

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**MARIANA LOTERIO SILVA**

**PROTEÍNA RUVB-LIKE 1: A POTENCIAL METILAÇÃO DE ARGININAS E  
SUA RELEVÂNCIA BIOLÓGICA EM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

**Ribeirão Preto  
2022**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**MARIANA LOTERIO SILVA**

**PROTEÍNA RUVB-LIKE 1: A POTENCIAL METILAÇÃO DE ARGININAS E  
SUA RELEVÂNCIA BIOLÓGICA EM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Orientadora:

Prof. Dra. **ANGELA KAYSEL CRUZ**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biomédicas com  
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

**Ribeirão Preto  
2022**

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

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 68<sup>a</sup> Sessão Ordinária, realizada em  
31/10/2022

Dedico este trabalho aos meus pais, Andrea e Marcelo, por todo carinho, amor e tempo investido em mim. Ao meu irmão Rodrigo e companheiro Gustavo, por toda atenção, paciência e torcida.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Andrea e Marcelo, que sempre apoiaram meus sonhos, proporcionando o melhor que eles podiam. Ao meu querido irmão Rodrigo e companheiro Gustavo, por todo carinho, incentivo, apoio emocional durante os anos longe de casa e comemorações por cada conquista realizada.

Aos meus tios Zé, Tereza, Adriana e Fabiana, por todos os concelhos, orientações e apoio que recebi.

Agradeço à Deus por toda paciência durante todo o processo e pela oportunidade de trilhar o caminho dos meus sonhos, abençoando minha trajetória e pelas pessoas incríveis que conheci durante esta jornada.

Aos meus amigos da CB, que enfrentaram comigo todas as dificuldades da vida acadêmica e me fizeram companhia durante este período de altos e baixos.

Ao Curso de Férias em Ciências Biomédicas, pela oportunidade de fazer parte desta entidade que se dedica à levar a ciência para estudantes do ensino médio de escolas públicas e divulgar a CB pelo Brasil.

Aos meus professores, que me proporcionaram grandes aprendizados, tanto acadêmicos, quanto da vida. Por me ensinarem o amor pela ciência e que devemos lutar e protege-la sempre.

Sou grata também aos meus colegas de laboratório Carol, Jotacê, Lissur, Brenda e Gustavo Daniel, além das técnicas Tânia e Viviane, que ajudaram e contribuíram imensamente com este trabalho, por meio de seus conhecimentos e também pela amizade de cada um deles.

À professora Angela, por ter me recebido em seu laboratório, por ter me acolhido e ser muito além de uma orientadora de iniciação científica, por me ensinar o valor da ciência e vibrar comigo a cada resultado novo.

Ao Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênico e seus funcionários, pelo suporte e também pela estrutura.

### **AGRADECIMENTO À FAPESP**

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter concedido a bolsa iniciação científica para o desenvolvimento deste projeto, desde janeiro de 2021 (2020/14059-0).

## RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e que afetam cerca de um milhão de pessoas por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021). Do ponto de vista molecular, estes parasitas apresentam particularidades em relação a regulação da expressão gênica, que ocorre majoritariamente em nível pós-transcricional; seus genes estão organizados em unidades policistrônicas, e não têm promotores canônicos que dirijam individualmente sua transcrição. Assim, a transcrição origina uma molécula de pré-mRNA que é processada por *trans-splicing*, gerando mRNAs maduros, os quais podem ser alvos de Proteínas Ligantes de RNAs (RBPs, do inglês RNA Binding Proteins), que são capazes de alterar características como a estabilidade, distribuição celular ou iniciação da tradução deste mRNA. A interação das RBPs com o RNA depende de diferentes fatores, como modificações pós-traducionais (PTM), entre elas, a metilação de argininas promovida por PRMTs (proteínas arginina metiltransferases).

Em trabalhos anteriores do laboratório, a proteína RuvB-Like1 foi identificada como potencial alvo da enzima PRMT5 de *Leishmania braziliensis*. A RuvB-Like1 pertence à família AAA+, e pode estar envolvida em reparo de DNA, transcrição, remodelação da cromatina e apoptose. Esta proteína é conservada desde leveduras até humanos e é caracterizada pela presença de motifs responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP. Assim, nosso objetivo foi caracterizar RuvB-Like 1 de *L. braziliensis* (*LbRuvB*) e o efeito da potencial metilação de arginina sobre a proteína.

Nossos resultados incluíram o alinhamento da proteína *LbrRuvB* com a de outros organismos com a demonstração de alta conservação de seus motifs. Uma análise de modelagem molecular utilizando a RuvB-Like1 humana para comparação, revelou algumas diferenças estruturais, apesar da conservação dos motifs. O sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para adição da etiqueta *myc* na porção N-terminal da *LbRuvB* (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*) e para obtenção do nocaute de LbrPRMT5 (*mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*). Estas ferramentas foram utilizadas para a caracterização parcial de *LbrRuvB*; nas condições avaliadas não observamos efeitos fenotípicos ou alterações de distribuição da proteína RuvB-Like1 na ausência de PRMT5. Foi possível demonstrar por ensaios de RT-qPCR que os

níveis de transcrito da *LbrRuvB* são mais altos em amastigotas axênicos do que nas formas procíclicas e metacílicas, enquanto o ensaio de western blot empregando anticorpo anti-*myc* demonstrou que a proteína tem o tamanho predito (~50kDa) e é expressa nas três principais fases do ciclo de vida do parasito de maneira semelhante, independente da presença de *LbrPRMT5*. Os resultados da microscopia de imunofluorescência revelaram que a *LbrRuvB* se encontra no núcleo, mas também no citoplasma de forma semelhante nos dois backgrounds genéticos. Além disso, a *LrbPRMT5* foi co-imunoprecipitada com a *LbrRuvB* no ensaio imunoprecipitação, que também resgatou proteínas que participam de processos nos quais RuvB está implicada em outros organismos. Em conjunto, os dados ajudaram a elucidar algumas das características da *LbrRuvB* e demonstraram que *LrbPRMT5* não tem impacto mensurável em sua expressão ou localização intracelular. Nossos achados têm duas interpretações possíveis; ou a *LbrRuvB* não sofre metilação pela ação de *LbPRMT5*, ou esta não ocorre nas condições e parâmetros analisados.

**Palavras-chave:** RuvB-Like1, metilação, Arginina metiltransferases, modificação pós-traducional, regulação da expressão gênica, *Leishmania braziliensis*.

## ABSTRACT

The Leishmaniases are infectious diseases caused by *Leishmania* ssp and affect 1 million individuals per year, according to the World Health Organization (WHO, 2021). These protozoans have peculiar features regarding their genetic organization, which including the polycistronic nature of the transcriptional process and the implicated differences on regulation of gene expression that happens mainly at the post-transcriptional level. The transcription generates a pre-mRNA, which is processed into mature mRNA. The RNA Binding Proteins (RBPs) has an essential participation in modulating gene expression in these parasites. The interaction of RBPs with an mRNA may modulate its stability, cellular localization, or translation initiation rates. This interaction may change, depending on several factors, such as post-translational modifications (PTMs). One of this modifications is the arginine methylation, which is catalyzed by Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs).

Previously, our group identified protein RuvB-Like1 (*LbRuvB*) as a potential target of PRMT5 (*LbPRMT5*) in *Leishmania braziliensis*. RuvB-Like1 is a DNA helicase belonging to the AAA+ family of ATPases and plays essential roles in several cellular processes, such as DNA repair, transcription regulation, chromatin remodeling and apoptosis. This protein is conserved from yeast to humans and is characterized by the presence of conserved motifs, responsible for ATP binding and hydrolysis. Thereby, our goal was to characterize the effect of a putative arginine methylation on RuvB-Like 1.

The alignment of amino acid sequences from different organisms showed that the motifs of RuvB-Like1 are conserved, and a computational modeling analysis indicated some differences of the predicted structures of *LbrRuvB* and human RuvB-Like1. The CRISPR/Cas9 system allowed us to add a myc-tag to the *LbrRuvB* N-terminal (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*), and to knockout *LbPRMT5* to investigate putative effects of the absence of PRMT5 (*mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*). These tools were used to partially characterize the *LbrRuvB*; under the evaluated condition we did not observe phenotypic effects or differences in the distribution of the protein in the absence of PRMT5. RT-qPCR assays showed that the transcript levels of *LbrRuvB* is higher in axenic amastigotes compared to procyclic and metacyclic forms. Western blot assays revealed a protein of the predicted size

(50 kDa) and showed that there are no differences in *LbrRuvB* expression among the three main forms of the parasite life cycle. The results from immunofluorescence assays indicate that *LbrRuvB* displays a nuclear and cytosolic localization in both genetic backgrounds. Immunoprecipitation assays indicated that the *LbrRuvB* interacts with *LbrPRMT5* and with several proteins involved in cellular processes compatible with some of the predicted roles of RuvB. Together, our data helped to elucidate some of the characteristics of *LbrRuvB* and demonstrated that *LbrPRMT5* has no measurable impact on its expression or intracellular localization. Our findings have two possible interpretations; either *LbrRuvB* is not a target for the action of *LbrPRMT5*, or the putative methylation does not occur under the conditions and parameters analyzed.

**Keywords:** RuvB-Like1, methylation, Arginine Methyltransferases, post-transcriptional modification, gene expression regulation, *Leishmania braziliensis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAA+**: ATPase Associated with diverse cellular Activities
- aDMA**: dimetilação assimétrica
- ATP**: trifosfato de adenosina
- CDS**: Coding DNA Sequence
- CHX**: cicloheximida
- CRISPR**: Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas
- crRNA**: CRISPR RNA
- GO**: Gene Ontology
- IP**: imunoprecipitação
- LbPRMT5**: PRMT5 de *Leishmania braziliensis*
- LbRuvB**: proteína RuvB-Like 1 de *Leishmania braziliensis*
- LC**: leishmaniose cutânea
- LV**: leishmaniose visceral
- MMA**: monometilação
- mycRuvB<sup>+/+</sup>**: transfectantes contendo etiquetada *myc* no gene codificador da RuvB-Like1
- mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO**: transfectantes contendo etiquetada *myc* no gene codificador da RuvB-Like1 e nocaute para PRMT5
- OMS**: Organização Mundial da Saúde
- PAM**: Protospacer Adjacent Motif
- PRMTs**: Protein Arginine Methyltransferases
- PTMs**: Post-Translational Modifications
- RBPs**: RNA Binding Proteins
- sDMA**: dimetilação simétrica
- sgRNA**: RNA guia
- SL-RNA**: transcrito líder de trans-splicing
- tracrRNA**: trans-activating crRNA
- UTRs**: UnTranslated Regions

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo do ciclo de vida do parasita.....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo do processo de transcrição policistronica e trans-splicing.....	19
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo das três classificações das PRMTs.....	21
<b>Tabela I.</b> Proteínas que interagem com PRMTs contendo motivos RG e/ou GO RBP.....	22
<b>Figura 4.</b> Perfil de infecção in vitro de parasitos nocaute para PRMTs.....	23
<b>Figura 5</b> Ilustração do funcionamento do mecanismo CRISPR/Cas9 com todos os componentes do complexo enzimático.....	26
<b>Tabela II.</b> Parâmetros utilizados no termociclador para amplificação do DNA guia.....	29
<b>Tabela III.</b> Parâmetros utilizados no termociclador para amplificação do DNA doador.....	29
<b>Figura 6</b> Alinhamento da RuvB-Like1.....	39
<b>Figura 7</b> Predição da estrutura da proteína RuvB-Like 1 de <i>L. braziliensis</i> .....	40
<b>Figura 8</b> Análise dos produtos de PCR por fracionamento em gel de agarose 1%.....	42
<b>Figura 9</b> Confirmação da inserção da etiqueta myc na proteína RuvB-Like1.....	43
<b>Figura 10</b> Identificação da proteína RuvB-Like1 etiquetada com myc por ensaio de western blotting.....	44
<b>Figura 11</b> Análise dos produtos de PCR empregados na transfecção por fracionamento em gel de agarose 1%.....	45
<b>Figura 12</b> Confirmação da substituição de PRMT5 pelo gene de resistência a blasticidina.....	46
<b>Figura 13</b> Curva de crescimento celular.....	47
<b>Figura 14</b> Representação gráfica da análise dos níveis do transcrito de RuvB-Like1, por RT-qPCR.....	48
<b>Figura 15</b> Representação gráfica da análise dos níveis do transcrito de RuvB-Like1, por RT-qPCR, nas linhagens parental e nocaute.....	49
<b>Figura 16</b> Identificação da proteína RuvB-Like 1 etiquetada com myc por ensaio de western blot e análise por densitometria.....	50
<b>Figura 17</b> Identificação da proteína RuvB-Like 1 etiquetada com myc por ensaio de western blot e análise por densitometria nas linhagens etiquetada e nocaute.....	51

<b>Figura 18</b> Ensaio de decaimento de proteína.....	53
<b>Figura 19</b> Análise de decaimento da proteína RuvB-Like1.....	54
<b>Figura 20</b> Localização subcelular da proteína RuvB-Like 1 por microscopia de imunofluorescência em promastigotas procíclicos.....	55
<b>Figura 21</b> Imunoprecipitação da proteína <i>LbRuvB</i> .....	56
<b>Tabela IV.</b> Proteínas que interagem com <i>LbRuvB</i> identificadas por meio do ensaio de imunoprecipitação.....	57
<b>Tabela V.</b> Descrição da função das proteínas que interagem com <i>LbRuvB</i> .....	59
<b>Figura 22</b> Rede de interação entre genes identificados e termos do GO.....	60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	16
<b>1.1. <i>Leishmania</i> spp.....</b>	16
<b>1.2. Ciclo de vida digenético.....</b>	17
<b>1.3. Organização Genética.....</b>	18
<b>1.3.1. Arginina Metiltransferases (PRMTs) .....</b>	20
<b>1.4. Estudo de uma proteína alvo de PRMT5: RuvB-Like1.....</b>	21
<b>1.5. Proteína RuvB-Like 1.....</b>	23
<b>1.6. Edição Gênica.....</b>	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	27
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	27
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	28
<b>3.1. Cultura dos parasitos.....</b>	28
<b>3.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para amplificação do DNA utilizado para transfecção.....</b>	28
<b>3.2.1. Amplificação do DNA para gerar parasitos etiquetados.....</b>	28
<b>3.2.2. Amplificação do DNA para gerar parasitos nocautes.....</b>	30
<b>3.3. Precipitação e Purificação do produto das reações de PCR.....</b>	31
<b>3.4. Transfecção.....</b>	31
<b>3.5. Extração do DNA para confirmação de sucesso na transfecção.....</b>	32
<b>3.6. Curva de Crescimento Celular.....</b>	32
<b>3.7. Enriquecimento de metacíclicos e diferenciação dos amastigotas.....</b>	32
<b>3.8. PCR quantitativa a partir de RNA (RT-qPCR) .....</b>	33
<b>3.9. Extração de Proteína e ensaio de Western Blot.....</b>	33
<b>3.10. Ensaio de decaimento de proteína.....</b>	34
<b>3.11. Imunofluorescência.....</b>	34
<b>3.12. Imunoprecipitação.....</b>	35
<b>3.13. Análises de Bioinformática.....</b>	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	38
<b>4.1. Alinhamento e Análise da estrutura da proteína.....</b>	38
<b>4.2. Obtenção dos transfectantes contendo a etiqueta Myc na porção N- terminal da proteína <i>RuvB-Like 1</i>.....</b>	40

4.3. Obtenção dos transfetantes nocautes para o gene codificador da PRMT5.....	44
4.4. Curva de Crescimento Celular dos transfetantes <i>mycRuvB<sup>+/+</sup></i> .....	47
4.5. Quantificação dos níveis do transcrito de RuvB-Like1 por RT-qPCR.....	47
4.6. Avaliação da expressão da proteína RuvB-Like1 por ensaio de Western Blot utilizando promastigotas procíclicos, metacíclicos e amastigotas... ..	50
4.7. Análise da estabilidade da proteína <i>LbRuvB</i> na ausência e presença da PRMT5.....	52
4.8. Localização subcelular da proteína RuvB-Like 1 por ensaio de Imunofluorescência.....	54
4.9. Análise de interação da RuvB-Like 1 com outras proteínas por imunoprecipitação.....	55
<b>5. DISCUSSÕES.....</b>	61
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	65
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	66

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Leishmania* spp.

A *Leishmania* é um gênero de protozoários responsáveis por causar um conjunto de doenças conhecido como Leishmanioses. Os parasitos são transmitidos para os humanos pela picada de um flebotomíneo fêmea previamente infectado, conhecido popularmente como mosquito-palha.

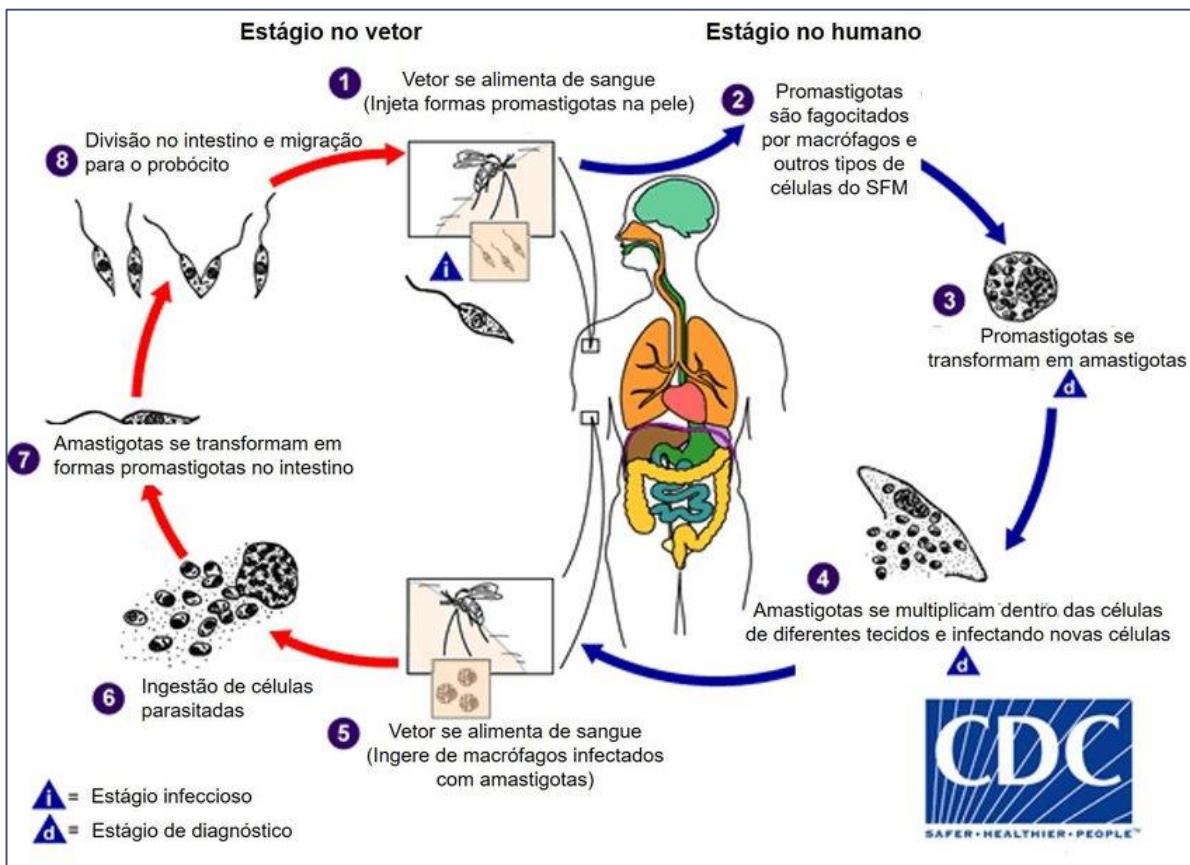
As Leishmanioses apresentam-se como manifestações clínicas bastante diversas, dependendo da espécie causadora da infecção e da resposta imune do indivíduo, podendo ser classificadas entre as formas visceral (LV, leishmaniose visceral), também conhecida como calazar, e a tegumentar (LT). A última pode ser subdividida em formas brandas ou graves podendo se apresentar como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LCM) ou em caso de indivíduos imunossuprimidos, como leishmaniose disseminada (LCD). As principais espécies causadoras da leishmaniose visceral em adultos e crianças são *L. donovani*, no continente asiático e africano; e a *L. infantum* no Mediterrâneo, sudoeste e região central da Ásia, além da América central e do sul, acometendo, principalmente, crianças (MURRAY, HENRY W. et al., 2005). Em relação à LT, as espécies de *Leishmania* podem ser divididas entre aquelas presentes no “Novo Mundo”, dentre as quais as mais importantes são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, e *L. mexicana* e as espécies prevalentes no “Velho Mundo”, como *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, por exemplo (BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen., 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018 reportou que 92 países são endêmicos ou relataram casos de leishmaniose cutânea (LC). Já os casos de leishmaniose visceral foram relatados em 83 países. Atualmente existem mais de 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas para leishmaniose (OMS, 2022). Além disso, a doença está associada a regiões com índices socioeconômicos mais baixos, sendo que a população mais afetada é de origem pobre, tendo como fatores agravantes a desnutrição, condições precárias de saneamento básico e habitação, mudanças climáticas e ambientais, entre outros. A enfermidade pode ser encontrada em regiões da África, Américas (no qual, o Brasil apresenta uma grande quantidade de casos), mediterrâneo; uma doença com distribuição abrangente no mundo (Médicos Sem Fronteiras, 2022).

## 1.2. Ciclo de vida digenético

O parasito *Leishmania* spp. possui características digenéticas, precisa passar por dois hospedeiros (um invertebrado e outro vertebrado) para completar seu ciclo de vida (ORREGO, LINA M. et al., 2019).

Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo infectado regurgita a forma infectiva do parasito, conhecida como promastigota metacíclico, presente no trato digestivo anterior do inseto. Os promastigotas metacíclicos inoculados nos hospedeiros vertebrados são fagocitados por macrófagos e outras células fagocíticas na derme e se diferenciam em amastigotas, as formas proliferativas no hospedeiro vertebrado, no interior do fagolisossomo. As principais características dos amastigotas são a forma arredondada e a presença de flagelo internalizado, restrito ao bolso flagelar. A intensa proliferação dos parasitas leva à lise das células fagocitárias, e uma vez liberados, infectam outros fagócitos presentes no tecido. O ciclo recomeça no momento em que outro inseto se alimenta em reservatório infectado, no qual, acaba ingerindo as formas amastigotas, que irão se diferenciar na forma promastigota procíclica no intestino do inseto (Figura 1). Nesta fase a *Leishmania* é caracterizada por seu aspecto alongado e monoflagelado; outro ponto importante presente nesse momento do ciclo é a rapidez com que os parasitas conseguem se multiplicar (REITHINGER, RICHARD et al., 2007). As formas promastigota procíclicas diferenciam-se em nectomonas, que interagem com as microvilosidades presentes no intestino médio do inseto, movendo-se pelo intestino médio torácico, onde ocorre a diferenciação em promastigotas leptomonas. Quando atingem a válvula estomodeal, há diferenciação para as formas haptomonas que, em seguida se diferenciam em promastigotas metacíclicos na porção anterior de trato digestório do hospedeiro invertebrado (SUNTER, Jack; GULL, Keith., 2017).

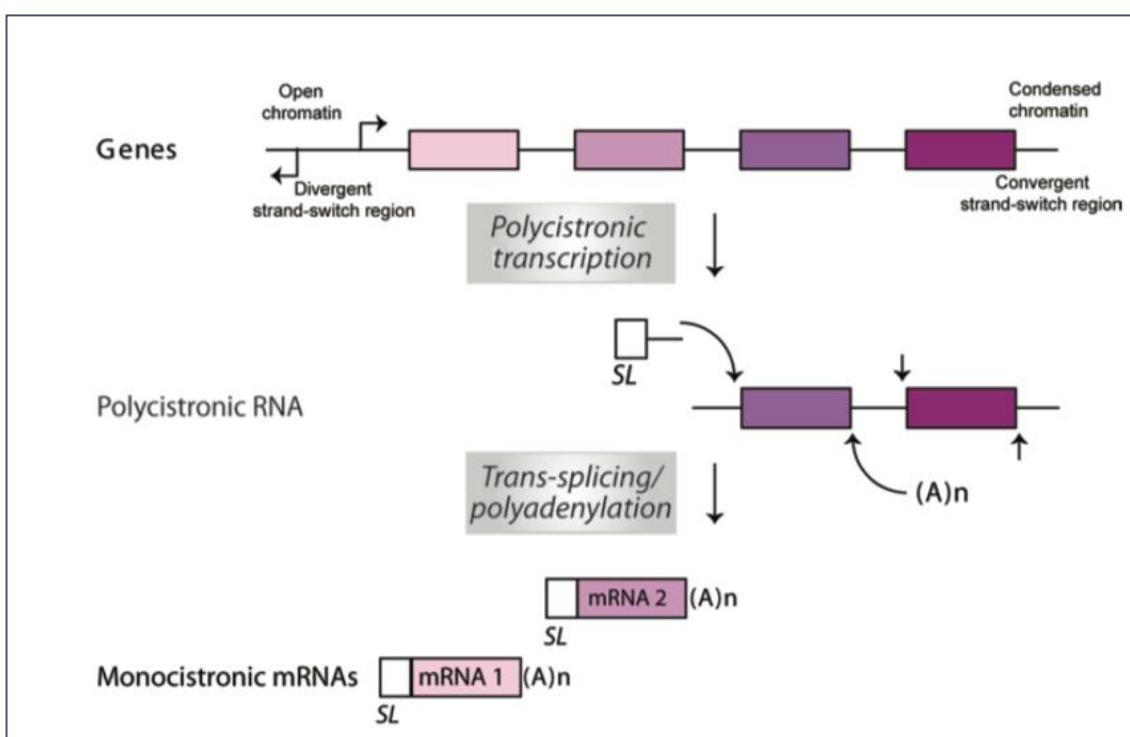


**Figura 1.** Esquema ilustrativo do ciclo de vida do parasita, mostrando sua fase promastigota, enquanto ainda habita o intestino do Flebotomíneo e sua fase amastigota, infectando macrófagos de mamíferos. Imagem modificada de: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>

### 1.3. Organização Genética

Do ponto de vista de organização genética, os tripanossomatídeos apresentam algumas peculiaridades em relação a outros eucariotos, o que inclui seu processo de transcrição, o qual ocorre constitutivamente. Isto se deve ao fato de que os genes destes organismos são organizados em longas unidades policistrônicas, as quais não apresentam promotores canônicos para a RNA polimerase II (responsável pela transcrição dos mRNAs de *Leishmania*), fazendo com que a dinâmica de transcrição dos tripanossomatídeos seja diferente da maioria dos eucariotos, ocorrendo de maneira policistrônica (DOCAMPO, Roberto et al., 2011). Normalmente, a transcrição se inicia em áreas de troca de fitas divergentes e termina em regiões convergentes (de troca de fita) ou no final de um cromossomo (CLAYTON, Christine., 2019). O produto da transcrição policistrônica é uma molécula de pré-mRNA que será processado por *trans-splicing*, em que a clivagem e emenda envolve um transcrito líder de *splicing*

(SL-RNA) portando um miniexon de ~39 nucleotídeos na extremidade 5', que traz consigo o *cap* e é adicionado à extremidade 5' de cada mRNA (DOCAMPO, Roberto et al., 2011). Outra modificação que ocorre durante o processo de formação do mRNA maduro é a adição da cauda Poli-A, localizada na extremidade 3'. O sítio de poliadenilação não tem conservação de sequência, sendo dependente do sítio acceptor de *splicing* do gene a jusante. A presença de uma trilha de pirimidinas próxima a um dinucleotídeo AG, o sítio acceptor do splicing, localizada entre duas regiões codificantes adjacentes, é o sinal que direciona tais processos (adição do SL-RNA e cauda PoliA) e comanda o processamento do pré-mRNA (LIANG, 2003). Estes processos acoplados geram os mRNAs maduros (Figura 2) e tal organização genética confere ao organismo plasticidade e rapidez em sua adaptação a ambientes bastante diversos e hostis (BENZ, Corinna et al., 2005).



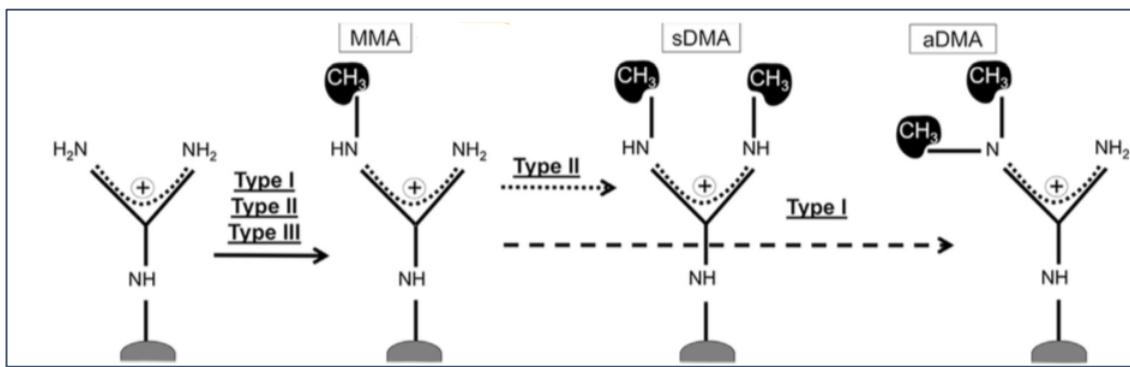
**Figura 2.** Esquema ilustrativo do processo de transcrição policistrônica e trans-splicing. Grosso modo, a transcrição se inicia em uma região de troca de fita divergente, terminando em uma região de troca de fita convergente, dando origem a um transcrito policistrônico, que sofrerá trans-splicing (adição da SL-RNA e cauda PoliA), originando um mRNA maduro. Referência: DOCAMPO, 2011.

Cada RNA mensageiro maduro apresenta em sua estrutura regiões não traduzidas (UnTranslated Regions, UTRs) que flanqueiam a região codificadora da proteína (Coding DNA Sequence, CDS). As UTRs, e particularmente a 3'UTR, desempenha papel importante na regulação da expressão gênica pois contém

cis-elementos que atuam como sítios de interação de proteínas ligantes de RNA (RBPs). A interação das RBPs nestas regiões podem formar complexos que definem o destino daquela molécula de RNA ( REQUENA, Jose M., 2011). A ação das RBPs e sua interação com os diferentes mRNAs podem ser alteradas por modificações pós-traducionais (Post-Translational Modifications, PTMs), entre elas a metilação de argininas. Um grupo de enzimas denominado proteína arginina metiltransferases (PRMTs) é responsável por catalisar tal metilação. A consequência desta PTM é o aumento da hidrofobicidade, ou seja, o substrato das PRMTs torna-se mais hidrofóbico e mais volumoso; o que consequentemente pode alterar a afinidade destas proteínas metiladas por outras macromoléculas, incluindo proteínas e RNAs (BEDFORD, Mark T.; CLARKE, Steven G., 2009). Estes níveis de controle são essenciais em organismos que promovem a transcrição de seu genoma de forma constitutiva, como os tripanossomatídeos, fazendo com que a regulação de sua expressão gênica ocorra majoritariamente em nível pós-transcricional.

### **1.3.1. Arginina Metiltransferases (PRMTs)**

Durante os últimos anos a metilação de argininas começou a ganhar destaque como uma PTM importante, tal modificação é catalisada por proteínas conhecidas como Arginina Metiltransferases (WANG, Min; XU, Rui-Ming; THOMPSON, Paul R., 2013), consistindo em reações de transferência de um grupo metil a átomos de guanidino-nitrogênio de resíduos de arginina. Tipicamente presentes em domínios RG ou RGG (JARROLD, James; DAVIES, Clare C., 2019). Atualmente são conhecidas nove PRMTs, que podem catalisar diferentes tipos de metilação, como monometilação (MMA), dimetilações simétricas (sDMA) ou assimétricas (aDMA) (GUCCIONE, Ernesto; RICHARD, Stéphane., 2019). Portanto, dependendo do tipo de metilação promovida, essas transferases podem ser classificadas em 3 tipos diferentes; as PRMTs do tipo I e II promovem primeiro uma MMA e posteriormente, aDMA e sDMA, respectivamente, enquanto a PRMT do tipo III promove somente MMA, (FERREIRA, Tiago R. et al., 2020).



**Figura 3.** Esquema ilustrativo das três classificações das PRMTs, em que as transferases do tipo III promovem monometilação, bem como as transferases dos tipos I e II numa primeira etapa. Posteriormente, estas duas classes de enzimas promovem dimetilação simétrica (tipo II) e assimétrica (tipo I). **Fonte:** FERREIRA; DOWLE; PARRY; ALVES-FERREIRA et al., 2020.

Em mamíferos já foi descrito que as PRMTs controlam diversos processos celulares, incluindo transcrição, reparo no DNA, *splicing* de RNA, sinalização para vias de quinases, entre outros. Portanto, levando em consideração os processos em que estas transferases estão envolvidas, elas se tornaram atrativas como potenciais alvos terapêuticos, sendo a terapia anticâncer, um exemplo (WANG, Min; XU, Rui-Ming; THOMPSON, Paul R., 2013). Ostripanossomatídeos expressam cinco proteínas ortólogas destas transferases, que incluem a PRMT1, PRMT3, PRMT5, PRMT6, PRMT7 (LORENZON, Lucas et al, 2022). Dada a importância das interações macromoleculares para essa regulação e a importância das PTMs introduzidas por PRMTs nas RBPs para tais interações, pode-se afirmar que é relevante estudar as PRMTs e seus alvos, entre eles as RBPs, para entender melhor a biologia do parasito e, no futuro, poder identificar potenciais alvos terapêuticos.

#### 1.4. Estudo de uma proteína alvo de PRMT5: RuvB-Like1.

Como já mencionado, os processos de controle pós-transcricional de regulação de expressão gênica em *Leishmania* envolvem um grande número de RBPs, a modulação das interações macromoleculares destas proteínas pode ocorrer por modificações pós-tradicionais e um dos interesses do laboratório é estudar as PRMTs e seus alvos, ou como as PTMs afetam funcionalmente as proteínas modificadas. Lucas Lorenzon, em seu trabalho de doutorado no laboratório, caracterizou as 5 PRMTs de *L. braziliensis* e dentro de um grande conjunto de dados (LORENZON, Lucas et al, 2022, 2022), identificou as proteínas ligantes de cada uma das PRMTs, por imunoprecipitação. Entre as

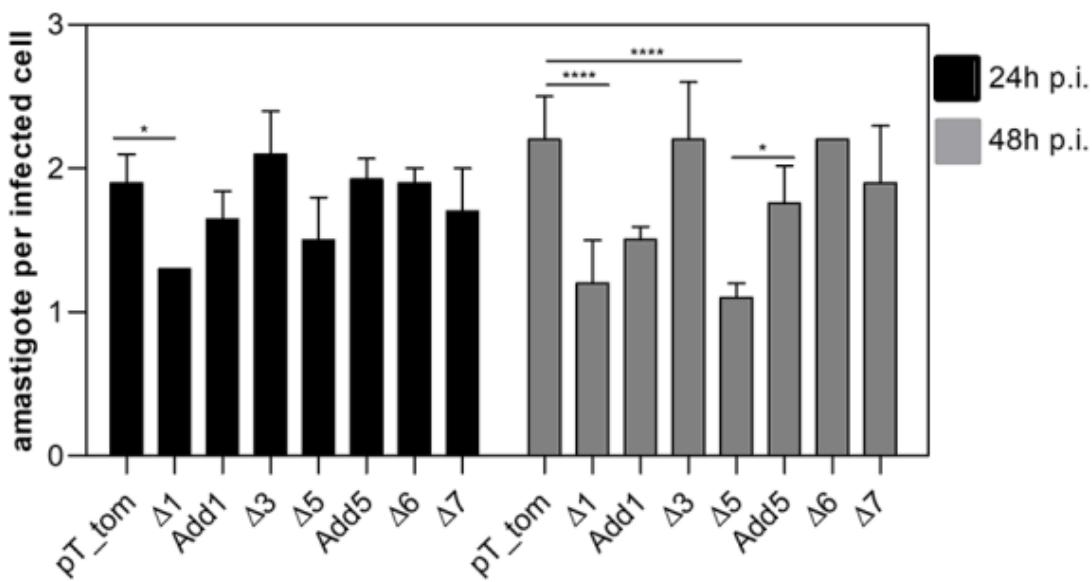
proteínas que interagem com a *LbrPRMT5* que têm argininas em motivos característicos de sofrerem metilação (RG ou RGG) está uma proteína anotada como RuvB-like 1, uma helicase putativa que, em outros organismos, possui diferentes funções celulares, entre elas, reparo de danos no DNA, remodelação de cromatina, transcrição, entre outras (Tabela I).

**Tabela I.** Proteínas que interagem com PRMTs contendo motivos RG e/ou identificador GO como RBP.

GO RNA binding	Gene ID	Description	MW	PRMT IP
	LbrM.01.0520	fatty acyl CoA syntetase 1, put.	77	1,5
	LbrM.13.1540	pyrroline-5-carboxylate reductase	29	5
	LbrM.17.1410	RNA cytidine acetyltransferase	118	1,5,7
RG/RGG motif	LbrM.20.3080	ruvb-like 1 DNA helicase, put.	50	5
	LbrM.22.1400	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, put.	120	7
	LbrM.24.0240	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, put.	67	5,7
	LbrM.25.0290	RNA-binding protein, put.	63	1
	LbrM.31.2990	acetoin dehydrogenase e3 component-like protein	81	1,5,6
	LbrM.32.0670	DnaJ domain containing protein, put.	37	1,3,7
	LbrM.35.6930	y113g7b.23 protein-like protein	39	5
	LbrM.03.0890	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha	47	5,7
	LbrM.10.1130	RNA-binding protein-like protein	42	7
	LbrM.11.0630	hypothetical protein, conserved	146	5
	LbrM.20.1540	ATP-dependent RNA helicase, put.	90	7
	LbrM.22.0730	translation initiation factor SUI1, put.	74	3
	LbrM.27.2430	EMG1/NEP1 methyltransferase, put.	26	1
	LbrM.28.1910	NOL1/NOP2/sun family, put.	64	1,3,5,7
	LbrM.29.0330	RNA binding protein, put.	30	1
	LbrM.32.0810	hypothetical protein, conserved	55	1
	LbrM.34.3290	poly A polymerase regulatory subunit, put.	62	3,5,7

**MW:** Peso molecular aproximado; **PRMT IP:** indica com qual das proteínas foram identificadas.  
**Fonte:** Lorenzon, Lucas B., 2022.

Sabendo que em *Saccharomyces cerevisiae* esta helicase putativa atua na regulação do ciclo de replicação celular (LIM, Chun Ren et al., 2000) enxergou-se potencial no estudo da RuvB-like 1 em *Leishmania*, particularmente pelo fato de que esta proteína, pode sofrer metilação catalisada por *LbrPRMT5*, e que parasitos nocaute para PRMT5 perdem virulência *in vitro* (Figura 4).



**Figura 4.** Perfil de infecção *in vitro* de parasitos nocaute para PRMTs. Células THP1 infectadas com promastigotas em fase estacionária. O gráfico avalia a média de amastigotas por célula infectada. **Fonte:** Lorenzon, Lucas B., 2022.

### 1.5. Proteína RuvB-Like 1

Helicases são um grupo de enzimas com papel importante em muitos aspectos do metabolismo dos ácidos nucleicos, como transcrição, replicação, recombinação, reparo de DNA e a estabilidade do RNA ( BROSH, Robert M., 2013). A proteína RuvB-like 1 é um exemplo destas enzimas, sendo classificada como uma DNA helicase ATP-dependente, que por sua vez, possuem relação com várias atividades celulares, pertencendo a superfamília de proteínas AAA+(ATPase Associated with diverse cellular Activities) (LIM, Chun Ren et al., 2000).

A superfamília de ATPases AAA+ são cruciais para diversas maquinárias moleculares, sendo responsáveis por catalisar a hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), utilizando a energia resultante para realizar trabalhos mecânicos (NEUWALD, Andrew F. et al., 1999). Os mecanismos de hidrólise do ATP, bem como a arquitetura dos domínios das AAA+ são altamente conservados entre os membros desta família. Uma das características destas proteínas é a presença de *motifs* responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP denominados Walker-A e Walker-B (GORYNIA, Sabine et al., 2011). Além destes, os *motifs* Sensor I e Sensor II são críticos para a função ATPásica

adequada e mudanças conformacionais para a ligação do ATP, respectivamente (MILLER, Justin M.; ENEMARK, Eric J., 2016).

Em procariotos, como *E. coli*, já foi descrito que tal proteína é essencial para reverter eventuais erros que ocorram na forquilha de replicação e na movimentação de junções de Holliday ( MÉZARD, Christine et al., 1999). Já em eucariotos, como *Saccharomyces cerevisiae*, a RuvB-like foi descrita com sendo uma proteína residente do núcleo, indispensável para RNA polimerase II realizar a transcrição, assim, tendo grande relevância para o ciclo celular e também participação nos processos de regulação da transcrição de pelo menos 5% dos genes das leveduras, fazendo parte de um complexo com papel de remodelar a cromatina (LIMUDOMPORN, Paviga et al., 2016).

Embora já existam estudos da proteína RuvB-Like em outros organismos, incluindo uma caracterização preliminar da proteína de *Leishmania major* (ABRAHÃO, Josielle et al., 2021), em *Leishmania braziliensis* não há relatos de estudos estruturais ou funcionais desta proteína. A ocorrência de modificações pós-traducionais, ou sua relevância para o exercício das funções de RuvB-like 1 é desconhecida até o momento. Desta forma, no contexto do estudo da relevância funcional da metilação de argininas promovida pelas PRMTs para o exercício e modulação da função de seus alvos, nossa proposta neste trabalho de conclusão de curso é estudar a RuvB-like 1 de *L. braziliensis*. A escolha desta proteína se dá também por sua relevância relatada em outros organismos e por potenciais conexões com a virulência do parasito, como sugerem os resultados de Lucas Lorenzon (Figura 3), de que a *LbrPRMT5* afeta a infecção indiretamente, por promover modificações pós-traducionais em um conjunto de proteínas, entre elas, a RuvB-like1.

### **1.6. Edição gênomica para estudo da função gênica**

O estudo de função gênica pode empregar um conjunto de ferramentas diferentes, mas geralmente passa pela superexpressão ou nocaute do gene em estudo para analisar os efeitos da ausência ou excesso do produto gênico. Uma das técnicas de edição gênica mais utilizadas atualmente é baseada no sistema de CRISPR/Cas9 descoberto como sistema de defesa bacteriano contra a invasão por bacteriófagos (LONE, Bilal Ahmad et al., 2018). Tal sistema consiste na clivagem do DNA invasor, e posterior adição dos fragmentos no *loci* CRISPR

destas bactérias. O *locus* é caracterizado pela presença de um conjunto de repetições palindrômicas (LOUREIRO, Alexandre; DA SILVA, Gabriela Jorge., 2019). A transcrição deste *locus* origina uma molécula de crRNA (CRISPR RNA), a qual possui fragmento do DNA viral e forma um complexo com a endonuclease Cas9 e um RNA não codificante, denominado tracrRNA (trans-activating crRNA) (CHYLINSKI, Krzysztof; LE RHUN, Anaïs; CHARPENTIER, Emmanuelle., 2013). Portanto, quando houver uma nova invasão do mesmo bacteriófago, o complexo CRISPR/Cas9 reconhecerá o material genético do vírus, utilizando os RNAs do complexo como guias da endonuclease, para que haja a clivagem do DNA invasor (DELTACHEVA, Elitza et al., 2011).

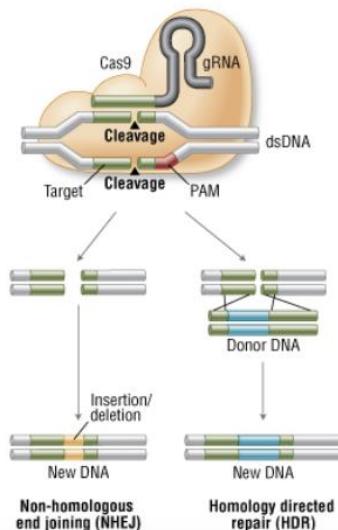
O sistema foi então explorado para o desenvolvimento de ferramenta de engenharia genômica para eucariotos. A adaptação do sistema CRISPR/Cas9, foi possível em diversos organismos (XIAO-JIE, Lu et al., 2015) incluindo os tripanossomatídeos (PENG, Duo et al., 2015).

A técnica de edição gênica consiste na combinação do crRNA e tracrRNA, originando um RNA guia (sgRNA), além da expressão da endonuclease Cas9 (ZHANG, Wen-Wei; MATLASHEWSKI, Greg., 2015; BENEKE, Tom et al., 2017). Com o auxílio de bancos de dados online e ferramentas de bioinformática (como por exemplo, *TryTripDB* e *Geneious*) é possível determinar o terminal 5' do sgRNA, o que permitirá seu pareamento com o gene alvo, assim direcionando o complexo Cas9 até ele para que ocorra sua clivagem. Além disso, é necessário que o DNA alvo possua uma sequência conservada, contendo três nucleotídeos específicos denominada PAM (Protospacer Adjacent Motif) (XUE, Chaoyou; SASHITAL, Dipali G., 2019).

Após a clivagem do DNA alvo, a célula começa seu sistema de reparo de dano, ocorrendo por meio de recombinação homóloga ou não-homóloga. A recombinação homóloga consiste em fornecer um DNA doador à célula (*donor*), possuindo uma sequência homóloga a que sofreu ação da endonuclease em sua extremidade, importante para que os mecanismos de reparo da célula incorporem esse fragmento à sua sequência como forma de consertar a região danificada. Além disso, o DNA doador também possui um gene que confere resistência a antibióticos ou outras sequências de interesse. Já a recombinação não-homologa consiste em tentar reparar o dano sofrido, sem que haja o auxílio de uma sequência similar à danificada, portanto, ao tentar reparar o DNA

previamente clivado pelo complexo Cas9, a maquinaria de reparo pode acabar promovendo mutações de inserção ou deleção (LINO, Christopher A. et al., 2018).

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



**Figura 5.** Ilustração do funcionamento do mecanismo CRISPR/Cas9 com todos os componentes do complexo enzimático, entre eles a própria Cas9, o RNA guia (sgRNA), além de exemplificar os meios de reparo do DNA. Imagem disponível em:< [http://www.fcf.usp.br/arquivos/gestao-ambiental/imgEvento/imgSimposio/Simposio\\_2016/Paulo\\_ILSI\\_2016.pdf](http://www.fcf.usp.br/arquivos/gestao-ambiental/imgEvento/imgSimposio/Simposio_2016/Paulo_ILSI_2016.pdf)>

Essa ferramenta vem acelerando a investigação de função gênica via manipulação genômica em diferentes organismos, incluindo *Leishmania* spp. e vem facilitando o estudo funcional de proteínas alvo, como é o caso deste trabalho. Por meio da técnica de CRISPR/Cas9 descrita anteriormente, foi possível otimizar o estudo das proteínas de interesse (RuvB-Like1 e PRMT5), a partir da inserção de uma etiqueta *myc* na proteína RuvB-Like 1 em *Leishmania braziliensis* (*LbRuvB*), o que possibilitando a utilização de anticorpo comercial (anti-*myc*) para investigá-la e cumprir os objetivos descritos a baixo, tornando o estudo mais rápido e com menor custo, pelo fato de não ser necessário a geração de anticorpos específicos contra a proteína de interesse, além de possibilitar o posterior nocaute da proteína PRMT5.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a helicase RuvB-Like 1 em *Leishmania braziliensis* (*LbRuvB*), o efeito da metilação de arginina nesta proteína e sua importância funcional na dinâmica de sua expressão e interações.

### 2.2. Objetivos específicos

- I. Identificar a localização subcelular e níveis de expressão da *LbrRuvB* empregando transfectantes com esta proteína etiquetada *myc* (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*) em dois backgrounds genéticos: linhagem etiquetada (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*) e no caute para *LbrPRMT5* (*mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*);
- II. Avaliar o efeito da metilação de *LbrRuvB* sobre a estabilidade da proteína empregando os transfectantes descritos no item I;
- III. Identificar proteínas ligantes de *LbrRuvB* empregando os dois backgrounds genéticos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultura dos parasitos**

Os parasitos na fase promastigota procíclicos de *Leishmania braziliensis* M2903 foram cultivados em meio M199 suplementado com biopterina (1 $\mu$ M), 20% soro fetal bovino inativado pelo calor, penicilina (100 U/ml), steptamicina (100  $\mu$ g/mL), L-glutamina (2mM), Hepes (40mM), adenina (0,1mM, em 50mM de Hepes), hemina (5mg/ml em 50% de trietanolamina) e 6-biotina (1mg/ml) (ALCOFORADO DINIZ, Juliana et al, 2021). As células da linhagem parental (pT007) (Lorenzon et al., 2022) são mantidas em meio contendo higromicina B (16 $\mu$ g/mL), com objetivo de manter as células expressando a Cas9, enquanto os transfectantes contendo a etiqueta *myc* no gene codificador da proteína RuvB-Like 1 e nocautes da *LbPRMT5* são mantidos em meio contendo puromicina (7,5 $\mu$ g/mL). Os parasitos são armazenados em estufa B.O.D. com uma temperatura de 26°C.

#### **3.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para amplificação do DNA utilizado para transfecção**

##### **3.2.1. Amplificação do DNA para gerar parasitos etiquetados**

Com o objetivo de inserir a etiqueta *myc* na porção N-terminal do gene codificante da proteína RuvB-Like 1 empregando a técnica de edição genômica por CRISPR/Cas9, foram feitas três PCRs, sendo duas para gerar e amplificar o DNA guia, respectivamente, e a última para amplificar o DNA doador contendo a etiqueta e o gene de resistência à puromicina, que foi utilizada como droga de seleção dos transfectantes.

A PCR para gerar o DNA consistiu na adição de 2 $\mu$ M do *primer* de interesse (**MLS\_guide**: GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CCA TCT TCG ATA ACA CCA CGG TTT TAG AGC TAG AAA TAGC), 0.2mM de dNTPs, 2 $\mu$ M do primer G00\_scaffold, 1 unidade da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs®), 1x tampão da enzima (presente no mesmo kit da New England Biolabs®) e água Milli-Q com o objetivo de completar o volume final da reação (50 $\mu$ L). Foram utilizados os seguintes parâmetros descritos na tabela II.

**Tabela II.** Parâmetros utilizados no termociclador para amplificação do DNA guia.

Temperatura	Tempo
98°C	30''
98°C	10''
53°C	30''
72°C	15''
72°C	5'
16°C	∞

A segunda PCR foi realizada com o objetivo de amplificar os produtos gerados a partir da primeira, com isso obtém-se o DNA guia. Para esta reação, foram utilizados 0.2µM dos primers G00\_loredited\_F e G00\_loredited\_R, 0.2mM de dNTPs, 1µL do produto da reação de PCR anterior, 1 unidade da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs®), 1x tampão da enzima e água Milli-Q para completar o volume final da reação (50µL). As condições utilizadas no termociclador foram idênticas às da primeira PCR.

A reação de PCR feita para amplificar o DNA doador consistiu na adição de 20ng do plasmídeo doador (neste caso foi utilizado o plasmídeo pPlot Puro), 0.2mM de dNTPs, 0.2µM dos primers forward e reverse (**MLS01\_F**: GGC TGC TGC ACT GAC TAG TGA CGT TGA GTT GTA TAA TGC AGA CCT GCT GC. **MLS01\_R**: GAT AAC CTC TTC GAT CTT AAT GCC GGA CAT AGA ACC GGA ACC GGA AC) 2 unidades da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs®), 1x de tampão da enzima e água Milli-Q para completar o volume final da reação (50µL). As condições para o termociclador estão descritas na tabela III.

**Tabela III.** Parâmetros utilizados para amplificação do DNA doador

Temperatura	Tempo
98°C	30''
98°C	10''
60 °C	40''
72°C	1'10''
72°C	5''

16°C	∞
------	---

### 3.2.2. Amplificação do DNA para gerar parasitos nocaute

Para nocautear o gene codificador de *LbrPRMT5* empregando CRISPR/Cas9, a primeira etapa também consiste em três reações de PCR, as duas primeiras para gerar e amplificar o DNA guia, respectivamente, e a terceira para amplificar o DNA doador que, por recombinação homóloga, substituiu o gene da PRMT5 e inseriu em seu lugar um gene de resistência à blasticidina, possibilitando a seleção dos transfectantes com a droga.

Na primeira PCR para gerar os DNA guia foram utilizados 0.2mM de dNTPs, 2 $\mu$ M do primer de interesse (**SG1 PRMT5**: GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG TCC CTT CTA CAC CAC TCT CTG TTT TAG AGC TAG AAA TAG C. **SG2 PRMT5**: GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGA ATA GGC AAA GCA TCA GGG TTT TAG AGC TAG AAA TAG C), 2 $\mu$ M do primer G00\_scaffold, 1 unidade da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs®), 1x tampão da enzima e água Milli-Q com o objetivo de completar o volume final da reação (50 $\mu$ L). As condições que foram utilizadas no termociclador estão descritas na tabela II. A segunda PCR foi realizada para amplificar o produto da primeira reação (que serviu como molde) e gerar os DNA guias, como descrito no terceiro parágrafo do item 3.2.1.

Para amplificar o DNA doador foram adicionados: 0.2mM de dNTPs, 20ng do plasmídeo doador (para este experimento foi utilizado o pTblast), 0.2 $\mu$ M dos primers forward e reverse (**LbrPR5\_KO\_F**: TCC TAC ACT TTC CTC CTT TCA CCT CTT CCT GTA TAA TGC AGA CCT GCT GC. **LbrPR5\_KO\_R**: TCC TAC ACT TTC CTC CTT TCA CCT CTT CCT GTA TAA TGC AGA CCT GCT GC. LbrPR5\_KO\_R: CAC CAG CAG TGA ACG TGA GCA GAG AGA GAA CCA ATT TGA GAG ACC TGT G), 2 unidades da enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs®), 1x de tampão da enzima e água Milli-Q para completar o volume final da reação (50 $\mu$ L). Os parâmetros utilizados para amplificação no termociclador estão descritos na tabela III.

### 3.3. Precipitação e Purificação do produto das reações de PCR

Os *amplicons* (DNA guia e doador) gerados a partir das reações de PCR descritas anteriormente foram adicionados no mesmo tubo, juntamente com acetato de sódio (10% do volume total contido no tubo) e etanol 100% (3x o volume total contido no tubo). O DNA foi centrifugado por 20 minutos, a 16000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspensiondo em etanol 70%. Uma nova centrifugação foi feita, na qual, mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido por ~50 minutos no fluxo de proteção biológica, para secar. Finalmente, o *pellet* foi ressuspensiondo em tampão de transfecção 1x (fosfato de sódio 90 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, HEPES 50 mM, pH: 7,3). O DNA purificado foi quantificado com auxílio de um NanoDrop One.

### **3.4. Transfecção**

Foram utilizados 10<sup>7</sup> promastigotas procíclicos para cada uma das transfecções realizadas. As células foram centrifugadas a 2000 x g, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensiondo em 1ml de tampão de transfecção 1x (fosfato de sódio 90 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, HEPES 50 mM, pH: 7,3). Os parasitos foram centrifugados novamente, o *pellet* foi ressuspensiondo em tampão de transfecção 1x. Adicionou-se 100µL da suspensão de células na cubeta de transfecção e 50µL de DNA purificado contendo 15µg de DNA, calculado anteriormente. (Obs.: no controle negativo foi adicionado 50µL de água estéril). O conteúdo das cubetas de transfecção foi homogeneizada e submetida à eletroporação no equipamento AMAXA Nucleofactor 2b com a programação X-001. Os transfectantes foram transferidos imediatamente para 5 ml de meio de cultura líquido sem droga de seleção, por 12 horas, para recuperação, e posteriormente foram plaqueados em M199 sólido, contendo a respectiva droga de seleção. Dez a quinze dias após a transfecção, as colônias de parasitos resistentes à droga foram inoculadas em meio líquido em uma placa de 12 poços com 1 mL de M199 e drogas de seleção. Depois de dois dias, o DNA dos parasitos foi extraído e submetido a PCR diagnóstica, seguida de fracionamento por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da inserção da etiqueta *myc* nos dois alelos do gene da RuvB-Like 1.

### **3.5. Extração do DNA para confirmação de sucesso na transfecção**

Para extrair o DNA dos transfetantes, empregou-se 1mL da cultura dos parasitos na placa de 12 poços que, depois de dois dias, foi centrifugada por 10 minutos, a 2000 x g, e o sedimento contendo os parasitos foi lavado uma vez com PBS. Os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise (Tris 10 mM, SDS 0.5%, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, proteinase K 100 ug/mL) e incubados por 30 minutos em banho maria a 55°C. Posteriormente, foi adicionado etanol absoluto gelado nas amostras que foram centrifugadas por 25 minutos, a 4°C, a 16000 x g; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em etanol 70%, também gelado; seguido de uma nova centrifugação; mais uma vez o sobrenadante foi descartado, enquanto o *pellet* foi mantido por 45 minutos em estufa a 37°C, para secar. Finalmente, o *pellet* contendo o DNA foi ressuspensionado em TE (Tris 1mmM, EDTA 0.1mM).

### **3.6. Curva de Crescimento Celular**

A curva de crescimento de promastigotas em M199 foi realizada a partir de um inóculo de  $2 \times 10^5$  parasitos/mL das linhagens parental e transfetantes *mycRuvB<sup>myc+/+</sup>*. A contagem dos promastigotas foi feita a cada 24 horas, por sete dias consecutivos. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica.

### **3.7. Enriquecimento de metacíclicos e diferenciação dos amastigotas**

O protocolo de purificação de metacíclicos foi estabelecida no laboratório pela Dra Juliana Diniz, baseado no trabalho de Späth e colaboradores (2001). A cultura de promastigotas de *L. braziliensis* deve ser mantida em crescimento por 5 dias, quando alcança a fase estacionária. O volume total da cultura (15 mL) foi centrifugado por 10 minutos, a 2000 x g, e o *pellet* foi ressuspensionado em 3mL de meio de cultura (M199). Em outro tubo falcon de 15mL foi montado um gradiente de Ficoll, contendo na primeira camada Ficoll 20%, na segunda, Ficoll 10% (50% M199, 50% Ficol 20%) e na terceira, a suspensão de células. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 1300 x g (altera-se a aceleração da centrífuga para 1 e a desaceleração para zero). Após a centrifugação, retirou-se completamente a primeira camada superior que foi transferida para outro tubo (checa-se a pureza de metacíclicos analisando uma alíquota ao microscópio), e

completou-se o volume com PBS 1x para posterior centrifugação. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de PBS1x. Neste ponto, 100 $\mu$ L foram inoculados em 5mL de soro fetal bovino para diferenciar os amastigotas, enquanto o restante dos metacíclicos foi utilizado para os ensaios de western blotting e imunofluorescência.

### 3.8. PCR quantitativa a partir de RNA (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi feita em triplicata técnica e quatro réplicas biológicas, utilizando promastigotas procíclicos, metacíclicos e amastigotas. A partir da cultura dos parasitos, foi realizada a extração do RNA com o kit RNA MiniPrep Plus, seguindo orientações do fabricante (ZYMO RESEARCHTM). A etapa seguinte consistiu em sintetizar o DNA complementar (cDNA) com o auxílio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Depois de obter o cDNA, a PCR foi montada empregando o Mix PowerUp™SYBR™Green (Thermo Fisher Scientific), o cDNA sintetizado diluído 10x, 10 pMol/ $\mu$ L *primers forward e reverse* (**RuvB-qPCR\_F**: ATT ACC CTC AAG TCG CAG AAG. **RuvB-qPCR\_F**: CCA GAG CTT GCC TCA ATG TA), e água Milli-Q para completar o volume final da reação (10 $\mu$ L). Foi empregada uma plataforma abi 7500 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.9. Extração de Proteína e ensaio de Western Blot

Para a extração de proteínas foram utilizadas 2x10<sup>7</sup> células de *L.braziliensis*. Os parasitos foram centrifugados a 2000 x g, por 7 minutos a 3°C, seguiu-se uma lavagem com PBS contendo o inibidor de proteases cOmplete (Roche) a 1x, centrifugação e eluição em tampão de lise (SDS 2%, 50mM Tris-HCl, 1mM PMSF, 1x cOmplete). As amostras foram fervidas por 10 minutos e posteriormente foram mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação; o *pellet* foi descartado e o sobrenatante, transferido para um tudo novo.

A proteína das amostras foi quantificada por absorbância 280nm com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific). Em seguida, as concentrações de proteína das amostras foram padronizadas na proporção: 1V das amostras em 0,2V de tampão de amostra 6x (350mM Tris-Cl, pH6,8; 30%

glicerol; 0,12mg/mL azul de bromofenol, 10%SDS, 6% b-mercaptopetanol, H<sub>2</sub>O para completar o volume da solução); a mistura foi fervida por 3 minutos.

Em seguida, o extrato de proteínas foi fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, e a transferência foi feita para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare 10600003), por 3 horas a 60V, em cuba de transferência (BIO-RAD), mantida em gelo. Após a transferência, a membrana foi incubada durante 15 minutos com Ponceau, como controle de carregamento. Em seguida a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (TBS-T, 5% de leite em pó desnatado) e posteriormente, incubada por 2 horas com anticorpo primário (*anti-myc-tag*, Cell Signaling; Diluição 1:5000), seguido por lavagens com TBS-T e uma nova incubação anticorpo secundário (GE Healthcare NA931V). As imagens foram obtidas com auxílio do fotodocumentador GE ImageQuant LAS 4000 e a densitometria foi realizada utilizando o software *ImageJ* (DAVARINEJAD, Hossein., 2015).

### **3.10. Ensaio de decaimento de proteína**

Para este ensaio, foram utilizados parasitos na sua forma promastigota procíclica no segundo dia de sua curva de crescimento (fase logarítmica). As células foram incubadas com 200µg/mL de cicloheximida (CHX) a 26°C e coletadas em diferentes horários, durante um período de 24h. A taxa de decaimento da proteína de interesse foi analisada por western blot contra a etiqueta myc.

### **3.11. Imunofluorescência**

Para o ensaio de imunofluorescência, utilizou-se 2x10<sup>6</sup> células dos parasitos. As células foram centrifugadas por 5 minutos, a 1400 x g e ressuspensas em PBS1x. A centrifugação foi repetida e as células foram ressuspensas mais uma vez em PBS1x com 3% de paraformaldeído, e homogeneizadas por 10 minutos em agitador “gangorra”, centrifugadas (1200 x g, por 10 min) e ressuspensas em PBS1x com 0,1% de glicina.

Para facilitar a adesão das células, adicionou-se polilisina aos poços das lâminas de imunofluorescência, para retirá-la em seguida cuidadosamente, para que os poços secassem. Depois de secos, a suspensão de células foi adicionada para que pudesse aderir à lâmina. As células foram permeabilizadas com

PBS1x, 0,2% de TRITON X-100, e lavadas mais 5 com PBS 1x. Posteriormente, as células foram bloqueadas com a solução de bloqueio (PBS1x, 1%BSA, 0,2% Tween20) por 2 horas e incubadas com o anticorpo primário (*anti-myc-tag*; Cell Signaling) por 4 horas. Ao final da incubação, e depois de 5 lavagens com PBS 1x, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário (anti-mouse Alexa 488) por 2 hora. A partir desta etapa, o protocolo foi realizado evitando exposição à luz. Mais 5 lavagens com PBS1x foram feitas e adicionou-se a solução HOESCHT (2 $\mu$ g/mL, invitrogen H3570) diluído em PBS1x durante 30 minutos, finalizando esta etapa com outras 5 lavagens com PBS1x.

Por fim, adicionou-se uma gota de meio de montagem em cada poço (Invitrogen P36934) e cobriu-se os poços com lamínula retangular, selada com esmalte. A lâmina foi mantida protegida da luz e armazenada a 4°C. As imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica TCS SP5.

### **3.12. Imunoprecipitação**

Com o objetivo de identificar as proteínas que potencialmente interagem com a *LbRuvB*, foi realizado o ensaio de imunoprecipitação. Foram coletadas 2x10<sup>8</sup> células que foram centrifugadas (1300 x g por 10 minutos a 4°C) e lavadas duas vezes com PBS1x. O pellet contendo as células foi ressuspendido em 1 ml de tampão de lise gelado (20mM Tris pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, PMSF 2 mM, 1 mM DTT, 1% TritonX-100, 10% glicerol, 2x cOmplete protease inhibitor) e ficou agitando suavemente durante 1 hora e meia a 4°C.

Durante o intervalo de agitação do lisado, as *beads* (Protein A/G MagBeads, GenScript) magnéticas foram preparadas. Para isso, foi necessário a utilização de dois tubos para cada amostra:

Tubo 1: continha 30 $\mu$ l de suspensão das *beads*, objetivando excluir as proteínas que se ligam inespecificamente nas *beads*;

Tubo 2: continha 100 $\mu$ l de suspensão das *beads*, as quais receberam o tratamento com anticorpos *anti-myc* e foram utilizadas na imunoprecipitação.

Com o auxílio de uma rack magnética, as *beads* foram separadas da solução de armazenamento e lavadas duas vezes com 250 $\mu$ l de PBS-T (PBS1x, 0.05% de Tween20) por 10 minutos, com o auxílio do agitador orbital. Após as lavagens, foi adicionado 500 $\mu$ l de tampão de lise no Tubo 1 e 500 $\mu$ l de tampão de lise

contendo anticorpos anti-*myc* no Tubo 2 (1:500), os quais ficaram agitando durante 2 e 3 horas, respectivamente, no agitador orbital.

Aproveitou-se este intervalo da preparação das *beads* para prosseguir com o preparo do extrato proteico. Portanto, após agitarem durante 1 hora e meia, a amostras foram submetidas a lise mecânica, passando o lisado em agulhas de calibre de 29G, por 20 vezes. As amostras foram centrifugadas (10000 x g, por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante recuperado.

Após o término das 2 horas de agitação do Tubo 1, o tampão de lise foi retirado e adicionado o extrato proteico. Posteriormente, o Tubo 1 ficou agitando por mais 1 hora contendo o extrato, até que o tempo de incubação do Tubo 2 terminasse. Com isso, as *beads* do Tubo 2 foram lavadas duas vezes com tampão de extração.

O lisado do Tubo 1 foi transferido para o Tubo 2 (neste momento foi retirado uma amostra de 30µl, denominado *input* e armazenada em -20°C), novamente, com o auxílio da rack magnética. Em seguida, o tubo 2 ficou agitando *overnight* a 4°C. Após este período, retirou-se uma nova amostra de 30 µl do lisado, desta vez denominada de *flow through*. As *beads* foram lavadas duas vezes com tampão de lise e finalmente, todo o excesso de tampão foi retirado, as *beads* forma ressuspendidas em 30µl de tampão de proteína 6x (350mMTris-HCl pH6.8, 30% glicerol, 10%SDS, 0,12mg azul de bromofenol) e incubadas por 10 minutos a 98°C. O eluato foi separado das *beads* com o auxílio da rack magnética e armazenado a -20°C.

### 3.13. Análises de Bioinformática

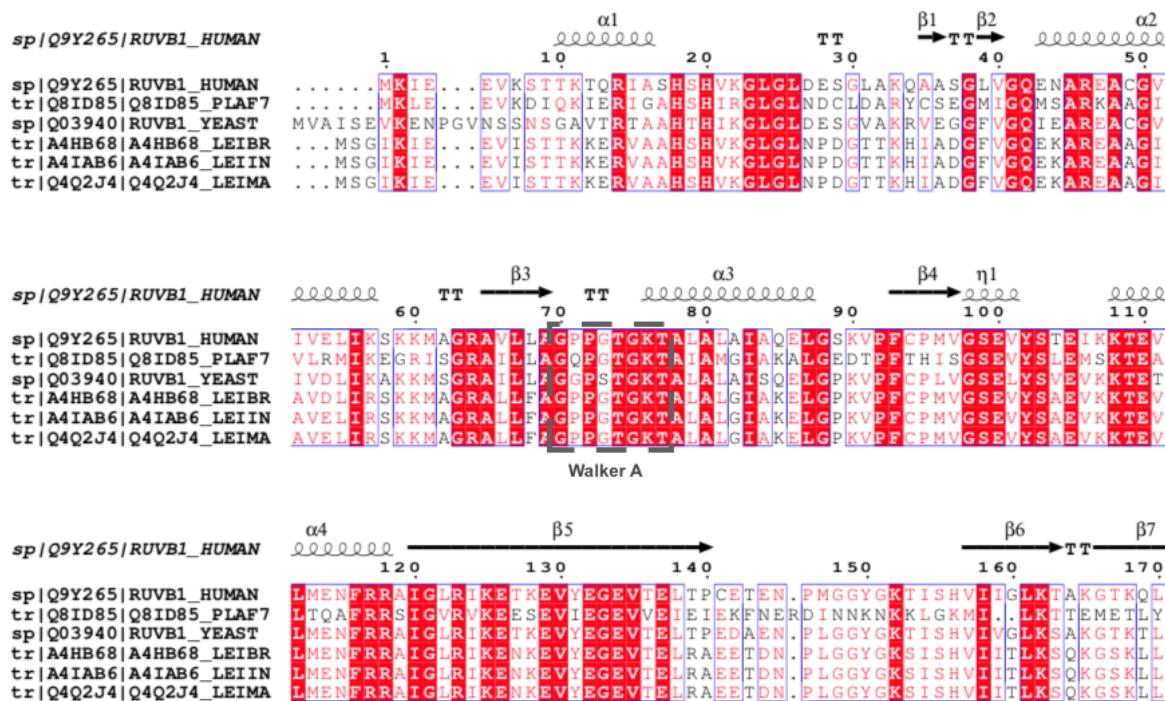
A sequência de aminoácidos da proteína LbRuvB foi identificada a partir das informações contidas no banco de dados TriTrypDB ([https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/LBRM2903\\_200044400](https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/LBRM2903_200044400)), assim como seus ortólogos em *L. major* e *L. infantum*. Já as sequências de seus ortólogos em outras espécies (humanos, levedura e *P. falciparum*) foram adquiridas do UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y265>). O alinhamento das sequências foi realizado com o auxílio do software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), enquanto a predição da estrutura secundária da proteína RuvB nas diferentes espécies, foi obtida a partir

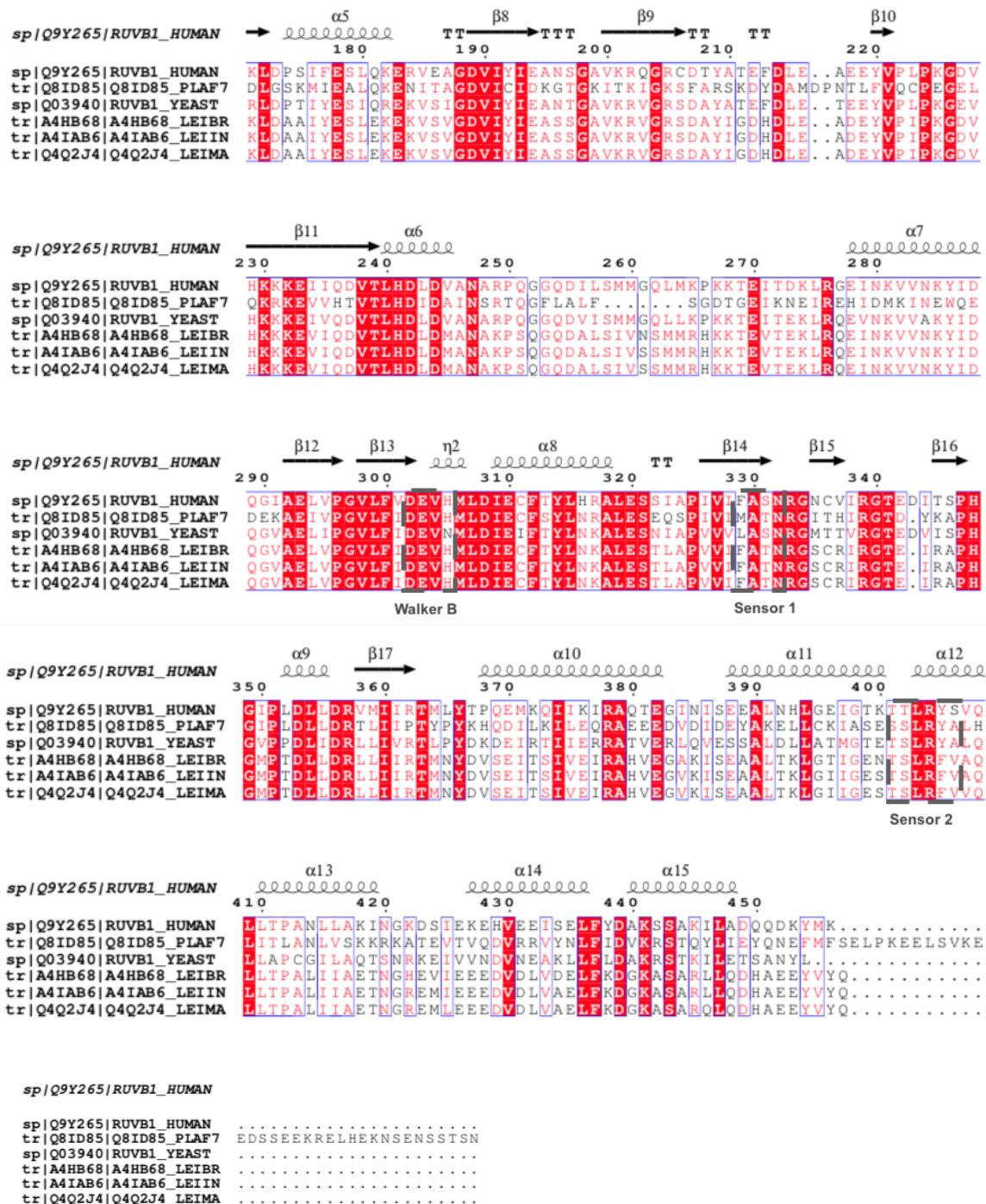
da ferramenta ESPript (<https://escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) (ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice., 2014). Tais análises foram feitas utilizando como referência o artigo de Abrahão e colaboradores, 2021. Por fim, a predição da estrutura da LbRuvB foi realizada com o auxílio da ferramenta online Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Alinhamento e Análise da estrutura da proteína

Para avaliar a conservação da proteína RuvB-Like 1, foi realizado um alinhamento entre as sequências de genes ortólogos de diferentes organismos, entre eles, *Saccharomyces cerevisiae* (Q03940), *Plasmodium falciparum* (Q8ID85), *Leishmania braziliensis* (A4HB68), *L. infantum* (A4IAB6) e *L. major* (Q4Q2J4), tendo como modelo, a RuvB de humano (2C9O), as quais foram adquiridas na plataforma UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Além disso, com o auxílio do software ESPript (<https://escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>), foi possível realizar o alinhamento das proteínas ortólogas e, simultaneamente, fazer a predição da estrutura secundária da proteína (Figura 6).

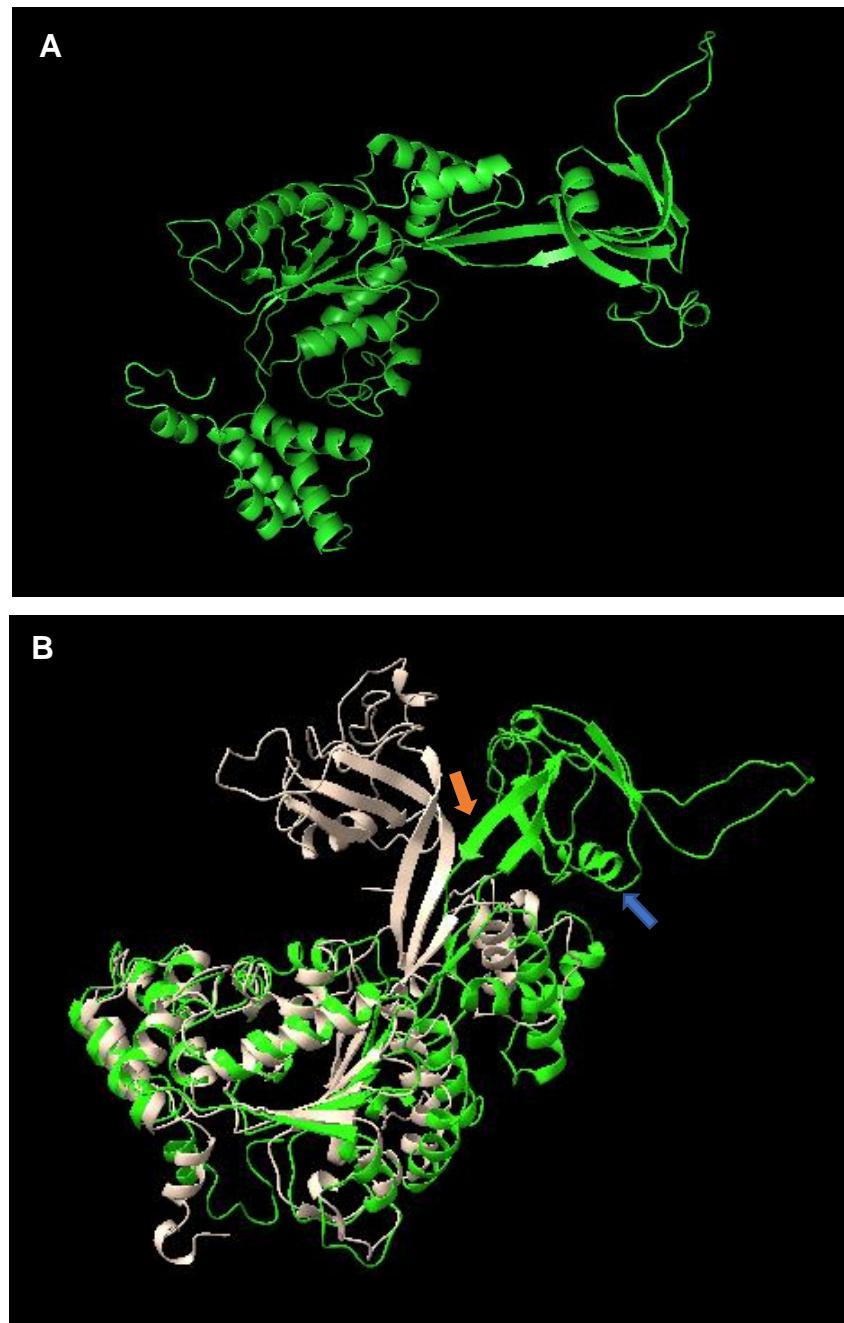




**Figura 6.** Alinhamento da RuvB-Like 1. O alinhamento foi realizado utilizando as sequências de aminoácidos da proteína LbRuvB e seus ortólogos. A espécies analisadas foram (de cima para baixo): *Homo sapiens*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Leishmania braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. A proteína utilizada como molde para predizer a estrutura secundária da RuvB-Like 1 foi a RuvB humana 2C9O. A imagem também mostra os motivos Walker A, Walker B, sensor I e sensor II.

A partir do alinhamento das sequências, foi possível identificar que as proteínas ortólogas da RuvB-Like 1 de *L. braziliensis* possuem diferenças no número de aminoácidos presente em sua sequência, variando de 456 (RuvB-

Like1 humana - 2C9O) até 481 aminoácidos (RuvB-Like1 de *Plasmodium falciparum* - Q8ID85); a proteína de *Leishmania* possui 459 aminoácidos. Além disso, também foi possível observar que existe grande similaridade entre os ortólogos, principalmente em seus domínios de ligação e hidrólise de ATP (Walker A, Walker B, sensor I e sensor II), os quais, mostraram-se bem conservados (ABRAHÃO, Josielle et al., 2021).



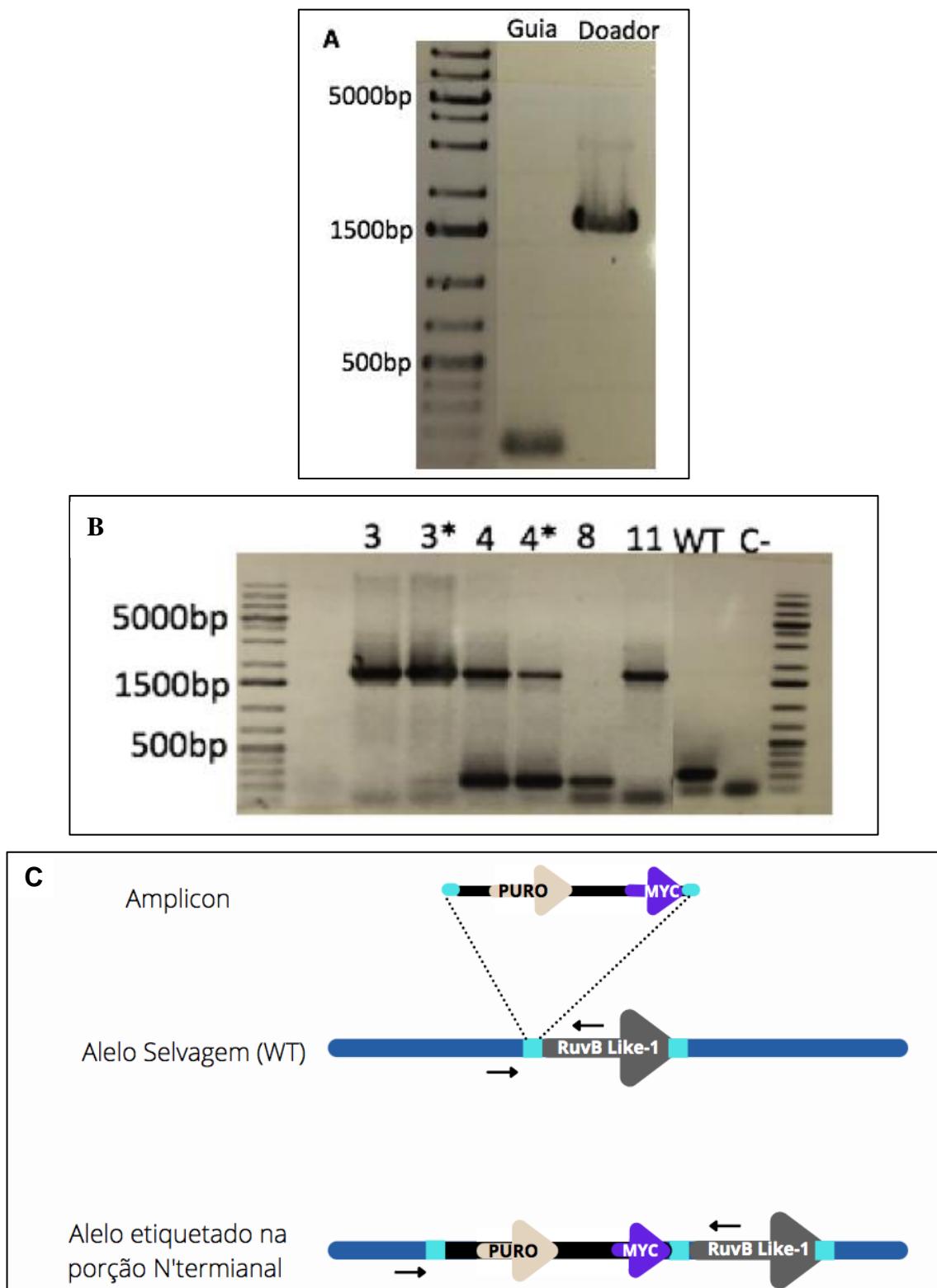
**Figura 7.** Predição da estrutura da proteína RuvB-Like 1 de *L. braziliensis*. (A) O software Phyre2 foi utilizado para predizer a estrutura da LbRuvB a partir da sua sequência de aminoácidos e informações contidas em diferentes bancos de dados. (B) Sobreposição das proteínas de *L.braziliensis* (verde) e humano (bege).

Além disso, com o auxílio do software Phyre2, foi possível fazer a predição da estrutura da proteína RuvB-Like 1, a partir da sequência de aminoácidos adquirida no TriTrypDB, analisando, também, informações contidas em outros bancos de dados, até chegar na modelagem predita (Figura 7A), sendo possível fazer a sobreposição entre a proteína RuvB-Like1 predita de *L.braziliensis* e de humano (Figura 7B), com auxílio do software ChimeraX-1.3 (SGRO, 2018); esta análise permitiu observar uma menor conservação estrutural na região onde estão presentes a alfa hélice 5 ( $\alpha 5$ , figura 6), apontada na figura 7 com a seta azul e folha beta 5 à 11( $\beta 5$  à  $\beta 11$ , figura 6), esta última, apontada com a seta laranja na figura 7.

#### **4.2. Obtenção dos transfectantes contendo a etiqueta Myc na proteína RuvB-Like 1**

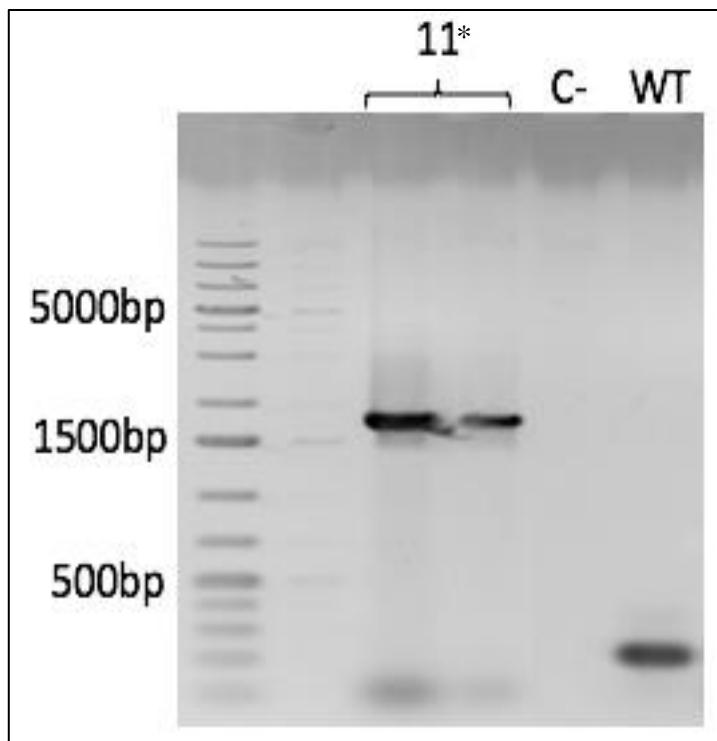
A adição da etiqueta *myc* na porção N-terminal da proteína *LbrRuvB-Like1* foi realizada com o auxílio da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9. A inserção da etiqueta *myc* conferiu a vantagem de não ser preciso gerar anticorpos específicos para a proteína de interesse, assim, com uma relação custo-benefício positiva, optamos pela utilização de anticorpo comercial (anti-*myc*) nos ensaios de western blot e imunofluorescência.

Antes de realizar a transfecção, a amplificação dos DNA guia e doador foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8A). Cerca de ~10 dias depois da transfecção, colônias de parasitos foram observadas nas placas. A partir de então, estes transfectantes foram resgatados e inoculadas em M199 líquido, e depois de dois dias, procedeu-se a extração do DNA e a PCR diagnóstica (Figura 8B) para confirmar se os clones eram hetero ou homozigotos pela verificação da etiqueta *myc* (Figura 8C).



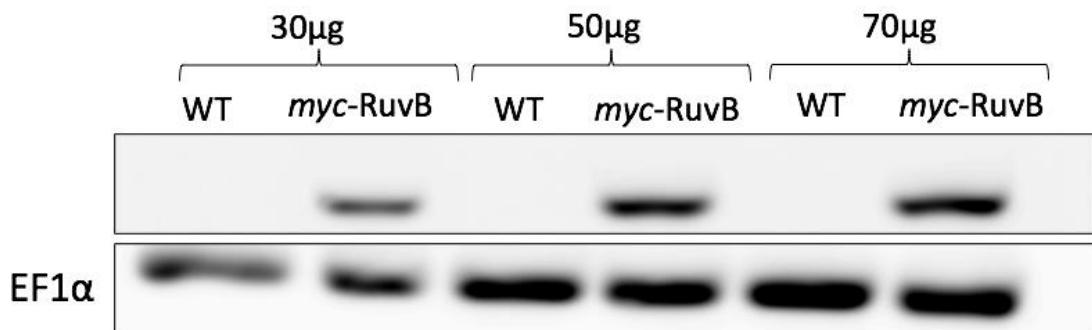
**Figura 8.** Análise dos produtos de PCR por fracionamento em gel de agarose 1%.(A) da esquerda para a direita, as canaletas possuem: marcador de peso molecular (1kb), DNA guia e DNA doador; (B) fracionamento dos produtos de PCR diagnóstica. Da esquerda para direita: marcador de peso molecular (1kb), transfectantes (3, 3\*, 4, 4\*, 8, 11), linhagem parental (WT), controle negativo e novamente o marcador de peso molecular (1kb); (C) esquema ilustrativo do processo de inserção da etiqueta myc no gene codificante da proteína RuvB-Like 1; (\*) Indica os transfectantes que foram inoculados em meio de cultura há mais de dois dias.

Os clones 3 e 4 já haviam sido submetidos a uma PCR diagnóstica previamente, e para confirmar o primeiro resultado, foram submetidos novamente a uma nova reação, dois dias depois da primeira. Pelo fato destas colônias estarem próximas na placa de *Petri*, hipotetizamos que pudesse ter havido contaminação de transfectantes entre as colônias no momento de resgatar os clones da placa, o que explicaria a segunda banda, discreta, na canaleta correspondente a colônia 3\*. Por conta disso, o clone escolhido para dar andamento ao projeto foi o 11. Assim, para reafirmar o resultado, mais uma PCR diagnóstica foi realizada com a colônia 11, com transfectantes inoculados em meio de cultura há mais de dois dias (Figura 9).



**Figura 9.** Confirmação da inserção da etiqueta myc na proteína RuvB-Like1. Segunda PCR diagnóstica para confirmar a inserção da etiqueta myc nos dois alelos do gene codificador da proteína RuvB-Like 1. Da esquerda para direita: marcador de peso molecular (1kb), transfectantes (11\*), controle negativo, linhagem parental (WT); (\*) Indica os transfectantes que foram inoculados em meio de cultura há mais de dois dias.

A partir destes resultados, confirmando o sucesso da transfecção para gerar parasitos homozigotos (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*), os experimentos seguintes foram realizados utilizando o transfectante 11.



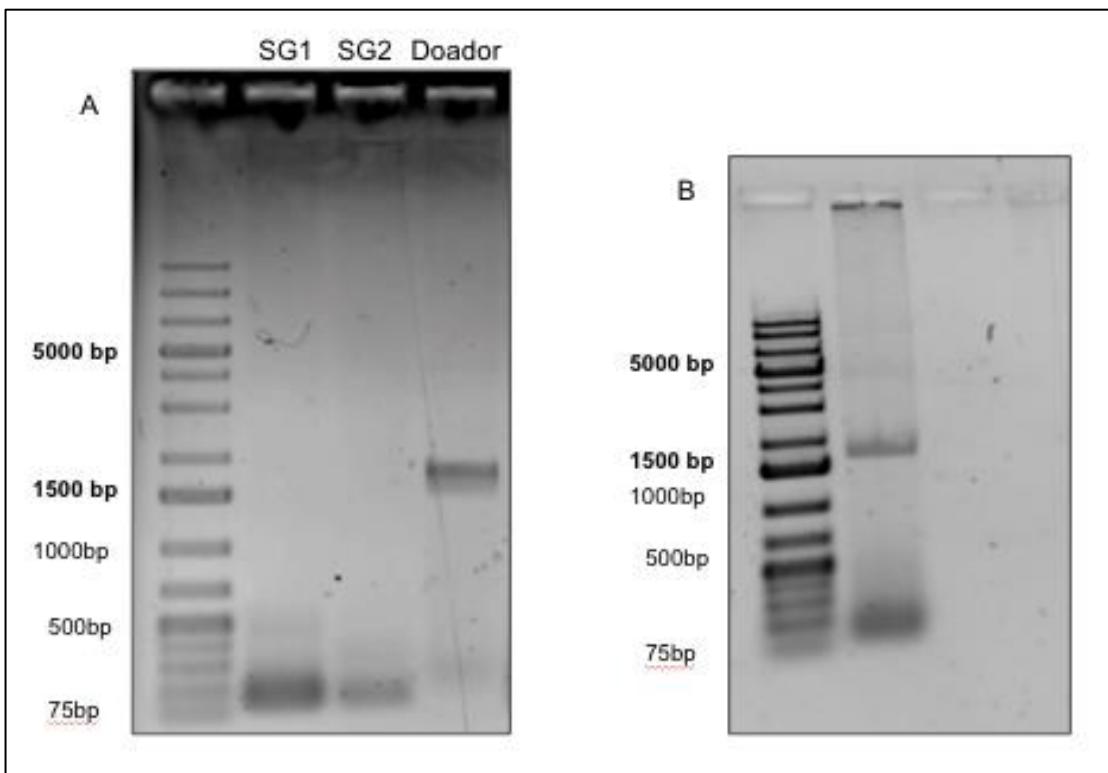
**Figura 10.** Identificação da proteína *RuvB-Like1* etiquetada com *myc* por ensaio de western blotting. O ensaio foi realizado utilizando quantidades diferentes de proteína (30 $\mu$ g, 50 $\mu$ g e 70 $\mu$ g) extraída de parasitos *mycRuvB*<sup>+/−</sup> e a linhagem parental (WT) como controle negativo. Como controle de carregamento foi utilizada a proteína EF1-alfa.

A confirmação da etiqueta *myc* também foi feita a partir do ensaio de western blotting, que foi realizado utilizando quantidades diferentes de proteínas, objetivando avaliar a melhor concentração para os ensaios posteriores. Note-se que este ensaio foi realizado com extrato de proteína de heterozigotos para a etiqueta *myc*, devido a dificuldade inicial de gerar os parasitos *mycRuvB*<sup>++</sup> (Figura 10). Os demais ensaios de western blotting foram feitos utilizando 50 $\mu$ g de proteína.

#### 4.3. Obtenção dos transfectantes nocautes para o gene codificador da PRMT5

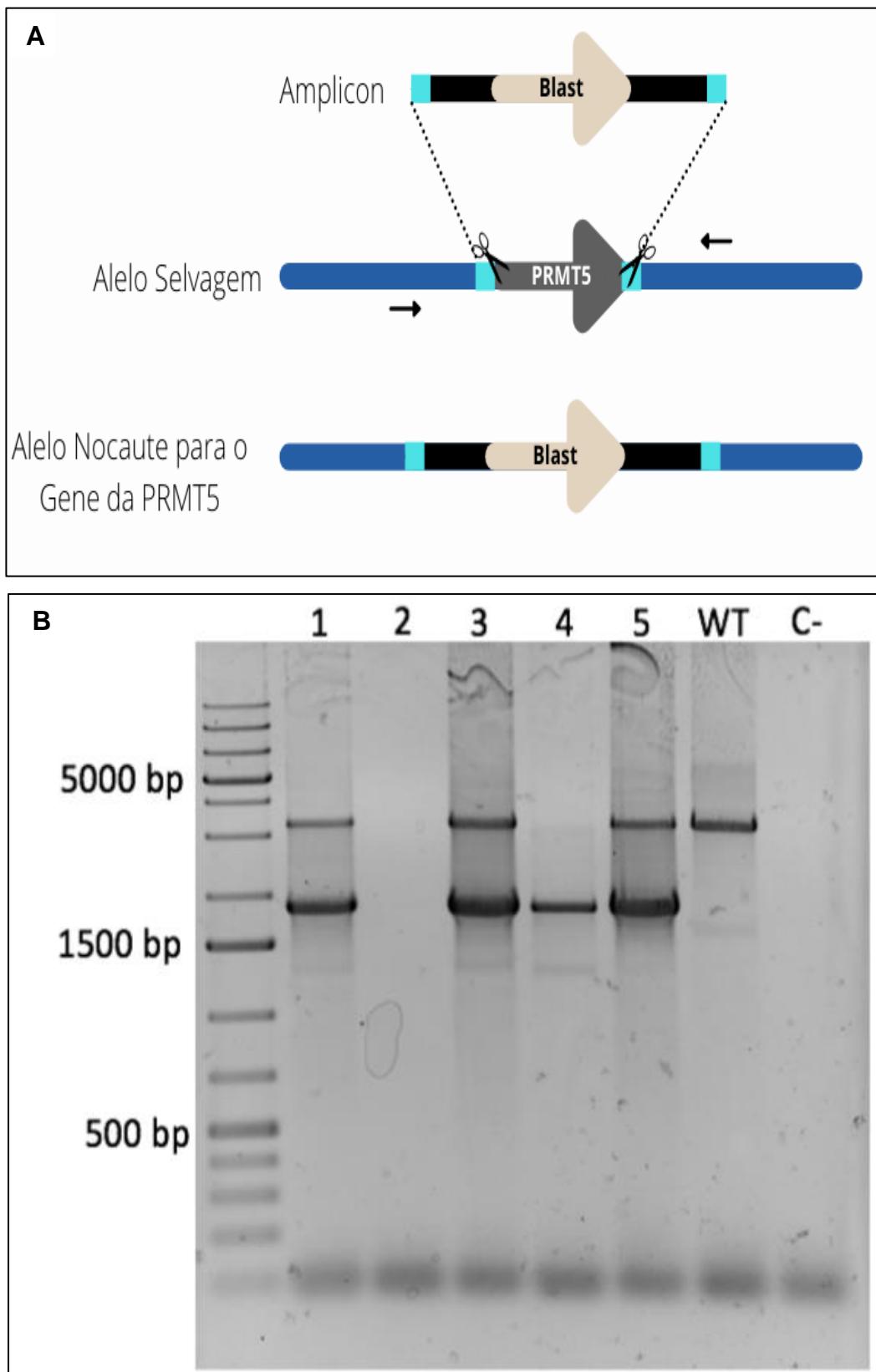
A próxima etapa do trabalho foi gerar os parasitos nocaute para o gene da *LbrPRMT5*, possibilitando um estudo comparativo de *LbrRuvB* a partir destes dois backgrounds distintos (*mycRuvB*<sup>++</sup> ou nocaute para *LbrPRMT5*).

Assim como na primeira transfecção (para etiquetar o gene codificador da *LbrRuvB*: *mycRuvB*<sup>++</sup>), os amplicons do DNA guia e DNA doador foram submetidos a fracionamento em gel de agarose 1%, porém desta vez, antes (Figura 11A), e depois (Figura 11B) da purificação do DNA.



**Figura 11.** Análise dos produtos de PCR empregados na transfecção por fracionamento em gel de agarose 1%. A) Da esquerda para a direita as canaletas contêm: marcador de tamanho molecular (1kb), single guide desenhado para a porção 5'UTR da PRMT5 (SG1); single guide desenhado para a porção 3'UTR da PRMT5 (SG2); e, por fim, o DNA doador. B) A primeira canaleta mostra o marcador de tamanho molecular, seguido pelo DNA precipitado e purificado utilizado na transfecção.

Aproximadamente uma semana depois da transfecção, foi possível observar colônias na placa de Petri. Os transfectantes foram analisados por PCR diagnóstica; de todas as colônias analisadas, somente a colônia 4 (Figura 12A) era nocaute para a PRMT5 (*PRMT5KO*), ou seja, ambos os alelos foram substituídos pelo gene de resistência (Figura 12B).

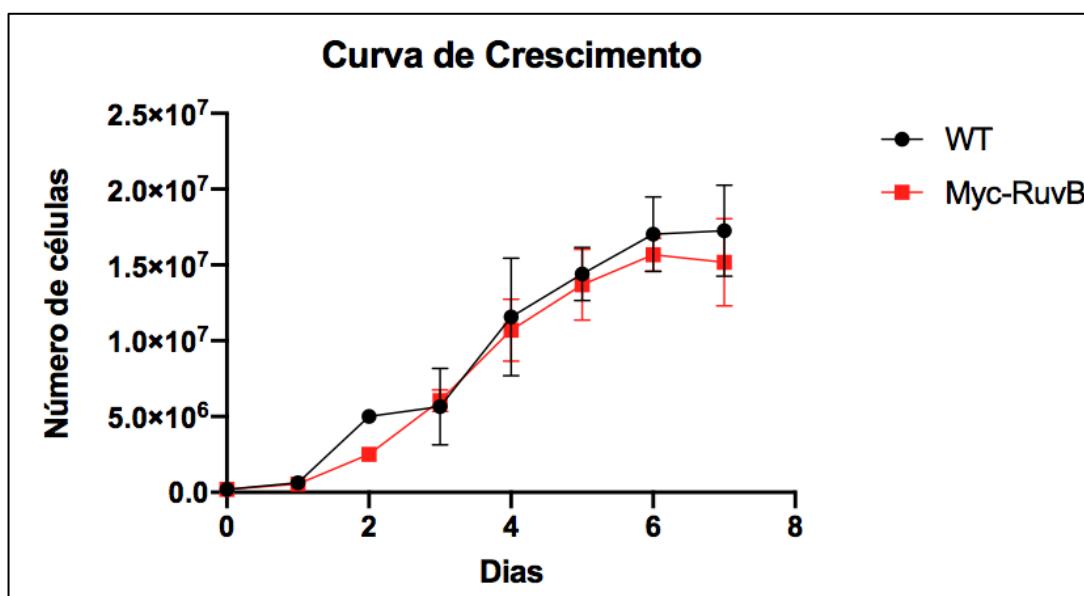


**Figura 12.** Confirmação da substituição de *PRMT5* pelo gene de resistência a blasticidina. (A) Esquema ilustrativo do processo de substituição do gene residente (*PRMT5*) pelo gene de resistência (*Blast*). (B) Fracionamento em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR diagnóstica. Da esquerda para a direita temos: marcador de molecular (1kb), linhagens transfectantes (1,2,3,4,5), linhagem parental (WT) e controle negativo (C-), em que não foi adicionado DNA à reação.

Em conclusão, obtivemos os parasitos contendo a etiqueta *myc* nos dois alelos (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*), na presença ou ausência de *PRMT5*; *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*. Com isso, foram abertas as margens para as análises fenotípicas.

#### 4.4. Curva de Crescimento Celular dos transfectantes *mycRuvB<sup>+/+</sup>*

Com a finalidade de saber se a etiqueta *myc* inserida no gene codificante da proteína RuvB-Like 1 interferiria no crescimento das células transfectadas, foi realizada a curva de crescimento comparando os parasitos *mycRuvB<sup>+/+</sup>* com a linhagem parental (Figura 13).



**Figura 13.** Curva de crescimento celular. O eixo das abscissas indica o tempo, em dias; o eixo das ordenadas indica o número de células; A linha preta do gráfico representa a linhagem parental (WT); enquanto a linha vermelha representa a linhagem dos transfectantes *mycRuvB<sup>+/+</sup>*(Myc-RuvB).

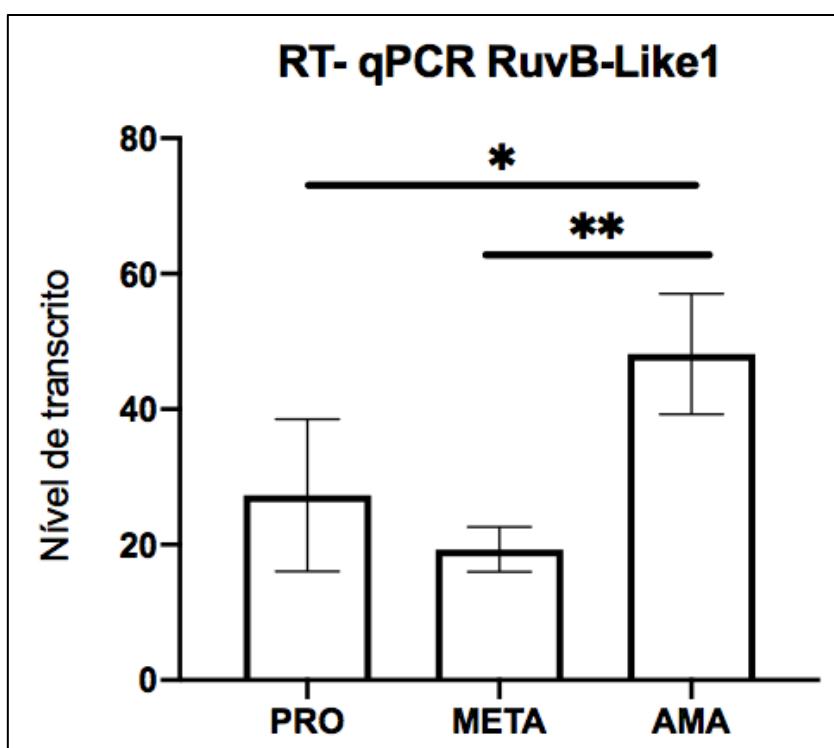
As curvas de crescimento indicam que a inserção da etiqueta *myc* no gene da RuvB no transfectante *mycRuvB<sup>+/+</sup>* não alterou o crescimento dos promastigotas *in vitro*. Além disso, já foi demonstrado que o nocaute de *LbPRMT5* não altera o crescimento dos parasitos (Lorenzon et al., 2022).

#### 4.5. Quantificação dos níveis do transcrito de RuvB-Like1 por RT-qPCR

Para avaliar se os níveis do transcrito de RuvB-Like1 oscilam ao longo do ciclo de vida, foi realizada uma RT-qPCR (Figura 14). O transcrito 7SL foi

utilizado como controle do ensaio pelo fato de manter-se em níveis semelhantes ao longo do ciclo de vida do parasito.

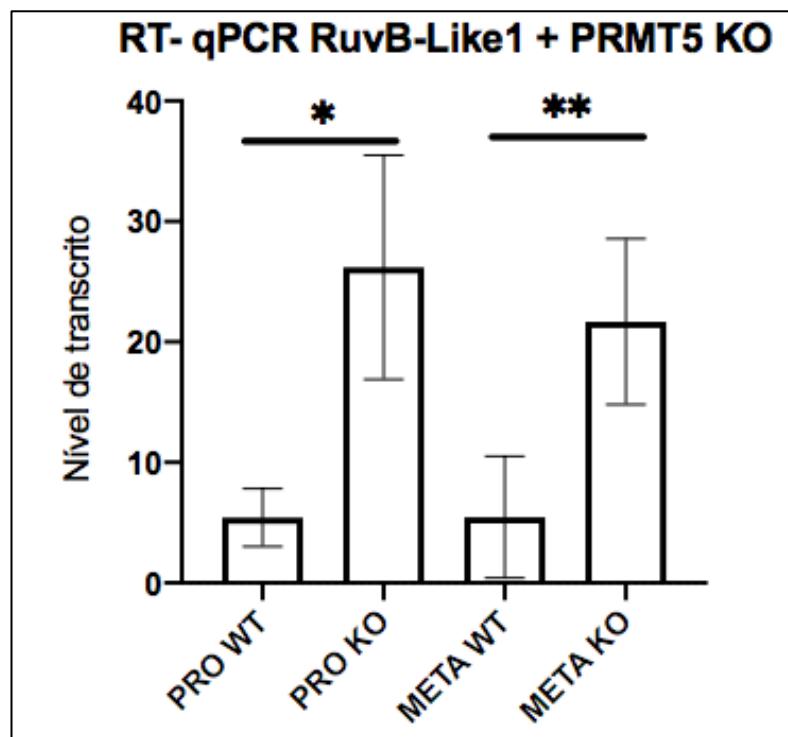
O ensaio foi feito a partir de triplicatas técnicas e quatro réplicas biológicas utilizando as três principais formas do parasito, em que os resultados foram analisados, e os gráficos foram gerados a partir dos valores de  $2^{\Delta\text{CT}}$ . Para isso, primeiramente, foi necessário identificar os valores de DeltaCT, que consiste na média de amplificação das triplicatas de RuvB-Like1 e subtração do valor de amplificação do controle 7SL. Com base no valor de DeltaCT, o  $2^{\Delta\text{CT}}$  foi calculado e plotado no gráfico. A partir dos resultados, foi possível, comparar os níveis relativos de transcripto de RuvB-Like1 ao longo do ciclo de vida do parasito.



**Figura 14.** Representação gráfica da análise dos níveis do transcripto de RuvB-Like1, por RT-qPCR. O gráfico demonstra os níveis de transcripto de RuvB-Like1 em promastigotas procíclicos (PRO), metacíclicos (META) e amastigotas (AMA). O eixo y demonstra o nível relativo do transcripto de RuvB-Like1 comparada com a expressão de outra proteína do parasito, denominada de 7SL, utilizada como controle. O teste estatístico realizado foi o One-Way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey para todos os grupos. \* $p=0.0175$ ; \*\* $p=0.0025$ .

Com isso, identificou-se que os níveis do transcripto de RuvB-Like1 estão mais altos em amastigota (AMA), seguido de níveis intermediários nos procíclicos, sendo seu nível mais baixo na forma metacíclica (META).

O ensaio também foi realizado utilizando as linhagens nocaute para o gene codificados da *LbPRMT5*, nas formas promastigotas procíclicas e metacíclicas (Figura 15).



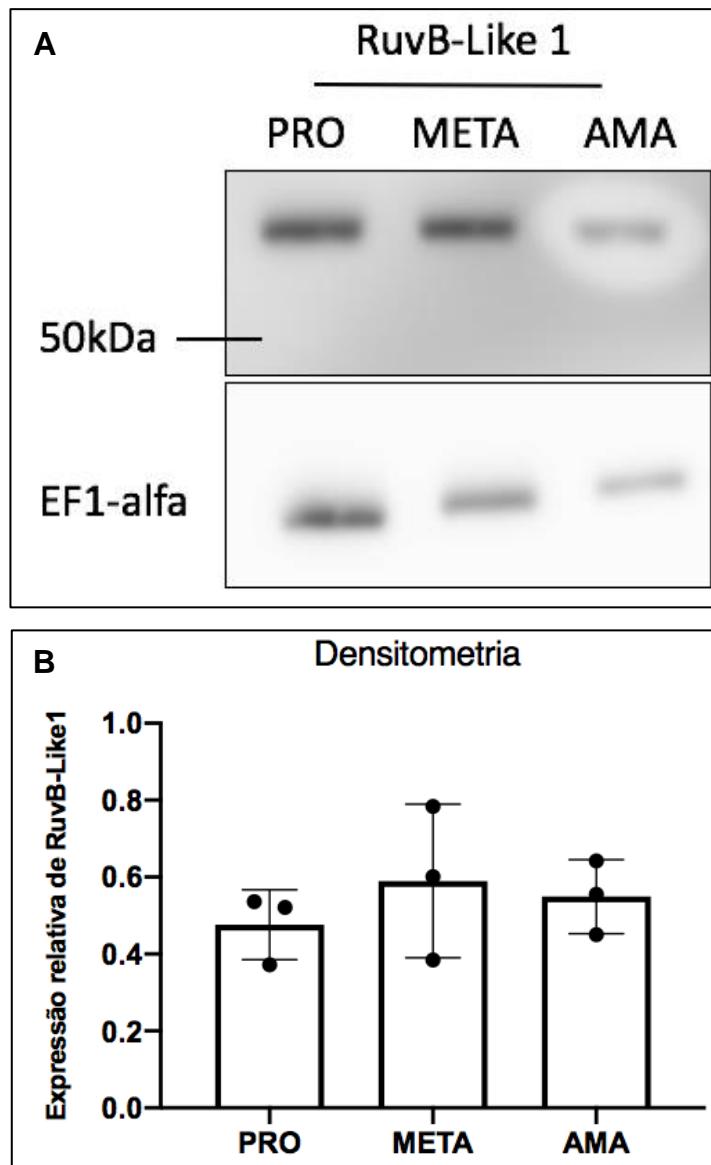
**Figura 15.** Representação gráfica da análise dos níveis do transcrito de *RuvB-Like1*, por RT-qPCR, nas linhagens parental e nocaute. O gráfico demonstra os níveis de transcrito de *RuvB-Like1* em promastigotas procíclicos (PRO), metacíclicos (META). A linhagem parental está representada como WT, enquanto a linhagem *PRMT5* nocaute, como KO. O eixo y demonstra o nível relativo do transcrito de *RuvB-Like1* comparada com a expressão de outra proteína do parasito, denominada de 7SL, utilizada como controle. O teste estatístico realizado foi o Teste T. \* $p=0.02$ ; \*\* $p=0.0089$ .

A partir deste resultado, foi possível identificar que os níveis de transcrito na linhagem nocaute são maiores, quando comparados com a linhagem parental, tanto nas formas promastigotas procíclicas, quanto nas metacíclicas. As análises com a forma amastigota axênica não foi realizada, pelo fato de que parasitos nocaute para a *LBPRMT5* não sofrem diferenciação para esta forma de vida.

Ressalta-se que os níveis de RNA nem sempre se correlacionam com os níveis da proteína, pelo fato de a regulação da expressão gênica ocorrer majoritariamente à nível pós-transcricional. Tanto a taxa de síntese proteica quanto a de degradação da proteína são fatores que modificam especificamente o nível da proteína independentemente da abundância do transcrito (REQUENA, Jose M., 2011).

#### 4.6. Avaliação da expressão da proteína RuvB-Like1 por ensaio de Western Blot utilizando promastigotas procíclicos, metacíclicos e amastigotas

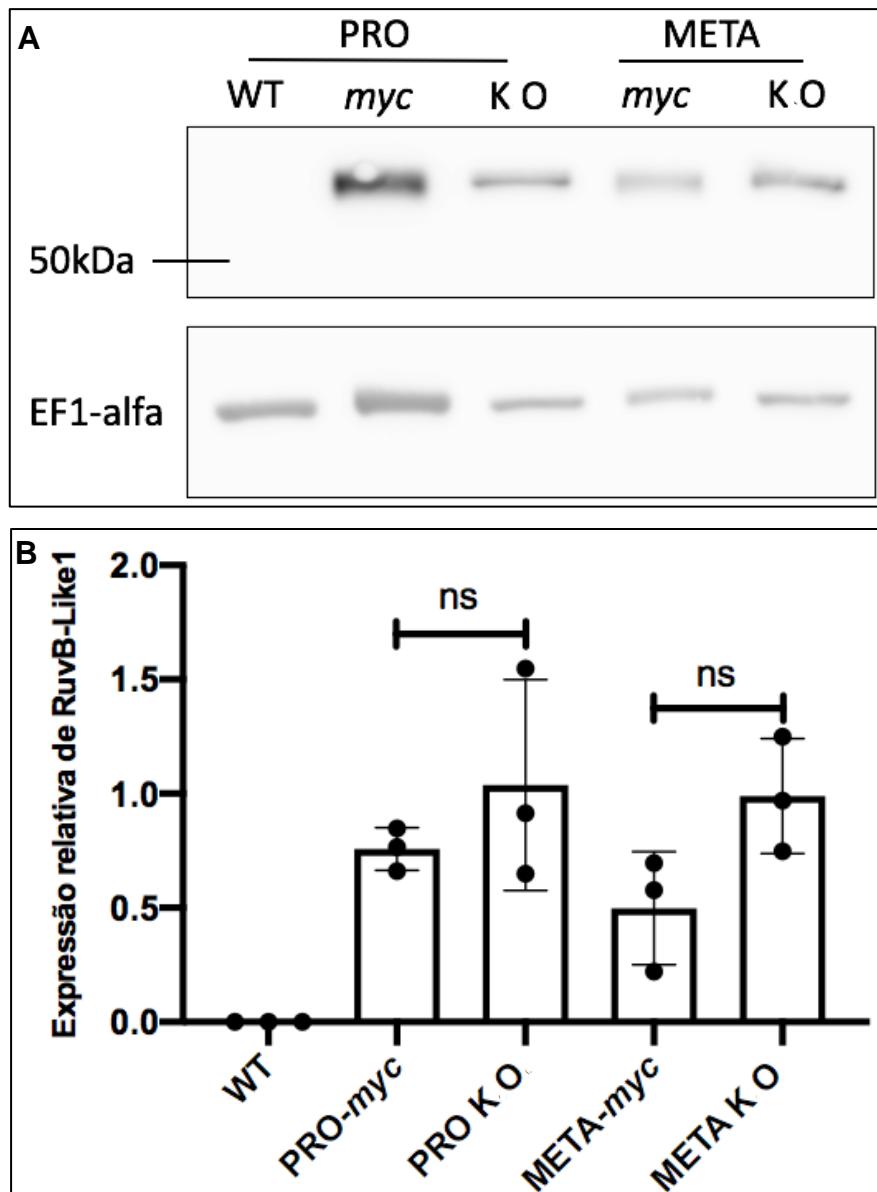
A proteína foi identificada por ensaio de western blotting, confirmando seu tamanho de aproximadamente 55kDa (somando o tamanho esperado da proteína e a etiqueta *myc*; Tabela I) e também sua expressão nas três fases do ciclo de vida do parasita (Figura 16A).



**Figura 16.** Identificação da proteína RuvB-Like 1 etiquetada com *myc* por ensaio de western blot e análise por densitometria. A) ensaio de western blot, utilizando o extrato de proteína dos parasitos da linhagem *mycRuvB+/+(RuvB-Like1)*. O ensaio foi realizado nas três fases do ciclo de vida do parasito, da esquerda para direita, promastigotas procíclicos (PRO), metacíclicos (META) e amastigotas (AMA). Como controle de carregamento foi utilizado a proteína EF1- $\alpha$ . B) Densitometria do ensaio de Western Blot: da esquerda para direita estão as amostras de promastigotas procíclicos, metacíclicos e amastigotas. O teste estatístico realizado foi o One-Way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey para todos os grupos.

O ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica e como controle de carregamento, foi utilizado a proteína EF1-Alfa, pelo fato desta ser expressa de maneira constitutiva durante todas as fases do ciclo do parasita.

Além disso, também foi realizado um ensaio de western blot considerando os dois backgrounds genéticos gerados. Com isso, foi possível avaliar a expressão da proteína *LbrRuvB* em parasitos promastigotas procíclicos e metacíclico, na presença e ausência da *LbrPRMT5* (Figura 17A).



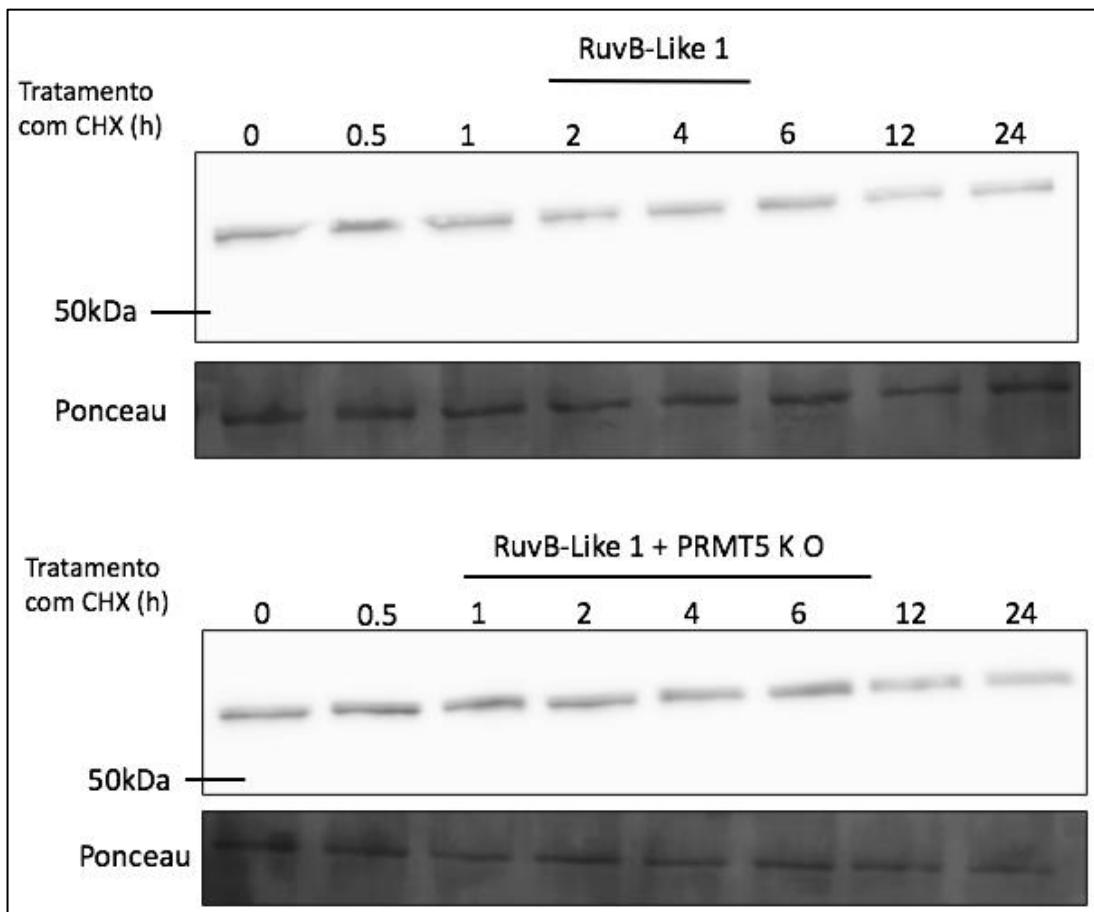
**Figura 17.** Identificação da proteína *RuvB-Like 1* etiquetada com *myc* por ensaio de western blot e análise por densitometria nas linhagens etiquetada e no caute. A) ensaio de western blot, utilizando o extrato de proteína dos parasitos da linhagem *mycRuvB<sup>+/+</sup>(myc)* e *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO* (*KO*). O ensaio foi realizado nas três fases do ciclo de vida do parasito, da esquerda para direita, promastigotas procíclicos (PRO) e metacíclicos (META). Como controle de carregamento foi utilizado a proteína EF1- $\alpha$ . B) Densitometria do ensaio de Western Blot: da esquerda para direita estão as amostras de promastigotas e metacíclicos, com os backgrounds genéticos: parental (WT), *mycRuvB<sup>+/+</sup>(myc)* e *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO* (*KO*). O

teste estatístico realizado foi o One-Way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni para todos os grupos. ns= sem diferença estatística significante.

O ensaio foi realizado em triplicata técnica, utilizando a linhagem parental como controle negativo e a proteína EF1-Alfa como controle de carregamento. Os níveis de proteína foram analisados por densitometria, com auxílio do software ImageJ (DAVARINEJAD, Hossein., 2015). A partir desta análise, foi possível concluir que não existe diferença estatística relevante na expressão relativa da proteína *LbRuvB* entre as três principais formas do parasito (Figura 16B), nem entre os dois backgounds genéticos gerados (Figura 17B).

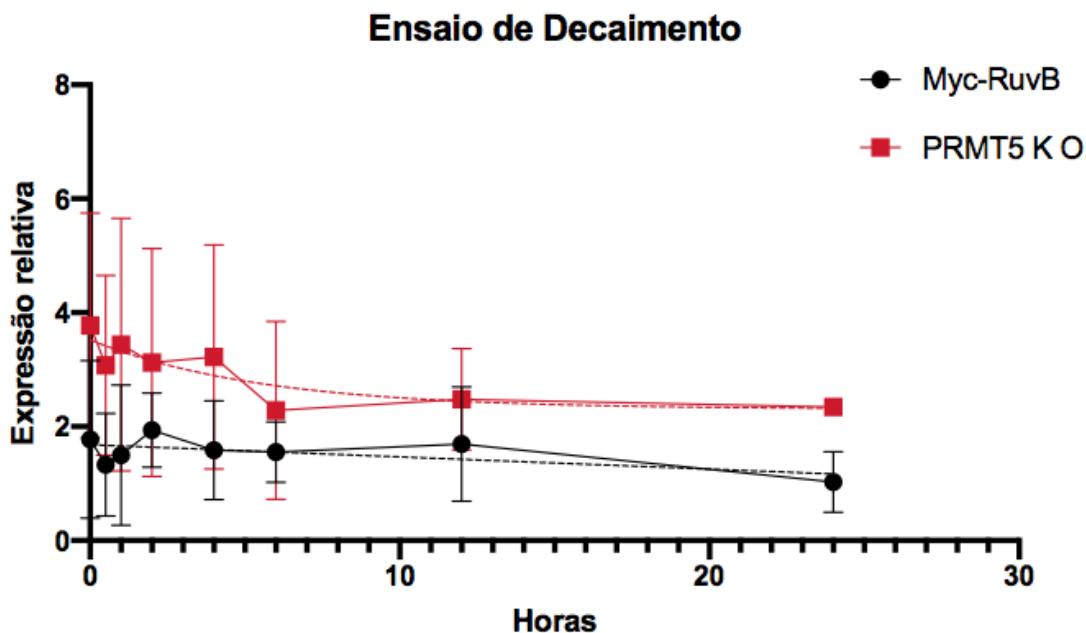
#### **4.7. Análise da estabilidade da proteína *LbRuvB* na ausência e presença da PRMT5**

Para analisar a estabilidade da proteína *LbRuvB* na ausência e presença de PRMT5, os parasitos em fase *log* de crescimento foram inoculados com cicloheximida (CHX), a fim de parar seu processo de tradução. A partir disso, foram coletadas amostras destas culturas em diferentes períodos, para serem analisadas por western blot (Figura 18).



**Figura 18.** Ensaio de decaimento de proteína. A estabilidade da proteína RuvB-Like1 foi analisada nos dois backgrounds genéticos gerados (RuvB-Like1: *mycRuvB*+/-; RuvB-Like1+PRMT5KO: *mycRuvB*+/+PRMT5KO), em parasitos na fase logarítmica de crescimento depois da adição de cicloeximida (CHX). O Ponceau foi utilizado como controle de carregamento de proteína.

A partir das imagens obtidas por western blot não foi possível identificar qualquer diferença aparente entre os parasitos dos dois backgrounds genéticos. As imagens foram analisadas com o auxílio do software ImageJ e os resultados foram plotados em um gráfico (Figura 19)

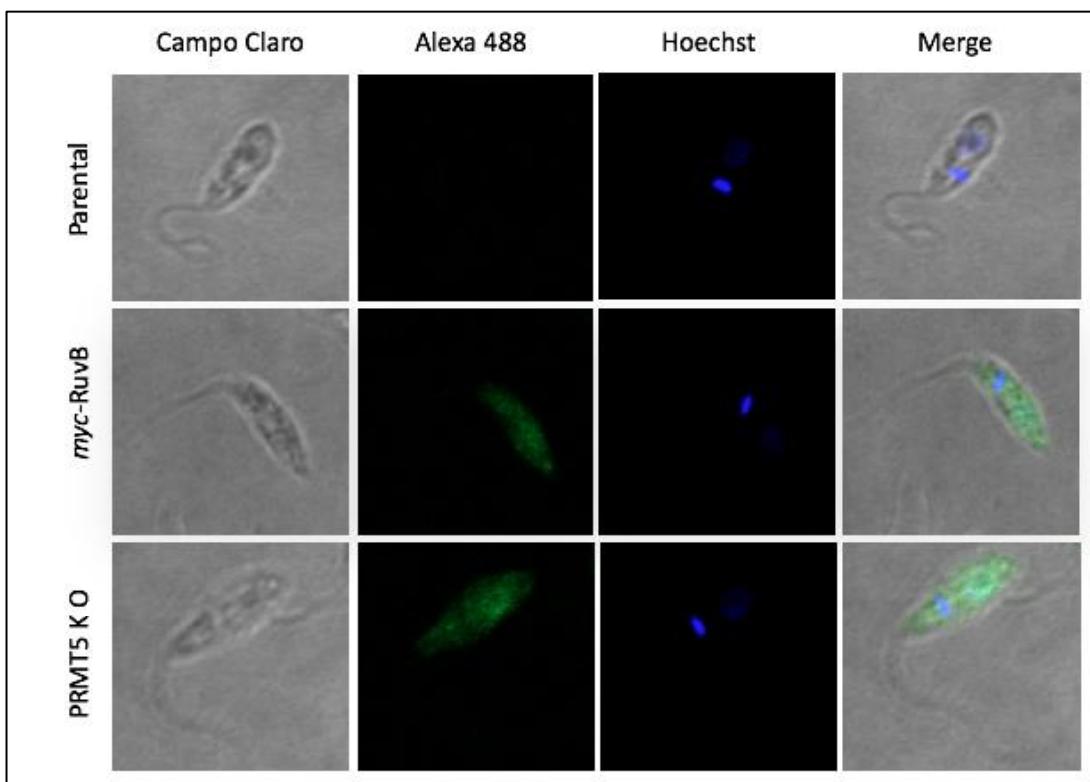


**Figura 19.** Análise de decaimento da proteína RuvB-Like1. O eixo da abscissa indica o período (em horas) em que as amostras foram coletadas, a partir do momento da incubação com CHX (0h); o eixo da ordenada indica a expressão relativa da proteína LbRuvB. A linha preta representa a linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>(Myc-RuvB), enquanto a linha vermelha representa a linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>*PRMT5KO* (PRMT5 KO).

A partir do teste *One-phase decay exponential fit* foi possível estipular o tempo de meia-vida da proteína entre os dois backgrounds, sendo de 11,6h para a linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>e 3,8h para a linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>*PRMT5KO*. Com o gráfico, pode ser observado que a taxa de decaimento da proteína *LbrRuvB*-Like1 é ligeiramente menor na linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup> *PRMT5KO* em comparação com a linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>.

#### 4.8. Localização subcelular da proteína RuvB-Like 1 por ensaio de Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência (IF) foi realizado para identificar a localização subcelular da proteína *LbRuvB*-Like1 levando em consideração os dois backgrounds genéticos gerados. Portanto, depois que as células foram fixadas na lâmina e incubadas com os anticorpos primário e secundário, as imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica TCS SP5. O experimento foi realizado em duplicatas biológicas, utilizando a forma promastigota procíclica.

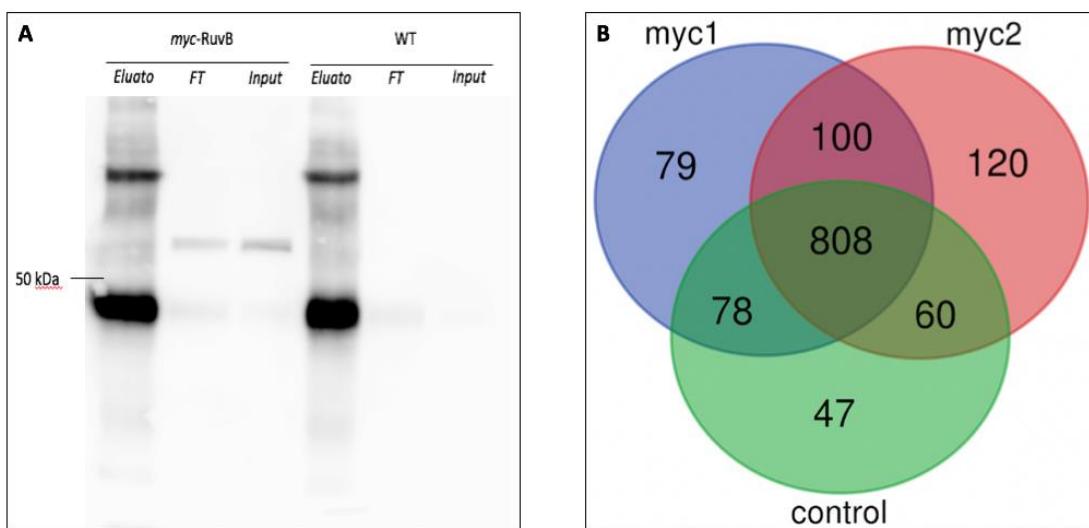


**Figura 22** Localização subcelular da proteína RuvB-Like 1 por microscopia de imunofluorescência em promastigotas procíclicos. As quatro imagens superiores contêm parasitos da linhagem parental utilizados como controle para o ensaio (WT); as quatro imagens intermediárias, parasitos da linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>(*myc-RuvB*); as quatro imagens inferiores contêm parasitos da linhagem *mycRuvB*<sup>+/+</sup>*PRMT5KO* (*PRMT5KO*). Da esquerda para a direita as imagens mostram os parasitos sem a utilização de filtros; com filtro para identificar o marcador de DNA (Hoechst); com filtro para identificar o anticorpo secundário Alexa488; e o merge, indicando a sobreposição dos três canais utilizados.

A partir deste ensaio foi possível observar que a proteína *LbRuvB*, pode ser detectada no núcleo, mas também possui localização citoplasmática, em ambos os backgrounds dos parasitos (*mycRuvB*<sup>+/+</sup> e *mycRuvB*<sup>+/+</sup>*PRMT5KO*) (Figura 20).

#### 4.9. Análise de interação da RuvB-Like 1 com outras proteínas por imunoprecipitação

Com o objetivo de identificar as proteínas que interagem com a *LbRuvB*, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação (IP), como descrito no item 3.12, em duplicata biológica. O ensaio de western blotting foi feito para confirmar a imunoprecipitação da proteína de interesse, utilizando como controle, as amostras de *input* e *flow-through*, com isso, confirmando a presença da proteína de interesse na amostra e a ligação do antígeno às esferas magnéticas, respectivamente (Figura 21A).



**Figura 23** Imunoprecipitação da proteína LbRuvB. A) Identificação da proteína RuvB-Like 1 etiquetada com myc por western blot para validar o ensaio de imunoprecipitação. Da esquerda para direita: eluato, flow-through e input. A linhagem utilizada no ensaio foi *mycRuvB<sup>+/+</sup>* (*myc-RuvB*) e como controle foi utilizado a linhagem parental (WT). B) Diagrama de Venn das proteínas identificadas pelo ensaio de IP. As réplicas estão representadas por “myc1” e “myc2” (linhagem *mycRuvB<sup>+/+</sup>*) e o controle está representado por “control” (linhagem parental).

O eluato originado pelo ensaio de IP foi submetido à análise por espectrometria de massas com a finalidade de identificar as proteínas que potencialmente interagem com a *LbRuvB*. Os resultados obtidos a partir das replicadas foram tratados, de modo que proteínas que encontradas em somente uma das réplicas biológicas não foram consideradas na análise. Além disso, as proteínas encontradas nas amostras WT (utilizada como controle) também foram desconsideradas, por não possuirem relação de interação com a proteína alvo do ensaio. A partir desta análise, um diagrama de Venn foi gerado, identificando 100 potenciais proteínas que interagem com a *LbRuvB* de forma direta ou indireta (Figura 21B). Finalmente, entre as 100 proteínas identificadas, estava a *LbPRMT5*, com isso, comprovando, mais uma vez, a interação existente entre que as proteínas *LbRuvB* e *LbPRMT5*.

**Tabela IV.** Proteínas que interagem com *LbrRuvB* identificadas por meio do ensaio de imunoprecipitação.

Gene ID	Descrição	Peso Molecular
LbrM.30.2440	Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_30_2440 PE=3 SV=1	71 kDa
LbrM.18.0020	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_18_0020 PE=4 SV=1	113 kDa
LbrM.21.1830	PRMT5 protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=PRMT5 PE=4 SV=2	112 kDa
LbrM.20.4800	CTP synthase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_4800 PE=3 SV=1	66 kDa
LbrM.24.1970	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_24_1970 PE=3 SV=1	88 kDa
LbrM.29.1230	TXN1 protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=TXN1 PE=4 SV=1	16 kDa
LbrM.28.2830	Cootomer subunit gamma OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_28_2830 PE=3 SV=2	96 kDa
LbrM.27.2100	Protein kinase-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_2100 PE=4 SV=1	102 kDa
LbrM.24.1260	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_24_1260 PE=4 SV=1	48 kDa
LbrM.25.2560	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=lbrM_25_2560 PE=4 SV=1	65 kDa
LbrM.11.0920	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_11_0920 PE=3 SV=2	122 kDa
LbrM.10.0130	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_10_0130 PE=4 SV=2	83 kDa
LbrM.21.1500	Putative 2-nitropropane dioxygenase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_21_1500 PE=4 SV=1	34 kDa
LbrM.32.1290	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_1290 PE=4 SV=2	83 kDa
LbrM.17.0380	RING-type domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_17_0380 PE=4 SV=1	115 kDa
LbrM.18.0870	Putative DNA-directed RNA polymerases II OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_18_0870 PE=3 SV=1	27 kDa
LbrM.07.0280	Acetylornithine deacetylase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_07_0280 PE=3 SV=1	43 kDa
LbrM.32.1390	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_1390 PE=4 SV=2	100 kDa
LbrM.35.5340	Casein kinase II subunit beta OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_35_5340 PE=3 SV=1	31 kDa
LbrM.01.0550	Putative long-chain-fatty-acid-CoA ligase (Fragment) OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_01_0550 PE=4 SV=1	74 kDa
LbrM.34.0230	FCP1 homology domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_34_0230 PE=4 SV=1	27 kDa
LbrM.22.0740	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_22_0740 PE=4 SV=1	23 kDa
LbrM.32.3140	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_3140 PE=3 SV=1	33 kDa
LbrM.26.1310	JmjC domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_26_1310 PE=4 SV=1	65 kDa
LbrM.13.0930	DUF155 domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_13_0930 PE=3 SV=1	65 kDa
LbrM.10.0970	Histone H3 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_10_0970 PE=3 SV=1	15 kDa
LbrM.30.2390	TPR_REGION domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_30_2390 PE=4 SV=1	85 kDa
LbrM.09.0990	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_09_0990 PE=3 SV=1	130 kDa
LbrM.20.2770	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_2770 PE=4 SV=1	56 kDa
LbrM.34.0200	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_34_0200 PE=4 SV=1	28 kDa
LbrM.33.1410	AAA domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_33_1410 PE=4 SV=1	70 kDa
LbrM.27.1010	Putative isovaleryl-CoA dehydrogenase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_1010 PE=3 SV=1	45 kDa
LbrM.05.1010	Methyltransferase-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_05_1010 PE=4 SV=1	69 kDa
LbrM.04.1190	Putative RNA-binding protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_04_1190 PE=4 SV=1	35 kDa
LbrM.05.0060	Major vault protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_05_0060 PE=3 SV=1	93 kDa
LbrM.32.3750	Putative exosome-associated protein 2 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_3750 PE=3 SV=1	33 kDa
LbrM.20.0510	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_0510 PE=4 SV=1	14 kDa
LbrM.08.0710	DNA polymerase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_08_0710 PE=3 SV=1	43 kDa
LbrM.07.1220	Peptide-methionine (S)-5-oxide reductase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_07_1220 PE=3 SV=1	20 kDa
LbrM.33.1560	Putative expression-site associated gene (ESAG3) OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_33_1560 PE=4 SV=2	73 kDa
LbrM.34.3290	Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-) methyltransferase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_34_3290 PE=4 SV=1	62 kDa
LbrM.17.0590	Putative P-type ATPase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_17_0590 PE=4 SV=1	120 kDa
LbrM.19.0330	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_19_0330 PE=4 SV=1	28 kDa
LbrM.35.2890	Transportin2-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_35_2890 PE=4 SV=1	103 kDa
LbrM.29.1130	Putative KU70 protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_29_1130 PE=4 SV=1	103 kDa
LbrM.20.3330	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_3330 PE=4 SV=2	54 kDa
LbrM.11.0250	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_11_0250 PE=4 SV=1	54 kDa
LbrM.29.1770	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_29_1770 PE=4 SV=2	30 kDa
LbrM.30.0980	Putative surface protein amastin OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_30_0980 PE=4 SV=1	21 kDa
LbrM.20.3040	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_3040 PE=4 SV=1	54 kDa
LbrM.17.0210	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_17_0210 PE=3 SV=1	76 kDa
LbrM.14.0820	Putative calpain-like cysteine peptidase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_14_0820 PE=4 SV=1	13 kDa
LbrM.14.1540	Inositol-3-phosphate synthase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=INO1 PE=3 SV=1	58 kDa
LbrM.35.7390	Cytochrome c oxidase subunit I OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_35_7390 PE=4 SV=1	14 kDa
LbrM.24.1230	Putative translation factor s1 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_24_1230 PE=3 SV=1	12 kDa
LbrM.32.1530	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_1530 PE=4 SV=1	85 kDa
LbrM.31.2150	RING-CH-type domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_31_2150 PE=4 SV=1	121 kDa
LbrM.18.1660	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_18_1660 PE=4 SV=1	24 kDa
LbrM.07.0240	SCG1 protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=SCG1 PE=3 SV=2	90 kDa
LbrM.25.0290	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_25_0290 PE=4 SV=1	63 kDa
LbrM.29.1540	Putative phosphatidylinositol 4-kinase alpha OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_29_1540 PE=4 SV=2	287 kDa
LbrM.07.0120	SEC7 domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_07_0120 PE=4 SV=1	220 kDa
LbrM.32.3240	ATP binding protein-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_32_3240 PE=3 SV=1	22 kDa
LbrM.31.0440	AAT1.2 protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=AAT1.2 PE=4 SV=1	55 kDa
LbrM.03.0670	Ubiquitin-like domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_03_0670 PE=4 SV=1	60 kDa
LbrM.20.5400	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_5400 PE=4 SV=1	78 kDa
LbrM.06.1160	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_06_1160 PE=3 SV=1	51 kDa
LbrM.29.2210	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_29_2210 PE=4 SV=2	56 kDa
LbrM.26.1010	Glucosidase 2 subunit beta OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_26_1010 PE=4 SV=1	56 kDa
LbrM.30.3060	SAM-dependent MTase TRM10-type domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_30_3060 PE=4 SV=1	42 kDa
LbrM.29.2410	Phosphodiesterase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_29_2410 PE=3 SV=1	82 kDa
LbrM.33.2180	Charged multivesicular body protein 1a OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_33_2180 PE=4 SV=1	22 kDa
LbrM.25.2240	DUF1935 domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=lbrM_25_2240 PE=4 SV=1	16 kDa
LbrM.27.1180	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_1180 PE=4 SV=1	22 kDa
LbrM.27.2600	Putative TPR-repeat protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_2600 PE=4 SV=2	53 kDa
LbrM.16.0850	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_16_0850 PE=4 SV=1	86 kDa
LbrM.24.1820	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_24_1820 PE=4 SV=2	29 kDa
LbrM.34.3350	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_34_3350 PE=3 SV=1	13 kDa
LbrM.31.3570	Methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_31_3570 PE=4 SV=2	76 kDa
LbrM.20.2060	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_2060 PE=4 SV=1	261 kDa
LbrM.09.0590	CULT domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_09_0590 PE=4 SV=2	53 kDa
LbrM.13.0540	Oxidoreductase-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_13_0540 PE=4 SV=1	37 kDa
LbrM.24.0130	Ankyrin/TPR repeat protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_24_0130 PE=4 SV=1	43 kDa
LbrM.27.2200	D-lactate dehydrogenase-like protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_2200 PE=4 SV=1	54 kDa
LbrM.20.5530	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_20_5530 PE=4 SV=1	15 kDa
LbrM.21.0270	Major vault protein-like protein (Fragment) OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_21_0270 PE=4 SV=1	67 kDa
LbrM.30.1750	Putative small GTP-binding protein Rab28 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_30_1750 PE=4 SV=1	26 kDa
LbrM.27.2210	Putative branched-chain amino acid aminotransferase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_2210 PE=3 SV=1	44 kDa
LbrM.16.0290	Putative proteasome 26S non-ATPase subunit 9 OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_16_0290 PE=4 SV=1	28 kDa
LbrM.17.0400	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_17_0400 PE=4 SV=1	61 kDa
LbrM.34.1860	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_34_1860 PE=3 SV=1	27 kDa
LbrM.35.5030	Uncharacterized protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_35_5030 PE=4 SV=2	34 kDa
LbrM.33.0460	Putative deoxyribodipyrimidine photolyase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_33_0460 PE=3 SV=2	62 kDa
LbrM.14.1020	DUF202 domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_14_1020 PE=4 SV=1	20 kDa
LbrM.33.1290	Guanilate kinase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_33_1290 PE=3 SV=1	23 kDa
LbrM.09.1510	Rhodanese domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_09_1510 PE=4 SV=1	15 kDa
LbrM.25.0750	Non-specific serine/threonine protein kinase OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_25_0750 PE=3 SV=1	32 kDa
LbrM.27.1830	C3H1-type domain-containing protein OS=Leishmania braziliensis OX=5660 GN=LBRM_27_1830 PE=4 SV=1	67 kDa

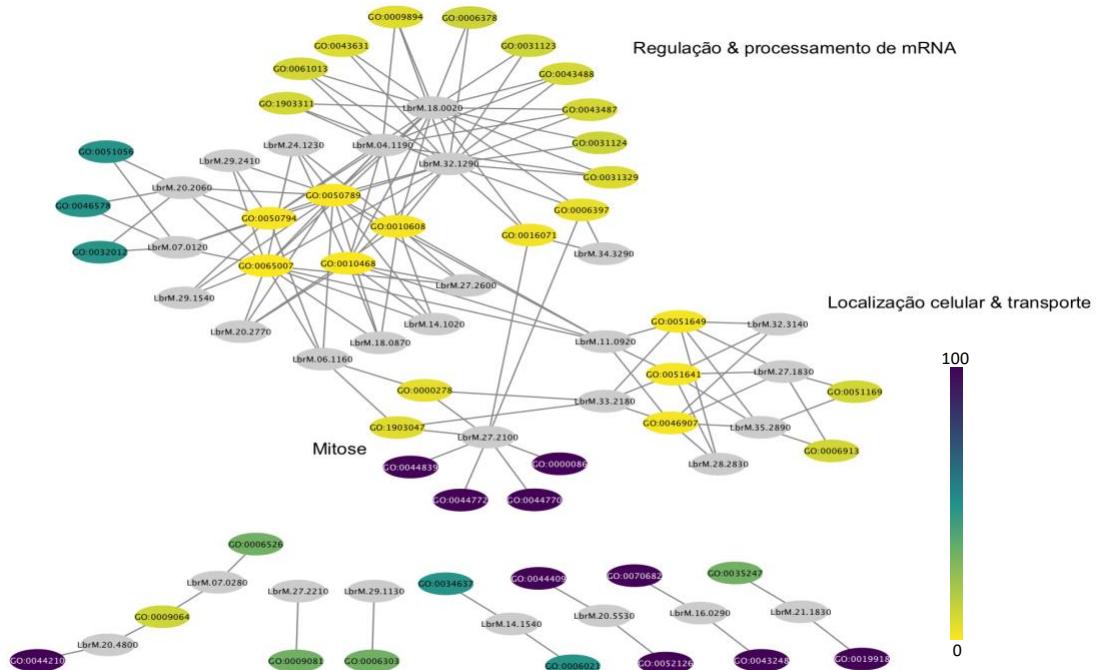
*Lista de proteínas identificadas pelo ensaio de imunoprecipitação, que interagem com a proteína LbrRuvB. A primeira coluna indica o ID do gene codificador de cada proteína, seguida por sua descrição e por fim, peso molecular.*

Empregando ferramentas do Gene Ontology (GO) foi possível obter informações sobre possíveis funções ou processos biológicos nos quais as proteínas identificadas por IP fariam parte. Esta análise possibilitou a identificação de diversos processos biológicos para os quais observou-se enriquecimento gênico, sendo que alguns deles guardam coerência com as funções relatadas para a RuvB-like1 em outros organismos. O processamento de RNA (como metabolismo e estabilidade, por exemplo), transição das fases do ciclo celular, regulação da expressão gênica, transporte (nuclear, nucleocitoplasmático e intracelular), reparo de dano de dupla fita e metabolismo de arginina, são alguns exemplos (Tabela V). Contribuindo com a descrição da *LbrRuvB*, que é classificada como uma helicase AAA+, ou seja, uma ATPase Associada a diversas atividades celulares.

**Tabela V.** Descrição da função das proteínas que interagem com *LbrRuvB*.

ID	Descrição	Bgd count	Result count	Pct of bbgd
GO:0051056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	4	2	50.0
GO:0032012	regulation of ARF protein signal transduction	4	2	50.0
GO:0046578	regulation of Ras protein signal transduction	4	2	50.0
GO:1903311	regulation of mRNA metabolic process	26	3	11.5
GO:0061013	regulation of mRNA catabolic process	26	3	11.5
GO:0043488	regulation of mRNA stability	26	3	11.5
GO:0043487	regulation of RNA stability	27	3	11.1
GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	31	3	9.7
GO:0009894	regulation of catabolic process	34	3	8.8
GO:0050789	regulation of biological process	503	14	2.8
GO:1903047	mitotic cell cycle process	35	3	8.6
GO:0044770	cell cycle phase transition	1	1	100.0
GO:0044409	entry into host	1	1	100.0
GO:0044210	'de novo' CTP biosynthetic process	1	1	100.0
GO:0052126	movement in host environment	1	1	100.0
GO:0070682	proteasome regulatory particle assembly	1	1	100.0
GO:0044839	cell cycle G2/M phase transition	1	1	100.0
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	1	1	100.0
GO:0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle	1	1	100.0
GO:0043248	proteasome assembly	1	1	100.0
GO:0019918	peptidyl-arginine methylation, to symmetrical-dimethyl arginine	1	1	100.0
GO:0006397	mRNA processing	65	4	6.2
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	271	9	3.3
GO:0065007	biological regulation	524	14	2.7
GO:0006378	mRNA polyadenylation	15	2	13.3
GO:0031124	mRNA 3'-end processing	15	2	13.3
GO:0000278	mitotic cell cycle	41	3	7.3
GO:0031123	RNA 3'-end processing	16	2	12.5
GO:0009064	glutamine family amino acid metabolic process	16	2	12.5
GO:0051169	nuclear transport	17	2	11.8
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	17	2	11.8
GO:0046907	intracellular transport	157	6	3.8
GO:0051649	establishment of localization in cell	158	6	3.8
GO:0006021	inositol biosynthetic process	2	1	50.0
GO:0034637	cellular carbohydrate biosynthetic process	2	1	50.0
GO:0050794	regulation of cellular process	250	8	3.2
GO:0016071	mRNA metabolic process	83	4	4.8
GO:0051641	cellular localization	170	6	3.5
GO:0010468	regulation of gene expression	312	9	2.9
GO:0043631	RNA polyadenylation	22	2	9.1
GO:0009081	branched-chain amino acid metabolic process	3	1	33.3
GO:0006303	double-strand break repair via nonhomologous end joining	3	1	33.3
GO:0035247	peptidyl-arginine omega-N-methylation	3	1	33.3
GO:0006526	arginine biosynthetic process	3	1	33.3

**ID:** Identificação no GO; **Bgd count:** número de genes com este termo no genoma; **Results count:** número de genes com este termo nos resultados; **Pct of Bgd:** porcentagem com que os termos dos genes presentes no **Bgd count** aparecem no **Results count**.



**Figura 22** Rede de interação entre genes identificados e termos do GO. Os genes estão representados em cinza; A escala amarelo-verde-roxo representa, a porcentagem com que os termos dos genes presentes no **Bgd count** aparecem no **Results count**.

Além disso, foi possível gerar uma rede de interação entre os genes das proteínas identificadas e os termos GO. A figura 22 esquematiza algumas informações da tabela V, entre elas, a porcentagem com que os genes do genoma (**Bgd count**) aparecem nos resultados (**Results count**) e a análise dos processos biológicos mais frequentes, entre eles, destacando-se regulação & processamento de RNA, Mitose e Localização celular & transporte.

## 5. DISCUSSÃO

As proteínas pertencentes ao grupo da superfamília AAA+ estão envolvidos com diversas atividades celulares, incluindo desdobramento, desassociação e remodelação de macromoléculas (proteínas e ácidos nucléicos) (AMMELBURG, Moritz; FRICKEY, Tancred; LUPAS, Andrei N., 2006), entre este grupo, encontra-se a proteína RuvB-Like1, caracterizada como uma DNA helicase. Devido à importância desta proteína observada em diferentes organismos, como em leveduras (LIM, Chun Ren et al., 2000) e outros protozoários, incluindo *Plasmodium falciparum* (AHMAD, Moaz; TUTEJA, Renu., 2013), uma das finalidades deste trabalho foi caracterizar a proteína RuvB-Like1 em *Leishmania braziliensis*.

Em trabalhos anteriores do laboratório, a *LbrRuvB* foi identificada como um potencial alvo da metiltransferase PRMT5 (LORENZON, Lucas et al, 2022). Portanto, estabelecemos como objetivo analisar o efeito da potencial metilação de arginina promovida pela PRMT5 na estabilidade, interação com outras macromoléculas e localização da *LbrRuvB*.

Para avaliar a conservação da *LbrRuvB*, foi realizado o alinhamento da proteína com seus ortólogos em humanos, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*. Apesar de serem observadas pequenas diferenças em relação ao comprimento da cadeia polipeptídica (Figura 6), e algumas divergências na estrutura sobreposta da proteína de humanos e *L. braziliensis*, particularmente na porção N-terminal desta (Figura 7B), o alinhamento demonstrou alta conservação, com a manutenção dos *motifs* que caracterizam a proteína como helicase AAA+ (ABRAHÃO, Josielle et al , 2021), o que sugere que deva haver funções conservadas em *L. braziliensis*.

A partir da técnica de edição gênica CRISPR/Cas9 (BENEKE, Tom et al., 2017), foi possível realizar a inserção da etiqueta *myc* no gene codificador da proteína *LbrRuvB*, possibilitando o uso de anticorpo comercial em diversos ensaios realizados no estudo, fazendo com que o tempo e custo do projeto fosse otimizado, já que não foi preciso gerar anticorpos específicos para a proteína de interesse. Além disso, também foi possível obter parasitos nocaute para o gene codificador da proteína *LbrPRMT5*. Com isso, os ensaios do projeto foram

realizados a partir destes dois backgrounds genéticos distintos (*mycRuvB<sup>+/+</sup>* e *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*).

Foi feita uma análise da curva de crescimento dos transfetantes *mycRuvB<sup>+/+</sup>* para observar se a etiqueta *myc* inserida na porção N-terminal do gene codificante da *LbrRuvB* afetava o crescimento dos parasitos. Não foi observada diferença estatística entre o crescimento de promastigotas das células parentais e dos transfetantes *in vitro*.

Para analisar os níveis de expressão da proteína *LbrRuvB* nos três principais estágios do ciclo de vida do parasito foram realizados ensaios de *western blotting*. A partir deste ensaio, foi possível concluir que, a expressão relativa de *LbrRuvB* é semelhante entre as três formas analisadas. Entretanto, quando o nível de transcrito de *LbrRuvB* foi analisado por RT-qPCR, observou-se que a forma amastigota possuí níveis comparativamente maiores de transcrito, do que o observado nas formas promastigotas procíclica e metacíclica. A não correlação entre níveis de transcrito e de proteína é um achado comum em *Leishmania*, considerando que a regulação da expressão gênica ocorre majoritariamente em nível pós-transcricional (FERNÁNDEZ-MOYA, Sandra M.; ESTÉVEZ, Antonio M., 2010; CORTAZZO DA SILVA, Leonardo; AOKI, Juliana Ide; FLOETER-WINTER, Lucile Maria., 2022).

Esses resultados motivaram a investigação da estabilidade da proteína no estágio promastigotas procíclicos. Para isso, foi realizado o ensaio de decaimento da proteína em estudo utilizando Cicloheximida (FERREIRA, Tiago R. et al., 2020), empregado para estimar a estabilidade da proteína (ensaios conduzidos em triplicata). Com este ensaio, foi possível estipular a meia vida da proteína nos dois backgrounds genéticos (*mycRuvB<sup>+/+</sup>* e *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*), demonstrando que o decaimento da proteína *LbrRuvB-Like1* da linhagem PRMT5 no caute é menor em comparação com a linhagem etiquetada (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*).

Tendo em vista as funções da proteína RuvB-Like1 descritas na literatura (GORYNIA Sabine et al., 2011), particularmente referentes ao metabolismo de DNA, foi hipotetizado que tal proteína teria preferencialmente localização nuclear, entretanto, o ensaio de imunofluorescência revelou que a proteína também possui localização citoplasmática em ambos os backgrounds genéticos analisados (Figura 19). Uma possível explicação para a localização da *LbrRuvB*

é a participação de algumas helicases nos processos metabólicos envolvendo RNA, o que inclui transcrição, *splicing*, tradução e biogênese do ribossomo (TUTEJA, Renu., 2010). Portanto, embora esta proteína seja considerada predominantemente nuclear, ela também pode ser encontrada no citoplasma, apesar de sua função nesta localização subcelular não estar bem esclarecida (IZUMI, Natsuko et al., 2010).

A análise do ensaio de imunoprecipitação demonstrou que a *LbrRuvB* interagiu com proteínas que possuem funções que corroboram com o papel da RuvB-Like1 descrito na literatura, como por exemplo, reparo de fita dupla (MORRISON, Ashby J.; SHEN, Xuetong., 2009), funções relacionadas ao ciclo celular (MAGALSKA, Adriana et al., 2014; LIM, Chun Ren et al., 2000) e controle de transcrição (GALLANT, Peter., 2007). Esta gama de funções também condiz com a classificação da proteína, que pertence à superfamília das ATPases Associadas a diversas Atividades celulares (AAA+). Além disso, a interação da *LbrRuvB* com proteínas relacionadas a funções de transporte (nucleocitoplasmático e intracelular) e processamento de RNA, por exemplo, ajudam a esclarecer sua localização citoplasmática.

A IP também foi capaz de identificar a *LbrPRMT5*, demonstrando mais uma vez, a potencial interação entre ambas. Com isso, reafirmando a hipótese de que a *LbrRuvB* é um potencial alvo de metilação promovida pela *LbrPRMT5*, apesar de não terem sido observados diferenças relevantes no nível de expressão e localização subcelular da proteína, nos padrões analisados, entre os dois backgrounds genéticos.

A ausência de diferenças estatísticas entre os dois backgrounds genéticos analisados através deste estudo, em relação a localização e expressão de RuvB-like1 ao longo do ciclo biológico de *L. braziliensis*, pode estar relacionada com a plasticidade genômica dos tripanossomatídeos, possibilitando rápidas adaptações a condições desfavoráveis (BERNÁ, Luisa et al., 2019), de forma que a falta de metilação promovida por uma PRMT, neste caso, a arginina metiltransferase 5, pode estar sendo suprida por outras metiltransferases, apesar de apenas a PRMT5 ser classificada como uma PRMT do tipo II, capaz de promover sDMA (PASTERNACK, Deborah A. et al., 2007). Além disso, a geração de uma linhagem no caute para a enzima (*LbrRuvB*) ajudará a

esclarecer a importância de sua participação em diferentes processos metabólicos.

## 6. CONCLUSÃO

O trabalho teve como objetivo caracterizar a proteína RuvB-like1 de *L.braziliensis* e a importância da potencial metilação de arginina em sua estabilidade, localização subcelular e interação com outras macromoléculas. A partir do alinhamento, foi possível identificar que a *LbRuvB* possui alto nível de conservação na sequência de aminoácidos, comparativamente a seus ortólogos, principalmente em seus *motifs* (Walker A, Walker B, Sensor I e Sensor II) característicos da família. Apesar disto, a predição computacional de sua estrutura e a sobreposição com a proteína RuvB-Like1 humana revelaram diferenças estruturais que podem refletir em algumas diferenças funcionais. Este aspecto deverá ser analisado no futuro.

Ademais, neste trabalho foi possível editar o genoma do parasito *L.braziliensis*, gerando duas linhagens genéticas distintas, entre elas, transfectantes contendo a etiqueta *myc* nos alelos codificantes da proteína RuvB-Like1 (*mycRuvB<sup>+/+</sup>*) e transfectantes que, além da etiqueta, eram parasitos nocaute para PRMT5 (*mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO*). Com estas duas linhagens, foi possível identificar que não existe diferença no nível de expressão da proteína *LbRuvB* ao longo diferentes formas do ciclo de vida do parasito, apesar de existir diferenças no nível relativo de transcrito entre as três formas analisadas. Além disso, o ensaio de estabilidade demonstrou que o decaimento da *LbRuvB* na linhagem *mycRuvB<sup>+/+</sup>PRMT5KO* é ligeiramente menor do que a linhagem *mycRuvB<sup>+/+</sup>*. Outro achado foi a localização subcelular da proteína que, além de estar presente no núcleo, também está localizada no citoplasma. Por fim, a análise de imunoprecipitação reafirmou a interação existente entre a *LbPRMT5* e *LbRuvB*, além de possibilitar a identificação da função de diversas outras proteínas que interagem com *LbRuvB*. Em conjunto, os dados ajudaram a elucidar algumas das características da proteína alvo do estudo, na presença e ausência da proteína arginina metiltransferase 5 em *L. braziliensis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MURRAY, HENRY W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis—authors' reply. **The Lancet**, v. 393, n. 10174, p. 872-873, 2019.

Leishmaniose. Organização Mundial da Saúde, 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 17 de agosto de 2022.

Leishmaniose Visceral (calazar). Médicos Sem Fronteiras, 2022. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/leishmaniose/>> Acesso em: 17 de agosto de 2022.

ORREGO, LINA M. et al. Heme synthesis through the life cycle of the heme auxotrophic parasite *Leishmania major*. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13367-13385, 2019.

REITHINGER, RICHARD et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

CLAYTON, Christine. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open biology**, v. 9, n. 6, p. 190072, 2019.

BENZ, Corinna et al. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125-134, 2005.

REQUENA, Jose M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 16, n. 6, p. 2069-2085, 2011.

FERREIRA, Tiago R. et al. PRMT7 regulates RNA-binding capacity and protein stability in *Leishmania* parasites. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 10, p. 5511-5526, 2020.

BEDFORD, Mark T.; CLARKE, Steven G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. **Molecular cell**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2009.

DOCAMPO, Roberto et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays in biochemistry**, v. 51, p. 31-46, 2011.

LORENZON, Lucas et al. Functional study of Leishmania braziliensis protein arginine methyltransferases (PRMTs) reveals that PRMT1 and PRMT5 are required for macrophage infection. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 516-532, 2022.

LIANG, XUE-HAI et al. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LIM, Chun Ren et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22409-22417, 2000.

BROSH, Robert M. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 542-558, 2013.

MÉZARD, Christine et al. *Escherichia coli* RuvBL268S: a mutant RuvB protein that exhibits wild-type activities in vitro but confers a UV-sensitive rv phenotype in vivo. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 5, p. 1275-1282, 1999.

LIMUDOMPORN, Paviga et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* ATP-dependent DNA helicase RuvB3. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2016.

NEUWALD, Andrew F. et al. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome research**, v. 9, n. 1, p. 27-43, 1999.

GORYNIA, Sabine et al. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine—the RuvBL1/RuvBL2 complex. **Journal of structural biology**, v. 176, n. 3, p. 279-291, 2011.

MILLER, Justin M.; ENEMARK, Eric J. Fundamental characteristics of AAA+ protein family structure and function. **Archaea**, v. 2016, 2016.

WANG, Min; XU, Rui-Ming; THOMPSON, Paul R. Substrate specificity, processivity, and kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 5. **Biochemistry**, v. 52, n. 32, p. 5430-5440, 2013.

JARROLD, James; DAVIES, Clare C. PRMTs and arginine methylation: cancer's best-kept secret?. **Trends in molecular medicine**, v. 25, n. 11, p. 993-1009, 2019.

GUCCIONE, Ernesto; RICHARD, Stéphane. The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 10, p. 642-657, 2019.

LOUREIRO, Alexandre; DA SILVA, Gabriela Jorge. Crispr-cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 18, 2019.

LONE, Bilal Ahmad et al. CRISPR/Cas9 system: a bacterial tailor for genomic engineering. **Genetics research international**, v. 2018, 2018.

CHYLINSKI, Krzysztof; LE RHUN, Anaïs; CHARPENTIER, Emmanuelle. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. **RNA biology**, v. 10, n. 5, p. 726-737, 2013.

DELTACHEVA, ELITZA et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602-607, 2011.

XIAO-JIE, Lu et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. **Journal of medical genetics**, v. 52, n. 5, p. 289-296, 2015.

PENG, Duo et al. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02097-14, 2015.

ZHANG, Wen-Wei; MATLASHEWSKI, Greg. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. **MBio**, v. 6, n. 4, p. e00861-15, 2015.

XUE, Chaoyou; SASHITAL, Dipali G. Mechanisms of type IE and IF CRISPR-Cas systems in Enterobacteriaceae. **EcoSal plus**, v. 8, n. 2, 2019.

LINO, Christopher A. et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Drug delivery**, v. 25, n. 1, p. 1234-1257, 2018.

ALCOFORADO DINIZ, Juliana et al. Protein methyltransferase 7 deficiency in *Leishmania major* increases neutrophil associated pathology in murine model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009230, 2021.

SPÄTH, Gerald F.; BEVERLEY, Stephen M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 2, p. 97-103, 2001.

DAVARINEJAD, Hossein. Quantifications of western blots with ImageJ. University of York, 2015.

ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W320-W324, 2014.

MATIAS, Pedro M. et al. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38918-38929, 2006.

- SGRO, Jean-Yves. UCSF ChimeraX-I-Overview. In: **Workshop goal**. 2018.
- AMMELBURG, Moritz; FRICKEY, Tancred; LUPAS, Andrei N. Classification of AAA+ proteins. **Journal of structural biology**, v. 156, n. 1, p. 2-11, 2006.
- AHMAD, Moaz; TUTEJA, Renu. Plasmodium falciparum RuvB1 is an active DNA helicase and translocates in the 5'-3' direction. **Gene**, v. 515, n. 1, p. 99-109, 2013.
- ABRAHÃO, Josielle et al. Leishmania major RUVBL1 has a hexameric conformation in solution and, in the presence of RUVBL2, forms a heterodimer with ATPase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 703, p. 108841, 2021.
- BENEKE, Tom et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society open science**, v. 4, n. 5, p. 170095, 2017.
- FERNÁNDEZ-MOYA, Sandra M.; ESTÉVEZ, Antonio M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 1, n. 1, p. 34-46, 2010.
- CORTAZZO DA SILVA, Leonardo; AOKI, Juliana Ide; FLOETER-WINTER, Lucile Maria. Finding Correlations Between mRNA and Protein Levels in Leishmania Development: Is There a Discrepancy?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 678, 2022.
- GORYNIA, Sabine et al. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine—the RuvBL1/RuvBL2 complex. **Journal of structural biology**, v. 176, n. 3, p. 279-291, 2011.
- TUTEJA, Renu. Genome wide identification of Plasmodium falciparum helicases: a comparison with human host. **Cell cycle**, v. 9, n. 1, p. 104-120, 2010.
- IZUMI, Natsuko et al. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. **Science signaling**, v. 3, n. 116, p. ra27-ra27, 2010.
- MORRISON, Ashby J.; SHEN, Xuetong. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 6, p. 373-384, 2009.
- MAGALSKA, Adriana et al. RuvB-like ATPases function in chromatin decondensation at the end of mitosis. **Developmental cell**, v. 31, n. 3, p. 305-318, 2014.
- GALLANT, Peter. Control of transcription by Pontin and Reptin. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 4, p. 187-192, 2007.

BERNÁ, Luisa et al. Biology of the Trypanosoma cruzi Genome. **Biology of Trypanosoma cruzi**, 2019.

PASTERNACK, Deborah A. et al. Evolutionarily divergent type II protein arginine methyltransferase in Trypanosoma brucei. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 9, p. 1665-1681, 2007.