

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Carine Lais Moreira

**IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO EXOSSOMA DE RNA de
Trypanosoma rangeli E CARACTERIZAÇÃO DA SUBUNIDADE
ASSOCIADA EAP3**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moreira, Carine Lais

Identificação do complexo exossoma de RNA de *Trypanosoma rangeli* e caracterização da subunidade associada EAP3 / Carine Lais Moreira ; orientador, Edmundo Carlos Grisard - Florianópolis, SC, 2017.
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Complexo exossoma de RNA. 3. Regulação da expressão gênica. 4. *Trypanosoma rangeli*. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Identificação e caracterização das subunidades catalíticas do complexo exossoma de RNA de *Trypanosoma rangeli*”

Por

Carine Lais Moreira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

Prof. Dr. Mario Steindel Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:

Dr. Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador

Dr. Luiz Cláudio Miletto (Universidade do Estado de Santa Catarina)

Dr. Guilherme Razzera Maciel (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr. Diogo Robl (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 06 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde e sabedoria para realizar este projeto e me ajudar encarar as dificuldades do dia a dia.

Ao Professor Edmundo Carlos Grisard pela paciência, compreensão e dedicação durante estes dois anos. Obrigada pela oportunidade de conhecer o mundo da ciência de uma forma mais crítica. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos.

Ao Professor Glauber Wagner, por me incentivar na pesquisa desde o período da graduação em 2007 na UNOESC. Você é um dos responsáveis por eu ter chegado até aqui. Obrigada por tudo!

A Professora Patrícia Stoco por toda ajuda e disponibilidade para discussão dos resultados.

Ao Professor Mário Steindel pelos ensinamentos e exemplo de profissionalismo e dedicação científica/acadêmica.

Aos meus pais, Valdecir e Maristela, pelo amor e apoio incondicional. Obrigada pelo carinho à distância, por confiarem em mim e por compreender a minha ausência em alguns momentos familiares.

Ao meu irmão José Antônio, por todo carinho e amor dispensado durante este período. Você me inspira a ser melhor a cada dia. Obrigada pela companhia durante os dias que precederam o Natal e o Ano-Novo, foram longas madrugadas de leitura e escrita, que não teriam sido divertidas e produtivas se não fosse sua garrafa de água e suas frases de apoio.

Aos meus amigos de graduação, Michelle, Taina, Fabiano, Marla, Fran, Fernando, Micheli e Samuel que mesmos estando a quilômetros de distância tornaram os meus dias mais leves com palavras de apoio e me proporcionaram aquele churrasco gaúcho e chopp gelado a cada final de ano. Obrigada Tachooo!

A Tatiana Flores, minha amiga de sempre e pra sempre. Obrigada pela sua amizade desde a infância.

A minha mãezinha do lab., Ingrid, obrigada pela acolhida, pelos ensinamentos e toda atenção. Seu abraço e seus conselhos fazem milagres. Quero sua amizade para toda a vida, tenho um carinho enorme por você. Conte comigo sempre!

Aninhaaaa, amiga que o mestrado me deu. Obrigada pela acolhida desde o meu primeiro dia no laboratório em Junho de 2014. Sua amizade vale ouro, continue sendo essa pessoa dedicada e inteligente, você colherá bons frutos. A parceria para festas, cafés, almoços e aventuras continuam. Conte comigo sempre!

A todos os colegas de laboratório: Adriana, Abadio, Bruno, Carime, Carol, Laryssa, Milene, Natália e Tati pela convivência e discussões diárias desde o preparo de soluções, resultados mal sucedidos até assuntos não científicos.

Ana Gru, Greicy e Lucas obrigada por tudo que vocês fizeram por mim. Obrigada pela companhia no RU, nos almoços na copa e nos minutos de descanso na saída de emergência. Ana, obrigada por toda ajuda com os parasitos e com o ensaio de imunofluorescência, o resultado ficou lindo! Contem comigo, vou levar a amizade de vocês pra sempre.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho.

RESUMO

Exossoma de RNA é um complexo multiproteico composto por 12 subunidades, que possui atividade catalítica no sentido 3' → 5' e está envolvido no processamento e degradação de vários tipos de RNAs. As subunidades RRP6 (*Ribossomal RNA Processing 6*) e RRP44 (*Ribossomal RNA Processing 44*) são responsáveis pela atividade catalítica e as demais subunidades envolvidas no direcionamento e seleção de transcritos para processamento ou degradação. O *Trypanosoma rangeli*, juntamente com outros tripanosomatídeos, apresentam deficiência no sistema de regulação de fatores de transcrição, portanto o mecanismo de regulação da expressão gênica nestes organismos ocorre predominantemente a níveis pós-transcricionais através da regulação dos níveis de RNA, sendo esses níveis regulados a partir da degradação dos transcritos. No presente estudo realizamos a caracterização de três subunidades do complexo exossoma de *T. rangeli*. A subunidade RRP6 de *T. rangeli* possui uma janela aberta de leitura de 2.133 pares de base que codifica para um polipeptídio de 710 aminoácidos ($\pm 78,7$ kDa). Foram identificados os domínios conservados PMC2NT, DEDD-Y e HRDC, que também se encontram presentes em outros organismos em que o complexo exossoma de RNA está caracterizado. Foi realizado teste de expressão heteróloga desta proteína em *E. coli* BL21 *CodonPlus*, porém sem sucesso de isolamento. A subunidade RRP44 de *T. rangeli* possui uma janela aberta de leitura de 3012 pares de base que codifica para um polipeptídio de 1003 aminoácidos ($\pm 113,2$ kDa). Os domínios conservados presentes nesta proteína são PIN, Exoribonuclease R e RNB. Foi realizada a expressão heteróloga desta proteína em *E. coli* BL21 *CodonPlus*, porém não tivemos sucesso do rendimento da proteína para o posterior etapa de purificação. A subunidade EAP3 (*Exosome Associated Protein 3*) possui uma janela aberta de leitura de 547 pares de base que codifica para um polipeptídio de 181 aminoácidos (± 20 kDa) e está descrita como uma proteína associada ao exossoma de RNA formando um heterodímero com a subunidade RRP6. Em ensaios de *Western blot* utilizando o antissoro produzido essa interação *in vivo* foi comprovada, uma vez que a ligação do anticorpo ocorreu na banda de ± 150 kDa. As sequências do complexo exossoma de RNA apresentam porcentagens de identidade altas, demonstrando ser uma maquinaria conservada entre os

tripanosomatídeos, porém com sua funcionalidade ainda desconhecida.

Palavras-chave: Complexo exossoma de RNA, regulação da expressão gênica, *Trypanosoma rangeli*.

ABSTRACT

RNA exosome complex is a multiprotein complex composed of 12 subunits, which has 3' → 5' catalytic activity and is involved in the processing and degradation of several types of RNAs. The subunits RRP6 (Ribosomal RNA Processing 6) and RRP44 (Ribosomal RNA Processing 44) are responsible for the catalytic activity, and the other subunits are involved in the targeting and selection of transcripts for processing or degradation. *Trypanosoma rangeli*, together with other trypanosomatids, are deficient in the regulation system of transcription factors, so the regulation mechanism of gene expression in these organisms occurs exclusively at post-transcriptional levels through of RNA levels regulation, these levels being regulated from the degradation of the transcripts. In the present study we performed the characterization of subunits of the *T. rangeli* exosome complex. The RRP6 subunit of *T. rangeli* has an open reading frame of 2,133 base pairs coding for a polypeptide of 710 amino acids (\pm 78.7 kDa). The conserved domains identified was PMC2NT, DEDD-Y and HRDC, which are also present in other organisms in which the RNA exosome complex is characterized, have been identified. A heterologous expression test of this protein was performed in *E. coli* BL21 CodonPlus, but with no success of isolation. The RRP44 subunit of *T. rangeli* has an open reading frame of 3012 base pairs encoding a polypeptide of 1003 amino acids (\pm 113.2 kDa). The conserved domains present in this protein are PIN, Exoribonuclease R and RNB. The heterologous expression of this protein was performed in *E. coli* BL21 Codon Plus, but we did not have a success of protein yield for the subsequent protein purification process. The EAP3 (Exosome Associated Protein 3) subunit has an open reading frame of 547 base pairs encoding a polypeptide of 181 amino acid (\pm 20 kDa) and is described as a protein associated with the RNA exosome forming a heterodimer with the subunit RRP6. In Western Blotting assays using the antiserum produced from purified protein this *in vivo* interaction was proven, since antibody binding occurred in the \sim 150 kDa band, which corresponds to the sum of the proteins. The sequences of the RNA exosome complex have high identity percentages, demonstrating that it is a conserved machinery among the trypanosomatids, but with its still unknown functionality.

Keywords: RNA exosome complex, regulation of gene expression, *Trypanosoma rangeli*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura do complexo exossoma de RNA em eucariotos e seus respectivos domínios conservados (MAKINO et al., 2015).....31
- Figura 2 – Diagrama da reação hidrolítica de degradação de RNA pelo complexo exossoma de RNA (RAINES, 1998).....32
- Figura 3 – Representação esquemática de *trans-splicing*. A figura mostra o sítio acceptor 5' de *splicing* (GU) no SL-RNA, o sítio acceptor 3' (AG) e o ponto de ramificação (BP); PY – trato polimirimídico (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003).....40
- Figura 4 - Fluxograma de atividades desenvolvidas neste trabalho. Retângulos com fundo rosa representam as etapas realizadas neste estudo, em azul representam as subunidades do canal central trimérico, em cinza as subunidades do anel hexamérico, em lilás e laranja as subunidades catalíticas e em verde a subunidade associada ao complexo exossoma de RNA.....45
- Figura 5 – Árvore filogenética resultante da análise concatenada dos genes codificantes para as doze subunidades do complexo exossoma de RNA de tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados gerada através do programa MEGA7[®] utilizando o método de Neighbor-Joining com análise por *Bootstrap* (1.000 replicatas).....60
- Figura 6 – Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da subunidade RRP6 do complexo exossoma de RNA de *Trypanosoma rangeli* com outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados. Os aminoácidos em cinza (187-306) correspondem ao domínio DEDD-Y e os aminoácidos em verde correspondem ao sítio ativo deste domínio que é essencial para a atividade catalítica.....62
- Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR dos genes EAP3: Linhas 1-2 cepa Choachí; 3-4 cepa SC58; Gene RRP6: 5-6 cepa Choachí; 7-8 cepa SC58; RRP44: Linha 9 cepa Choachí e linha 10 cepa SC58; PPM: Padrão de massa molecular (DNA de fago lambda digerido com *HindIII*).....63
- Figura 8 – Análise de expressão da subunidade RRP44 em *Escherichia coli* BL21 *CodonPlus*. A – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* das frações solúveis e insolúveis dos lisados da bactéria. B- *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG (linhas 1 e 2), 0,5 mM (linhas 3 e 4) e 0,25 mM (linhas 5 e 6) Tempo de indução: 6 horas a 27 °C. As linhas 1S, 3S e 5S correspondem à fração solúvel e as

linhas 2I, 4I e 6I correspondem à fração insolúvel. PPM: Padrão de peso molecular; CNI: Controle não induzido; S: Solúvel; I: Insolúvel.....64

Figura 9 – Análise de expressão da subunidade RRP6 em *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* BL21 PlyS e *Escherichia coli* BL21 *CodonPlus*. A e C – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* das frações insolúveis dos lisados da bactéria. B e D – *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG em diferentes temperaturas (27°C e 37°C) e tempos (6h e 16h). CP- Controle positivo; PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Biorad).
.....66

Figura 10 - Análise de expressão da subunidade EAP3 em *Escherichia coli* BL21 *CodonPlus*. A – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* dos lisados da bactéria. B – *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão à 27°C utilizando 1 mM de IPTG. C - *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão à 27°C utilizando diferentes concentrações do indutor. Cbac- Controle bactéria com vetor sem inserto; PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Biorad).....67

Figura 11 - Etapas da purificação da subunidade EAP3 por cromatografia de afinidade. A- Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie blue*. B- *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) Lisado bacteriano: L; *Flow Thought*: FT – proteínas que não aderiram à resina; Lavagens: L1, L2 e L3; Eluições (E1, E2, E3, E4 e E5).....68

Figura 12 – Resultados obtidos através de espectrometria de massas. Os peptídeos marcados em amarelo representam os peptídeos encontrados durante a análise.....69

Figura 13 - *Western blot* utilizando o antissoro anti-TrEAP3 em extratos proteicos totais de: 1) forma epimastigota da cepa SC58 de *Trypanosoma rangeli*; 2) Proteína recombinante purificada Tr-EAP3..70

Figura 14 – Resultados obtidos através de espectrometria de massas. Os peptídeos marcados em amarelo representam os peptídeos encontrados durante a análise.....70

Figura 15 - *Western blot* utilizando o antissoro anti-TrEAP3 em extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas da cepa SC58 de *T. rangeli*. 1 – Extrato proteico solúvel; 2 – Extrato proteico solúvel sonificado;.....71

Figura 16 – Citolocalização da TrEAP3 em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*, cepa Choachí, por

imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-TrEAP3. As imagens representam (1) microfotografias do campo claro, (2) núcleo e cinetoplasto corados com DAPI, (3) expressão da TrEAP3 e (4) merge: sobreposição das imagens 2 e 3; Barra: 10 μm73

Figura 17 – Reconhecimento da proteína EAP3 em extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas das cepas SC58 (linha 1) e Choachí (linha 2) de *Trypanosoma rangeli*. Como normalizador utilizamos um anticorpo anti β -tubulina.....74

Figura 18 - Reconhecimento da proteína EAP3 em extratos proteicos totais de formas epimastigotas (1) e tripomastigotas (2) da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli*. Como normalizador utilizamos um anticorpo anti β -tubulina.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes RRP44, RRP6 e EAP3 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	48
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos preditos das subunidades do complexo exossoma de RNA de <i>Trypanosoma rangeli</i> e suas identidades com os genes homólogos de <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Tabela 3 - Relação das espécies de organismos da família Trypanosomatidae que possuem genes codificantes para as subunidades do complexo exossoma de RNA, indicando seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, suas formas evolutivas e localização celular no hospedeiro, que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
BSA	Soro albumina bovina – do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CSL	do inglês <i>Cep1 Synthetic Lethal</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	ácido desoxiribonucleico – do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado – do inglês <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DO	Densidade Óptica
EAP	Proteína associada ao exossoma do inglês <i>Exosome Associated Protein</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - ácido etilendiamino tetra-acético
ExpASy	do inglês <i>Expert Protein Analysis System</i>
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio de cultura de infuso de fígado e triptose do inglês <i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minutos
mℓ	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NMP	Nucleosídeo monofosfatado
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão Salina Fosfato - do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucleico - do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RRP	Processamento de RNA ribossomal - do inglês <i>Ribossomal RNA Processing</i>
SBF	Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide*
Gel Electrophoresis
μl Microlitro
X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
1.1	COMPLEXO EXOSSOMA DE RNA	30
1.1.1	SUBUNIDADE CATALÍTICA RRP44 (<i>RIBOSOMAL RNA-PROCESSING 44</i>).....	36
1.1.2	SUBUNIDADE CATALÍTICA RRP6 (<i>RIBOSOMAL RNA-PROCESSING 6</i>).....	37
1.1.3	SUBUNIDADE ASSOCIADA EAP3 (<i>EXOSOME-ASSOCIATED PROTEIN 3</i>).....	38
1.2	PROCESSAMENTO DE RNA E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS	39
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	OBJETIVO GERAL	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	46
3.2	PARASITOS.....	46
3.2.1	CULTIVO	47
3.2.2	DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	47
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	47
3.4	DOSAGEM DO DNA GENÔMICO	47
3.5	DESENHO DE INICIADORES	48
3.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	48
3.7	CLONAGEM.....	49
3.8	EXTRAÇÃO DNA PLASMIDIAL	49
3.9	SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	49
3.10	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS..	50
3.11	EXPRESSÃO HETERÓLOGA E TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	50
3.12	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	51

3.13	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL ANTI-EAP3 DE <i>T.rangeli</i>	52
3.14	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	53
3.14.1	DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS <i>IN-GEL</i>	53
3.14.2	ANÁLISE POR LC-ESI-MS/MS	53
3.14.3	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	53
3.15	EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS DE PARASITOS.....	54
3.16	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA <i>TREAP3</i> POR <i>WESTERN BLOT</i>	54
3.17	CITOLocalização DA PROTEÍNA EAP3 EXPRESSA POR <i>T. RANGELI</i> ATRAVÉS DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	55
4	RESULTADOS	56
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	56
4.1.1	IDENTIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS CONSERVADOS	61
4.2	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM/SUBCLONAGEM	62
4.2.1	SUBUNIDADE RRP44.....	62
4.2.2	SUBUNIDADE RRP6.....	63
4.2.3	SUBUNIDADE EAP3.....	63
4.3	TESTES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA	64
4.3.1	SUBUNIDADE RRP44.....	64
4.3.2	SUBUNIDADE RRP6.....	65
4.3.3	SUBUNIDADE EAP3.....	67
4.4	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA E IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS.....	68
4.5	AVALIAÇÃO DO ANTÍSSORO POLICLONAL ANTI- <i>TREAP3</i>	69
4.6	ENSAIO DE CITOLocalização POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA.....	72
4.7	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS E	74

	TRIPOMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>	74
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	82
7	PERSPECTIVAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 COMPLEXO EXOSSOMA DE RNA

Em eucariotos o chamado “complexo exossoma de RNA” é um complexo multiproteico envolvido no processamento e degradação de diferentes tipos de RNA, atuando sempre no sentido $3' \rightarrow 5'$ desta molécula. Apresenta em sua composição nove subunidades, estando presente tanto no núcleo quanto no citoplasma celular, desempenhando diversas funções relacionadas ao processamento, controle de qualidade e degradação de RNA. A estrutura do complexo consiste em um núcleo central denominado Exo9, o qual possui um anel hexamérico composto pelas subunidades RRP41, RRP42, RRP43, RRP45, RRP46 e MTR3, e um canal central trimérico composto pelas subunidades RRP4, RRP40 e CSL4 (Figura 1) (LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008; RIGBY; REHWINKEL, 2015). Este núcleo central é conservado ao longo da evolução, não apresentando atividade catalítica em eucariotos (MITCHELL, 2014). Entretanto, em espécies do domínio Arquea e algumas plantas este núcleo apresenta-se ativo (CHEKANOVA et al., 2000).

Outras três subunidades encontram-se associadas a este complexo: RRP47, RRP6, e RRP44. A RRP6 e a RRP44 são exonucleases que apresentam plena atividade hidrolítica que se baseia no ataque à extremidade $3'$ -OH de uma molécula de RNA por uma molécula de água, liberando $5'$ -nucleosídeos monofosfatados (NMP) (Figura 2) (CHLEBOWSKI et al., 2013).

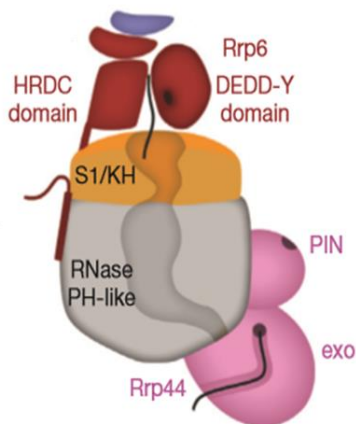


Figura 1 – Estrutura do complexo exossoma de RNA em eucariotos e seus respectivos domínios conservados (MAKINO et al., 2015).

Um complexo estruturalmente homólogo é encontrado em Arquea e bactérias, entretanto há diferenças distintas em relação ao complexo exossoma de RNA de eucariotos. Enquanto o complexo exossoma de RNA em Arquea possui múltiplas cópias das diferentes subunidades, os eucariotos possuem apenas uma subunidade de cada. (MITCHELL, 2014). A atividade catalítica do complexo exossoma em Archaea é desempenhada pela subunidade RRP41. Esta ribonuclease apresenta atividade catalítica processiva do tipo fosforolítica dependente de magnésio, onde utiliza um fosfato inorgânico para atacar o substrato de RNA e liberar 5'-nucleosídeo difosfatado (NDP) (CHLEBOWSKI et al., 2013).

Em eucariotos o complexo exossoma de RNA foi primeiramente descrito em *Sacharomyces cerevisiae* (MITCHELL et al., 1997) e atualmente encontra-se caracterizado em diversos outros organismos, como *Homo sapiens* (ALLMANG et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* (LANGE et al., 2008), além dos protozoários *Trypanosoma brucei* (ESTÉVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001) e *Leishmania tarentolae* (CRISTODERO et al., 2008).

Cada estrutura deste complexo multiproteico é caracterizado por um domínio específico, sendo que o núcleo central apresenta seis subunidades com o domínio RNase PH, e três subunidades com o domínio S1, enquanto que as subunidades catalíticas apresentam os domínios de exoribonuclease R, ribonuclease II, PIN, DEDD-Y, HRDC e PMC2NT. Estes domínios estão relacionados à capacidade de ligação

ao RNA ou interação proteína-proteína, como também a capacidade de degradar diversos tipos de substrato de RNA (JANUSZYK; LIMA, 2014; MAKINO et al., 2015).

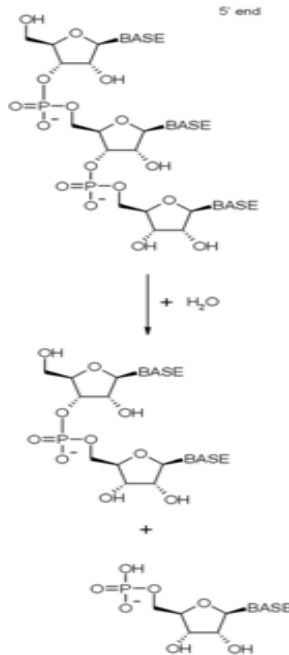


Figura 2 – Diagrama da reação hidrolítica de degradação de RNA pelo complexo exossoma de RNA (RAINES, 1998).

Este complexo multiproteico possui grande diversidade de funções. A primeira função descrita foi o papel na maturação do rRNA 5,8S em *S. cerevisiae* (MITCHELL et al., 1997). Entretanto pesquisas demonstraram uma ampla capacidade de funções deste complexo no núcleo e no citoplasma. No citoplasma, participa nas vias de degradação dos diversos tipos de RNA mensageiro e tem papel fundamental no controle dos níveis de RNA disponíveis para tradução. No núcleo é requerido para o processamento da região 3' do RNA ribossomal 5,8S e para a degradação de regiões espaçadoras de pré-RNA ribossômico. Atua na maturação de pequenos RNA nucleares (snRNA) e pequenos RNA nucleolares (snoRNA) como na degradação de transcritos não maduros e pré-RNA mensageiros não adenilados, limitando sua

exportação para o citoplasma. O complexo exossoma atua também na vigilância de RNA prevenindo a tradução de moléculas de mRNA aberrantes (BUTLER, 2002; LYKKE-ANDERSEN et al., 2011; MITCHELL; TOLLERVEY, 2000).

As atividades desempenhadas pelo complexo exossoma de RNA do núcleo estão diretamente relacionadas a um sistema de controle de qualidade que degrada RNA mensageiro aberrante, limitando ou excluindo sua exportação para o citoplasma. Já o complexo exossoma de RNA do citoplasma, juntamente com outras enzimas de degradação atua na taxa de renovação de RNA e em vias especializadas de decaimento de RNA, como degradação de transcritos ricos em AU ou degradação de RNA mensageiros clivados via RNA de interferência (LYKKE-ANDERSEN et al., 2011).

Diferentes atividades deste complexo requerem diferentes modos de ação, sendo que o processamento de RNA envolve a clivagem precisa do substrato enquanto que a degradação exige a remoção rápida e completa. A vigilância do RNA exige igualmente a ação rápida das enzimas e também um cuidado para não colocar em risco RNA que não são necessários ao processamento ou degradação. O complexo exossoma de RNA por si só não está diretamente envolvido neste processo de decisão e na maioria dos casos atua como um efetor comum para as vias de processamento, degradação e vigilância de RNA (CHLEBOWSKI et al., 2013).

As subunidades catalíticas que apresentam atividade de exoribonuclease 3' → 5' são dependentes de cofatores adicionais, entretanto não se tem clareza de como esses cofatores são regulados e como este complexo distingue entre substratos de RNA que serão destinados ao processamento e quais substratos deverão ser degradados (BUTLER, 2002; JANUSZYK; LIMA, 2014; LYKKE-ANDERSEN et al., 2011; MITCHELL; TOLLERVEY, 2000).

O complexo exossoma de RNA tem uma baixa capacidade de reconhecer substratos de RNA *in vivo*, portanto, a maioria dos substratos degradados por este complexo envolvem fatores auxiliares, ativadores ou cofatores. Esses fatores são proteínas ou complexos que interagem com o exossoma de RNA e recrutam o substrato e/ou fazem deles elegíveis para degradação. Como exemplo de proteínas e complexos que agem neste recrutamento podemos citar: RRP47 (ortólogo EAP3 em tripanosomatídeos), o complexo NEXT, o complexo TRAMP, a Mpp6 e o complexo SKI (CHLEBOWSKI et al., 2013). Em relação aos RNA maduros “saudáveis” que estão prontos para tradução, são protegidos da ação do complexo exossoma de RNA pela formação do complexo

ribonucleico (RNP), que dispõem de uma estrutura quaternária onde a região 3' final do RNA está protegida ou embutida em uma estrutura secundária e portanto escapa da atenção deste complexo multiproteico. Deste modo RNA defeituosos tem dificuldade de assumir essa conformação nativa e formar o RNP resultando em uma fraca interação RNA-RNA e/ou RNA/proteína, expondo assim a região 3' final para ação de exonucleases (CHLEBOWSKI et al., 2013; DEUTSCHER, 2006).

Vários modelos vêm sendo formulados para explicar como este complexo é regulado. Uma das hipóteses apresentadas é que o substrato teria acesso ao núcleo central do complexo exossoma de RNA pela interação com proteínas adaptadoras. De acordo com essa hipótese, RNA helicases (MTR4 e SKI2) atuam como adaptadoras que remodelariam o substrato e direcionariam para o complexo exossoma de RNA nuclear ou citoplasmático (BUTLER, 2002). Um segundo modelo proposto sugere que substratos de RNA com estruturas específicas ativariam o complexo exossoma de RNA de forma alostérica, determinando assim qual substrato estaria sujeito à formação e qual estaria sujeito à degradação (BUTLER, 2002; MITCHELL; TOLLERVEY, 2000). A helicase MTR4 (pertencente ao complexo TRAMP) está diretamente associada ao complexo exossoma de RNA. Experimentos de isolamento deste complexo a partir de células humanas revelaram que esta helicase é co-purificada em quantidades estequiométricas. O complexo TRAMP em leveduras atua primordialmente no exossoma de RNA do núcleo, em mRNA aberrantes, pré-rRNA, sn/snoRNA, tRNA defeituosos e grupos diversos de transcritos generalizados. Alguns desses RNA são marcados para completa degradação enquanto que outros são mediados para sofrer maturação através do complexo exossoma de RNA (CHLEBOWSKI et al., 2013).

Outras duas proteínas são co-purificadas com o complexo exossoma, são elas: RRP47 e Mpp6, ambas as proteínas apresentam propriedade de ligação de RNA. Enquanto a subunidade RRP47 se liga a substratos estruturados a Mpp6 apresenta preferência por sequências ricas em pirimidinas (A/U rich). Entretanto a presença dessas proteínas é importante em *S. cerevisiae*, onde a sua depleção incorre em defeitos na estabilidade de CUT (*Cryptic Unstable Transcripts*) e biogênese de rRNA, sendo a dupla depleção letal para o organismo (CHLEBOWSKI et al., 2013; MILLIGAN et al., 2008; MITCHELL et al., 2003).

Em leveduras o recrutamento do complexo exossoma de RNA é mediado por proteínas de ligação de RNA específicas, possivelmente

pelo complexo SKI. Em células humanas este recrutamento parece estar relacionado a elementos ricos em AU (ARE), que são elementos desestabilizadores presentes no RNA mensageiro, sendo que em *T. brucei* a degradação também é recrutada através de RNA mensageiros contendo ARE (RAIJMAKERS; SCHILDERS; PRUIJN, 2004). O complexo SKI está relacionado ao exossoma do citoplasma e participa da degradação de mRNA sujeitos a maquinaria de RNA de interferência, como também na degradação de mRNA defeituosos (CHLEBOWSKI et al., 2013).

A regulação deste complexo é crucial para a sobrevivência celular (MITCHELL; TOLLERVEY, 2000). Estudos indicam que o Exo9 desempenha um papel importante no recrutamento de substratos de RNA para as ribonucleases RRP6 e RRP44 (LYKKE-ANDERSEN et al., 2011). Este recrutamento é através do canal central do Exo9, onde o substrato de RNA passa através deste canal direcionando o substrato para ação da ribonuclease RRP44, que se encontra na base do complexo. Outra possibilidade de recrutamento de substrato de RNA é a regulação da estrutura do canal central do Exo9, o qual bloqueia a passagem do substrato de RNA através deste, disponibilizando-o para a ação da ribonuclease RRP6 (CHLEBOWSKI et al., 2013; JANUSZYK; LIMA, 2014).

As subunidades catalíticas RRP6 e RRP44 variam entre os diversos organismos e podem estar associadas a outras enzimas e/ou cofatores. Diversos estudos apontam que estas subunidades possuem um papel central ou estão envolvidos na montagem do complexo exossoma de RNA. A citolocalização e o modo de ação de cada uma dessas ribonucleases são diferentes entre os organismos até o momento estudados (LYKKE-ANDERSEN et al., 2011). Em leveduras, por exemplo, a subunidade RRP6 encontra-se presente somente no núcleo, participando nos processos de degradação de RNA instáveis. Entretanto, em *T. brucei* esta subunidade encontra-se presente no núcleo e no citoplasma e desempenha funções diversas relacionadas ao RNA que ocorrem nesses dois compartimentos celulares (LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008).

A subunidade RRP6 possui atividade catalítica do tipo distributiva, onde se liga ao RNA e dissocia-se repetidas vezes, removendo um nucleotídeo de cada vez, enquanto que a subunidade RRP44 possui atividade catalítica do tipo processiva, onde a enzima se liga ao substrato e uma vez ligado permanece associada até a digestão completa do substrato liberando os 5'-nucleosídeos monofosfatados

(NMP) (MITCHELL; TOLLERVEY, 2000) (CHLEBOWSKI et al., 2013).

A ação dessas ribonucleases ocorre de forma inespecífica nos diversos tipos de RNA, onde se considera que o núcleo central do complexo exossoma de RNA atue no controle rígido de escolha de direcionamento de substrato de RNA para processamento ou degradação (SCHMID; JENSEN, 2008).

Em cepas de *S. cerevisiae* nas quais os genes codificantes para o núcleo central do complexo exossoma de RNA (Exo9) não estão presentes ocorre um acúmulo de subprodutos do processamento do ribossomo 5,8S, bem como acúmulo de intermediários ou precursores processados incorretamente indicando a importância desta estrutura para a atividade catalítica (MITCHELL et al., 2003).

1.1.1 SUBUNIDADE CATALÍTICA RRP44 (RIBOSOMAL RNA-PROCESSING 44)

A subunidade RRP44 faz parte da superfamília RNR, homóloga de RNase II e R de *E. coli*, possuindo o domínio S1 na região C-terminal que está relacionado a ligação de RNA e o domínio RNB envolvido na atividade catalítica processiva atribuída a esta subunidade, onde o sítio ativo consiste de quatro resíduos conservados de aspartato e uma sequência motivo (JENSEN, 2010).

Uma característica distinta da família da subunidade RRP44 é a presença do domínio PIN localizado na região N-terminal da região RNR, relacionado à atividade de endoribonuclease como também da interação desta subunidade com o núcleo do exossoma de RNA. O motivo deste domínio consiste de quatro aminoácidos ácidos, que coordenam dois cátions metal divalentes (MITCHELL, 2014). Este domínio pode ser observado em diferentes proteínas podendo desempenhar atividade de exo ou endoribonuclease. O domínio RNB possui sítio ativo para coordenar dois íons magnésio que são necessários para atividade 3' → 5' exoribonuclease, liberando 5'-NMP (CHLEBOWSKI et al., 2013).

Em leveduras esta subunidade possui apenas um gene codificante presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, enquanto que em humanos esta subunidade possui três isoformas, sendo uma delas exclusiva do núcleo e as outras duas encontram-se localizadas no citoplasma (MITCHELL, 2014).

Estudos recentes apontam que esta subunidade pode alterar sua conformação para exercer sua função. Sendo assim, o complexo exossoma de RNA usa conformações alternativas para se tornar ativo e atuar em diferentes substratos de RNA, adotando também diferentes conformações para acomodar substratos de RNA com características distintas (HAN; HOOFF; GENETICS, 2016).

1.1.2 SUBUNIDADE CATALÍTICA RRP6 (RIBOSOMAL RNA-PROCESSING 6)

A subunidade catalítica RRP6 pertence à família da RNase D da superfamília DEDD de exoribonucleases que caracteriza-se pelo uso de dois íons metais para hidrólise do RNA. Para isso utiliza-se o aminoácido fenilalanina para estabilizar a hidrólise do anión para a clivagem da ligação fosfodiéster da molécula de RNA. O sítio ativo do domínio DEDD consiste em quatro resíduos conservados de aminoácidos ácidos (três aspartatos e um glutamato) (CHLEBOWSKI et al., 2013). Apresenta também os domínios HRDC (Helicase e RNase D – C-terminal) na C-terminal e PMC2NT na N-terminal (MITCHELL, 2014).

A citolocalização da subunidade RRP6 varia entre as espécies, sendo que em *S. cerevisiae* encontra-se presente somente no núcleo, enquanto que em humanos está restrita ao nucléolo. Em plantas, como *Arabidopsis thaliana* esta subunidade é expressa de três formas distintas, duas delas exclusivas do núcleo e a outra restrita ao citoplasma (LANGE et al., 2008; MITCHELL, 2014). Em *T. brucei* esta subunidade encontra-se presente tanto no núcleo quanto no citoplasma e, através de ensaios *in vitro*, Barbosa e colaboradores demonstram a capacidade de degradar RNA dupla-fita bem como RNA estruturados (BARBOSA et al., 2014).

Estas formas distintas desta subunidade catalítica evoluíram diferentemente, formando sistemas distintos e possuindo, presumidamente, funções especializadas em cada grupo e/ou espécie (MITCHELL, 2014).

Estudos de análise estrutural do complexo exossoma de RNA demonstraram que a subunidade RRP47 encontra-se associada à subunidade catalítica RRP6, sugerindo que esta interação promova a atividade de RRP6, permitindo que a ribonuclease se ligue a elementos estruturais do substrato de RNA. O endereçamento da subunidade RRP6

para participar das distintas vias de processamento de diferentes tipos de RNA é especificada por essa interação (STEAD et al., 2007).

1.1.3 SUBUNIDADE ASSOCIADA EAP3 (EXOSOME-ASSOCIATED PROTEIN 3)

A subunidade EAP3 encontra-se associada ao complexo exossoma de RNA formando uma interação com a subunidade RRP6. Essa interação ocorre através da região N-terminal onde está localizado o domínio PMC2NT da subunidade RRP6, enquanto que a extremidade C-terminal possui regiões ricas em lisina que estão associadas à ligação ao substrato de RNA. Estudos demonstram que a deleção desta região causa bloqueio de ligação ao substrato (COSTELLO et al., 2011; MITCHELL, 2010).

Esta subunidade é expressa na forma de um homodímero, estrutura esta que se desfaz após a interação com RRP6. Estudos *in vivo* indicam que quando EAP3 não está interagindo com a subunidade RRP6, ela é rapidamente degradada (FEIGENBUTZ et al., 2013a). Experimentos em leveduras indicam que o domínio PMC2NT é instável quando isolado, assim como a subunidade RRP47 (ortólogo de EAP3 em tripanosomatídeos), sugerindo que esta associação com a subunidade RRP6 é necessária para ambas às proteínas (DEDIC et al., 2014).

Diferentes estudos revelaram resultados similares quando da deleção individual das subunidades RRP47 ou RRP6, em ambos os casos demonstrando defeitos no processamento de RNA estáveis (COSTELLO et al., 2011). O nível de expressão de RRP6 e RRP47 são mutualmente dependentes, sendo a RRP47 mais sensível do que a RRP6 na ausência da proteína auxiliar (FEIGENBUTZ et al., 2013b).

A região N-terminal das subunidades RRP6 e RRP47 se associam e formam um heterodímero com uma arquitetura elaborada, possuindo um entrelace de pares de alfa-hélices. A ligação entre estas duas subunidades é realizada através de interações eletroestáticas (SCHUCH et al., 2014).

1.2 PROCESSAMENTO DE RNA E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

De modo geral os genes de eucariotos são constituídos por regiões promotoras, regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3', íntrons e éxons. A transcrição é controlada pela região reguladora, iniciando na região 5' UTR, passando pelos íntrons e éxons e terminando na região 3' UTR. Os genes codificantes são transcritos pela RNA polimerase II e o transcrito primário passa por três modificações para se tornar funcional: adição do Cap (m7Gppp) na extremidade 5', processamento (*splicing*) para retirada dos íntrons e união dos éxons e poliadenilação na extremidade 3'. Por outro lado a regulação da expressão destes genes ocorre desde o nível transcricional até a tradução em proteína. Neste sentido os mecanismos de regulação mais comuns são condensação da cromatina, regulação de transcritos via polimerase II, metilação do DNA, processamento alternativo do RNA, controle do início da tradução, modificações pós-traducionais, tráfego intracelular e degradação de proteínas, sendo o início da transcrição o ponto chave desta regulação (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006; PHILLIPS, 2008).

O processamento de RNA mensageiro em tripanosomatídeos ocorre de forma diferenciada dos demais eucariotos, onde a transcrição resulta em único RNA mensageiro policistrônico capaz de traduzir diversas proteínas com características distintas (JOHNSON; KOOTER; BORST, 1987). Estes genes estão dispostos em cromossomos como grupo de genes direcionais (DGC – *directional gene clusters*) que formam longos arranjos de genes sem função relacionada, não apresentando promotores canônicos e íntrons, embora existam algumas exceções. Este RNA mensageiro policistrônico é processado através de *trans-splicing* e poliadenilação (BENZ et al., 2005; CLAYTON; SHAPIRA, 2007; GÜNZL, 2010).

O processo de *trans-splicing* é a adição de uma sequência promotora que indica o início de um RNA mensageiro individual na extremidade 5' denominada de *spliced-leader* RNA (SL-RNA) ou mini-exon. O mecanismo de processamento em *trans* se dá através de reações de trans-esterificação, onde o sítio GU doador (precursor do mini-exon) funde-se a uma região próxima ao sítio AG, que é uma região aceptora presente no transcrito derivado da unidade policistrônica, denominado ponto de ramificação, formando uma estrutura intermediária em forma de Y. Esse sinal é reconhecido pelo complexo de processamento,

denominado spliciossomo, onde as estruturas intermediárias são removidas e a sequência SL se funde a extremidade 5' do mRNA (Figura 3). O sinalceptor para o processamento no pré-mRNA é o dinucleotídeo AG localizado imediatamente após uma região rica em pirimidinas (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003).

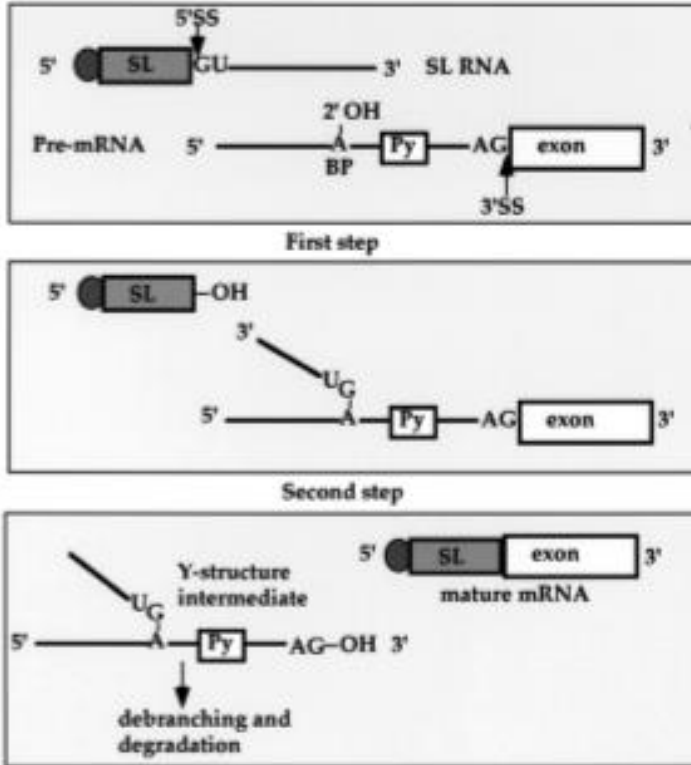


Figura 3 – Representação esquemática de *trans-splicing*. A figura mostra o sítio aceptor 5' de *splicing* (GU) no SL-RNA, o sítio aceptor 3' (AG) e o ponto de ramificação (BP); PY – trato polimirimídico (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003).

A adição da sequência SL-RNA possui duas finalidades, pois funciona em conjunto com a poliadenilação na dissecação do transcrito policistrônico e atua também no fornecimento do “cap” para os mRNA (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003).

A poliadenilação é necessária para a conclusão da etapa de processamento sendo que em tripanosomatídeos ocorre simultaneamente ao processo de *trans-splicing*. A poliadenilação ocorre a uma distância de 100 a 400 nucleotídeos após o sinal de processamento, assim o mesmo trato polimirimídico usado como sinal na reação de *trans-splicing*, presente nas regiões intergênicas, parece funcionar como um sinal de poliadenilação (LEBOWITZ et al., 1993; ULLU; MATTHEWS; TSCHUDI, 1993).

Este processamento desencadeia uma maior estabilidade do transcrito maduro desempenhando um papel importante na regulação da expressão gênica nestes organismos (BLUMENTHAL, 2005; CLAYTON; SHAPIRA, 2007; GÜNZL, 2010; LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003).

Os tripanosomatídeos possuem tanto hospedeiros vertebrados quanto invertebrados, sendo que nestes dois ambientes celulares há diferenças de temperatura, nutrientes disponíveis, alteração de pH e osmolaridade, diferentes sistemas de defesa antioxidante, dentre outros. As adaptações para essas condições são necessárias e, desse modo, a regulação de quais genes devem ser expressos e em que quantidade são fundamentais para a sobrevivência destes organismos (CLAYTON, 2002; CLAYTON; SHAPIRA, 2007; KRAMER, 2012).

Em tripanosomatídeos a regulação da expressão gênica apresenta-se diferenciada, e em virtude dos genes estarem contidos em unidades extensas de RNA policistrônicos e ausência de promotores de RNA-polimerase II, a regulação da expressão gênica nesses organismos ocorre em sua maior parte através de processos pós-transcricionais em nível de metabolismo de RNA e proteínas (DE GAUDENZI et al., 2013; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006).

Os mecanismos de regulação pós-transcricionais envolvem poliadenilação e *trans-splicing* relacionados ao processamento de RNA mensageiro, exportação do núcleo para o citoplasma, controle da estabilidade de mRNA através da degradação dos transcrito e acesso de mRNA à maquinaria de tradução para o controle de produção, modificações, transporte e degradação de proteínas (ÁVILA et al., 2003; CLAYTON, 2002).

Um dos principais modos de controle da estabilidade do mRNA é a degradação do transcrito. O processo de degradação de mRNA em tripanosomatídeos inicia através da desadenilação, que é o encurtamento da cauda poli A na extremidade 3' pela ação das enzimas deadenilases (ex: complexo Ccr/Pop2/Not). Após esta etapa o mRNA pode ser

degradado por duas vias, em uma via a desadenilação vai estimular a retirada do “cap” expondo o transcrito a ação da enzima Xrn1, uma exonuclease com atividade 5'→3', e em outra via após a desadenilação (independente do *decapping*), o transcrito pode ser degradado na direção 3'→5' pelo complexo exossoma de RNA (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

Considerando a forma de transcrição em tripanosomatídeos ser de forma policistrônica constitutiva, onde todos os genes são transcritos de uma só vez, e ao gasto energético elevado para esta atividade, a degradação destes transcritos pelo complexo exossoma de RNA desempenha um papel fundamental para a sobrevivência destes parasitos.

Tendo em vista a relação filogenética do *Trypanosoma rangeli* com os tripanosomatídeos que já se encontram com este complexo multiproteico caracterizado e as diferenças e similaridades em relação a hospedeiro, ciclo de vida e patogenicidade, a hipótese é que este tripanosomatídeo apresenta esta maquinaria em seu genoma e esteja ativa, podendo participar no processo de regulação da expressão gênica através da degradação de RNA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os elementos do complexo exossoma de RNA de *T. rangeli* e caracterizar as subunidades RRP44, RRP6 e EAP3

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as subunidades do complexo exossoma de RNA de *T. rangeli* e analisar comparativamente com sequências ortólogas do complexo exossoma de RNA em tripanosomatídeos;
- Avaliar o perfil de expressão da subunidade associada EAP3 em formas epimatigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*;
- Determinar a citocalização da *TrEAP3* em formas epimatigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor compreensão das etapas experimentais desenvolvidas neste trabalho apresento o fluxograma descrevendo as atividades realizadas e os componentes do complexo de exossoma de RNA estudadas em cada etapa do trabalho (Figura 4).

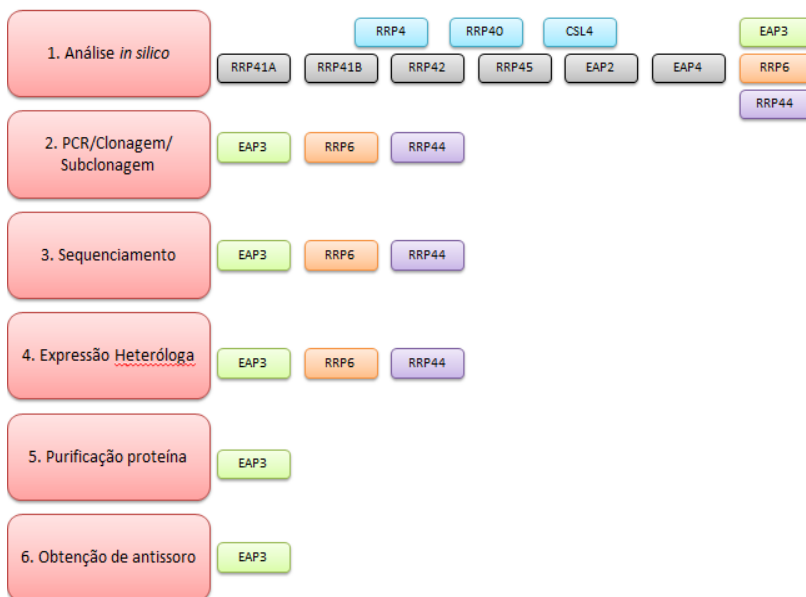


Figura 4 - Fluxograma de atividades desenvolvidas neste trabalho. Retângulos com fundo rosa representam as etapas realizadas neste estudo, em azul representam as subunidades do canal central trimérico, em cinza as subunidades do anel hexamérico, em lilás e laranja as subunidades catalíticas e em verde a subunidade associada ao complexo exossoma de RNA.

Em síntese, a análise *in silico* inicial foi realizada com os genes codificantes para as 12 proteínas do complexo exossoma de RNA do *T. rangeli* obtidas da última montagem do genoma do parasito. Dentre estas, nove pertencem ao núcleo central Exo9 (RRP41A, RRP41B, RRP42, RRP45, EAP2, EAP4, RRP4, RRP40 e CSL4), duas subunidades catalíticas (RRP6 e RRP44) e a proteína associada EAP3.

As etapas de amplificação gênica, clonagem/subclonagem, sequenciamento e expressão heteróloga foram realizadas unicamente com as subunidades catalíticas e a subunidade associada, enquanto que as etapas 5 e 6 foram somente realizadas com a subunidade EAP3 em virtude da impossibilidade técnica de realizar expressão heteróloga das demais unidades estudadas.

3.1 ANÁLISE *IN SILICO*

A busca pelos genes que compõem o complexo exossoma de RNA foi realizado no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). As análises de similaridade entre as sequências e organismos filogeneticamente relacionados foram realizadas através do programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Os parâmetros físico-químicos de cada um dos genes analisados foram caracterizados através do programa ProtParam disponível no pacote de ferramentas ExPASy (*Expert Protein Analysis System* – <http://expasy.org>). Com este programa foram determinados o ponto isoelétrico e peso molecular de cada uma das proteínas analisadas, baseando-se nas suas sequências aminoacídicas.

O *Conserved Domains Search Service* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) foi utilizado como ferramenta para identificar os domínios conservados presentes nas sequências analisadas.

A análise filogenética foi realizada através do método de *Neighbor-Joining* utilizando-se o programa MEGA 7.0, resultando na construção de uma árvore filogenética. A distância evolutiva entre os tripanosomatídeos selecionados foi computada usando o método de *p-distance*. As 12 sequências utilizadas nesta análise foram concatenadas, formando um contig representando cada espécie.

3.2 PARASITOS

Foram utilizados parasitos das cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli*, isoladas originalmente de *Echimys dasythrix* e *Rhodnius prolixus*, respectivamente. Ambas as cepas encontram-se criopreservadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.1 CULTIVO

As formas epimastigotas de *T. rangeli* foram cultivadas a 27 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina, através de repiques semanais.

3.2.2 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*

As formas tripomastigotas de *T. rangeli* foram obtidas conforme protocolo descrito por Koerich e colaboradores (KOERICH et al., 2002). Inicialmente 12×10^7 epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas por 10 minutos a $3.000 \times g$ e lavadas duas vezes com PBS (tampão salina fosfato, pH 7,4). Em seguida foram adicionados 15 ml de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pH 8,0 contendo 5% de SBF e mantidos à 27° C durante 8 dias. O processo de diferenciação foi acompanhado através da visualização em microscópio óptico após coloração dos parasitos com Giemsa. As formas tripomastigotas foram obtidas no 8° dia de cultivo, sendo coletados por centrifugação quando a porcentagem de tripomastigotas foi superior a 95%.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a extração de DNA genômico total, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS pH 7,4. Para a lise da amostra, foi adicionado três vezes o volume do precipitado de tampão de lise (10 mM Tris HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0 1% SDS), acrescido de proteinase K (100µg/ml) e incubado a 37 °C por 12 horas. As etapas seguintes de separação de DNA genômico foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio de acordo com o protocolo padrão descrito por Sambrook e Russel (2001).

3.4 DOSAGEM DO DNA GENÔMICO

As amostras de DNA extraídas foram dosadas e avaliadas quanto a pureza através de espectrofotometria em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf) a 260 e 280nm, observando-se as relações 260/280nm e 260/230 nm.

3.5 DESENHO DE INICIADORES

Foram desenhados iniciadores específicos para as regiões codificantes dos genes das subunidades RRP44, RRP6 e EAP3 utilizando-se o programa *Primer Select* do pacote DNASTAR® (Lasergene). Nas extremidades 5' dos iniciadores senso e antiseno foram adicionados sítios de clivagem das enzimas de restrição *HindIII* e *KpnI*, respectivamente, em destaque na tabela 1, visando a subsequente clonagem em vetor de expressão pET47b (+) (Novagen), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes RRP44, RRP6 e EAP3 de *Trypanosoma rangeli*.

Nome do iniciador	Sequência 5'-3'
<i>TrRRP44_F</i>	GGTACCACGTCTTTATATGTGACATGCG
<i>TrRRP44_R</i>	AAGCTTTCACCTTCTCCGATTTTCGTCAC
<i>TrRRP6_F</i>	GGTACCCAATGTCAGGCAAGCTTCCG
<i>TrRRP6_R</i>	AAGCTTTTAGGCACCACTGGTCCGCT
<i>TrEAP3_F</i>	GGTACCACATGGATTTTCGATGATGAC
<i>TrEAP3_R</i>	AAGCTTTTATGCGATACTCGAATCCT

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os genes correspondentes às subunidades RRP44, RRP6 e EAP3 foram amplificados através de PCR utilizando iniciadores específicos para cada uma das subunidades (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas com uma unidade de enzima *Taq* DNA polimerase (PROMEGA), 40 µM de dNTP, 1 pmol de cada iniciador, 0,3 mM de MgCl₂ e 30 ng de DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*) utilizando as seguintes condições térmicas:

RRP44 – 95 °C – 5 min	RRP6 – 95 °C – 5 min	EAP3 – 95 °C – 5 min
5x { 95 °C – 1 min	35x { 95 °C – 1 min	35x { 95 °C – 1 min
59 °C – 0:40 s	63 °C – 0:45 s	56 °C – 1 min
72 °C – 3 min	72 °C – 2:30 min	72 °C – 1 min
30x { 95 °C – 1 min	72 °C – 5 min	72 °C – 5 min
62 °C – 0:40 s		
72 °C – 3 min		
72 °C – 5 min		

3.7 CLONAGEM

Os fragmentos gerados pela PCR foram clonados utilizando-se o kit pGEM *T-easy Vector* (PROMEGA), seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente o produto desta ligação foi transformado em células *Escherichia coli* DH5 α cálcio competentes segundo protocolos padrão (42 °C por 45 segundos) e imediatamente incubadas em gelo novamente durante 2 minutos. Após adição de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glicose) e crescimento das células pelo período de 1h a 37 °C, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 μ g/ml) IPTG (40 μ g/ml) e X-Gal (20 μ g/ml). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas na placa de cultivo. A confirmação dos clones com plasmídeo contendo o inserto foi através de PCR de colônia utilizando os iniciadores M13 senso e antiseno. Após a confirmação da presença e da correta orientação do inserto, foi realizado o crescimento bacteriano do clone positivo em meio LB suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina para posterior extração do DNA plasmidial.

3.8 EXTRAÇÃO DNA PLASMIDIAL

Os clones contendo os genes de interesse foram crescidos a 37 °C sob agitação por 16 horas e, após este crescimento, os plasmídeos foram extraídos através de protocolo padrão de lise alcalina, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). O DNA plasmidial extraído foi dosado e avaliado quanto à sua pureza através de espectrofotometria no equipamento *BioPhotometer*[®] (Eppendorf), observando a absorbância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras também foram visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo os resultados registrados digitalmente.

3.9 SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

A construção do plasmídeo para expressão heteróloga foi realizada utilizando o plasmídeo pET47b. Para a inserção de cada um dos genes (RRP44, RRP6 e EAP3) no vetor de expressão, o plasmídeo pGEM *T-easy*, contendo o inserto, assim como o vetor pET47b foram submetidos a digestão com duas unidades de cada enzima (*Hind*III e *Kpn*I para as subunidades RRP44 e EAP3; *Not*I e *Kpn*I para RRP6) a 37 °C durante 3 horas. Concluída a digestão, os produtos foram separados

em gel de agarose 1%, onde a banda de tamanho esperado para cada gene foi excisada do gel e purificada utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os genes foram inseridos no vetor de expressão previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizando-se três unidades da enzima T4 DNA ligase em tampão próprio durante 16 horas a 16 °C. Os produtos desta ligação foram utilizados para transformação de células cálcio competentes *E. coli* DH5 α , nas mesmas condições descritas no item 3.6. Após a seleção dos clones através de PCR de colônia (Item 3.6), os clones positivos foram crescidos em meio LB suplementados com kanamicina (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas e posteriormente submetidos á extração plasmidial através de lise alcalina (SAMBROOK, RUSSEL, 2001).

3.10 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

O sequenciamento de todos os clones obtidos foi realizado em equipamento *Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyser* de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Em síntese, as reações foram realizadas com o *Kit BigDye 3.1* na presença de 5 pmol de iniciador, 700 ng do vetor contendo o inserto, sendo a reação realizada nas seguintes condições térmicas: 95°C por um minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, ligação dos iniciadores a 55°C por 15s e extensão a 60 °C por 15s. Posteriormente os produtos marcados foram precipitados para a retirada de nucleotídeos e iniciadores não incorporados utilizando 2,5 μl de EDTA (125 mM). Antes da injeção no sequenciador as amostras foram eluídas em 10 μl de formamida. As sequências geradas forma analisadas quanto a sua qualidade utilizando o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>), sendo consideradas válidas as sequências com valor de *Phred*>20.

3.11 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a expressão heteróloga, foram testadas três linhagens distintas de bactérias: *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 pLysS e *E. coli* BL21 *CodonPlus*. Uma colônia de cada cepa bacteriana foi utilizada

como pré-inóculo em 10 ml de LB suplementado com 15 µg/ml de kanamicina e 34 µg/ml de clorafenicol, este último, somente para as cepas *E. coli* BL21 pLysS e *E. coli* BL21 CodonPlus, sendo a cultura mantida sob agitação por aproximadamente 16 horas a 37 °C. Uma diluição de 1:10 dos pré-inóculos foi realizada em 10 ml de meio LB suplementado com os mesmos antibióticos descritos acima, sendo mantidas sob agitação constante a 37 °C até atingir uma densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,5 a 0,6. Foi adicionado IPTG utilizando-se concentrações finais de 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM. A cultura bacteriana foi crescida em diferentes tempos (3h, 6h e 16h) e diferentes temperaturas (15 °C, 27 °C e 37 °C) sob agitação de 130 rotações por minuto em agitador. As bactérias foram coletadas com centrifugação a 4.000 x *g* por 15 minutos. O sedimento celular foi adicionado de PBS pH 7,4 e resolvido em gel SDS-PAGE 12%, posteriormente as proteínas resolvidas foram transferidas durante 3h a 100 V em banho de gelo para uma membrana de nitrocelulose e, em seguida, submetidas a ensaio de *Western blot* utilizando um anticorpo anti-cauda de histidina (anti His-Tag) conforme descrito na seção 3.16.

Para o teste de solubilidade da proteína heteróloga, as bactérias recombinantes foram adicionadas de PBS pH 7,4 e submetidas à lise por sonicação (*Ultrasonic dismembrator*, FISHER), em banho de gelo, utilizando 10 pulsos (amplitude de 85%) de 30 segundos cada, com intervalo de 30 segundos entre cada pulso. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 16.000 x *g*, por 30 minutos a 4 °C, sendo coletado o sobrenadante (Fração solúvel) e o sedimento (Fração insolúvel) adicionado de solução de SDS 10%. As frações proteicas foram igualmente resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% submetidos a voltagem constante de 30 mA em aparato de eletroforese, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose seguido de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-His-tag, conforme descrito na seção 3.16.

3.12 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Uma vez que a proteína recombinante está adicionada de uma cauda de seis histidinas, a purificação desta proteína foi realizada utilizando-se uma coluna de afinidade de níquel Ni-NTA (Qiagen®) conforme recomendação do fabricante. As etapas de purificação foram realizadas a partir de extratos provenientes de cultura de bactérias crescidas em 200 ml de LB a 27 °C por 6 horas, induzidas com 0,25 mM de IPTG. As culturas pós-indução foram centrifugadas a 4.000 x *g*

por 15 minutos e os sedimentos homogeneizados em tampão de lise (8M uréia, 10 mM NaH₂PO₄, 100mM Tris-HCl, pH 8,0), mantidos a 60 °C durante uma hora sob agitação branda. A fração insolúvel foi utilizada para dar seguimento ao processo de purificação em coluna, onde foi mantido por uma hora em contato com a resina a 4°C. Após esta etapa, o lisado foi passado através da coluna, lavado três vezes com tampão de lavagem (8M uréia, 10 mM NaH₂PO₄, 100mM Tris-HCl, pH 6,3). Posteriormente a eluição da proteína da resina foi realizada em tampão de eluição (8M uréia, 10 mM NaH₂PO₄, 100mM Tris-HCl, pH 4,5). A proteína eluída foi dialisada duas vezes a 4 °C com tampão de diálise (0,5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20% Glicerol, 5 mM DTT, pH 8,5), sendo que a segunda diálise foi realizada com o mesmo tampão descrito acima, porém com uma quantidade maior de glicerol (40%). Posteriormente, a proteína purificada e as alíquotas de cada uma estas etapas de purificação foram resolvidas e gel de poliárilamida SDS-PAGE 12% submetido a voltagem constante de 30 mA em aparato de eletroforese, sendo os resultados registrados digitalmente.

3.13 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL ANTI-EAP3 DE *T.rangeli*

Para a obtenção de antissoro policlonal, foram utilizados camundongos Balb/C oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC). A utilização de animais de experimentação foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFSC (Protocolo CEUA n° 9923170516).

Para a produção do antissoro anti-*TrEAP3*, três camundongos fêmea da linhagem Balb/C foram imunizados com 50 µg da proteína purificada. Foram realizadas quatro imunizações por via subcutânea com intervalo de 10 dias, sendo que na primeira imunização a proteína foi emulsificada com o adjuvante completo de Freund (MP Biomedicals LLC) e as demais imunizações foram realizadas com adjuvante ALU-GEL S (MP Biomedicals LLC). Após a quarta imunização, a geração de antissoro policlonal anti-EAP3 foi verificada através de ensaio de *Western blot*. Para tanto, o antissoro foi obtido através da coleta de sangue por punção cardíaca dos camundongos previamente anestesiados com cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%. O sangue coletado foi mantido a 4 °C durante 1 hora para a formação do coágulo, e posteriormente centrifugado a 800 x *g* por 10 minutos para a separação

do soro, o qual foi alíquotado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

3.14 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os procedimentos referentes à espectrometria de massas foram realizados no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), em Atlanta (EUA) com o apoio do Dr. Glauber Wagner.

3.14.1 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS *IN-GEL*

A banda de interesse foi excisada do gel SDS-PAGE e tratada com solução descorante I (50% de metanol /5% ácido acético). Em seguida, incubada com a solução descorante II (50% acetonitrila em 5 mM de carbonato de amônia (NH_4HCO_3) e desidratada com 200 μl de acetonitrila. Após esta etapa de descoloração e desidratação, a amostra foi tratada com 10 mM de DTT para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas, seguido da alquilação deste grupos tiol com 50 mM de iodocetamina. Na sequência as proteínas foram submetidas a fragmentação proteolítica *in-gel* com tripsina (Promega). Os peptídeos foram extraídos do gel com 100 μL de solução descorante II, sendo o sobrenadante contendo os peptídeos transferido para um novo tubo e os géis submetidos a novo tratamento com 50 μl de uma solução descorante I. Após este período, o sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o sobrenadante obtido na primeira etapa de extração. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (SpeedVac, Eppendorf) e os peptídeos reconstituídos com 10 μl de 0,1% ácido fórmico (AF).

3.14.2 ANÁLISE POR LC-ESI-MS/MS

Os peptídeos gerados pela digestão das proteínas em gel foram analisados em plataforma LC-ESI-MS/MS, composta por sistema de cromatografia líquida *NanoAcquity* (Waters) acoplado em linha com espectrômetro de massas *Nanospray LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fischer Scientific) no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA).

3.14.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os dados brutos foram processados utilizando o programa MASCOT Distiller® (Matrix Science, Boston) e a busca na base de

dados foi realizada utilizando o programa MASCOT (Matrix Science) e a base de dados do genoma *T. rangeli* (TrangeliDB).

3.15 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS DE PARASITOS

Os extratos proteicos totais das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* foram obtidos através de lise celular em tampão Tris-HCl pH 8,0; 1% Triton X-100 acrescidos de um coquetel de inibidores de protease (PMSF 44,2 mg/ml, pepstatina 68,6 µg/ml, TPCK 2 mg/ml, TLCK 0,5 mg/ml), aquecidos a 100 °C. A fração solúvel dos extratos proteicos foi obtida através de centrifugação a 12.000 x *g* por 30 minutos a 4°C.

A quantificação dos extratos proteicos foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando uma solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão para a construção de curva de calibração.

Para a desnaturação dos extratos proteicos foi adicionado tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS, 2% β-mercaptoetanol), seguido de aquecimento a 95 °C durante cinco minutos e posteriormente resolvidos e gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

O gel de poliacrilamida SDS-PAGE contendo as proteínas foi corado com azul de Comassie R250 0,25% e sua imagem digitalizada em equipamento *Perfection 4990 Scanner*[®] (Epson, Suwa).

3.16 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA *TREAP3* POR WESTERN BLOT

Para avaliação do nível de expressão da *EAP3* pelo *T. rangeli*, 50 µg de extratos proteicos solúveis de parasitos foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) durante 3 horas a 100 volts em cuba de eletroforese em banho de gelo contendo tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol).

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi mantida em solução de bloqueio que consiste de uma solução de 5% de leite desnatado diluído em tampão de “*blotting*” (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween), por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada cinco vezes durante cinco minutos cada com tampão de “*blotting*”. O anticorpo primário foi adicionado a membrana na diluição 3:100 com 2% de leite desnatado e a incubação

ocorreu durante 16 horas a 4 °C sob agitação lenta. Posteriormente a membrana foi novamente lavada cinco vezes durante cinco minutos com tampão de “*blotting*” e incubada durante uma hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (PROMEGA) na diluição 1:3.000 (v/v), sendo novamente lavada cinco vezes durante cinco minutos com tampão de “*blotting*”.

A membrana foi então recoberta com o reagente ECL (*Thermo Scientific*) e exposta a filme radiográfico (IBF-Medix) por uma hora a temperatura ambiente, sendo os mesmos revelados em processador de filmes SRX-101A (*Konica Minolta Medical & Graphic*)

3.17 CITOLocalização DA PROTEÍNA EAP3 EXPRESSA POR *T. RANGELI* ATRAVÉS DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Para a determinação da citolocalização da *TrEAP3* através de RIFI foram utilizados formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* da cepa Choachí. Os parasitos foram coletados após centrifugação a 3.000 x *g* por 10 minutos e lavados duas vezes com PBS pH 7,4, tendo a sua concentração ajustada para 1×10^6 parasitos/ml. Dessa suspensão, 50 µl foram depositados sobre lamínulas circulares que foram dispostas em poços de uma placa de poliestireno de 24 cavidades. Foram utilizados 20 minutos para a adesão dos parasitos, seguidos de fixação com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4 durante cinco minutos. As lamínulas foram submetidas a três lavagens de cinco minutos cada com PBS pH 7,4. A permeabilização dos parasitos foi realizada com detergente Triton X-100 a 0,5% em PBS pH 7,4 e o bloqueio realizado com uma solução de BSA 5% (Solução de bloqueio). O antissoro policlonal anti-*TrEAP3* foi diluído 1:4 em solução de bloqueio 2% e incubado sobre as lamínulas durante 90 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 0,1%, o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (anti-igG de camundongo) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio foi incubado por sobre as lamínulas por 15 minutos ao abrigo da luz. Após três lavagens de cinco minutos em PBS-Tween 0.1%, as lamínulas foram coradas com 1µg/ml de DAPI por cinco minutos, lavadas novamente e montadas com o reagente *Hydromount* (*National Diagnostics*) sobre lâminas de microscopia. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus – Bx40-FL (Olympus) e registradas digitalmente.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Dentre as 12 subunidades que compõem o complexo exossoma de RNA descritas na literatura, 11 sequências ortólogas foram encontradas no genoma do *T. rangeli*. Estas sequências foram previamente anotadas por análise de similaridade como proteínas de processamento de RNA ribossomal ou proteínas associadas ao exossoma de RNA. Para a subunidade RRP6 não foi encontrado nenhum gene ortólogo no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>). Sendo assim, foi realizada uma nova busca utilizando a mesma ferramenta BLAST contra o banco de dados do genoma do *T. rangeli* que se encontra em revisão e constante atualização pelo nosso grupo de pesquisa. O resultado revelou uma sequência que corresponde a subunidade RRP6 localizada no contig 09 (TcRangeli-9) com 63,94% de identidade aminoacídica quando comparado com *T. brucei*. A anotação correta para a subunidade RRP6 será enviada para correção no banco de dados TriTryp.

De posse das sequências do complexo exossoma de RNA de *T. rangeli* identificadas, foi realizada a predição dos parâmetros físico-químicos de todas as subunidades através do software ProtParam do pacote de programas ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) (<http://www.expasy.org/>) (Tabela 2) de forma comparativa ao *T. brucei* e à *S. cerevisiae*, ambas espécies que já encontram-se com este complexo multiproteico caracterizado.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos preditos das subunidades do complexo exossoma de RNA de *Trypanosoma rangeli* e suas identidades com os genes homólogos de *Trypanosoma brucei* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Subunidade	Número de acesso*	pb	aa	P.m (kDa)	pI	% Identidade (aa)	
						<i>T. brucei</i>	<i>S. cerevisiae</i>
RRP41A	TRSC58_05808	759	52	27,20	5,79	75,40	25,73
RRP41B	TRSC58_03839	840	79	29,50	5,86	58,98	23,15
EAP1	TRSC58_03213	1146	81	40,82	4,98	61,41	25,74
RRP45	TRSC58_03403	1149	33	36,69	6,80	65,26	25,93
EAP2	TRSC58_00010	840	79	29,70	5,97	62,68	21,38
EAP4	TRSC58_04374	690	29	24,33	5,11	66,08	20,33
RRP4	TRSC58_04364	909	02	33,02	6,91	63,79	34,91
RRP40	TRSC58_00903	894	97	30,95	4,80	64,63	30,43
CSL4	TRSC58_04124	771	56	27,36	8,90	57,77	26,05
RRP44	TRSC58_04624	3012	1003	113,29	6,05	75,48	37,32
RRP6	TcRangeli-9	2133	710	8,75	6,04	63,94	31,60
EAP3	TRSC58_01860	547	181	19,85	5,77	50,84	20,96

pb: pares de base; aa: aminoácidos; P.m: Peso molecular; pI: ponto isoelétrico;

* O número de acesso é proveniente do banco de dados TriTrypDB e do banco de dados interno no genoma do *T. rangeli*.

A análise de similaridade foi realizada com as sequências de todas as subunidades do complexo exossoma de RNA de outros tripanosomatídeos buscando compreender a conservação deste complexo dentro desta família Trypanosomatidae (Tabela 3). Desta forma, todas as espécies para as quais haviam sequências de todos os genes codificantes para as 12 subunidades do complexo exossoma de RNA depositadas nos bancos de dados públicos foram utilizadas em uma análise filogenética.

Tabela 3 - Relação das espécies de organismos da família Trypanosomatidae que possuem genes codificantes para as subunidades do complexo exossoma de RNA, indicando seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, suas formas evolutivas e localização celular no hospedeiro, que foram utilizadas para a construção da árvore filogenética.

Espécie	Localização Celular	Hospedeiro Vertebrado	Hospedeiro Invertebrado	Formas Evolutivas
<i>Trypanosoma rangeli</i>	Intra-Extracelular (?)	Mamíferos	Triatomíneo	Epimastigota/Tripomastigota sanguíneo/metacíclico
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Intracelular	Mamíferos	Triatomíneo	Amastigota/Epimastigota Tripomastigota sanguíneo/metacíclico
<i>Trypanosoma brucei</i>	Extracelular	Mamíferos	Mosca Tsé-Tsé	Tripomastigota/Epimastigota
<i>Trypanosoma vivax</i>	Extracelular	Bovinos e pequenos ruminantes	Moscas hematófagas	Epimastigota/Tripomastigota
<i>Trypanosoma evansi</i>	Extracelular	Equinos	Moscas hematófagas	Tripomastigota
<i>Leishmania brasiliensis</i>	Intracelular	Mamíferos	Flebotomíneo	Amastigota/Promastigota
<i>Leishmania donovani</i>	Intracelular	Mamíferos	Flebotomíneo	Amastigota/Promastigota
<i>Leishmania infantum</i>	Intracelular	Mamíferos	Flebotomíneo	Amastigota/Promastigota
<i>Leishmania major</i>	Intracelular	Mamíferos	Flebotomíneo	Amastigota/Promastigota
<i>Leishmania mexicana</i>	Intracelular	Mamíferos	Flebotomíneo	Amastigota/Promastigota

Os resultados dos alinhamentos das seqüências aminoacídicas apontou a conservação do complexo exossoma de RNA em todas as espécies analisadas. A fim de realizar uma análise filogenômica deste complexo como um todo as 12 seqüências que correspondem ao complexo exossoma de RNA das espécies listadas na Tabela 3, foram concatenadas de forma ordenada e o alinhamento destas seqüências resultou em uma árvore filogenética representativa (Figura 5).

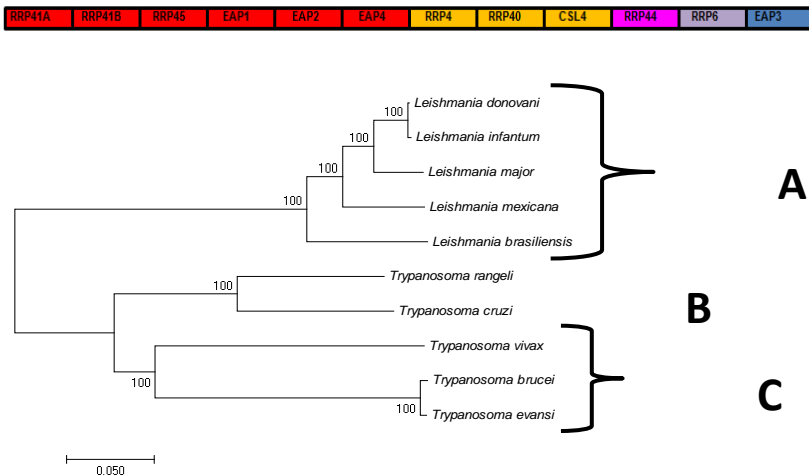


Figura 5 – Árvore filogenética resultante da análise concatenada dos genes codificantes para as doze subunidades do complexo exossoma de RNA de tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados gerada através do programa MEGA7[®] utilizando o método de Neighbor-Joining com análise por *Bootstrap* (1.000 replicatas).

A árvore filogenética apresenta um alto poder de resolução e valores máximos de *bootstrap*, demonstrando uma separação clara das espécies do gênero *Trypanosoma* em relação às espécies do gênero *Leishmania*. A organização dos ramos das espécies do gênero *Leishmania* (A) demonstra maior conservação entre si, porém reúnem em ramos próximos as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania major*, que apresentam localização em continentes diferentes e causam doenças distintas.

Nos ramos das espécies do gênero *Trypanosoma* observa-se maior proximidade do *T. rangeli* com o *T. cruzi* (B) em relação aos demais tripanosomatídeos analisados. Ambos parasitos de ocorrência predominante na região da América do Sul, onde somente um deles (*T. cruzi*) é patogênico ao humano. Outro agrupamento identificado foi entre as espécies *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma evansi* (B), onde apenas um é patogênico ao homem (*T. brucei*), com ocorrência africana e outros dois relacionados à patogenicidade animal.

4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS CONSERVADOS

Tendo observado que o complexo exossoma de RNA como um todo é uma estrutura conservada ao longo da evolução dos tripanosomatídeos, foi realizada a busca dos domínios específicos de cada subunidade deste complexo no *T. rangeli* utilizando para tal o banco de dados CDD (*Conserved Domain Database*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>).

Todos os domínios conservados característicos de cada uma das subunidades que compõem o complexo exossoma de RNA foram identificados em *T. rangeli*, exceto para a subunidade EAP3. Para as subunidades do anel hexamérico (RRP41A, RRP41B, EAP1, RRP45, EAP2 E EAP4) foi identificado o domínio RNase PH. Para o canal central trimérico (RRP4, RRP40 E CSL4) foram identificados os domínios S1 e KH, ambos associados à ligação de RNA. Para a subunidade catalítica RRP6 foram detectados os domínios PMC2NT, DEDD-Y e HRDC e para a subunidade RRP44 foram identificadas os domínios EXO R, PIN e Ribonuclease II, sendo estes os domínios característicos descritos na literatura. Entretanto, para a subunidade EAP3 não foi observado o domínio Sas1D/C1D, o qual está presente em *Saccharomyces cerevisiae* e *Homo sapiens*.

O domínio DEDD-Y pertence a uma superfamília de exonucleases que são caracterizadas pela presença de um núcleo constituído por quatro aminoácidos invariantes distribuídos em três seqüências motivo (ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E) e tirosina (Y)). Essas seqüências formam um sítio ativo que serve como ligante para os dois íons metálicos que são requeridos para a atividade de exoribonuclease. No alinhamento da subunidade RRP6 de diferentes espécies de tripanosomatídeos podemos observar a presença e a conservação deste sítio ativo (Figura 6).

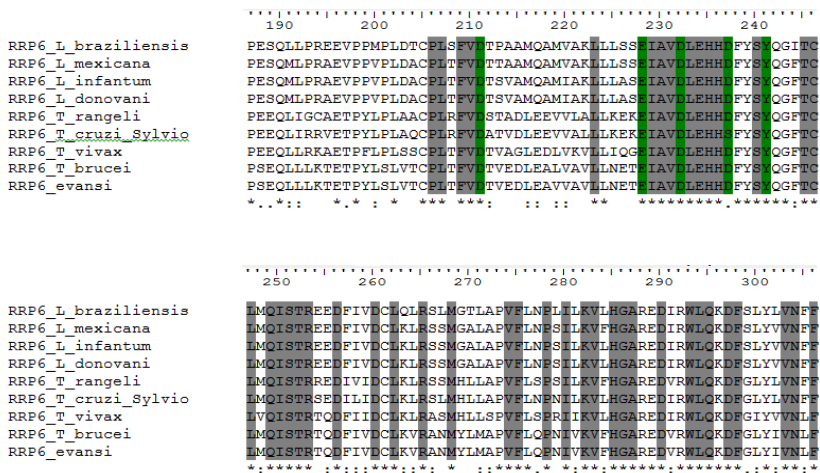


Figura 6 – Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da subunidade RRP6 do complexo exossoma de RNA de *Trypanosoma rangeli* com outros tripanosomatídeos filogeneticamente relacionados. Os aminoácidos em cinza (187-306) correspondem ao domínio DEDD-Y e os aminoácidos em verde correspondem ao sítio ativo deste domínio que é essencial para a atividade catalítica.

4.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM/SUBCLONAGEM

4.2.1 SUBUNIDADE RRP44

Os produtos amplificados possuem, de acordo com o esperado, aproximadamente 3.012 pares de bases (pb), tanto para a cepa SC58 (KP1-) quanto para a cepa Choachí (KP1+) de *T. rangeli*, conforme

observado na Figura 7. Após a clonagem inicial em vetor pGEM T-*easy*, os clones positivos foram selecionados e, após a extração plasmidial, uma dupla digestão foi realizada com as enzimas *Hind*III e *Kpn*I para a excisão do gene RRP44. Tendo em vista que o vetor pGEM T-*easy* possui tamanho semelhante ao gene RRP44, foi necessário uma terceira digestão (enzima *Xmn*I) com objetivo de clivar o vetor e gerar fragmentos menores para facilitar a identificação do fragmento do gene de interesse. O produto da digestão foi purificado e subclonado no vetor de expressão pET47b, para a posterior etapa de testes de expressão heteróloga descrito no item 4.3.

4.2.2 SUBUNIDADE RRP6

O produto amplificado foi de aproximadamente 2.133 pb para as duas cepas de *T. rangeli* (SC58 e Choachí), conforme demonstrado na Figura 7. Após a etapa inicial de clonagem em vetor pGEM T-*easy* e seleção dos clones positivos, os plasmídeos recuperados foram submetidos a dupla digestão com as enzimas *Not*I e *Kpn*I e subclonados no vetor de expressão pET47b para seguir a etapa de testes de expressão heteróloga.

4.2.3 SUBUNIDADE EAP3

O fragmento amplificado foi de aproximadamente 547 pb para as cepas SC58 e Choachí de *T. rangeli* (Figura 7). Após a clonagem em vetor pGEM T-*easy* os plasmídeos contendo o gene de interesse foram submetidos a dupla digestão com as enzimas *Hind*III e *Kpn*I e subclonados em vetor pET47b para as posteriores etapas de testes de expressão heteróloga.

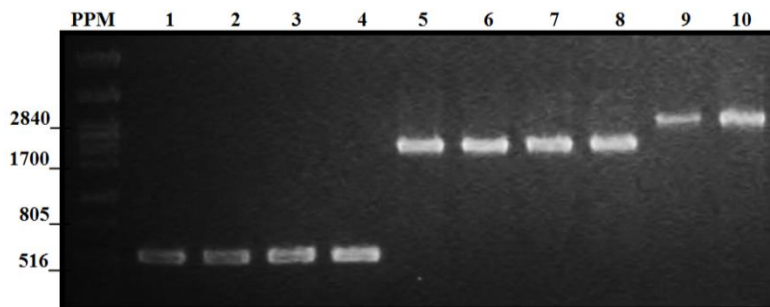


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando os produtos de amplificação via PCR dos genes EAP3: Linhas 1-2

cepa Choachí; 3-4 cepa SC58; Gene RRP6: 5-6 cepa Choachí; 7-8 cepa SC58; RRP44: Linha 9 cepa Choachí e linha 10 cepa SC58; PPM: Padrão de massa molecular (DNA de fago lambda digerido com *HindIII*).

Ambas as construções (vetor pGEM T-*easy* e pET47b) das três subunidades do complexo exossoma de RNA foram confirmados através de sequenciamento utilizando os iniciadores do vetor e do inserto.

4.3 TESTES DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

4.3.1 SUBUNIDADE RRP44

Para a expressão heteróloga da subunidade catalítica RRP44 foram testadas três cepas de bactérias (*E. coli* BL21(DE3), pLysS e *CodonPlus*). Como resultado foi obtido sucesso de expressão da proteína de interesse na fração insolúvel da cepa *E. coli* BL21 *CodonPlus*, no tempo 6h à 27°C, porém o rendimento da proteína de interesse foi extremamente baixo. Foram realizados testes adicionais com alterações nas concentrações do indutor (1mM, 0,5mM e 0,25mM), porém sem alteração e conseqüente melhoria no rendimento de produção da proteína (Figura 8).

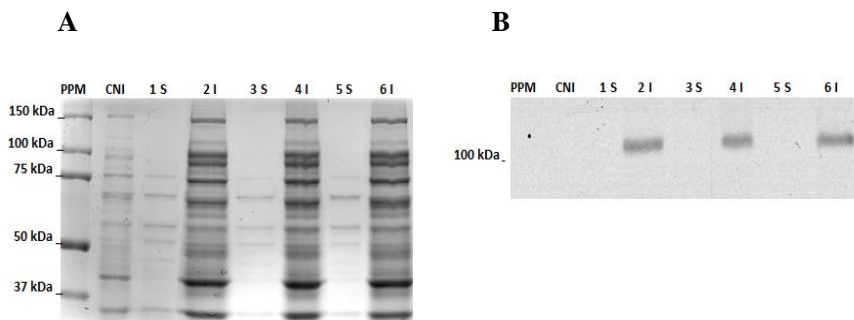


Figura 8 – Análise de expressão da subunidade RRP44 em *Escherichia coli* BL21 *CodonPlus*. A – Gel de poliácridamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* das frações solúveis e insolúveis dos lisados da bactéria. B-*Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG (linhas 1 e 2), 0,5 mM (linhas 3 e 4) e 0,25 mM (linhas 5 e 6) tempo de indução: 6 horas a 27 °C. As linhas 1S, 3S e 5S correspondem à fração solúvel e as linhas 2I, 4I e 6I correspondem à fração insolúvel. PPM: Padrão de peso molecular; CNI: Controle não induzido; S: Solúvel; I: Insolúvel.

Como a subunidade RRP44 possui alto peso molecular (± 116 kDa), pode incorrer em certa dificuldade para o sistema de síntese proteica da bactéria. A alternativa para a expressão heteróloga fracionada dessa proteína, como por exemplo, a expressão em separado das regiões que correspondem ao domínio exoribonuclease R e ribonuclease II, que são responsáveis pela atividade catalítica. Devido a este baixo rendimento, foi optado por não dar continuidade nas etapas seguintes de purificação da proteína, produção de antissoro em camundongos e ensaio de atividade de degradação *in vitro* com esta subunidade.

4.3.2 SUBUNIDADE RRP6

Para a expressão heteróloga da subunidade catalítica RRP6, também foram testadas as três linhagens bacterianas *E. coli* BL21(DE3), pLysS e *CodonPlus*. Após os testes de expressão iniciais, foi identificado a presença da proteína heteróloga via *Western blot* no extrato proteico das linhagens *E. coli* BL21 (DE3) e *CodonPlus*, nos tempos de indução 16h (27°C) e 6h (37°C) para a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) e 6h (27°C), 6h e 16h (37°C) para a linhagem *E. coli CodonPlus*. Entretanto, a detecção via anticorpo anti-His•Tag® foi observada em várias bandas de tamanhos diferentes no extrato proteico bacteriano (Figura 9B). Foram realizadas alterações no processo de extração da proteína das bactérias e adição de inibidores de protease, além de implementar alterações nas condições de transferência e revelação de *Western blot*, porém sem alteração de resultado, persistindo a ligação do anticorpo em várias proteínas do extrato proteico, seguindo um mesmo perfil da ligação (figura 9D).

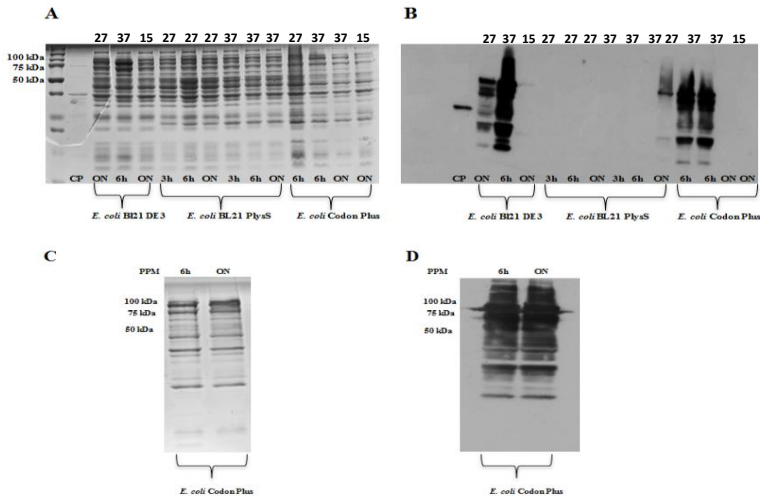


Figura 9 – Análise de expressão da subunidade RRP6 em *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* BL21 PlyS e *Escherichia coli* BL21 CodonPlus. A e C – Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* das frações insolúveis dos lisados da bactéria. B e D – *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão utilizando 1 mM de IPTG em diferentes temperaturas (27°C e 37°C) e tempos (6h e 16h). CP- Controle positivo; PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Biorad).

No ensaio de *Western blot* foi utilizado extrato proteico da cepa *E. coli* BL21 (DE3) expressando uma proteína conhecida, o qual denominamos de controle positivo (Figura 9 – CP). Uma vez que neste extrato houve a detecção específica da proteína heteróloga de ± 40 kDa utilizada como controle e que o extrato bacteriano não transformado não é reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-His•Tag®, conclui-se que a expressão da subunidade RRP6 do complexo exossoma de *T. rangeli* pelas linhagens de *E. coli* utilizadas incorre em alterações que levam a reconhecimentos errôneos. Em virtude deste problema encontrado com a subunidade RRP6 foi optado por não dar continuidade às etapas subsequentes pela impossibilidade de purificação desta proteína.

4.3.3 SUBUNIDADE EAP3

Para a subunidade associada EAP3 foram testadas as mesmas três linhagens de bactérias (*E. coli* BL21(DE3), pLysS e *CodonPlus*). Houve sucesso na expressão heteróloga com a linhagem *E. coli* BL21 *CodonPlus*, com 6h a 27°C com indução de 1 mM (Figura 10). Entretanto um baixo rendimento da produção da proteína de interesse foi detectado (Figura 10B). Para tanto, foi realizado testes com diferentes concentrações do indutor, o que resultou em uma maior expressão da proteína de interesse com 6h a 27°C com 0,25 mM de IPTG (Figura 10D).

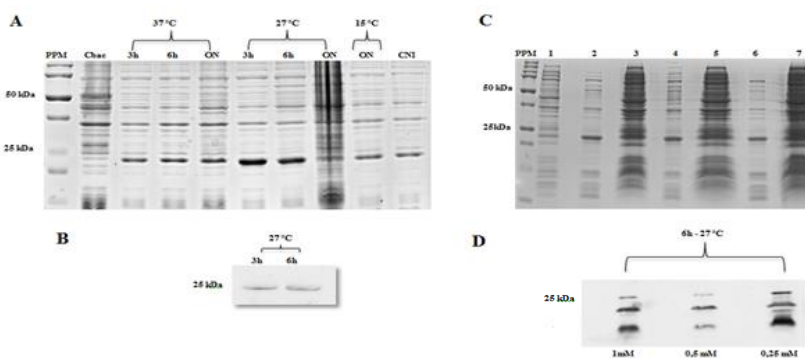


Figura 10 - Análise de expressão da subunidade EAP3 em *Escherichia coli* BL21 *CodonPlus*. A - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie-Blue* dos lisados da bactéria. B - *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão à 27°C utilizando 1 mM de IPTG. C - *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His•Tag®. Indução da expressão à 27°C utilizando diferentes concentrações do indutor. Cbac- Controle bactéria com vetor sem inserto; PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Biorad).

Conforme se pode observar na figura 10D, o anticorpo revelou três bandas distintas de aproximadamente 25 kDa, 15 kDa e 10 kDa., Entende-se que a banda de 25 kDa corresponde a proteína íntegra e as bandas de 15 kDa e 10 kDa correspondem a produtos de degradação devido a possível instabilidade na região C-terminal desta proteína.

4.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA E IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Após a expressão da proteína EAP3 nas condições estabelecidas no item 4.3.3, foi realizado a purificação a partir da fração insolúvel da bactéria por uma coluna de afinidade conforme o descrito na seção 3.12, sendo os resultados apresentados na figura 11. Após a purificação, a proteína recombinante nas cinco eluições foram dialisadas e quantificadas pelo método de Bradford, sendo a imunização dos camundongos realizada conforme descrito no item 3.13.

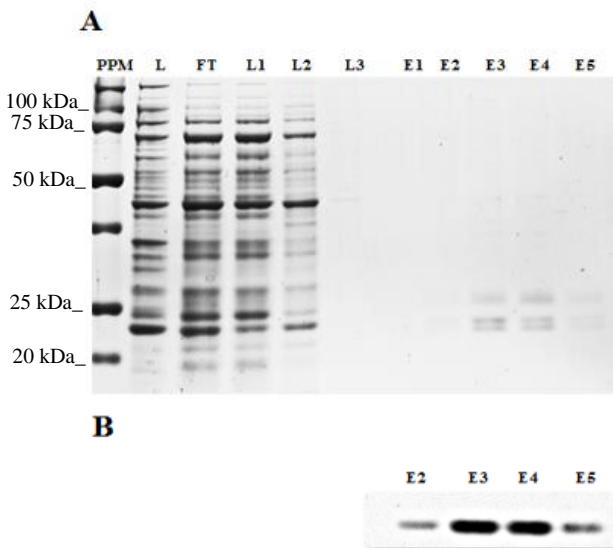


Figura 11 - Etapas da purificação da subunidade EAP3 por cromatografia de afinidade. A- Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % corado com Coomassie blue. B- Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-His*Tag®. PPM - Padrão de peso molecular: *Protein Precision Plus Dual Color* (Bio-Rad) Lisado bacteriano: L; *Flow Through*: FT – proteínas que não aderiram à resina; Lavagens: L1, L2 e L3; Eluições (E1, E2, E3, E4 e E5).

Uma das eluições da proteína purificada foi analisada por espectrometria de massas e confirmou se tratar da proteína associada EAP3 de *T. rangeli* apresentando entre 25% e 49% de cobertura de acordo com a banda analisada. A identidade das três bandas observadas nas eluições foram confirmadas, onde os peptídeos gerados foram identificados no banco de dados como “*exosome associated protein 3*” (Figura 12).

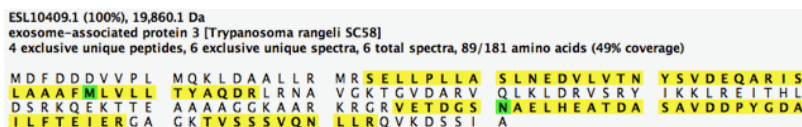


Figura 12 – Resultados obtidos através de espectrometria de massas. Os peptídeos marcados em amarelo representam os peptídeos encontrados durante a análise.

4.5 AVALIAÇÃO DO ANTISSORO POLICLONAL ANTI-TREAP3

A especificidade do antissoro anti-EAP3 produzido foi testado isoladamente em ensaios de *Western blot* utilizando-se como antígenos extratos proteicos totais de parasitos (50µg) de formas epimastigotas da cepa SC58 de *T. rangeli*, assim como a proteína recombinante TrEAP3. Conforme observado na figura 13, o antissoro revelou uma banda única de aproximadamente 150 kDa (Figura 13, linha 1), que não corresponde ao tamanho teórico esperado da proteína EAP3 que é de aproximadamente 20 kDa, tamanho este revelado na linha 2 da figura 13. Entretanto, uma vez que dados descritos na literatura indicam haver uma forte interação *in vivo*, devido ao entrelace de pares de alfa-hélice ligadas por interações eletrostáticas entre a subunidade associada EAP3 com a subunidade RRP6, a qual possui um tamanho de aproximadamente 82 kDa conforme descrito por Barbosa e colaboradores (2014), sugerimos que em *T. rangeli* a subunidade EAP3 encontra-se ligada a subunidade RRP6 e que essa interação não é desfeita quando da desnaturação proteica descrita na seção 3.15.



Figura 13 - *Western blot* utilizando o antissoro anti-*TrEAP3* em extratos proteicos totais de: 1) forma epimastigota da cepa SC58 de *Trypanosoma rangeli*; 2) Proteína recombinante purificada *Tr-EAP3*.

A identidade desta banda de aproximadamente 150 kDa que foi detectada pelo antissoro anti-*TrEAP3* igualmente foi submetida a análise de espectrometria de massas, onde os peptídeos gerados foram identificados no banco de dados como a proteína associada ao exossoma – EAP3 (Figura 14), confirmando assim a sua interação com outra proteína por estar sendo detectada em bandas acima do seu tamanho real.

ESL10409.1 (100%), 19,860.1 Da
 exosome-associated protein 3 [Trypanosoma rangeli SC58]
 2 exclusive unique peptides, 2 exclusive unique spectra, 2 total spectra, 44/181 amino acids (24% coverage)

MDFDDDDVVP L	MQK LDAALL R	MRSELLP LLA	SLNEDV LVTN	YSVDEQAR IS
LAAAFMLVLL	TYAQDR LRNA	VGKTGVDAR V	QLKLD RVSRY	IKKLR EITHL
DSRKQEK TTE	AAAAGGKAAR	KRGRVETDGS	NAELHEATDA	SAVDDPYGDA
ILFTEIERGA	GKTVSSSVQN	LLRQVKDSSI	A	

Figura 14 – Resultados obtidos através de espectrometria de massas. Os peptídeos marcados em amarelo representam os peptídeos encontrados durante a análise.

Um resultado interessante desta análise de proteínas por espectrometria de massas foi a identificação de uma proteína reguladora de transcrição, denominada NOT1. Esta proteína é componente do

complexo CCr4/NOT, que está envolvido em atividades de regulação de transcritos e degradação de RNA. A interação desta proteína já foi relatada na literatura, onde subunidades do complexo exossoma de RNA e complexo TRAMP, co-purificam com o complexo CCr4/NOT apresentando interações físicas e funcionais (AZZOUZ et al., 2009).

De posse deste resultado e por considerar que a subunidade EAP3 possui forte interação com a subunidade RRP6, foi realizada uma tentativa de desfazer essa interação proteica e desacoplar as subunidades EAP3 e RRP6. Para tanto, foram testados diferentes métodos de extração, com alterações na composição do tampão de lise e do pH, com o intuito de separar estas duas unidades proteicas. Apesar das variáveis trabalhadas, não foi obtido resultado satisfatório que permitisse evidenciar a separação das duas subunidades, persistindo a detecção de uma banda de aproximadamente 150 kDa. Foi realizada também a tentativa de dissociação das unidades via sonicação do extrato proteico total, o que resultou na ausência da ligação do antissoro na banda de aproximadamente 150 kDa e reconhecimento de bandas de diferentes tamanhos, havendo um forte reconhecimento de uma banda de aproximadamente 10 kDa (Figura 15).

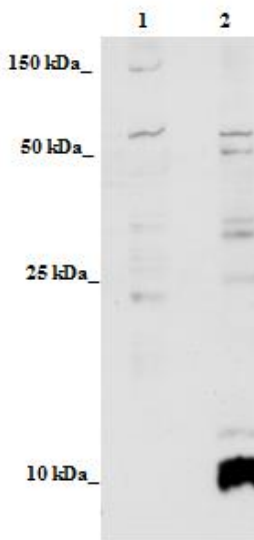


Figura 15 - *Western blot* utilizando o antissoro *anti-TrEAP3* em extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas da cepa SC58 de *T. rangeli*. 1 – Extrato proteico solúvel; 2 – Extrato proteico solúvel sonicado;

4.6 ENSAIO DE CITOLOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A avaliação da localização celular da *TrEAP3* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* por imunofluorescência indireta com o antissoro anti-*TrEAP3* revelou uma fluorescência difusa por todo o corpo celular do parasito, independentemente da forma analisada, que sugere ter localização celular tanto no núcleo como no citoplasma, conforme demonstrado na Figura 16.

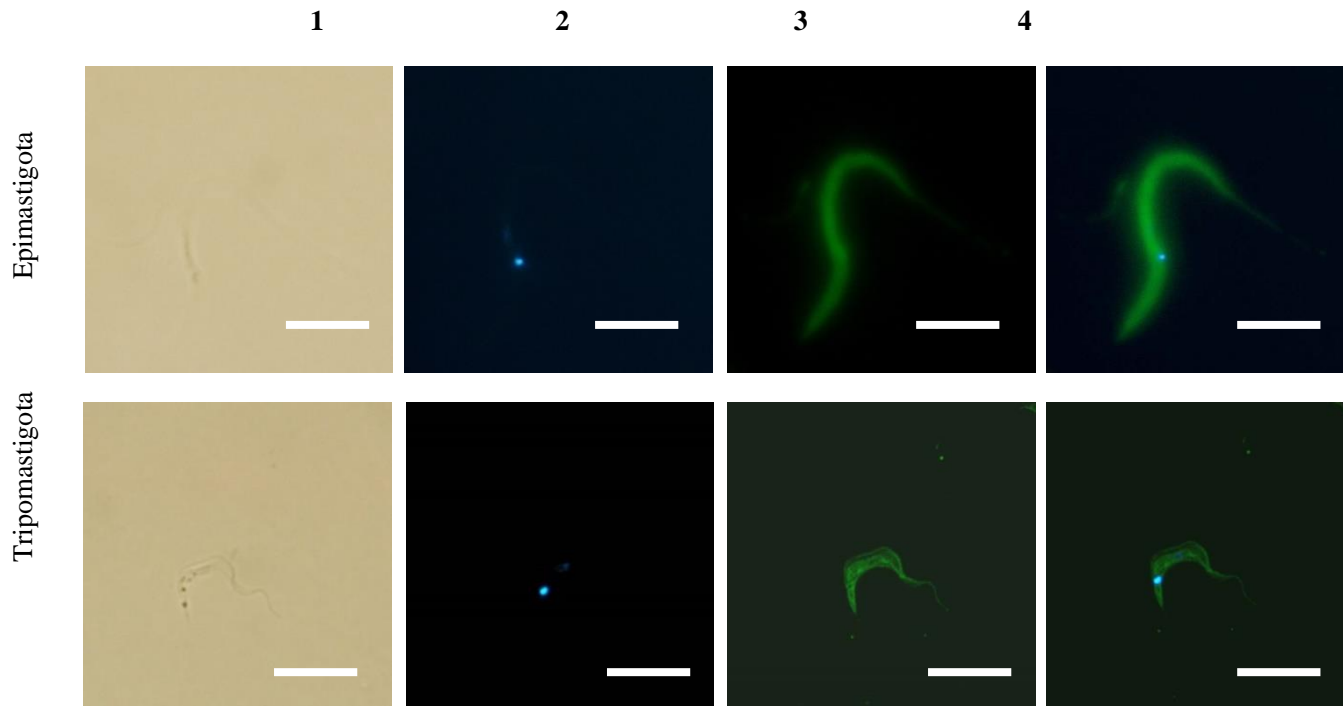


Figura 16 – Citolocalização da *TrEAP3* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*, cepa Choachí, por imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrEAP3*. As imagens representam (1) microfotografias do campo claro, (2) núcleo e cinetoplasto corados com DAPI, (3) expressão da *TrEAP3* e (4) merge: sobreposição das imagens 2 e 3; Barra: 10 μm .

4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO EM FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA RANGELI*

Em ensaios de *Western blot* com extratos proteicos de formas epimastigotas de *T. rangeli*, o antissoro *TrEAP3* detectou quatro bandas na cepa Choachí (KP1+) ($\pm 50/55$ kDa e 165/170 kDa) e duas bandas para SC58 (KP1-) (± 70 e 150 kDa) conforme observado na Figura 17. Apesar da diferença observada, os ensaios de PCR revelaram que os genes da EAP3 para ambas as cepas é do mesmo tamanho, tendo sido observadas somente diferenças pontuais nos resultados de sequenciamento. Além disso, a comparação das sequências traduzidas da EAP3 das duas cepas revelou alterações em relação ao perfil de hidrofobicidade com evidente troca de aminoácidos hidrofílicos para hidrofóbicos, o que pode resultar em proteínas de tamanhos diferentes entre as cepas, uma vez que podem direcionar o enovelamento das proteínas, resultando em tamanhos diferenciados.

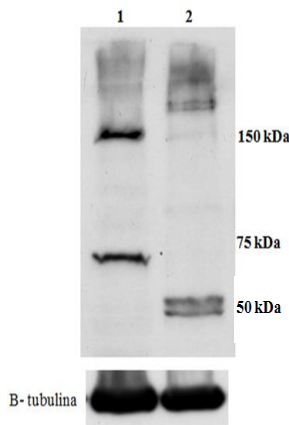


Figura 17 – Reconhecimento da proteína EAP3 em extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas das cepas SC58 (linha 1) e Choachí (linha 2) de *Trypanosoma rangeli*. Como normalizador utilizamos um anticorpo anti β -tubulina.

Igualmente foi realizado ensaio de *Western blot* com extratos proteicos de formas tripomastigotas de *T. rangeli*. Conforme observado na figura 18 não houve alteração no perfil de bandas, como também intensidade de ligação, o que indica que a proteína *TrEAP3* deva ser expressa igualmente nas duas formas do parasito, ainda que seja passível de considerarmos modificações pós-traducionais no estágio epimastigota conforme o descrito acima (Figura 17).



Figura 18 - Reconhecimento da proteína EAP3 em extratos proteicos totais de formas epimastigotas (1) e tripomastigotas (2) da cepa Choachí de *Trypanosoma rangeli*. Como normalizador utilizamos um anticorpo anti β -tubulina.

5 DISCUSSÃO

Enzimas envolvidas no processamento e taxa de renovação de RNA desempenham funções importantes nas vias de expressão gênica. Em tripanosomatídeos a regulação da expressão gênica é crucial para sobrevivência, uma vez que estes organismos estão expostos ao sistema de defesa tanto do hospedeiro mamífero quanto do hospedeiro invertebrado, necessitando assim de proteínas diferenciadas para cada situação, como também proteínas especializadas que irão atuar no processo de diferenciação celular.

O complexo exossoma de RNA atua no processamento e degradação de diversos tipos de RNA, possuindo assim função central na regulação da expressão gênica. Em eucariotos, este complexo multiproteico consiste de um núcleo catalítico inativo (Exo9) dotado de subunidades ribonucleotídicas ativas e cofatores que são necessárias para ativação e ligação do substrato de RNA.

Neste estudo, todos os genes codificantes para as unidades componentes do complexo exossoma de RNA foram identificados no genoma de *T. rangeli*. Este complexo já foi descrito em diversos organismos, tendo sua funcionalidade caracterizada. Dentre as espécies da família Trypanosomatidae somente *L. tarentolae* e *T. brucei* encontram-se com este complexo multiproteico descrito, porém não há relatos de caracterização funcional, especificidade de substrato de RNA, como ocorre a regulação e quais as vias de direcionamento do substrato para as subunidades catalíticas que deverão ser responsáveis por processar ou degradar. Sendo assim, vários fatores precisam ser elucidados neste grupo de organismos.

As sequências nucleotídicas e aminoácidas obtidas para as subunidades catalíticas *TrRRP6*, *TrRRP44* revelaram uma janela aberta de leitura de 2.133 e 3.012 pb que codificam para proteínas de 710 aa (\pm 78,7 kDa) e 1.003 aminoácidos (\pm 113,2 kDa), respectivamente, revelando uma alta identidade com suas ortólogas encontradas em *T. brucei* e *L. tarentolae* (CRISTODERO et al., 2008; ESTEVEZ; KEMPF; CLAYTON, 2001).

Para a subunidade associada *TrEAP3* foi encontrada uma janela aberta de leitura de 547 pb que codifica para uma proteína de 181 aminoácidos (\pm 20 kDa), tamanho semelhante ao encontrado em *T.*

brucei (ESTEVEZ et al., 2003). Esta subunidade possui correspondente homólogo em *S. cerevisiae* denominado RRP47, que se encontra associado fisicamente à subunidade RRP6 no núcleo, desempenhando a função de reconhecimento e ligação do substrato para posterior direcionamento para as subunidades catalíticas (MITCHELL, 2010). Nestes organismos, cepas mutantes para esta subunidade apresentam defeitos no processamento de RNA, revelando sua essencialidade no processo (MITCHELL et al., 2003). Células com depleção da subunidade RRP47 demonstram defeitos similares no processamento de RNA estáveis, como os observados em células com ausência de RRP6, porém os mecanismos precisos de cada uma dessas subunidades permanecem não elucidados (COSTELLO et al., 2011).

As análises dos domínios do complexo exossoma de RNA revelaram a presença dos domínios RNase PH, S1 e KH para o núcleo central (Exo9). Estes domínios encontram-se conservados entre Arquea, procariotos e eucariotos, e com a presença do sítio ativo catalítico somente em Arquea e algumas plantas, e nos demais grupos inativos para atividade catalítica (JANUSZYK; LIMA, 2014; SCHMID; JENSEN, 2008).

O domínio RNase PH encontrado nas subunidades do anel hexamérico está relacionado a atividade exoribonuclease 3' → 5', sendo enzimas que degradam substratos de RNA. Em bactérias e Arquea a atividade catalítica do tipo fosforolítica, que utiliza fosfato inorgânico para a clivagem dos nucleotídeos, liberando NDP (nucleosídeos difosfatados). Já os domínios S1 e KH estão relacionados à capacidade de ligação ao RNA, sendo que a deleção destes domínios ocasiona na perda de afinidade de ligação ao RNA (JENSEN, 2010).

A atividade catalítica do complexo exossoma de RNA em eucariotos é desempenhada pelas subunidades RRP6 e RRP44, também caracterizadas pela presença de domínios específicos que são responsáveis pelas funções de reconhecimento e ligação do substrato como também apresentam sítio ativo para atividade de clivagem dos substratos de RNA (LORENTZEN; BASQUIN; CONTI, 2008). Em *T. rangeli* estes domínios característicos foram identificados nestas subunidades e também estão presentes em organismos filogeneticamente relacionados, como o *T. brucei* (BARBOSA et al., 2014), e também em uma ampla variedade de eucariotos como leveduras e humanos (ALLMANG et al., 1999; MITCHELL et al., 1997).

A análise filogenética de todas as subunidades do complexo exossoma de RNA em tripanosomatídeos demonstrou uma separação das espécies do gênero *Trypanosoma* em relação às espécies do gênero

Leishmania com valores máximos de *bootstrap*, confirmando a já relatada maior proximidade filogenética entre *T. rangeli* e *T. cruzi* em relação aos demais tripanosomatídeos (GRISARD et al., 2010).

O domínio exoribonuclease R e ribonuclease II presentes na subunidade RRP44 fazem parte da família RNR, e são exoribonucleases processivas 3'-5'. Enzimas desta família geralmente são polipeptídeos com múltiplos domínios e estão relacionados com a capacidade de degradar RNA simples como também RNA estruturados. O domínio PIN (*PilT N-terminus*) está relacionado a enzimas endonucleases que clivam RNA simples e são metal-dependentes, ou seja, necessitam desse cofator para desempenhar a atividade endonuclease (CLISSOLD; PONTING, 2000).

O domínio DEDD-Y presente na subunidade RRP6, pertence a uma superfamília de exonucleases que são caracterizadas pela presença de um núcleo constituído por quatro aminoácidos invariantes distribuídos em três sequências motivo (ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E) e tirosina (Y)). Essas sequências formam um sítio ativo que serve como ligante para os dois íons metais que são requeridos para a atividade de exoribonuclease. Este sítio ativo está presente nas sequências analisadas de *T. rangeli*. Para *T. brucei* a presença deste sítio ativo e atividade catalítica já foram descritas, assim foi sugerido que *T. rangeli* a subunidade RRP6 possui este sítio ativo e possa exercer atividade de exoribonuclease. Estudos recentes de cristalografia demonstraram a presença deste sítio catalítico ativo em *T. brucei*, como também demonstram a habilidade de *TbRRP6* em degradar substratos de RNA dupla fita e RNA estruturados *in vitro* (BARBOSA et al., 2014). O domínio HRDC (Helicase e RNAse D – C-terminal) está relacionado ao reconhecimento de diferentes substratos direcionando-o para o sítio ativo para ser processado, enquanto que o domínio PMC2NT está presente na região N-terminal e é essencial para a interação proteína-proteína (STEAD et al., 2007).

Diversas tentativas foram realizadas com o objetivo de expressar a subunidade *TrRRP6* de forma heteróloga para posterior isolamento da proteína e ensaio de atividade de degradação *in vitro*, porém não obtivemos sucesso. Diferentes estudos de expressão da subunidade RRP6 de outros organismos relataram dificuldade na expressão da proteína inteira, sendo que todos os estudos e ensaios de degradação de substrato de RNA *in vitro* realizados com esta subunidade foram obtidos através de construções mutantes em determinados regiões ou expressão de porções desta proteína (BARBOSA et al., 2014; COSTELLO et al., 2011; GREIMANN,

JACLYN C.; LIMA, 2009; HAILE et al., 2007; LIU; GREIMANN; LIMA, 2006; WASMUTH; LIMA, 2016).

Igualmente foram realizadas tentativas de expressão para a segunda subunidade catalítica (RRP44), porém não obtivemos sucesso devido ao um baixo rendimento do sistema de expressão heteróloga utilizado, impossibilitando assim a purificação desta proteína para os ensaios subsequentes. Há algumas possíveis explicações para esse insucesso, onde destaca-se que a subunidade RRP44 possui alto peso molecular (± 116 kDa), o que pode ser um fator limitante para a expressão heteróloga em procaríotos, e que dificultou seu processamento pelo sistema de síntese proteica da bactéria. Etapas de processamento pós-traducional também podem ser requeridos para a produção da proteína de interesse, porém no sistema de expressão heteróloga em *E. coli* esta maquinaria não está presente. Uma alternativa para a expressão desta proteína para estudos funcionais seria a expressão heteróloga de partes dela, como por exemplo, das regiões que correspondem ao domínio exoribonuclease R e ribonuclease II, que são responsáveis pela atividade catalítica.

Os resultados obtidos neste trabalho referente à subunidade associada *TrEAP3* são promissores e, ainda que careça de comprovação detalhada por espectrometria de massas e ensaios de interação proteica, demonstram a primeira evidência *in vivo* da interação desta proteína com a subunidade catalítica RRP6, uma vez que o reconhecimento do antissoro policlonal foi em bandas de alto peso molecular (± 150 kDa), podendo indicar que esse reconhecimento seja referente à soma de proteínas ligadas. Considerando a soma dos tamanhos teóricos das duas subunidades obtêm-se um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa, porém, como o reconhecimento do antissoro é de uma banda de maior tamanho, podemos inferir que estas duas unidades podem estar associadas a modificações pós-traducionais que aumentam o tamanho das proteínas. Em *T. brucei* somente interações *in vitro* foram relatadas, onde as subunidades *TbEAP3* e *TbRRP6* formam um heterodímero (BARBOSA et al., 2014). Estudos funcionais *in vitro* de *TbRRP6* ligado a *TbEAP3* relataram que a ausência desta ligação diminui atividade de ribonuclease, porém não afeta a especificidade ou a habilidade da enzima em degradar RNA dupla-fita (BARBOSA et al., 2014).

Análises *in vitro* com *S. cerevisiae* demonstraram que a subunidade RRP47 (homóloga da EAP3 em tripanosomatídeos) se liga a substratos de RNA estruturados e interage com a subunidade RRP6 formando um heterodímero, sendo esta interação necessária para a estabilidade da subunidade RRP47 (DEDIC et al., 2014). Os níveis de

expressão de RRP47 são significativamente reduzidos em cepas de leveduras expressando mutantes na região N-terminal da subunidade RRP6, onde o domínio PMC2NT, responsável pela interação proteica está localizado (FEIGENBUTZ et al., 2013a; STEAD et al., 2007). Os níveis de transcritos de RRP47 também são reduzidos em mutantes para a subunidade RRP6, sendo que esta redução chega a 15 vezes quando comparada com a cepa selvagem (FEIGENBUTZ et al., 2013a).

Igualmente se observa que em leveduras expressando mutantes para a subunidade RRP6 que ocorre uma redução dos níveis de expressão da subunidade RRP47. Essa redução também é observada em nível de transcritos, sugerindo que os níveis de expressão de RRP6 e RRP47 são mutuamente dependentes, sendo RRP47 mais sensível do que a RRP6 na ausência da sua proteína acessória. Essa sensibilidade deve-se ao fato de que na ausência da sua proteína acessória, esta subunidade sofre ação proteolítica e é direcionada para degradação via proteossoma (FEIGENBUTZ et al., 2013b).

De modo interessante, dados descritos para leveduras revelam que o complexo RRP6-RRP47 é formado depois da importação independente para o núcleo, e que a subunidade RRP47 é rapidamente degradada se a subunidade RRP6 não está disponível para interação. Não se sabe como essa interação não acontece no citoplasma, onde estas proteínas são sintetizadas, porém supõe-se que ambas são direcionadas para o núcleo via importinas ou chaperonas para a formação deste complexo proteico no núcleo (FEIGENBUTZ et al., 2013a).

Apesar das condições de separação das proteínas do *T. rangeli* em géis SDS-PAGE terem sido realizadas em condições desnaturantes, a interação destas proteínas demonstrou-se forte o suficiente e se manteve após o tratamento de desnaturação dos extratos proteicos. Nesse contexto, foi realizado um ensaio alternativo na tentativa de separar esta interação através de sonicação dos extratos proteicos, onde resultou no desaparecimento do sinal na altura entre 150 e 170 kDa e o reconhecimento do anticorpo com maior intensidade em bandas de aproximadamente 10 kDa. Para esta subunidade é relatado na literatura que há a formação de homodímero em leveduras e *T. brucei*, onde os dados de espectrometria revelam a presença de dois picos, 75 kDa e 40 kDa, correspondendo a RRP6 e EAP3, respectivamente (BARBOSA et al., 2014; FEIGENBUTZ et al., 2013a).

Schuch e colaboradores demonstraram que RRP6 e RRP47 se interligam em um heterodímero globular com uma arquitetura elaborada formada por pares de α -hélice entrelaçados. A estrutura dessa ligação explica o porquê da formação desse heterodímero leva a estabilidade e interdependência funcional destas proteínas (SCHUCH et al., 2014).

O domínio PMC2NT da região N-terminal da subunidade RRP6 em leveduras se liga ao RNA e ativa o complexo exossoma nuclear (WASMUTH; LIMA, 2016). Estudos bioquímicos demonstram que este domínio interage diretamente com o domínio N-terminal da subunidade RRP47 (COSTELLO et al., 2011). Este domínio também é responsável pela atividade RRP6 facilitando a ligação desta subunidade com elementos estruturados do RNA (STEAD et al., 2007). Diante destas características do domínio PMC2NT de interagir com a região N-terminal da subunidade RRP6, como também da sua capacidade de ligação a substratos de RNA, supõe-se que a dificuldade encontrada para expressar a subunidade RRP6 de *T. rangeli* deve-se ao fato desta proteína interagir com proteínas sintetizadas pela bactéria na tentativa de estabilizar a sua expressão, uma vez que a interação com esta proteína foi relatada como essencial para a atividade de exoribonuclease em *S. cerevisiae* (FEIGENBUTZ et al., 2013b).

Os ensaios de citolocalização celular para a proteína *TrEAP3* demonstraram um padrão de marcação difusa por todo o parasito, evidenciando a presença desta proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma, porém ensaios mais precisos de citolocalização por confocal seriam necessários para confirmar esta localização. Para *T. brucei*, a localização celular desta proteína não encontra-se descrita, porém estudos de localização subcelular da subunidade catalítica RRP6 (associada de EAP3) através da purificação dos extratos citosólicos e nucleares demonstram que esta proteína encontram-se presente tanto no núcleo quanto no citoplasma, aparentemente em quantidades estequiométricas (HAILE et al., 2007).

Em conjunto, estes resultados indicam a presença do complexo exossoma de RNA no genoma de *T. rangeli* e a expressão da subunidade EAP3 por formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito, e uma possível associação *in vivo* da subunidade catalítica RRP6 com a subunidade EAP3.

6 CONCLUSÕES

- O *Trypanosoma rangeli* possui todos os genes codificantes para as 12 subunidades do complexo exossoma de RNA em seu genoma e apresenta todos os domínios conservados característicos para as subunidades do núcleo central e subunidades catalíticas sugerindo que esta maquinaria seja ativa neste organismo;
- O complexo exossoma de RNA encontra-se conservado entre as espécies de tripanosomatídeos analisadas, reforçando a maior proximidade filogenética do *T. rangeli* com o *T. cruzi* do que com os demais tripanosomatídeos analisados;
- Os genes *TrRRP6* e *TrRRP44* possuem 2.133 e 3.012 pb e codificam para proteínas de 710 e 1.003 aa, respectivamente;
- O gene *TrEAP3* possui 547 pb, codificando para um proteína de 181 aa com peso molecular predito de aproximadamente 20 kDa. Entretanto, a análise da proteína em extratos proteicos totais de *T. rangeli* com o antissoro anti-*TrEAP3* revela uma banda de ± 150 kDa, sugerindo a sua associação com a subunidade *TrRRP6* e/ou a existência de modificações pós-traducionais;
- Nos extratos proteicos totais de *T. rangeli* a subunidade *TrEAP3* encontra-se ligada a subunidade catalítica *TrRRP6*, uma vez que após processo de sonicação o sinal de reconhecimento da proteína diminuiu de ± 150 kDa para ± 10 kDa.
- Resultados preliminares da análise imunofluorescência indireta apontam que *TrEAP3* está distribuída por todo o corpo celular, tanto em formas epimastigotas como em formas tripomastigotas;

7 PERSPECTIVAS

- Confirmação da identidade das proteínas reconhecidas por *Western Blot* com o antissoro *TrEAP3* através de espectrometria de massas;
- Construção de plasmídeos para transfecção de parasitos para superexpressão e/ou *knockout* de *TrRRP6* para avaliar possíveis alterações nos níveis de transcrito e expressão proteica de *TrEAP3*;
- Expressão heteróloga das porções correspondentes ao domínio responsável pela atividade catalítica das subunidades RRP6 e RRP44 para ensaios de atividade de degradação de RNA *in vitro*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLMANG, C. et al. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. **Genes and Development**, v. 13, n. 16, p. 2148–2158, 1999.
- ÁVILA, A. R. et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 159–168, 2003.
- AZZOUZ, N. et al. The CCR4-NOT complex physically and functionally interacts with TRAMP and the nuclear exosome. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, 2009.
- BARBOSA, R. L. et al. RRP6 from *Trypanosoma brucei*: Crystal structure of the catalytic domain, association with EAP3 and activity towards structured and non-structured RNA substrates. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- BENZ, C. et al. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125–134, 2005.
- BLUMENTHAL, T. Trans-splicing and operons. **WormBook**, p. 1–9, 2005.
- BUTLER, J. S. The yin and yang of the exosome. **Trends in Cell biology**, v. 12, n. February, 2002, 2002.
- CHEKANOVA, J. A. et al. Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33158–33166, 2000.
- CHLEBOWSKI, A. et al. RNA decay machines: The exosome. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 6–7, p. 552–560, 2013.
- CLAYTON, C. E. without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal** v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.

CLISSOLD, P. M.; PONTING, C. P. mRNA decay and RNAi. **Current Biology**, v. 10, p. 888–890, 2000.

COSTELLO, J. L. et al. The C-terminal region of the exosome-associated protein Rrp47 is specifically required for box C/D small nucleolar RNA 3' maturation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4535–4543, 2011.

CRISTODERO, M. et al. The *Leishmania tarentolae* exosome: Purification and structural analysis by electron microscopy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 24–29, 2008.

DE GAUDENZI, J. G. et al. Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes. **PeerJ**, v. 1, p. e118, 2013.

DEDIC, E. et al. Structural analysis of the yeast exosome Rrp6p-Rrp47p complex by small-angle X-ray scattering. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 634–640, 2014.

DEUTSCHER, M. P. Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 659–666, 2006.

ESTEVEZ, A. M. et al. The roles of intersubunit interactions in exosome stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34943–34951, 2003.

ESTEVEZ, A. M.; KEMPF, T.; CLAYTON, C. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **EMBO Journal**, v. 20, n. 14, p. 3831–3839, 2001.

FEIGENBUTZ, M. et al. Assembly of the yeast exoribonuclease Rrp6 with its associated cofactor Rrp47 occurs in the nucleus and is critical for the controlled expression of Rrp47. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 22, p. 15959–15970, 2013a.

FEIGENBUTZ, M. et al. The exosome cofactor Rrp47 is critical for the

stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–17, 2013b.

GREIMANN, JACLYN C.; LIMA, C. D. . Activity Assays. **Methods Enzymol**, v. 448, n. 8, 2009.

GRISARD, E. C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 18–25, 2010.

GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.

HAILE, S. et al. The subcellular localisation of trypanosome RRP6 and its association with the exosome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 52–58, 2007.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, 2007.

HAN, J.; HOOFF, A. VAN; The RNA exosome channeling and direct access conformations have distinct *in vivo* functions. **Cell Rep.** 16, n. 12, p. 3348–3358, 2016.

JANUSZYK, K.; LIMA, C. D. The eukaryotic RNA exosome. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 24, n. 1, p. 132–140, 2014.

JENSEN, T. H. RNA exosome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 702, 2010.

JOHNSON, P. J.; KOOTER, J. M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**, v. 51, n. 2, p. 273–281, 1987.

KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 1, p. 21–25, 2002.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 181, n. 2, p. 61–72, 2012.

LANGE, H. et al. Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 9, p. 3038–3044, 2008.

LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly (A) site selection and *trans-splicing* in *Leishmania*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 7, p. 996–1007, 1993.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S. *trans* and *cis* splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830–840, 2003.

LIU, Q.; GREIMANN, J. C.; LIMA, C. D. Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1223–1237, 2006.

LORENTZEN, E.; BASQUIN, J.; CONTI, E. Structural organization of the RNA-degrading exosome. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 6, p. 709–713, 2008.

LYKKE-ANDERSEN, S. et al. The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. **RNA biology**, v. 8, n. 1, p. 61–66, 2011.

MAKINO, D. L. et al. RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 54–58, 2015.

MILLIGAN, L. et al. A yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 17, p. 5446–57, 2008.

MITCHELL, P. et al. The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'- 5' Exoribonucleases. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 457–466, 1997.

MITCHELL, P. et al. Rrp47p is an exosome-associated protein required

for the 3' processing of stable RNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 19, p. 6982–92, 2003.

MITCHELL, P. Rrp47 and the function of the Sas10/C1D domain. **Biochemical Society transactions**, v. 38, n. 4, p. 1088–92, 2010.

MITCHELL, P. Exosome substrate targeting: the long and short of it. **Biochemical Society transactions**, v. 42, n. 4, p. 1129–34, 2014.

MITCHELL, P.; TOLLERVEY, D. Musing on the structural organization of the exosome complex. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 10, p. 843–6, 2000.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135–141, 2006.

PHILLIPS, T. Regulation of Transcription and gene expression in eukaryotes. **Nature Education**, v. 1, p. 1–4, 2008.

RAIJMAKERS, R.; SCHILDERS, G.; PRUIJN, G. J. The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. **Eur J Cell Biol**, v. 83, n. 5, p. 175–183, 2004.

RAINES, R. T. Ribonuclease A. **Chemistry Review**, v. 98, n. 96, p. 1045–1065, 1998.

RIGBY, R. E.; REHWINKEL, J. RNA degradation in antiviral immunity and autoimmunity. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 179–188, 2015.

SCHMID, M.; JENSEN, T. H. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 10, p. 501–510, 2008.

SCHUCH, B. et al. The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 23, p. 2829–2846, 2014.

STEAD, J. A. et al. The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor

Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 16, p. 5556–5567, 2007.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 1, p. 720–725, 1993.

WASMUTH, E. V; LIMA, C. D. The C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. **Nucleic Acids Research**, p. 1–15, 2016.