M. et al. In vivo and in vitro phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. **Cell Motil Cytoskeleton,** v. 47, n. 1, p. 25-37, Sep 2000b.

BAQUI, M. M. et al. A giant protein associated with the anterior pole of a trypanosomatid cell body skeleton. **Eur J Cell Biol,** v. 70, n. 3, p. 243-9, Jul 1996.

BASTIN, P. et al. Inside and outside of the trypanosome flagellum:a multifunctional organelle. **Microbes Infect,** v. 2, n. 15, p. 1865-74, Dec 2000.

BENIAN, G. M. et al. Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in C. elegans. **Nature,** v. 342, n. 6245, p. 45-50, Nov 2 1989.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 15 2005.

BONHIVERS, M. et al. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. **PLoS Biol,** v. 6, n. 5, p. e105, May 6 2008.

BROADHEAD, R. et al. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. **Nature,** v. 440, n. 7081, p. 224-7, Mar 9 2006.

BRUN, R.; SCHONENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Trop,** v. 36, n. 3, p. 289-92, Sep 1979.

BUSCHER, P. et al. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of Trypanosoma brucei gambiense infected patients. **Acta Trop,** v. 73, n. 1, p. 11-20, May 25 1999.

CHAPPUIS, F. et al. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. **Clin Microbiol Rev,** v. 18, n. 1, p. 133-46, Jan 2005.

COTRIM, P. C. et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol,** v. 71, n. 1, p. 89-98, Apr 1995.

CROOKS, G. E. et al. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res,** v. 14, n. 6, p. 1188-90, Jun 2004.

DAWE, H. R. et al. The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules. **BMC Biol,** v. 5, p. 33, 2007.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 15 2005a.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 404-9, Jul 15 2005b.

ERSFELD, K. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in Trypanosoma brucei. **Res Microbiol,** v. 162, n. 6, p. 626-36, Jul-Aug 2011.

ESSON, H. J. et al. Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure. **Eukaryot Cell,** v. 11, n. 6, p. 761-72, Jun 2012.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat Rev Microbiol,** v. 7, n. 11, p. 775-86, Nov 2009.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. **Nature,** v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998.

FRANCO, J. R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clin Epidemiol,** v. 6, p. 257-75, 2014.

GALETOVIC, A. et al. The repetitive cytoskeletal protein H49 of Trypanosoma cruzi is a calpain-like protein located at the flagellum attachment zone. **PLoS One,** v. 6, n. 11, p. e27634, 2011.

GALLET, C. et al. A Protein Phosphatase 1 involved in correct nucleus positioning in trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol,** v. 192, n. 1-2, p. 49-54, Nov-Dec 2013.

GARCIA, C. R.; ABRAHAMSON, P. A megadalton protein (Pc2500) is present during the intraerythrocytic development of P. chabaudi. **Biochem Mol Biol Int,** v. 36, n. 5, p. 983-9, Aug 1995.

GHEIRATMAND, L. et al. Biochemical characterization of the bi-lobe reveals a continuous structural network linking the bi-lobe to other single-copied organelles in Trypanosoma brucei. **J Biol Chem,** v. 288, n. 5, p. 3489-99, Feb 1 2013.

GRANZIER, H. L.; WANG, K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. **Electrophoresis,** v. 14, n. 1-2, p. 56-64, Jan-Feb 1993.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu Rev Microbiol,** v. 53, p. 629-55, 1999.

HAMILTON, P. B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int J Parasitol,** v. 34, n. 12, p. 1393-404, Nov 2004.

HAMMARTON, T. C. et al. Trypanosoma brucei MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. **Mol Microbiol,** v. 56, n. 1, p. 104-16, Apr 2005.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature,** v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002.

HAYES, P. et al. Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. **J Cell Biol,** v. 206, n. 3, p. 377-84, Aug 4 2014.

HE, C. Y. et al. Golgi duplication in Trypanosoma brucei requires Centrin2. **Science,** v. 310, n. 5751, p. 1196-8, Nov 18 2005.

HERMAN, D. S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. **N Engl J Med,** v. 366, n. 7, p. 619-28, Feb 16 2012.

HIRUMI, H.; HIRUMI, K. Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. **J Parasitol,** v. 75, n. 6, p. 985-9, Dec 1989.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates - a New Terminology. **Nature,** v. 212, n. 5068, p. 1385-&, 1966.

HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol,** v. 195, n. 2, p. 123-9, Jul 2014.

HU, H. et al. SAS-4 Protein in Trypanosoma brucei Controls Life Cycle Transitions by Modulating the Length of the Flagellum Attachment Zone Filament. **J Biol Chem,** v. 290, n. 51, p. 30453-63, Dec 18 2015.

INOUE, N. et al. Tetracycline-regulated RNA interference in Trypanosoma congolense. **Mol Biochem Parasitol,** v. 120, n. 2, p. 309-13, Apr 9 2002.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science,** v. 309, n. 5733, p. 436-42, Jul 15 2005.

JAMONNEAU, V. et al. Untreated Human Infections by Trypanosoma brucei gambiense Are Not 100% Fatal. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 6, n. 6, Jun 2012.

KALL, L. et al. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J Mol Biol,** v. 338, n. 5, p. 1027-36, May 14 2004.

KAZYUMBA, G. et al. Expression of the B cell repertoire and autoantibodies in human African trypanosomiasis. **Clin Exp Immunol,** v. 65, n. 1, p. 10-8, Jul 1986.

KENNEDY, P. G. Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. **Int J Parasitol,** v. 36, n. 5, p. 505-12, May 1 2006.

_____. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Lancet Neurol,** v. 12, n. 2, p. 186-94, Feb 2013.

KOHL, L. et al. Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the Trypanosoma brucei cell cycle. **J Eukaryot Microbiol,** v. 46, n. 2, p. 105-9, Mar-Apr 1999.

KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A.; BLOCH, R. J. Obscurin: a multitasking muscle giant. **J Muscle Res Cell Motil,** v. 26, n. 6-8, p. 419-26, 2005.

KOSTER, S. et al. Intermediate filament mechanics in vitro and in the cell: from coiled coils to filaments, fibers and networks. **Curr Opin Cell Biol,** v. 32, p. 82-91, Feb 2015.

LABEIT, S.; KOLMERER, B. Titins - Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity. **Science,** v. 270, n. 5234, p. 293-296, Oct 13 1995.

LACOMBLE, S. et al. A Trypanosoma brucei protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains. **Protist,** v. 163, n. 4, p. 602-15, Jul 2012.

LACOUNT, D. J. et al. Trypanosoma brucei FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. **J Biol Chem,** v. 277, n. 20, p. 17580-8, May 17 2002.

LANGOUSIS, G.; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei. **Nat Rev Microbiol,** v. 12, n. 7, p. 505-18, Jul 2014.

LEJON, V. et al. Human African trypanosomiasis. **Handb Clin Neurol,** v. 114, p. 169-81, 2013.

LUPAS, A. et al. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science,** v. 252, n. 5009, p. 1162-4, May 24 1991.

MANABE, T. et al. Connectin, giant elastic protein, in giant sarcomeres of crayfish claw muscle. **J Muscle Res Cell Motil,** v. 14, n. 6, p. 654-65, Dec 1993.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. **Nucleic Acids Res,** v. 41, n. Database issue, p. D348-52, Jan 2013.

MASLOV, D. A. et al. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: Implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 75, n. 2, p. 197-205, Jan 1996.

MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol,** v. 29, n. 1, p. 43-52, Jan 2013.

MATTEI, D. et al. Pfl I-I and Pf332: two giant proteins synthesized in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. **Parasitol Today,** v. 8, n. 12, p. 426-8, Dec 1992.

MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. **J Cell Sci,** v. 118, n. Pt 2, p. 283-90, Jan 15 2005.

MAY, S. F. et al. The Trypanosoma brucei AIR9-like protein is cytoskeleton-associated and is required for nucleus positioning and accurate cleavage furrow placement. **Mol Microbiol,** v. 84, n. 1, p. 77-92, Apr 2012.

MCALLASTER, M. R. et al. Proteomic identification of novel cytoskeletal proteins associated with TbPLK, an essential regulator of cell morphogenesis in Trypanosoma brucei. **Mol Biol Cell,** v. 26, n. 17, p. 3013-29, Sep 1 2015.

MONNERAT, S. et al. Searching for novel cell cycle regulators in Trypanosoma brucei with an RNA interference screen. **BMC Res Notes,** v. 2, p. 46, 2009.

MOREIRA, B. P. et al. **Giant FAZ10 is required for flagellum attachment zone stabilization and cleavage furrow positioning in trypanosome**: Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo 2016. Sob revisão.

MOREIRA, J. E. et al. Accumulation and localization of two adult acinar cell secretory proteins during development of the rat submandibular gland. **Am J Anat,** v. 191, n. 2, p. 167-84, Jun 1991.

MORRISWOOD, B. et al. Novel bilobe components in Trypanosoma brucei identified using proximity-dependent biotinylation. **Eukaryot Cell,** v. 12, n. 2, p. 356-67, Feb 2013.

MORRISWOOD, B. et al. The bilobe structure of Trypanosoma brucei contains a MORN-repeat protein. **Mol Biochem Parasitol,** v. 167, n. 2, p. 95-103, Oct 2009.

MULLER, N. et al. Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection. **Parasitology,** v. 104 Pt 1, p. 111-20, Feb 1992.

NAPOLI, C. et al. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell,** v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr 1990.

NGO, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 95, n. 25, p. 14687-92, Dec 8 1998.

NOZAKI, T. et al. Characterization of the Trypanosoma brucei homologue of a Trypanosoma cruzi flagellum-adhesion glycoprotein. **Mol Biochem Parasitol,** v. 82, n. 2, p. 245-55, Nov 25 1996.

OBERHOLZER, M. et al. Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious Trypanosoma brucei. **Mol Cell Proteomics,** v. 10, n. 10, p. M111 010538, Oct 2011.

OGBADOYI, E. O. et al. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. **Mol Biol Cell,** v. 14, n. 5, p. 1769-79, May 2003.

OVERATH, P.; ENGSTLER, M. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: Trypanosoma brucei as a model system. **Mol Microbiol,** v. 53, n. 3, p. 735-44, Aug 2004.

PADMAKUMAR, V. C. et al. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. **Exp Cell Res,** v. 295, n. 2, p. 330-9, May 1 2004.

PAL, A. et al. Differential endocytic functions of Trypanosoma brucei Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. **J Biol Chem,** v. 277, n. 11, p. 9529-39, Mar 15 2002.

PAYS, E. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. **Microbes Infect,** v. 8, n. 3, p. 930-7, Mar 2006.

PELIN, K. et al. Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 5, p. 2305-10, Mar 2 1999.

PETERSEN, C. et al. The gene product of the Plasmodium falciparum 11.1 locus is a protein larger than one megadalton. **Mol Biochem Parasitol,** v. 42, n. 2, p. 189-95, Sep-Oct 1990.

PODLIPAEV, S. A. Catalogue of the world fauna of protozoa of the family Trypanosomatidae. **Trudy Zoologicheskii Institut, Akademii Nauk**, n. 217, 1990.

PORTMAN, N.; GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. **Int J Parasitol,** v. 40, n. 2, p. 135-48, Feb 2010.

QIAO, X. et al. Sorting signals required for trafficking of the cysteine-rich acidic repetitive transmembrane protein in Trypanosoma brucei. **Eukaryot Cell,** v. 5, n. 8, p. 1229-42, Aug 2006.

RALSTON, K. S. et al. Flagellar motility contributes to cytokinesis in Trypanosoma brucei and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. **Eukaryot Cell,** v. 5, n. 4, p. 696-711, Apr 2006.

RAPER, J. et al. Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum. **Infect Immun,** v. 67, n. 4, p. 1910-6, Apr 1999.

RAUCH, A. et al. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. **J Proteome Res,** v. 5, n. 1, p. 112-21, Jan 2006.

REDMOND, S. et al. RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol,** v. 128, n. 1, p. 115-8, Apr 25 2003.

REY, L. **Parasitologia**. 4a ed. 2008. 930.

RIFKIN, M. R. Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 75, n. 7, p. 3450-4, Jul 1978.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. **Nature,** v. 352, n. 6337, p. 731-3, Aug 22 1991.

ROBINSON, D. R. et al. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. **J Cell Biol,** v. 128, n. 6, p. 1163-72, Mar 1995.

ROTUREAU, B. et al. Flagellar adhesion in Trypanosoma brucei relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body. **J Cell Sci,** v. 127, n. Pt 1, p. 204-15, Jan 1 2014.

ROTUREAU, B. et al. Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the Trypanosoma brucei parasite cycle. **Cell Microbiol,** v. 13, n. 5, p. 705-16, May 2011.

RUIZ-MORENO, L. et al. Trypanosoma cruzi: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. **Exp Parasitol,** v. 80, n. 4, p. 605-15, Jun 1995.

SAIDE, J. D. Identification of a connecting filament protein in insect fibrillar flight muscle. **J Mol Biol,** v. 153, n. 3, p. 661-79, Dec 15 1981.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANT'ANNA, C. et al. Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). **Histochem Cell Biol,** v. 124, n. 1, p. 87-95, Jul 2005.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in Trypanosoma brucei. **Mol Biol Cell,** v. 18, n. 9, p. 3290-301, Sep 2007.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Role of centrins 2 and 3 in organelle segregation and cytokinesis in Trypanosoma brucei. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e45288, 2012.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol,** v. 49, p. 117-43, 1995.

SHERWIN, T.; GULL, K. The cell division cycle of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 323, n. 1218, p. 573-88, Jun 12 1989.

SHI, J. et al. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in T. brucei. **J Cell Sci,** v. 121, n. Pt 18, p. 3062-70, Sep 15 2008.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol,** v. 7, p. 539, 2011.

SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Mol Phylogenet Evol,** v. 30, n. 1, p. 201-12, Jan 2004.

SIMPSON, L. The Kinetoplast of Hemoflagellates. **International Review of Cytology,** v. 32, p. 9, 1972.

SPRINGER, A. L. et al. Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immotility in Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol,** v. 175, n. 1, p. 68-75, Jan 2011.

STEVERDING, D. et al. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in Trypanosoma brucei. **J Cell Biol,** v. 131, n. 5, p. 1173-82, Dec 1995.

SUBOTA, I. et al. Proteomic analysis of intact flagella of procyclic Trypanosoma brucei cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localization and dynamics. **Mol Cell Proteomics,** v. 13, n. 7, p. 1769-86, Jul 2014.

SUN, S. Y. et al. An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in Trypanosoma brucei. **J Cell Sci,** v. 126, n. Pt 2, p. 520-31, Jan 15 2013.

SUNTER, J. D. et al. Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in Trypanosoma brucei life cycle transitions. **J Cell Sci,** v. 128, n. 16, p. 3117-30, Aug 15 2015a.

SUNTER, J. D.; GULL, K. The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology. **Trends Parasitol,** v. 32, n. 4, p. 309-24, Apr 2016.

SUNTER, J. D. et al. A dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes. **J Cell Sci,** v. 128, n. 8, p. 1580-94, Apr 15 2015b.

SVITKINA, T. M. et al. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. **J Cell Biol,** v. 135, n. 4, p. 991-1007, Nov 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol,** v. 24, n. 8, p. 1596-9, Aug 2007.

URBANIAK, M. D. et al. Comparative SILAC proteomic analysis of Trypanosoma brucei bloodstream and procyclic lifecycle stages. **PLoS One,** v. 7, n. 5, p. e36619, 2012.

VANHAMME, L. et al. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature,** v. 422, n. 6927, p. 83-7, Mar 6 2003.

VANHOLLEBEKE, B. et al. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to Trypanosoma brucei in humans. **Science,** v. 320, n. 5876, p. 677-81, May 2 2008.

VAUGHAN, S. et al. A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in Trypanosoma brucei. **Protist,** v. 159, n. 1, p. 127-36, Jan 2008.

VICKERMAN, K. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the Trypanosoma brucei sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 56, p. 487-95, Nov 1962.

VOTYPKA, J. et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol,** v. 31, n. 10, p. 460-9, Oct 2015.

WANG, K. Purification of titin and nebulin. **Methods Enzymol,** v. 85 Pt B, p. 264-74, 1982.

_____. Cytoskeletal matrix in striated muscle: the role of titin, nebulin and intermediate filaments. **Adv Exp Med Biol,** v. 170, p. 285-305, 1984.

WANG, K. et al. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 76, n. 8, p. 3698-702, Aug 1979.

WANG, K.; WILLIAMSON, C. L. Identification of an N2 line protein of striated muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 77, n. 6, p. 3254-8, Jun 1980.

WANG, M. et al. An interplay between Centrin2 and Centrin4 on the bi-lobed structure in Trypanosoma brucei. **Mol Microbiol,** v. 83, n. 6, p. 1153-61, Mar 2012.

WEI, Y. et al. Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. **Nat Commun,** v. 5, p. 4060, 2014.

WHEELER, R. J. et al. Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. **J Cell Sci,** v. 129, n. 4, p. 854-67, Feb 15 2016.

WHO. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organ Tech Rep Ser,** v. 881, p. I-VI, 1-114, 1998.

_____. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. **Wkly Epidemiol Rec,** v. 81, n. 8, p. 71-80, Feb 24 2006.

_____. Control and surveillance of human African trypanosomiasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 984, p. 1-237, 2013.

WICKSTEAD, B. et al. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol,** v. 125, n. 1-2, p. 211-6, Nov-Dec 2002.

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

WITT, C. C. et al. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. **EMBO J,** v. 25, n. 16, p. 3843-55, Aug 23 2006.

WOODS, K. et al. Identification and characterization of a stage specific membrane protein involved in flagellar attachment in Trypanosoma brucei. **PLoS One,** v. 8, n. 1, p. e52846, 2013.

ZHANG, Q. et al. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to Drosophila melanogaster muscle protein MSP-300. **Genomics,** v. 80, n. 5, p. 473-81, Nov 2002.

ZHOU, Q. et al. A comparative proteomic analysis reveals a new bi-lobe protein required for bi-lobe duplication and cell division in Trypanosoma brucei. **PLoS One,** v. 5, n. 3, p. e9660, 2010.

ZHOU, Q. et al. Assembly and maintenance of the flagellum attachment zone filament in Trypanosoma brucei. **J Cell Sci,** v. 128, n. 13, p. 2361-72, Jul 1 2015.

ZHOU, Q. et al. An EF-hand-containing Protein in Trypanosoma brucei Regulates Cytokinesis Initiation by Maintaining the Stability of the Cytokinesis Initiation Factor CIF1. **J Biol Chem,** v. 291, n. 28, p. 14395-409, Jul 8 2016.

ZHOU, Q. et al. A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in Trypanosoma brucei. **J Cell Sci,** v. 124, n. Pt 22, p. 3848-58, Nov 15 2011.

Anexos

Anexo 1 – Lista dos genes identificados como componentes da zona de adesão flagelar (FAZ) de *T. brucei*.

Gene	Nome	Localização	Massa (kDa)	Referências
Tb927.8.4010	FLA1	FAZ Intracelular	59	(NOZAKI; HAYNES; CROSS, 1996)
Tb927.8.4060	FLA2	FAZ Intracelular	64	(LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002)
Tb927.8.4110	FLA3	FAZ Intracelular	64	(SUN et al., 2013)
Tb927.8.4050	FLA1BP	FAZ Intracelular	83	(SUN et al., 2013)
Tb927.8.4100	FLA1BP	FAZ Intracelular	83	(SUN et al., 2013)
Tb927.5.4570	FLA3	FAZ Intracelular	89	(WOODS et al., 2013)
Tb927.5.4580	FLA3	FAZ Intracelular	89	(WOODS et al., 2013)
Tb927.10.2880	Ca^{2+}channel	FAZ Intracelular	304	(OBERHOLZER et al., 2011)
Tb927.10.8830	FAZ5	FAZ Intracelular	67	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.10.14320	FAZ9	FAZ filamento	122	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.11.1090	ClpGM6	FAZ filamento	>660	(HAYES et al., 2014)
Tb927.8.4780	FLAM3	FAZ filamento	468	(ROTUREAU et al., 2014)
Tb927.1.4310	FAZ2	FAZ filamento	184	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.11.12530	FAZ3	FAZ filamento	91	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.7.3330	FAZ10	FAZ intracelular	503	(MORRISWOOD et al., 2013; MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3)**
Tb927.4.2060	FAZ8	FAZ filamento	67	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.4.3740	FAZ1	FAZ filamento	193	(VAUGHAN et al., 2008)
Tb927.4.2080	CC2D	FAZ filamento	105	(ZHOU et al., 2011)
Tb927.9.10530	FAZ4	FAZ filamento	119	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.10.840	FAZ6	FAZ filamento	195	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.4.5340	FAZ11	Desconhecido	95	(MORRISWOOD et al., 2013)
Tb927.10.15390	FAZ7	FAZ filamento	124	(SUNTER et al., 2015b)
Tb927.11.13230	TbVAP	FAZ filamento (RE)	24	(LACOMBLE et al., 2012)

continua

continuação

Gene	Nome	Localização	Massa (kDa)	Referências
Tb927.9.13820	KMP11	Corpo celular e flagelo	11	(ZHOU et al., 2015)
Tb927.9.13880	KMP11	Corpo celular e flagelo	11	(ZHOU et al., 2015)
Tb927.9.13920	KMP11	Corpo celular e flagelo	11	(ZHOU et al., 2015)
Tb927.11.2590	FAZ12	FAZ filamento	121	(HU; ZHOU; LI, 2015)
Tb927.3.1020	FAZ13	FAZ filamento	54	(HU; ZHOU; LI, 2015)
Tb927.8.6980	FAZ14	FAZ filamento	95	(HU; ZHOU; LI, 2015)
Tb927.11.3300	TbSAS4	Ponta do flagelo (anterior) e FAZ filamento	108	(HU; ZHOU; LI, 2015; MCALLASTER et al., 2015)
Tb927.8.7070	FAZ15	Desconhecido	35	(MCALLASTER et al., 2015)
Tb927.5.3460	FAZ16	Desconhecido	57	(MCALLASTER et al., 2015)
Tb927.10.7210	FAZ17	Desconhecido	26	(MCALLASTER et al., 2015)
Tb927.11.15800	TOEFAZ1	Ponta do flagelo (anterior) e FAZ filamento	90	(MCALLASTER et al., 2015)

Anexo 2 – Certificado do protocolo para uso de animais em experimentação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

INFORMAÇÃO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 014/2012**, sobre o projeto intitulado *"Caracterização funcional das proteínas gigantes de tripanossomatídeos."*, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Munira Muhammad Abdel Baqui** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de agosto de 2012.

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal orientam que inúmeras Comissões Internacionais que utilizam Animais de Laboratório estão **desaconselhando** o uso do anestésico Tribromoetanol (TBE), por não atingir os requerimentos da FDA/USA e pela dificuldade em preparar e manter esta droga de modo seguro aos animais, sendo **aconselhado** o uso da associação de Xilazina e Quetamina no seu lugar.

Ribeirão Preto, 27 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Anexo 3 – Manuscrito intitulado “Giant FAZ10 is required for flagellum attachment zone stabilization and cleavage furrow positioning in trypanosome”, submetido e sob revisão no periódico *Journal of Cell Science*.

GIANT FAZ10 IS REQUIRED FOR FLAGELLUM ATTACHMENT ZONE STABILIZATION AND CLEAVAGE FURROW POSITIONING IN TRYPANOSOME

BERNARDO PEREIRA MOREIRA[1], CAROL KOBORI DA FONSECA[1], TANSY C. HAMMARTON[2] AND MUNIRA MUHAMMAD ABDEL BAQUI*[1]

[1] Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil,

[2] Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, G12 8QQ, United Kingdom

*To whom correspondence should be addressed; e-mail: munira@fmrp.usp.br

Phone: +55-16-3315-3059

Fax: +55-16-3633-1786

Running title: FAZ10 required for cytokinesis

Keywords: cytoskeleton, giant protein, FAZ10, FAZ, nucleus/kinetoplast positioning, cytokinesis

Summary Statement

The first functional characterization of FAZ10 giant protein in *Trypanosoma brucei* revealed functions in flagellar attachment and nucleus/kinetoplast positioning, and uniquely for a FAZ protein, direct roles in cytokinesis.

Abstract

The flagellum and flagellum attachment zone (FAZ) are important cytoskeletal structures in trypanosomatids, being required for motility, cell division and cell morphogenesis. Trypanosomatid cytoskeletons contain abundant High Molecular Weight Proteins (HMWPs), but many of their biological functions are still unclear. Here, we report the characterization of the giant FAZ protein, FAZ10, in *Trypanosoma brucei*. Our data show that FAZ10 is an essential giant cytoskeletal protein in both procyclic and bloodstream parasite life cycle stages, since its depletion led to defects in cell morphogenesis, flagellum attachment and kinetoplast and nucleus positioning. Moreover, ablation of FAZ10 impaired the timing and placement of the cleavage furrow during cytokinesis, resulting in premature or asymmetrical cell division.

Introduction

Trypanosoma brucei is the causative agent of sleeping sickness, also known as Human African Trypanosomiasis (HAT) and belongs to the Trypanosomatidae family. Trypanosomatids are an early divergent group in eukaryotic evolution and have developed unique characteristics that differentiate these organisms from other eukaryotes. The cytoskeleton is one such remarkable feature and a key element in cell motility, morphogenesis, organelle positioning, infectivity and reproduction (Gull, 1999).

The *T. brucei* cytoskeleton is a well-defined component of the cell with two main structures: a subpellicular corset of microtubules that defines cell shape and size, and a flagellum that is critical for motility and cell division. (Hemphill et al., 1991). The cytoskeleton undergoes rearrangement (although is not disassembled) during cell morphogenesis and division, making this structure essential for trypanosome biology (Sherwin and Gull, 1989). The flagellum, which emerges from a small invagination of the plasma membrane named the flagellar pocket, runs attached to the cell body along its length and consists of the axoneme and the Paraflagellar Rod (PFR), which are essential structures for a wide range of cellular processes, including cell motility, morphogenesis, division and infectivity (Bastin et al., 1998; Gull, 1999; Kohl et al., 2003; Broadhead et al., 2006; Emmer et al., 2010). A Flagellum Attachment Zone (FAZ) is primarily responsible for flagellar attachment and stabilization. Initially, the FAZ was described as being composed of a cytoskeletal bundle of fibrillar links resembling a desmosome-like structure (Hemphill et al., 1991). Although in higher eukaryotes desmosomes connect adjacent cells, the FAZ in trypanosomes connects structures within the same cell. Now it is known that the FAZ is a large and complex interconnected set of fibres, filaments and junctional complexes that link the flagellum to the cell body, and can be divided into five main domains (FAZ Flagellum Domain, FAZ Intracellular Domain, FAZ Filament Domain, Microtubule Quartet Domain, and Microtubule Quartet-FAZ Linker Domains) that can be subdivided into eight overlapping zones (Sunter and Gull, 2016). It is important to identify and characterize new components of each of these zones in order to understand FAZ biogenesis and function.

It has been suggested that depending on the location of a given FAZ protein, the RNAi phenotype can be often predicted (Sunter and Gull, 2016). The outer portion of the FAZ structure is the FAZ flagellum domain. Some proteins located at the FAZ flagellum domain often exhibit a knockdown of FAZ shortening and morphological changes. For instance, ClpGM6 knockdown leads to the repositioning of the kinetoplast, basal body, Golgi and flagellar pocket (FP), and to the formation of an epimastigote-like morphology, characterized by the repositioning of the kinetoplast to the anterior region of the cell in comparison to the nucleus (Hayes et al., 2014). Similar morphogenetic defects were also observed after knockdown of FLAM3, another FAZ flagellum domain protein (Sunter et al., 2015b). At the cell body side, the FAZ filament domain comprises several proteins, most importantly FAZ1, CC2D, FAZ2 and FAZ9. FAZ1 knockdown was reported to lead to flagellum attachment defects,

and although the FAZ was still being formed, cells without FAZ1 showed unequal segregation of nuclei and kinetoplasts during cytokinesis (Vaughan et al., 2008). In contrast, CC2D was reported to be present in the FAZ and basal body of *T. brucei*, with its knockdown leading to the absence of the FAZ in daughter cells with major effects on the subpellicular cytoskeleton architecture, flagellum detachment, shorter cell body, and cell death (Zhou et al., 2011). Similar effects were observed following depletion of FAZ2 protein (Zhou et al., 2015). Moreover, FAZ9 RNAi caused the position of the kinetoplast to alter but the flagellum to remain attached to the cell body (Sunter et al., 2015a). Between the FAZ filament and FAZ flagellum domain is the FAZ intracellular domain, which usually comprises transmembrane proteins that harbour a small intracellular domain and a glycosylated extracellular region for protein interaction. The glycoprotein FLA1, which is homologous to *T. cruzi* GP72, is located at the FAZ intracellular region, specifically at the cell body membrane (Haynes et al., 1996; Nozaki et al., 1996; Sunter and Gull, 2016). LaCount et al. (2002) demonstrated the importance of FLA1, since in its absence, cells were incapable of undergoing proper cytokinesis, resulting in a multinucleated phenotype. In addition, Sun et al. (2013) identified a flagellar membrane protein named FLA1-binding protein (FLA1BP), which is essential for flagellum biogenesis and FAZ elongation and interacts with FLA1 in a zipper-like manner to bring about flagellum attachment.

All of these observations on FAZ protein functions highlight that even though proteins may be located in the same domain, their specific sub-localization within the FAZ might reflect distinct functions. Although the categorization of FAZ proteins is a useful first step in understanding this intricate structure, much work is needed to reveal all of its components and their function. Driven by the lastest advances in reverse genetics, proteomics and high-resolution microscopy, new FAZ proteins have been identified including a whole new family of FLAgellar Member (FLAM) proteins (Subota et al., 2014), several new FAZ proteins of *T. brucei* (McAllaster et al., 2015; Sunter et al., 2015a) and a *T. brucei* homolog of metazoan centriole/basal body protein SAS-4 (Hu et al., 2015). Although many FAZ proteins have been identified and reported in the last few years, still several of them remain uncharacterized with regard to their function in *T. brucei* biology.

The presence of High Molecular Weight Proteins (HMWPs) in the cytoskeleton of several trypanosomatids has previously been reported, although some of their biological functions are still unknown (Ruiz-Moreno et al., 1995; Baqui et al., 1996; Baqui et al., 2000a; Baqui et al., 2000b). In the non-pathogenic trypanosomatid *Phytomonas serpens*, a megadalton protein, named Ps3500 (Baqui et al., 1996; Baqui et al., 2000b), presents the same electrophoretic mobility as the muscle giant protein titin with an apparent molecular mass of 4000 kDa (Wang et al., 1979). Ps3500 is located at the anterior end of the flagellar pocket connecting the cell body cytoskeleton to the flagellum and seems to be an autophosphorylating serine and threonine protein kinase (Baqui et al., 1996, 2000). In *T. cruzi*, a family of giant proteins (ranging from 700-2500 kDa), present in all life cycle stages and located specifically at the FAZ has been described (Ruiz-Moreno et al., 1995). Additionally, newly characterized FAZ

proteins FLAM3 and ClpGM6 have been shown to be considerably larger (483 and, 660 kDa, respectively) than other cytoskeletal proteins (Muller et al., 1992; Rotureau et al., 2014).

Here, we focused our studies on the characterization of the FAZ10 protein in *T. brucei*. During in a study in our group in which we used mass spectrometry analysis to identify novel cytoskeletal HMWPs in kinetoplastids, we independently identified FAZ10. From that, we were able to characterize FAZ10 as a giant protein of approximately 2000 kDa and reveal its localization at the FAZ with anti-FAZ10 antibody. Upon depletion of FAZ10, the attachment of the new flagellum is compromised, kinetoplasts and nuclei positioning is affected, and cytokinesis is disrupted. Although FAZ10 is not essential for flagellum and FAZ formation, its depletion affects the orientation of, and distance between, the PFR/axoneme and the FAZ filament. We show that FAZ10 is also required for correct orientation of the cleavage furrow, reinforcing the importance of cytoskeleton proteins in cell division.

Results

FAZ10 is a large and repetitive cytoskeletal protein of *T. brucei*

A mass spectrometry analysis of *T. brucei* HMWPs excised from an SDS-PAGE gel was performed and the resulting peptide data was matched against the TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/). We detected Tb927.7.3330, a protein previously identified as a FAZ component in *T. brucei* (Morriswood et al., 2013) and recently named FAZ10 (Sunter et al., 2015a). However, besides its localization, nothing was known about the molecular and cellular biology of this protein.

FAZ10 is encoded by a 13005-bp long ORF located on chromosome 7 and it is predicted to be a high molecular weight protein (MW ≥ 502 kDa, pI 4.62) based on its sequence in TriTrypDB (Aslett et al., 2010). FAZ10 protein structure is characterized by an N-terminal portion, two coiled-coil domains (as predicted by COILS (Lupas et al., 1991)) separated by a central region, and a C-terminal portion (Fig. 1A). Distributed within the two coiled coil domains of Tb927.7.3330 are 52 nearly identical repeats of 35 amino acids (Fig. 1B, C). Orthologues were detected in other *Trypanosoma* species, each exhibiting similar repeat-containing patterns although with variations in length and number of repeats and diverging up to 57% (*T. cruzi* and *T. congolense*) in amino acid sequence (Fig. 1B, C). Additionally, *T. b. gambiense* and *T. evansi* orthologues also showed another repeated motif, but with a completely different sequence from that observed for FAZ10 (Fig. 1B, C). Moreover, the TMHMM prediction method did not detect any transmembrane helices (Kall et al., 2004).

FAZ10 is a giant FAZ protein highly associated with the flagellum

To facilitate FAZ10 characterization, a mouse polyclonal antibody (anti-FAZ10) was raised against its C-terminal end, corresponding to amino acids 4085-4334. The serum was used to detect the FAZ10 protein in cytoskeletal preparations by Western blotting and to evaluate FAZ10 cellular

distribution by immunofluorescence. As FAZ10 is predicted to be a HMWP, cytoskeletal fractions were separated by linear gradient SDS-PAGE (Fig. 2A, B), as has been used extensively to study other megadalton proteins of trypanosomatids (Ruiz-Moreno et al., 1995; Baqui et al., 1996; Baqui et al., 2000a; Baqui et al., 2000b) and higher eukaryotes (Wang, 1982). Several high molecular weight protein bands were observed in all fractions of the cytoskeleton preparation (Fig. 2B), with the anti-FAZ10 antibody recognizing a high molecular weight doublet of bands (~ 2000 kDa) in the P1 (whole cytoskeleton) and P2 (flagella) fractions (Fig. 2C) by Western blotting. To determine whether these bands correspond to the giant proteins, the cytoskeletal extract were immunoprecipitated with anti-FAZ10 antibody and western blotting specifically recognized a 2000 kDa cytoskeletal giant protein (Fig. 2D). This is much higher than FAZ10's predicted size of 502 kDa, but use of this antibody in FAZ10 RNAi cells (Fig. 3B, C) and immunofluorescence analysis (Fig. S1) confirmed its specificity. C-terminally myc-tagged FAZ10 (FAZ10:myc) was detected at the same molecular weight (Figs. 3C and 4A), suggesting that FAZ10 might contain more repeat regions than annotated and/or is extensively post-translationally modified. Confocal analysis revealed that FAZ10 is putatively distributed along the FAZ structure, ranging from the flagellar pocket to the anterior end of the cell but not extending to the distal tip of the flagellum (Fig. 2E), similar to what has been observed by Morriswood et al. (2013) in PCF *T. brucei* with Ty1-tagged FAZ10. The same distribution was observed in the new FAZ when cells were progressing through cell division (Fig. 2E). Further, FAZ10:myc expressed from its endogenous locus in PCF or BSF trypanosomes exhibited the same cellular localisation as detected by immunofluorescence (Figs. 2F, 4B and S2). Also, anti-FAZ10 antibody revealed the presence of the FAZ10 in isolated flagella by Western blotting in agreement with the detection of the same protein in the flagellar fraction (Fig. 2G). Thus, FAZ10 is a giant cytoskeletal protein highly associated with the flagellum.

Moreover, whole cytoskeletons were co-labelled with anti-FAZ10 and with either L3B2 to visualize FAZ1 (FAZ filament domain) or with anti-ClpGM6 the calpain-like protein GM6 (ClpGM6; FAZ flagellum domain). Confocal analysis revealed that FAZ10 does not completely co-localize with FAZ1 and does not colocalize at all with ClpGM6 (Fig. S3A, B). Hence, FAZ10 probably, given its apparent lack of transmembrane domains, association with isolated flagella, periodic localization along the FAZ and its close proximity to FAZ1, localizes to the FAZ intracellular domain (intermembrane staples) (Hoog et al., 2012; Sunter and Gull, 2016). A closer examination of FAZ10 in detergent-extracted cytoskeletons of PCF *T. brucei* expressing FAZ10:myc was performed by immunogold-EM double labelling with anti-FAZ10 and anti-myc antibodies. These antibodies revealed the same punctate pattern distribution along the FAZ, likely corresponding to the ~122 nm apart junctional complexes that connect the cell body to the flagellum (Fig. 2H).

Knockdown of FAZ10 affects cell proliferation, flagellum attachment and inhibits nuclei and kinetoplasts segregation in *T. brucei*

The function of FAZ10 was investigated using RNAi, initially in PCF *T. brucei* (Wirtz et al., 1999). Upon 24 hours of RNAi induction, FAZ10 protein levels decreased substantially and were barely detectable by Western blotting or immunofluorescence by 72-96 hours post-induction (Fig. 3A, B). FAZ10 depletion was also confirmed by introducing FAZ10:myc into the FAZ10 RNAi cell line and Western blotting with anti-myc antibody (Fig. 3C). Depletion of FAZ10 was accompanied by a substantial decrease in growth rate indicating that FAZ10 is necessary for normal cell proliferation (Fig. 3D). Furthermore, FAZ10 depletion caused morphological defects in cell shape and size, indicating that FAZ10 is needed for the maintenance of the morphology of the daughter cells (Fig. 3E). In addition, induced cells exhibited flagellum attachment abnormalities (Fig. 3E), with the proportion of cells with one or more flagella partially or fully detached from the cell body increasing substantially by 48 hours post-RNAi induction (Fig. 3F). Additionally, cells containing abnormal numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K) accumulated (Fig. 3G). After 96 hours of induction, zoids (Robinson et al., 1995), which contain a single kinetoplast (0N1K) and 2N1K cells comprised approximately 11% and 5% of the population, respectively. The origin of these cells appeared to be 2N2K cells that were unable to divide in the right plane, generating unequal daughter cells. The lower numbers of 2N1K cells compared to zoids can be explained by 2N1K cells continuing to replicate their organelles and becoming multinucleated cells (Fig. 3G, 'Other' cells).

To investigate FAZ10 function in BSF *T. brucei*, a FAZ10 RNAi cell line endogenously expressing FAZ10:myc was generated. Induction of FAZ10 RNAi resulted in depletion of the high molecular weight FAZ10:myc protein to undetectable levels by 48 hours post-induction as monitored by Western blotting and immunofluorescence (Fig. 4A, B). Similar to procyclic cells, FAZ10 localised to the FAZ structure (Fig. 4B). FAZ10 knockdown impaired cell growth from 24 hours post-induction (Fig. 4C) and resulted in the accumulation of cells that were aberrant with respect to their size and shape, and flagellum attachment (Fig. 4D). Flagellum attachment defects increased over time following FAZ10 ablation with detached flagella being detected in ~30% cells by 72 hours post-induction (Fig. 4E). Significant numbers of multinucleated cells were also observed from 24 hours post-induction (Fig. 4F, G, 'Other' cells). Likewise procyclic cells, zoids were also observed, in this case most likely originating from 1N2K cells that divided prematurely prior to completion of mitosis (Fig. 4H), or as 2N1K cells were also detected, from aberrant division of 2N2K cells.

FAZ10 is responsible for the organization of the FAZ and flagellar structures

To investigate whether these defects could have occurred as a consequence of the malformation of essential structures of the trypanosome flagellum, the axoneme, FAZ and PFR were examined by immunofluorescence of isolated flagella and cytoskeletons using β-tubulin, FAZ1 and PFR antibodies, respectively. No alterations in protein distribution were observed, indicating that the lack of FAZ10 did not impair the formation of these structures (Figs. S1 and S4). To investigate further the flagellar/FAZ structure following FAZ10 RNAi, cells were examined by transmission electron microscopy (TEM).

Although immunofluorescence had shown that FAZ10-depleted cells still formed the PFR and FAZ (Figs. S1 and S4), by electron microscopy, a loss of proper linkage between the proximal domain of the PFR and the intracellular FAZ filament was observed, increasing the distance between these structures, on average by ~62% ($p < 0.001$) (Fig. 5A, B). Moreover, in induced cells with two flagella, the axoneme/PFR structures were no longer orientated in the same direction as in wild type or uninduced cells; instead, one flagellum was rotated such that its axoneme faced the axoneme of the second flagellum (Fig. 5C), which could have occurred as a result of a weakened flagellum attachment following FAZ10 depletion. Additionally, based upon the analysis of many thin sections of induced cells, we observed events like the presence of two flagella (axoneme + paraflagellar rod) inside the same flagellar membrane (Fig. 5D), and significant disorganization and/or mislocalisation of the FAZ microtubule quartet (Fig. 5E, F). Besides these effects, the arrangement of subpellicular microtubules underlying the flagellum also showed some disorganization (Fig. 5F).

Thus, while FAZ10 is probably not essential for the formation of the axoneme, PFR and FAZ, it likely plays roles in the overall organization of these structures, with direct implications for their functionality.

Lack of FAZ10 compromises nucleus and kinetoplast segregation and positioning

FAZ10-depleted PCF and BSF cells also exhibited mispositioned nuclei and kinetoplasts after mitosis, which led to the accumulation of aberrant cells after cytokinesis (Figs. 3E, G, and 4D, F, G). This phenomenon was analysed in more detail in PCF *T. brucei* by tracking the position of the duplicated kinetoplasts relative to the posterior nucleus in 2N2K cells (Fig. 6A). Compared to uninduced cells, posterior kinetoplasts in FAZ10-depleted cells had a broader distribution range, while the anterior kinetoplasts were distributed significantly more posteriorly with many overlaying or being located posterior to the posterior nucleus (Fig. 6A). Additionally, the internuclear distance was reduced (Fig. 6A). A number of abnormal rearrangements of nuclei and kinetoplasts were present in 2N2K cells (Fig. 6B), of which the most common was where the anterior kinetoplast was superimposed over the posterior nucleus (Fig. 6B, phenotype 4).

FAZ10 is essential for defining the cleavage furrow path during cytokinesis

As well as FAZ10 being required for proper flagellum attachment, cell morphogenesis and organelle segregation, cytokinesis also appeared to be affected following FAZ10 knockdown. Close examination of FAZ10-depleted cells showed that in 2N2K cells undergoing cytokinesis, the furrow was either incorrectly positioned (asymmetrical) (Fig. 3E) or incorrectly timed (occurring prior to completion of N/K duplication and segregation) (Fig. 4H) in a much greater proportion compared to uninduced cells (Fig. 7A). We hypothesized that flagellum detachment was responsible for that defect. However, while dividing cells with detached flagella always exhibited defective furrow ingression (Fig. 7B, C), for the most part, defective furrow ingression did not correlate with any obvious defective

flagellum attachment, since 70-80% of aberrantly dividing cells did not display detached flagella (Fig. 7B, D). This was confirmed by visualising the highly asymmetric segregation of the cell body and the nuclei and kinetoplasts via β-tubulin antibody labelling and DAPI staining (Fig. 7E). On occasion, the cleavage furrow was observed to ingress through the anterior nucleus, resulting in even more aberrant DNA accumulation (Fig. 7E).

Similar observations were made via scanning electron microscopy (SEM), where we were able to track the cleavage furrow generation and ingression. In uninduced cells, the cleavage fold forms as an invagination of the cell body (i) with anterior-to-posterior ingression of the furrow (ii) (Fig. 7F). In FAZ10-depleted cells, the definition of the cleavage fold invagination is lost resulting in asymmetric division (Fig. 7F). SEM also revealed cells undergoing alternative posterior-to-anterior cytokinesis (Fig. 7G), as previously observed upon depletion of CIF1 and CIF2, and which has been proposed to be an alternative or backup cytokinesis pathway following inhibition of the anterior-to-posterior furrow ingression (Zhou et al., 2016b; Zhou et al., 2016a). Therefore, FAZ10 may play a role in the definition of the path for cleavage furrow ingression during the early steps of cytokinesis. Together, these results indicate that the depletion of FAZ10 inhibits proper cytokinesis through mispositioning of the duplicated nuclei and kinetoplasts, and aberrant placement of the cleavage furrow.

Discussion

We report here the functional characterisation of *T. brucei* FAZ10, a high molecular weight protein (HMWP) previously shown to localise to the FAZ region in close proximity to the bilobe structure (Morriswood et al., 2013; Sunter et al., 2015a). FAZ10 is, to our knowledge, the largest protein investigated and characterized in *T. brucei* to date. A number of studies have described HMWPs, comprising proteins ranging from around 500 kDa to as large as 3500 kDa, in several trypanosomatids (Ruiz-Moreno et al., 1995; Baqui et al., 1996; Baqui et al., 2000a; Baqui et al., 2000b; Hayes et al., 2014; Rotureau et al., 2014). While the roles of most of these HMWPs remain unclear, several of them have been localised to the cytoskeleton and in particular to the FAZ. Interestingly, where their functions have been determined, most HMWPs appear to play important roles in cell morphogenesis (Hayes et al., 2014; Rotureau et al., 2014).

Although the annotated Tb927.7.3330 ORF in TriTrypDB is predicted to encode a 502 kDa protein, FAZ10 was detected here by Western blot analysis, as a doublet of proteins of approximately 2000 kDa, about four times larger than expected. The 2000 kDa protein was confirmed to be FAZ10 since it was depleted in FAZ10 RNAi cells following induction, and FAZ10:myc was observed to migrate similarly. Since there is an abundance of repetitive elements in FAZ10, it is possible that these regions may not have been correctly assembled due to sequencing assembly errors and are actually more extensive than annotated in TriTrypDB.

Other giant cytoskeletal proteins have also been detected as doublets in *Phytomonas* and *Leishmania* (Baqui et al., 2000b), and in higher eukaryotes (Labeit and Kolmerer, 1995). A similar

migration pattern was observed for FAZ1, FLAM3 and ClpGM6 (Vaughan et al., 2008; Hayes et al., 2014; Rotureau et al., 2014), and our unpublished observations suggest that this behaviour might be a common feature of high molecular weight proteins. Although the result of cytoskeleton and flagella isolations might lead to protein degradation during the process, we used several protease and phosphatase inhibitors to minimize these effects. Instead it is possible that the doublet could represent allelic variation due to heterogeneity in the number of repeats, or the two bands could represent different post-translational modifications, as has been proposed for the FAZ1 doublet (Vaughan et al., 2008).

FAZ10 localisation is similar to that of FAZ1, and indeed appears to partially co-localise with FAZ1 by immunofluorescence. Additionally, FAZ10 is localised close to ClpGM6, but the proteins do not overlap at any point. Since FAZ10 is present in isolated flagella but does not contain a transmembrane domain, we suggest that FAZ10 may be localised to the FAZ intracellular domain, most likely to the intermembrane staples, of this intricate cytoskeletal structure (Sunter and Gull, 2016), as indicated by immunogold-EM of whole-mounted cytoskeletons of *T. brucei*. This is consistent with other FAZ proteins that display flagellum attachment and/or nucleus/kinetoplast positioning defects following RNAi depletion. Depletion of FAZ10 resulted in an increased distance between the distal domain of PFR and the junctional complexes of the FAZ intracellular domain, indicating that FAZ10 may act to tether these structures together.

Our data suggest that FAZ10 has several biological functions. Firstly, FAZ10 is required for flagellum attachment since its knockdown led to ~30% of cells displaying detached flagella in both PCF and BSF parasites, similar to the proportion of flagellum attachment defects that occurred following FAZ1 depletion (Vaughan et al., 2008). Defects in flagellum orientation with respect to the cell body were also observed. Several other FAZ proteins are known to participate in flagellum attachment (LaCount et al., 2002; Vaughan et al., 2008; Sun et al., 2013; Rotureau et al., 2014), but it seems that these cannot entirely compensate for the absence of FAZ10.

In addition to flagellum attachment, FAZ10 plays important roles in cell division. Following FAZ10 depletion, cells accumulated with abnormal numbers of nuclei and kinetoplasts that were often malpositioned, and it is likely that these effects, at least in part, can be attributed to defective flagellar attachment. The flagellum/FAZ have been shown to be crucially important for the repositioning of organelles after their duplication (Zhou et al., 2011; Sun et al., 2013; Hayes et al., 2014) and it has been reported that formation and elongation of the new flagellum/FAZ provides the force necessary for the movement of the new basal body and kinetoplast towards the posterior end of the cell (Absalon et al., 2007). In this study, we observed that the segregation of duplicated kinetoplasts and nuclei was significantly compromised in 2N2K cells after FAZ10 silencing, consistent with flagellum/FAZ destabilization leading to aberrant movement of duplicated organelles. We hypothesise that the newly formed flagellum/FAZ, which exhibits disorganization and decreased attachment to the cell body, has reduced traction with which to bring about the movement of these organelles following their duplication, thus resulting in a range of aberrant N/K positions in 2N2K cells. However, a direct role in

organelle positioning independently of flagellar detachment cannot be entirely ruled out at this stage, since in many 2N2K cells exhibiting aberrant N/K positioning, the flagella were not obviously detached. Indeed, depletion of the cytoskeletal-associated protein AIR9 (May et al., 2012) or the phosphatase PP1-3 (Gallet et al., 2013) resulted in nucleus/kinetoplast positioning defects in the absence of flagellum attachment defects.

Defective flagellar attachment is also known to disrupt or inhibit cytokinesis. For instance, FAZ1 knockdown cells, which are able to form a FAZ, albeit an aberrant one, display a range of detachment defects of the flagellum, leading to aberrant nucleus segregation and defects in cytokinesis (Vaughan et al., 2008). Similarly, knockdown of FLA1 leads to flagellum detachment, resulting in cytokinesis arrest and the formation of multinucleate cells (LaCount et al., 2002). It should be noted that flagellar detachment does not always lead to defects in cytokinesis. RNAi silencing of the FLA1-binding protein, FLA1BP causes flagellum detachment but does not affect cell division (Sun et al., 2013). However, in this study, our data indicate that the flagellar detachment mediated by FAZ10-depletion always results in defective cytokinesis.

Our data also demonstrate direct roles for FAZ10 in cytokinesis. Many 2N2K PCF cells exhibited mispositioned cleavage furrows and underwent unequal cytokinesis despite both flagella being attached. Additionally, some FAZ10-depleted PCF cells were observed to be undergoing cytokinesis furrow ingression from the posterior rather than the anterior end. Further, in BSF cells, 1N2K cells with attached flagella were observed to undergo premature and unequal cytokinesis. Thus, FAZ10 appears to be required for determining cleavage furrow positioning and for the timing of furrow ingression, independently of its role in flagellar attachment. These roles are similar to those identified for MOB1, which affects cleavage furrow positioning and timing of cytokinesis when depleted in PCF *T. brucei* (Hammarton et al., 2005), and for AIR9 which has been shown to play a role in cleavage furrow positioning in BSF *T. brucei* (May et al., 2012). Future works should explore whether these proteins operate within the same regulatory pathway. Further, the indications that FAZ10 may be necessary to ensure the suppression of the alternative posterior-to-anterior cytokinesis pathway might suggest cooperation between FAZ10 and CIF1/CIF2, especially as FAZ10 has been identified as a close neighbour and possible binding partner of CIF1 (Zhou et al., 2016a).

Altogether, our data indicate that depletion of FAZ10 results in several different phenotypes. It is possible that these phenotypes are mediated by FAZ10 depletion destabilising other FAZ proteins. Many studies have shown that FAZ architecture relies on a number of proteins with different functional roles and displaying specific localisations within the FAZ (Absalon et al., 2007; Vaughan et al., 2008; Zhou et al., 2011; Hayes et al., 2014; Rotureau et al., 2014; Hu et al., 2015; Sunter and Gull, 2016). Roles in flagellar attachment and organelle positioning, as defined here for FAZ10, are common to many FAZ proteins. However, FAZ10 is the first FAZ protein to be directly linked to controlling the timing and positioning of the cleavage furrow. Given its giant size and repetitive nature, it is tempting to speculate that FAZ10 might act as a scaffold for regulatory signalling molecules at the site of

cytokinesis initiation. Studies to isolate binding partners of FAZ10 are now required to elucidate the mechanisms by which it operates.

Materials and Methods

Bioinformatics. TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/) was used to search for FAZ10 orthologues. Regular expressions were built in the online tool RegExr v2.0 (http://www.regexr.com/) to search for, identify and extract repeat patterns within sequences of FAZ10 and its orthologues. Sequences similarities were analysed by BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and alignment analyses were performed with Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). The phylogenetic analysis was performed using MEGA4 and the tree was obtained using the Neighbour-joining method with 5000 bootstrap replications as described by Galetovic et al. (2011). Sequence logos were generated using WebLogo version 2.8.2 (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi).

Trypanosomes and cell culture. All cell lines were derivatives of *Trypanosoma brucei* strain 427. For RNAi, the procyclic 29-13 and bloodstream form 90-13 host cell lines were used (Wirtz et al., 1999). Procyclic cells were grown in SDM-79 (LGC Bio - São Paulo, Brazil) medium supplemented with hemin and 10% FBS (Life Technologies – California, US) at 28°C and 5% CO_2 (Brun and Schonenberger, 1979). Bloodstream form parasites were cultured in HMI-9 medium (Life Technologies) supplemented with 20% FBS at 37°C and 5% CO_2 (Hirumi and Hirumi, 1989).

RNAi cell lines and transfection. For the construction of the FAZ10 RNAi cell line, a 575 bp target fragment of the *FAZ10* coding sequence (Tb927.07.3330), selected using the RNAit software (trypanofan.bioc.cam.ac.uk/software/RNAit.html) (Redmond et al., 2003), was amplified by PCR and cloned using SpeI and HindIII restriction sites into the tetracycline inducible p2T7-177 vector (Wickstead et al., 2002). To construct FAZ10:myc cell lines, the last 900 bp of the *FAZ10* coding sequence (Tb927.7.3330) without the stop codon were cloned using Hind III and Xba I into the pNATxTAG vector (Alsford and Horn, 2008) to allow integration into the *FAZ10* locus for endogenous expression. For all vectors, 5-10 µg of plasmid were linearized at the appropriate restriction site and transfected into 2-6 x 10^7 cells using either a Gene Pulser Electroporation System (BioRad; PCF) (McCulloch et al., 2004) or an AMAXA Nucleofector II system (programme X-001; BSF) (Burkard et al., 2007). Transformants were selected by limiting dilution and cells were maintained in the presence of G418 (15 μgml^{-1}), hygromycin (50 μgml^{-1}) and zeocin (10 μgml^{-1}) for PCF and G418 (2.5 μgml^{-1}), hygromycin (5 μgml^{-1}) and phleomycin (2.5 μgml^{-1}) for BSF. FAZ10:myc cell lines were maintained in the presence of blasticidin (10 μgml^{-1}). Cell density was monitored daily, with cultures maintained between 1 x 10^6-1 x 10^7 $cellsml^{-1}$ (PCF) and 1 x 10^5-1 x 10^6 $cellsml^{-1}$ (BSF). RNAi induction was achieved by the addition of 1 μgml^{-1} doxycycline or tetracycline and fresh drug was added at each culture dilution (Wirtz et al., 1999).

DAPI staining. Cells were fixed in -20 ºC methanol for at least 1 hour and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and the number of nuclei and kinetoplasts per cell were counted using epifluorescence microscopy DMI4000 Leica (Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo) or Zeiss Axioskop2 microscope/Axiocam MRM camera (Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow).

Morphogenetic measurements. Fluorescence microscopy images of DAPI-stained cells were used to evaluate kinetoplast and nucleus positioning. ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/) was used to measure the position of kinetoplasts and nuclei in 2N2K cells. The centre of the posterior nucleus was used as reference for the coordinates of the kinetoplasts and anterior nucleus. A straight line connecting the two nuclei was used to define the longitudinal axis of the cell (posterior-anterior end). Each kinetoplast and anterior nucleus position was plotted as a coordinate.

Cytoskeleton and flagella isolation. Whole cytoskeletons and flagella were obtained as described by Baqui et al. (2000b). Briefly, cells were harvested by centrifugation and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) before being resuspended in ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES pH 6.9; 0.1 mM EDTA; 5 mM EGTA and 2 mM $MgCl_2$) containing 1% NP-40 and the following protease and phosphatase inhibitors: 2 μgml^{-1} aprotinin, 5 μgml^{-1} antipain, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM leupeptin, 1 mM DTT, 0.5 mM benzamidine, 1 mM sodium orthovanadate, and 5 mM sodium fluoride. Cytoskeletons were pelleted by centrifugation at 10000 x g for 10 min at 4 °C, washed twice with PBS and either prepared for SDS-PAGE, or resuspended in Tris buffer (50 mM Tris pH 7.2; 1 M NaCl containing the same protease and phosphatase inhibitors as described above) and incubated on ice for 45 min prior to centrifuging at 10000 x g for 10 min at 4 ºC to obtain isolated flagella and cell body supernatant.

Polyclonal FAZ10 antibody. The coding sequence for the last 250 amino acids of Tb927.7.3330 (without the stop codon) was fused to the glutathione-S-transferase (G*ST*) coding sequence in the pGEX-4T-1 vector (GE Healthcare) using the Eco RI and Xho I restriction sites. GST:CtermFAZ10 was expressed and purified from BL21star *E. coli* (B F^- *ompT gal dcm lon* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ $[malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$) using glutathione-sepharose according to the manufacturer's instructions. The purified recombinant protein was then emulsified with PBS and Freund's complete adjuvant and injected subcutaneously into female Balb/C mice (6-week old). Three additional boosts with incomplete adjuvant were performed at 2-week intervals. Blood was collected from the orbital plexus and the serum was used in subsequent analysis (Donovan and Brown, 2006). All experiments with mice were approved in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation (Protocol nº014/2012) of the University of São Paulo (COBEA).

Immunoprecipitation. A total of $2x10^9$ cells of cytoskeletal fraction of *T. brucei* PCF were used (described above). Cytoskeletons were resuspended in 1 ml RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40) in the presence of protease and phosphatases inhibitors, sonicated twice and left on ice for 30 min. Samples were centrifuged at 12000 g at 4 °C for 10 minutes and the resulting supernatant was diluted in equal volume of T-NET buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40). We first incubated with pre-immune mouse serum (1: 200) for 2 hours at 4 °C with agitation and centrifuged at 12,000 g for 2 min. The supernatant was recovered in a new tube and a suspension of protein A-Sepharose (GE Healthcare) was added and incubated for 30 min at 4 °C with agitation. The supernatant was collected in a new tube and incubated with anti-FAZ10 antibody (1:50) overnight at 4 °C (IP). Thereafter, the same procedure was repeated by addition of protein A-Sepharose and centrifugation. The immunocomplexes (IP) were resuspended in sample buffer for analysis by SDS-PAGE.

SDS-PAGE and Western blotting. A total of $5x10^7$ **c**ells and corresponding cell fractions were resuspended in SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue and 200 mM DTT) and incubated for 5 min at 95 °C. Samples were analysed by SDS-PAGE using a 2.5% -12.5% polyacrylamide gradient gel. Rabbit skeletal muscle myofibrils were used as the mass standard (Wang, 1982; Baqui et al., 1996). Gels were stained with Coomassie Blue G-250 or transferred to nitrocellulose membrane. For Western blotting analysis, membranes were blocked with 5% skimmed milk in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl) containing 0.05% Tween20 for 2 hours at room temperature and then incubated with primary antibody in TBST (anti-FAZ10, 1:500; anti-PFR (PFR, 1:2000, a kind gift from Dr Sérgio Schenkman, UNIFESP, Brazil); anti-β-tubulin (β-tubulin, 1:10000, SIGMA); anti-EF1α (CBP-KK1, 1:10,000, Millipore); anti-myc (4E6 or 9E10, 1:1000, Millipore)). After 3 washes with TBST, membranes were incubated with goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Pierce) (1:12000) and the signal detected with enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) according to the manufacturers instructions.

Immunofluorescence. Parasites were collected by centrifugation and washed once with PBS. They were settled onto 0.01% poly-lysine coated slides, fixed with PBS containing 3.6% paraformaldehyde for 10 minutes and permeabilized with PBS containing 0.3% Triton X-100 for 5 minutes. The slides were blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin for 30 minutes, and then incubated with the following primary antibodies, diluted in blocking solution: anti-β-tubulin (1:500, Sigma), anti-PFR (1:250), anti-FAZ1 L3B2 (1:5, a kind gift from Prof Keith Gull, Oxford, UK) (Kohl et al., 1999), anti-myc 4E6 and 9E10 antibodies (1:300 and 1:100), anti-FAZ10 (1:50) and anti-ClpGM6 (1:200, a kind gift from Prof Keith Gull). Alexa Fluor IgG secondary antibodies (Life Technologies) were used at 1:500. No nonspecific labelling was observed with these secondary antibodies alone (data not shown). Images were acquired using a Leica DMI4000 B epifluorescence microscope, a Leica Confocal SP5

Microscope (LMMC- Multiuser Laboratory of Confocal Microscopy, Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo) or a Zeiss Axioskop2 microscope/Axiocam MRM camera (Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow).

Electron microscopy. For transmission-EM (TEM) of ultrathin sections, *T. brucei* parasites were fixed in 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, block-stained with 2% uranium acetate in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0). Samples were dehydrated in ethanol and then propylene oxide and embedded in resin (Embed 812, EM Sciences). Ultrathin sections were collected on Pioloform (Ted Pella, Redding, CA) and carbon-coated single sloth grids, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Moreira et al., 1991). Immunogold-EM was performed as described elsewhere (Robinson and Gull, 1991; Baqui et al., 1996). Briefly, cytoskeletons were collected and applied to carbon-formvar-polylysine-coated nickel grids. Detergent-extraction was performed in PEME buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM $MgSO_4$, 0.1 mM EDTA, 2 mM EGTA, containing 1% NP-40) plus protease inhibitors: benzamine, DTT, PMSF. Samples were then fixed with 3.7% paraformaldehyde plus 0.01% glutaraldehyde in PEME buffer and washed in 20 mM glycine in PBS, followed by 1% BSA in PBS. Grids were incubated with mouse anti-FAZ10 (diluted 1:5) and with rabbit anti-myc antibodies (1:10, a gift from Dr Ramanujan Hegde, Cambridge, UK) followed by secondary antibody goat anti-mouse 15 nm and goat anti-rabbit 6 nm gold conjugates (1:40, EMS, Hatfield, PA). Then, grids were post-fixed in 2.5% glutaraldehyde and negatively stained with 2% ammonium molybdate, pH 6.9. After the embedding methods for immunogold and EM processing, the images were acquired at 120 kV using a Tecnai G2 electron microscope (LCMS, Laboratory of Cellular and Molecular Ultrastructure of the Department of Pathology and Forensic Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo). Scanning-EM (SEM) was performed as described elsewhere (Sant'Anna et al., 2005). Briefly, cells were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 2 hours at room temperature. Cells were treated with osmium tetroxide and then settled onto poly-lysine treated coverslips. After washing the cells three times with PBS, cells were dehydrated in an alcohol series (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%). The dehydrated sample was taken into an insulated chamber and liquid CO_2 was injected at 4 °C with samples being gradually heated to 40°C. Then, samples were impregnated with gold and images were acquired using Jeol JSM-6610 LV microscope (LMME, Multiuser Electron Microscopy Laboratory, Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo).

Acknowledgements

We thank all lab members for their time and expertise, Elizabete Rosa Milani for the confocal microscopy technical assistance, José Augusto Maulin and Maria Dolores Seabra Ferreira for electron microscopy technical assistance, Dr Sérgio Schenkman (UNIFESP, São Paulo, Brazil) and Prof Keith

Gull (University of Oxford, Oxford, UK) and Dr Ramanujan Hegde (Cambridge, UK) for providing antibodies, and Dra. Maria Carolina Elias (Instituto Butantã, São Paulo, Brazil) for providing the RNAi vector.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author Contributions

BPM carried out the majority of the experiments. CKF carried out electron microscopy analysis. BPM, TCH and MMAB designed experiments, interpreted the results and wrote the paper.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/19547-1 to MMAB, 2004/08868-0 to LMMC, 2009/54013-0 to LMME), by Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência- FAEPA (to MMAB), by the Medical Research Council (GO900239 to TCH). BPM received doctoral fellowship from FAPESP (2012/22129-2) and CAPES - PDSE (BEX 6508/15-4).

References

Absalon, S., Kohl, L., Branche, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Rusconi, F., Cosson, J., Bonhivers, M., Robinson, D. and Bastin, P. (2007). Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **2.** e437.

Alsford, S. and Horn, D. (2008). Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **161.** 76-9.

Aslett, M., Aurrecoechea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X. et al. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* **38.** D457-62.

Baqui, M. M., Takata, C. S., Milder, R. V. and Pudles, J. (1996). A giant protein associated with the anterior pole of a trypanosomatid cell body skeleton. *Eur J Cell Biol* **70.** 243-9.

Baqui, M. M., De Moraes, N., Milder, R. V. and Pudles, J. (2000a). A giant phosphoprotein localized at the spongiome region of *Crithidia luciliae thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* **47.** 532-7.

Baqui, M. M., Milder, R., Mortara, R. A. and Pudles, J. (2000b). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **47.** 25-37.

Bastin, P., Sherwin, T. and Gull, K. (1998). Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* **391.** 548.

Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., Shaw, M. K., Ginger, M. L., Gaskell, S. J., McKean, P. G. et al. (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440.** 224-7.

Brun, R. and Schonenberger. (1979). Cultivation and *in vitro* cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Trop* **36.** 289-92.

Burkard, G., Fragoso, C. M. and Roditi, I. (2007). Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **153.** 220-3.

Donovan, J. and Brown, P. (2006). Blood collection. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 1.** Unit 17.
Emmer, B. T., Daniels, M. D., Taylor, J. M., Epting, C. L. and Engman, D. M. (2010). Calflagin inhibition prolongs host survival and suppresses parasitemia in *Trypanosoma brucei* infection. *Eukaryot Cell* **9.** 934-42.
Galetovic, A., Souza, R. T., Santos, M. R., Cordero, E. M., Bastos, I. M., Santana, J. M., Ruiz, J. C., Lima, F. M., Marini, M. M., Mortara, R. A. et al. (2011). The repetitive cytoskeletal protein H49 of *Trypanosoma cruzi* is a calpain-like protein located at the flagellum attachment zone. *PLoS One* **6.** e27634.
Gallet, C., Demonchy, R., Koppel, C., Grellier, P. and Kohl, L. (2013). A protein phosphatase 1 involved in correct nucleus positioning in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* **192.** 49-54.
Gull, K. (1999). The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annual Review of Microbiology* **53.** 629.
Hammarton, T. C., Lillico, S. G., Welburn, S. C. and Mottram, J. C. (2005). *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. *Mol Microbiol* **56.** 104-16.
Hayes, P., Varga, V., Olego-Fernandez, S., Sunter, J., Ginger, M. L. and Gull, K. (2014). Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. *J Cell Biol* **206.** 377-84.
Haynes, P. A., Russell, D. G. and Cross, G. A. (1996). Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. *J Cell Sci* **109 (Pt 13).** 2979-88.
Hemphill, A., Lawson, D. and Seebeck, T. (1991). The cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Parasitology* **77.** 603-612.
Hirumi, H. and Hirumi, K. (1989). Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *Journal of Parasitology* **75.** 985-9.
Hoog, J. L., Bouchet-Marquis, C., McIntosh, J. R., Hoenger, A. and Gull, K. (2012). Cryo-electron tomography and 3-D analysis of the intact flagellum in *Trypanosoma brucei*. *J Struct Biol* **178.** 189-98.
Hu, H., Zhou, Q. and Li, Z. (2015). SAS-4 rotein in *Trypanosoma brucei* controls life cycle transitions by modulating the length of the flagellum attachment zone filament. *J Biol Chem* **290.** 30453-63.
Kall, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* **338.** 1027-36.
Kohl, L., Sherwin, T. and Gull, K. (1999). Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *J Eukaryot Microbiol* **46.** 105-9.
Kohl, L., Robinson, D. and Bastin, P. (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J* **22.** 5336-46.
Labeit, S. and Kolmerer, B. (1995). Titins - giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270.** 293-296.
LaCount, D. J., Barrett, B. and Donelson, J. E. (2002). *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J Biol Chem* **277.** 17580-8.
Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252.** 1162-4.
May, S. F., Peacock, L., Almeida Costa, C. I., Gibson, W. C., Tetley, L., Robinson, D. R. and Hammarton, T. C. (2012). The *Trypanosoma brucei* AIR9-like protein is cytoskeleton-associated and is required for nucleus positioning and accurate cleavage furrow placement. *Mol Microbiol* **84.** 77-92.
McAllaster, M. R., Ikeda, K. N., Lozano-Nunez, A., Anrather, D., Unterwurzacher, V., Gossenreiter, T., Perry, J. A., Crickley, R., Mercadante, C. J., Vaughan, S. et al. (2015). Proteomic identification of novel cytoskeletal proteins associated with TbPLK, an essential regulator of cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell* **26.** 3013-29.
McCulloch, R., Vassella, E., Burton, P., Boshart, M. and Barry, J. D. (2004). Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* **262.** 53-86.

Moreira, J. E., Ball, W. D., Mirels, L. and Hand, A. R. (1991). Accumulation and localization of two adult acinar cell secretory proteins during development of the rat submandibular gland. *Am J Anat* **191.** 167-84.

Morriswood, B., Havlicek, K., Demmel, L., Yavuz, S., Sealey-Cardona, M., Vidilaseris, K., Anrather, D., Kostan, J., Djinovic-Carugo, K., Roux, K. J. et al. (2013). Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. *Eukaryot Cell* **12.** 356-67.

Muller, N., Hemphill, A., Imboden, M., Duvallet, G., Dwinger, R. H. and Seebeck, T. (1992). Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection. *Parasitology* **104 Pt 1.** 111-20.

Nozaki, T., Haynes, P. A. and Cross, G. A. (1996). Characterization of the *Trypanosoma brucei* homologue of a *Trypanosoma cruzi* flagellum-adhesion glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* **82.** 245-55.

Redmond, S., Vadivelu, J. and Field, M. C. (2003). RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **128.** 115-8.

Robinson, D. R. and Gull, K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* **352.** 731-3.

Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H. and Gull, K. (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol* **128.** 1163-72.

Rotureau, B., Blisnick, T., Subota, I., Julkowska, D., Cayet, N., Perrot, S. and Bastin, P. (2014). Flagellar adhesion in *Trypanosoma brucei* relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body. *J Cell Sci* **127.** 204-15.

Ruiz-Moreno, L., Bijovsky, A. T., Pudles, J., Alves, M. J. and Colli, W. (1995). *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. *Exp Parasitol* **80.** 605-15.

Sant'Anna, C., Campanati, L., Gadelha, C., Lourenco, D., Labati-Terra, L., Bittencourt-Silvestre, J., Benchimol, M., Cunha-e-Silva, N. L. and De Souza, W. (2005). Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). *Histochem Cell Biol* **124.** 87-95.

Sherwin, T. and Gull, K. (1989). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei* brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **323.** 573-88.

Subota, I., Julkowska, D., Vincensini, L., Reeg, N., Buisson, J., Blisnick, T., Huet, D., Perrot, S., Santi-Rocca, J., Duchateau, M. et al. (2014). Proteomic analysis of intact flagella of procyclic *Trypanosoma brucei* cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localization and dynamics. *Mol Cell Proteomics* **13.** 1769-86.

Sun, S. Y., Wang, C., Yuan, Y. A. and He, C. Y. (2013). An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **126.** 520-31.

Sunter, J. D. and Gull, K. (2016). The flagellum attachment zone: 'the cellular ruler' of trypanosome morphology. *Trends Parasitol*.

Sunter, J. D., Varga, V., Dean, S. and Gull, K. (2015a). A dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes. *J Cell Sci* **128.** 1580-94.

Sunter, J. D., Benz, C., Andre, J., Whipple, S., McKean, P. G., Gull, K., Ginger, M. L. and Lukes, J. (2015b). Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in Trypanosoma brucei life cycle transitions. *J Cell Sci* **128.** 3117-30.

Vaughan, S., Kohl, L., Ngai, I., Wheeler, R. J. and Gull, K. (2008). A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. *Protist* **159.** 127-36.

Wang, K. (1982). Purification of titin and nebulin. *Methods Enzymol* **85 Pt B.** 264-74.

Wang, K., McClure, J. and Tu, A. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76.** 3698-702.

Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* **125.** 211-6.

Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **99.** 89-101.

Zhou, Q., Hu, H. and Li, Z. (2016a). An EF-hand-containing protein in *Trypanosoma brucei* regulates cytokinesis initiation by maintaining the stability of the cytokinesis initiation factor CIF1. *J Biol Chem*.

Zhou, Q., Liu, B., Sun, Y. and He, C. Y. (2011). A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **124.** 3848-58.

Zhou, Q., Hu, H., He, C. Y. and Li, Z. (2015). Assembly and maintenance of the flagellum attachment zone filament in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **128.** 2361-72.

Zhou, Q., Gu, J., Lun, Z. R., Ayala, F. J. and Li, Z. (2016b). Two distinct cytokinesis pathways drive trypanosome cell division initiation from opposite cell ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113.** 3287-92.

Figure legends

Figure 1: FAZ10 is a giant repeat-containing protein. A. Domain structure of FAZ10 showing N- and C-terminal regions (N-term and C-term, respectively), two coiled-coil (CC) domains and the central region that separates them are shown. **B.** Representation of the consensus amino acid sequence for the repeat pattern found in FAZ10 and orthologues. **C.** Comparison of the single FAZ10 orthologue present in various trypanosomes. Each box represents a single repeat sequence, which is coloured according to its similarity to the consensus sequence given in (B). The total numbers of repeats and the repeat aminoacid (aa) length are listed on the right.

Figure 2: FAZ10 localizes to the FAZ and is associated with the flagellar cytoskeletal fraction of PCF *T. brucei*. A. Flow chart illustrating the preparation of different fractions of the cytoskeleton of PCF *T. brucei*. **B.** Linear gradient (2.5%-12.5%) SDS-PAGE analysis of cytoskeletal fractions. Gels were stained with Coomassie blue. M: rabbit muscle myofibrils molecular mass standard; S1: detergent-soluble proteins; P1: whole cytoskeleton; S2: 1M NaCl-soluble cell body proteins; P2: flagella. The HMWP region (500 - 3800 kDa) is indicated with bracket. **C.** Western blot analysis of cytoskeletal fractions (described in B) with FAZ10 antibody. PFR (paraflagellar rod) and β-TUB (β-tubulin) antibodies were used to validate the integrity of the cytoskeleton fractions. **D.** Immunoprecipitation (IP) of the cytoskeletal fraction with anti-FAZ10 antibody analysed by SDS-PAGE and silver-stained (SS) or by western blotting with anti-FAZ10 antibody (WB). **E.** Immunolocalization of FAZ10 protein using anti-FAZ10 antibody (FAZ, red) in PCF *T. brucei*. Nuclei and kinetoplasts are stained with DAPI (blue); DIC/DAPI/ FAZ10 merged images are shown, as indicated. Scale bar = 5 µm. **F.** Immunofluorescence microscopy of whole cytoskeletons of the FAZ10 RNAi + FAZ10:myc cell line labelled with anti-myc (FAZ10:myc; green). DAPI (blue) stained nuclei and kinetoplasts. Merged images are shown, as indicated. Scale bar = 5 µm. **G.** FAZ10 is localized to the intact flagella of PCF *T. brucei* with anti-FAZ10 antibody. DIC, anti-FAZ10 antibody (FAZ10, green) and DIC/FAZ10 merged images are shown, as indicated. Scale bar = 5 µm **H.** Immunogold EM labelling of FAZ10 and FAZ10:myc. PCF *T. brucei* cytoskeletons were labelled with anti-FAZ10 and anti-myc antibodies and revealed with secondary antibodies conjugated to colloidal gold (FAZ10 - 15 nm; myc - 6 nm). Arrowheads indicate the punctate repetitive pattern distribution at the FAZ. Insets are indicated by boxes. Scale bars = 200 nm.

Figure 3: FAZ10 knockdown in PCF *T. brucei* affects cell growth, morphogenesis and flagellum attachment. A. Western blotting of detergent-extracted cytoskeleton of uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox) FAZ10 RNAi cells at the timepoints indicated. Anti-FAZ10 labelled FAZ10 and anti-PFR was used as a loading control. **B.** Immunofluorescence of whole cytoskeletons from uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi cells. DIC, DAPI

(blue), anti-FAZ10 (FAZ10, red) and DIC/DAPI/anti-FAZ10 merged images are shown, as indicated. Scale bar = 5 µm. **C.** Western blotting of whole cell lysates of uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi or FAZ10 RNAi + FAZ10:myc cells. Anti-FAZ10 and anti-myc antibodies were used to detect FAZ10 and FAZ10:myc, respectively. Anti-PFR was used as a loading control. **D.** Growth curve of FAZ10 RNAi cells in the presence (+dox) or absence (-dox) of doxycycline. Cells were counted daily and diluted as indicated to maintain logarithmic phase growth. **E.** Fluorescence microscopy of DAPI-stained of uninduced (-dox) or induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi cells. Arrowheads indicate fully or partially detached flagella. Arrow indicates a cell with abnormal furrow ingression. Scale bar = 7.5 µm. **F.** Quantification (%) analysis of FAZ10 RNAi cells with flagellum attachment defects over time following RNAi induction. $n > 500$ cells/timepoint. **G.** Quantification (%) of nuclei (N) and kinetoplasts (K) in DAPI-stained FAZ10 RNAi cells over time post-RNAi induction ($n > 250$ cells per timepoint).

Figure 4: FAZ10 knockdown in BSF *T. brucei* impairs cell growth and causes flagellum detachment and DNA accumulation. A. Western blotting with anti-FAZ10 antibody of whole cell lysate of uninduced (-tet) and induced (+tet; 48 hours) FAZ10:myc or FAZ10 RNAi + FAZ10:myc. Anti-EF1α antibody was used as a loading control. **B.** Immunofluorescence of uninduced (-tet) and induced (+tet) FAZ10 RNAi + FAZ10:myc cells. DIC, DAPI (blue), anti-myc (FAZ10:myc; green) and DIC/DAPI/anti-myc merged images are shown, as indicated. Scale bar = 5 µm. **C.** Cumulative growth curve of FAZ10 RNAi cells in the presence (+tet) or absence (-tet) of tetracycline. **D.** DAPI-stained nuclei and kinetoplasts of FAZ10 RNAi cells in different timepoints after induction with tetracycline. Arrowheads indicate partially or fully detached flagella. Scale bar = 5 µm. **E.** Quantification of FAZ10 RNAi cells with flagellum detachment defects over time following RNAi induction. $n > 500$ cells/timepoint. **F-G.** Quantification of nuclei (N) and kinetoplasts (K) in DAPI-stained FAZ10 RNAi cells over time post-RNAi induction ($n > 150$ cells per timepoint). **H.** Epifluorescence microscopy of DAPI-stained FAZ10 RNAi cells 8 hours after induction with tetracycline. Arrowheads indicate furrow ingression. Scale bar = 5 µm

Figure 5: FAZ10 depletion affects the FAZ filament-PFR distance and the overall organization of FAZ/flagellum structure in PCF *T. brucei*. A. Transmission electron microscopy (TEM) of transverse flagella sections of wild type (WT), uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi PCF *T. brucei*. Brackets mark the distance between the FAZ filament and the distal domain of PFR. AXO: axoneme; PFR: paraflagellar rod; MtQ: microtubule quartet. Scale bars = 100 nm. **B.** Scatter plot of the distance (nm) between the FAZ filament and the distal domain of PFR ($n \geq 14$; one-way ANOVA *** $P < 0.0001$) for the cell lines in (A). **C.** TEM images of the arrangement of duplicated flagella in wild type (WT), uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi PCF cells. Arrows indicate the orientation of the PFR-axoneme. Scale bars = 100 nm. **D-F.** TEM images of doxycycline-induced FAZ10 RNAi PCF cells 96 hours post-induction, showing 2

flagella inside 1 flagellar membrane (D), disorganisation of the microtubule quartet (MtQ; E, F) and disruption of the subpellicular microtubules (F, arrowhead). AXO, axoneme; PFR, paraflagellar rod. Scale bars = 100 nm (D, E), 500 nm (F).

Figure 6: FAZ10 is essential for segregation and positioning of the nuclei and kinetoplasts in PCF *T. brucei*. A. Schematic illustration of the average position of the anterior nucleus (light grey circle) and the positions of the anterior (red dots) and posterior (blue dots) kinetoplasts relative to the posterior nucleus (dark grey circle, y axis) in 2N2K cells (pre-abscission) in uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox) FAZ10 RNAi PCF cells (n >90) post-RNAi induction. The positions of the nuclei (N) and kinetoplasts (K) were measured as described in the Materials and Methods. **B.** Proportions of 2N2K cells from uninduced (-dox) or doxycycline-induced (+dox) FAZ10 RNAi cells exhibiting the respective phenotypes of nuclei (N) and kinetoplasts (K), as visualized by DAPI staining. $n > 90$. Scale bar = 5 µm.

Figure 7: FAZ10 is required for correct cleavage furrow placement in PCF *T. brucei*. A. Percentage of 2N2K cells with normal or abnormal placement of the cleavage furrow in uninduced (-dox) or doxycycline-induced (+dox) FAZ10 RNAi cells. $n > 65$ cells. **B.** Percentage of 2N2K cells with flagellum attachment defects correlated with whether they exhibited normal or abnormal furrow placement, in uninduced (-dox) or doxycycline-induced (+dox) FAZ10 RNAi PCF cells. $n = 50$. **C-D.** Merge of DAPI stained (nuclei and kinetoplasts) and DIC images of doxycycline-induced FAZ10 RNAi cells displaying aberrantly positioned cleavage furrows with (C) incorrect nucleus/kinetoplast placement and detached flagellum, or (D) correct nucleus/kinetoplast placement and attached flagella. Scale bars = 5 µm. **E.** Confocal microscopy of whole cytoskeletons from uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi cells. Cells were labelled with anti-β-TUB (β-tubulin) and nuclei (N) and kinetoplasts (K) were stained with DAPI. DIC, DAPI and DAPI/anti-β-tubulin merged images are shown, as indicated. Inset/arrowhead indicates the ingression of the furrow through the nucleus. Scale bar = 5 µm. **F-G.** Scanning electron micrograph (SEM) images of uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 96 hours) FAZ10 RNAi cells. Images represent the cleavage fold generation (i) and cleavage furrow ingression (ii), as indicated by the arrowheads. Scale bars = 2 µm.

Abbreviations

FAZ, flagellum attachment zone; HMWP, high molecular weight protein; FAZ10, flagellum attachment zone protein 10, PFR, paraflagellar rod; MtQ, microtubule quartet; PCF, procyclic form; BSF: bloodstream form; TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; N, nucleus; K, kinetoplast;

Figures

Figure 1

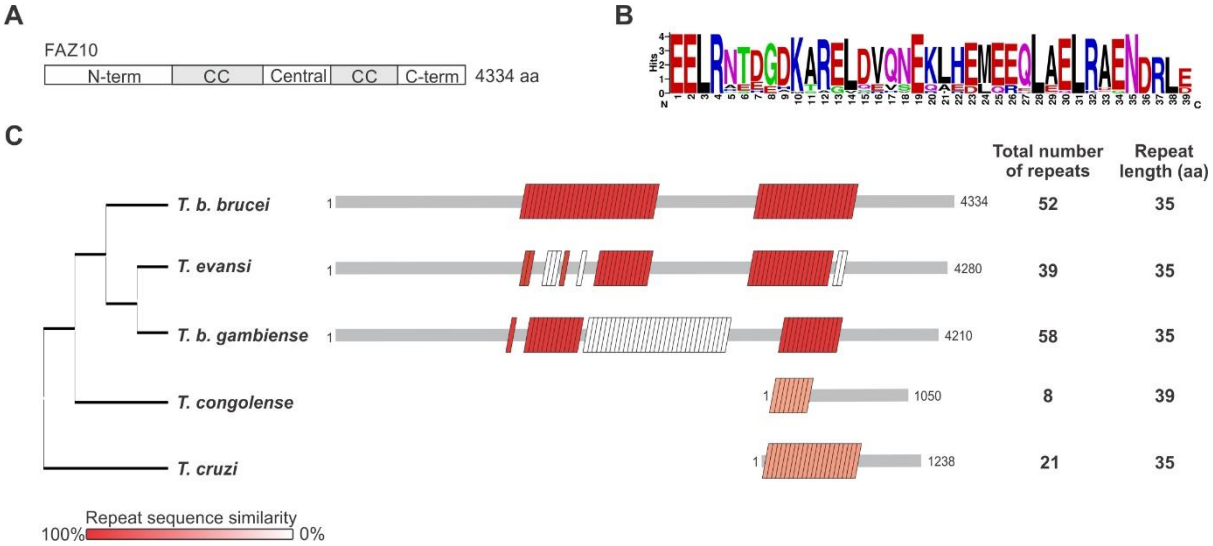


Figure 2

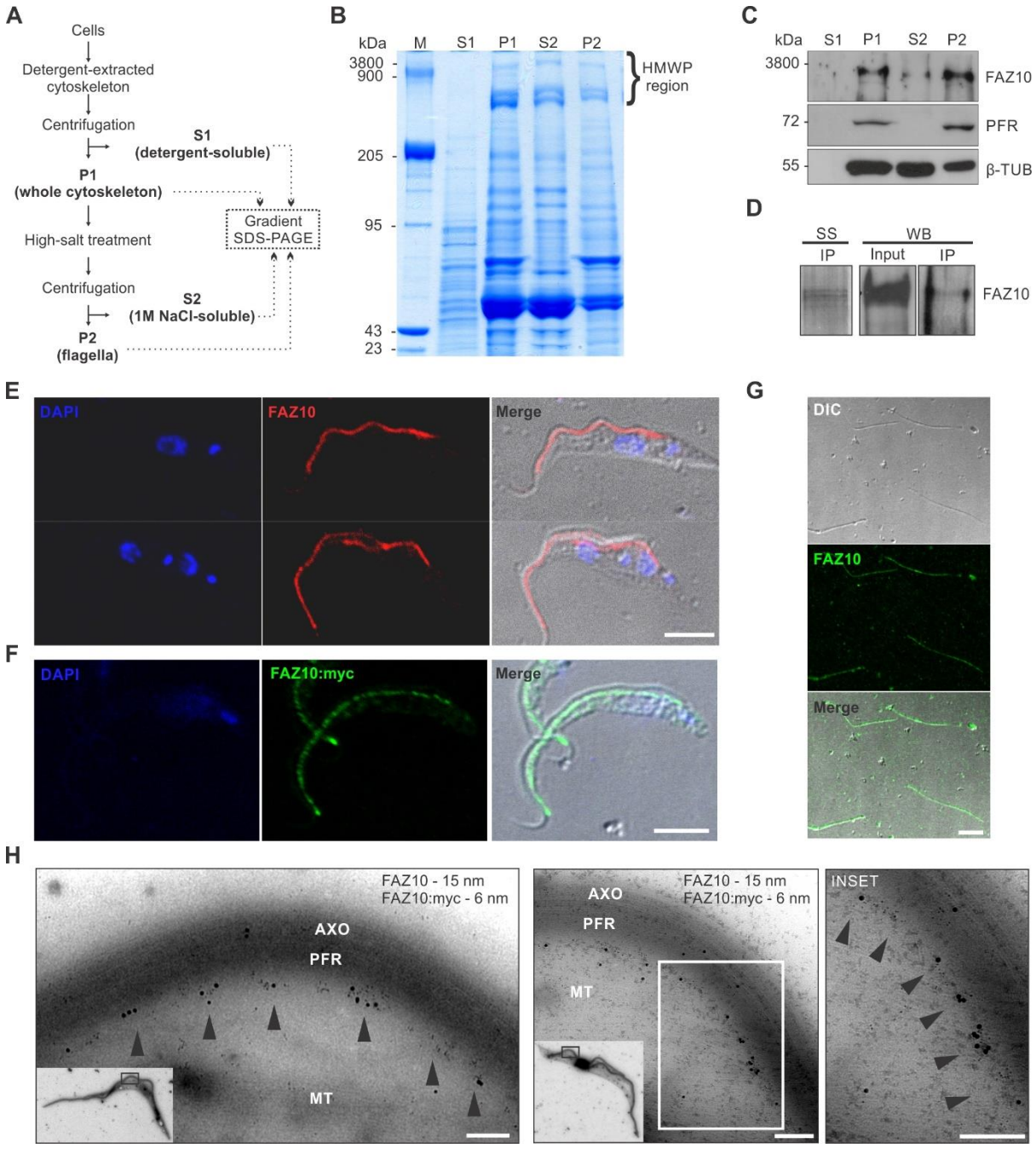

A
Cells
Detergent-extracted cytoskeleton
Centrifugation
S1 (detergent-soluble)
P1 (whole cytoskeleton)
Gradient SDS-PAGE
High-salt treatment
Centrifugation
S2 (1M NaCl-soluble)
P2 (flagella)
B
kDa M S1 P1 S2 P2
3800
900
205
95
43
23
HMWP region
C
kDa S1 P1 S2 P2
3800
72
55
FAZ10
PFR
β-TUB
D
SS
WB
IP
Input
IP
FAZ10
E
DAPI
FAZ10
Merge
F
DAPI
FAZ10:myc
Merge
G
DIC
FAZ10
Merge
H
FAZ10 - 15 nm
FAZ10:myc - 6 nm
AXO
PFR
MT
INSET

Figure 3

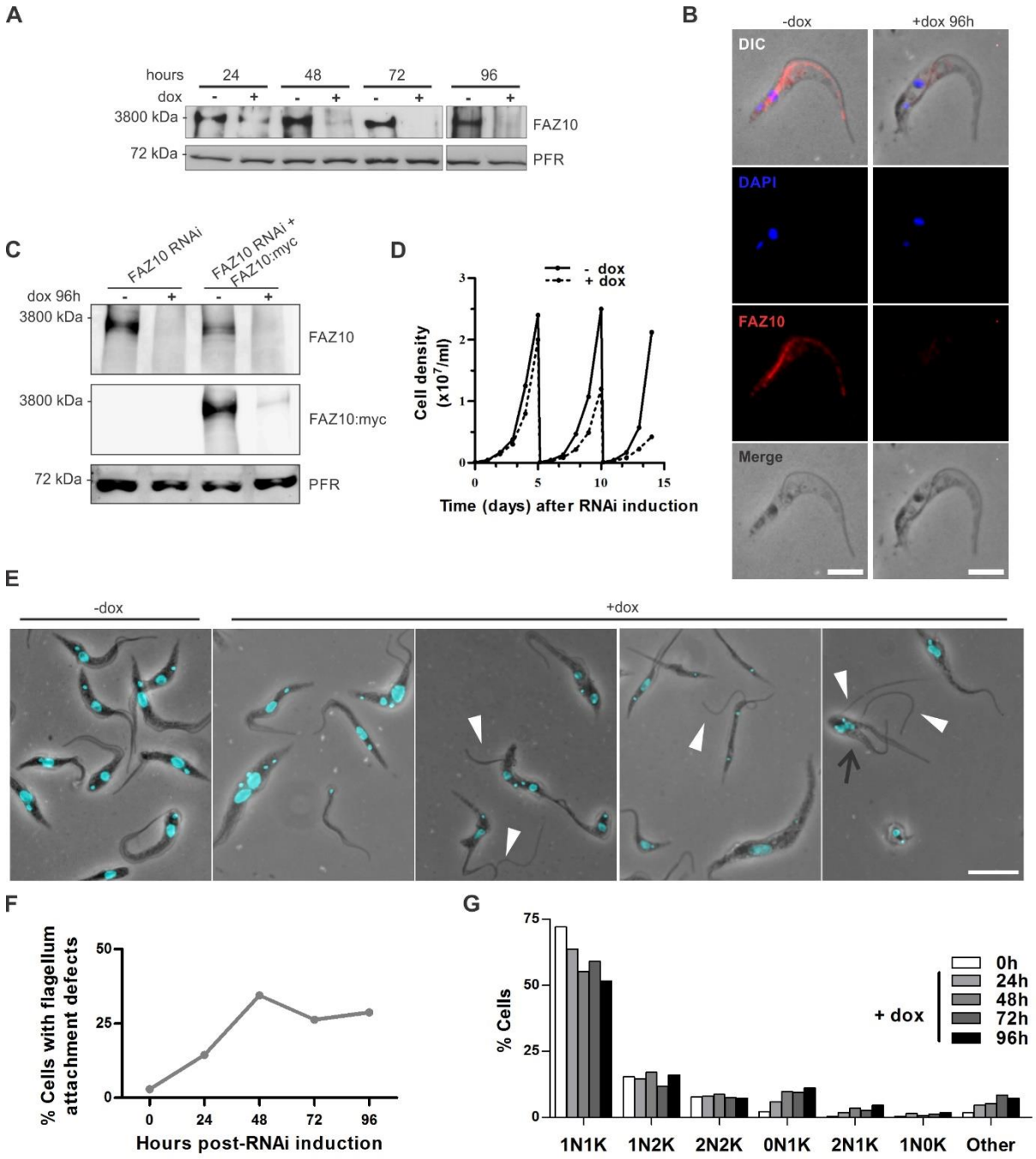

A
hours
24
48
72
96
dox
3800 kDa
FAZ10
72 kDa
PFR
B
-dox
+dox 96h
DIC
DAPI
FAZ10
Merge
C
FAZ10 RNAi
FAZ10 RNAi + FAZ10:myc
dox 96h
3800 kDa
FAZ10
3800 kDa
FAZ10:myc
72 kDa
PFR
D
- dox
+ dox
Cell density (x10^7/ml)
Time (days) after RNAi induction
E
-dox
+dox
F
% Cells with flagellum attachment defects
Hours post-RNAi induction
G
% Cells
+ dox
0h
24h
48h
72h
96h
1N1K
1N2K
2N2K
0N1K
2N1K
1N0K
Other

Figure 4

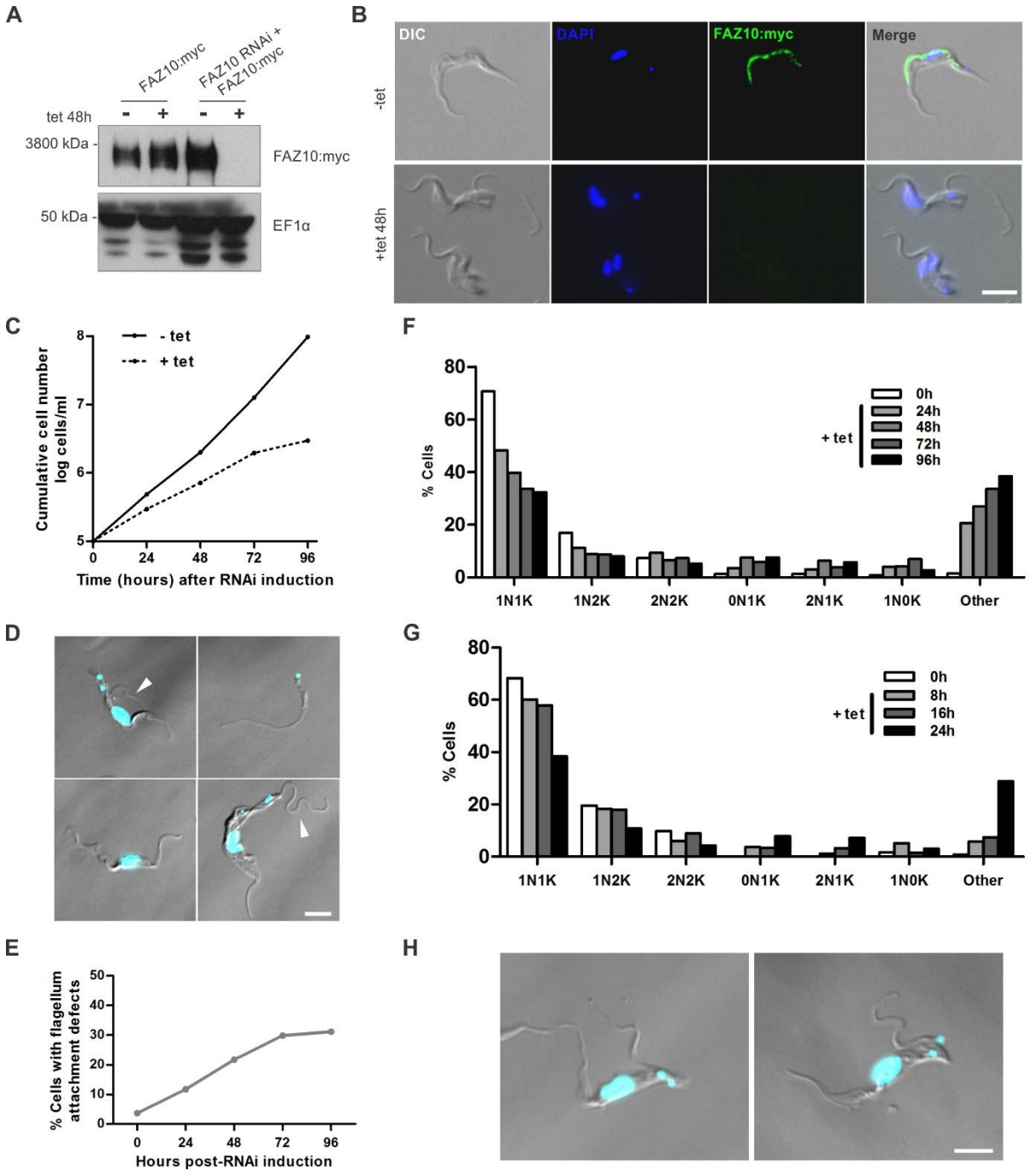

A
FAZ10:myc
FAZ10 RNAi + FAZ10:myc
tet 48h
- + - +
3800 kDa
FAZ10:myc
50 kDa
EF1α
B
DIC
DAPI
FAZ10:myc
Merge
-tet
+tet 48h
C
- tet
+ tet
Cumulative cell number log cells/ml
Time (hours) after RNAi induction
D
E
% Cells with flagellum attachment defects
Hours post-RNAi induction
F
% Cells
+ tet
0h
24h
48h
72h
96h
1N1K
1N2K
2N2K
0N1K
2N1K
1N0K
Other
G
% Cells
+ tet
0h
8h
16h
24h
H

Figure 5

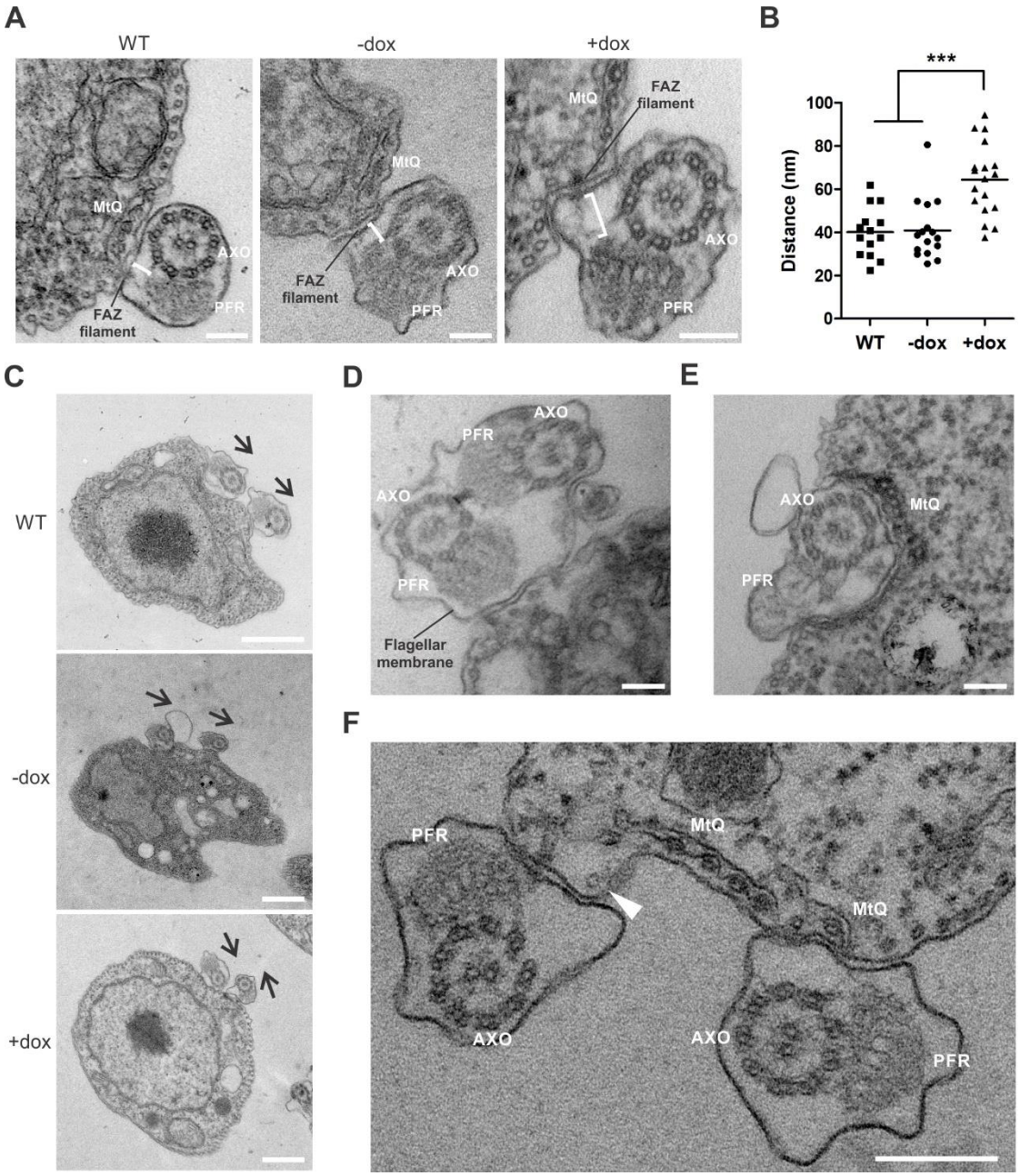

A
WT
-dox
+dox
MtQ
AXO
FAZ filament
PFR
B
***
Distance (nm)
100
80
60
40
20
0
WT
-dox
+dox
C
WT
-dox
+dox
D
AXO
PFR
Flagellar membrane
E
AXO
MtQ
PFR
F
PFR
MtQ
AXO

Figure 6

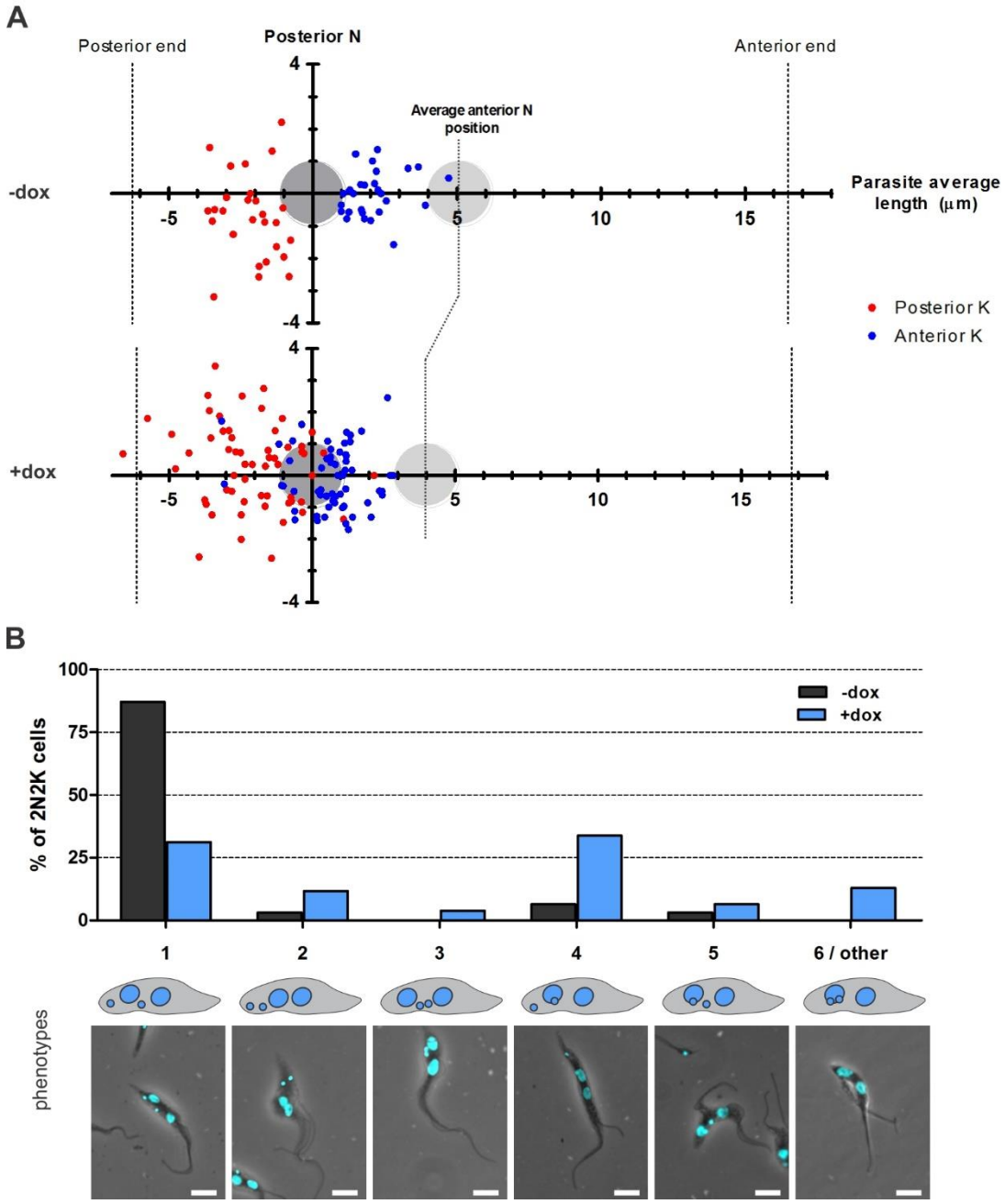
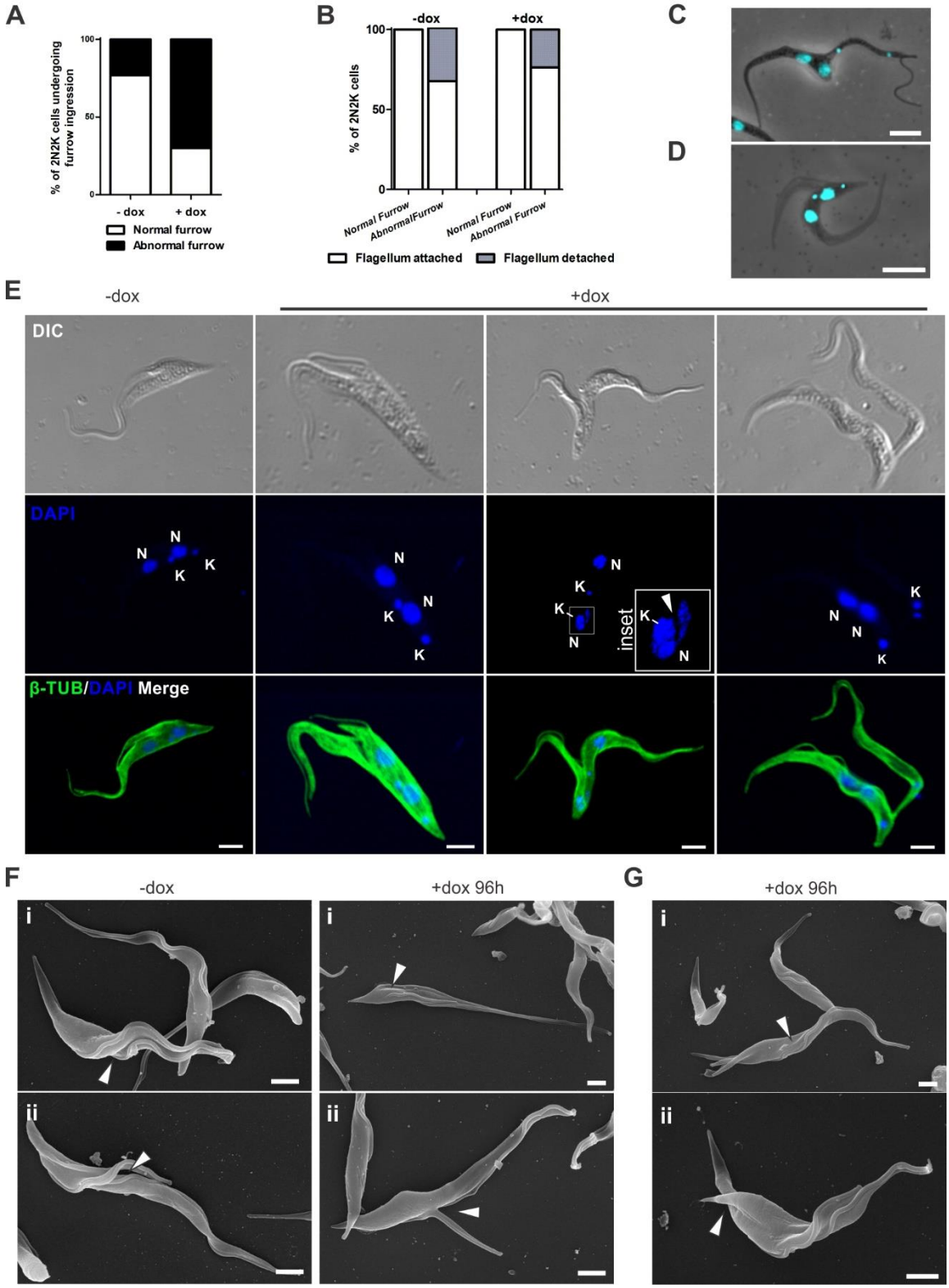

A
Posterior end
Posterior N
Anterior end
Average anterior N position
-dox
+dox
Parasite average length (µm)
Posterior K
Anterior K
B
% of 2N2K cells
-dox
+dox
1
2
3
4
5
6 / other
phenotypes

Figure 7


A
% of 2N2K cells undergoing furrow ingression
100
50
0
- dox
+ dox
Normal furrow
Abnormal furrow
B
-dox
+dox
% of 2N2K cells
100
50
0
Normal Furrow
AbnormalFurrow
Normal Furrow
Abnormal Furrow
Flagellum attached
Flagellum detached
C
D
E
-dox
+dox
DIC
DAPI
N
K
inset
β-TUB/DAPI Merge
F
-dox
+dox 96h
i
ii
G
+dox 96h
i
ii

Supplementary Information

Figure S1: Immunofluorescence of isolated flagella of PCF *T. brucei* cells. Confocal microscopy of intact flagella of uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 72 hours) FAZ10 RNAi cells. Isolated flagella were labelled with anti-FAZ10 (FAZ10; green), anti-β-TUB (β-tubulin; green) or anti-PFR (PFR; green) antibodies, as indicated. Scale bars = 2.5 µm.

Figure S2: Co-localization of FAZ10 and FAZ10:myc at the FAZ in PCF *T. brucei*. A. Confocal microscopy of cytoskeleton showing the same distribution of FAZ10 and FAZ10:myc using anti-FAZ10 (FAZ10; green), anti-myc (FAZ10:myc; red). Nuclei and kinetoplasts were stained with DAPI and merged images are shown as indicated. Scale bar = 10 µm.

Figure S3: Distribution of FAZ1 and ClpGM6 proteins compared to FAZ10 in PCF *T. brucei*. A. Confocal microscopy of FAZ10:myc cytoskeletons labelled with L3B2 (FAZ1; green) and anti-myc (FAZ10:myc; red) antibodies. DAPI (blue) stained nuclei and kinetoplasts. Merged images are shown as indicated. **B.** Confocal microscopy of FAZ10:myc cytoskeletons labelled with anti-ClpGM6 (ClpGM6; green) and anti-myc (FAZ10:myc; red) antibodies. DAPI (blue) stained nuclei and kinetoplasts. Merged images are shown as indicated. Scale bars = 10 µm.

Figure S4: FAZ10 knockdown does not impair the formation of the PFR or the FAZ. Immunofluorescence microscopy of whole cytoskeletons of uninduced (-dox) and doxycycline-induced (+dox; 72 hours) FAZ10 RNAi PCF cells. Cytoskeletons were labelled with either anti-PFR (PFR; green) (**A**) or L3B2 (FAZ1; green) (**B**) antibodies. DAPI (blue) stained nuclei and kinetoplasts. Merged images are shown, as indicated. Scale bars = 10 µm.

Figures

Figure S1

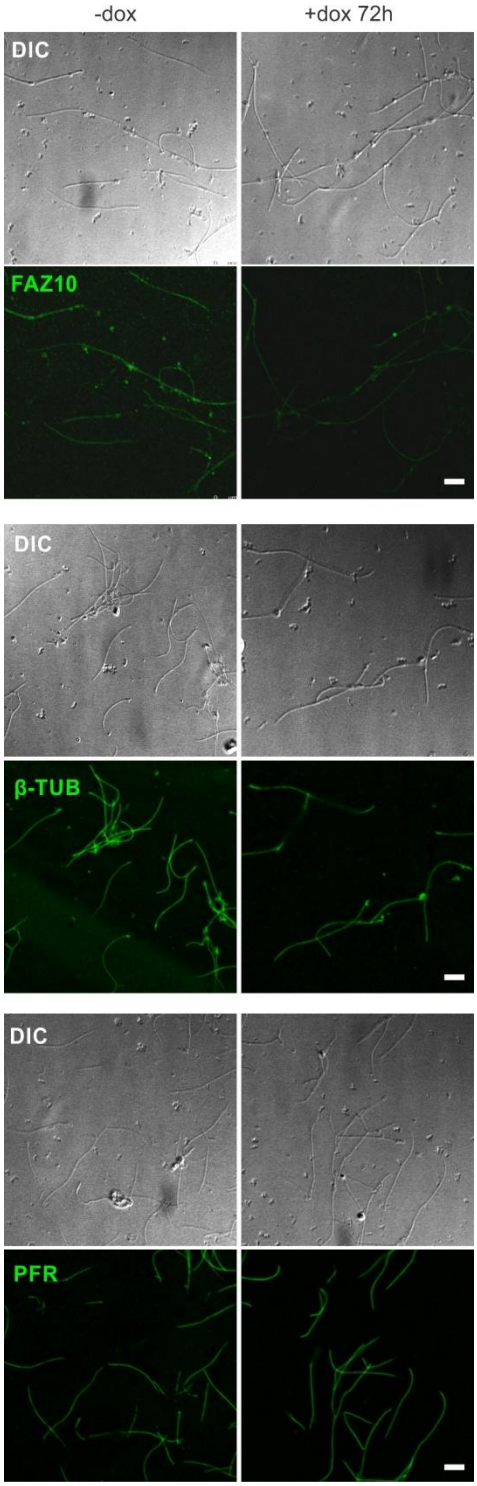


Figure S2

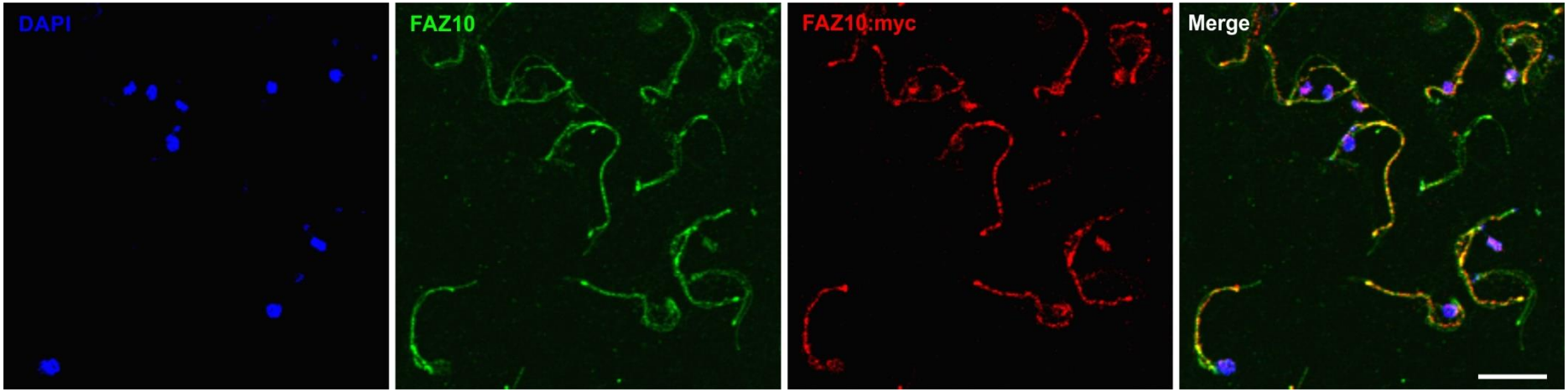


Figure S3

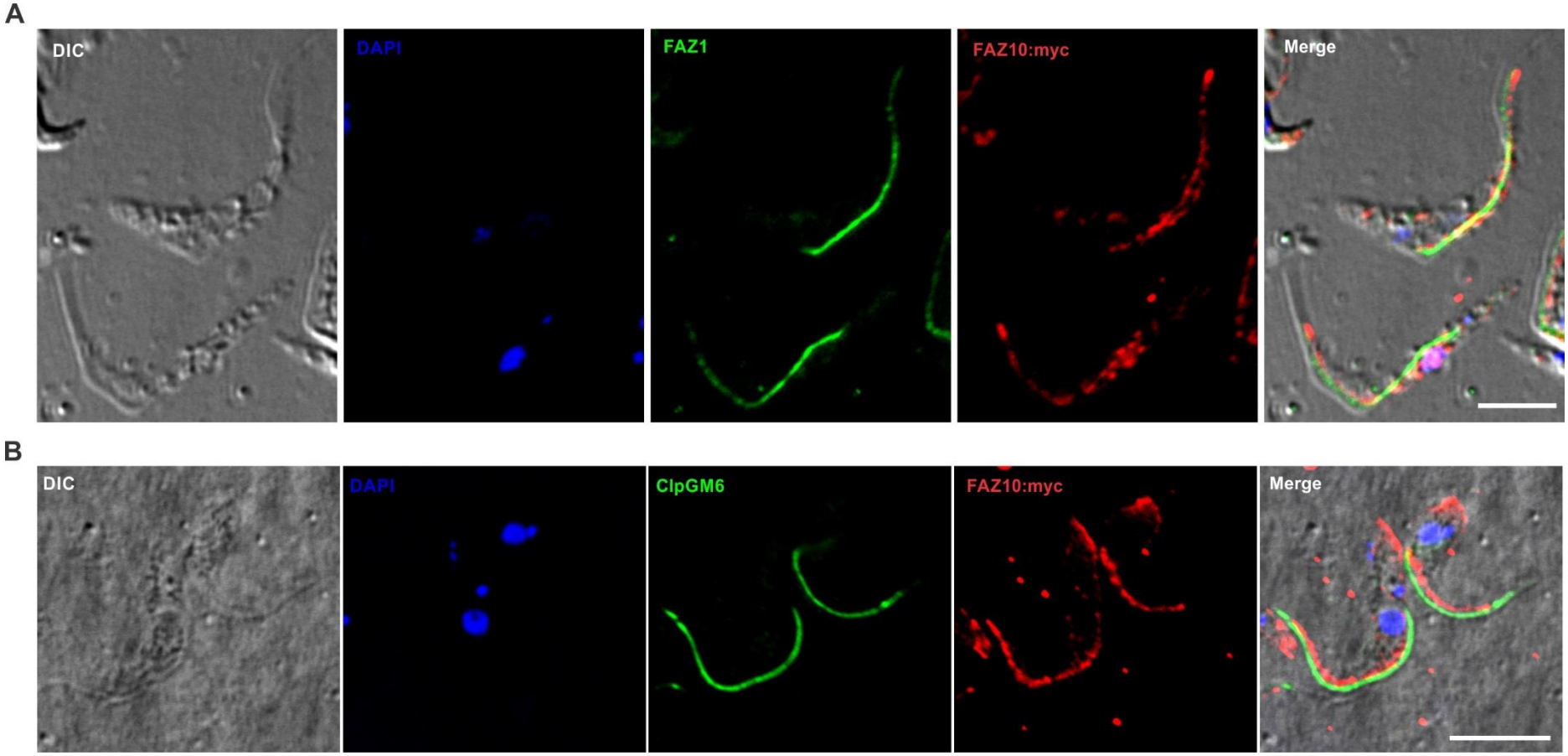
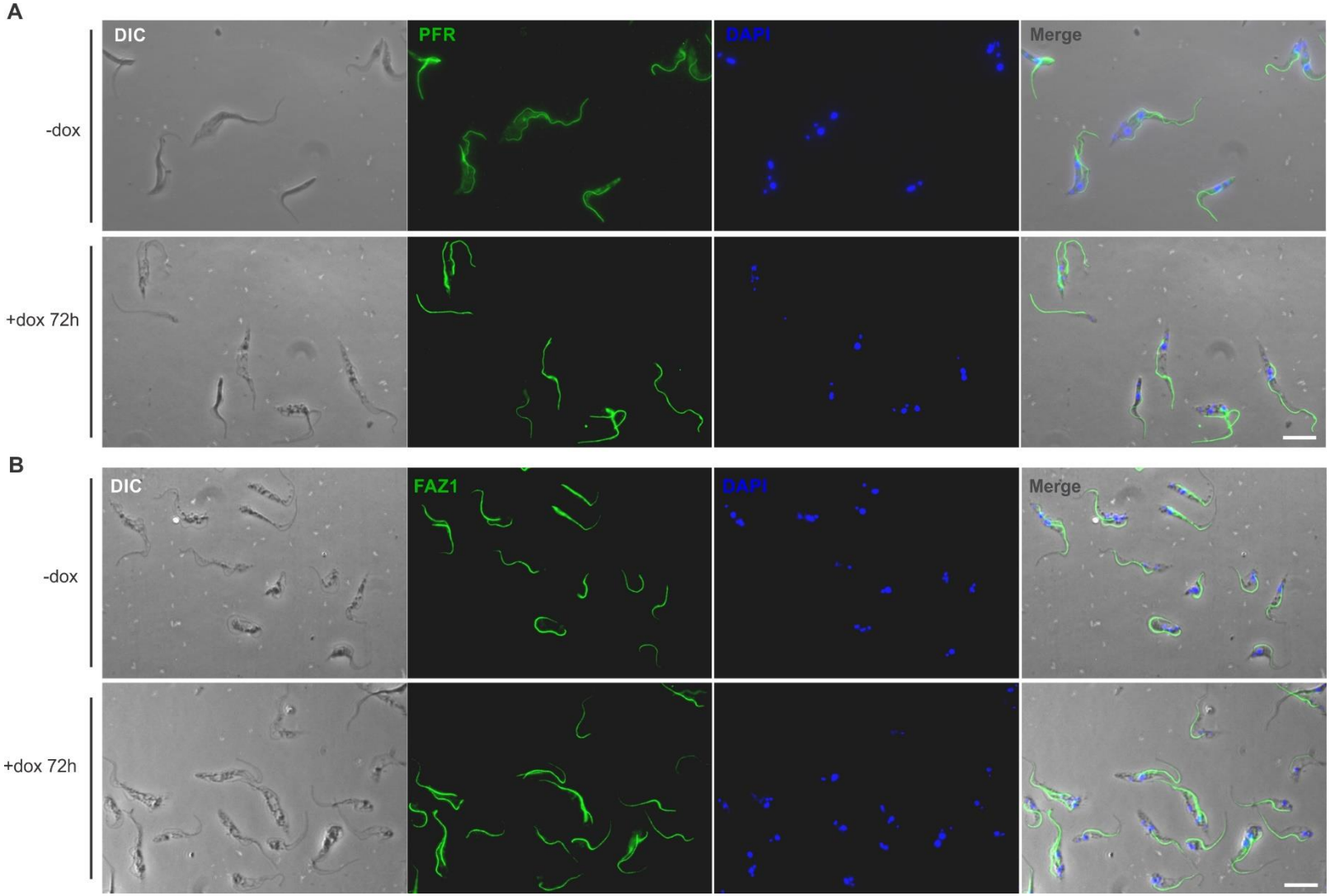

A
DIC
DAPI
FAZ1
FAZ10:myc
Merge
B
DIC
DAPI
ClpGM6
FAZ10:myc
Merge

Figure S4


A
DIC
PFR
DAPI
Merge
-dox
+dox 72h
B
DIC
FAZ1
DAPI
Merge
-dox
+dox 72h