UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILA MARIA DOS SANTOS BORALLI

Estudo do envolvimento da RNA helicase Sub2 na reação de *splicing* em
Trypanosoma brucei

São Carlos

2018

CAMILA MARIA DOS SANTOS BORALLI

Estudo do envolvimento da RNA helicase Sub2 na reação de *splicing* em
Trypanosoma brucei

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique
Thiemann

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2018

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.

Boralli, Camila Maria dos Santos

Estudo do envolvimento da RNA helicase Sub2 na reação de splicing em *Trypanosoma brucei* / Camila Maria dos Santos Boralli; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

126 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. Splicing. 3. Sub2. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

Aos meus pais, minhas irmãs e ao Guto, com amor e gratidão por todo apoio e compreensão ao longo da realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela confiança, orientação, ajuda e discussões que possibilitaram a realização desse trabalho.

Ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva pelos ensinamentos, discussões construtivas e apoio durante todo o período de desenvolvimento desse trabalho.

Ao Ivan, Ana Laura, Guilherme e Túlio pela amizade e discussões construtivas sobre *splicing*.

À Catherine pela ajuda em parte dos experimentos desse trabalho, e pela dedicação, parceria e amizade.

Aos membros e ex-membros do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann: Túlio, Ivan, Ana Laura, Nathália, Thomás, Renata, Jéssica Bonomo, Jéssica Fernandes, B2, Ana Letícia, Laure, Murilo e Andréa e demais pela amizade, discussões construtivas e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos professores, técnicos e alunos do Grupo de Biologia Molecular Estrutural e Cristalografia de Proteínas pelos ensinamentos e apoio nos experimentos.

Às Dras Julia Pinheiro Chagas da Cunha e Andrea Rodrigues Ávila por possibilitarem a realização de parte dos experimentos.

À Priscila por toda a parceria, dedicação, trabalho e discussões construtivas durante a realização de parte dos experimentos.

Ao Instituto de Física de São Carlos e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do projeto de pesquisa de mestrado.

Ao Grupo de Biologia Molecular Estrutural e Cristalografia de Proteínas pela oportunidade de realização desse trabalho.

À CAPES pela ajuda financeira.

Às funcionárias do serviço de Biblioteca e Informação do IFSC-USP por todo auxílio e prestatividade.

Aos meus amigos de graduação que ainda estão presentes no meu dia-a-dia, Marina, Guilherme e Nicolau, em nome de quem agradeço a todos os outros que fizeram parte dos meus quatro anos de Biomol. Obrigada pela amizade e por contribuírem para a vida ser mais feliz em São Carlos.

À Marina por todos esses anos de amizade.

Ao time feminino do Vôlei CAASO por toda amizade, parceria e por proporcionarem momentos de alegria e descontração dentro e fora das quadras, em nome de quem agradeço a todos dessa família.

Ao Guto por todo amor, companheirismo, apoio e confiança durante todos esses anos e por sempre me ajudar e me dar forças nos momentos mais difíceis.

À toda a minha família, em especial aos meus pais Sabrina e Lucilo e às minhas irmãs Ana Carolina e Maria Fernanda, pelo amor, carinho e força em todos os momentos. Obrigada por tudo que fazem por mim.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

RESUMO

BORALLI, C. M. d. S. **Estudo do envolvimento da RNA helicase Sub2 na reação de *splicing* em *Trypanosoma brucei***. 2018. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A excisão de sequências intrônicas dos precursores de mRNAs é um passo crítico durante a expressão gênica eucariótica. Essa reação é catalisada pelo complexo macromolecular denominado spliceossomo, composto por partículas ribonucleoproteicas nucleares (U1, U2, U4/U6, U5 snRNPs), além de inúmeros fatores associados. Em tripanossomatídeos, os genes são transcritos em longas unidades policistrônicas e a reação de SL *trans-splicing* é requerida para geração de transcritos monocistrônicos maduros. O spliceossomo é uma maquinaria altamente dinâmica e parte das mudanças conformacionais ocorridas neste complexo é mediada por RNA helicases. A RNA helicase/ATPásica Sub2 (em mamífero, UAP56), cujas homólogas foram descritas como membros do complexo TREX (transcrição/exportação do RNA), é essencial na montagem do pré-spliceossomo, além de estudos sugerirem sua participação em outras etapas de montagem desse complexo. Em tripanossomatídeos, a função desta proteína no transporte de mRNA entre núcleo e citoplasma já foi descrita, entretanto, seu envolvimento na reação de *splicing* permanece indefinido. Neste trabalho, buscou-se estudar esse envolvimento através de técnicas de purificação em *tandem* e RNA de interferência. A purificação dos parceiros de interação da proteína somada à identificação por espectrometria de massas mostrou que TbSub2 co-purifica com proteínas envolvidas em múltiplas vias do metabolismo do parasito, incluindo proteínas e fatores relacionados ao processamento de mRNA. Além disso, essa proteína é essencial para os parasitos na forma procíclica e sanguínea e apresenta localização nuclear em ambas as linhagens. Análises por qPCR em tempo real e RT-PCR mostraram que o silenciamento de TbSub2 causa defeito na maquinaria de SL *trans-splicing* mas seu efeito no *cis-splicing* não é claro. Por fim, foi possível realizar a expressão heteróloga e purificação da proteína TbSub2 recombinante, bem como estudos para avaliar seu estado oligomérico e estabilidade. Dessa forma, foi constatado que essa proteína é estável em diferentes tampões e apresenta estados oligoméricos distintos nas técnicas empregadas nesse trabalho. O estudo aqui apresentado trouxe evidências da participação da proteína TbSub2 na reação de SL *trans-splicing* em ambas as linhagens, bem como em múltiplas vias do metabolismo do parasito na forma procíclica, contribuindo para uma elucidação das funções dessa proteína em tripanossomatídeos.

Palavras-chave: *Trypanosoma brucei*. *Splicing*. Sub2.

ABSTRACT

BORALLI, C. M. d. S. **Study of the involvement of RNA helicase Sub2 in the splicing reaction in *Trypanosoma brucei***. 2018. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The excision of intronic sequences from precursor mRNAs is a critical step during eukaryotic gene expression. This reaction is catalyzed by the macromolecular complex called spliceosome, composed of nuclear ribonucleoprotein particles (U1, U2, U4 / U6, U5 snRNPs), besides numerous associated factors. In trypanosomatids, genes are transcribed in long polycistronic units and the SL trans-splicing reaction is required for the generation of mature monocistronic transcripts. The spliceosome is a highly dynamic machinery and part of this complex's conformational changes is regulated by RNA helicases. The RNA helicase / ATPase Sub2 UAP56, in mammalian), whose homologous proteins have been described as members of the TREX complex (transcription / RNA export), is essential in the pre-spliceosome assembly, besides its participation in other assembly steps of this complex, as suggested by other studies. In trypanosomatids, the role of this protein in the nucleus/cytoplasm mRNA transport has already been described, however its involvement in the splicing reaction remains unknown. In this work, we studied this involvement through tandem affinity purification and RNA interference. The purification of this protein's binding partners added to the identification by mass spectrometry showed that TbSub2 co-purifies with proteins involved in multiple metabolism pathways of the parasite, including proteins and factors related to mRNA processing. In addition, this protein is essential for the parasites in procyclic and bloodstream forms and localizes in the nucleus in both strains. qPCR and RT-PCR analysis showed that the silencing of TbSub2 causes defect in the SL trans-splicing machinery but its effect on cis-splicing is unclear. Finally, it was possible to perform the heterologous expression and purification of recombinant TbSub2 protein, as well as studies to evaluate its oligomeric state and stability. Thus, it was found that this protein is stable in different buffers and presents different oligomeric states in the techniques employed in this work. This study has provided evidence of this helicase's participation in the SL trans-splicing reaction in both strains, as well as in several metabolism pathways of the parasite in procyclic form, contributing to the elucidation of the protein functions in trypanosomatids.

Keywords: *Trypanosoma brucei*. Splicing. Sub2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição geográfica da doença do sono em 2016. Painel A – *T. brucei gambiense*. Painel B – *T. brucei rhodesiense*..... 30
- Figura 2 - Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. 1- O inseto vetor injeta a forma tripomastigota metacíclica do *T. brucei* no hospedeiro. 2-4- *T. brucei* se transforma em tripomastigota sanguíneo, é transportados para outros locais por todo o corpo e continua a replicação por fissão binária. 5- O inseto vetor se infecta com formas tripomastigotas sanguíneos. 6- No intestino da mosca, os parasitos se transformam em tripomastigotas procíclicos, multiplicam-se por fissão binária. 7- Saindo do intestino, transformam-se em epimastigotas e atingem as glândulas salivares (8), onde se reproduzem por fissão binária..... 31
- Figura 3 - Variação da posição do cinetoplasto nas diferentes formas do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. 1-cinetoplasto. 2- núcleo. 3- flagelo..... 32
- Figura 4 - Representação esquemática do genoma nuclear de *T. brucei*. Barras coloridas indicam a posição e o tamanho de cada elemento genético de cada cromossomo de *T. brucei*. Barras acima da linha preta que representa um cromossomo (C1-C11) correspondem à transcrição no sentido contrário. 33
- Figura 5 - Esquema do processamento de pré-mRNA em tripanosomatídeos. 35
- Figura 6 - Reações de A) *cis-splicing* e B) *SL trans-splicing*. As duas transesterificações são mostradas em ambos os casos, juntamente com os sinais de *splicing*. 36
- Figura 7 - a) Esquema de U1 snRNP de mamíferos. m3G: cap trimetilgranosina. B, D1, D2, D3, E, F, G: proteínas Sm. - b) A- Modelo do núcleo Sm. B- Variação do núcleo Sm de U2 snRNP de *T. brucei*. C- Variação do núcleo Sm de U4 snRNP de *T. brucei*. 38
- Figura 8 - Modelo de *cis-splicing* de pré-mRNA catalizado pelo spliceossomo. 40
- Figura 9 - Modelo de dois metais para o núcleo catalítico de RNA do spliceossomo. Para o *branching*, R1 representa a hidroxila da adenosina do BP; R2, o intron; e R3, o oxigênio pró-Sp. Para o *exon ligation*, R1 representa o grupo de saída oxigênio 3'; R2, o oxigênio pró-Sp; e R3, o exon 3'. Os oxigênios reativos foram coloridos de vermelho, o fosfato pré-mRNA é mostrado em um estado de transição, e interações entre ligantes específicos e os oxigênios reativos mediados por M1 e M2 são mostrados como linhas tracejadas. 41
- Figura 10 - Representação dos sinais de *splicing* no pré-mRNA em humanos e leveduras e *T. brucei*..... 41

Figura 11 - Comparação de fatores spliceossomais conhecidos de tripanossomas e humanos. As proteínas grifadas apresentam homólogos em <i>T. brucei</i> e as destacadas em vermelho são únicas deste organismo.	42
Figura 12 - Representação em <i>ribbon</i> do núcleo da helicase canônica Aquarius (PDB 4PJ3) com motivos conservados dos domínios RecA1 (I, Ia-c, II, III e Q) e RecA2 (IIIa, IV, V, Va-b e VI).....	43
Figura 13 - Organização de domínio de helicases spliceossomais, agrupadas de acordo com sua subfamília.	44
Figura 14 - Representação esquemática da via do spliceossomo e a função das RNA helicases DExD / H-box envolvidas.	47
Figura 15 - Modelos para vias de <i>splicing</i> dependentes e independentes de Sub2-Mud2. Complexos spliceossomais formados durante estágios iniciais dependentes e independentes de ATP estão esquematizados. CC1, complex concomitante 1; CC2, complex concomitante 2; PS, pré-spliceosome; B circulado, BBP; M circulado, Mud2.	49
Figura 16 - Esquema de exportação de mRNA dependente do complexo EJC, em humano. O EJC e o cap do mRNA maduro são responsáveis por recrutar o TREX (THO, Aly/REF/Yra1 e UAP56/Sub2), que, por sua vez, recruta o receptor de exportação TAP/p15.	50
Figura 17 - A) Estrutura do domínio N-terminal de UAP56. A proteína do terminal N ao terminal C é colorida de azul a vermelho continuamente (PDB: 1T6N). B) Estrutura do domínio C-terminal da UAP56. A proteína do terminal N ao terminal C é colorida de azul a vermelho continuamente. A linha tracejada preta representa a região desordenada no terminal C (PDB: 1T5I).	51
Figura 18 – Esquema comparando motivos de TcSub2 com o consenso geral DEAD-box e a disposição de aminoácidos da hUAP56.	51
Figura 19 - Vetor de Recombinação Homóloga pC-PTP-Neo	55
Figura 20 - Esquema da purificação do PTP-tag, mostrando por etapas. A) Extrato protéico. B) Ligação à Ig sepharose. C) Clivagem com TEV protease seguida de ligação à Anti-ProtC. D) Eluição com tampão EGTA/EDTA	61
Figura 21 - Representação esquemática das reações de digestão utilizadas na construção do RNAi usando pLEW100.....	64
Figura 22 - Representação esquemática da geração das construções para realização da técnica de RNAi usando o vetor pLEW100.	65

- Figura 23 - Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e SL *trans-splicing*. CS1 e CS2 ligam-se ao éxon do transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pré-PAP) e processado (PAP); TS1 e TS2 anelam-se no éxon e íntron, ainda não processados do transcrito de α -tubulina (Pré- α -tub). Para avaliação do processamento do de α -tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). E, éxon; I, íntron. 68
- Figura 24 - Esquema mostrando uma parte da sequência do vetor de expressão pETTrx-1a/LIC, onde tem-se o gene de eGFP e os sítios de restrição para digestão pela enzima *BsaI*, e o produto da digestão com essa enzima..... 70
- Figura 25 - Esquema mostrando o produto da reação de tratamento do vetor com a enzima T4 DNA polimerase na presença de dTTP..... 71
- Figura 26 - Esquema mostrando o produto da reação de tratamento do inserto com a enzima T4 DNA polimerase na presença de dATP. 72
- Figura 27 - Representação da curva de desenovelamento de uma proteína em um experimento de DSF 75
- Figura 28 - Esquema representativo das técnicas de (A) *hanging drop* e (B) *sitting drop*. .. 76
- Figura 29 - Paineis A e B - Mapa do vetor pC-PTP-Neo. Em azul, PTP-tag. Em verde, tem-se o marcador de resistência a neomicina. E a sequência da proteína (construções de interesse) são substituídas no Gene U1-70k. Painel B - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SybrSafe da confirmação, por PCR de colônia, da clonagem do fragmento gênico de interesse nos vetores pC-PTP-Neo. A seta indica os fragmentos gênicos esperados em três colônias testadas. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*. 77
- Figura 30 - *Western Blot* de confirmação da expressão da proteína de interesse fusionadas a cauda do PTP-tag. Sub2-PTP, extrato total revelado com o anticorpo anti-Proteína A (diluição 1:2.000). A banda em torno de 70 kDa demonstra correta expressão de cauda de PTP-tag fusionada a proteína Sub2. 427, *T. brucei* cepa 427 (não transfectada) como controle negativo. 78
- Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com Sybr Safe do produto de PCR da construção de TbSub2 amplificada a partir do DNA genômico extraído das culturas transfectadas de *T. brucei*, para confirmação de inserção correta do vetor pC-PTP-Neo no DNA genômico. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*..... 79

- Figura 32 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (12%) contendo as amostras da purificação de Sub2-PTP corado com Sypro Ruby (Invitrogen). Canaletal, Input, extrato total inicial; 2, FT-IgG: proteínas que não interagem com a resina IgG sepharose; 3, TEV eluato, proteínas eluídas após clivagem com TEV protease; 4, FT-protC, proteínas que não interagem com a resina anti-proteína C; 5, EDTA/EGTA Eluato, proteínas co-eluídas com as proteínas de interesse. As linhas brancas horizontais indicam as frações separadas para identificação por espectrometria de massas. O marcador de massa molecular está representado em kDa. 80
- Figura 33 - Gráfico de pizza do número de proteínas de cada via metabólica do parasito que foram co-eluídas com TbSub2 e identificadas por espectrometria de massas. 81
- Figura 34 - Painei A - Eletroforese em gel SDS-PAGE (10%) corado com Sypro Ruby (Invitrogen) contendo alíquotas da separação dos sub complexos de TbSub2-PTP por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Os valores de massa acima indicam os intervalos de massas moleculares dos sub complexos encontrados em cada fração do gradiente e os valores ao lado indicam às massas estimadas de cada componente da fração. A linha azul indica a intersecção dos dois géis que foram unidos na imagem. O marcador de massa molecular está representado em kDa..... 85
- Figura 35 - Imunolocalização (IFI) da proteína TbSub2 em formas procíclicas de *T. brucei*, utilizando anticorpo anticorpo Anti-ProtA para a proteína e DAPI para o núcleo. Os círculos brancos destacam comportamento de TbSub2 semelhante ao fuso mitótico. 87
- Figura 36 - Imunolocalização (IFI) da proteína TbSub2 em formas sanguíneas de *T. brucei*, utilizando anticorpo anticorpo Anti-TbSub2 para a proteína e DAPI para o núcleo..... 88
- Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SyberSafe das etapas de clonagem do sistema pLEW100. Painei A: Confirmação, por PCR de colônia, da clonagem do fragmento gênico de interesse nos vetores pJM325 e pLEW100. A seta, nos tamanhos de aproximadamente 500 pb, indica os fragmentos gênicos esperados. Painei B: Produtos de digestão com as enzimas *HindIII* e *XbaI* dos vetores, 1, pJM325; e 2, pLEW100. Painei C: Confirmação por PCR de colônia da clonagem final do sistema pLEW100. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*. ... 89
- Figura 38 - Curvas de crescimento de *T. brucei* de culturas de Sub2 RNAi positivo durante 3 dias de indução. Induzido, tet+; não induzido, tet-. Painei A – linhagem procíclica 2913. Painei B – linhagem sanguínea 9013. 90
- Figura 39 - Análises por PCR em tempo real (qPCR) de células não tratadas (sem adição de tetraciclina, Sub2 NInd) e tratadas (com adição de tetraciclina, Sub2 Ind)

por 24 horas. Utilizou-se o gene de referência TERT. Painel A - linhagem procíclica 2913. Painel B – linhagem sanguínea 9013. O eixo vertical correspondem aos valores de Q/Q_{ref}91

Figura 40 - Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos de α -tubulina não processado (Pre- α -tub), transcrito de α -tubulina processado (α -tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP), transcrito de Poli A Polimerase processado e 7SL. a) eletroforese em gel de agarose dos produtos das RT-PCRs semi-quantitativas realizadas com culturas da forma procíclica com 0 (NI), 24, 36 e 48 horas de indução com tetraciclina. b) Gráficos derivados do experimento de RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos em linhagens da forma procíclica com 0 (NI), 24, 36 e 48 horas de indução com tetraciclina. Painel A – transcrito de α -tubulina não processado (Pre- α -tub). Painel B - transcrito de α -tubulina processado (α -tub). Painel C - transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP). Painel D - transcrito de Poli A Polimerase processado (PAP).93

Figura 41 - Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos de α -tubulina não processado (Pre- α -tub), transcrito de α -tubulina processado (α -tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP), transcrito de Poli A Polimerase processado e 7SL. a) eletroforese em gel de agarose dos produtos das RT-PCRs semi-quantitativas realizadas com culturas da forma procíclica com 0 (NI) e 24 horas de indução com tetraciclina. b) Gráficos derivados do experimento de RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos em linhagens da forma procíclica com 0 (NI) e 24 horas de indução com tetraciclina. Painel A – transcrito de α -tubulina não processado (Pre- α -tub). Painel B - transcrito de α -tubulina processado (α -tub). Painel C - transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP). Painel D - transcrito de Poli A Polimerase processado (PAP).94

Figura 42 - Gráfico dos níveis de SL-RNA obtidos por qPCR presente em culturas da forma sanguínea induzidas com tetraciclina por diferentes períodos em comparação à cultura não induzida, bem como da cultura tratada com sinefungina (controle positivo).96

Figura 43 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SyberSafe da confirmação, por PCR de colônia, da clonagem de TbSub2 no sistema pET-Trx-1a/LIC. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*.97

Figura 44 - Ensaios de expressão de Sub2. Painel A: Eletroforese em gel 12% SDS-PAGE, corado com Coomassie Blue Brilhante R-250, referente ao teste de expressão realizado a 18°C, 0,5 mM de IPTG, em meio de cultivo *Lysogeny broth* (LB). Em 1, 0 hora de indução; 2, 2 horas; 3, 4 horas; 4, 16 horas; 5, em meio de cultivo autoindutor. A seta indica a banda densa referente a TbSub2 superexpressa. Painel B: Eletroforese em gel SDS-PAGE, corado com Coomassie Blue Brilhante R-250, referente ao teste de

solubilidade em diferentes tampões. P, fração insolúvel; S, fração solúvel. A seta indica a proteína Sub2 nas diferentes canaletas. O padrão de massa molecular refere-se a kDa..... 98

Figura 45 - Purificação por Cromatografia de Afinidade em resina *TALON® Metal Affinity* (Clontech) de TbSub2. Painei A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brilhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Afinidade em resina *TALON® Metal Affinity* (Clontech) de TbSub2. Canaleta 1, Fração solúvel obtida após clarificação do extrato proteico; canaleta 2, Proteínas que não interagem com a coluna contendo resina; canaleta 3, fração referente a lavagem com tampão A; canaleta 4, fração referente ao primeiro pico obtido ainda na etapa de lavagem; canaletas 5 - 10, frações referentes a eluição com 15% de tampão B; canaletas 11-14, frações referentes a eluição com 25% de tampão B. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Painei B: Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação de TbSub2 recombinante. Pico 1, proteínas que não aderiram à coluna; pico 2, fração eluída ainda na etapa de lavagem; pico3; fração eluída com 15% de tampão B; pico 4, fração eluída com 25% de tampão B. A linha azul corresponde a concentração de tampão B em cada etapa. 99

Figura 46 - Purificação por Cromatografia de Afinidade em resina HisTrap™ High Performance (*GE Healthcare*) de TbSub2. Painei A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brilhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Afinidade em resina HisTrap™ High Performance (*GE Healthcare*) de TbSub2. Canaleta 1, proteína antes da clivagem com TEV protease; canaleta 2, proteína após a clivagem com TEV protease; canaleta 3 e 4, frações referentes às proteínas que não aderem à resina (pico1 do cromatograma); canaleta 5, fração referente a lavagem com tampão A2; canaletas 6 e 7, frações referentes a eluição com 100% de tampão B. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Painei B: Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação de TbSub2 recombinante. Pico 1, proteínas que não aderiram à coluna; pico 2, fração eluída com 25% de tampão B. A linha azul corresponde a concentração de tampão B em cada etapa. 100

Figura 47 - Purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) de Sub2. Painei A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brilhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Exclusão Molecular de Sub2. Canaleta 1, amostra aplicada na coluna; canaleta 2 e 3, frações eluídas correspondentes ao pico 1 da SEC; canaletas 4-9, frações eluídas correspondentes ao pico 2 da SEC; canaleta 10 e 11, frações eluídas correspondentes ao pico 3 da SEC. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Painei B: Perfil cromatográfico da purificação de Sub2

	recombinante O segundo pico representado, cuja eluição ocorreu em torno de 84,4 mL de amostra aplicada, correspondem à eluição da proteína de interesse.....	101
Figura 48 -	Distribuição de tamanho pela massa da proteína TbSub2 recombinantes em solução.	102
Figura 49 -	Eletroforese em <i>PhastGel® Gradient Pre-cast Gels</i> 10-15% (GE healthcare), corado com <i>Coomassie Blue Brilhante</i> R-250, mostrando que o estado oligomérico predominando de TbSub2 em experimentos de gel nativo é de tetrameros. O padrão de massa molecular refere-se a kDa.	103
Figura 50 -	Gráfico de DSF de ΔT_m para as soluções do kit <i>Solubility & Stability Screen 2</i> – (<i>Hampton Research</i>). A ΔT_m foi calculada subtraindo a T_m da proteína obtida em cada solução do kit e a T_m da mesma em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reação de PCR para amplificação inicial dos fragmentos de interesse	56
Tabela 2 -	Condições utilizadas nas reações de PCR	56
Tabela 3 -	Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.....	68
Tabela 4 -	Proteínas relacionadas à processamento mRNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas. Proteínas relacionadas à poliadenilação estão coloridas de azul, ao capeamento 3' em verde e ao <i>splicing</i> em vermelho.	82
Tabela 5 -	Informações referentes à proteína Sub2/UAP56 de <i>T. brucei</i> , fornecidas pela ferramenta ProtParam (<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>).....	97
Tabela 6-	Proteínas relacionadas à processamento de rRNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas	121
Tabela 7 -	Proteínas relacionadas à transcrição co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas.....	122
Tabela 8 -	Proteínas relacionadas à exportação núcleo/citoplasma co-eluídas com TbSub- PTP e identificadas por espectrometria de massas	123
Tabela 9 -	Proteínas ligadoras de RNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas.....	124
Tabela 10 -	Proteínas hipotéticas co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas.....	125
Tabela 11 -	Proteínas relacionadas à microtúbulos co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	do inglês, <i>bovine serum albumins</i>
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control</i>
DLS	do inglês, <i>dynamic light scattering</i>
DSF	do inglês, <i>differential scanning fluorimetry</i>
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	ditiotreitól
EDTA	do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EM	do inglês, <i>eletroporation medium</i>
GFP	do inglês, <i>green fluorescent protein</i>
IFI	imunofluorescência indireta
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	do inglês, <i>Lysogeny broth</i>
LIC	do inglês, <i>Ligation Independent Cloning</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	do inglês, <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	do inglês, <i>phenylmethane sulfonyl fluoride</i>
PTP	Proteína A - TEV - Proteína C
qPCR	do inglês, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNAi	RNA de interferência

RNP	do inglês, <i>ribonucleoprotein</i>
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	do inglês, <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SDS	do inglês, Sodium dodecyl sulfate
SEC	do inglês, <i>size exclusion chromatography</i>
si	do inglês, <i>short interfering</i>
SL	do inglês, <i>spliced leader</i>
sn	do inglês, <i>small nuclear</i>
sno	do inglês, <i>small nucleolar</i>
SS	do inglês, <i>splice site</i>
T _m	temperatura de <i>melting</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	29
1.2	O <i>Trypanosoma brucei</i> e seu ciclo de vida.....	30
1.3	Características moleculares do <i>Trypanosoma brucei</i>	32
1.4	Processamento de mRNA.....	34
1.5	<i>Cis</i> e <i>SL trans-splicing</i>	36
1.6	Splicessomo: composição e características	37
1.7	Catalise do <i>splicing</i>	39
1.8	Particularidades do <i>SL trans-splicing</i>	41
1.9	Helicases na reação de <i>splicing</i>	43
1.10	Sub2/UAP56.....	48
2	OBJETIVOS.....	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	Cultivo de <i>Trypanosoma brucei</i>	55
3.2	Identificação dos parceiros de interação da proteína.....	55
3.2.1	Clonagem molecular.....	55
3.2.2	Transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo.....	57
3.2.3	Confirmação da transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo	57
3.2.4	Preparação dos extratos de <i>Trypanosoma brucei</i>	59
3.2.5	Purificação em <i>tandem</i> da proteína TbSub2 e seus parceiros de interação	59
3.2.6	Espectrometria de massas.....	61
3.2.7	Ultracentrifugação	62
3.2.8	Imunolocalização da proteína TbSub2 por Imunofluorescência indireta (IFI)	62
3.3	Análise do efeito do <i>knockdown</i> da proteína nas reações de <i>cis</i> e <i>SL trans-splicing</i>	63
3.3.1	Clonagem Molecular	63

3.3.2	Transfecção da construção TbSub2 no sistema pLEW100 nas formas procíclica e sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i>	66
3.3.3	Curvas de crescimento das culturas após silenciamento de TbSub2	67
3.3.4	qPCR para confirmação das taxas de transcrito do gene de TbSub2 após o silenciamento.....	67
3.3.5	RT-PCRs para análise de <i>splicing</i>	67
3.3.6	qPCR para analisar acúmulo de SL exon.....	69
3.4	Identificação do estado oligomérico da proteína recombinante.....	70
3.4.1	Clonagem molecular	70
3.4.2	Expressão heteróloga de TbSub2 em <i>E. coli</i>	72
3.4.3	Purificação da proteína TbSub2 recombinante	73
3.4.4	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	74
3.4.5	Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)	74
3.4.6	Eletroforese em gel nativo para análise do estado oligomérico.....	75
3.4.7	Ensaio de cristalização	76
4	RESULTADOS.....	77
4.1	Identificação dos parceiros de interação da proteína	77
4.1.1	Clonagem molecular	77
4.1.2	Confirmação da transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo.....	78
4.1.3	Purificação em <i>tandem</i> da proteína TbSub2	79
4.1.4	TbSub2 co-elui com proteínas de múltiplas vias do metabolismo de <i>T. brucei</i>	80
4.1.5	Ultracentrifugação em gradiente de sacarose para separação dos possíveis complexos estáveis de TbSub2.....	85
4.1.6	Imunolocalização da proteína TbSub2 por Imunofluorescência indireta (IFI).....	86
4.2	Análise do efeito do <i>knockdown</i> da proteína nas reações de <i>cis</i> e SL <i>trans-splicing</i>	88
4.2.1	Clonagem Molecular.....	88
4.2.3	O silenciamento de TbSub2 causa defeito de crescimento em culturas das formas procíclica e sanguínea	89

4.2.4	A indução do sistema RNAi causa diminuição dos níveis de mRNA de TbSub2	90
4.2.5	O silenciamento de TbSub2 interfere nas reações de <i>cis</i> e SL <i>trans-splicing</i>	91
4.2.6	O silenciamento de TbSub2 causa acúmulo de SL exon.....	94
4.3	Identificação do estado oligomérico da proteína recombinante	96
4.3.1	Clonagem molecular.....	96
4.4.2	Expressão heteróloga de TbSub2 em <i>E. coli</i>	97
4.4.3	Purificação da proteína TbSub2 recombinante.....	98
4.4.4	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	101
4.4.5	Eletroforese em gel nativo para análise do estado oligomérico	102
4.4.6	Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)	103
4.4.7	Ensaio de cristalização	104
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	109
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE A	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Apesar dos avanços científicos na área da saúde que vêm ocorrendo ao redor do mundo, as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) ainda atingem parte significativa da população e têm um alto impacto, especialmente nas regiões da África, Ásia e Américas, onde são endêmicas. Existem 17 DTN priorizadas pela OMS e as mesmas são causadas por uma variedade de agentes patogênicos, que incluem alguns vírus, bactérias, helmintos e protozoários. Essas doenças atingem cerca de um bilhão de pessoas em 149 países, sobretudo na região tropical do globo terrestre, onde se concentram nas regiões mais pobres dos países em desenvolvimento, e são transmitidas pela água, solo ou sangue contaminados ou por insetos vetores.¹

Dentre essas doenças, três delas são causadas por protozoários da família Trypanosomatidae: doença de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase humana africana (doença do sono), causadas, respectivamente, por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp e *Trypanosoma brucei*, que juntas acometem mais de 20 milhões de pessoas e cujo melhor método de prevenção se dá pelo controle do inseto vetor.¹

A doença do sono ameaça milhões de pessoas em 36 países da África Subsaariana e a figura 1 traz a distribuição geográfica da doença causada pelas subespécies *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*. Muitas das populações afetadas vivem em áreas rurais remotas com acesso limitado a serviços de saúde adequados, o que dificulta a vigilância e, portanto, o diagnóstico e o tratamento dos casos. A doença é transmitida por vetores invertebrados infectando o hospedeiro mamífero através da picada do inseto do gênero *Glossina* spp popularmente conhecido como tsé-tsé. Sem diagnóstico e tratamento imediatos, a doença geralmente é fatal, pois os parasitos se multiplicam no corpo, atravessam a barreira hematoencefálica e invadem o sistema nervoso central, causando sintomas como alterações de comportamento, confusão, distúrbios sensoriais, falta de coordenação e perturbação do ciclo do sono. Esforços contínuos para o controle da doença possibilitaram que em 2015, o número de novos casos relatados diminuísse para 2804, o nível mais baixo em 76 anos, e dados da Organização Mundial da Saúde apontam que o número de casos totais seja em torno de 20.000.¹

Figura 1 - Distribuição geográfica da doença do sono em 2016. Painei A – *T. brucei gambiense*. Painei B – *T. brucei rhodesiense*.
Fonte: WHO.¹

O *T. brucei* foi utilizado neste trabalho, assim como em tantos outros, como modelo de estudo de mecanismos moleculares presentes em espécies pertencentes à mesma família. O sequenciamento completo do genoma e a existência de técnicas bem estabelecidas para o estudo dos processos moleculares do *T. brucei* o tornam um alvo para os estudos recentes a cerca dos membros da família Trypanosomatidae.²

1.2 O *Trypanosoma brucei* e seu ciclo de vida

O *T. brucei*, assim como todos os membros da família Tripanosomatidae, é um protozoário que possui um flagelo e um núcleo. Membros dessa família apresentam uma variedade de formas morfológicas durante seu ciclo de vida, que se distinguem, em geral, pela

posição, comprimento e fixação do flagelo, como destacado na figura 3. Além disso, possuem um cinetoplasto, uma organela citoplasmática estrutural presente nos protozoários da ordem Kinetoplastida que encontra-se na base do flagelo fornecendo energia para a movimentação do mesmo, função semelhante a de uma mitocôndria.³

O ciclo de vida desse parasito tem início com a picada do inseto vetor, tsé-tsé (gênero *Glossina*), no hospedeiro mamífero, injetando parasitos na forma de tripomastigotas metacíclicos na circulação. Assim, os mesmos entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea. Dentro do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas sanguíneos, são transportados para outros locais por todo o corpo e continuam a replicação por fissão binária. Então, o inseto vetor se infecta com tripomastigotas sanguíneos quando realiza novo repasto sanguíneo em hospedeiro mamífero infectado. No intestino da mosca, os parasitos se transformam em tripomastigotas procíclicos e multiplicam-se por fissão binária e assim que saem do intestino, transformam-se em epimastigotas, que atingem as glândulas salivares da mosca e se tornam tripomastigotas metacíclicos, dando início a um novo ciclo. O ciclo na mosca leva, aproximadamente, três semanas (Figura 2).⁴

Figura 2 - Esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. 1- O inseto vetor injeta a forma tripomastigota metacíclica do *T. brucei* no hospedeiro. 2-4- *T. brucei* se transforma em tripomastigota sanguíneo, é transportado para outros locais por todo o corpo e continua a replicação por fissão binária. 5- O inseto vetor se infecta com formas tripomastigotas sanguíneos. 6- No intestino da mosca, os parasitos se transformam em tripomastigotas procíclicos, multiplicam-se por fissão binária. 7- Saindo do intestino, transformam-se em epimastigotas e atingem as glândulas salivares (8), onde se reproduzem por fissão binária.

Fonte: Adaptada de CDC.⁴

Nota-se que o parasito tem um ciclo de vida complexo, no qual adapta-se à corrente sanguínea dos mamíferos e a diferentes compartimentos dentro da mosca, assim, a organização da estrutura celular é fundamental para essa adaptação no decorrer do seu ciclo

de vida. A diferença morfológica mais óbvia entre os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito é a posição do cinetoplasto. Na forma sanguínea, o mesmo se encontra perto da extremidade posterior da célula, e cada cinetoplasto filho permanece na mesma região ao longo do ciclo celular, até a citocinese. Por outro lado, em formas procíclicas, o cinetoplasto se localiza entre o núcleo da célula e a porção posterior. Por fim, em formas epimastigotas (glândula salivar da mosca), o cinetoplasto é anterior ao núcleo central. Especula-se que essas mudanças podem estar relacionadas à função do flagelo, como por exemplo, aumentando a motilidade nas formas sanguíneas ou a fixação do substrato na forma epimastigota (Figura 3).³

Figura 3 - Variação da posição do cinetoplasto nas diferentes formas do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. 1- cinetoplasto. 2- núcleo. 3- flagelo.

Fonte: MATHEWS et al.³

Assim, o quadro geral que emerge é de uma célula altamente organizada, na qual as regras estabelecidas para divisão celular e morfogênese em organismos como leveduras e células de mamíferos não necessariamente se aplicam. Portanto, compreender a biologia celular do desenvolvimento do *T. brucei* pode fornecer informações sobre os aspectos conservados e diferentes da organização da célula eucariótica. Dessa forma, o *T. brucei* fornece um excelente sistema para o estudo de muitos aspectos de biologia celular, incluindo estrutura e morfologia, posicionamento de organelas, divisão celular e tráfico de proteínas.³

1.3 Características moleculares do *Trypanosoma brucei*

O *Trypanosoma brucei* possui um genoma de duas unidades, o genoma nuclear e um genoma mitocondrial (cinetoplasto) com aproximadamente 35Mb por genoma haploide. O

genoma mitocondrial tem replicação coordenada com o do núcleo e é composto de duas classes de DNA circular: maxicírculos e minicírculos.⁵ Os maxicírculos (aproximadamente 50 cópias por cinetoplasto) contêm os genes que codificam as proteínas mitocondriais e os minicírculos (aproximadamente 10.000 cópias por cinetoplasto) codificam curtos RNAs guias. Existem 11 cromossomos com tamanhos na ordem de milhões de bases (*megabase-sized*) (0,9-5,7 Mb), além dos intermediários (300-900 kb) e os minicromossomos (50-100 kb), sendo que os dois últimos são conhecidos por codificar sequências similares para regiões subteloméricas de cromossomos *megabase-sized*.² Esses minicromossomos abrigam um repertório de genes de glicoproteínas variantes de superfície (VSG, do inglês, *variant surface glycoprotein*), cada um flanqueado por uma sequência de repetição de 177 pb.⁶ O sequenciamento do genoma revelou que esses 11 cromossomos do tamanho na ordem de um milhão de bases contém aglomerados intercalados de pre-rRNA, tRNA, *small nuclear* (sn) RNA, *small nucleolar* (sno) RNA, *short interfering* (si) RNA, *spliced leader* (SL) RNA, e mRNA que codificam para genes (Figura 4).⁷⁻⁸

Figura 4 - Representação esquemática do genoma nuclear de *T. brucei*. Barras coloridas indicam a posição e o tamanho de cada elemento genético de cada cromossomo de *T. brucei*. Barras acima da linha preta que representa um cromossomo (C1-C11) correspondem à transcrição no sentido contrário.

Fonte: Adaptada de DANIELS et al.⁹ apud SILVA.¹⁰

A expressão de genes estágio-regulados é quase exclusivamente controlada a nível pós-transcricional através do diferente processamento de RNA, estabilidade do mRNA e sua tradução.¹¹⁻¹² A expansão de famílias de gene por duplicação em *tandem* é um mecanismo pelo qual os parasitos podem aumentar os níveis de expressão para compensar uma falta de controle transcricional.^{2, 12} Por fim, a importância limitada da iniciação da transcrição e dos fatores de transcrição na regulação da expressão gênica sugere que há uma complexidade para os mecanismos pós-transcricionais que governam os processos de desenvolvimento em tripanossomas.³

Em tripanossomatídeos a transcrição é catalisada por três RNAs polimerases (I, II e III), cada uma responsável pela síntese de diferentes grupos de gene, como ocorre nos eucariotos, em geral. Essas enzimas são responsáveis por copiar a informação contida no DNA genômico para moléculas de RNA que pode dar origem a diferentes classes de transcritos. Por exemplo, os mRNAs codificam polipeptídeos, rRNAs dirigem a maquinaria macromolecular de síntese proteica e os tRNAs atuam como moléculas adaptadoras para montagem de aminoácidos em proteínas. A síntese de transcritos específicos é influenciada por sinais celulares internos e ambientais, que por sua vez são cruciais para o controle de redes de regulação celular.¹⁴

A RNA polimerase I de *T. brucei* transcreve as moléculas de rRNA (RNA ribossomal) (18S, 5.8S e 28S), como esperado, porém, também transcreve dois mRNAs que são específicos de estágios do ciclo de vida do parasito e codificam as VSGs da forma sanguínea e da forma procíclica.^{8, 15-16} Já a RNA polimerase III, como previsto, transcreve tRNAs (RNAs transportadores) e os snRNAs ricos em uridina.^{8, 17} Por fim, como esperado, os mRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, assim como o gene codificante do SL-RNA, contendo o cap 4, que é um capacete 5' hipermetilado de 7-metilguanosina.^{8, 18-19}

1.4 Processamento de mRNA

O processamento do mRNA é um mecanismo muito importante para a viabilidade da célula eucariótica. Após a transcrição, uma fita de RNA mensageiro é gerada, porém esse transcrito primário (pré-mRNA) necessita passar por várias etapas de processamento antes de se tornar um mRNA maduro e funcional. Os processos principais desse mecanismo são o capeamento na porção 5', a clivagem ou poliadenilação na porção 3', a edição de RNA e o *splicing*. O processamento ocorre no núcleo, exceto a edição de RNA, e o mRNA maduro produzido é transportado para o citoplasma.¹⁵

O capacete e a cauda poli-A (polímero de nucleotídeos adenina) adicionados ao transcrito durante o processamento, dentre outras funções, auxiliam na proteção RNA maduro e exportação do núcleo para o citoplasma e posterior tradução.²⁰⁻²¹ Já o *splicing* consiste na retirada de íntrons (regiões não codificantes para proteínas) que estão intercalados entre os éxons (regiões codificantes para proteínas).²²

Estudos com tripanossomas revelaram vários fenômenos biológicos incomuns. Entre eles, destacam-se SL *trans-splicing* e a edição de RNA.¹⁴ Por se tratar de um tipo de processamento por *splicing*, o SL *trans-splicing* é requerido para resolver os transcritos de forma que o mRNA maduro contenha apenas as regiões codificantes e possa ser traduzido. Como em tripanossomatídeos os genes são transcritos em longas unidades policistrônicas, esse processamento é requerido para que os éxons possam ser separados de forma que um mini éxon não codificante, chamado SL RNA, é adicionado à extremidade 5' do éxon que está sendo excisado.¹⁵

A grande maioria dos transcritos da família Tripanossomatidae é resolvida por SL *trans-splicing*, porém, foram identificados dois genes que necessitam do *cis-splicing*. Os genes codificam para a poli-A polimerase, cuja função será discutida posteriormente, e para uma helicase putativa.

Em eucariotos em geral, o capacete é adicionado no primeiro nucleotídeo do transcrito durante sua transcrição.²⁰⁻²¹ Porém, em tripanossomatídeos, o capacete é adicionado ao SL RNA, também durante a transcrição do mesmo, sendo este incorporado na porção 5' do éxon processado por *splicing*.^{8, 18-19} Por fim, a poliadenilação em tripanossomas é concomitante à reação de SL *trans-splicing*, em um processo onde ocorre clivagem em região específica, seguida da adição da cauda poli-A na porção 3' do transcrito (Figura 5).^{2, 23}

Figura 5 - Esquema do processamento de pré-mRNA em tripanossomatídeos.

Fonte: Adaptada de PREUBER et al.²⁴

Embora a edição do RNA guia dependente do RNA seja unicamente observada em tripanossomas, o *trans-splicing* foi posteriormente observado em vários outros eucariotos inferiores, incluindo nematóides, trematódeos, euglenoides e cordados.¹⁴

1.5 Cis e SL *trans-splicing*.

A reação de *splicing* é caracterizada por duas reações de transesterificação, resultando na saída do íntron e união dos éxons, de forma que todo o processo é catalisado por um complexo macromolecular chamado spliceossomo, cuja função é bem caracterizada para humanos e leveduras. No primeiro passo, a hidroxila da adenosina do ponto de ramificação (do inglês, *branch point* - BP) do íntron realiza um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster do *splice site* 5' (5'SS), liberando o exon 5' com um grupamento OH livre na extremidade 3'. No caso do *cis-splicing* o 5'SS está localizado no pré-mRNA e no caso do SL *trans-splicing*, está no SL RNA, de forma que o exon 5' liberado será proveniente dessa sequência SL. No segundo passo, a extremidade 3'-OH do exon 5' ataca nucleofilicamente o 3' *splice site* (3'SS) levando à ligação entre os éxons e a excisão do íntron em forma de laço, no caso do *cis-splicing*, e em forma de Y no caso do SL *trans-splicing* (Figura 6).^{13, 25}

Figura 6 - Reações de A) *cis-splicing* e B) SL *trans-splicing*. As duas transesterificações são mostradas em ambos os casos, juntamente com os sinais de *splicing*.

Fonte: Adaptada de MICHAELI et al.²⁶

1.6 Splicessomo: composição e características

O spliceossomo é uma maquinaria ribonucleoproteica excepcionalmente dinâmica e ao contrário de muitas outras maquinarias macromoleculares, apresenta pelo menos sete estados distintos, conhecidos como o complexo pré-catalítico (B), o complexo ativado (B^{act}), o complexo cataliticamente ativado (B^*), o spliceossomo catalítico do primeiro passo (C), o complexo catalítico ativado do passo II (C^*), o complexo pós-catalítico (P) e o spliceossomo do íntron (ILS, do *inglês intron lariat spliceosome*). Esses complexos são caracterizados por diferenças em composição e conformação e já são bem elucidados bioquímica e estruturalmente em humanos e leveduras, mas não em tripanossomatídeos.²⁷⁻³¹

Os complexos spliceossomais são montados pela reunião de cinco subunidades ribonucleoproteicas (RNP) diferentes, juntamente com uma série de cofatores proteicos associados. Para distinguí-los de outras RNPs celulares, como as subunidades ribossômicas, as subunidades splicessômicas foram denominadas *small nuclear RNPs* (snRNPs).³²⁻³⁴ Cada snRNP contém um número definido de componentes proteicos, contendo um RNA nuclear pequeno rico em uridina (U snRNA) altamente conservado, além de proteínas comuns as diversas partículas e componentes proteicos específicos de cada uma. Os snRNAs definem as partículas ao qual pertencem, sendo elas denominadas U1, U2, U4, U5 e U6 snRNPs (Figura 7a).^{31, 35-38}

Assim como na montagem de ribossomos, a biogênese de snRNPs spliceossomais é um processo de múltiplos passos que ocorre em compartimentos subcelulares distintos. A montagem de complexos funcionais e a entrega aos seus destinos finais são frequentemente regulados através de uma série de complexos intermediários e localidades subcelulares. Os snRNAs são transcritos no núcleo pela RNA polimerase III e recebem um cap 5' de 7-metilguanosina e todos, exceto o U5 snRNA, são exportados do núcleo ao citoplasma e se ligam a sete proteínas Sm (B, D1, D2, D3, E, F e G), através do complexo SMN (Survival Motor Neuron protein), que formam um anel hetero-heptamérico ao redor do sítio Sm, que é conservado nos snRNAs. Vale ressaltar, que em tripanossomatídeos existem variações no núcleo Sm, onde as proteínas Sm16,5K e Sm15K substituem SmD3 e SmB, respectivamente, na U2 snRNP e SSm4 substitui SmD3 na U4 snRNP (Figura 7b).^{15, 32, 39-45}

Figura 7- a) Esquema de U1 snRNP de mamíferos. m³G: cap trimetilgranosina. B, D1, D2, D3, E, F, G: proteínas Sm. - b) A- Modelo do núcleo Sm. B- Variação do núcleo Sm de U2 snRNP de *T. brucei*. C- Variação do núcleo Sm de U4 snRNP de *T. brucei*.

Fonte: a) Adaptada de WILL; LURHMANN.³³ b) Adaptada de TKACZ et al.³⁹

Os snRNAs de U1, U2 e U5 de tripanossomas possuem características únicas, comparadas aos organismos que não apresentam *SL trans-splicing*. O U1 snRNA é menor que o observado para eucariotos superiores além de ter atuação provável apenas no *cis-splicing* e não no *SL trans-splicing*, já que não interage com o 5'SS presente no SL RNA, embora fatores de *splicing* associados a U1 snRNP já tenham sido identificados associados a *SL trans-splicing*. O U2 snRNA também é menor que o observado em humano, com a terceira estrutura em grampo de cabelo ausente. Além disso, não apresenta a sequência de reconhecimento de *branch point*. Já o U5 snRNA de *T. brucei* é o menor encontrado na natureza e não apresenta alguns domínios estruturais conservados em eucariotos superiores.^{15,46}

Uma vez que uma snRNP foi importada para o núcleo, ela pode se difundir por todo o espaço da inter-cromatina e se ligar a outros fatores proteicos específicos de cada partícula. Apesar de ainda não ser descrito em tripanossomatídeos, para humanos e leveduras acredita-se que SMN se dissocie do snRNP logo após a importação, já que o complexo não co-purifica com monopartículas snRNP maduras, spliceossomos ou intermediários de *splicing*.³³ Dentro do núcleo, snRNPs e seus co-fatores associados são tipicamente excluídos dos nucléolos, localizando em um padrão pontilhado de manchas nucleares de tamanho variável e irregular. De fato, esse padrão salpicado é identificado para fatores envolvidos no processamento de pré-mRNA. Precisamente como snRNPs e outros fatores de *splicing* são recrutados dos pontilhados para os locais de transcrição ativa ainda não está claro. No entanto, uma vez que as snRNPs totalmente montadas são direcionadas para o local da transcrição, elas são posicionadas para realizar a montagem do spliceossomo e o processamento do pré-mRNA.³³

1.7 Catalise do *splicing*

Tanto a montagem como a ativação do spliceossomo envolvem um grande fluxo de RNA e componentes proteicos e requerem energia. As etapas da reação de SL *trans-splicing* são as mesmas que ocorrem no *cis-splicing*, com algumas diferenças relacionadas à natureza intermolecular do primeiro. Na reação de *cis-splicing*, que ocorre majoritariamente em humanos e leveduras, a montagem do spliceossomo se inicia com o reconhecimento da partícula U1 ao 5'SS de SF1 ao BP e de U2AF ao 3'SS. Sequencialmente ocorre o recrutamento de U2 snRNP, que por pareamento de bases leva a interação do U2 snRNA e o BP, sendo então formado o complexo pré-spliceossomo (complexo A).^{15, 23, 26} Subsequentemente, há a incorporação da tri-snRNP formada pelas partículas U4/U6.U5 dando origem ao complexo B. O processo de montagem é alimentado por três ATPases/helicases conservadas: Prp5, Sub2/UAP56 e Prp28.²⁷ Na tri-snRNP, o U4 e U6 snRNAs interagem por um extenso pareamento de bases e se ligam a U5 snRNP principalmente através de interação proteína-proteína.²² No complexo B, o BP (do inglês, *branch point*) é reconhecido por U2 snRNP, com a formação de um duplex entre o BP e U2 snRNA.²⁷

A ativação do spliceossomo, ou seja, a conversão do complexo B para B^{act}, é mediada por Brr2, uma proteína específica da partícula U5, e envolve a liberação de U1 e U4 snRNPs e recrutamento de cerca de 30 proteínas adicionais que são indispensáveis para a reação de *splicing*.^{27, 31, 47} Brr2 age desapareando U4 e U6 snRNAs possibilitando novo pareamento de bases entre U6 e U2 snRNAs e entre U6 e o 5'SS. As proteínas recém-recrutadas no complexo B ativado incluem o complexo *Nineteen Complex* (NTC)^{38, 48, 50}, o NTC *related* (NTR), e fatores de *splicing* específicos do estágio.^{27, 51-53} Ao contrário das snRNPs, os componentes do NTC e NTR estão fracamente associados uns aos outros, de forma que não existem como um complexo físico. A maioria dos componentes NTC e NTR estão associados de forma estável ao spliceossomo durante a reação de *splicing*.^{27, 48-50} Com a associação do NTC ocorre estabilização das interações entre U5 e U6 snRNAs com o pré-mRNA, e o complexo B* catalítico é formado catalisando a primeira reação de transesterificação.⁵⁴ Em adição ao NTC e o NTR, fatores de *splicing* estágio-específicos são recrutados ao spliceossomo e passam por mudanças dinâmicas necessárias para as duas etapas da reação de *splicing*, de forma que a primeira reação requer os fatores de *splicing* Cwc25 e Yju2 (Figura 8).²⁷⁻³¹

Após essa reação o spliceossomo sofre rearranjos conformacionais, modificando-se em complexo C, e com a incorporação das proteínas Prp18 e Slu7 é possível a formação do

complexo C*, responsável por catalisar a segunda reação de transesterificação, com consequente liberação do íntron, ação promovida pelo complexo ILS.^{15, 23, 26} Apesar de suas mudanças conformacionais durante cada etapa do *splicing*, o spliceossomo contém um núcleo rígido de cerca de 20 componentes, do complexo B^{act} ao ILS. Esses componentes incluem os snRNAs de U6, U5 e U2 e pelo menos 17 proteínas, de forma que a localização e a conformação geral desses componentes permanecem quase indistinguíveis entre as estruturas dos complexos B^{act}, C, C* e ILS (Figura 8).²⁷

Figura 8 - Modelo de *cis-splicing* de pré-mRNA catalizado pelo spliceossomo.

Fonte: Adaptada de SHI et al.²⁷

Em 2013, Fica e colaboradores mostraram que o spliceossomo atua como uma ribozima, ou seja, que o RNA medeia a catálise dentro do complexo. Foi demonstrado que U6 snRNA era o responsável por coordenar dois íons magnésio, os metais catalíticos M1 e M2, que são os responsáveis por estabilizar os grupos abandonadores nas reações de transesterificação e ativar o nucleófilo que desempenham um papel mutuamente recíproco durante cada um dos passos reativos do *splicing* (Figura 9).^{27, 35}

Figura 9 - Modelo de dois metais para o núcleo catalítico de RNA do spliceossomo. Para o *branching*, R1 representa a hidroxila da adenosina do BP; R2, o intron; e R3, o oxigênio pró-Sp. Para o *exon ligation*, R1 representa o grupo de saída oxigênio 3'; R2, o oxigênio pró-Sp; e R3, o exon 3'. Os oxigênios reativos foram coloridos de vermelho, o fosfato pré-mRNA é mostrado em um estado de transição, e interações entre ligantes específicos e os oxigênios reativos mediados por M1 e M2 são mostrados como linhas tracejadas.
Fonte: Adaptada de FICA et al.³⁵

1.8 Particularidades do SL *trans-splicing*

Estudos de caracterização do SL *trans-splicing* mostraram que o mesmo apresenta diferenças quando comparado ao *cis-splicing*, como a presença do SL RNA, uma molécula essencial para reação que é composta de uma região não codificante de tamanho variável e uma região de reconhecimento de fatores de *splicing* proteicos.^{15, 55} Além disso, o 5' SS se encontra no SL RNA e não no pré-mRNA. Pareamento de bases entre o SL RNA e o 3' SS do pré-mRNA definirá onde ocorrerá o primeiro passo da reação.^{15, 23, 26} Na segunda reação de transesterificação o grupamento 3'-OH da sequência do SL RNA ataca o grupamento fosfato da extremidade 3' da junção intercistrônica/éxon. Nesta etapa, há a formação do 5' SL-éxon (transcrito maduro) e a ligação do SL íntron remanescente à adenosina do BP no pré-mRNA, resultando na formação de uma estrutura em Y intermediária.^{15, 23, 26} A figura 10 traz a representação dos sinais de *splicing* no pré-mRNA em humanos e leveduras e *T. brucei*.

Figura 10 - Representação dos sinais de splicing no pré-mRNA em humanos e leveduras e *T. brucei*.
Fonte: SILVA.¹⁰

Além disso, estudos indicam que U1 snRNP pode representar um elo entre as maquinarias de *cis-splicing* e SL *trans-splicing*. Devido aos altos níveis de expressão e abundância da mesma, desempenham um papel duplo no reconhecimento do sítio 5' de *splicing* no SL RNP e de *cis*-íntrons em pré-mRNAs, bem como representam uma ligação entre *splicing* e poliadenilação devido a associação da proteína U1A, específica de U1 snRNP, com fatores de poliadenilação.^{24, 39}

O uso de purificação por afinidade em *tandem* de complexos de *splicing* em tripanossomatídeos combinada à espectrometria de massas tem possibilitado a identificação de proteínas co-eluídas, permitindo inferir quais interagem com o alvo escolhido. Diversas partículas ribonucleoproteicas envolvidas no SL *trans-splicing*, bem como membros dos complexos proteicos associados, foram identificados e caracterizados.^{15, 56} Ademais, além das proteínas Sm variantes já citadas, foram identificadas proteínas exclusivas das snRNPs de tripanossomatídeos, como a proteína U5-Cwc21 e U1-24K (Figura 11).^{42, 57}

Figura 11 - Comparação de fatores spliceossomais conhecidos de humanos e tripanossomas. As proteínas grifadas apresentam homólogos em *T. brucei* e as destacadas em vermelho são únicas deste organismo.

Fonte: SILVA.¹⁰

1.9 Helicases na reação de *splicing*

A alta remodelação do spliceossomo e a consequente reorganização em múltiplos passos das interações RNA-RNA e RNA-proteínas requerem forças motrizes e mecanismos de regulação. Essas funções são realizadas por RNA helicases, que são motores moleculares capazes de usar a energia da ligação e hidrólise de NTP para remodelação de complexos RNA-RNA e RNA-proteína.^{58- 59}

Oito RNA helicases são requeridas para o *cis-splicing* nos eucariotos. Todas pertencem a superfamília 2 (SF2) das helicases, que são caracterizadas pela presença de dois domínios semelhantes a RecA e extensões variáveis amino e/ou carboxi terminal. As helicases dessa superfamília geralmente funcionam como monômeros, mas algumas atuam como homodímeros e compartilham motivos conservados envolvidos na ligação e hidrólise de NTP (geralmente, ATP) e na interação com ácido nucléico. Os domínios RecA são organizados em *tandem* e conectados por um alça flexível, formando juntos uma fenda que se fecha quando o ATP ou o RNA é ligado. Na interface compartilhada, os dois domínios exibem motivos conservados envolvidos na ligação e hidrólise do ATP, bem como na ligação ao RNA. Esses motivos são espacialmente segregados nos dois RecA sendo eles I, Ia-c, II, III e Q do domínio RecA1 e IIIa, IV, V, Va-b e VI do domínio RecA2 (Figura 12).⁵⁹

Figura 12 - Representação em *ribbon* do núcleo da helicase canônica Aquarius (PDB 4PJ3) com motivos conservados dos domínios RecA1 (I, Ia-c, II, III e Q) e RecA2 (IIIa, IV, V, Va-b e VI).
Fonte: Adaptada de DE et al.⁵⁹

Dentre as oito helicases envolvidas no *splicing*, três (Prp5, Sub2 e Prp28) pertencem à família DEAD-box, quatro (Prp2, Prp16, Prp22 e Prp43) à família DEAH-box e uma (Brr2) a família Ski2-like (Figura 13).^{59- 60}

As proteínas da família DEAD-box e Brr2 usam exclusivamente o ATP para suas funções, já as pertencentes à família DEAH-box podem usar todos os tipos de nucleotídeos trifosfatos como fontes de energia.⁶⁰⁻⁶³ Helicases DEAH-box demonstraram se ligar ao spliceossomo de uma maneira independente de ATP e se dissociam após a hidrólise do mesmo, de forma que elas são retidas no spliceossomo somente quando o ATP está ausente ou a função ATPase da proteína está comprometida, sendo que em geral, mutações que abolem a atividade ATPase frequentemente exibem fenótipos dominante negativos. Além disso, exceto Brr2, que é um componente de U5 snRNP, todas proteínas DExD/H-box envolvidas na reação de *splicing* interagem apenas temporariamente com o spliceossomo.⁶⁰

Figura 13 - Organização de domínios de helicases spliceossomais, agrupadas de acordo com sua subfamília.
Fonte: Adaptada de DE et al.⁵⁹

A primeira helicase que participa do *cis-splicing* é a UAP56/Sub2, responsável por deslocar BBP (do inglês, *branchpoint-binding protein*; SF1 em humanos e Msl5 em levedura) e Mud2 (U2AF65 em humano), tornando possível a ligação de U2 snRNP ao BP.^{59, 64-65} Esta interação é importante para a formação do pré-spliceossomo e requer Prp5, que interage com a U2 snRNP e induz sua reorganização a uma conformação ativa capaz de se associar ao spliceossomo.^{60-61, 67-69} Recentemente, foi mostrado que Prp5 liga-se diretamente ao U2

snRNA e sua liberação permite o recrutamento da tri-snRNP para o spliceossomo, resultando na formação do complexo B.^{59-60, 66}

Duas helicases, Prp28 e Brr2, estão envolvidas na ativação do spliceossomo, ou seja, na conversão do mesmo ao complexo B^{act} através de rearranjos conformacionais e composicionais, sendo ambas recrutadas como parte da tri-snRNP.^{59, 69} Prp28 induz o deslocamento da U1 snRNP do 5'SS permitindo o pareamento de bases dessa região com o U6 snRNA, atuando em proteínas conhecidas por estabilizarem o duplex U1 – 5'SS.^{59, 70-72} Além disso, Prp28 de humano se associa à tri-snRNP e a fosforilação da proteína desempenha um papel na regulação do recrutamento da tri-snRNP para o spliceossomo.^{69, 73} Brr2 atua mediando a liberação de U4 snRNP através da sua atividade helicase, que permite que a mesma realize o despareamento do duplex U4/U6 snRNA, desencadeando a reorganização das interações RNA-RNA e, como resultado, a formação do centro ativo baseado em U6 snRNA.^{59, 69, 74-76} Além de seu papel na mediação do despareamento U4 / U6 snRNAs durante a ativação do spliceossomo, Brr2 tem funções adicionais na regulação da função de outros fatores de *splicing*. O seu domínio C-terminal interage com muitos componentes spliceossomais, servindo como plataforma de interação proteína-proteína, envolvendo proteínas tais como Prp2, Prp16 e Slu7, que são cruciais em etapas catalíticas, e Ntr2, necessária para a desmontagem do spliceossomo.^{69, 77, 79-80} Posteriormente na reação de *splicing*, Brr2 também participa da desmontagem de spliceossomo, embora não esteja claro se a atividade ATPase de Brr2 é necessária para esta etapa.^{22, 59}

A catálise da primeira reação de transesterificação requer a proteína Prp2, responsável por remodelar o spliceossomo (de B^{act} para B*), posicionando a adenosina reativa do BP para catálise.^{59, 69, 81, 83} A função de Prp2 está associada com a desestabilização dos componentes SF3a/b de U2 snRNP do spliceossomo, que permite a exposição do BP e também alivia a rigidez do centro catalítico do spliceossomo.^{69, 82-83} Foi sugerido que Prp2 é recrutada para o spliceossomo através da interação com Brr2 e depois translocado para o pré-mRNA, que estimula sua atividade ATPásica.^{59, 69, 80}

Prp16 promove a segunda reação catalítica, deslocando os fatores de *splicing* Yju2 e Cwc25 do spliceossomo.^{59, 84-85} Esta função na remodelação do spliceosome requer hidrólise de ATP e resulta na associação estável de Slu7 e Prp18 para promover a segunda reação.^{70, 87} Esta ação produz mudanças na rede de interações RNA-RNA (em particular entre o duplex U2/U6), embora não esteja claro se é uma consequência do deslocamento da proteína ou o efeito direto de romper o pareamento de bases.^{59, 87, 89} Notavelmente, apesar de sua indiscutível importância para *splicing*, Prp16 associa apenas transitoriamente com o

spliceossomo e é altamente sub-representada na composição do complexo C, indicando uma transitória, mas muito eficaz, atividade de remodelação dependente de ATP.^{59, 90-91}

A principal função de Prp22 é mediar a liberação de mRNA maduro após a conclusão da reação de *splicing*, ligando-se ao spliceossomo juntamente com Slu7 e Prp18 durante o segundo passo catalítico. A proteína se liga diretamente ao intron próximo ao BP antes da reação e transloca-se no mRNA até a junção exon-exon após a reação de transesterificação. Foi proposto que Prp22 promove a ruptura da interação entre mRNA e U5 snRNA, movendo-se ao longo do mRNA na direção de 3' para 5', culminando na liberação do mRNA do spliceossomo.^{69, 92-93}

Após a conclusão da reação de *splicing* e a liberação de mRNA, Prp43 medeia a desmontagem do spliceossomo.^{59, 79, 94} A função de Prp43 requer dois co-fatores, Ntr1 (também chamado Spp382) e Ntr2, que formam um complexo dimérico para o recrutamento de Prp43 para o spliceossomo.^{69, 79, 95-96} Prp43 demonstrou desparear duplexes de RNA *in vitro*, mas ainda não é claro se esta enzima catalisa diretamente o despareamento de bases, mediando a desmontagem do spliceossomo. Além disso, Prp43 demonstrou estar funcionalmente ligada ao descarte de intermediários do spliceossomo e somente complexos formados após a ação das proteínas DExD/H-box Prp2 e Prp16, são suscetíveis à desmontagem mediada por Prp43, sugerindo uma função adicional destas proteínas na marcação do spliceossomo para sua suscetibilidade à maquinarias de desmontagem.^{69, 72, 94}

Figura 14 - Representação esquemática da via do spliceossomo e a função das RNA helicases DExD / H-box envolvidas.

Fonte: Adaptada de LIU et al.⁶⁰

Além de sua função promotora, as RNA helicases também asseguram a exatidão do *splicing*, ou seja, a capacidade do spliceossomo em discriminar os substratos corretos. Esse processo ocorre por meio de um mecanismo de revisão cinética que permite ativação dependente de ATP da rejeição de substratos anômalos usando "caminhos de descarte" que competem com *splicing* produtivo. Neste modelo, uma RNA helicase atua ou antes da etapa produtiva, reprimindo um substrato de qualidade sub-ótima, ou após o passo produtivo, promovendo um substrato correto. Pelo menos seis helicases spliceossomais são conhecidas por contribuir para a especificidade do *splicing*: Prp5, Prp28, Prp2, Prp16, Prp22 e Prp43.^{59, 97}

Dentre essas oito helicases, três já foram identificadas em tripanossomatídeos, sendo elas Sub2 (UAP56), Brr2 e Prp43.

U5-200K (homóloga a Brr2 em tripanossomatídeos) possui potencial interação com todos os U snRNAs, embora ocorra maior interação com o U5 snRNA, sugerindo presença em diferentes complexos multiproteicos relacionados com a reação de *SL trans-splicing*.⁴² Prp43 é uma proteína essencial para viabilidade do parasito e sua deleção afeta drasticamente a reação de *SL trans-splicing*.⁵⁶ Por fim, a helicase Sub2/UAP56 apesar de já ter sido identificada e caracterizada quanto a sua participação em outras vias⁹⁸, não teve sua participação na reação de *SL trans-splicing* determinada. As demais helicases ainda não foram caracterizadas em tripanossomatídeos, apesar de algumas hipotéticas já terem sido co-purificadas com proteínas de *splicing*, sendo que um estudo destas podem possibilitar a identificação das outras DExD/H-box envolvidas no *splicing*.

1.10 Sub2/UAP56

Sub2/UAP56 é uma helicase altamente conservada com homólogos em *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, ratos e humanos e está envolvida em múltiplos estágios de maturação do mRNA, de forma que estudos em *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que sua inativação impede a montagem do spliceossomo, decréscimo da poliadenilação, instabilidade do mRNA e acúmulo de poli-A RNA no núcleo.⁹⁹

Como dito no item anterior, a proteína RNA helicase/ATPásica Sub2 é essencial na formação do pré-spliceossomo em leveduras e humanos. Em leveduras, durante o estágio inicial de montagem do spliceossomo, a proteína ligadora de *branchpoint* (SF1 em humanos e Msl5 em levedura) se liga ao BP primeiro e une o 5'SS e o 3'SS pela interação com as proteínas Prp40 e Mud2 (U2AF65 em humano), que liga no pre-mRNA na região do 3'SS.^{69, 100-102} Acredita-se que BBP e Mud2, formando um heterodímero, recrutem Sub2 para próximo à região do BP para mediar a liberação de Msl5 e Mud2 e permitir a ligação de U2snRNP ao BP. Embora Sub2 seja essencial para levedura sob condições normais de crescimento, a deleção de Mud2 pode ignorar o requerimento de Sub2, sugerindo que uma função essencial de Sub2 é a remoção de Mud2 para facilitar a associação de U2snRNP com o spliceossomo (Figura 15).^{65, 69}

Figura 15 - Modelos para vias de *splicing* dependentes e independentes de Sub2-Mud2. Complexos spliceossomais formados durante estágios iniciais dependentes e independentes de ATP estão esquematizados. CC1, complex concomitante 1; CC2, complex concomitante 2; PS, pré-spliceosome; B circulado, BBP; M circulado, Mud2. Fonte: Adaptada de KISTLER et al.⁶⁵

Em humanos, estudos mostraram que hUAP56 tem múltiplas funções na montagem dos complexos de *splicing*, de forma que a proteína é necessária para a montagem do pré-spliceossomo e também para a conversão do mesmo ao spliceossomo maduro. A primeira função depende das atividades ATPásica e de ligação à ATP, necessárias para interação com o U2AF65 e recrutamento em complexos *splicing*. A montagem do spliceossomo maduro requer, além das atividades ATPásica e de ligação à ATP, a atividade de dsRNA helicase, onde hUAP56 contata diretamente os U4 e U6 snRNAs e promove o despareamento do duplex U4 / U6.⁶⁴

Porém, além de sua participação no processamento de mRNA, Sub2 já foi descrita envolvida em outras vias e, principalmente, como membro do complexo de transcrição e exportação (TREX) e envolvida com o EJC (do inglês, *exon junction complex*). O complexo TREX é evolutivamente conservado, facilita a montagem de mRNPs (mRNA com proteínas ligadas) competentes para exportação e conecta funcionalmente a transcrição com exportação nuclear, sendo um ator chave dos eventos nucleares de expressão de genes eucariotóticos, como transcrição, processamento de pré-mRNA e exportação nuclear.¹⁰³⁻¹⁰⁷ O complexo TREX em levedura consiste no complexo hetero-pentâmérico THO, Sub2 e a proteína Yra1 de ligação ao mRNA.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Nota-se que esse complexo é responsável pela etapa anterior

(transcrição) e a posterior (exportação do mRNA maduro para tradução) ao processamento do pre-mRNA.

O complexo EJC é um complexo multiproteico que é organizado em torno de um núcleo central de quatro proteínas (eIF4A3, MAGOH, Y14, MLN51) e se liga fortemente ao RNA sem especificidade de sequência. A maquinaria de *splicing* reúne o núcleo EJC, garantindo que o mesmo seja carregado especificamente em mRNAs processados maduros.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ Esse complexo é associado pelo spliceossomo em mRNAs em uma posição conservada da junção dos exons e permanecem nos mRNAs quando estes são transportados para o citoplasma, até sua dissociação do mRNA e desmontagem durante o primeiro ciclo de tradução.¹¹¹⁻¹¹² Dessa forma, o EJC e o cap do mRNA maduro são responsáveis por recrutar o TREX, que, por sua vez, recruta o receptor de exportação TAP/p15 (Figura 16). Ao recrutar vários fatores envolvidos no *splicing*, transporte e tradução, o EJC estabelece uma ligação molecular entre *splicing* nuclear e processos citoplasmáticos.¹¹³

Figura 16 - Esquema de exportação de mRNA dependente do complexo EJC, em humano. O EJC e o cap do mRNA maduro são responsáveis por recrutar o TREX (THO, Aly/REF/Yra1 e UAP56/Sub2), que, por sua vez, recruta o receptor de exportação TAP/p15.

Fonte: Adaptada de WOODWARD et al.¹¹⁴

Assim, Sub2 fornece um excelente exemplo de que o *splicing* de pré-mRNA e a exportação nuclear de mRNA estão vinculados, de forma que a própria proteína, desempenha várias funções nas duas vias.¹¹⁵

Em leveduras e humanos, Sub2 já teve seu papel no *splicing* comprovado, bem como já foi descrita na exportação de mRNA.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Além disso, UAP56, como é chamada a homóloga de Sub2 em humanos, teve sua estrutura resolvida através de cristalografia, em 2004 (Figura 17). Em geral, UAP56 é composta por dois domínios RecA conectados por uma alça flexível. A ligação de NTP causa mudanças conformacionais na alça, bem como na

junção dos domínios C e N-terminal. Além disso, um grande número de resíduos polares contribui para a formação do dímero na unidade assimétrica que pode ser importante para a função de UAP56.¹¹⁹

Figura 17 - A) Estrutura do domínio N-terminal de UAP56. A proteína do N-terminal ao C-terminal é colorida de azul a vermelho continuamente (PDB: 1T6N). B) Estrutura do domínio C-terminal da UAP56. A proteína do N-terminal ao C-terminal é colorida de azul a vermelho continuamente. A linha tracejada preta representa a região desordenada no C-terminal (PDB: 1T5I).
Fonte: Adaptada de ZHAO et al.¹¹⁹

A estrutura cristalográfica de UAP56 fornece uma estrutura para projetar análises mutacionais e funcionais adicionais. De fato, análises por mutação sítio dirigida da proteína homóloga de Sub2 em *T. cruzi* (TcSub2) demonstraram que o resíduo conservado K87 leva a abolição da capacidade de clivagem de ATP, e a proteína nativa apresenta velocidade máxima de clivagem superior ao que observado para o homólogo de humano.¹²⁰

Sub2/UAP56 também é consideravelmente conservada em tripanossomatídeos (Figura 18) e análises por RNA de interferência indicaram que Sub2/UAP56 é essencial para *T. brucei*, ocasionando acúmulo de mRNA no núcleo e redução nas taxas de transcrição.⁹⁸

Figura 18 – Esquema comparando motivos de TcSub2 com o consenso geral DEAD-box e a disposição de aminoácidos da hUAP56.

Fonte: Adaptada de SERPELONI et al.⁹⁸

Estudos em *T. cruzi* mostraram que a deleção dessa proteína impossibilita a recuperação de linhagens estáveis, mostrando que também é essencial nessa espécie. Além disso, dados indicam que a mesma está dispersa pelo núcleo, com exceção da região fibrilar

do nucléolo, além de interagir fisicamente com RNA polimerase II, mas não com RNA polimerase I.⁹⁸ Apesar de estudos recentes indicarem interação com U2AF35¹²¹ e mostrarem o acúmulo de SL-RNA com o silenciamento de Sub2, a atividade de Sub2/UAP56 na reação de *splicing* ainda não foi completamente elucidada em tripanossomatídeos.

Dessa forma, estudos acerca do envolvimento de TbSub2 (Sub2 de *T. brucei*) na catálise do *splicing* são necessários para elucidação da função dessa proteína, bem como para a caracterização desse processamento em tripanossomatídeos. Esse trabalho buscou fornecer informações importantes da proteína TbSub2 e da sua participação no *splicing*, através da identificação dos seus parceiros de interação, da avaliação do efeito de seu knockdown no *cis* e no SL *trans-splicing* e de experimentos com a proteína TbSub2 recombinante.

2 OBJETIVOS

Esse projeto teve como objetivo estudar a proteína Sub2/UAP56 de *Trypanosoma brucei* (TbSub2), com foco no envolvimento da mesma nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*, bem como o estudo da proteína TbSub2 recombinante.

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- 1- Identificar os parceiros de interação da proteína;
- 2- Analisar o efeito do *knockdown* da proteína nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*;
- 3- Identificar a forma oligomérica da proteína recombinante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Trypanosoma brucei*

As formas procíclicas das cepas 427 e 2913 de *T. brucei* foram cultivadas em meio SDM-79, contendo 10% de soro fetal bovino¹²² em estufa a 26°C, realizando-se repiques (diluições 1:100) a cada três dias. As formas sanguíneas, cepa 9013, foram mantidas em meio HMI-9¹²³, a 37°C, 5% de CO₂, com repiques (diluições 1:50) a cada dois dias. As linhagens 2913 e 9013 foram cultivadas na presença de 15µg/mL de geneticina (G418) e 50µg/mL de higromicina.

3.2 Identificação dos parceiros de interação da proteína

3.2.1 Clonagem molecular

Para a primeira etapa do trabalho, oligonucleotídeos foram desenhados a fim de clonar uma região da fase aberta de leitura de TbSub2 (Tb927.10.540) no vetor de recombinação homóloga pC-PTP-Neo. Esses oligonucleotídeos apresentam as sequências 5' AAGCTTACGCGTCTTCTGTCAAGCCATCGTCA 3' e 5' TCTAGACGCTGGTCAACGTAGATTTTCAG 3' para a amplificação de uma região de cerca de 700pb, suficiente para o pareamento deste inserto em um dos alelos correspondentes à região codificante para TbSub2 no DNA genômico do parasito. Isso possibilita que o produto recombinante da expressão homóloga seja a proteína TbSub2 fusionada na porção C-terminal à extensão PTP (ProtA-TEV-ProtC), utilizada para realização da técnica de purificação em *tandem*. A figura 19 traz uma representação do vetor utilizado.

Figura 19 - Vetor de Recombinação Homóloga pC-PTP-Neo

Fonte: SILVA.¹⁰

Dessa forma, a amplificação da região de interesse foi realizada por PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) a partir do DNA genômico de *Trypanosoma brucei* extraído da cepa 427, utilizando o kit *DNeasy Plant Mini kit* (Qiagen). As reações de PCR foram conduzidas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Reação de PCR para amplificação inicial dos fragmentos de interesse

Reagente	Volume utilizado	Concentração final
DNA genômico	1 µL	-
Primer forward (10µM)	1 µL	5µM
Primer reverse (10µM)	1 µL	5µM
dNTP (10mM)	0,5 µL	5mM
MgSO ₄ (50mM)	2 µL	2mM
Tampão (10X)	5 µL	1X
Taq Platinum High Fidelity (5 U/ µL – Invitrogen)	0,2 µL	0,02 U/µl
Água	q.s.p 50 µL	-

Fonte: Elaborada pela autora.

As reações foram executadas em Termociclador *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Condições utilizadas nas reações de PCR

Etapa	T(°C)	Tempo	Repetições
Denaturação inicial	96°C	2 mim	1
Denaturação	96°C	30 seg	
Hibridização dos iniciadores	50 - 65°C	30 seg	40
Extensão pela DNA polimerase	72°C	1 min/kb	
Extensão final	72°C	5 min	1
Armazenamento	4°C	Tempo indeterminado	1

Fonte: Elaborada pela autora.

A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg mL⁻¹ de *SyberSafe* em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x e os fragmentos gênicos foram clonados no sistema *CloneJET PCR Cloning Kit* (*ThermoScientific*), de acordo com instruções do fabricante. Os clones positivos foram sequenciados no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo seguido da digestão com as enzimas *ApaI* e *EagI* para liberação dos insertos de interesse, que foram subclonados no vetor pC-PTP-NEO utilizando a enzima T4 DNA Ligase (*ThermoScientific*), de acordo com as condições do fabricante. O produto da ligação foi utilizado na transformação de células

competentes *E. coli* DH5 α , para seleção de clones positivos que foram confirmados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos.

3.2.2 Transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo

A transfecção foi realizada com aproximadamente 10 μ g da construção realizada anteriormente linearizada com uma enzima de restrição específica para a sequência e purificada com o kit *PCR purification kit* (Cellco). Uma cultura de formas procíclicas de *T. brucei* cepa 427 em fase logarítmica de crescimento foi centrifugada por 7 min/3.000g à temperatura ambiente a fim de se obter um total de aproximadamente 5×10^7 células. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de *Electroporation Media* (EM) (três partes de *cytomix* para uma parte de solução de sacarose tamponada - *cytomix* = 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , pH 7,6 e sacarose tamponada = 277 mM sacarose, 16 mM KPO_4 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4) e centrifugado novamente a 2500g por 5 minutos. Retirado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em 1,0 mL de EM, a fim de obter uma concentração final de 5×10^7 células/mL. Em uma cubeta de eletroporação (*Gene Pulser Cuvette* – BioRad, 0,4cm) foi adicionado 450 μ L do preparado anteriormente e 100 μ L do DNA plasmidial linearizado e a eletroporação foi realizada com dois pulsos sucessivos separados por um intervalo de 10 segundos, no eletroporador *GeneRuler II* (BioRad) usando 1.500 V e 25 μ F. O conteúdo das cubetas foi transferido para garrafas contendo 10 mL de meio de cultura SDM 79 com 20 μ g/mL de antibiótico geneticina (G418).

Para seleção, 7,5 mL de meio, 2,5 mL de cultura de *T. brucei* cepa 427 selvagem e 20 μ g/mL de geneticina foram combinados com 2,5 mL de parasitos transfectados e foram distribuídos 125 μ L desse conteúdo por poço em placa de 96 poços mantida em câmara úmida à 26°C, para o isolamento de clones. Após a obtenção de populações clonais, o conteúdo dos poços foi transferido para garrafas contendo 10 mL de meio de cultura SDM 79 com 40 μ g/mL de antibiótico geneticina (G418). Após seleção por aproximadamente 15 dias, é esperada a obtenção de parasitas recombinantes, capazes de expressar corretamente a proteína fusionada a cauda de interesse.

3.2.3 Confirmação da transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo

A confirmação da inserção correta no DNA genômico, ou seja, da recombinação homóloga no *locus* correspondente foi feita por PCR, com oligonucleotídeos que hibridizam na sequência referente ao vetor (correspondente à sequência da proteína C presente na cauda PTP) (protC-TAP3') e no gene de Sub2, em uma região não presente na construção transfectada (nomeado Sub2_PTP_5'out).

Coletou-se 1 mL de cada cultura na fase logarítmica de crescimento para a extração do DNA genômico. A extração foi realizada seguindo o seguinte protocolo: 1 mL de cultura foi centrifugado a 2700g durante 1 minuto à temperatura ambiente, o sedimento lavado com 800 µL de *Tryps Wash Buffer* (100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) e centrifugado novamente nas mesmas condições. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 250 µL de *TELT Buffer* (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 4% Triton X100). Foram adicionados 250 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e as amostras foram centrifugadas a 16.000g durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionaram-se 250 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 16.000g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Novamente, o sobrenadante foi transferido e foram adicionados 3 volumes de etanol 100% gelado e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M/ pH 7,0. Centrifugou-se os tubos a 16.000g por 5 minutos à 4 °C e lavou-se com 500 µL de etanol 70% gelado. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16.000g por 15 minutos a 4 °C, secadas em temperatura ambiente por 5 minutos e ressuspensionadas em 30 µL de água ultrapura autoclavada. Dos produtos finais, 1 µL foi utilizado para as reações de PCR.

A correta expressão da proteína fusionada à cauda foi examinada por *Western Blotting*, utilizando anticorpo contra o epítipo de Proteína A, presente no PTP-tag, utilizando o seguinte protocolo: centrifugou-se 1 mL de cultura na fase logarítmica de crescimento a 3.000g por 7 minutos à temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspensionado em 40 µL de tampão de amostra e fervido por 5 minutos. Então, 10 µL de cada amostra foram aplicados em eletroforese SDS-PAGE 12%. As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 100 V por 1h, em tampão de transferência gelado (25 mM Tris, 192 mM glicina). Decorrido o tempo de transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em PBST 1x (PBS 1x, 0,1% de Tween20) por 1h à temperatura ambiente, sob agitação, e incubada com 15 mL de solução de anticorpo primário (anti-proteína A, *Sigma*) em diluição 1:5.000 em PBST 1x/leite 2% por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBST 1x (5 minutos cada), e a membrana foi novamente incubada com 15 mL de solução de anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase) com diluição

1:5.000 em PBST 1x/leite 2% por 1h em temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens com PBST 1x (5 minutos cada). A revelação foi realizada com solução de luminol (0,01M Tris 1M pH 8,5, 90 mM de ácido p-cumárico em DMSO, 250 mM de luminol em DMSO). Foram adicionados à membrana 10 mL de solução de luminol e 3 μ L de H₂O₂ e a mesma foi incubada por 1 minuto, sendo possível a observação de bandas no equipamento C-Digit (Li-COR).

3.2.4 Preparação dos extratos de *Trypanosoma brucei*

A preparação dos extratos se deu a partir de cerca de 5 L de uma cultura de parasitos em fase *mid-late log* de crescimento (aproximadamente 1×10^7 células/mL). As culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos à 4°C, o sobrenadante foi retirado e os *pellets* foram lavados duas vezes com 40 mL de *tryps wash buffer* (100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH7,5) e uma vez com 30 mL de *transcription buffer* gelado (150 mM sucrose, 20 mM ácido L-glutâmico, 20 mM Hepes-KOH pH 7,7, 3 mM MgCl₂) com centrifugações de 10 minutos a 3.000g a 4°C após cada lavagem. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em *transcription buffer* em uma proporção 1:1 (v:v) de sedimento para tampão e incubado em gelo por 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado um comprimido de coquetel de inibidores de protease (*mini completeTM*, livre de EDTA, Roche Diagnosis Ltda) e 1:1000 (v:v) de DTT (1M). Os parasitos foram lisados em Prensa Francesa (*Thermo Scientific IEC French Press Cell Disrupter*) utilizando seis ciclos de 1 minuto cada com uma pressão de 2.000 psi. O lisado foi, então, aliquotado em frações de 1 mL cada e congelado em nitrogênio líquido para finalização da lise e conservado a -80°C.

3.2.5 Purificação em *tandem* da proteína TbSub2 e seus parceiros de interação

Para cada purificação 10 aliquotas de 1 mL do lisado preparado anteriormente foram descongeladas e cada uma foi misturada com 100 μ L de tampão de extração gelado (1.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl pH7,7, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1% Tween 20) e incubados por 20 minutos no gelo, sendo invertidos por 5 vezes a cada 5 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 21.000g à 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo gelado, repetiu-se o processo com centrifugação por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 15 mL onde foi adicionado meio comprimido de coquetel de inibidores de protease (*mini completeTM*, livre de EDTA, Roche Diagnosis Ltda). Uma

alíquota de 5 µL adicionada de 45 µL de tampão de amostra com DTT foi separada para realização da eletroforese em SDS-PAGE (fração 1: input).

Em seguida, o conteúdo do tubo falcon foi adicionado em 260 µL de resina IgG *sepharose Fast Flow* (GE) já equilibrada com tampão PA-150 (150 mM de KCl, 20 mM de Tris/HCl pH7,7, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de DTT, 0,1% Tween 20) e a mistura foi incubada sob baixa agitação por 2 horas à 4°C. Decorrido o tempo de incubação, o *flow-through* foi coletado e novamente uma alíquota de 5 µL adicionada de 45 µL de tampão de amostra com DTT foi separada para realização da eletroforese em SDS-PAGE (fração 2: *IgG flow through*). Adicionou-se então, 10 mL de PA-150 à resina, deixando sob rotação por 10 minutos a 4°C, descartou-se o eluído e a lavagem foi repetida. Por fim, a resina foi incubada com 2 mL de tampão de TEV protease (150 mM de KCl, 20 mM de Tris/HCl pH7,7, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de EDTA pH 8,0, 1mM de DTT, 0,1 % de Tween 20) em conjunto com 300 U de TEV protease, sob baixa rotação por aproximadamente 16 horas a 4°C.

No dia seguinte, o TEV eluato foi coletado, de forma que 20 µL de amostra foi separado para eletroforese em SDS-PAGE (fração 3: TEV eluato) e meio comprimido de coquetel de inibidores de protease (*mini completeTM*, livre de EDTA, *Roche Diagnosis Ltda*) foi adicionado ao eluato. Em seguida, adicionaram-se os 6 mL de TEV eluato em 260 µL de matriz anti-Proteína C (Roche) previamente equilibrada com tampão PC-150 (150 mM de KCl, 20 mM de Tris/HCl pH7,7, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de DTT, 0,1 % de Tween 20) e esta foi mantida sob rotação por 2h em baixa velocidade a 4°C. O eluato foi coletado e 20 µL foi novamente separado para eletroforese em SDS-PAGE (fração 4: ProtC FlowThrough). Para lavagem da resina, foram adicionados 10 mL de PC-150 mantendo sob rotação por 10 minutos, repetindo esse passo três vezes. O eluato foi obtido utilizando-se o tampão de eluição EGTA/EDTA (5 mM de Tris/HCl pH 7,7, 10 mM de EGTA, 5 mM de EDTA pH 8,0, 4,3 µM de Leupeptina) capaz de desfazer a ligação dependente de cálcio da resina. Essa última foi mantida com tampão sob rotação por 5 minutos em temperatura ambiente. O eluato foi coletado e esse passo foi repetido por mais duas vezes, obtendo-se aproximadamente 1,8 mL de purificado (fração 5: EGTA/EDTA eluato) (Figura 20).

Figura 20 - Esquema da purificação do PTP-tag, mostrando por etapas. A) Extrato protéico. B) Ligação à Ig sepharose. C) Clivagem com TEV protease seguida de ligação à Anti-ProtC. D) Eluição com tampão EGTA/EDTA

Fonte: Adaptada de SILVA.¹⁰

O eluato final foi concentrado em concentrador *Plus* (Eppendorf) e resina *StrataClean* (Agilent) de acordo com recomendações do fabricante. Por fim, as amostras foram aplicadas em eletroforese SDS-PAGE em gel 12% corado com SyproRuby (Invitrogen) (que possui uma alta sensibilidade de detecção além de possibilitar a purificação das bandas que são recortadas sem que haja interferência do mesmo no experimento de espectrometria de massas) e visualizado em fotodocumentador Bio-Rad. A última coluna do gel, correspondente ao final da purificação, foi recortada e separada em várias bandas, que foram congeladas para posterior análise por espectrometria de massas.

3.2.6 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada no laboratório da Dra Júlia Chagas Pinheiro da Cunha no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, bem como a preparação das amostras que foram analisadas.

Nessa etapa as bandas excisadas foram descoradas por três horas à temperatura ambiente com solução aquosa de 50% metanol e 5% ácido acético e foram, em seguida, desidratadas com 100% de acetonitrila por cinco minutos. Adicionaram-se 10 mM de DTT e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos e após esse período cerca de 30 µL de solução iodoacetamina (50 mM de iodoacetamina em solução de 100 mM de bicarbonato de sódio) por mais 30 minutos. Por fim, lavaram-se os fragmentos com 100 mM de bicarbonato de amônio por 10 minutos e desidratou-os novamente com 100% de acetonitrila e novamente hidratatos com bicarbonato de amônio. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez e os

fragmentos desidratados resultantes foram proteolisados com 50 ng/ μ L de tripsina (*Sigma*) em solução de 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 16h a 4°C.

Assim, às amostras proteolisadas, adicionou-se solução 5% ácido fórmico de modo a se recobrir todo o gel e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a coleta do sobrenadante, adicionou-se solução 5% ácido fórmico em 50% acetonitrila, com incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizando, as amostras foram secadas a vácuo e, em seguida, ressuspendidas em 0,5% ácido fórmico e dessalinizadas em resinas do tipo *zip-tip* (*Millipore*).

As amostras preparadas foram submetidas a análises em LTQ-Orbitrap Velos (ThermoScientific) a 1,9 KV e 200°C, em modo de aquisição dependente dos dados, com cobertura de 200 a 20000 m/z e resolução de 3000 Da. Os dados foram analisados no Mascot (www.matrixscience.com/) e as sequências de proteínas foram identificadas à partir de busca em banco de dados de sequência de *T. brucei* (TriTrypDB).

3.2.7 Ultracentrifugação

Para a ultracentrifugação, foram previamente preparadas soluções de sacarose de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, e 40% diluídas em tampão contendo 80 mM KCl, 20 mM Hepes, 20 mM KGlu, 3 mM MgCl₂ e 0,1% Tween20. Dessa forma, 550 μ L de cada solução foi adicionada em um tubo plástico e o mesmo foi incubado a 4°C por 16h, a fim de se obter um gradiente linear. As amostras utilizadas na ultracentrifugação foram os elutatos finais da purificação concentrado 20x em SpeedVac e um controle formado por um mix de proteínas de pesos moleculares conhecidos. As mesmas foram adicionadas cada qual na parte superior de um tubo plástico com o gradiente montado e ultracentrifugadas a 41.000 rpm por 16h. Após a ultracentrifugação, foram retiradas alíquotas de 100 μ L começando do topo dos tubos e essas alíquotas foram concentradas com resina *StrataClean* (Agilent) e aplicadas em eletroforese SDS-PAGE em gel 12% corado com SyproRuby (*Thermo Fisher Scientific*).

3.2.8 Imunolocalização da proteína TbSub2 por Imunofluorescência indireta (IFI)

Para localização da proteína TbSub2 por Imunofluorescência indireta utilizaram-se cerca de 5×10^6 parasitos PTP-tag positivos (fase logarítmica) que foram centrifugados a 3.000g por 7 minutos, sendo o sedimento lavado 2 vezes com 1 mL de PBS 1X, pH 7,4 (Sigma – tabletes) gelado. Em seguida os parasitos foram ressuspendidos em 1 mL de PBS 1x

gelado e 40 µL dessa suspensão de parasitos foram depositados sobre cada poço da lâmina de imunofluorescência, incubando por 15 min/TA para a adesão. Em seguida, foi retirado o excesso de líquido sobre o poço e foram adicionados gentilmente 40 µL de solução de paraformaldeído 2% em PBS 1x para fixação, incubando a placa por 20 minutos a temperatura ambiente. Após 2 lavagens com 40 µL de PBS 1x gelado, foram adicionados 30 µL de solução Triton X-100 0,3% em PBS 1x gelado, incubando-se por 3 minutos à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS 1x gelado (5 minutos cada lavagem), a lâmina foi incubada por 1h à temperatura ambiente com 40 µL de solução de bloqueio (BSA 3%, 1% gelatina de peixe; em PBS 1x) seguido de incubação, pelo mesmo período, com 30 µL do anticorpo primário anti-proteína A de coelho (Sigma, P3775, diluição 1:8000) diluído em solução de bloqueio. Após 3 lavagens com PBS 1x (5 minutos cada), 30 µL de solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário Alexa 594 (Invitrogen, A11072, diluído 1:400) e DAPI 1mg/mL (Sigma - diluído 1:200) foram adicionados, incubando por 1h à temperatura ambiente. A lâmina foi então lavada 3 vezes com PBS 1x (5 minutos cada) e montada com *Vectashield* (*Vector laboratories*) para preservar a fluorescência. As lâminas foram observadas com um microscópio óptico de fluorescência *Nikon Eclipse E600*.

Para a forma sanguínea foi seguido o mesmo protocolo, com a exceção do anticorpo primário, pois foi utilizado o anticorpo contra a própria proteína Sub2 possibilitando realizar a localização da mesma na forma sanguínea. Essa segunda parte foi realizada no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná em colaboração com as Dras Priscila Mazzocchi Hiraiwa e Andrea Rodrigues Avila.

3.3 Análise do efeito do *knockdown* da proteína nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*

3.3.1 Clonagem Molecular

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing* - PTGS) atuando sobre o RNA mensageiro (mRNA). No foco deste mecanismo está uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA - double stranded RNA) que, ao ser incorporada na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA-alvo, ocasionando assim o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA.¹²⁴ Vários vetores estão disponíveis para realização da técnica de RNAi em *T. brucei*, que em geral variam em relação ao número e posição do promotores para

T7 RNA polimerase. Sistemas como p2T7, possuem dois promotores para T7, que ficam dispostos de modo a flanquear o fragmento gênico de interesse. Portanto, somente um passo de clonagem é necessário para realização do RNAi usando este plasmídeo. Vetores como o pLEW100 possuem apenas um promotor de T7 RNA polimerase, e portanto, se fazem necessários dois passos de clonagem, garantindo que os fragmentos gênicos estejam posicionados de forma oposta um em relação ao outro. A escolha no sistema pLEW100, originalmente usado para expressão de proteínas em *T. brucei*, se baseia no fato do menor nível do vazamento deste sistema, garantindo a formação da dupla fita de RNA somente quando tetraciclina é adicionada ao meio de cultura. Para garantir a formação de “grampo de cabelo” (*stem loop*) no RNA dupla fita formado durante a indução do sistema do RNAi, uma sequência espaçadora (*stuffer*) é inserida entre os dois fragmentos gênicos. Para tanto, é necessário o emprego de um segundo vetor, chamado pJM325. As funções deste plasmídeo são auxiliar no posicionamento oposto dos fragmentos gênicos e fornecer a região espaçadora.

Para desenho dos iniciadores específicos utilizou-se o programa *RNAit* (<http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/software/RNAit.html>), sendo que o software foi programado para fornecer fragmentos gênicos entre 400 e 600 pb. A amplificação foi realizada como na seção 3.2.1 e confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *SyberSafe* em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x. Os produtos de amplificação foram clonados no sistema *CloneJET PCR Cloning Kit* (Fermentas), de acordo com instruções do fabricante, para posterior reação de sequenciamento, realizada no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

Clones positivos foram digeridos de acordo com dois conjuntos reações, sendo que parte foi digerida com *HindIII* e *XbaI* (gerando o inserto direto, S) e o restante com *MluI* e *XbaI* (gerando o inserto inverso, AS), de acordo com a figura 21.

Figura 21 - Representação esquemática das reações de digestão utilizadas na construção do RNAi usando pLEW100

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor pJM325 foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Nhe*I, e utilizou-se o inserto S na ligação a este sistema (Figura 22). As enzimas *Xba*I e *Nhe*I possuem extremidades compatíveis, permitindo a ligação, entretanto, não é possível reabrir o sistema utilizando nenhuma das duas enzimas. O plasmídeo pLEW100 foi digerido com *Xba*I e *Mlu*I, e procedeu com a ligação do inserto digerido com as mesmas enzimas (Figura 22). As ligações foram feitas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com recomendações do fabricante e o produto da ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5α. Os clones confirmados do inserto S no pJM325 foram digeridos com *Hind*III e *Xba*I, liberando um fragmento contendo o inserto S e um espaçador (*stuffer*). Os clones do inserto AS no pLEW100 foram digeridos com *Hind*III e *Xba*I, sendo o vetor resultante utilizado para a ligação do inserto S com espaçador (Figura 22).

Figura 22 - Representação esquemática da geração das construções para realização da técnica de RNAi usando o vetor pLEW100.

Fonte: Elaborada pela autora.

A ligação final foi realizada utilizando a enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com recomendações do fabricante e o produto da ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α . A confirmação da clonagem final foi feita por PCR utilizando um oligonucleotídeo que hibridiza no vetor pLEW100 e outro que hibridiza no espaçador proveniente do sistema pJM325.

3.3.2 Transfecção da construção TbSub2 no sistema pLEW100 nas formas procíclica e sanguínea de *Trypanosoma brucei*.

A transfecção na forma procíclica foi realizada como na seção 3.2.2.

A transfecção de formas sanguíneas por métodos tradicionais se mostra bastante trabalhosa e com baixa eficiência. Metodologias que empregam o equipamento AMAXA *nucleofector* apresentam incremento de até 1.000 vezes na transfecção de formas sanguíneas de *T. brucei*. Na ausência do equipamento, importantes modificações no protocolo de transfecção foram implementadas, entretanto, ainda aquém da eficiência do equipamento acima citado. A seguir estão descritos os procedimentos adotados.

Culturas de parasitos na forma sanguínea, cepa 9013, ($4-7 \times 10^5$ parasitos/mL) de *T. brucei* foram centrifugadas por 7 minutos a 3.000g a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os parasitos lavados com 5 mL de tampão *Electroporation media* (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,6). Centrifugou-se novamente a 3.000g por 5 minutos; retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 1,0 mL de EM, a fim de obter-se uma concentração final de 5×10^8 células/mL. DNA linearizados e parasitos foram colocados em cubeta de eletroporação (*Gene Pulser Cuvette* – BioRad, 0,4cm) juntamente com os parasitos e esses foram eletroporados com pulso de 1,5 kV e 25 μ F em eletroporador *Gene Pulser II* (BioRad). Após a eletroporação os parasitos foram transferidos para uma garrafa com 30 mL de meio HMI-9 sem a presença de antibiótico. Somente após 24 horas de crescimento acrescentou-se 1,25 μ g/mL de fleomicina e após observar considerável do parasitos, fato que ocorreu aproximadamente 2 semanas mais tarde, elevou-se a concentração do antibiótico de seleção para 2,5 μ g/mL. No caso de formas sanguíneas não se procedeu-se com a seleção de populações clonais concomitantemente com seleção inicial, a exemplo do procedimento adotado para formas procíclicas.

3.3.3 Curvas de crescimento das culturas após silenciamento de TbSub2

Clones positivos obtidos após a transfecção com o plasmídeo pLEW100 recombinado foram induzidos com tetraciclina para realização da técnica de RNAi. Em placas de 24 poços estéreis, culturas de parasitos transfectados foram diluídas para 2×10^5 células/mL para forma sanguínea e 2×10^6 células/mL para a forma procíclica, adicionando-se 1 µg/mL de tetraciclina (Sigma) e incubando-se a 37°C, 5% de CO₂ para forma sanguínea e a 26°C para a forma procíclica. Nos poços não induzidos acrescentou-se o mesmo volume de álcool 70% (solvente no qual a tetraciclina foi preparada). A cada 24 horas, o número de parasitos em cada poço foi avaliado utilizando câmara de Neubauer (Kasvi), sendo a cultura novamente diluída para a concentração inicial com 1 µg/mL de tetraciclina. O experimento teve duração de uma semana, sendo os dados diários plotados em um gráfico para avaliar a curva de crescimento dos parasitos induzidos e não induzidos.

3.3.4 qPCR para confirmação das taxas de transcrito do gene de TbSub2 após o silenciamento.

RNA total foi extraído a partir 2×10^7 células utilizando o kit *NucleoSpin RNA*, (Macherey-Nagel), de acordo com instruções do fabricante. Para obtenção do cDNA utilizou-se a transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Essa técnica foi empregada, para quantificar os níveis dos transcritos de interesse, após indução do RNAi em diferentes tempos. Para avaliação de cada mRNA, 1 µL cDNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos utilizando *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante. As reações de qPCR foi executadas em termociclador *CFX96 real-time system* (Bio-Rad). Triplicatas experimentais foram empregadas e cada ensaio foi normalizado utilizando o gene que codifica para TERT, cujas análises demonstraram ser constitutivamente expresso tanto na forma sanguínea quanto procíclica.¹²⁵ O ciclo de temperatura empregado foi 95°C, 30 segundos, [(95°C, 5 segundos; 65°C, 5 segundos; seguido pela coleta de dados) por 40 ciclos].

3.3.5 RT-PCRs para análise de *splicing*

Para reação de RT-PCR empregou-se 1µg de RNA total extraído a partir de parasitos induzidos em diferentes tempos de indução com tetraciclina. A extração de RNA total foi feita

utilizando 5×10^8 parasitos com 1 mL de TRIzol (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Para síntese do cDNA utilizou-se 500 ng do reagente de *Random Hexamer Primer* (5'-nnnnnn-3'), de acordo com o sistema *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega).

O cDNA obtido foi usado como *template* para as reações de PCR com iniciadores específicos que amplificam regiões processadas e não processadas por *cis-splicing* ou SL *trans-splicing*. Para a avaliação da reação de *cis-splicing* foram utilizados os iniciadores CS1 e CS2 (Tabela 3), sendo que os iniciadores utilizados são capazes de amplificar as formas processadas e não processadas do transcrito da Poli-A polimerase (Figura 23).

Figura 23 – Representação esquemática das regiões de anelamento dos iniciadores empregados na análise funcional das reações de *cis* e SL *trans-splicing*. CS1 e CS2 ligam-se ao éxon do transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pré-PAP) e processado (PAP); TS1 e TS2 anelam-se no éxon e intron, ainda não processados do transcrito de α -tubulina (Pré- α -tub). Para avaliação do processamento do de α -tubulina, TS3 se liga em outra região do éxon de α -tubulina, enquanto TS4 anela-se tanto no SL éxon quanto no éxon de α -tubulina (α -tub). E,éxon; I, intron.
Fonte: CICARELLI et al¹²⁶.

Para reação de SL *trans-splicing* foram empregados os iniciadores TS1 e TS2 (tabela 3) para formas não processadas, e TS3 e TS4 (tabela 3) para formas processadas de α -tubulina, utilizando cDNA obtido. Como controle de reação foi amplificado o transcrito de 7SL RNA, utilizando os iniciadores 7SL1 e 7SL2 (tabela 3), uma vez que este mensageiro endereçado ao retículo endoplasmático não é processado por *splicing*.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.

Iniciador	Sequência
<i>Random Hexamer Primer</i>	5' – NNNNNN – 3'
CS1	5' – –TG CAG CGG CAC TCC CAA AAC – 3'
CS2	5' – –GT TAA AAC AGA TGG ACA AAT C – 3'
TS1	5' – GGC TAT CTG CAT CCA CAT TG – 3'
TS2	5' – –TA AGT GGT GGT GGC GTA AG – 3'
TS3	5' – GCC TAC CAC GAG CAA CTC TC – 3'

continua

TS4	5' GTA CTA TAT TGA TGC GTG ACG C – 3'
7SL1	5' – TTG CTC TGT AAC CTT C – 3'
7SL2	5' – TCT ACA GTG GCG ACC TCA AC – 3'

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos de RT-PCR com a forma procíclica foram realizados no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná em colaboração com as Dras Priscila Mazzocchi Hiraiwa e Andrea Rodrigues Ávila.

3.3.6 qPCR para analisar acúmulo de SL exon

O cDNA preparado para os experimentos de RT-PCR foi utilizado nessa etapa para avaliar a quantidade relativa de SL-RNA nos diferentes tempos de indução da cultura da forma sanguínea com tetraciclina. Para avaliação de cada mRNA, 20 ng de cDNA foi amplificado com oligonucleotídeos específicos e *SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados amplificam regiões do transcrito 7SL (5' CGCATTGCTCTGTAACCTTCGGG 3' e 5' GGTTGCGTGTCGGTGTTGAGG 3'), que não sofre *splicing* e foi empregado para normalização, e do transcrito SL-RNA (5' CCACCTTCCAGATTCCCGCA 3' e 5' AACGCTATTATTAGAACAGTTTCTGTACTATATTG 3'). Como controle positivo foi usado o cDNA cujo RNA foi extraído de uma cultura tratada com sinefungina, que é uma substância que inibe a metilação do SL-RNA, impedindo a ocorrência do SL *trans-splicing*. As reações de qPCR foram executadas em termociclador *LightCycler® 96 System (Roche Life Science)* e ciclo de temperatura empregado foi 95°C, 60 segundos, [(95°C, 20 segundos; 55°C, 55 segundos; 72°C, 20 segundos; seguido pela coleta de dados) por 40 ciclos].

Para posterior análise comparativa pelo método de Pfaffl¹²⁷, amostras contendo uma mesma quantidade de cDNA e diluições seriadas dos oligonucleotídeos utilizados foram submetidas ao mesmo ciclo de qPCR, afim de se obter a curva cujo coeficiente angular permitirá calcular a eficiência de cada par de oligonucleotídeos e assim, normalizar os dados obtidos.

$$E = 10^{-1/\text{coeficiente angular}} \quad (1)$$

$$\text{alvo} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{controle-amostra})}} \quad (2)$$

Esse experimento foi realizado no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná em colaboração com as Dras Priscila Mazzocchi Hiraiwa e Andrea Rodrigues Ávila.

3.4 Identificação do estado oligomérico da proteína recombinante

3.4.1 Clonagem molecular

Clonagem independente de Ligase (do inglês; LIC, *Ligase Independent Cloning*) é um método simples e rápido para obter construções para expressão de proteínas, que faz uso da atividade 3'→5' da T4 DNA polimerase para criar regiões coesivas complementares muito específicas entre o vetor de expressão e o inserto a ser ligado. O processo é muito eficiente, pois apenas os produtos desejados podem se formar.

Para preparação do vetor de expressão pETTrx-1a/LIC (http://babel.ucmp.umu.se/cpep/web_content/pdf/vector%20maps/pETtrx1.pdf), o primeiro passo foi realizar uma digestão utilizando a enzima de restrição *BsaI* (*Thermo Fisher Scientific*), pois todos os vetores LIC desenvolvidos pelo EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) contém um gene que codifica para eGFP flanqueado por dois sítios de restrição para *BsaI* (mostrados em vermelho na figura 24). Assim, através da reação de digestão feita de acordo com instruções do fabricante, foi possível obter o vetor linearizado ao mesmo tempo em que o gene de eGFP é removido.

Figura 24 - Esquema mostrando uma parte da sequência do vetor de expressão pETTrx-1a/LIC, onde tem-se o gene de eGFP e os sítios de restrição para digestão pela enzima *BsaI*, e o produto da digestão com essa enzima.

Fonte: Adaptada de LIC.¹²⁸

Após a purificação do vetor digerido utilizando o kit *Agarose Gel Extraction* (Jena Bioscience), o mesmo foi tratado com a enzima T4 DNA polimerase (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com o protocolo da mesma, na presença de dTTP. Assim, através da

atividade de exonucleasica 3'→5' as bases são removidas à partir de ambas as extremidades 3' até o primeiro resíduo de timidina (T), como mostrado na Figura 25.

Figura 25 - Esquema mostrando o produto da reação de tratamento do vetor com a enzima T4 DNA polimerase na presença de dTTP.

Fonte: Adaptada de LIC¹²⁸

Para obtenção de um inserto com extremidades coesivas complementares aos vetores LIC, o esquema de construção de iniciadores abaixo deve ser seguido:

Primer sense: CAGGGCGCCATG- região do gene de interesse.

Primer antisense: GACCCGACGCGGTTA- região do gene de interesse (complementar reverso)

As bases com linha dupla devem ser acrescentadas a cada iniciador para gerar as extremidades coesivas complementares ao vetor, e os códons de iniciação (ATG) e parada (TTA) podem ser os próprios da sequência a ser amplificada ou podem ser acrescentados. Assim, para amplificar a fase aberta de leitura correspondente a proteína Sub2, foram utilizados os seguintes iniciadores:

Primer sense: CAGGGCGCCATGAGTAGTGGTCTCGCTGAC

Primer antisense: GACCCGACGCGGTTATTGGTTCATATACTGGCTC

O inserto foi obtido através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando a enzima Pfu DNA polimerase (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com instruções do fabricante, intencionando-se obter extremidades abruptas. Da mesma forma realizada com o vetor, após a purificação do produto de PCR, o produto obtido foi tratado com a enzima T4 DNA polimerase (*Thermo Fisher Scientific*) na presença, porém, de dATP ao invés de dTTP como demonstrado na figura 26. Assim, através da atividade de polimerização 3'→5' as bases são removidas na extremidade 3' até o primeiro resíduo de adenosina (A).

Figura 26 - Esquema mostrando o produto da reação de tratamento do inserto com a enzima T4 DNA polimerase na presença de dATP.

Fonte: Adaptada de LIC¹²⁸

Após as reações de tratamento com T4 DNA polimerase, os produtos dessas reações foram novamente purificados utilizando o *PCR Purification kit* (Cellco) e a reação de hibridização foi montada utilizando 35 ng de vetor e 25 ng de inserto, respeitando a relação vetor:inserto de 1:3. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 25 mM de EDTA e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se água deionizada até que o volume final de 20 µL e o produto da reação foi transformado em *E. coli* DH5-α competente e a confirmação dos clones positivos foi feita por PCR utilizando oligonucleotídeos que se anelam em regiões que flanqueiam o inserto.

3.4.2 Expressão heteróloga de TbSub2 em *E. coli*

Após a confirmação da clonagem, o DNA plasmidial de um clone positivo foi extraído com o kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (Cellco) e em seguida transformado em células competentes da cepa *E. coli* Rosetta-gami 2 (Novagen). Esta cepa fornece cópias extras de tRNAs raros, permitindo contornar o problema do *codon usage* em *E. coli*, além de mutações em genes que auxiliam na formação de ligações de dissulfeto no citoplasma da célula. Colônias transformantes foram inoculadas em 10 mL de meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) por 16h à 37°C. Então, os pré inóculos foram transferidos para 1 L de meio TB modificado (1,2% triptona, 2,4% extrato de levedura, 1% NaCl, 0,4% glicerol, 2 µM CoCl₂, 10 µM MgCl₂, 10 µM ZnSO₄, 50 µM FeCl₃, 2 µM NaCl). As culturas foram mantidas a 18°C sob agitação por mais 16h e ao fim desse tempo, foram centrifugadas a fim de sedimentar as células do restante de meio de cultivo. As células foram lavadas com PBS 1x, novamente centrifugadas e os pellets foram guardados para posterior lise e purificação.

3.4.3 Purificação da proteína TbSub2 recombinante

Primeiramente foi realizada a lise das bactérias onde as células foram ressuspensas em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 5% de glicerol, 100 mM de PMSF (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl fluoride*) e um comprimido de coquetel de inibidores de protease (*completeTM*, livre de EDTA, *Roche Diagnosis Ltda*) e lisadas por sonicação. Posterior a lise, centrifugou-se o lisado por 40 minutos a 12.000 rpm como etapa de clarificação da amostra.

Uma vez que a utilização do tampão Tris-HCl demonstrou possuir a maior de fração de proteína solúvel, decidiu-se prosseguir para purificação utilizando este tampão. A purificação por Cromatografia de Afinidade de Sub2 foi feita por meio da aplicação da amostra proteica em coluna contendo resina *TALON® Metal Affinity (Clontech)*, que permite coordenação entre os íons cobalto e os grupos imidazólicos das histidinas adicionadas pelo vetor. A lavagem da resina foi feita com 5 volumes de coluna (~50 mL) de tampão A (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 300 mM de NaCl, 5% (M/V) de glicerol, 2 mM de imidazol) com fluxo de 2mL/min e pressão 0,5MPa. As proteínas aderidas aos íons da coluna foram eluídas da resina pela aplicação de tampão com um gradiente não linear de concentração de imidazol produzido pelo ÄKTA Purifier, tendo com patamares de purificação a relação de 5, 15, 25, 50 e 100% de tampão B (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5% (M/V) de glicerol e 200 mM Imidazol). Alíquotas foram retiradas a cada etapa para verificação em géis poliacrilamida 12% SDS-PAGE e, ao término da purificação, as frações eluídas foram dialisadas em tampão A2 (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 300 mM de NaCl, 5% (M/V) de glicerol) para retirada do imidazol e concentradas utilizando o sistema Amicon Ultra, com corte de 30 kDa.

Após a primeira etapa de purificação, o eluato foi incubado por 16h a 4°C na presença de TEV protease recombinante e 2 mM de DTT (adicionado ao tampão A2, no qual a proteína foi dialisada) para clivagem da cauda fusionada a proteína que é inserida pelo vetor. Uma proporção de 1 mg de TEV protease para 50 mg de proteína total foi utilizada e a eficiência da clivagem foi conferida por eletroforese SDS-PAGE em gel 12%. Após a clivagem, uma nova etapa de purificação foi realizada no sistema ÄKTA Purifier por meio da aplicação da amostra proteica em coluna HisTrapTM High Performance (*GE Healthcare*), que permite coordenação entre os íons níquel e os grupos imidazólicos das histidinas da cauda adicionada pelo vetor que foi clivada da proteína. A lavagem da resina foi feita com 5 volumes de coluna (~25 mL) de tampão A2 com fluxo de 2 mL/min e pressão 0,5MPa. A proteína de interesse não se liga à coluna nessa etapa da purificação, pois a cauda de histidinas que conferia afinidade pela

resina foi excisada. As proteínas ligadas aos íons da coluna foram eluídas da resina pela aplicação de tampão B (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5% (M/V) de glicerol e 200 mM imidazol). Alíquotas foram retiradas a cada etapa para verificação em géis 12% SDS-PAGE e, ao término da purificação, as frações eluídas foram dialisadas em tampão A2 para retirada do imidazol e concentradas utilizando o sistema Amicon Ultra, com corte de 30 kDa.

Por fim, o último passo de purificação foi uma cromatografia de exclusão molecular, com aplicação da amostra na coluna Superdex® 200 10/300 GL (*GE Healthcare*) de 24 mL onde as proteínas e peptídeos são separados de acordo com os seus diferentes tempos de retenção na coluna, relacionados com o tamanho e a forma de cada uma. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para verificação em géis poliacrilamida 12% SDS-PAGE e, ao término da purificação, as frações correspondentes à proteína Sub2 foram concentradas utilizando o sistema Amicon Ultra, com corte de 30 kDa.

3.4.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O DLS é um método não destrutivo que avalia o tamanho de partículas em escala nanométrica ou micrométrica, para o estudo de fluidos complexos, polímeros e biopolímeros, suspensões coloidais, sistemas micelares e nanopartículas.¹²⁹

Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, como um *laser*, ela irá espalhar luz em todas as direções. A técnica de DLS consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento da partícula, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade. Essa técnica possibilita a determinação do raio hidrodinâmico do polímero em solução e considerando-os para proteínas globulares a massa dos polímeros pode ser calculada e assim inferir um possível estado oligomérico de uma proteína em solução.¹³⁰

Para a realização desse experimento foi utilizada a proteína após as etapas de purificação e concentração da mesma no equipamento Zetasizer UV (Malvern).

3.4.5 Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

O DSF é usado para monitorar as transições térmicas de proteínas, como o desenovelamento, na presença de um corante fluorescente (Figura 27). Os corantes que podem ser utilizados para DSF são altamente fluorescentes em ambiente não polar, isto é, em

bolsas hidrofóbicas de proteínas (parcialmente) desenoveladas, enquanto a fluorescência é extinta em solução aquosa e /ou na presença de proteína nativa.

Figura 27 - Representação da curva de desnaturamento de uma proteína em um experimento de DSF
Fonte: Adaptada de NIESEN et al.¹³¹.

O DSF permite a análise rápida de múltiplas amostras em paralelo em condições idênticas, por exemplo, dentro de um estudo de desenvolvimento de tampão utilizando diferentes excipientes estabilizadores, sendo assim uma ferramenta valiosa para estudos de rastreio de formulação. Assim, utilizou-se o kit *Solubility & Stability Screen 2* – (Hampton Research) que contém 96 variações de possíveis estabilizadores de proteínas e cerca de 25 μM de proteína foi acrescentado a cada condição, bem como foi usado o SyproOrange (Life Technologies) 10x concentrado como corante. Os experimentos foram conduzidos no equipamento CFX96 (Bio-Rad).

3.4.6 Eletroforese em gel nativo para análise do estado oligomérico

Nessa etapa utilizou-se o sistema de eletroforese em *PhastGel® Gradient Pre-cast Gels 10-15%* (GE healthcare), de acordo com recomendações do fabricante, e tampão de corrida comercial *PhastGel™ Native Buffer Strips*. A proteína foi dialisada para um tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 20 mM de NaCl e 5% glicerol, pois esse experimento exige baixas concentrações de sal na amostra.

3.4.7 Ensaios de cristalização

Muitas são as técnicas utilizadas na cristalização de macromoléculas, sendo a mais frequente a técnica de difusão a vapor. Nela, a solução proteica fica suspensa em uma lamínula voltada para a região interna vedada do poço, procedimento conhecido como *hanging drop*, ou então sobre uma plataforma ao lado do reservatório também na região interna vedada do poço, procedimento conhecido como *sitting drop* (Figura 28).

Figura 28 - Esquema representativo das técnicas de (A) *hanging drop* e (B) *sitting drop*.
Fonte: Adaptada de VAPOR DIFFUSION METHOD.¹³²

Foram testados 5 kits contendo cada qual 96 condições de cristalização, com variações de tampão, sal e agente precipitante. As caixas de cristalização foram feitas com auxílio do robô de cristalização *Crystol Gryphon* (Art Robinson Instruments) e permanecem incubadas a 18°C. As caixas estão sendo acompanhadas, e cristais, presentes nas condições iniciais, poderão ser testados utilizando o equipamento de difração de Raios X *Rigaku Micromax 007 HF* (Rigaku), presente no Grupo de Cristalografia do IFSC.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos parceiros de interação da proteína

4.1.1 Clonagem molecular

Tendo em vista que Sub2/UAP56 participa de diferentes etapas do processamento de mRNA, um fragmento de aproximadamente de 670 pares de bases foi amplificado, clonado em vetor de clonagem comercial, sequenciado e subclonado no sistema pC-PTP-NEO. Este plasmídeo é um vetor de recombinação homóloga, e desta forma, ao transfectar o vetor linearizado com o inserto ligado, o mesmo irá se alinhar com um dos alelos do gene que codifica para a proteína alvo e ocorrerá recombinação homóloga (Figura 19). Assim o parasito irá expressar a proteína com a cauda PTP (Proteína C – sitio de clivagem para TEV protease – Proteína A), utilizada para realização da técnica de purificação em *tandem* PTP-tag, sob níveis do promotor natural, ou seja, de acordo com o nível de expressão de cada proteína em dada condição fisiológica. Vale ressaltar que somente um dos alelos será alterado, de forma que a proteína selvagem também será co-expressada.

Foi possível realizar a amplificação da região de interesse e a confirmação das clonagens se deu por meio de PCR de colônia, onde é adicionado na reação de PCR um volume (que varia de acordo com o tamanho da colônia) de colônia diluída em meio LB como DNA molde (Figura 29). Assim, é possível a seleção de colônias transformantes positivas sem a necessidade da extração do DNA plasmidial. Por fim, a construção foi sequenciada no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

Figura 29 - Painei A - Mapa do vetor pC-PTP-Neo. Em azul, PTP-tag. Em verde, tem-se o marcador de resistência a neomicina. E a sequência da proteína (construções de interesse) são substituídas no Gene U1-70k. Painei B - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SybrSafe da confirmação, por PCR de colônia, da clonagem do fragmento gênico de interesse nos vetores pC-PTP-Neo. A seta indica os fragmentos gênicos esperados em três colônias testadas. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Confirmação da transfecção da construção TbSub2 no vetor pC-PTP-Neo

Após a conclusão das etapas de clonagens, a construção foi linearizada com enzima de restrição específica e cerca de 10 µg da mesma foi empregada para transfecção na linhagem 427 de *T. brucei*. A região do gene escolhida para o procedimento supracitado, permite que a proteína inteira receba a extensão PTP que adiciona aproximadamente 19 kDa ao tamanho da proteína nativa. Tal fato pode ser confirmado através da técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo anti-Proteína A, que se encontra nessa extensão. Como observado na figura 30 foi possível inserir corretamente a cauda PTP à proteína TbSub2, demonstrado pela presença da banda de aproximadamente 70 kDa (49 kDa de TbSub2, 19 kDa da extensão PTP). Não se observa reação positiva para a linhagem não transfectada (427, Figura 30).

Figura 30 - *Western Blot* de confirmação da expressão da proteína de interesse fusionadas a cauda do PTP-tag. Sub2-PTP, extrato total revelado com o anticorpo anti-Proteína A (diluição 1:2.000). A banda em torno de 70 kDa demonstra correta expressão de cauda de PTP-tag fusionada a proteína Sub2. 427, *T. brucei* cepa 427 (não transfectada) como controle negativo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para a confirmação dos parasitos transfectados, um oligonucleotídeo externo à construção (5'out) foi construído, em direção à extremidade 5', com distância mínima de 100 pb do oligonucleotídeo direto. Este, juntamente com o oligonucleotídeo para a sequência de proteína C (protC-TAP3') permitiram a verificação da inserção do vetor na posição correta no genoma do parasito pelo método de PCR.

Dessa forma, esperava-se obter uma banda de tamanho correspondente ao tamanho da construção adicionado a cerca de 100 pb, além dos nucleotídeos que são parte da cauda PTP. A PCR permitiu a amplificação de uma banda do tamanho esperado, ou seja, de aproximadamente 800 pb, confirmando que a inserção no DNA genômico devido a recombinação homóloga foi bem sucedida, permitindo dar continuidade aos experimentos de purificação (Figura 31).

Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com Sybr Safe do produto de PCR da construção de TbSub2 amplificada a partir do DNA genômico extraído das culturas transfectadas de *T. brucei*, para confirmação de inserção correta do vetor pC-PTP-Neo no DNA genômico. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Purificação em *tandem* da proteína TbSub2

Tendo a cultura que apresentou resultados positivos para as confirmações por PCR e por *Western Blotting*, foi realizada a purificação dos possíveis sub-complexos de TbSub2 através da purificação em *tandem* pela técnica PTP-tag.

Os produtos das purificações foram aplicados em SDS-PAGE em gel 10% apresentado na figura 32. As canaletas enumeradas de 1 a 5 na figura 32 são correspondentes às 5 frações retiradas durante o processo de purificação. Nota-se que na canaleta correspondente aos produtos finais das purificações (Figura 32, canaleta 5), tem-se a presença de várias bandas correspondentes a prováveis parceiros de interação que se encontravam ligados à proteína TbSub2, ou a proteínas co-eluídas devido à ligação a algum parceiro de interação de TbSub2 ou até mesmo à resina.

Com o procedimento, observou-se no gel a presença de várias proteínas co-eluídas (Figura 32, canaleta 5), sendo que a mais intensa, com massa molecular um pouco abaixo de 70 kDa, trata-se de Sub2-P (resta somente parte da extensão PTP após todos os passos de purificação, figura 20) (Figura 32, *). A majoritariamente de TbSub2 no gel era esperada, pois esse experimento normalmente apresenta uma banda de maior intensidade, correspondente à proteína alvo. Mas além disso, de acordo com estudos já realizados com suas homólogas, essa proteína parece estar envolvida em diversas vias do metabolismo da célula, o que explica tamanha diferença de intensidade entre a banda equivalente a TbSub2 e as outras bandas do gel. Por fim, os resultados indicam se tratar de complexos de elevada massa, dado o alto número de membros purificados, ou mesmo a presença de vários complexos relacionados aos múltiplos papéis que TbSub2 pode desempenhar na célula. As diferentes bandas foram

excisadas do gel, recortadas de acordo com as linhas brancas mostradas na Figura 32 e armazenadas a -20°C, para posterior identificação por espectrometria de massas.

Figura 32 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (12%) contendo as amostras da purificação de Sub2-PTP corado com Sypro Ruby (Invitrogen). Canaleta 1, Input, extrato total inicial; 2, FT-IgG: proteínas que não interagem com a resina IgG sepharose; 3, TEV eluato, proteínas eluídas após clivagem com TEV protease; 4, FT-protC, proteínas que não interagem com a resina anti-proteína C; 5, EDTA/EGTA Eluato, proteínas co-eluídas com as proteínas de interesse. As linhas brancas horizontais indicam as frações separadas para identificação por espectrometria de massas. O marcador de massa molecular está representado em kDa.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 TbSub2 co-elui com proteínas de múltiplas vias do metabolismo de *T. brucei*

Os dados obtidos, através das análises por espectrometria de massas das bandas recortadas da fração do gel correspondente ao eluato final da purificação em *tandem*, identificaram proteínas envolvidas em múltiplas vias do metabolismo do parasito. Dessa forma, para melhor entendimento dos resultados, as identificações foram separadas em tabelas correspondentes a cada via, sendo elas, transcrição, exportação, processamento de mRNA, processamento de rRNA, proteínas relacionadas à microtúbulos, e proteínas hipotéticas conservada de ligadoras de RNA (Figura 33). A identificação com maior *score* foi da própria TbSub2, confirmando que a banda predominante na canaleta 5 do gel da purificação correspondia a mesma.

Figura 33 - Gráfico de pizza do número de proteínas de cada via metabólica do parasito que foram co-eluídas com TbSub2 e identificadas por espectrometria de massas.
Fonte: Elaborada pela autora.

O objetivo principal desse projeto é analisar se a proteína TbSub2 participa do processamento de mRNA em tripanossomatídeos, portanto, o enfoque dessa seção será na análise das proteínas identificadas dessa via (Tabela 4). Nota-se que quatro proteínas envolvidas na maquinaria de *splicing* foram identificadas: Prp19, U5-116K, Sf3b(SAP)145 e Prp31, sendo que todas já haviam sido identificadas em estudos anteriores em *T. brucei*^{133–136}, porém, o envolvimento de TbSub2 com cada uma dessas proteínas não é claro.

Prp19 é a proteína principal do complexo proteico NTC e se mostrou essencial para a viabilidade da célula e para o *cis* e o SL *trans-splicing* em *T. brucei*. Na reação de *splicing* o complexo NTC é incorporado ao splicessomo durante a ativação do complexo B, onde permanece até o término da catálise.^{39, 133} Além disso, estudos em levedura mostraram que o complexo Prp19 é necessário para a ocupação do TREX em genes transcritos, tendo assim, uma função secundária independente na expressão gênica na elongação da transcrição pela estabilização do TREX para transcrição pela RNA polimerase II.¹³⁷ Dessa forma, a identificação de Prp19 traz indícios de que essa proteína interaja com TbSub2 devido à essa função de estabilização do TREX.

A proteína Sf3b(SAP)145 é membro do subcomplexo Sf3b, associado à U2 snRNP e importante para o reconhecimento do BP por essa partícula,¹³⁵ passo subsequente à ação de Sub2/UAP56 na liberação de Msl5 e Mud2. Assim, a copurificação de Sf3b(SAP)145 indica que TbSub2 tem função associada à essa partícula, como esperado, de acordo com as funções já caracterizadas de suas homólogas.¹³⁸

U5-116K é membro da partícula U5 snRNP que é incorporada na ativação do spliceossomo na tri-snRNP formada por U4/U6.U5 e permanece no mesmo até o final da reação de *splicing*.⁴² Já Prp31 apresentou função na associação da tri-snRNP ao pré-spliceossomo, em leveduras, e por outro lado, mostrou ser necessária para a formação do complexo formado por U4/U6.U5.^{136,138} Assim, ambas são incorporadas ao spliceossomo após a formação do pré-spliceossomo,²⁷ ou seja, após a incorporação de U2 snRNP, o que torna curioso suas identificações nesse experimento, podendo ser um indicativo de uma participação de TbSub2 em outros complexos proteicos na catálise, já que as suas homólogas que tiveram seu papel no *splicing* demonstrado se mostraram importantes para a formação do pré-spliceossomo, mais especificamente, na incorporação da partícula U2 snRNP ao pré-mRNA.

Esses estudos trazem indícios de que a proteína de interesse tenha alguma função na reação de *trans* e/ou *cis-splicing* em tripanossomatídeos, porém, outros experimentos são necessários para comprovar essa hipótese. Além das proteínas de *splicing*, foram identificadas proteínas envolvidas na poliadenilação de mRNAs, bem como do capeamento 3'. Sabe-se que a poliadenilação em tripanossomatídeos ocorre simultaneamente ao *splicing*²⁻²³ e isso corrobora com a hipótese de que TbSub2 participe da reação, pois essa reação é concomitante ao *splicing* em tripanossomatídeos. Além disso, sabe-se que o silenciamento de homólogas de Sub2 causa decréscimo da poliadenilação, instabilidade do mRNA e acúmulo de poli-A RNA no núcleo.⁹⁹

Tabela 4 - Proteínas relacionadas à processamento mRNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas. Proteínas relacionadas à poliadenilação estão coloridas de azul, ao capeamento 3' em verde e ao *splicing* em vermelho.

Codigo no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.10.540	ATP-dependent RNA helicase SUB2, putative	2607	27	50867
Tb927.7.1620	Cleavage factor I 25 kDa subunit, putative	93	2	33519
Tb927.7.6180	Axonemal capping structure 1 (ACSI)	91	2	31581

continua

continuação

Tb927.4.1340	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit, putative	66	3	89082
Tb927.2.5240	pre-mRNA splicing factor 19 PRP19	67	1	58798
Tb927.9.10770	Polyadenylate-binding protein 2	57	1	62943
Tb927.11.13970	Pab1p-dependent poly(A) ribonuclease subunit, putative	55	2	58028
Tb927.3.2190	Capping enzyme RNA triphosphatase 1	53	1	30563
Tb927.8.4480	hypothetical protein, conserved associated with the polyadenylation complex	49	1	29155
Tb927.11.15430	U5 snRNP component, putative, U5-116K	46	2	107927
Tb927.10.10880	ATP-binding cassette sub-family F member 1, putative	43	1	78992
Tb927.6.2000	Spliceosome-associated protein, putative, Sf3b(SAP)145	40	1	52983
Tb927.10.10700	Splicing factor Prp31	38	1	40497

 Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, TbSub2 também pode estar envolvida em outro tipo de processamento, o de RNA ribossomal, copurificando com nove proteínas relacionadas ou que são parte desse mecanismo (tabela 6, apêndice A). De fato, estudos de imunoprecipitação de TbSub2 também identificaram proteínas dessa via.¹²¹ Foram detectadas 14 proteínas da via de transcrição, como subunidades das RNAs polimerases I e II, apesar de estudos recentes demonstrarem que o silenciamento dessa proteína pouco altera os níveis de transcrição. A identificação de proteínas relacionadas à via de exportação era esperada, afinal, Sub2 já teve sua essencialidade para a exportação de mRNA elucidada⁹⁸ e, de fato, seis proteínas relacionadas

ao transporte núcleo/citoplasma como nucleoporinas foram identificadas (tabelas 7 e 8, apêndice A). Por fim, também foram identificadas proteínas de ligação a RNA, envolvidas na estabilização de mRNA e possivelmente na regulação da transcrição (tabela 9, apêndice A).

Vale ressaltar, que foram excluídas das análises, proteínas comumente detectadas como contaminantes nesse tipo de experimento, como chaperonas, elementos de transposição, proteínas ribossomais, fatores de elongação, e outras.¹⁰⁻⁵⁷⁻¹³³⁻¹⁴⁰ Foram identificadas proteínas relacionadas ao flagelo e ao complexo de golgi que foram tratados como contaminantes, uma vez que são fatores que não se encontram no núcleo da célula, local onde TbSub2 foi detectada (seção 4.1.6).

Proteínas co-eluídas anotadas no TriTrypDB como hipotéticas conservadas foram submetidas a análises bioinformáticas utilizando ferramentas como o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e servidores envolvidos na predição de domínios proteicos como o Pfam.¹⁴¹ Porém, as análises de algumas dessas proteínas não retronaram informações acerca das mesmas e estas foram agrupadas separadamente (tabela 10, apêndice A). Essas identificações podem englobar, por exemplo, proteínas específicas de tripanossomatídeos que não possuem homologia de sequência com proteínas de outros organismos.

Por fim, proteínas que são relacionadas à microtúbulos foram identificadas e agrupadas. É sabido que proteínas como as tubulinas são comumente identificadas em altos níveis em experimentos de purificação em *tandem* e classificadas como contaminantes, porém, a identificação de proteínas como *AIR9-like protein* e a proteína associada a microtúbulos Tb927.10.10360 pode ser indicativo da participação de TbSub2 em etapas do ciclo celular, como regulação do fuso mitótico, assim como visto para ortólogas da mesma.¹⁴²⁻¹⁴⁴

Uma comparação entre os resultados desse trabalho e estudos já realizados acerca dos subcomplexos de TbSub2¹²¹ mostrou apenas três proteínas em comum, sendo, a RNA helicase FAL1 (envolvida no processamento de rRNA), a proteína de ligação à RNA Alba 4 e a subunidade 2 do complexo de transcrição ccr4-not. Essas discrepâncias nas identificações podem estar relacionadas ao método de purificação aplicado em cada trabalho, pois as composições dos tampões utilizados podem afetar interações proteína-proteína, ou à diferentes metodologias adotadas para realização da espectrometria de massas, trazendo identificações diferentes em sua maioria.

Os dados obtidos por espectrometria de massas não trouxeram informações conclusivas a cerca da função de TbSub2 nas reações de *splicing* ou em outro processo

metabólico. As proteínas interagentes características de TbSub2, como as homólogas de Mud2 de *splicing* e da proteína Yra1 de exportação¹⁴⁵, bem como membros estáveis do complexo TREX não foram identificados. A não identificação de proteínas de *splicing* que comumente interagem com homólogas de TbSub2 pode ser um indício da ausência da participação da proteína nessa etapa do *splicing* em tripanossomatídeos ou até mesmo, um problema de experimentação no decorrer da purificação que ocasionou a perda de interação entre essas proteínas e TbSub2, assim como da proteína com membros do complexo TREX.

4.1.5 Ultracentrifugação em gradiente de sacarose para separação dos possíveis complexos estáveis de TbSub2

A ultracentrifugação permite que uma amostra aplicada no topo de um gradiente de sacarose se disperse pelo tubo por um balanço entre sedimentação e difusão e os diferentes complexos sejam separados de acordo com sua massa molecular e forma em diferentes frações desse gradiente. Assim, um gradiente de 10 a 40% foi montado e o eluato final de duas purificações em *tandem* de TbSub2-PTP (Figura 32, canaleta 5) foi depositado nesse gradiente e submetido a ultracentrifugação por 16h a 41.000 rpm. Para que fosse possível estimar as massas correspondentes às diferentes frações do gradiente após a centrifugação, uma mistura de proteínas cujas massas são conhecidas foi submetida ao mesmo procedimento. Dessa forma, alíquotas de 200 µL dos gradientes foram coletadas e aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (10% v/v) corado com SyproRuby (Invitrogen)(Figura 34).

Figura 34 - Painel A - Eletroforese em gel SDS-PAGE (10%) corado com Sypro Ruby (Invitrogen) contendo alíquotas da separação dos subcomplexos de TbSub2-PTP (seta amarela) por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Os valores de massa acima indicam os intervalos de massas moleculares dos sub complexos encontrados em cada fração do gradiente e os valores ao lado indicam às massas estimadas de cada componente da fração. A linha azul indica a intersecção dos dois géis que foram unidos na imagem. O marcador de massa molecular está representado em kDa.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos através desse experimento demonstram a presença de TbSub2 em todas as frações do gel (seta amarela, figura 34), bem como a predominância deste membro em complexos estáveis de alto peso molecular, presentes em várias frações do gradiente. Utilizando os dados de espectrometria de massas poderia ser possível determinar quais são os membros desses complexos, porém, devido ao fato dos resultados mostrarem um elevado número de identificações em cada fração não é claro quais proteínas correspondem a cada uma das bandas co-purificadas e separadas no gradiente.

Para a caracterização desses complexos será necessário excisar as bandas das diferentes frações e submete-las à espectrometria de massas e assim poder identificar os parceiros de interação mais estáveis de TbSub2.

4.1.6 Imunolocalização da proteína TbSub2 por Imunofluorescência indireta (IFI)

A imunolocalização da proteína TbSub2 em culturas transfectadas na forma procíclica com o anticorpo anti-proteína A, dirigido para a cauda PTP, demonstrou que a proteína se encontra no núcleo do parasito, como esperado (Figura 35).⁹⁸ As homólogas de TbSub2 em humanos e leveduras demonstraram participar de diferentes maquinarias nucleares, como transcrição, processamento de mRNA e exportação núcleo/citoplasma.⁹⁹ O fato de TbSub2 apresentar localização nuclear corrobora com a possível função dessa proteína no processamento de mRNA, bem como com a sua participação como membro do TREX.

Durante a análise das lâminas de fluorescência, foram encontrados parasitos em diferentes estágios de divisão celular e curiosamente notou-se um comportamento inesperado para a proteína TbSub2. Em algumas imagens é possível notar que TbSub2 apresenta comportamento possivelmente semelhante ao fuso mitótico em diferentes etapas do ciclo celular (círculos brancos, Figura 35). De fato, experimentos de sincronização celular são necessários para confirmar esses dados, onde o comportamento da proteína em cada etapa do ciclo celular poderá ser monitorado, em culturas nas quais as células estejam na mesma etapa, utilizando-se marcadores para biomoléculas específicas, como, para proteínas do fuso mitótico. Porém, vale ressaltar que as ortólogas de TbSub2 em humano e *Drosophila sp.* apresentaram resultados que indicam sua participação na regulação do fuso mitótico. A proteína HEL25E, ortóloga de TbSub2 em *Drosophila sp* é essencial para a montagem correta do fuso mitótico em células em S2¹⁴² e uma redução dos níveis dessa proteína resulta em desalinhamento cromossômico e fusos alongados.¹⁴⁴ Em humanos, foi visto que a depleção de UAP56 provoca atraso mitótico e defeitos de coesão da cromátide-irmã e, além disso, a

depleção de outros componentes do TREX humano causa defeitos mitóticos similares.¹⁴³ Esses dados corroboram com os resultados obtidos por espectrometria de massas, onde foram identificadas proteínas relacionadas a microtúbulos, indicando uma função de TbSub2 na regulação do fuso mitótico, assim como suas ortólogas.

Figura 35 - Imunolocalização (IFI) da proteína TbSub2 em formas procíclicas de *T. brucei*, utilizando anticorpo anticorpo Anti-ProtA para a proteína e DAPI para o núcleo. Os círculos brancos destacam comportamento de TbSub2 semelhante ao fuso mitótico.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Dra Andréa Rodrigues Ávila e a Dra Priscila Mazzocchi Hiraiwa, do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná, cederam o anticorpo contra a proteína TbSub2 e foi possível realizar os experimentos de localização da proteína em cepas sanguíneas, realizados em parceria com as mesmas no instituto supracitado. As imagens obtidas mostraram localização nuclear, sugerindo que funções no transporte e processamento do mRNA ocorrem em ambas formas evolutivas (Figura 36). Além disso, não foi obtida nenhuma imagem de parasitos em divisão celular, fato que poderia indicar função associada ao fuso mitótico, assim como observado na forma procíclica. Por fim, assim como para a cepa sanguínea, experimentos de sincronização celular poderiam ser empregados para confirmar esta hipótese.

Figura 36 - Imunolocalização (IFI) da proteína TbSub2 em formas sanguíneas de *T. brucei*, utilizando anticorpo Anti-TbSub2 para a proteína e DAPI para o núcleo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Análise do efeito do *knockdown* da proteína nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*

Nessa etapa do trabalho foi estudado os efeitos do *knockdown* de TbSub2 nas formas procíclica e sanguínea que correspondem, respectivamente, às formas infectivas do inseto vetor e do mamífero. Assim, foi possível analisar as consequências da ausência da proteína nas culturas em si e, mais especificamente, nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*, diferente da maioria dos trabalhos envolvendo o estudo dessa via, onde os experimentos são realizados apenas com a forma procíclica. Estudar as vias metabólicas também na forma sanguínea pode trazer informações importantes acerca de possíveis diferenças nesses metabolismo, principalmente em pontos de regulação, com é o caso da helicase TbSub2.

4.2.1 Clonagem Molecular

A técnica de RNA de interferência é uma poderosa ferramenta no estudo da atividade de uma determinada proteína, sendo possível seu emprego mesmo em membros essenciais para célula. O vetor escolhido neste trabalho foi o sistema pLEW100, que possui apenas um promotor de T7 RNA polimerase, determinando, portanto, a necessidade de clonar o fragmento gênico de interesse de forma oposta. O programa específico *RNAit*, cuja função é sugerir regiões gênicas que possam ser empregadas na técnica de RNAi em *T. brucei*, demonstrou um fragmento de 428 pares de bases, que permite que somente o mRNA de TbSub2 seja degradado. O mesmo foi amplificado com auxílio de uma polimerase termoestável de alta fidelidade a partir do DNA genômico de *T. brucei*, sendo o produto obtido clonado no sistema pTZ57R/T, com posterior confirmação por sequenciamento. Os clones confirmados foram digeridos com as enzimas *MluI* e *XbaI*, cujo produto de digestão foi empregado na ligação no sistema pLEW100 (Figura 37A). Parte da mesma alíquota foi

digerida com *Hind*III e *Xba*I, e o produto foi utilizado para ligação no vetor pJM325. A confirmação de obtenção de clones positivos foi feita a partir de PCR de colônia (Figura 37A). A partir dos clones confirmados, procedeu-se com uma nova digestão utilizando *Hind*III e *Xba*I, e como demonstrado na figura 37B, o vetor pLEW100 foi linearizado, servindo de base para ligação de um inserto de aproximadamente 1000 pares de bases liberado do vetor pJM325. A confirmação da ocorrência da clonagem final, cujo o mesmo fragmento esta disposto de forma oposta contendo uma região espaçadora entre eles, foi feita utilizando um par de oligonucleotídeos desenhados para hibridizar no vetor e na região espaçadora (Figura 37C). A construção foi sequenciada no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SyberSafe das etapas de clonagem do sistema pLEW100. Painel A: Confirmação, por PCR de colônia, da clonagem do fragmento gênico de interesse nos vetores pJM325 e pLEW100. A seta, nos tamanhos de aproximadamente 500 pb, indica os fragmentos gênicos esperados. Painel B: Produtos de digestão com as enzimas *Hind*III e *Xba*I dos vetores, 1, pJM325; e 2, pLEW100. Painel C: Confirmação por PCR de colônia da clonagem final do sistema pLEW100. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 O silenciamento de TbSub2 causa defeito de crescimento em culturas das formas procíclica e sanguínea

Após a transfecção do plasmídeo recombinado nas linhagens procíclica 2913 e sanguínea 9013 de *T. brucei*, seguida de seleção de populações clonais, foi possível acompanhar o crescimento das culturas sob indução com 1 µg/mL de tetraciclina com contagens diárias em câmara de Neubauer, tendo como controle culturas mantidas sem a presença do indutor. Em ambas as linhagens, observou-se claro defeito de crescimento após 24 horas de indução, sendo que em 72 horas observou-se drástica redução no número de células em cultura da forma sanguínea, o que denota efeitos mais drásticos devido ao silenciamento de TbSub2 nessa linhagem (Figura 38). Esses dados mostram que TbSub2 é

essencial nas duas formas do parasito, o que era esperado devido ao fato da mesma possuir múltiplas funções celulares. Vale destacar que para a forma procíclica, presente no inseto, ensaios similares também demonstraram que este membro é essencial.⁹⁸

Figura 38 - Curvas de crescimento de *T. brucei* de culturas de Sub2 RNAi positivo durante 3 dias de indução. Induzido, tet+; não induzido, tet-. Painel A – linhagem procíclica 2913. Painel B – linhagem sanguínea 9013.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 A indução do sistema RNAi causa diminuição dos níveis de mRNA de TbSub2

Apesar dos defeitos de crescimento drásticos observados nas curvas de crescimento, como mostrado na figura 38, experimentos de qPCR utilizando as culturas induzidas e não induzidas de ambas as formas do parasito foram realizados a fim de se analisar a queda dos níveis de mRNA de TbSub2, validando os experimentos de RNAi. As análises foram feitas com a normalização através do gene referência TERT¹²⁵, pois a taxa de transcrição do mesmo não se altera com a adição de tetraciclina.

Para essa análise optou-se pela coleta dos parasitos com 0 e 24 horas de incubação com tetraciclina visando evitar efeitos secundários advindos de longos períodos de ausência da proteína. Os resultados obtidos mostraram claramente a redução dos níveis de mRNA de TbSub2 com a indução por tetraciclina em ambas as linhagens, que foi de cerca de 90% para a forma procíclica e 60% para a sanguínea (Figura 39). Também é possível observar que os valores de quantificação relativa após a normalização (eixo y dos gráficos) diferem em torno de uma a duas ordens de grandeza quando se compara os resultados entre as linhagens e isso se deve ao fato de que o número de células da linhagem sanguínea coletadas, e consequentemente a quantidade de RNA obtida é cerca de 10 vezes menor que da linhagem procíclica. Além disso, foi observado, através dos resultados da seção anterior, que os defeitos de crescimento na linhagem sanguínea são mais intensos, indicando que o silenciamento de TbSub2 tem um efeito negativo maior nessa forma quando comparada à forma procíclica.

Por fim, esses dados demonstram que o sistema de RNAi para o silenciamento do gene de interesse foi construído corretamente e está funcionando, possibilitando a realização de experimentos para análise dos efeitos desse silenciamento na reação de *splicing*.

Figura 39 - Análises por PCR em tempo real (qPCR) de células não tratadas (sem adição de tetraciclina, Sub2 NInd) e tratadas (com adição de tetraciclina, Sub2 Ind) por 24 horas. Utilizou-se o gene de referência TERT. Paineis A - linhagem procíclica 2913. Paineis B - linhagem sanguínea 9013. O eixo vertical corresponde aos valores de Q/Q_{ref} .

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5 O silenciamento de TbSub2 interfere nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*

Após confirmação da redução do número de transcritos específicos de TbSub2, as células induzidas com tetraciclina foram avaliadas quanto a possíveis defeitos nas reações de *cis* e SL *trans-splicing*. Foi utilizada a técnica de RT-PCR semi-quantitativa para avaliar a taxa de transcritos processados e não processados, de acordo com Cicarelli et al.¹²⁶

O resultado das amplificações mostrou diferentes intensidades de bandas amplificadas para cada amostra de ambas as linhagens, o que mostra que a quantidade de cada transcrito varia conforme a indução com tetraciclina. Para a forma procíclica foi possível realizar os experimentos com quatro tempos de indução diferentes (0, 24, 36 e 48 horas) (Figura 40a), porém, para linhagem sanguínea, devido aos pronunciados defeitos de crescimento, utilizou-se indução por 0 e 24 horas (Figura 41a). Como controle de carregamento foi utilizado o transcrito de 7SL, não processado por *splicing*.¹⁴⁶

A fim de facilitar a interpretação dos dados obtidos, o *software ImageJ* foi utilizado para gerar gráficos comparativos das intensidades das bandas amplificadas nas culturas induzidas em relação à cultura não induzida.

Para a forma procíclica, observou-se diferenças de comportamento entre a reação de *cis* e SL *trans-splicing*. Para o transcrito de α -tubulina observou-se elevação dos níveis da

forma não processada do transcrito até 36 horas e nítida diminuição dos níveis da forma processada, apesar de ter ocorrido um leve aumento em 24 horas. Esse comportamento é próximo ao esperado para outras proteínas essenciais para o *splicing*^{42, 134}, onde se observa uma diminuição dos níveis de transcrito processado e um acúmulo de transcrito não processado ao longo dos tempos de indução, mostrando que o *splicing* não está ocorrendo da forma como deveria (onde não se observaria diferenças entre os níveis de transcrito nos diferentes tempos de indução) na ausência da proteína. A obtenção de dados que mostram um comportamento parecido dos níveis de transcrito de α -tubulina com o silenciamento de TbSub2 indicam que essa proteína participa da reação de SL *trans-splicing*. O ponto de 48 horas apresentou redução em todas as análises e esse fato pode ter relação com efeitos secundários advindos de longos períodos sem os efeitos da proteína (Figura 40b).

Nas análises de *cis-splicing*, a participação de TbSub2 foi verificada utilizando iniciadores direcionados para o gene da Poli A polimerase (PAP), previamente descrito por Mair *et al* 2000¹² como sendo processado por *cis-splicing*. Os iniciadores sintetizados para esta reação foram capazes de se ligar nos *exons*, flanqueando o *intron* encontrado neste gene. Assim, após 36 horas observou-se intensa redução nas quantidades de transcrito não processado e uma pequena diminuição da forma processada, e o comportamento do transcrito de PAP apresentou comportamentos parecidos para ambas suas formas (processada e não processada), com um aumento dos níveis no ponto de 24 horas e uma diminuição nos pontos de 36 e 48 horas. Esse resultado indica que TbSub2 não tenha um papel direto na reação de *cis-splicing* na forma procíclica e que esse efeito seja devido a alguma outra função da proteína no parasito, ou até mesmo à efeitos secundários causados pelo silenciamento da mesma (Figura 40b).

Figura 40 - Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos de α -tubulina não processado (Pre- α -tub), transcrito de α -tubulina processado (α -tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP), transcrito de Poli A Polimerase processado e 7SL. a) eletroforese em gel de agarose dos produtos das RT-PCRs semi-quantitativas realizadas com culturas da forma procíclica com 0 (NI), 24, 36 e 48 horas de indução com tetraciclina. b) Gráficos derivados do experimento de RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos em linhagens da forma procíclica com 0 (NI), 24, 36 e 48 horas de indução com tetraciclina. Painei A – transcrito de α -tubulina não processado (Pre- α -tub). Painei B - transcrito de α -tubulina processado (α -tub). Painei C - transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP). Painei D - transcrito de Poli A Polimerase processado (PAP).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a linhagem sanguínea os experimentos demonstraram que ao longo de 24 horas de indução o nível de transcrito processado de α -tubulina diminui e o da forma não processada aumenta. Este resultado demonstra que a ausência de Sub2 reduz os níveis de processamento por SL *trans-splicing*, comportamento comumente observado para outras proteínas de *splicing*.^{42,134} Esse comportamento é semelhante ao observado com o silenciamento de TbSub2 na cultura da forma procíclica, indicando que essa proteína deve desempenhar uma função da reação de SL *trans-splicing* nas duas linhagens (Figura 41b).

Por outro lado, ao longo do tempo de indução com tetraciclina foi possível observar pequenas reduções nos níveis de transcritos das formas processadas e não processadas do transcrito de PAP. Esse resultado é um indicativo de que TbSub2 não interfere no *cis-splicing* diretamente e que esse efeito de diminuição seja devido à alguma outra função da proteína no parasit, ou à efeitos secundários causados pelo silenciamento da mesma. Novamente, é

curioso relembrar que no ponto de 24 horas das culturas da forma procíclica para o transcrito de PAP ocorre um aumento dos níveis do mesmo em ambas suas formas, porém em tempos maiores de indução é nítida sua diminuição. Esse fato, somado a observação dos efeitos do silenciamento de TbSub2 nas células da forma sanguínea, indicam que a ausência dessa proteína tenha o mesmo efeito indireto no *cis-splicing* em ambas as linhagens (Figura 41b).

A partir desses resultados, é possível indicar que TbSub2 participe da reação de SL *trans-splicing* em ambas as formas estudadas do parasito, porém, o mesmo não pode ser afirmado com relação a reação de *cis-splicing*, onde o efeito da ausência da proteína é o mesmo nas formas processada e não processada do transcrito de PAP. Assim, mais experimentos são necessários para corroborar com a hipótese de que TbSub2 só participe do SL *trans-splicing* em *Trypanosoma brucei*.

Figura 41 - Análise por RT-PCR semi-quantitativa de transcritos de α -tubulina não processado (Pre- α -tub), transcrito de α -tubulina processado (α -tub), transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP), transcrito de Poli A Polimerase processado e 7SL. a) eletroforese em gel de agarose dos produtos das RT-PCRs semi-quantitativas realizadas com culturas da forma procíclica com 0 (NI) e 24 horas de indução com tetraciclina. b) Gráficos derivados do experimento de RT-PCR semi-quantitativa de transcritos específicos em linhagens da forma procíclica com 0 (NI) e 24 horas de indução com tetraciclina. Painel A – transcrito de α -tubulina não processado (Pre- α -tub). Painel B - transcrito de α -tubulina processado (α -tub). Painel C - transcrito de Poli A Polimerase não processado (Pre-PAP). Painel D - transcrito de Poli A Polimerase processado (PAP).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6 O silenciamento de TbSub2 causa acúmulo de SL exon

Experimentos de qPCR (do inglês, *quantitative* PCR) em tempo real permitem a quantificação dos níveis de determinado gene durante a sua amplificação. Assim, os RNAs totais de culturas da forma sanguínea cujo silenciamento de TbSub2 foi induzido por 24, 36 e 48 horas foram extraídos, bem como de uma cultura não induzida e de uma tratada com sinefungina (substância que impede o SL *trans-splicing*). A partir desses RNAs, cDNAs foram sintetizados e usados para a reação de qPCR.

Para essas reações foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos. Um deles amplifica uma região do SL-RNA, que é o alvo do experimento, e o outro amplifica uma região do 7SL, não processado por *splicing*. Dessa forma, as taxas de amplificação do 7SL podem ser utilizadas para a normalização dos dados. Os cálculos de eficiência dos pares de oligonucleotídeos foram feitos a partir do coeficiente angular da curva de amostras amplificadas contendo uma mesma quantidade inicial de cDNA e diluições seriadas dos iniciadores. Assim o modelo de Pffaf¹²⁷ pode ser utilizado para análise comparativa entre os níveis de SL-RNA nas diferentes amostras. Este modelo não precisa de curva de calibração e os níveis de controle são incluídos no modelo para padronizar cada reação em relação à integridade do RNA, carga da amostra e variações inter-PCR.¹²⁷ Esse experimento foi conduzido no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná, em colaboração com as Dras Andréa Rodrigues Ávila e Priscila Mazzocchi Hiraiwa.

Os resultados obtidos foram organizados na forma de um gráfico, para facilitar a análise dos resultados, onde os níveis de SL-RNA em cada uma das etapas de indução é comparado com os níveis de SL-RNA na cultura não induzida, mostrando assim um aumento desse transcrito nas culturas induzidas por 24, 36 e 48h além do controle positivo com sinefungina de aproximadamente 1,5 vezes (50%), 2 vezes (100%), 3,6 vezes (260%), e 1,7 vezes (70%) respectivamente, com relação à cultura não induzida. Com isso, nota-se um aumento gradativo nos níveis de SL-RNA com a indução do RNAi, ou seja, o silenciamento de TbSub2 causa um acúmulo de SL-RNA, indicando que o SL *trans-splicing* não está ocorrendo na ausência da proteína (Figura 42) . Dados ainda não publicados de *primer extension*, obtidos pela Dra Priscila Mazzocchi Hiraiwa demonstram um comportamento semelhante de acúmulo de SL-RNA em culturas da forma procíclica RNAi induzidas. Esses resultados corroboram com os dados de RT-PCR para uma possível função de TbSub2 na reação de SL *trans-splicing*, apesar dos dados de espectrometria de massas não indicarem de qual complexo participe.

Figura 42 - Gráfico dos níveis de SL-RNA obtidos por qPCR presente em culturas da forma sanguínea induzidas com tetraciclina por diferentes períodos em comparação à cultura não induzida, bem como da cultura tratada com sinefungina (controle positivo).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Identificação do estado oligomérico da proteína recombinante

Os experimentos correspondentes aos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3 foram desenvolvidos com o auxílio da estudante Catherine Ortheaga Gómez do programa *Undergraduate Internships for Biological Research in Brazil*, durante seu estágio de dois meses no laboratório.

4.3.1 Clonagem molecular

Para expressão e purificação de TbSub2 decidiu-se utilizar um sistema que possibilita clonagem sem auxílio de T4 DNA ligase, do inglês *Ligation Independent Cloning* (LIC). Tal ferramenta gera extremidades coesivas, que propiciam a ligação de um mesmo inserto em diferentes vetores tratados para o LIC, assim como permite o tratamento de diferentes insertos sem a preocupação com impossibilidade de usar determinadas enzimas de restrição. Utilizou-se a ferramenta ProtParam (*Swiss Institute of Bioinformatics*) para obter informações como número de aminoácidos, massa molecular, dentre outras informações importantes (Tabela 5) da proteína Sub2 por meio do fornecimento da estrutura primária proteica.

Tabela 5 - Informações referentes à proteína Sub2/UAP56 de *T. brucei*, fornecidas pela ferramenta ProtParam (Swiss Institute of Bioinformatics).

Número de aminoácidos	436,00
Massa molecular estimada (kDa, quilodaltons)	49.22
Ponto isoelétrico teórico	6,20
Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 280 nm, medido em água)	18.910,00

Fonte: Elaborada pela autora.

A clonagem no sistema LIC foi bem sucedida e confirmada por PCR de colônia utilizando oligonucleotídeos que se hibridizam antes e depois da região onde o inserto se liga e um clone foi sequenciado no laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo. A figura 43 mostra as bandas amplificadas na PCR de quatro colônias no tamanho esperado.

Figura 43 - Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com SyberSafe da confirmação, por PCR de colônia, da clonagem de TbSub2 no sistema pET-Trx-1a/LIC. Padrão de peso molecular Fermentas *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Expressão heteróloga de TbSub2 em *E. coli*

Após a clonagem utilizando o sistema LIC, o plasmídeo recombinado foi transformado na linhagem de expressão *E. coli* Rosetta-gami 2 (Novagen). Esta cepa fornece cópias extras de tRNAs raros, permitindo contornar o problema do *codon usage* em *E. coli*, além de mutações em genes que auxiliam na formação de ligações de dissulfeto no citoplasma da célula. Em ensaios de expressão realizados a 18°C utilizando 0,5 mM de IPTG, amostras em determinados intervalos de tempo foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE. Além disso, foi verificada a expressão em culturas crescidas em meio autoindutor TB modificado, que não necessita da adição de IPTG para indução da expressão. A análise dos resultados

permitiram identificar uma banda correspondente à proteína em estudo, como demonstrado pela banda relativamente densa próxima à altura de 66 kDa, sendo a estimativa para proteína em estudo contendo a extensão adicionada pelo vetor, de 63,2 kDa (49,2 kDa de TbSub2, 14,0 kDa da cauda de histidinas e proteína tioredoxina, além do sítio de clivagem para TEV protease) (Figura 44A). Nota-se que TbSub2 foi expressa em níveis maiores quando submetida a 0,5 mM de IPTG por 16 horas de incubação a 18 °C. Porém, a expressão também ocorreu no meio autoindutor utilizado e essa condição foi escolhida, por ser mais simples e de custo menor (Figura 44A). Estabelecida a condições de expressão da proteína TbSub2, utilizaram-se três diferentes tampões para verificar a solubilidade da mesma. Como demonstrado na figura 44B, TbSub2 se mostrou solúvel nos tampões contendo 50mM de fosfato (pH 7,4), 50 mM de Hepes (pH 7,5) e 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), sempre adicionados de 300 mM de NaCl e 5 % (M/V) de glicerol. Porém, em Tris-HCl observou-se uma banda de maior intensidade da proteína na porção solúvel quando comparada com a porção insolúvel (Figura 44B).

Figura 44 - Ensaios de expressão de Sub2. Painel A: Eletroforese em gel 12% SDS-PAGE, corado com Coomassie Blue Brilhante R-250, referente ao teste de expressão realizado a 18°C, 0,5 mM de IPTG, em meio de cultivo *Lysogeny broth* (LB). Em 1, 0 hora de indução; 2, 2 horas; 3, 4 horas; 4, 16 horas; 5, em meio de cultivo autoindutor. A seta indica a banda densa referente a TbSub2 superexpressa. Painel B: Eletroforese em gel SDS-PAGE, corado com Coomassie Blue Brilhante R-250, referente ao teste de solubilidade em diferentes tampões. P, fração insolúvel; S, fração solúvel. A seta indica a proteína Sub2 nas diferentes canaletas. O padrão de massa molecular refere-se a kDa

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.3 Purificação da proteína TbSub2 recombinante

Uma vez que a utilização do tampão Tris-HCl demonstrou possuir a maior fração de proteína solúvel, decidiu-se prosseguir para purificação utilizando o mesmo. A purificação foi

realizada em três etapas, sendo duas cromatografias de afinidade e uma de exclusão molecular.

A primeira etapa foi realizada em resina *TALON® Metal Affinity* (Clontech), que permite coordenação entre os íons cobalto e os grupos imidazólicos das histidinas adicionadas pelo vetor. Dessa maneira, espera-se que a proteína TbSub2 que é expressa fusionada a uma extensão contendo um sítio pra clivagem com TEV protease, uma tiorredoxina que auxilia na solubilização da proteína e uma sequência de histidinas permaneça ligada à resina até a sua eluição com tampão B contendo alta concentração de imidazol. No cromatograma da purificação é possível observar a presença de três picos principais, sendo que o primeiro é correspondente à etapa de lavagem da resina, onde a baixa concentração de imidazol presente no tampão A influenciou essa eluição. Os outros dois picos correspondem à etapa de eluição com 15 e 25% de tampão B. A eletroforese em gel 12% SDS-PAGE mostrou que em todas as frações coletadas dos picos há a presença de TbSub2, porém somente as amostras obtidas na eluição possuem uma taxa de pureza considerável (Figura 45). Assim, todas as frações correspondentes aos dois picos foram unidas e submetidas à clivagem com TEV protease.

Figura 45 - Purificação por Cromatografia de Afinidade em resina *TALON® Metal Affinity* (Clontech) de TbSub2. Paine A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brilhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Afinidade em resina *TALON® Metal Affinity* (Clontech) de TbSub2. Canaleta 1, Fração solúvel obtida após clarificação do extrato proteico; canaleta 2, Proteínas que não interagem com a coluna contendo resina; canaleta 3, fração referente a lavagem com tampão A; canaleta 4, fração referente ao primeiro pico obtido ainda na etapa de lavagem; canaletas 5 - 10, frações referentes a eluição com 15% de tampão B; canaletas 11-14, frações referentes a eluição com 25% de tampão B. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Paine B: Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação de TbSub2 recombinante. Pico 1, proteínas que não aderiram à coluna; pico 2, fração eluída ainda na etapa de lavagem; pico3; fração eluída com 15% de tampão B; pico 4, fração eluída com 25% de tampão B. A linha azul corresponde a concentração de tampão B em cada etapa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como a etapa de retirada da cauda geralmente apresenta clivagem parcial, uma nova cromatografia de afinidade, agora em coluna HisTrap™ High Performance (*GE Healthcare*) foi realizada a fim de separar as proteínas cujas extensões foram retiradas daquelas que permanecem com a mesma. Nessa etapa, as amostras de interesse correspondem à fração não-ligada (*flow-through*) da coluna, pois a proteína de interesse não possui mais a sequência de histidinas que lhe conferia afinidade pela resina. Assim, é possível observar no cromatograma e na eletroforese em gel 12% SDS-PAGE que a clivagem foi eficiente e que o largo pico correspondente as amostras que não se ligam à resina possui predominantemente a proteína TbSub2 (Figura 46). Assim, as frações correspondentes foram reunidas e concentradas utilizando o sistema Amicon Ultra, com corte de 30 kDa.

Figura 46 - Purificação por Cromatografia de Afinidade em resina HisTrap™ High Performance (*GE Healthcare*) de TbSub2. Painel A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brillhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Afinidade em resina HisTrap™ High Performance (*GE Healthcare*) de TbSub2. Canaleta 1, proteína antes da clivagem com TEV protease; canaleta 2, proteína após a clivagem com TEV protease; canaleta 3 e 4, frações referentes às proteínas que não aderem à resina (pico1 do cromatograma); canaleta 5, fração referente a lavagem com tampão A2; canaletas 6 e 7, frações referentes a eluição com 100% de tampão B. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Painel B: Perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação de TbSub2 recombinante. Pico 1, proteínas que não aderiram à coluna; pico 2, fração eluída com 25% de tampão B. A linha azul corresponde a concentração de tampão B em cada etapa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foi realizada a Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC), onde se observou um padrão cromatográfico com três picos principais, sendo que o pico 2, com volume de eluição de 15,58 mL, apresentava a maior fração da proteína de interesse. Ao se analisar a amostra por eletroforese em gel SDS-PAGE foi possível observar a presença de

uma banda próxima de 45 kDa. O cálculo da massa molecular para o pico 2, levando em conta calibração realizada, foi de aproximadamente 55 kDa, o que demonstra que a proteína purificada está organizada como monômero, uma vez que sua massa teórica está em torno de 49 kDa. Tal dado está de acordo com o observado para a proteína de *T. cruzi*.¹²⁰ Observa-se que no pico 1 há a presença da proteína de interesse, mas o volume de eluição demonstrava que a mesma estava na frente de corrida da coluna, indicando que parte da proteína purificada se encontrava agregada. Portanto, as frações referentes a este pico não foram usadas em etapas subsequentes. As frações correspondentes ao pico 3 também foram desconsideradas por apresentar uma concentração muito baixa de TbSub2, além de seu volume de eluição ser correspondente à proteínas de massas muito menores que a proteína de interesse (Figura 47).

Os resultados mostram a obtenção da proteína TbSub2 recombinante com uma pureza considerável, prosseguindo com os experimentos de caracterização desta proteína.

Figura 47 - Purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) de Sub2. Painei A: Eletroforese em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue Brilhante R-250 das frações recolhidas após Cromatografia de Exclusão Molecular de Sub2. Canaleta 1, amostra aplicada na coluna; canaleta 2 e 3, frações eluídas correspondentes ao pico 1 da SEC; canaletas 4-9, frações eluídas correspondentes ao pico 2 da SEC; canaleta 10 e 11, frações eluídas correspondentes ao pico 3 da SEC. O marcador de massa molecular está representado em kDa. A seta vermelha indica as frações coletadas. A seta preta indica a banda correspondente à proteína de interesse. Painei B: Perfil cromatográfico da purificação de Sub2 recombinante. O segundo pico representado, cuja eluição ocorreu em torno de 84,4 mL de amostra aplicada, correspondem à eluição da proteína de interesse.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Esse experimento foi realizado a fim de analisar a homogeneidade da proteína TbSub2 recombinante em solução, após todas as etapas de purificação. A amostra apresentava concentração de 2 mg/mL, o raio hidrodinâmico calculado foi de 8 ± 3 nm e a massa estimada

da proteína em solução, calculada como se TbSub2 fosse globular e possuísse raio igual ao raio hidrodinâmico, foi de 90 ± 30 kDa . Os dados obtidos mostram que a proteína apresenta um estado oligomérico predominante de massa próxima a 90 kDa, que se aproxima da massa teórica de um dímero. Porém, esse valor é pouco preciso, pois apresenta um erro associado relativamente alto e está no intervalo correspondente a massa de um monômero e de um dímero, de forma que não foi possível estimar o estado oligomérico de TbSub2 por meio dessa técnica. Entretanto, o resultado desse experimento indica que a proteína apresentava homogeneidade de massa em solução, pois apresenta um pico único no gráfico de distribuição de tamanho por massa (Figura 48).

Figura 48 - Distribuição de tamanho pela massa da proteína TbSub2 recombinantes em solução.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.5 Eletroforese em gel nativo para análise do estado oligomérico

Para tentar estabelecer o estado oligomérico de TbSub2 em solução, foi realizado um experimento de gel nativo, onde não há a desnaturação da proteína e a mesma pode migrar através do gel de acordo seu estado oligomérico. Curiosamente, o gel mostrou uma banda única correspondente a um tamanho de aproximadamente 200 kDa o que indica que a proteína se encontrava numa conformação tetramérica, e não dimérica ou monomérica como se esperava devido aos experimentos de cromatografia de exclusão molecular e de DLS (Figura 49). Esse estado oligomérico pode estar relacionado ao fato de que as quantidades de sal devem ser baixas para realização desse experimento, o que pode tornar a proteína menos estável e influenciar sua oligomerização.

Figura 49 - Eletroforese em *PhastGel® Gradient Pre-cast Gels* 10-15% (GE healthcare), corado com *Coomassie Blue Brilhante R-250*, mostrando que o estado oligomérico predominando de TbSub2 em experimentos de gel nativo é de tetrâmeros. O padrão de massa molecular refere-se a kDa.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.6 Fluorimetria de varredura diferencial (DSF)

A fim de encontrar uma condição de maior estabilidade para a proteína TbSub2 recombinante, objetivando futuros ensaios de cristalização, a técnica de DSF foi empregada utilizando um kit contendo 96 soluções diferentes. Primeiramente um teste de concentração foi realizado a fim de estabelecer as melhores concentrações de proteína e corante SyproOrange (dados não mostrados). Dessa forma, 25 μ M da proteína e SyproOrange concentrado 10x foram utilizados na proporção de 1:1 proteína/tampão.

Sabe-se que a temperatura de desenovelamento (T_m , temperatura de *melting*) está diretamente relacionada à estabilidade da proteína em solução, pois a mesma representa a temperatura na qual a proteína perdeu aproximadamente metade de sua estrutura¹⁴⁷. Assim, um incremento no valor da T_m indica aumento de estabilidade térmica, pois significa que a proteína suporta temperaturas maiores sem perder sua estrutura.

Do teste de concentração realizado notou-se que TbSub2 apresentava uma T_m de aproximadamente 43°C no tampão adotado para sua lise e purificação. Dessa forma, foi construído um gráfico com os valores de ΔT_m correspondentes as novas condições testadas, de forma que o valor de ΔT_m é dado pela T_m da proteína em cada solução subtraída de 43°C. Os dados obtidos mostraram um aumento no valor da T_m em algumas condições e o maior deles foi utilizando tampão fosfato contendo 700 mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado e 1300 mM de fosfato de potássio dibásico em pH 7,4 (Figura 50, seta vermelha). Esse tampão possibilitou um aumento de 7°C na T_m da proteína, o que significa

um ganho de estabilidade térmica da mesma, e assim, essa condição foi escolhida para ser testada nos ensaios de cristalização.

Figura 50 - Gráfico de DSF de ΔT_m para as soluções do kit *Solubility & Stability Screen 2* – (Hampton Research). A ΔT_m foi calculada subtraindo a T_m da proteína obtida em cada solução do kit e a T_m da mesma em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.7 Ensaios de cristalização

Por fim, os testes de cristalização foram realizados visando a obtenção de cristais da proteína TbSub2, possibilitando a resolução da estrutura da mesma por meio da técnica de difração de raios X.

Para realização dos testes, foram utilizadas três concentrações de proteína (5, 10 e 15 mg/mL) em dois tampões diferentes. O primeiro sendo o tampão utilizado durante a lise e purificação de TbSub2 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl e 5 % (M/V) de glicerol) e o segundo o tampão fosfato descrito na seção 4.3.6 por ser um tampão que mostrou, pelos experimentos de DSF, proporcionar um ganho de estabilidade da proteína. Também foram adicionados ao tampão fosfato citado 300 mM de NaCl e 5 % (M/V) de glicerol.

Foram testadas condições de cristalização presentes em cinco kits, *Crystal Screen HT*TM (Hampton Research), *Index HT* (Hampton Research), *JCSG Screen* (Molecular Dimensions), *Morpheus HT* (Molecular Dimensions), *SG1 Screen* (Molecular Dimensions). As caixas de cristalização foram feitas com auxílio do robô de cristalização *Crystol Gryphon* (Art Robinson Instrument) e estão sendo acompanhadas, porém, até o momento não foi observada a formação de cristais de proteína. Novas condições de cristalização ainda podem ser testadas, bem como outras temperaturas de incubação.

5 DISCUSSÃO

A primeira parte dos objetivos do projeto envolvia o estudo de uma possível função da helicase TbSub2 nas reações de *cis* e SL *trans-splicing* em tripanossomatídeos, através identificação dos seus parceiros de interação e de análises de possíveis defeitos de *splicing* em células RNAi induzidas.

A técnica de purificação em *tandem* pela cauda PTP vem sendo utilizada para a caracterização dos componentes de diversas vias em tripanossomatídeos, incluindo *splicing*. Um experimento onde a proteína SmD1, presente em todas as snRNPs, foi utilizada como alvo nessa técnica¹³⁴, permitiu a identificação de várias proteínas e fatores de *splicing* e desde então muitos outros trabalhos foram realizados baseados nessa técnica, possibilitando a caracterização de novos componentes trans-spliceossomais.^{42, 125}

TbSub2 é uma helicase conservada em toda a escala evolutiva e estudos com suas homólogas já revelaram sua participação em múltiplas vias do metabolismo celular, principalmente em estágios da maturação do mRNA.⁹⁹ Como membro do complexo TREX, sabe-se que Sub2/UAP56 está envolvida na transcrição e exportação de mRNA e na interação com o complexo EJC, mas além disso, seu papel na reação de *splicing* já foi descrito em humanos e leveduras. Os dados de espectrometria de massas obtidos nesse trabalho, possibilitaram a identificação de proteínas relacionadas à diversos mecanismos moleculares do parasito, mostrando que em tripanossomatídeos TbSub2 tem múltiplas funções. A detecção de proteínas de exportação de mRNA corroboram com função descrita de Sub2 em tripanossomatídeos.⁹⁸ Além disso, proteínas relacionadas à transcrição, como RNAs polimerases também foram identificadas, apesar de estudos recentes mostrarem que o silenciamento de TbSub2 pouco interfere nas taxas de transcrição.¹²¹

Até o momento, a possível função de TbSub2 na reação de *splicing* permanece incerta. Alguns experimentos realizados recentemente permitiram a identificação de parceiros de interação de TbSub2 em experimentos de imunoprecipitação.¹²¹ No presente trabalho identificaram-se proteínas participantes da reação de *splicing* Prp19, U5-116K, Prp31 Sf3b(SAP)145 trazendo indicativos de que TbSub2 participe dessa reação. A identificação de Prp19 pode estar relacionada a função de estabilização do TREX pela mesma ou até a uma função de TbSub2 em outras etapas de *splicing* que Prp19 participa. O indício de que TbSub2 participe de outras etapas da reação supracitada é reforçado com a identificação de U5-116K e Prp31, pois as três identificações são incorporadas ao splicessomo após a formação do pré-splicessomo,²⁷ ou seja, após a incorporação de U2 snRNP. Entretanto, esses dados não

convergem para uma conclusão da função de TbSub2 baseado nas funções já caracterizadas em seus ortólogos, que se mostraram essenciais para a formação do pré-spliceossomo, onde são recrutadas para à região próxima ao BP para mediar a liberação de Msl5 e Mud2 e para permitir a ligação de U2snRNP ao BP.^{65, 80} A única identificação que traz indícios dessa função para TbSub2 é o fator de *splicing* Sf3b(SAP)145, componente pertencente ao SF3b, complexo proteico associado a U2 snRNP. Entretanto, a ausência de proteínas como Mud2, que teriam interação direta com TbSub2, indica que este membro possa participar de complexos spliceossomais em tripanossomatídeos distintos daqueles identificados em outros organismos. Estudos recentes identificaram TbSub2 em amostras de imunoprecipitações utilizando como “isca” a proteína U2AF35 (ortóloga a Mud2 em tripanossomatídeos), o que traz indícios de uma função de TbSub2 na reação de *splicing* semelhante às suas ortólogas, apesar de U2AF35 não ter sido identificada nos experimentos realizados nesse trabalho.¹²¹ A não identificação de proteínas como U2AF35 ou que já foram identificadas em estudos anteriores¹²¹ pode ser devido à metodologia aplicada nesse trabalho, como por exemplo, os tampões utilizados durante a purificação que podem interferir nas interações proteína-proteína.

Buscando a obtenção de dados que fornecessem maiores informações acerca da participação de TbSub2 na reação de *splicing*, culturas de linhagem da forma procíclica e sanguínea foram transfectadas com o vetor pLEW100, possibilitando o uso da técnica de RNA de interferência e assim, a indução do silenciamento da proteína, e assim, analisar os efeitos que a ausência da mesma causa no parasito. Estudos anteriores indicam que TbSub2 é essencial para o crescimento de linhagens da forma do inseto (procíclica)⁹⁸, e nesse trabalho buscou-se mostrar a essencialidade desta proteína também para forma sanguínea (forma do hospedeiro mamífero). Em nossos experimentos, as curvas de crescimento obtidas com o acompanhamento de culturas RNAi não induzidas e induzidas mostraram que o silenciamento de TbSub2 teve efeitos negativos em ambas as linhagens, onde um drástico defeito de crescimento foi observado.

Análises por RT-PCR apresentaram resultados semelhantes para ambas as linhagens. Notou-se que para a reação de SL *trans-splicing* ocorre o acúmulo de transcrito não processado e redução dos níveis de transcrito processado de α -tubulina em culturas RNAi induzidas, mostrando que a ausência da proteína afeta consideravelmente a reação de SL *trans-splicing*, comportamento semelhante ao observado para outras proteínas de *splicing*.⁴²⁻⁴⁸ Além disso, o mesmo experimento mostrou que para a reação de *cis-splicing* o silenciamento de TbSub2 causa o mesmo efeito de redução de ambas as formas do transcrito de PAP,

indicando que essa proteína não interfere nessa reação, sugerindo que a redução observada foi devido à efeitos secundários causados pela ausência de TbSub2.

Por fim, estudos anteriores haviam mostrado acúmulo de SL-RNA, precursor da reação de SL *trans-splicing* devido ao silenciamento de TbSub2 em células da linhagem procíclica¹²¹. De fato, com os experimentos de qPCR realizados nesse trabalho, foi possível constatar um acúmulo de SL-RNA também para culturas induzidas da forma sanguínea.

Os experimentos de identificação dos parceiros de interação de TbSub2, bem como a sua localização celular trouxeram dados curiosos. Em algumas imagens obtidas foram encontrados parasitos em diferentes estágios de divisão celular e foi possível notar que TbSub2 apresenta comportamento possivelmente semelhante ao fuso mitótico. Porém, outros experimentos, como por exemplo IFI acoplada a sincronização celular, são necessários para confirmação desses dados, onde o comportamento da proteína em cada etapa do ciclo celular poderá ser monitorado, em culturas nas quais as células estejam na mesma etapa, utilizando-se marcadores para biomoléculas específicas, como, por proteínas do fuso mitótico. Sabe-se que ortólogas de TbSub2 em humano e *Drosophila sp* apresentaram resultados que indicam sua participação na regulação do fuso mitótico. A proteína HEL25E, ortóloga de TbSub2 em *Drosophila sp* é essencial para a montagem correta do fuso mitótico em células em S2¹⁴² e uma redução dos níveis dessa proteína resulta em desalinhamento cromossômico e fusos alongados.¹⁴⁴ Em humanos, foi visto que a depleção de UAP56 provoca atraso mitótico e defeitos de coesão da cromátide-irmã.¹⁴³ Além disso, proteínas classificadas como relacionadas a microtúbulos foram identificadas, reforçando a hipótese de que TbSub2 possa ter função na regulação do fuso mitótico no parasito.

UAP56 em células de mamífero teve sua estrutura determinada em 2004¹¹⁹ mostrando ser composta por dois domínios RecA conectados por uma alça flexível. Além disso, a ligação de NTP causa mudanças conformacionais na alça, bem como da intersecção dos domínios C e N-terminal. Dados obtidos por cromatografia de exclusão molecular para TcSub2 de *Trypanosoma cruzi* mostraram que a proteína se encontrava na forma monomérica, como observado para TbSub2.¹²⁰ Porém, os experimentos de DLS e gel nativo aqui mostrados não corroboraram com esse resultado, pois o primeiro resultou, apesar do erro de medida relativamente alto, em uma massa estimada mais próxima do valor de massa de um dímero de TbSub2 e o segundo apresentou um valor de massa correspondente à um tetrâmero. De fato, não está claro se a forma funcional da maioria das proteínas DExD/H-box é um dímero ou monômero e resultados para a homóloga UAP56 mostraram que a mesma migra em uma coluna de gel filtração com um tamanho correspondente ao intervalo entre um monômero e

um dímero e esse comportamento pode estar relacionado à existência da alça flexível,¹¹⁹ de forma que os resultados obtidos nesse trabalho condizem com essa ambiguidade de conformação da proteína.

O experimento de DSF permitiu a identificação de uma condição onde a proteína TbSub2 recombinante possui uma temperatura de *melting* mais alta, contribuindo para a obtenção dessa proteína com uma maior estabilidade térmica em solução, possibilitando estudos biofísicos, de atividade enzimática e estruturais que venham a ser desenvolvidos.

Por fim, os resultados obtidos nesse trabalho trazem fortes indicativos de que a proteína TbSub2 seja essencial para a reação de SL *trans-splicing* em tripanossomatídeos mas não houve evidências de sua participação no *cis-splicing*. Além disso, a caracterização de uma provável proteína de *splicing* em linhagem sanguínea abre caminhos para o estudo dessa via, em ambas as formas do parasito. Os dados de espectrometria de massas mostraram a identificação de proteínas envolvidas em múltiplas vias do metabolismo do tripanossoma, inclusive uma possível função, até então não identificada para TbSub2, na regulação do fuso mitótico, que corrobora com as imagens obtidas por imunofluorescência para a forma procíclica. Além disso, estudos com a proteína TbSub2 recombinante permitiram identificar condições nas quais a mesma possui maior estabilidade térmica para que futuros experimentos de caracterização dessa proteína sejam realizados.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como conclusões desse trabalho têm-se:

- TbSub2 copurifica com as proteínas se *splicing* Prp19, U5-116K, Prp31 Sf3b(SAP)145 e com proteínas de múltiplas vias do metabolismo de *T. brucei*;
- TbSub2 apresenta localização nuclear nas formas procíclica e sanguínea;
- O silenciamento de TbSub2 causa defeito de crescimento em culturas da forma procíclica e sanguínea mostrando essencialidade da proteína em ambas as formas;
- O silenciamento de TbSub2 causa defeito na reação de SL *trans-splicing* nas duas formas do parasito;
- O silenciamento de TbSub2 causa acúmulo de SL exon na forma sanguínea, indicando defeito na reação de SL *trans-splicing*;
- O silenciamento de TbSub2 interfere na reação de *cis-splicing* nas duas formas do parasito, porém não há evidências de que a proteína interfira diretamente na reação.
- TbSub2 apresenta estados oligoméricos distintos em cada uma das técnicas aplicadas.
- TbSub2 recombinante é solúvel em diversos tampões, porém apresenta maior estabilidade térmica em tampão contendo 700 mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado e 1300 mM de fosfato de potássio dibásico em pH 7,4.

Como perspectivas desse trabalho têm-se:

- Identificação e caracterização do complexo copurificado com TbSub2 e isolado por ultracentrifugação;
- Análises de RT-PCR para avaliar *cis* e SL *trans-splicing* em culturas da forma sanguínea com tempos de indução maiores, para melhor avaliar os efeitos causados pelo silenciamento de TbSub2;
- Experimentos para validar os dados que indicam que TbSub2 esteja envolvida na regulação do fuso mitótico;
- Caracterização biofísica da proteína TbSub2 recombinante;
- Novos ensaios de cristalização, testando outras condições de solução tamponante e agente precipitante, concentração de proteína e temperatura de incubação, bem como outros experimentos para caracterização estrutural da proteína TbSub2 recombinante.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. WHO 2018. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 19 jun. 2018.
- 2 BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.
- 3 MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. pt 2, p. 283–90, 2005.
- 4 CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **African Trypanosomiasis - Biology**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- 5 KLINGBEIL, M. M.; ENGLUND, P. T. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 13, p. 4333–4334, 2004.
- 6 WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1014–1024, 2004.
- 7 PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135–141, 2006.
- 8 EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005.
- 9 DANIELS, J. P.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell biology of the Trypanosome genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 4, p. 552–569, 2010.
- 10 SILVA, I. R. **Caracterização bioquímica e biofísica de proteínas específicas envolvidas no SL trans-splicing de Trypanosoma brucei**. 2016.238p, Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 11 CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? from fly to man and back again. **EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–8, 2002.
- 12 MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163–9, 2000.
- 13 IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.
- 14 DAS, A.; BANDAY, M.; BELLOFATTO, V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 3, p. 429–34, 2008.
- 15 GUNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of Trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.
- 16 PAYS, E. Regulation of antigen gene expression in. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 517–520, 2005.

- 17 NAKAAR, V. et al. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 10, p. 6736–42, 1994.
- 18 BANGS, J. D. et al. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 9805–15, 1992.
- 19 GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 7, p. 1556–64, 2001.
- 20 KEREN, H.; LEV-MAOR, G.; AST, G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 5, p. 345–355, 2010.
- 21 BOURDIN, C. M. et al. Intron retention in mRNA encoding ancillary subunit of insect voltage-gated sodium channel modulates channel expression, gating regulation and drug sensitivity. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e67290, 2013.
- 22 MOZAFFARI-JOVIN, S. et al. Novel regulatory principles of the spliceosomal Brr2 RNA helicase and links to retinal disease in humans. **RNA Biology**, v. 11, n. 4, p. 298–312, 2014.
- 23 LASDA, E. L.; BLUMENTHAL, T. *Trans* -splicing. **RNA**, v. 2, n. 3, p. 417–434, 2011.
- 24 PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, 2012.
- 25 PADGETT, R. A. et al. Splicing of messenger RNA precursors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 1119–1150, 1986.
- 26 MICHAELI, S. *Trans* -splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, 2011.
- 27 SHI, Y. The Spliceosome: a protein-directed metalloribozyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 17, p. 2640–2653, 2017.
- 28 BRODY, E.; ABELSON, J. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. **Science**, v. 228, n. 4702, p. 963–7, 1985.
- 29 FRENDEWEY, D.; KELLER, W. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. **Cell**, v. 42, n. 1, p. 355–67, 1985.
- 30 GRABOWSKI, P. J.; SEILER, S. R.; SHARP, P. A. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. **Cell**, v. 42, n. 1, p. 345–53, 1985.
- 31 WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701–718, 2009.
- 32 MATERA, A. G.; WANG, Z. A day in the life of the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 108–21, 2014.
- 33 WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a003707.
- 34 JURICA, M. S.; MOORE, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. **Molecular Cell**, v. 12, n. 1, p. 5–14, 2003.

- 35 FICA, S. M. et al. RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. **Nature**, v. 503, n. 7475, p. 229–234, 2013.
- 36 BUTCHER, S. E. The spliceosome as ribozyme hypothesis takes a second step. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 30, p. 12211–2, 2009.
- 37 FICA, S. M. et al. Evidence for a group II intron-like catalytic triplex in the spliceosome. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 5, p. 464–471, 2014.
- 38 SHI, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 11, p. 655–670, 2017.
- 39 TKACZ, I. D. et al. Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 13, n. 1, p. 30–43, 2007.
- 40 JAE, N. et al. Essential role of a trypanosome U4-specific Sm core protein in small nuclear ribonucleoprotein assembly and splicing. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 3, p. 379–386, 2010.
- 41 PALFI, Z. et al. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 8, p. 2493–2503, 2005.
- 42 SILVA, M. T. A. da et al. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 130–8, 2011.
- 43 HUBER, J. et al. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. **EMBO Journal**, v. 17, n. 14, p. 4114–4126, 1998.
- 44 NARAYANAN, U. et al. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. **Molecular Cell**, v. 16, n. 2, p. 223–234, 2004.
- 45 PALACIOS, I. et al. Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. **EMBO Journal**, v. 16, n. 22, p. 6783–92, 1997.
- 46 AMBRÓSIO, D.; SILVA, M.; CICARELLI, R. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 97–106, 2007.
- 47 VALADKHAN, S.; JALADAT, Y. The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. **Proteomics**, v. 10, n. 22, p. 4128–41, 2010.
- 48 CHAN, S.-P. et al. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 279–282, 2003.
- 49 OHI, M. D.; GOULD, K. L. Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. **RNA**, v. 8, n. 6, p. 798–815, 2002.
- 50 TARN, W. Y. et al. Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. **EMBO Journal**, v. 13, n. 10, p. 2421–31, 1994.
- 51 FABRIZIO, P. et al. The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 593–608, 2009.
- 52 MAKAROV, E. M. et al. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2205–2208, 2002.

- 53 ZHOU, Z. et al. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. **Nature**, v. 419, n. 6903, p. 182–185, 2002.
- 54 HUANG, M.; PARKER, M. J.; STUBBE, J. Choosing the right metal: case studies of class I ribonucleotide reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 41, p. 28104–11, 2014.
- 55 VAN DER FELTZ, C. et al. Architecture of the spliceosome. **Biochemistry**, v. 51, n. 16, p. 3321–3333, 2012.
- 56 LIANG, X. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830–40, 2003.
- 57 PALFI, Z. et al. SMN-assisted assembly of snRNP-specific Sm cores in trypanosomes. **Genes & Development**, v. 23, n. 14, p. 1650–1664, 2009.
- 58 LIN, C. L.; TAGGART, A. J.; FAIRBROTHER, W. G. RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. **RNA Biology**, v. 13, n. 9, p. 766–71, 2016.
- 59 DE, I.; SCHMITZOVÁ, J.; PENA, V. The organization and contribution of helicases to RNA splicing. **RNA**, v. 7, n. 2, p. 259–274, 2016.
- 60 LIU, Y. C.; CHENG, S.-C. Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA splicing. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 54, 2015.
- 61 JARMOSKAITE, I.; RUSSELL, R. RNA helicase proteins as chaperones and remodelers. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 697–725, 2014.
- 62 JANKOWSKY, E. RNA helicases at work: binding and rearranging. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 19–29, 2011.
- 63 PYLE, A. M. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, n. 1, p. 317–336, 2008.
- 64 SHEN, H. et al. Distinct activities of the DExD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome. **Genes & Development**, v. 22, n. 13, p. 1796–1803, 2008.
- 65 KISTLER, A. L.; GUTHRIE, C. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. **Genes & Development**, v. 15, n. 1, p. 42–9, 2001.
- 66 LIANG, W.-W.; CHENG, S.-C. A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. **Genes & Development**, v. 29, n. 1, p. 81–93, 2015.
- 67 WELLS, S. E.; ARES, M.; JR Interactions between highly conserved U2 small nuclear RNA structures and Prp5p, Prp9p, Prp11p, and Prp21p proteins are required to ensure integrity of the U2 small nuclear ribonucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 9, p. 6337–49, 1994.
- 68 XU, Y. Z. et al. Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. **EMBO Journal**, v. 23, n. 2, p. 376–85, 2004.
- 69 LIU, Y. C.; CHENG, S.-C. Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA

splicing. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 54, 2015.

70 STALEY, J. P.; GUTHRIE, C. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. **Molecular Cell**, v. 3, n. 1, p. 55–64, 1999.

71 HAGE, R. et al. A targeted bypass screen identifies Ynl187p, Prp42p, Snu71p, and Cbp80p for stable U1 snRNP/pre-mRNA interaction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 14, p. 3941–3952, 2009.

72 CHEN, J. Y. et al. Specific alterations of U1-C protein or U1 small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD box splicing factor. **Molecular Cell**, v. 7, n. 1, p. 227–32, 2001.

73 MÖHLMANN, S. et al. Structural and functional analysis of the human spliceosomal DEAD-box helicase Prp28. **Acta Crystallographica**, v. 70, n. pt 6, p. 1622–30, 2014.

74 MOZAFFARI-JOVIN, S. et al. Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8. **Science**, v. 341, n. 6141, p. 80–4, 2013.

75 RAGHUNATHAN, P. L.; GUTHRIE, C. RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. **Current Biology**, v. 8, n. 15, p. 847–55, 1998.

76 MAEDER, C.; KUTACH, A. K.; GUTHRIE, C. ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 42–8, 2009.

77 ZHANG, L. et al. Structural evidence for consecutive Hel308-like modules in the spliceosomal ATPase Brr2. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 7, p. 731–739, 2009.

78 VAN NUES, R. W.; BEGGS, J. D. Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1451–67, 2001.

79 TSAI, R. T. et al. Dynamic interactions of Ntr1-Ntr2 with Prp43 and with U5 govern the recruitment of Prp43 to mediate spliceosome disassembly. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 23, p. 8027–8037, 2007.

80 LIU, H. L.; CHENG, S.-C. The interaction of Prp2 with a defined region of the intron is required for the first splicing reaction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 24, p. 5056–66, 2012.

81 KIM, S. H.; LIN, R. J. Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 12, p. 6810–9, 1996.

82 LARDELLI, R. M. et al. Release of SF3 from the intron branchpoint activates the first step of pre-mRNA splicing. **RNA**, v. 16, n. 3, p. 516–528, 2010.

83 WARKOCKI, Z. et al. Reconstitution of both steps of *Saccharomyces cerevisiae* splicing with purified spliceosomal components. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 12, p. 1237–1243, 2009.

- 84 SCHWER, B. A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. **Molecular Cell**, v. 30, n. 6, p. 743–754, 2008.
- 85 TSENG, C.-K.; LIU, H.-L.; CHENG, S.-C. DEAH-box ATPase Prp16 has dual roles in remodeling of the spliceosome in catalytic steps. **RNA**, v. 17, n. 1, p. 145–154, 2011.
- 86 OHRT, T. et al. Molecular dissection of step 2 catalysis of yeast pre-mRNA splicing investigated in a purified system. **RNA**, v. 19, n. 7, p. 902–915, 2013.
- 87 HOGG, R. et al. Remodeling of U2-U6 snRNA helix I during pre-mRNA splicing by Prp16 and the NineTeen Complex protein Cwc2. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 12, p. 8008–8023, 2014.
- 88 PERRIMAN, R. J.; ARES, M. Rearrangement of competing U2 RNA helices within the spliceosome promotes multiple steps in splicing. **Genes & Development**, v. 21, n. 7, p. 811–820, 2007.
- 89 MEFFORD, M. A.; STALEY, J. P. Evidence that U2/U6 helix I promotes both catalytic steps of pre-mRNA splicing and rearranges in between these steps. **RNA**, v. 15, n. 7, p. 1386–97, 2009.
- 90 BESSONOV, S. et al. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 846–850, 2008.
- 91 AGAFONOV, D. E. et al. Semiquantitative proteomic analysis of the human spliceosome via a novel two-dimensional gel electrophoresis method. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 13, p. 2667–2682, 2011.
- 92 MCPHEETERS, D. S.; SCHWER, B.; MUHLENKAMP, P. Interaction of the yeast DExH-box RNA helicase prp22p with the 3' splice site during the second step of nuclear pre-mRNA splicing. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 6, p. 1313–21, 2000.
- 93 SCHWER, B.; GUTHRIE, C. PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. **Nature**, v. 349, n. 6309, p. 494–499, 1991.
- 94 MARTIN, A.; SCHNEIDER, S.; SCHWER, B. Prp43 Is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17743–17750, 2002.
- 95 TANAKA, N.; ARONOVA, A.; SCHWER, B. Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome. **Genes & Development**, v. 21, n. 18, p. 2312–25, 2007.
- 96 PANDIT, S.; LYNN, B.; RYMOND, B. C. Inhibition of a spliceosome turnover pathway suppresses splicing defects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 37, p. 13700–13705, 2006.
- 97 KODATHINGAL, P.; STALEY, J. P. Splicing fidelity. **RNA Biology**, v. 10, n. 7, p. 1073–1079, 2013.
- 98 SERPELONI, M. et al. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20730, 2011.
- 99 SAGUEZ, C. et al. Mutational analysis of the yeast RNA helicase Sub2p reveals

conserved domains required for growth, mRNA export, and genomic stability. **RNA**, v. 19, n. 10, p. 1363–71, 2013.

100 ABOVICH, N.; LIAO, X. C.; ROSBASH, M. The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. **Genes & Development**, v. 8, n. 7, p. 843–54, 1994.

101 BERGLUND, J. A. et al. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 781–7, 1997.

102 CHANG, J.; SCHWER, B.; SHUMAN, S. Structure–function analysis and genetic interactions of the yeast branchpoint binding protein Msl5. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4539–4552, 2012.

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

104 REHWINKEL, J. et al. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. **RNA**, v. 11, n. 10, p. 1530–44, 2005.

105 RODRÍGUEZ-NAVARRO, S.; HURT, E. Linking gene regulation to mRNA production and export. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 3, p. 302–309, 2011.

106 RODRÍGUEZ-NAVARRO, S.; STRÄSSER, K.; HURT, E. An intron in the YRA1 gene is required to control Yra1 protein expression and mRNA export in yeast. **EMBO Reports**, v. 3, n. 5, p. 438–42, 2002.

107 REN, Y.; SCHMIEGE, P.; BLOBEL, G. Structural and biochemical analyses of the DEAD-box ATPase Sub2 in association with THO or Yra1. **Elife**, v. 6, 2017.

108 CHÁVEZ, S. et al. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 19, n. 21, p. 5824–34, 2000.

109 BALLUT, L. et al. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 10, p. 861–869, 2005.

110 TANGE, T. O. et al. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. **RNA**, v. 11, n. 12, p. 1869–1883, 2005.

111 LUO, M. J. et al. Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 644–647, 2001.

112 LE HIR, H. et al. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. **EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4987–4997, 2001.

113 HIR, H. L.; SAULIÈRE, J.; WANG, Z. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 41–54, 2016.

114 WOODWARD, L. A. et al. The exon junction complex: a lifelong guardian of mRNA fate. **RNA**, v. 8, n. 3, p. e1411, 2017.

- 115 SHEN, H. UAP56- a key player with surprisingly diverse roles in pre-mRNA splicing and nuclear export. **BMB reports**, v. 42, n. 4, p. 185–8, 2009.
- 116 LIBRI, D. et al. Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. **Genes & Development**, v. 15, n. 1, p. 36–41, 2001.
- 117 ZHAO, X.; RUSH, M.; SCHWARTZ, S. Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene. **Journal of Virology**, v. 78, n. 20, p. 10888–905, 2004.
- 118 SHI, H. et al. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17628–17633, 2004.
- 119 ZHAO, R. et al. Crystal structure of UAP56, a DExD/H-Box protein involved in pre-mRNA splicing and mRNA export. **Structure**, v. 12, n. 8, p. 1373–1381, 2004.
- 120 BITTENCOURT, I. de A. et al. Dissecting biochemical peculiarities of the ATPase activity of TcSub2, a component of the mRNA export pathway in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 793–801, 2017.
- 121 HIRAIWA, P. M. **Relação de Sub2 com diferentes maquinarias do metabolismo nuclear do rna mensageiro**. 2017.135p. Tese(Doutorado em Biologia e Tecnologia) - Instituto Carlos Chagas, Curitiba. 2017.
- 122 BRUN, R.; SCHÖNENBERGER Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289–92, 1979.
- 123 HESSE, F. et al. A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 70, n. 1–2, p. 157–66, 1995.
- 124 FRANÇA, N. R. de et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 695–709, 2010.
- 125 BRENNDÖRFER, M.; BOSHART, M. Selection of reference genes for mRNA quantification in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 1, p. 52–55, 2010.
- 126 CICARELLI, R. et al. **Tools for trans-splicing drug interference evaluation in kinetoplastid**. Disponível em: <chopen.com/pdfs/31806/InTech-Tools_for_trans_splicing_drug_interference_evaluation_in_kinetoplastid.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2018.
- 127 PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- 128 LIGASE independent cloning (LIC). Disponível em: <https://www.helmholtz-muenchehttp://cdn.intechopen.com/pdfs/31806/InTech-Tools_for_trans_splicing_drug_interference_evaluation_in_kinetoplastid.pdfn.de/fileadmin/P/EPF/Protocols/LIC-cloning.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2018

- 129 ESPALHAMENTO dinâmico de luz (DLS). Disponível em: <<http://www.nanomed.com.br/servicos/analise-estrutural/espalhamento-dinamico-de-luz-dls#.WyHMtJKjIV>>. Acesso em: 19 jun. 2018
- 130 JOHNSON, W. C. Circular dichroism and its empirical application to biopolymers. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 31, p. 61–163, 2006.
- 131 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.
132. VAPOR diffusion method. Disponível em: <http://soft-matter.seas.harvard.edu/index.php/Vapor_Diffusion_Method>. Acesso em: 19 set. 2018
- 133 AMBRÓSIO, D. L.; BADJATIA, N.; GÜNZL, A. The spliceosomal PRP19 complex of trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 885–901, 2015.
- 134 AMBRÓSIO, D. L. et al. Spliceosomal proteomics in trypanosoma brucei reveal new RNA splicing factors. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 990–1000, 2009.
- 135 MANFUL, T.; CRISTODERO, M.; CLAYTON, C. DRBD1 is the Trypanosoma brucei homologue of the Spliceosome-Associated Protein 49. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, n. 2, p. 186–189, 2009.
- 136 LIANG, X. et al. Analysis of spliceosomal complexes in Trypanosoma brucei and silencing of two splicing factors Prp31 and Prp43. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 29–39, 2006.
- 137 CHANARAT, S.; SEIZL, M.; STRASSER, K. The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. **Genes & Development**, v. 25, n. 11, p. 1147–1158, 2011.
- 138 CASPARY, F. et al. Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. **EMBO Journal**, v. 18, n. 12, p. 3463–74, 1999.
- 139 WEIDENHAMMER, E. M.; RUIZ-NORIEGA, M.; WOOLFORD, J. L. Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 7, p. 3580–8, 1997.
- 140 XU, X. et al. The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. **Protein Expression and Purification**, v. 72, n. 2, p. 149–156, 2010.
- 141 PFAM. Disponível em: <<https://pfam.xfam.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2018)
- 142 GOSHIMA, G. et al. Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. **Science**, v. 316, n. 5823, p. 417–421, 2007.
- 143 YAMAZAKI, T. et al. The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 16, p. 2953–65, 2010.

- 144 KOTA, K. P. et al. Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. pt 9, p. 1526–37, 2008.
- 145 JOHNSON, S. A. et al. The export factor Yra1 modulates mRNA 3' end processing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 10, p. 1164–71, 2011.
- 146 STERN, M. Z. et al. Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. **RNA**, v. 15, n. 4, p. 648–65, 2009.
- 147 KU, T. et al. Predicting melting temperature directly from protein sequences. **Computational Biology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 445–450, 2009.

APÊNDICE A

Tabela 6 - Proteínas relacionadas à processamento de rRNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Codigo no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.4.1630	ribosomal RNA processing protein 6	89	1	84508
Tb927.11.8770	ATP-dependent RNA helicase FAL1, putative	87	2	46532
Tb927.9.5320	Nucleolar RNA binding protein, putative	79	1	57502
Tb927.8.3750	Nucleolar protein 56, putative	79	1	55987
Tb927.9.2900	hypothetical protein, conserved	72	2	298304
Tb927.7.4220	WD domain, G-beta repeat/Dip2/Utp12 Family, putative	51	2	124904
Tb927.9.2490	Nucleolar protein	48	1	88712
Tb927.1.1370	rRNA biogenesis protein, putative	47	1	76520
Tb927.9.11840	pre-rRNA-processing protein PNO1	42	1	24371

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Proteínas relacionadas à transcrição co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Código no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.3.2600	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	173	8	251165
Tb927.11.630	RNA polymerase I second largest subunit	150	2	179401
Tb927.10.1510	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	120	4	266489
Tb927.3.3220	RNA polymerase-associated protein CTR9, putative	84	3	106222
Tb927.10.13310	RNA polymerase I subunit 1RPB5	81	3	34635
Tb927.10.15950	TFIID-like protein	77	1	30476
Tb927.11.10230	RNA polymerase-associated protein CDC73, putative	73	1	45387
Tb927.8.5090	DNA-directed RNA polymerase I largest subunit	73	3	201049
Tb927.4.3810	DNA-directed RNA polymerase II subunit 2, putative	62	1	140155
Tb927.8.4030	class I transcription factor A, subunit 5a	52	1	27238
Tb927.3.5620	Facilitates chromatin transcription complex subunit spt16	46	1	108401
Tb927.6.850	ccr4-not transcription complex subunit 2	46	1	33891

continua

continuação

Tb927.8.1960	CCR4-NOT transcription complex subunit 11	40	1	50423
Tb927.10.15370	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1, putative	40	1	37563

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Proteínas relacionadas à exportação núcleo/citoplasma co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Código no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.9.13520	Importin 1	104	3	108920
Tb927.10.13800	hypothetical protein, conserved	69	1	46491
Tb927.11.2950	Nucleoporin NUP89	55	1	92013
Tb927.9.14240	Nucleoporin NUP82	42	1	86378
Tb927.3.1120	GTP-binding nuclear protein rtb2	42	1	25644
Tb927.10.8170	Nucleoporin NUP144	41	1	151368

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Proteínas ligadoras de RNA co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Codigo no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.4.2000	RuvB-like helicase	346	9	53413
Tb927.6.4440	RNA-binding protein 42	121	1	38531
Tb927.11.500	RNA-binding protein, UBP1	60	1	24586
Tb927.4.2030	DNA/RNA-binding protein Alba 4	54	3	22691
Tb927.9.8740	Double RNA binding domain protein 3	48	1	37170
Tb927.3.2000	RNA-binding protein, putative, RBP21	48	1	24753

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10 - Proteínas hipotéticas co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Codigo no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.10.13280	hypothetical protein, conserved	136	4	296944
Tb927.9.2590	hypothetical protein, conserved	111	2	126097
Tb927.11.2940	hypothetical protein, conserved	87	2	43573
Tb927.10.5920	hypothetical protein, conserved	83	2	89782
Tb927.6.4380	Protein of unknown function (DUF544), putative	67	2	48583

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Proteínas relacionadas à microtúbulos co-eluídas com TbSub-PTP e identificadas por espectrometria de massas

Codigo no TriTrypDB	Anotação	Score	# sequências	Massa Molecular (Da)
Tb927.1.2340	Alpha tubulin	396	11	52055
Tb927.1.2330	Beta tubulin	353	10	52345
Tb927.6.1290	Dynein assembly factor 5, axonemal	131	6	105063
Tb927.11.3250	Dynein heavy chain, putative	123	6	547538
Tb927.6.4390	Kinesin, putative	122	4	130420

continua

continuação

Tb927.10.10360	Microtubule-associated repetitive protein	80	4	483722
Tb927.11.2270	Inner dynein arm II intermediate chain	60	2	93037
Tb927.11.5510	Dynein light chain p28, axonemal, putative	50	1	28190
Tb927.6.1770	Kinesin, putative	49	1	70996
Tb927.7.4290	Nuclear distribution protein C homolog	48	1	48006
Tb927.8.7490	Symplekin	41	1	162700
Tb927.11.17000	AIR9-like protein	41	1	110336
Tb927.10.13110	Outer arm dynein light chain 7	38	1	12845

Fonte: Elaborada pela autora.