

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Gabriela de Assis Burle Caldas**

**Edição de genoma em *Trypanosoma*  
utilizando nucleases dedo de zinco  
e o sistema CRISPR/Cas9**

**Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira**

**Co-orientador: Wanderson Duarte da Rocha**

**Colaborador: Isabel Roditi**

**Belo Horizonte – MG**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Gabriela de Assis Burle Caldas**

**Edição de genoma em *Trypanosoma*  
utilizando nucleases dedo de zinco  
e o sistema CRISPR/Cas9**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências: Biologia Molecular.

**Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira**

**Co-orientador: Wanderson Duarte da Rocha**

**Colaborador: Isabel Roditi**

**Belo Horizonte – MG  
2016**

Ao meu marido Felipe,  
pelo amor, paciência e compreensão.  
Aos meus pais Sérgio e Vânia,  
pelo incentivo e carinho.  
Ao meu filho Yan,  
pela inspiração.  
Em memória do grande amigo e ex  
colega de trabalho Juli.

“The important thing is not to  
stop questioning. Curiosity  
has its own reason for  
existing.”  
Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me trazer luz nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu marido, pela compreensão, paciência, incentivo, amizade, conforto nos momentos que todos os experimentos davam errado, mesmo sem entender direito o meu projeto. Agradeço meu marido principalmente pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis do doutorado, nos quais eu achava que nada iria dar certo.

Aos meu pais que sempre me incentivaram a estudar e me ajudaram quando eu tive meu filho muito nova a continuar a estudar sempre.

Ao meu filho Yan, por me inspirar a continuar sempre no caminho, mesmo que ele seja difícil.

Ao meu irmão, minha Tia Vanda e toda a família pela torcida e incentivo.

À Professora Santuza, por ter me aceitado em seu laboratório, a long time ago. Por me ensinar como é que se faz pesquisa, pela sua exigência com a qualidade, por me mostrar que resultados negativos também são importantes, e por todas as oportunidades que me foram dadas por ela.

Ao meu co-orientador Professor Wanderson Duarte da Rocha, pela colaboração com o projeto, por toda ajuda nas construções de plasmídeos, que é sua especialidade, e pelas críticas sempre construtivas.

À Professora Isabel Roditi da Universidade de Berna na Suíça, pela coloboração no trabalho e por ter me aceitado em seu laboratório, me dando a oportunidade de vivenciar como é trabalhar com pesquisa em outro país.

À aluna de pós doutorado Gabriela Burkard, que me ajudou bastante durante meu período de doutorado sanduíche e deu contribuições importantes para o projeto.

Ao Professor João Trindade que sempre esteve pronto a ajudar com dicas, sugestões, plasmídeos e reagentes.

Ao Prof. Greg Kitten pelo auxílio com os experimentos de microscopia.

À doutora Viviane Grazielle, pela construção de alguns dos plasmídeos utilizados neste projeto, pela amizade, companhia, pelo carinho, pela preocupação, pela compreensão e por sempre estar disposta a me ajudar.

À aluna de pós doutorado Mariana Santos Cardoso pela ajuda nas análises de citometria de fluxo, por sempre, sempre, sempre estar disposta a

ajudar mesmo tendo mil outras coisas para fazer, pelos conselhos e pela amizade.

À aluna de iniciação científica Melissa Soares, por toda ajuda no desenvolvimento do projeto.

À Fernanda Bastos, secretária do laboratório, pela compra de materias e reagentes, ajuda na organização do laboratório e também pelo carinho e amizade.

À aluna de iniciação científica ThaisTavares, que está sempre disposta a ajudar, seja nos experimentos ou na organização do laboratório.

Aos amigos do laboratório, Bruna, Nailma, Rafael, Edson, Carlos Taís, Rondon, pela convivência, pela amizade, pela ajuda.

À Professora Patiu por sempre estar disposta a ajudar e por abrir as portas de seu laboratório.

Aos ex alunos da Professora Patiu: Natália, Jarina, Bah, Nina, Luciana, pelos momentos vividos juntos, pelos almoços, pela amizade.

Ao Elimar pela ajuda, amizade, apoio e por todos os ensinamentos de como cuidar bem dos equipamentos do laboratório.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

In memoriam do grande e queridíssimo amigo e ex colega de trabalho Juliano (Juli), que estava sempre disposto a ajudar em qualquer situação, tanto em situações de trabalho, como os da vida pessoal. Seu carinho, companhia, alegria e AMIZADE, foram muito importantes em todos esses anos que convivemos juntos. SAUDADES SEM FIM.....

## Sumário

Lista de figuras .....	vii
Lista de tabelas .....	ix
Lista de abreviaturas .....	x
Resumo .....	xii
Abstract .....	xv
1. Introdução .....	1
1.1 Os protozoários <i>Trypanossoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> e as doenças por eles transmitidas .....	1
1.2 Estudos de genoma e processamento do RNA mensageiro em tripanosomatídeos.....	5
1.3 Vetores e técnicas de manipulação genética utilizados para o <i>T. cruzi</i> e o <i>T. brucei</i> .....	7
1.4 Novas técnicas para aumentar a eficiência de edição gênica em parasitos: ZFNs e o sistema de CRISPR/Cas9.....	14
2. Objetivo .....	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos .....	28
3. Materiais e Métodos .....	29
3.1 Digestão de DNA e clonagens .....	29
3.2 PCR de colônia e PCR de DNA plasmidial/genômico.....	29
3.3 Transformação de células XL1 Blue e obtenção de DNA plasmidial .....	32
3.4 Cultivo do <i>T. cruzi</i> e curva de crescimento .....	32
3.5 Transfecção e clonagem do <i>T. cruzi</i> .....	33
3.6 Transfecção e clonagem do <i>T. brucei</i> .....	35
3.7 Indução da expressão de Rluc e ensaio da atividade de luciferase.....	35
3.8 Indução da expressão das ZFNs e análise da eficiência de transfecção no <i>T. brucei</i> .....	36
3.9 Análise da expressão de proteínas por <i>western blot</i> .....	36
3.10 Extração de RNA total e análise por <i>northern blot</i> .....	38
3.11 Eletroforese de campo pulsado (PFGE) e <i>Southern blot</i> .....	39
3.12 Análise por citometria de fluxo .....	40
3.13 Análise dos parasitos por microscopia de luz e de fluorescência .....	40

4. Resultados .....	41
4.1 Otimização de protocolos de transfecção utilizando o <i>nucleofector</i> e expressão regulada por tetraciclina .....	41
4.2 Edição do genoma do <i>T. cruzi</i> utilizando ZFNs.....	54
4.2.1 Geração de linhagem de <i>T. cruzi</i> expressando GFP constitutivamente .....	54
4.2.2 Construção do plasmídeo para expressão de um par de ZFNs em <i>T. cruzi</i> .....	56
4.2.3 Determinação do fenótipo dos parasitos expressando ZFNs que tem o gene <i>egfp</i> como alvo.....	59
4.2.4 Edição do genoma do <i>T. brucei</i> utilizando ZFNs que possuem <i>egfp</i> como alvo .....	68
4.2.5 Edição do gene de <i>gp72</i> de <i>T. cruzi</i> utilizando ZFNs.....	77
4.3 Edição do genoma do <i>T. cruzi</i> utilizando o sistema de CRISPR/Cas9 ...	86
4.3.1 Expressão de Cas9 de forma constitutiva.....	86
4.3.2 Detecção do fenótipo dos parasitos transfectados com sgRNA que tem <i>gp72</i> como alvo .....	90
5. Discussão.....	93
6. Referências Bibliográficas .....	109
7. Anexo .....	115
7.1 Anexo I.....	115
7.2 Anexo II.....	116



## Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	2
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i> -----	4
Figura 3: Esquema do plasmídeo pROCKGFPNeo e sua integração no locus de $\alpha/\beta$ tubulina-----	9
Figura 4: Estratégia para expressão de proteínas regulada por tetraciclina em <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> -----	12
Figura 5: Esquema da estrutura das ZFNs e sua ligação na dupla fita do DNA-----	17
Figura 6: Esquema do sistema de CRISPR/Cas9 do tipo II de bactéria-----	22
Figura 7. Plasmídeo pLEW13-----	45
Figura 8: <i>Northern blot</i> para detectação da expressão da T7 RNA polimerase e repressor da tetraciclina-----	48
Figura 9: Esquema do plasmídeo de expressão regulada por tetraciclina pTcINDEX-----	52
Figura 10. Formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> expressando eGFP constitutivamente-----	55
Figura 11: Construção dos plasmídeos de expressão constitutiva contendo o par de ZFNs que tem <i>egfp</i> ou <i>gp72</i> como alvo-----	57
Figura 12: Análise por citometria de fluxo dos parasitos transfectados de forma transiente com o par de ZFNs <sup>eGFP</sup> e um plasmídeo contendo sequências para recombinar com <i>egfp</i> -----	61
Figura 13: Alinhamento das sequências de DNA referentes às regiões codificadoras da ZFN1 <sup>eGFP</sup> e ZFN2 <sup>eGFP</sup> -----	64
Figura 14: Análise da expressão das ZFNs <sup>eGFP</sup> por <i>western</i> e <i>northern blot</i> -----	66
Figura 15: Análise dos parasitos transfectados com o par de ZFNs <sup>eGFP</sup> por PFGE e <i>Southern blot</i> -----	67
Figura 16: Análise da expressão das ZFNs <sup>eGFP</sup> no <i>T. brucei</i> por <i>western blot</i> --	70
Figura 17: Expressão das ZFNs <sup>eGFP</sup> regulada por tetraciclina no <i>T. brucei</i> -----	73
Figura 18: Curva de crescimento de formas sanguíneas do <i>T. brucei</i> transfectados com o par de ZFNs <sup>eGFP</sup> integrado na região dos minicromossomos-----	76
Figura 19: Capacidade de clivagem das ZFNs <sup>eGFP</sup> medida por meio do ensaio repórter de levedura de MEL-1-----	79

Figura 20: Análise da expressão das ZFNs que tem o gene <i>gp72</i> como alvo----	83
Figura 21: Obtenção de parasitos nocautes para <i>gp72</i> utilizando as ZFNs -----	84
Figura 22: Análise da expressão e localização da proteína Cas9 nuclelease-----	88
Figura 23: Curva de crescimento dos parasitos expressando Cas9 nuclelease----	89
Figura 24: Análise por microscopia de fluorescência dos parasitos expressando Cas9 nuclelease transfectados com sgRNA que tem o gene <i>gp72</i> como alvo -----	92

## Lista de tabelas

Tabela I: Lista de iniciadores-----	30
Tabela II: Comparação da eficiência de transfecção entre o <i>nucleofector</i> e o sistema convencional de eletroporação-----	43
Tabela III: Ensaio da atividade de Rluc-----	53
Tabela IV: Ensaio da atividade de Rluc com clones-----	53

## **Lista de abreviaturas**

$\beta$ -GalGT -  $\beta$ -galactofuranosil glicosiltransferase

CRISPR/Cas9 - *clustered regularly interspaced short palindromic repeats Cas9 associated*)

CRISPRi – CRISPR *inteference*

crRNA - CRISPR RNA

DiCRE recombinase – CRE recombinase dimerizável

Domínio DD - domínio destabilizador de diidrofolato redutase

DSB – *double strand break* (quebra na dupla fita)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoadsorção enzimática)

*eyfp* - *enhanced yellow fluorescent protein*

FLuc – luciferase de vagalume

gDNA – DNA genômico

HA – hemaglutinina

IR – *intergenic region* - região intergênica

mRFP – *monomeric red fluorescent protein* - proteína vermelha fluorescente monomérica

MMEJ - *Microhomology-mediated End Joining*

NHEJ - *Non Homologous End Joining*

PAM - *protospacer adjacent motif*

PARP – procoquina

pre-crRNA - pre-CRISPR RNA

PFGE - *pulsed field gel electrophoresis* – eletroforese de campo pulsado

PFR - *paraflagellar rod*

RFP - *red fluorescent protein* - proteína vermelha fluorescente

Rluc – luciferase de renilla

*rRNA* – RNA ribossômico

sgRNA – *single guide* RNA

snRNA – *small nuclear* RNA

SL – *splice leader*

TALE - *Transcription activator-like effector*

TALEN - *Transcription activator-like effector nucleases*

T7 RNA pol – T7 RNA polimerase

tracrRNA - *trans- activating* crRNA

UTR - *untranslated region* - região não traduzida

ZF – zinc finger – dedo de zinco

ZFPs – *zinc finger proteins* – proteínas dedo de zinco

ZFNs – *zinc finger nucleases* – nucleases dedo de zinco

## Resumo

A manipulação genética em tripanosomatídeos é uma ferramenta essencial para estudo desses organismos, muitos deles, agentes causadores de importantes doenças humanas e veterinárias. A introdução de DNA exógeno no genoma das células ou o nocaute de um gene requer um evento de quebra na dupla fita (do inglês, *double strand break*, ou DSB) e reparo dessa DSB por recombinação homóloga (HR) ou por outros mecanismos. Duas metodologias descritas recentemente em outros organismos foram testadas com objetivo de aumentar a eficiência de manipulação genética em *T. cruzi* e em *T. brucei*: a expressão de nucleases dedo de zinco (ZFNs) e o sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats Cas9 associated*). ZFNs são proteínas sintéticas que possuem a capacidade de se ligar de forma específica a uma sequência de DNA e causar DSB em uma região pré-definida no genoma. CRISPR/Cas9 faz parte do sistema de defesa de bactérias e *archae* contra invasão por vírus e plasmídeos envolvendo uma nuclease (Cas9) capaz de clivar uma sequência específica na presença de um pequeno RNA (do inglês, *single guide RNA*, ou sgRNA) que reconhece a sequência alvo por complementaridade. Nesse trabalho foi também testado o sistema de transfecção denominado *nucleofection* que resultou em uma eficiência 20 vezes maior em comparação com o protocolo de eletroporação convencional. Para testar a utilização de ZFNs, formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas sanguíneas de *T. brucei* expressando *enhanced GFP* (eGFP) foram transfectadas com plasmídeos codificando o par de ZFNs desenvolvidas para reconhecer e clivar uma sequência de *egfp*. Como não foi observada a perda da fluorescência verde nos parasitos e como também não foi possível detectar

a expressão das ZFNs por *western blot* ou *northern blot*, concluímos que a expressão constitutiva dessas ZFNs direcionadas para sequências de *egfp* poderia ser tóxica para os parasitos. A expressão de ZFNs sob o controle da tetraciclina em *T. brucei* confirmou que essa proteína, apesar de afetar o crescimento, foi capaz de aumentar a eficiência de transfecção em até 15 vezes. Como para o *T. cruzi* não há um sistema adequado de expressão regulada por tetraciclina, foram geradas linhagens expressando a T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina, as quais foram testadas após transfecção com um plasmídeo contendo o gene repórter de luciferase de renilla (Rluc) sob o controle do operador da tetraciclina. Entretanto, devido aos baixos níveis de expressão do repressor da tetraciclina, níveis elevados de Rluc foram obtidos mesmo antes da adição de tetraciclina. Ainda com o objetivo de testar as ZFNs, foi selecionado o gene de *gp72* como alvo de um segundo par de ZFNs, pois o nocaute desse gene resulta em um fenótipo facilmente detectável de descolamento do flagelo do corpo do parasito. Diferente das ZFNs que tem *egfp* como alvo, a transfecção de parasitos expressando constitutivamente ZFNs direcionadas para *gp72* com uma sequência contendo o gene de resistência a neomicina flanqueada por sequências de *gp72*, resultou em uma população resistente a G418 na qual 90% das células apresentaram o fenótipo de nocaute de *gp72*. Análises de PCR mostraram a inserção do gene de resistência no locus de *gp72*. Resultados similares foram obtidos com a transfecção de formas epimastigotas expressando constitutivamente Cas9 nuclease. Para testar o nocaute do gene de *gp72* utilizando o sistema de CRISPR/Cas9, essa linhagem foi transfectada com um plasmídeo contendo sequências do sgRNA complementares a *gp72* e

transcritas pelo promotor de rRNA do *T. cruzi*. A análise dos parasitos após transfecção transiente com o plasmideo contendo o sgRNA resultou em uma população na qual aprox. 1% das células apresentaram o fenótipo nocaute de *gp72*. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a utilização de ambos os tipos de nucleases resulta em um aumento expressivo na eficiência dos protocolos para nocaute gênico em *T. cruzi*, o que representa um enorme avanço para os estudos sobre esse parasito.



## Abstract

Genetic manipulation in trypanosomatids is an essential tool to study these organisms, many of them are agents of important human and veterinary diseases. The introduction of exogenous DNA into the genome in any cell or the generation of a gene knockout requires a double strand break event (or DSB) and the repair of this DSB by homologous recombination (HR) or by other mechanisms. Two methods recently described in other organisms were tested in order to increase the efficiency of genetic manipulation in *T. cruzi* and *T. brucei*: the expression of zinc finger nucleases (ZFNs) and the CRISPR/Cas9 system. ZFNs are synthetic proteins having the ability to bind specifically to a DNA sequence and cause a DSB in a pre-defined region in the genome. CRISPR/Cas9 is part of the bacterial and archaea defense system against invasion by viruses and plasmids and requires a nuclease (Cas9) capable of cleaving a specific sequence in the presence of a small RNA (single guide RNA, or sgRNA) that recognizes the sequence targeted by complementarity. In this work we also tested the transfection system called nucleofection, which resulted in a 20 fold higher transfection efficiency compared with the electroporation protocol. To test a pair of ZFNs, epimastigotes of *T. cruzi* and *T. brucei* bloodstream forms expressing enhanced GFP (eGFP) were transfected with a plasmid encoding ZFNs designed to recognize and cleave the sequence of *egfp*. Because no loss in fluorescence and no detectable expression of ZFNs were observed by western or northern blots, we concluded that the constitutive expression of ZFNs directed to *egfp* could be toxic for these parasites. Expression of ZFNs under the control of tetracycline operator in *T. brucei* confirmed that the transient expression of this nuclease protein, although

affecting parasites growth, resulted in increased transfection efficiency by up to 15 times. Since an appropriate system for tetracycline-regulated expression was not available for *T. cruzi*, we generated a cell line expressing T7 RNA polymerase, and the tetracycline repressor, which was tested after transfection with a plasmid containing the renilla luciferase (Rluc) gene under the control of the tetracycline operator. However due to low levels of expression of the tetracycline repressor, high levels of Rluc expression were obtained before the addition of tetracycline. Aimed at testing a second pair of ZFNs, we expressed ZFNs that targets the *gp72* gene, which was chosen because it's knockout results in readily detectable phenotype with the flagellum detached from the parasite's body. Different from the result with ZFNs that targets *egfp*, transfection of epimastigotes constitutively expressing ZFNs that targets *gp72* with a sequence containing the neomycin resistance gene flanked by *gp72* sequences, resulted in G418 resistant population with 90% of cells with the *gp72* knockout. PCR analyses showed that the neomycin resistance gene integrated into the *gp72* locus. Similar results were obtained with the transfection of epimastigotes constitutively expressing Cas9 nuclease. To test the *gp72* gene knockout using the CRISPR/Cas9 system this strain was transiently transfected with a circular plasmid containing *gp72* and sgRNA scaffold sequence transcribed by the *T. cruzi* rRNA promoter. Following transient transfection with a plasmid containing the sgRNA sequence, a population in which approx. 1% of the cells showed the knockout phenotype of *gp72* was obtained. Taken together, our results showed that the use of both nuclease resulted in a significant increase in the efficiency of gene knockout

protocols for *T. cruzi*, thus constituting a valuable new tool for studies with this parasite.

## 1. Introdução

### 1.1 Os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* e as doenças por eles causadas

Os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, agentes causadores da doença de Chagas e da doença do sono, respectivamente, são organismos uniflagelados, pertencentes à ordem Kinetoplastae. Esses protozoários causam patologias consideradas parte do grupo de doenças negligenciadas e afetam principalmente populações pobres e carentes do mundo [1].

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo todo e mais de 25 milhões estão sob risco de contrair essa infecção (WHO). A transmissão ocorre principalmente por insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, no momento do repasto sanguíneo, no entanto, outras formas de transmissão como transfusão de sangue, transplante de órgãos, congênita e ingestão de alimentos contaminados com o inseto vetor ou fezes do inseto infectados com o *T. cruzi* também ocorrem [2,3]. A figura 1 ilustra o ciclo de vida do *T. cruzi*. Primeiramente formas tripomastigotas metacíclicas provenientes das fezes do inseto vetor penetram na pele do hospedeiro mamífero por meio de microlacerações no momento do repasto sanguíneo. Uma vez na corrente sanguínea as formas tripomastigotas possuem a capacidade de invadir uma variedade de células. Dentro da célula, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas que multiplicam por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, estas se diferenciam em formas tripomastigotas intracelulares, que rompem a célula, e podem invadir

novas células e/ou serem ingeridas pelo inseto vetor da doença no momento do repasto sanguíneo. No inseto as formas tripomastigotas migram para o intestino médio e diferenciam em epimastigotas replicativas que após vários ciclos de divisão, se deslocam para o intestino grosso, onde diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que podem ser expelidas nas fezes do inseto durante o respasto sanguíneo, iniciando um novo ciclo da doença [4].

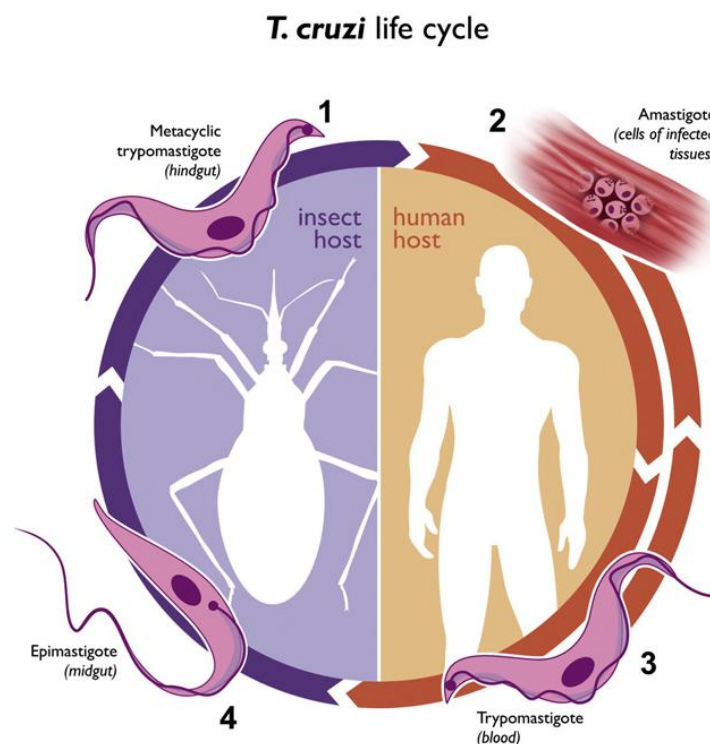


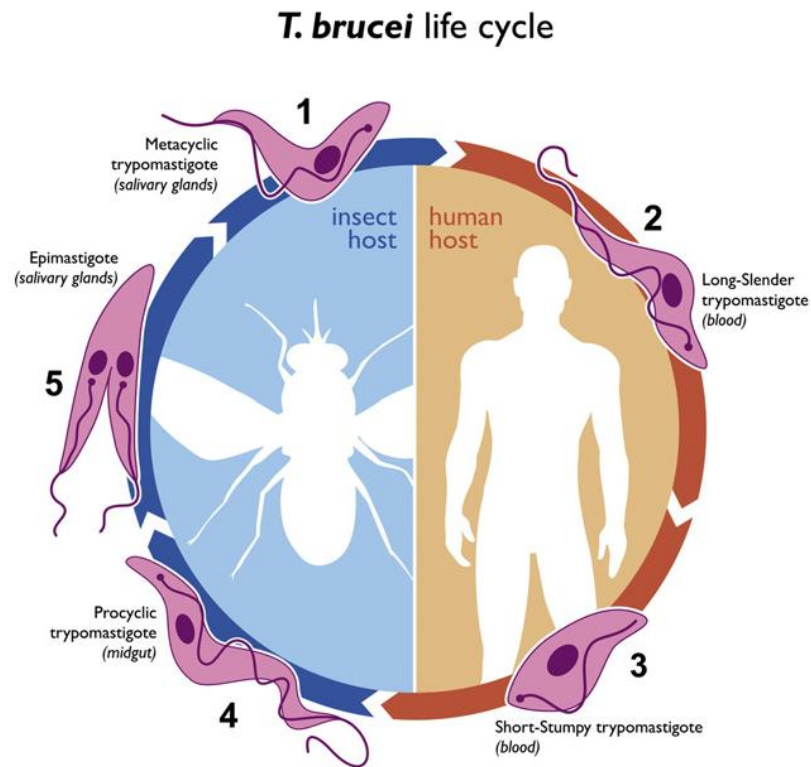
Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto são depositadas na pele do hospedeiro mamífero no momento do respasto sanguíneo (1). Dentro da célula as formas tripomastigotas diferenciam em formas amastigotas replicativas (2), que após vários ciclos de divisão diferenciam em tripomastigotas intracelulares (3). As tripomastigotas intracelulares rompem a célula e são liberadas na corrente sanguínea podendo invadir novas células e/ou serem ingeridas pelo inseto vetor da doença. No inseto as formas tripomastigotas migram para intestino médio e diferenciam em formas epimastigotas replicativas (4), que após migrarem para o intestino grosso diferenciam em formas tripomastigotas

**metacíclicas (1), podendo iniciar um novo ciclo da doença. Retirado de Cuervo *et al*, 2009 [4].**

Cem anos após a descoberta e caracterização da doença por Carlos Chagas, ainda não há um tratamento eficaz para a doença, pois as drogas atualmente utilizadas, além de possuírem muitos efeitos colaterais, tem baixa eficácia na fase crônica [5,6].

O *T. brucei*, agente causador da doença do sono em humanos e da nagana no gado, é transmitido pela picada de moscas do gênero *Glossina*, popularmente conhecidas como moscas tsé-tsé. Apesar de ter sido estimado que a doença do sono houvesse sido praticamente erradicada nos anos 60, na África subsariana, com o relaxamento das práticas de combate ao inseto vetor da doença, devido às constantes guerras civis, um novo surto ocorreu nos anos 90. Atualmente a Organização Mundial de Saúde estima a existência de 50.000 – 70.000 casos da doença na África subsariana [7]. A figura 2 esquematiza o ciclo de vida do *T. brucei* que se inicia com a inoculação de formas tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero pela mosca tsé-tsé no momento da alimentação. Na corrente sanguínea estas formas diferenciam em tripomastigotas alongadas (*long slender*) replicativas que podem migrar também para o fluído cérebro-espinhal. Após vários ciclos de replicação as tripomastigotas delgadas diferenciam em tripomastigotas arredondadas (*short stumpy*) que podem ser ingeridas pela mosca tsé-tsé no momento do repasto sanguíneo. No intestino médio da mosca as tripomastigotas diferenciam em formas procíclicas replicativas, e após a colonização deste órgão migram para as glândulas salivares da mosca. Nas glândulas salivares as formas procíclicas diferenciam em epimastigotas replicativas para em seguida diferenciarem em

trypomastigotas metacíclicas, podendo, desta forma, iniciar um novo ciclo da doença [4].



**Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*** Formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas glândulas salivares da mosca tsé-tsé são inoculadas no hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo (1). Na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero as formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam em formas tripomastigotas alongadas replicativas, podendo também migrar para o fluído cérebro-espinhal (2). Após vários ciclos de replicação as formas tripomastigotas alongadas diferenciam em formas tripomastigotas arredondadas que podem ser ingeridas pela mosca tsé-sté no momento do repasto sanguíneo (3). Na mosca as formas tripomastigotas arredondadas migram para o intestino médio e diferenciam em formas procíclicas replicativas (4). Após a colonização do intestino médio as formas procíclicas migram para as glândulas salivares, e diferenciam em formas epimastigotas replicativas (5) e em seguida em tripomastigotas metacíclicas, podendo iniciar um novo ciclo da doença. Retirado de Cuervo *et al*, 2009 [4].

Vários problemas estão relacionados com os medicamentos utilizados para tratamento da doença do sono, dentre eles podemos citar: são estágios específicos, possuem muitos efeitos colaterais, alguns possuem alta toxicidade devido as altas doses administradas e surgimento de parasitos com resistência natural á alguns medicamentos [8].

## **1.2 Estudos de genoma e processamento do RNA mensageiro em tripanosomatídeos**

Além de sua importância médica, os tripanosomatídeos são organismos que despertam a atenção dos pesquisadores devida a algumas peculiaridades de sua biologia. Dentre essas peculiaridades podemos citar o processo de transcrição gênica. Diferente dos eucariotos, os quais possuem transcrição monocistrônica de genes codificadores de proteínas catalizada principalmente pela enzima RNA polimerase II, a transcrição nos tripanosomatídeos ocorre de forma policistrônica, e alguns genes são transcritos pela RNA polimerase I. Depois de transcritos, os RNA mensageiros (mRNAs) policistrônicos são clivados no núcleo, para produção dos mRNAs monocistrônicos. Associada a essa clivagem, ocorre o processamento destes mRNAs por meio de dois processos: *trans*-splicing e poliadenilação. No processo de *trans*-splicing ocorre a adição de uma sequência de 39 nucleotídeos, denominada *splice leader* (SL) contendo uma guanosina metilada, no 5' do mRNA. No processo de poliadenilação, uma cauda poli A é adicionada à extremidade 3', dando assim origem aos mRNAs monocistrônicos maduros contendo o *cap* e cauda poli-A (para uma revisão, veja Teixeira & DaRocha, 2003) [9]. Esses dois processos não ocorrem de maneira independente. Estudos em diferentes tripanosomatídeos indicam que a adição da cauda poli A é governada pela



posição do sítio acceptor da sequência *SL* do gene logo abaixo. Além disso, foi demonstrado que apenas sequências dinucleotídicas AG localizadas abaixo de motivos ricos em polipirimidinas, são utilizadas como sítio acceptor da sequência *SL* [10,11].

Considerando o impacto na saúde pública causado por estes organismos e as peculiaridades que envolvem sua biologia, o estudo destes organismos para melhor compreensão de seus mecanismos de virulência é crucial para desenvolvimento de medicamentos mais eficazes.

A publicação do sequenciamento completo do genoma do *T. cruzi* e do *T. brucei* em 2005 foi um marco importante para os estudos deste parasito, pois possibilitaram análises de genômica em larga escala bem como análises *in silico* de possíveis alvos para desenvolvimento de novas drogas. Além disso, a publicação do genoma da *Leishmania major* bem como as publicações mais recentes do sequenciamento dos genomas completos de outros tripanosomatídeos proporcionaram análises de genômica comparativa entre esses organismos [12-16]. Por se tratar de uma cepa híbrida, a utilização da cepa de referência CL Brener para sequenciamento do genoma do *T. cruzi* somado ao fato de mais de 50% do conteúdo genômico deste parasito ser composto por sequências repetitivas dificultou a montagem de seus cromossomos. Por esta razão, ao contrário da publicação dos genomas de *L. major* e *T. brucei*, o genoma do *T. cruzi* foi publicado em pequenos pedaços (32.746 *contigs* parcialmente montados em 638 *scaffolds*) ao invés de cromossomos montados. Alguns anos mais tarde Weatherly e colaboradores (2009), utilizando sequências da linhagem parental de CL Brener, mapas de sintenia do *Trityp* e as pontas das sequências de bibliotecas BAC de *T. cruzi*,

foram capazes de montar o genoma do *T. cruzi* em 41 cromossomos, no entanto, muitos *scaffolds* e *contigs* ainda ficaram de fora dessa montagem [17].

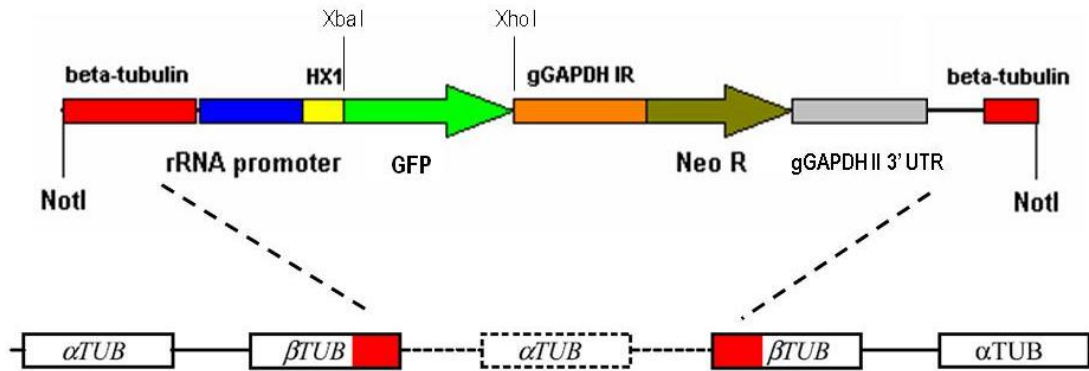
Apesar da dificuldade na montagem do genoma do *T. cruzi*, a publicação do sequenciamento completo de seu genoma alavancou as pesquisas relacionadas a este parasito. Utilizando técnicas de genética reversa foram surgindo muitas publicações descrevendo possíveis funções de proteínas do *T. cruzi* [18], mecanismos de regulação da expressão gênica [19], interações de proteínas do parasito com proteínas do hospedeiro mamífero que estão relacionadas com a invasão deste [20] e possíveis mecanismos que o parasito utiliza para evadir do sistema imune do hospedeiro [21]. No entanto, a falta de técnicas mais robustas e eficazes para manipulação genética deste organismo ainda é um fator limitante.

### **1.3 Vetores e técnicas de manipulação genética utilizados para o *T. cruzi* e o *T. brucei***

Para a expressão de proteínas exógenas nestes organismos é necessário à utilização de plasmídeos que possibilitem o correto processamento dos transcritos. Para *T. cruzi* e também para *T. brucei* dois tipos de transfecção são possíveis: a transfecção estável e a transiente. Na transfecção transiente são utilizados plasmídeos circulares, que são mantidos como episômos na célula, por um curto período, sem a pressão de uma droga. Este tipo de transfecção é instável e o plasmídeo não é mantido por muito tempo no parasito. A transfecção transiente é muito utilizada para análises de localização de proteínas, regulação pós transcricional, entre outros. A eficiência da transfecção transiente é baixa e o fator limitante neste tipo de transfecção é a forma como o plasmídeo é levado para dentro da célula, pois

isso determina o número de células transfectadas e o número de cópias de plasmídeo que estará dentro das células produzindo a proteína de interesse. Diferente da transfecção transiente, na transfecção estável ocorre a seleção de uma população transfectada com antibiótico. Em alguns organismos, como por exemplo *Leishmania*, na presença de um antibiótico de seleção, plasmídeos de expressão episossomal podem ser também estavelmente mantidos no parasito. Um fator limitante para a integração do plasmídeo no genoma do parasito na transfecção estável é a presença de uma DSB no DNA do parasito, no local onde o plasmídeo irá integrar por HR [22].

O plasmídeo pTEX, faz parte da primeira geração de plasmídeos utilizados para expressão gênica em *T. cruzi*. Neste sistema de expressão, postula-se que os plasmídeos são mantidos como episossomos nos parasitos [23]. O desenvolvimento do plasmídeo pTRES após a caracterização do promotor ribossômico e de um sinal para adição da sequência *SL* no mRNA nascente, derivado da sequência intergênica da proteína TcP2 $\beta$ , facilitou a expressão de genes exógenos no *T. cruzi* [24-26]. Em 2004, DaRocha e colaboradores, testaram diferentes 3' e 5' UTRs (*untranslated region* - região não traduzida) para processamento do mRNA, gerando um novo um vetor denominado pROCK. Este vetor possui um fragmento da sequência codificadora do gene de  $\beta$ -tubulina, que permite a integração do plasmídeo no *cluster* de alfa-beta tubulina presente no genoma do parasito por recombinação homóloga (figura 3) [27].



**Figura 3. Esquema do plasmídeo pROCKGFPNeo e sua integração no locus de  $\alpha/\beta$ -tubulina.** O plasmídeo possui parte da sequência codificadora do gene de  $\beta$ -tubulina, o que permite sua integração no genoma do parasito. A sequência HXI é responsável pela adição da sequência *SL*, no gene a ser expresso. A sequência intergênica (IR) de *gapdh* é responsável pela adição da cauda poli A, no gene a ser expresso e a sequência *SL* no gene de resistência à neomicina. Por último a sequência 3' UTR de *gapdh* é responsável pela adição da cauda poli A no gene de resistência a neomicina. O gene da proteína de interesse a ser expressa, pode ser facilmente trocado utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*. Adaptado de Araújo *et al*, 2011 [19].

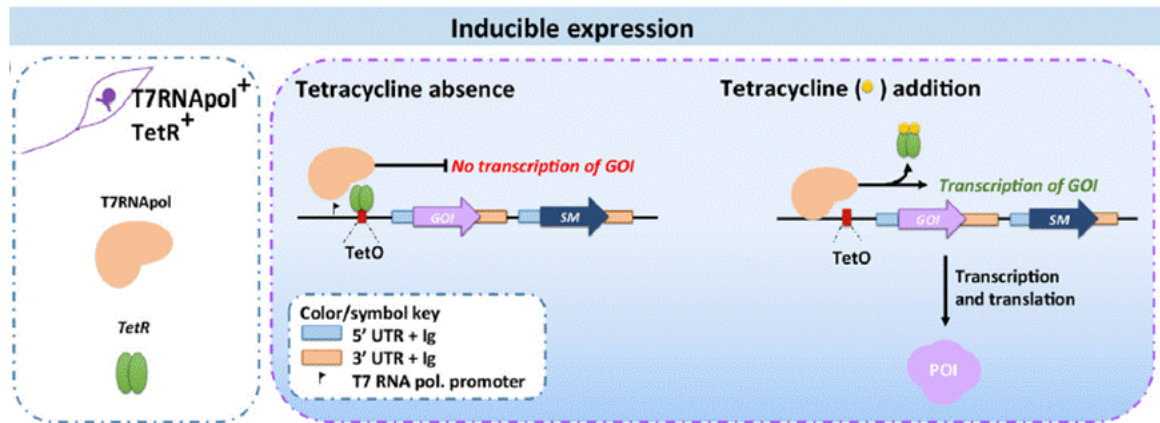
Muitos esforços já foram feitos no sentido de melhorar a eficiência de transfecção no *T. cruzi*, no entanto, a baixa eficiência de recombinação, continua sendo uma limitação para manipulação genética neste organismo. Curto e colaboradores (2014), desenvolveram um sistema de expressão em *T. cruzi*, utilizando cromossomos artificiais [28]. Eles criaram um plasmídeo contendo em sua extremidade sequências teloméricas e subteloméricas do *T. cruzi*, que é mantido de forma linear no parasito. Embora tenha sido demonstrado que esse plasmídeo é mantido por até 60 gerações no parasito sem a pressão de uma droga, a eficiência de transfecção conseguida não foi melhor em relação aos plasmídeos que já são utilizados.

Além das dificuldades relacionadas á eficiência de recombinação, outra limitação encontrada no processo de transfecção deste parasito é o tempo de seleção de clones. Para obtenção de clones é preciso primeiro a seleção da população, que leva em torno de um mês. Em seguida, clones podem ser gerados por plaqueamento dos parasitos em placas ágar- sangue, ou por meio de diluição limitante e este processo também leva em torno de um mês [29,30]. Em contraste, no *T. brucei* é possível gerar clones logo após a transfecção por diluição limitante. Além disso, a população de clones é obtida apenas duas semanas após a transfecção. [31,32]. Essa diferença pode estar relacionada com uma maior taxa de integração de plasmídeos no genoma do *T. brucei* em relação ao *T. cruzi*, devido a uma maior eficiência de HR.

Vários plasmídeos estão disponíveis para a manipulação genética em *T. brucei*. Para eficiente expressão da proteína de interesse são utilizados plasmídeos com o promotor do gene de prociclina (PARP) ou do promotor de RNA ribossômico. Para correto processamento do mRNA, são utilizadas sequências *upstream* e *downstream* de genes com expressão constitutiva, como aldolase e actina [33]. A transfecção de formas procíclicas do *T. brucei* já está bem estabelecida, podendo alcançar eficiências de  $10^{-3} - 10^{-6}$  [34]. No entanto, a transfecção de formas sanguíneas ainda possui algumas limitações. Um dos problemas está relacionado com a alta mortalidade dos parasitos após a transfecção. Outros parâmetros e tampões de eletroporação foram testados para transfecção de formas sanguíneas, todavia, a eficiência de transfecção obtida até então, era muito baixa, podendo atingir  $10^{-7} - 10^{-8}$  (o que significa 1 transformante em  $10^7 - 10^8$  células) [31]. Em 2002, Hara e colaboradores conseguiram um aumento de 8.5 vezes na eficiência de transfecção de formas

sanguíneas, utilizando o método de bombardeamento de partículas. Apesar de esse ter sido um aumento significativo, esta técnica, além de laboriosa, exige instrumentação especial, por essa razão, a eletroporação continua sendo o método de transfecção utilizado [35]. Utilizando a tecnologia do *nucleofector*, Burkard e colaboradores (2007), conseguiram um aumento na eficiência de transfecção de formas sanguíneas de 1000 vezes, em relação aos métodos de eletroporação convencionais, atingindo eficiências de  $10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-5}$  [32]. A tecnologia de *nucleofection* é um sistema de transfecção não viral, baseado em uma combinação de parâmetros elétricos associados a tampões célula-específicos (<http://www.amaxa.com/technology.html>).

Para o *T. brucei* a expressão de proteínas de forma regulada é amplamente utilizada, pois este organismo possui um sistema já bem estabelecido de expressão de proteínas regulado por tetraciclina [36]. No sistema de expressão regulado por tetraciclina, como mostra a figura 4, o gene de interesse é inserido em um vetor de expressão logo abaixo do operador da tetraciclina sob o comando do promotor da T7 RNA polimerase. Esse vetor é introduzido em uma célula que expressa o gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 e a proteína repressora de tetraciclina. Na ausência da tetraciclina o repressor encontra-se ligado ao operador, impedindo a transcrição do gene pela T7 RNA pol. Quando pequenas quantidades de tetraciclina são adicionadas, esta se liga ao repressor, mudando sua conformação e liberando-a do operador, permitindo assim a transcrição do gene pela T7 RNA pol. Sistemas de expressão de proteínas regulados por tetraciclina para *T. cruzi* mostraram-se falhos, pois apresentam níveis altos de expressão da proteína de interesse antes da adição da tetraciclina [37-39].



**Figura 4. Estratégia para expressão de proteínas regulada por tetraciclina em *T. cruzi* e *T. brucei*.** Parasitos constitutivamente expressando a T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina são transfectados com um plasmídeo contendo o gene de interesse (GOI) sob o controle do operador da tetraciclina e o promotor da T7 RNA pol. Na ausência de tetraciclina o repressor se encontra ligado ao operador, impedindo a transcrição pela T7 RNA pol. Quando a tetraciclina é adicionada ao meio, ela se liga ao repressor provocando uma mudança em sua conformação e subsequente liberação do promotor, permitindo a transcrição do GOI pela T7 RNA pol. Retirado de Burle-Caldas *et al*, 2015 [40].

Recentemente, Ma e colaboradores (2015), desenvolveram um sistema de expressão em *T. cruzi* usando o domínio destabilizador de diidrofolato redutase (domínio DD), que pode ser estabilizado com o reagente TMP-lactato [41]. Eles construíram quatro versões diferentes do plasmídeo pTREX contendo os genes repórteres *gfp* ou o gene que codifica a *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) e as toxinas alpha toxina e cecropina A, todas contendo o domínio DD em sua porção N-terminal. Após a transfecção de parasitos com estes plasmídeos, eles observaram que o domínio DD era capaz

de mediar a expressão regulada de GFP e da alpha toxina, visto que essas proteínas foram detectadas apenas após a incubação dos parasitos com TMP-lactato. No entanto, o mesmo não foi observado para a proteína EYFP e para a cecropina A. Após a incubação dos parasitos transfectados com o pTREX-EYFP-DDD com TMP-lactato, não foi observada a expressão dessa proteína. Em contraste as formas epimastigotas transfectadas com o pTREX-CecropinaA-DDD, apresentaram uma redução em seu crescimento, indicando que o domínio DD não estava sendo capaz de desestabilizar essa proteína. Além disso, a incubação desses parasitos com TMP-lactato resultou em níveis baixos de expressão de cecropina A.

Apesar das limitações relacionadas à eletroporação de formas sanguíneas, o mecanismo de manipulação genética no *T. brucei* tem sido mais amplamente explorado, comparado ao *T. cruzi*, pelo fato deste organismo possuir a maquinaria completa para indução de RNAi. Visto que o *T. cruzi* não possui uma maquinaria de RNAi funcional, a maioria dos trabalhos para testar a função de genes utiliza a técnica de deleção gênica por recombinação homóloga [38]. Para tal, geralmente são utilizados plasmídeos contendo um gene de resistência a uma droga, como por ex., a neomicina, flanqueado por sequências homólogas do gene alvo [18,42,43]. Como consequência da recombinação homóloga entre as sequências flanqueadoras do gene de resistência e do gene a ser deletado, ocorre à substituição do mesmo pelo gene de resistência. Tendo em vista que o *T. cruzi* é um organismo diploíde, para deleção gênica por HR neste protozoário, são necessárias duas rodadas de transfecção com dois genes de resistência diferentes. Na primeira transfecção o primeiro alelo é interrompido, enquanto que na segunda



transfecção, o outro alelo é interrompido. Considerando estes aspectos, e a escassez de genes de resistência que podem ser utilizados para o *T. cruzi*, é possível concluir que a deleção gênica por HR, de genes que possuem mais de duas cópias no genoma é inviável.

Kangussu-Marcolino e colaboradores (2014), desenvolveram um sistema para excisão de genes de resistência do genoma do *T. cruzi*, com o objetivo de possibilitar múltiplos nocautes em um mesmo parasito [44]. Tendo como base o sistema da CRE recombinase do bacteriófago P1, eles utilizaram uma CRE recombinase dimerizável (DiCRE recombinase), cuja dimerização e consequentemente a atividade da DiCRE é induzida com rapamicina [45,46]. Formas epimastigotas do *T. cruzi*, foram estavelmente transfectadas com duas construções diferentes: a 1<sup>o</sup> contendo a DiCRE recombinase, e a 2<sup>o</sup> contendo um plasmídeo com a sequência que codifica o gene de resistência a puromicina flanqueada por sítios loxP. O segundo plasmídeo foi utilizado como indicador da recombinação, logo se a DiCRE for capaz de promover a recombinação entre os dois sítios loxP, ocorrerá a excisão do gene de resistência a puromicina, em consequência os parasitos passarão a ser sensíveis a este antibiótico. Após a indução da atividade da DiCRE com rapamicina na presença de puromicina, Kangussu-Marcolino e colaboradores obtiveram uma eficiência de recombinação de 40-75%.

#### **1.4 Novas técnicas para aumentar a eficiência de edição gênica em parasitos: ZFNs e o sistema de CRISPR/Cas9**

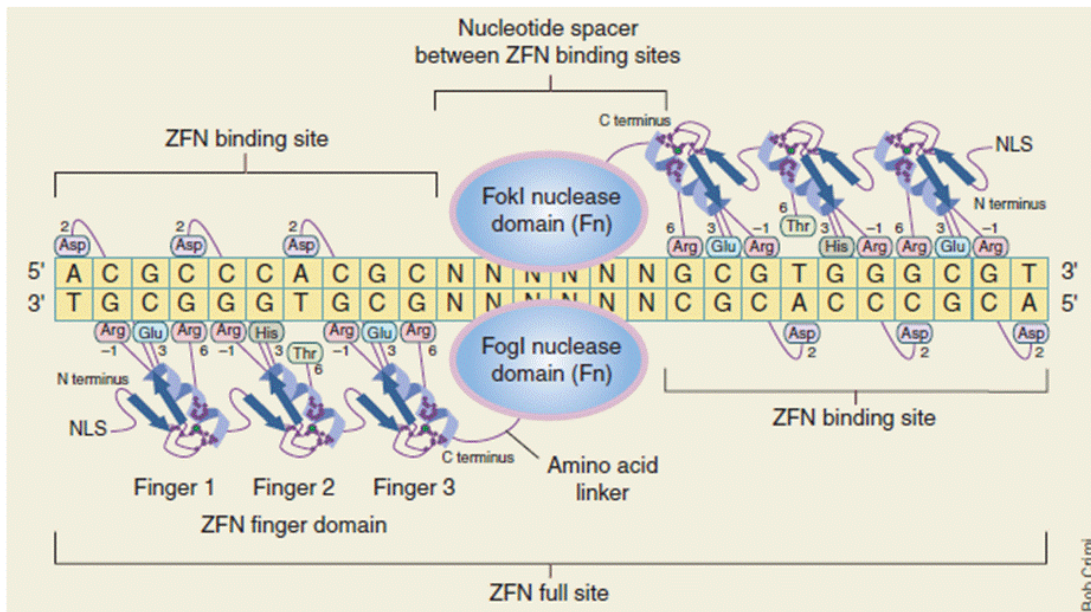
Considerando que para manipulação genética são utilizados plasmídeos que integram por recombinação homóloga no genoma do parasito, a quebra espontânea no DNA alvo é um fator crítico para integração do DNA no genoma

do parasito. Desta forma, a baixa eficiência de transfecção nestes organismos pode estar relacionada com a reduzida taxa de quebra espontânea no DNA-alvo.

Em 1995, Smih e colaboradores demonstraram que a indução de quebra sítio específica no DNA de células tronco embrionárias de camundongo, utilizando a enzima de corte raro *I-SceI*, aumentava a taxa de HR em 50 vezes [47]. De forma similar, Glover e colaboradores (2009), observaram que a indução de quebra sítio específica no *T. brucei* resultou em um aumento de mais de 250 vezes na eficiência de transfecção de formas sanguíneas [48]. Eles utilizaram o gene que codifica a proteína vermelha fluorescente (RFP) fusionada com o gene de resistência a puromicina, incorporado com o sítio de restrição da enzima *I-SceI*. Essa construção foi então integrada no espaçador de rRNA em linhagens de parasito que continham a expressão da enzima *I-SceI* sob o controle do operador da tetraciclina. Após a indução da expressão da enzima *I-SceI*, os parasitos foram transfectados com uma sequência linear de DNA contendo o gene de resistência à neomicina flanqueado por sequências do espaçador de rRNA. Nos parasitos nos quais a expressão da enzima *I-SceI* foi induzida com tetraciclina uma eficiência de  $3.2 \times 10^{-3}$  foi conseguida, enquanto que nos parasitos não induzidos  $1.2 \times 10^{-5}$  transformantes foram obtidos. Este resultado indica que a sequência linear integrou com maior eficiência por HR nos parasitos nos quais foi induzida uma *DSB* no gene alvo.

Nós últimos 10 anos, vários trabalhos têm demonstrado que as proteínas denominadas ZFNs, são uma forma eficaz de introduzir uma quebra sítio específica na dupla fita do DNA. As ZFNs são proteínas sintéticas compostas pela a junção de proteínas dedo de zinco (ZFPs), que se ligam ao DNA, com o

sítio catalítico da endonuclease *FokI*. As ZFNs podem conter de 3 a 4 motivos dedo de zinco (ZF), sendo que cada um é formado por 30 aminoácidos. Cada motivo ZF se enovela em uma estrutura de  $\beta\beta\alpha$  que é estabilizada por um átomo de zinco por meio de dois resíduos de cisteína e dois resíduos de histidina. Cada motivo ZF se liga a três pares de base pela inserção da  $\alpha$ -hélice no sulco maior da dupla fita do DNA como ilustrado na figura 5. Alguns aminoácidos chave são responsáveis pela especificidade da ligação das ZFNs ao DNA, desta forma, a troca destes aminoácidos possibilita o desenvolvimento de nucleases que se liguem de forma específica em um alvo determinado. Para que as ZFNs tenham atividade catalítica, causando DSB no DNA, é preciso que ocorra dimerização do motivo *FokI*, por esta razão as ZFNs tem de ser utilizadas em pares [49,50].



**Figura 5. Esquema da estrutura das ZFNs e sua ligação na dupla fita do DNA.** A figura ilustra a ligação de um par de ZFNs na dupla fita do DNA. Cada ZFN se liga a uma fita de DNA, sendo que cada motivo ZF se associa a três pares de base. O domínio Fn (*FokI* nuclease domain) é conectado ao motivo ZF C-terminal por um aminoácido (Amino acid linker). Os motivos de ligação ao DNA estão arranjados em uma orientação inversa de forma que uma ZFN está fazendo a maioria de seus principais contatos com uma fita de DNA, enquanto que a outra ZFN está fazendo com a outra fita do DNA. Entre os dois sítios de ligação existe um espaçador formado por seis nucleotídeos (NNN....). NLS – sinal de localização nuclear. Adaptado de Porteus & Carrol, 2005 [49].

Quebras na dupla fita do DNA são lesões graves que podem levar a instabilidade genômica e conseqüentemente a morte do organismo se não reparadas. Em eucariotos inferiores, a recombinação homóloga é o mecanismo principal de reparo de DSB [51]. Um dos eventos iniciais que acionam o processo de HR em um organismo é a presença de DSB no DNA. No processo de HR a quebra na dupla fita é reconhecida e processada a fitas simples de DNA com pontas 3' livres. A fita simples com o 3' livre associada a proteína RAD51 invade a dupla fita de uma seqüência de DNA com quem compartilhe

homologia. Após a invasão ocorre a síntese de DNA, usando a sequência homóloga como molde. O processo tem fim, com o anelamento da fita com sua parceira original e uso desta como molde para replicação do DNA [52]. Tendo isso em vista, a DSB causada pelas ZFNs pode ser reparada por *HR*, quando uma sequência com homologia está presente, ou pelo mecanismo de *Non Homologous End Joining* (NHEJ), o qual insere inserções e deleções no gene alvo. No entanto, alguns elementos chave do mecanismo de NHEJ parecem estar ausentes no *T. cruzi* e *T. brucei*, portanto na ausência de uma sequência que forneça homologia a DSB é reparada por *microhomology-mediated end joining* (MMEJ), um mecanismo de reparo também não conservativo [53,54].

O primeiro trabalho descrevendo o uso das ZFNs *in vivo*, demonstrou que essas nucleases eram capazes de induzir DSB em oócitos de *Xenopus laevis* [55]. Em seguida o mesmo grupo demonstrou que as ZFNs também poderiam ser usadas para estimular a recombinação homóloga em *Drosophila melanogaster* [56]. Desde então muitos trabalhos foram publicados demonstrando a utilização das ZFNs para manipulação genética em diferentes organismos. Höher e colaboradores (2012), interromperam o gene *egfp*, previamente inserido em queratinócitos de células tronco, por meio da utilização das ZFNs. Importante ressaltar que os queratinócitos expressando as ZFNs mantiveram a capacidade de auto-renovação e formação de células epidérmicas diferenciadas em cultura [57]. De forma notável, Straimer e colaboradores (2012), demonstraram uma eficiência de transfecção de 88%, ao substituírem o gene *egfp* por *mrfp*, por HR, utilizando as ZFNs. Importante salientar que neste caso não foi utilizada a pressão de um antibiótico para seleção dos parasitos contendo *mrfp*. Além disso, neste trabalho também foi

demonstrado a substituição do gene *pfcr1*, que codifica o transportador de resistência a cloroquina, contendo uma mutação que está associada à resistência dos parasitos á essa droga, por um gene *pfcr1* sem a mutação [58]. Recentemente Singer e colaboradores (2015), foram capazes de gerar linhagens atenuadas de *P. berghei*, por meio da utilização das ZFNs [59]. Eles transfectaram formas sanguíneas do *P. berguei* contendo o gene *egfp* inserido no cromossomo 12, com um par de ZFNs sintetizadas para se ligaram ao gene *egfp*. Como não foi fornecida uma sequência homóloga para que a quebra no gene *egfp* fosse reparada por *HR*, a *DSB* levou a perda de um pedaço do cromossomo 12 e conseqüentemente de vários genes. A expressão dessas ZFNs em esporozoítos deu origem a parasitos incapazes de prosseguir na infecção para formas merozoítas sanguíneas em camundongos C57BL/6. A imunização de camundongos com essa linhagem foi capaz de proteger esses animais do desafio com esporozoítos WT.

Apesar de serem potentes ferramentas para uso na manipulação genética, as ZFNs podem ser tóxicas para as células que as expressam. Bibikova e colaboradores (2002), observaram que a expressão das ZFNs sob o controle do promotor do gene da *heat shock protein* era letal para as larvas e embriões de *Drosophila melanogaster*, devido à quebra excessiva no DNA alvo [56]. A toxicidade das ZFNs também está associada à quebra inespecífica da dupla fita do DNA, o que pode ser proveniente de ligação inespecífica do par de ZFNs ou homodimerização de uma das ZFNs que compõem o par [49]. Pruett-Miller e colaboradores (2009), demonstraram que a expressão das ZFNs em células HEK 293 de forma regulada é capaz de diminuir a toxicidade dessas proteínas [60].

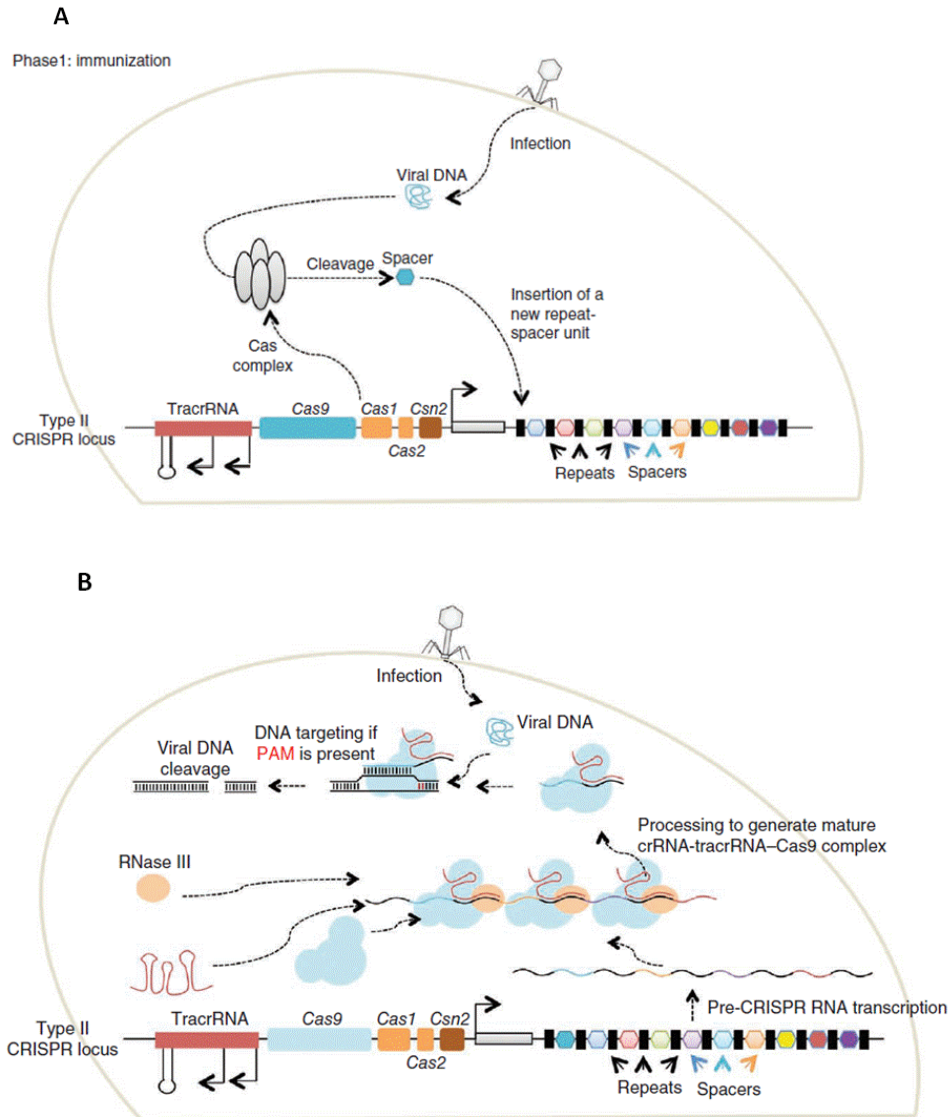
As proteínas sintéticas denominadas TALENS (*transcription activator-like effector nucleases*) também têm sido utilizadas para edição gênica em alguns organismos [61-63]. Estas nucleases foram desenvolvidas pela fusão das proteínas denominadas TALEs (*transcription activator-like effectors*), identificadas no patógeno de plantas *Xanthomonas*, com a endonuclease *FokI*. As TALEs são fatores transcricionais que se ligam e regulam a transcrição de genes durante a patogênese. De forma similar às ZFNs, as TALENs são compostas por um domínio central contendo repetições de aminoácidos, que é responsável pela ligação ao DNA e um domínio de clivagem, da endonuclease *FokI* [64]. Também de forma similar às ZFNs, as TALENs podem apresentar toxicidade para as células que as expressam, devido a quebra inespecífica [65]. Sua aplicação para manipulação genética em protozoários ainda não foi demonstrada.

Outra estratégia para indução sítio específica de DSB que vem sendo amplamente utilizada para manipulação genética em diversos organismos é o sistema de CRISPR/Cas9. O sistema de CRISPR/Cas9 consiste em um complexo de RNA com a endonuclease Cas9, que se liga por complementaridade ao seu alvo no DNA e causa uma DSB sítio específica. Essa ferramenta para manipulação e edição gênica foi adaptada do sistema efetor do tipo II de bactéria, que é utilizado na defesa contra invasão por vírus e plasmídeos [66].

Em bactéria e *archae*, o sistema de CRISPR/Cas9 é composto por um pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) que é transcrito do locus CRISPR, a proteína Cas9 e um *trans-activating* crRNA (tracrRNA). O locus CRISPR é formado por repetições de DNA, intercaladas por sequências denominadas espaçadoras

que correspondem ao material genético do vírus invasor que foi previamente clivado e incorporado ao locus (figura 6A). A transcrição do locus CRISPR resulta na formação de um tracrRNA que se hibridiza com a região repetitiva do pre-CRISPR-RNA e com a Cas9 nuclease. Em seguida a enzima RNaseIII cliva o híbrido pre-CRISPR-RNA-tracrRNA e logo após a porção 5' final de cada espaçador é removida, dando origem ao CRISPR RNA (crRNA) maduro que se associa com a Cas9 nuclease. Esse complexo (crRNA+ Cas9) se liga em seu DNA alvo por complementaridade, e causa uma quebra na dupla do DNA. Para que ocorra a ligação do complexo em seu alvo, é necessária a presença de um motivo NGG, denominado motivo PAM (*protospacer adjacent motif*), precedendo o local de ligação do complexo (figura 6B) [67].





**Figura 6. Esquema do sistema de CRISPR/Cas9 do tipo II de bactéria.** Na fase denominada de imunização, que corresponde ao momento em que a bactéria tem o primeiro contato com o vírus, o material genético do invasor é clivado pela maquinaria da bactéria e incorporado no locus CRISPR entre as sequências repetitivas (A). Quando a bactéria tem o segundo contato com o vírus a fase efetora tem início (B). Ocorre a transcrição do locus CRISPR que dá origem a um pre-CRISPR-RNA e um tracrRNA, que se associam por meio de interações do tracrRNA com regiões repetitivas do pre-CRISPR-RNA. O híbrido pre-CRISPR-RNA–tracrRNA se associa a Cas9 nuclease e em seguida a RNase III o cliva. Em um passo subsequente a porção 5' final de cada espaçador é removida dando origem ao crRNA maduro. Por último, o complexo crRNA/Cas9 nuclease localiza seu alvo por complementaridade de bases guiado pelo motivo PAM e o cliva. Retirado de Mali *et al*, 2013 [67].

O trabalho desenvolvido por Jinek e colaboradores em 2012 foi de crucial importância para estabelecer os requerimentos necessários para adaptação do sistema de CRISPR/Cas9 para utilização na manipulação genética [68]. Por meio de uma série de ensaios *in vitro* eles demonstraram a possibilidade de induzir DSB sítio específicas em plasmídeos, utilizando um crRNA-tracrRNA transcrito *in vitro*, juntamente com a Cas9 nuclease purificada de *S. pyogenes*. Além disso, Jinek e colaboradores desenvolveram uma molécula quimera de RNA, por meio da fusão da porção 3' de um crRNA com a 5' do tracrRNA gerando um *single guide* RNA (sgRNA), que foi capaz de se associar com a Cas9 nuclease e clivar de forma específica seu alvo. Em seguida dois trabalhos publicados na mesma edição da revista *Science*, demonstraram pela primeira vez a utilização do sistema de CRISPR/Cas9 para manipulação genética em células de mamífero [69,70]. Ambos os trabalhos demonstraram que a utilização de uma Cas9 nuclease de *S. pyogenes human codon-optimized*, com um sinal de localização nuclear e a expressão do híbrido crRNA-tracrRNA sob o controle do promotor da U6 *small nuclear* RNA (snRNA), era capaz de promover a clivagem sítio específica em células de mamífero e dessa forma promover a edição gênica por NHEJ, ou por HR, quando uma sequência doadora estava presente. Logo após a publicação destes trabalhos, a utilização do sistema de CRISPR/Cas9 foi demonstrada para diferentes organismos, como levedura, zebrafish, camundongo, drosophila, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* e até mesmo *T. cruzi*. [71-78].

Sollelis e colaboradores (2015), utilizaram o sistema de CRISPR/Cas9 para deletar o gene que codifica a proteína *paraflagelar rod 2* (PFR2) de *L.*

*major*, o qual possui 3 cópias organizadas em *tandem* no cromossomo 16 [77]. Após a geração de linhagens expressando a Cas9 nuclease, formas promastigotas foram transfectadas com um plasmídeo contendo a sequência do sgRNA, sob o controle do promotor da U6 snRNA e o gene de resistência a puromicina, flanqueada por sequências que possibilitam a recombinação do plasmídeo no locus de *pfr2*. Onze dias após a seleção dos parasitos com puromicina foi observado uma diminuição na porcentagem de parasitos *pfr2* positivos, indicando que a quebra no locus de *pfr2* estava sendo reparada por HR, no entanto alguns parasitos da população ainda mantinham o locus intacto. Após a clonagem dessa população, oito clones foram avaliados por PCR, e destes dois haviam deletado por completo o gene *pfr2*.

Em um trabalho posterior, Zhang e colaboradores (2015), utilizaram o sistema de CRISPR/Cas9 para editar o gene transportador de miltefosina (*LdMT*) de *L. donovani* [79]. Considerando que a mutação nesse gene leva a geração de parasitos resistentes ao antibiótico miltefosina, à eficiência de edição/deleção do gene pode ser avaliada por ensaios de resistência á esse antibiótico. Após a transfecção de formas promastigotas com um sgRNA que tem esse gene como alvo, juntamente com uma sequência construída para recombinar no gene *LdMT* por HR, foi observado que o cultivo dos parasitos após a transfecção a 27°C, ao invés de 37°C, aumentava a taxa de obtenção de parasitos resistentes a miltefosina em 2-4 vezes. A explicação dos autores para esse resultado é o fato de a 37°C a Cas9 nuclease ter sua atividade aumentada enquanto que a taxa de duplicação dos parasitos é diminuída, visto que a temperatura ótima de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* é a 27°C. Desta forma a Cas9 nuclease teria mais tempo para agir

em seu alvo, causando a DSB. Outro resultado interessante demonstrado por Zhang e colaboradores neste trabalho, e que vale a pena destacar, foi a utilização de um único plasmídeo contendo dois sgRNAs que tem o gene *LdMT* como alvo. Após a transfecção de parasitos com este plasmídeo, eles obtiveram uma taxa de 25-51% dos parasitos resistentes a miltefosina um aumento 25-50 vezes maior em comparação com a estratégia utilizando apenas um sgRNA.

O primeiro trabalho demonstrando a utilização do sistema de CRISPR/Cas9 no *T. cruzi* foi publicado por Peng e colaboradores em 2015 [78]. Como prova de conceito eles demonstraram que a transfecção de formas epimastigotas da cepa CL expressando a Cas9 nuclease e eGFP com um sgRNA transcrito *in vitro* que tem o gene *egfp* como alvo, resultava em uma diminuição da expressão de eGFP. Importante ressaltar que dois dias após a transfecção já era possível detectar parasitos nos quais o gene *egfp* foi interrompido. Com o objetivo de testar a utilização do sistema de CRISPR/Cas9 para aumentar a eficiência de integração de plasmídeos por HR, Peng e colaboradores transfectaram parasitos expressando eGFP e Cas9 nuclease com um sgRNA que tem o gene *egfp* como alvo junto com uma sequência linear contendo o gene *rfp* flanqueado por sequências que possibilitariam a recombinação homóloga, de forma a substituir *egfp* por *rfp*. A análise desses parasitos cinco dias após a transfecção por citometria de fluxo demonstrou que embora tenha sido observada a perda de fluorescência verde em 35-51% dos parasitos apenas 0,1-0,06% dos parasitos passaram a expressar RFP. Apesar da baixa eficiência de recombinação conseguida, Peng e colaboradores (2015), demonstraram de forma surpreendente, o *knockdown* da proteína  $\beta$ -

galactofuranosil glicosiltransferase ( $\beta$ -GalGT). Essa proteína faz parte de uma família multigênica e possui 65 genes anotados. Para alcançar esse resultado parasitos foram simultaneamente transfectados com três sgRNAs diferentes, transcritos *in vitro*, que tinham o gene  $\beta$ -GalGT como alvo.

Em um trabalho posterior Lander e colaboradores (2015), demonstraram o *knockdown* de três genes do *T. cruzi*: *PFR1*, *PFR2* e *gp72* [80]. Diferente da estratégia adotada por Peng e colaboradores (2015), que utilizaram sgRNAs transcritos *in vitro*, neste trabalho foi utilizado um único plasmídeo para expressão tanto do sgRNA, quanto da Cas9 nuclease (pTREXsgRNA/Cas9). Como foi mostrado por Peng e colaboradores, neste trabalho foi observado que a transfecção de parasitos com um sgRNA e a Cas9 nuclease, na ausência de uma sequência com homologia para reparar a DSB, resulta em uma população mista, contendo tanto a deleção do gene de interesse, quanto o gene selvagem. No entanto, Lander e colaboradores (2015), também demonstraram que após a co-transfecção dos parasitos com o plasmídeo pTREXsgRNA<sup>PFR2</sup>/Cas9 (sgRNA<sup>PFR2</sup> – sgRNA que tem o gene *pfr2* como alvo) e com uma sequência linear contendo o gene de resistência a blasticidina flanqueado por sequências para recombinar no locus de *pfr2*, uma população 100% nocaute para esse gene é obtida.

Com base nos dados apresentados, o objetivo deste trabalho é utilizar as ZFNs e o sistema de CRISPR/Cas9 para edição gênica do *T. cruzi* e comparar a eficiência, bem como a facilidade de aplicação dos dois sistemas. As ZFNs utilizadas neste projeto foram desenhadas e sintetizadas pela empresa Sigma Aldrich. Parte do projeto foi desenvolvido em colaboração com o grupo da professora Isabel Roditi, pesquisadora na Universidade de Berna-

Suíça. O objetivo inicial era testar a utilização das ZFNs para indução de DSB sítio específica para promover um aumento nas taxas de HR no *T. cruzi* e *T. brucei*. Como prova de conceito da funcionalidade das ZFNs nestes organismos, primeiramente foi testado um par de ZFNs que tem o gene *egfp* como alvo. A idéia é induzir uma quebra sítio específica no gene *egfp* com as ZFNs e em seguida transfectar os parasitos com uma sequência que contenha um gene de resistência ou o gene que codifica a proteína RFP flanqueado por sequências de *egfp* e avaliar se a utilização das ZFNs é capaz de aumentar as taxas de recombinação em ambos os protozoários. Em seguida decidimos testar para o *T. cruzi*, um par de ZFNs que tivesse um gene endógeno como alvo. Foi escolhido o gene *gp72*, que codifica uma glicoproteína de superfície do parasito, pois a deleção deste gene resulta em um fenótipo facilmente identificável sem a perda da viabilidade dos parasitos [81]. Além disso, decidimos testar a eficiência do sistema de CRISPR/Cas9 para deleção gênica. Para isso, desenvolvemos linhagens de parasitos expressando a proteína Cas9 nuclease de forma constitutiva. Em seguida essa linhagem foi transientemente transfectada com um plasmídeo contendo a sequência do sgRNA que tem o gene *gp72* como alvo, e o gene *gfp*.

Além de testar a aplicabilidade do uso das ZFNs e do sistema de CRISPR/Cas9, também foi otimizado um protocolo de transfecção utilizando o sistema *nucleofector* para em seguida ser testado um sistema para expressão regulada de genes exógenos em *T. cruzi* utilizando elementos do operador da tetraciclina. Esse trabalho teve como principal objetivo contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais eficazes para a manipulação de genes

em *T. cruzi*, as quais poderão ser empregadas em inúmeros estudos de genômica funcional nesse parasito.

## 2. Objetivo

### 2.1. Objetivo geral

Otimizar protocolos para manipulação do genoma em *T. cruzi* e em *T. brucei* por meio da utilização das ZFNs e do sistema de CRISPR/Cas9.

### 2.2 Objetivos específicos

- Adaptar o protocolo de transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* utilizando o *nucleofector*;
- Desenvolver um vetor para construção de linhagens de *T. cruzi* com expressão gênica regulada por tetraciclina;
- Gerar linhagens de *T. cruzi* e *T. brucei* expressando *egfp* e um par de ZFNs que tem como alvo o gene de *egfp* e testar a capacidade das ZFNs de aumentar a eficiência de recombinação homóloga no genoma dos dois parasitos;
- Gerar linhagens de *T. cruzi* expressando um par de ZFNs que tem como alvo o gene *gp72* para testar a capacidade das ZFNs de aumentar a eficiência de deleção gênica e de recombinação homóloga no genoma do parasito;
- Gerar linhagens de *T. cruzi* expressando Cas9 nuclease e testar o sistema de CRISPR/Cas9 para geração de nocautes de *gp72* por meio de expressão transiente de sgRNA tendo *gp72* como alvo.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Digestão de DNA e clonagens

Para digestão do DNA, este foi incubado com as enzimas de restrição necessárias por 2 horas, de acordo com as instruções do fabricante. Logo após o DNA foi separado em gel de agarose 1% a 100 V por 50 minutos em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e o inserto de interesse cortado do gel e purificado utilizando kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean up - MN). Para clonagem de insertos no vetor de clonagem TOPO 2.1 (TOPO TA Cloning Kit- Invitrogen), o inserto de interesse foi incubado com o plasmídeo por 30 minutos a temperatura ambiente segundo instruções do fabricante. Para clonagem no vetor pGEM Teasy o inserto de interesse foi incubado com o plasmídeo por uma hora a temperatura ambiente, segundo instruções do fabricante (pGEM-T Easy Vector System- Promega). Para clonagem nos vetores de expressão em *T. cruzi* (pROCK, pTcINDEX, ou pTrex) e *T. brucei* (pLEW13, plew100) o inserto de interesse foi incubado com o plasmídeo e 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (T4 DNA ligase- Promega) a 16°C por 18 horas.

#### 3.2 PCR de colônia e PCR de DNA plasmidial/genômico

Para análise das colônias transformantes foi realizado PCR de colônia. Neste protocolo a célula é incubada com 20 uL de H<sub>2</sub>O por 5 minutos e em seguida 1-2 uL foram adicionados a 16 uL da reação de PCR (0,2 mM de dNTPs, tampão Taq 1x , 1 µM de cada primer, Taq 0,04 u/µL). Esta reação de PCR foi submetida a 95 °C por 5 minutos seguido de 31 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos. Após todos os ciclos as reações eram incubadas a 72°C por 10 minutos para complementação da extensão das cadeias. Por último, a reação de PCR era analisada por



eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 volts, por 45 minutos em tampão de TAE 1x. Para PCR de DNA plasmidial 10 ng de plasmídeo foi adicionado à reação de PCR e logo após foi seguido o mesmo procedimento descrito acima para PCR de colônia. A única diferença é que a temperatura de 50 °C na reação de PCR descrita acima variou de acordo com a temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados. Para PCR de DNA genômico (gDNA), 100 ng de DNA foram transferidos para 19 uL de reação de PCR e em seguida foi prosseguido como descrito acima para PCR de colônia. Abaixo segue tabela com a lista de todos os iniciadores utilizados neste trabalho. Sublinhado estão destacados os sítios de restrição de enzimas inseridos nos primers, quando presentes.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
<b>PRcruziF</b>	5' <u>ACGCGT</u> TATCAAGCTCCCTAAAAAAA 3'
<b>PRcruziR</b>	5' <u>ACGCGT</u> GTTGGGGGATCCACTAGAAC3'
<b>SondaTetrF</b>	5'TAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAA3'
<b>SondaTetrR</b>	5'GGGATCCTTAAGACCCACTTTCAC3'
<b>SondaT7F</b>	5'TGGCTTGCCTAACCAGTGCT3'
<b>SondaT7R</b>	5'CCAGTCCACGGCTTAGGAGG3'
<b>renillaClaF</b>	5' <u>ATCGAT</u> TGTCTAGCCACCATGACTTCG3'
<b>renillaBamR</b>	5' <u>GGATCC</u> GCGTTGCCTTGGAGTCGTAA3'

<b>5'eGFPF</b>	5' <u>GGTACCATGGT</u> GAGCAAGGGCGAGGAGC3'
<b>5'eGFPR</b>	5'TAACTCGAG <u>GGATCCT</u> CCAGCTTGTGCCCCAGG AT3'
<b>3'eGFPF</b>	5'TTAGTCGACA <u>CTAGT</u> AACGGCATCAAGGTGAACTT3'
<b>3'eGFPR</b>	5' <u>GAGCTCCT</u> ACTTGTACAGCTCGTCCATG3'
<b>HXI-mRFPF</b>	5' <u>GGATCCCCA</u> ACACGAGAGGGCGGT3'
<b>gapdhR</b>	5' <u>ACTAGTCC</u> ATATTGGCTGCAGGGTCGCT 3'
<b>ZFN2NheF</b>	5' <u>GCTAGCTCTT</u> CAAATATGCAGCG3'
<b>ZFN2NheR</b>	5' <u>GCTAGCTTTT</u> CATCACTAGTTCTAAG3
<b>HA-ZFN1FXba</b>	5' <u>TCTAGAAT</u> GTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCCCC AAGAAGAAGAG 3'
<b>HA-ZFN1R Xho</b>	5' <u>CTCGAGAA</u> ACGGGCCCTCTAGACT3'
<b>177PspOMIF</b>	5' <u>GGGCCC</u> GAGCTCTTTAATGGTCCTTATAC 3'
<b>177PspOMIR</b>	5' <u>GGGCCC</u> TCGGTACCCATTAACACTAAAG 3'
<b>GP725'FHind</b>	5' GATCA <u>AAGCTT</u> TGGTGGTGGTGGCAGTCTGTG 3'
<b>GP725'RBam</b>	5' CAGT <u>GGATCCC</u> ATGGTCACACAACAGCAGCGT 3'
<b>GP723'FXho</b>	5' GATC <u>CTCGAGC</u> GGCGACGGCACTCTTCAACATAC 3'
<b>GP723'RXba</b>	5' CAGTT <u>CTAGAGG</u> ACGGCTGTACGGTTTGAT 3'
<b>sgRNAGP72F</b>	5'GATC <u>GGATCC</u> GTGCGTTTTGGTGAACAAATCGTTTTAGAGCTAGA AATAGC 3'

<b>sgRNAGP72R</b>	5' CAGTAGATCTGAGCTCAAAAAAGCACCGACTCGGTG 3'
-------------------	--

**Tabela I – Lista de iniciadores**

### 3.3 Transformação de células XL1 Blue e obtenção de DNA plasmidial

A ligação vetor + inserto ou plasmídeo, foram transferidos para tubos *eppendorfs* contendo 100 µL de bactéria *E. coli* (cepa XL1 Blue) quimiocompetentes e incubados por meia 30 minutos no gelo. Logo após foi dado o choque térmico a 42°C por 55 segundos e adicionado 400 µL de meio 2XYT (1,6% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; pH 7,0). As bactérias foram mantidas a 37 °C por 60 minutos sob agitação e em seguida 200 µL da cultura transformada foi plaqueada em meio 2XYT-ágar (1,5 %), contendo 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. As placas foram então incubadas por 16 horas a 37°C. Para extração de DNA plasmidial em pequenas quantidades, inóculos de bactéria transformada foram incubados em 5 mL de meio 2XYT por 16 horas a 37°C e centrifugadas a 11.000 x g. Em seguida o DNA plasmidial foi extraído com kit (NucleoSpin Plasmid – MN), seguindo as instruções do fabricante. Para extração de DNA plasmidial em larga escala, foi feito um pré- inóculo da bactéria transformada em 4 mL de meio 2XYT. Após 16 horas de crescimento a 37 °C, 800 uL do pré-inóculo foram transferidos para frascos *erlenmeyer* contendo 400 mL de meio 2XYT e incubados a 37°C por 16 horas. Logo após a cultura de bactéria foi centrifugada 6000 x g por 15 minutos e o DNA plasmidial extraído com kit (QIAGEN Plasmid Maxi Kit), segundo instruções do fabricante.

### 3.4 Cultivo do *T. cruzi* e curva de crescimento

Neste trabalho foram utilizados parasitos do clone CL14 do *T. cruzi* gentilmente cedidos pela Pesquisadora Caroline Junqueira, do Centro de

Pesquisa René Rachou. As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT [82] (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 U/mL a 28°C. Os parasitos transfectados foram mantidos em cultura com 200 µg/mL de antibiótico de seleção. Para curva de crescimento, formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram diluídas para uma densidade de 5x10<sup>5</sup> células/mL e seu crescimento foi avaliado por contagem em camara de Neubauer no microscópio.

### 3.5 Transfecção e clonagem do *T. cruzi*

Para transfecção do *T. cruzi* utilizando o *gene pulser system* (BioRad) 4x10<sup>7</sup> formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas a 1200 x g, ressuspendidas em 400 µL de tampão de eletroporação (120 mM KCl; 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25 mM HEPES; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) e transferidas para cuvetas de 0,2 mm (BioRad) juntamente com 100 µg de plasmídeo. Os parasitos foram então submetidos a dois pulsos de 10 segundos a 0,3 kV e 500 µF de capacitância e logo em seguida transferidos para 5 mL de meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para transfecções estáveis, vinte e quatro horas após a transfecção foi adicionado 200 µg/mL do antibiótico de seleção as culturas (G418 ou higromicina). Para transfecção de formas epimastigotas do *T. cruzi* no *nucleofector*, 4x10<sup>7</sup> parasitos foram centrifugados e ressuspendidos em tampão de eletroporação Tb-BSF buffer, descrito por Schumann e colaboradores em 2011 [83]. Logo após foi adicionado o plasmídeo ressuspendido em tampão de eletroporação. Essa mistura foi então transferida

para cuvetas de 0,2 mm (BioRad ou BTX) e submetidas ao programa U033 no *Amxa Nucleofector II Device*. Após a transfecção foi procedido como descrito para transfecção com eletroporador *gene pulser*. Após a seleção da população com antibiótico os parasitos foram clonados por meio do plaqueamento em placas ágar-sangue ou por diluição limitante em placas de 96 poços. Para clonagem em placas ágar-sangue foi utilizado 0,75% de agarose *low melting (BioRad)* e 2% de sangue desfibrinado. A essa mistura foi adicionado meio de cultura LIT e BHI, em uma concentração de 1:1. Após adição do antibiótico de seleção, 25 mL dessa mistura foi vertida em placas de petri, dispostas em bandejas contendo gelo, para rápida solidificação do meio. Em seguida as placas foram embaladas em papel autoclavado e incubadas a 28°C por 48 horas, para secagem das mesmas. Após a secagem do meio de cultura das placas, 100 µL de meio LIT contendo  $10^2$ ,  $10^3$  ou  $10^4$  parasitos na fase exponencial de crescimento foram plaqueados na superfície do ágar e incubadas a 28 °C [29]. Após 30 dias de seleção, colônias isoladas obtidas nas placas foram transferidas para garrafas de cultura. Para geração de clones por diluição limitante parasitos na fase exponencial de crescimento foram diluídos em meio LIT contendo 200 µg/mL de antibiótico de seleção e transferidos para placas de 96 poços. Foram utilizadas três diluições diferentes: 5 parasitas/poço, 1 parasita/poço e 0,5 parasita/poço. As placas foram mantidas em câmara úmida e após três semanas de seleção, os parasitos que cresceram em poços individuais foram transferidos para garrafas de cultura [30].

### **3.6 Transfecção e clonagem do *T. brucei***

O equivalente a  $2 \times 10^7$  formas sanguíneas do *T. brucei* foram centrifugados a 1200 x g e ressuspendidas em 80  $\mu$ L de tampão de transfecção Tb-BSF. Em seguida os parasitos foram transferidos para cuvetas de 0.2 mm contendo 8  $\mu$ g de DNA em um volume de 20  $\mu$ L e submetidos ao programa Z-001 no *nucleofector*. As células foram transferidas para 25 mL de meio HMI-9 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida foram realizadas três diluições diferentes (1:100, 1:500 e 1:1000) e logo após os parasitos foram transferidos para placas de 96 wells para obtenção de clones. Vinte horas após a transfecção foi adicionado antibiótico de seleção as culturas.

### **3.7 Indução da expressão de Rluc e ensaio da atividade de luciferase**

Formas epimastigotas na fase logarítmica de crescimento foram diluídas para uma densidade de crescimento de  $5 \times 10^6$  p/mL em garrafas de cultura e em seguida 0,5  $\mu$ g/mL de tetraciclina foi adicionada ao meio. Vinte e quatro horas após a adição de tetraciclina, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e o equivalente a  $2 \times 10^7$  parasitos foi centrifugado e em seguida ressuspendido em tampão de lise 1x (renilla luciferase assay lysis buffer). Logo após o lisado foi centrifugado a 20800 x g por 3 minutos e 20  $\mu$ L do sobrenadante foi incubado com 100  $\mu$ L do substrato da renilla (renilla luciferase assay reagent) em tubo de vidro (75 x 12 mm – Sarstedt). A luminescência produzida foi medida por meio de 3 leituras de 10 segundos em luminômetro (Lumat LB9501). Para leitura do não induzido, formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, foram mantidas em cultura na ausência de tetraciclina e processadas da mesma forma como descrito acima.

### **3.8 Indução da expressão das ZFNs e análise da eficiência de transfecção no *T. brucei***

Formas sanguíneas do *T. brucei* em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas na presença de 1 µg/mL de tetraciclina por 3 horas ou 96 horas. Os parasitos nos quais a expressão das ZFNs foi induzida por 3 horas foram transfectados com o plasmídeo pDONOR<sup>eGFP</sup>*brucei* como descrito no item 3.6. Em paralelo parasitos provenientes da mesma cultura inicial foram mantidos em cultura sem tetraciclina e transfectados da mesma forma com o pDONOR<sup>eGFP</sup>*brucei*. Para análise da eficiência de transfecção, duas semanas após a transfecção o número de clones obtidos foi acessado. Os parasitos nos quais a expressão das ZFNs foi induzida por 120 horas, foram contados utilizando câmaras de Neubauer, durante todo o período da indução da expressão.

### **3.9 Análise da expressão de proteínas por *western blot***

Para análise da expressão de proteínas por *western blot*, formas epimastigotas na fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas a 1200 x g por 10 minutos. Logo após o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1X e centrifugado novamente a 1200 x g por 10 minutos. Esse passo de lavagem com PBS foi repetido mais uma vez e em seguida o *pellet* foi ressuspenso em tampão de lise de forma a ficar em uma concentração de 10<sup>5</sup> p/mL. Tampão de lise – Tampão RIPA 1x, tampão de proteína 1x, inibidor de protease 1x. RIPA 10x – 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS. Tampão de amostra 4x - 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% de glicerol; 2% de SDS; 5% de β-mercaptoetanol; 0,002% de azul de bromofenol. As amostras foram seringadas 10 vezes em seringa de insulina de 1 mL

(13x0,45 mm-26G 1/2) e fervidas por 10 minutos. A seguir os extratos foram separados em gel de poliacrimamida 10% a 180 volts por 60 minutos. Ao término da corrida o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (Amersham Protan 0,45 um- GE Healthcare) por 3 horas a 100 volts em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol). Em seguida a membrana foi incubada com solução de bloqueio por 1 hora (PBS 1x, 0,1% tween, 5% leite em pó desnatado), e logo após com anticorpo primário (diluído em solução de bloqueio contendo 3% de leite desnatado em pó) por 1 hora ou *overnight* dependendo do anticorpo utilizado. A membrana foi lavada 3x com solução de lavagem (PBS 1x, 0,1% tween) e incubada por 1 hora com anticorpo secundário. Passada 1 hora, a membrana foi lavada 3x com solução de lavagem e revelada com solução de revelação (Luminata Western HRP substrate – Millipore) em aparelho fotodocumentador (Gel LOGIC 1500 Imaging System). Para análise de expressão de proteínas utilizando a fração citoplasmática e nuclear, após a centrifugação e lavagem dos parasitos em PBS 1x, estes foram ressuspensos em tampão A (10 mM HEPES pH 8.0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 % NP40, 0,25 % Triton X-100, 5 % glicerol, Inibidor de protease 1x). Em seguida foram incubados no gelo 15 minutos, com agitação eventual e logo após centrifugados a 5000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante, correspondente a fração citoplasmática foi transferido para um novo tubo *ependorf*. Logo após o *pellet* foi ressuspensado em ¾ do volume centrifugado anteriormente, em tampão B (10 mM HEPES pH 8.0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 % glicerol; Inibidor de protease 1x) e mantido no gelo por 10 minutos. Em seguida o tubo foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*,



correspondente a fração nuclear, foi ressuspensionado no mesmo volume da fração citoplasmática. Para a análise por *western blot*, foi seguido o mesmo procedimento como descrito acima para as frações totais.

### **3.10 Extração de RNA total e análise por *northern blot***

O equivalente a  $1 \times 10^9$  formas epimastigotas foram centrifugadas a 1200 x g por 10 minutos, lavados uma vez com PBS e ressuspensionados em 1 mL de fenol. Em seguida foi adicionado 200  $\mu$ L de clorofórmio. O lisado foi homogeneizado por inversão dos tubos e incubados 3 minutos a temperatura ambiente. Logo após os tubos foram centrifugados a 1200 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol aos tubos que em seguida foram homogeneizados por inversão e incubados 10 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 1200 x g por 10 minutos a 4°C e em seguida o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram lavados com etanol 70%, e após secagem, foram ressuspensionados em H<sub>2</sub>O *RNase free*. Após a extração, os RNAs foram quantificados e o equivalente a 20  $\mu$ g de RNA foi transferido para tubos eppendorfs contendo tampão de amostra 6X (50% glicerol, 50 mM fosfato de sódio, 0,4% bromofenol blue) e H<sub>2</sub>O. Os RNAs foram incubados por 10 minutos a 65°C, resfriados no gelo e separados em gel de agarose 1,2% por duas horas, a 100 volts. Ao final da corrida, os RNAs foram então transferidos para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond-N – GE Healthcare) em tampão SSC 20x e hibridizadas com 100 ng de sonda marcada com 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCT, expostas em cassete e reveladas no aparelho STORM840 PhosphorImager (GE Healthcare).

### 3.11 Eletroforese de campo pulsado (PFGE) e *Southern blot*

Para separação dos cromossomos por eletroforese de campo pulsado o DNA genômico dos parasitos foi primeiro incluído em blocos de parafina. Para tal,  $1 \times 10^8$  formas epimastigotas foram lavadas duas vezes com PBS 1x por centrifugação a  $7.000 \times g$  por 10 minutos e em seguida ressuspensos em 1 mL de agarose *low melting temperature* (Bio-Rad). Alíquotas de 100  $\mu$ L dessa suspensão, contendo aproximadamente  $10^7$  parasitos foram depositadas em formas apropriadas e incubadas a  $4^\circ\text{C}$  para solidificação. Em seguida os blocos foram incubados em solução de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 500 Mm pH 8,0; sarcosil 1%; proteinase K 1mg/mL) a  $56^\circ\text{C}$  por 16 horas e lavados 3x com TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0). Os blocos contendo o gDNA dos parasitos foram separados em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x (25 mM Tris-borato; 0,5 mM EDTA pH 8,0) por eletroforese de campo pulsado juntamente com um padrão de peso molecular comercial de *Hansenula wingei* (BioRad). As corridas eletroforéticas foram realizadas por 135 horas com voltagem constante (80 V) a  $13^\circ\text{C}$  em aparelho *Gene Navigator System* (Pharmacia). Foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 s por 30 hrs, 120 s por 30 hrs, 200 s por 24 hrs, 350 s por 25 hrs e 800 s por 26 hrs, com interpolação. Após a separação cromossômica os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e fotografados. Em seguida o gel contendo os cromossomos foi tratado com solução de depuração (125 mM HCl) por 15 minutos, solução de desnaturação por 30 minutos (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) e por último 2 vezes com solução de neutralização (Tris HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M) por 15 minutos. Na sequência os cromossomos foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond-N+ - GE Healthcare Life Sciences) em

solução SSC 20x e incubada com 100 ng de sonda marcada com 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCT , expostas em cassete e reveladas no aparelho STORM840 PhosphorImager (GE Healthcare).

### **3.12 Análise por citometria de fluxo**

Parasitos foram centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e ressuspensos em 400  $\mu$ L de solução de PBS 1x. Em seguida foram novamente centrifugados a 1200 x g e ressuspensos em 200  $\mu$ L de solução de paraformaldeído 2%. Após o término da centrifugação os parasitos foram ressuspensos em 400  $\mu$ L de PBS 1x, de forma a ficar em uma concentração final de  $10^5$  parasitos. Os parasitos fixados foram analisados no citômetro FACScan (BD FACS Scan flow cytometer).

### **3.13 Análise dos parasitos por microscopia de luz e de fluorescência**

Para análise por microscopia de fluorescência, os parasitos foram fixados em paraformaldeído como descrito no item acima, transferidos para lâminas de 25x75mm, previamente tratadas com poli-lisina e analisados por microscopia de fluorescência (Microscópio Óptico de Fluorescência Axio Imager Z2 – ApoTome 2-Zeiss). Para análise dos parasitos por microscopia de luz, foi feito esfregão dos parasitos em lâminas de 25x75mm, previamente tratadas com poli-lisina. Após a secagem as lâminas foram incubadas na estufa por 1 hora a 80°C. Os parasitos foram fixados com metanol por 5 minutos e logo após, sem retirar o metanol foi acrescentado 20  $\mu$ L do reagente Giemsa. As lâminas foram incubadas com Giemsa por 30 minutos a temperatura ambiente e logo após lavadas com H<sub>2</sub>O corrente, para retirada do excesso de Giemsa. Em seguida foi acrescentada três gotas de entellan e lamínulas 22x22

mm foram fixadas. Ao final do processo, os parasitos foram analisados em microscópio Zeiss com módulo Apotome no Centro de Microscopia da UFMG

## 4. Resultados

### 4.1 Otimização de protocolos de transfecção utilizando o *nucleofector* e expressão regulada por tetraciclina

Tendo por base o trabalho de Burkard e colaboradores publicado em 2007 [32], que mostrou que a transfecção de formas sanguíneas do *T. brucei*, utilizando o *nucleofector*, resulta em uma maior eficiência de transfecção, comparada ao método convencional de eletroporação (BTX ECM 600 *electroporation system*), a eficiência de transfecção de formas epimastigotas do *T. cruzi* utilizando o *nucleofector* foi comparada com o sistema de eletroporação convencional utilizando o *Gene Pulser II Eletroporation System* (BioRad). O *nucleofector* possui uma série de programas, que definem parâmetros como corrente elétrica, tempo de descarga, etc diferentes, mas que não são revelados pela empresa. Também é oferecida pela empresa uma variedade de tampões célula-específicos, para serem utilizados na transfecção de diferentes tipos celulares.

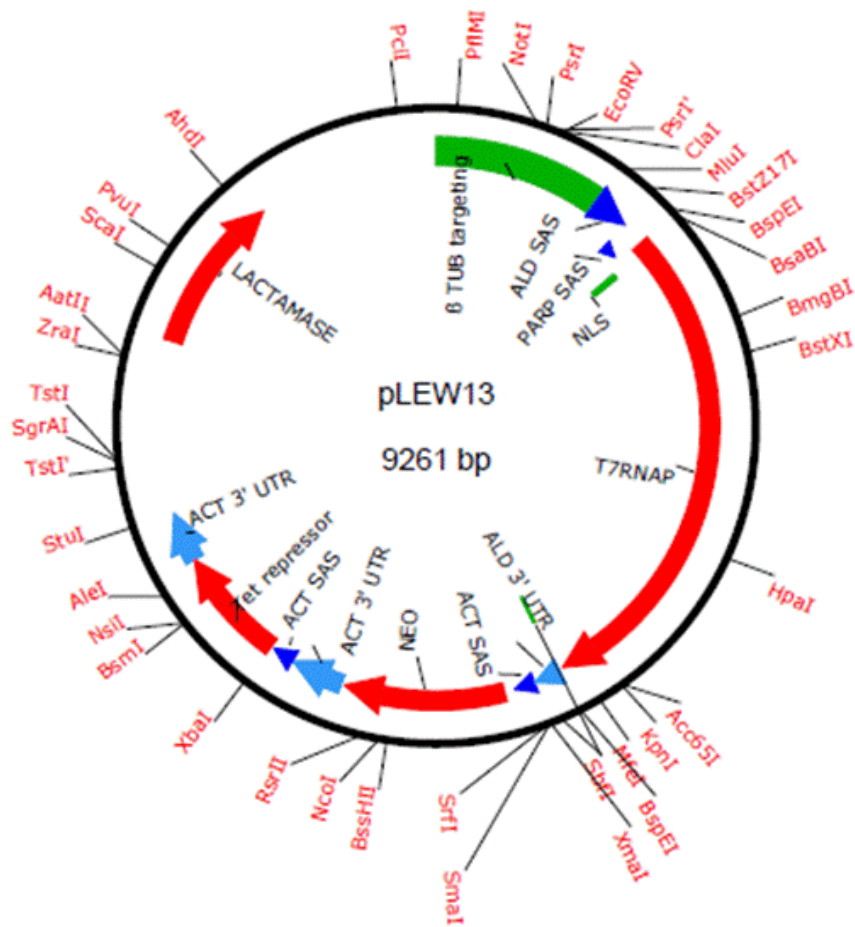
Primeiramente para avaliar qual seria o melhor programa para transfecção do *T. cruzi* utilizando *nucleofector*, foram testados três programas e dois tampões diferentes que são sugeridos pela empresa para utilização em parasitas. Parasitos do clone CL Brener foram transientemente transfectados com 10 µg do plasmídeo pTREXGFPNeo circular. Este plasmídeo contém o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) flanqueado na região 5' pela sequência de HXI, para adição da sequência *SL* e na região 3' pela IR do gene *gapdh*, para a adição da cauda poli A, sob o controle do promotor do

rRNA. Quarenta e oito horas após a transfecção, a porcentagem de parasitos expressando GFP foi avaliada por citometria de fluxo. Foi observado que a melhor eficiência de transfecção foi obtida com o programa U033 associada à solução II (dados não mostrados). Em seguida a eficiência de transfecção utilizando o *nucleofector* e o *gene pulser system* foi comparada. Parasitos foram transfectados utilizando o *nucleofector* com 5, 10, 50 ou 100 µg do pTREXGFPNeo circular com o tampão de transfecção que foi publicado por Schumann e colaboradores em 2011 [83] e utilizando o programa U033. Em paralelo, culturas idênticas de parasitos foram transfectadas no *gene pulser system* como descrito por DaRocha *et al*, 2004 [27], com as mesmas quantidades de plasmídeo que foram utilizadas para a transfecção no *nucleofector*. Quarenta e oito horas após a transfecção a porcentagem de parasitos expressando GFP foi avaliada por microscopia de fluorescência. Foi observado que a transfecção no *nucleofector* utilizando 5 µg de DNA resulta em uma eficiência de transfecção 2 vezes maior que a transfecção no *gene pulser system* utilizando uma quantidade de DNA vinte vezes maior (tabela 1 – *nucleofector* 5 µg X *gene pulser* 100 µg). Essa diferença ficou ainda mais evidente quando foi utilizado 50 µg de plasmídeo na transfecção. Enquanto no *nucleofector* foi observado em torno de 21% dos parasitos expressando GFP, a transfecção no *gene pulser system* resultou em apenas 1% da população de parasitos expressando GFP.

Plasmídeo [ ] µg	% parasitas verdes com <i>gene pulser</i>	% parasitas verdes com <i>nucleofetor</i>
5	0	5,5
10	0	14
50	1	21,5
100	2,5	16,4

**Tabela II. Comparação da eficiência de transfecção entre o *nucleofetor* e o sistema de eletroporação convencional.** Parasitos foram transientemente transfectados com 5, 10, 50 e 100 µg do plasmídeo pTrexGFPNeo utilizando os sistemas de transfecção *nucleofetor* ou *gene pulser system*. Quarenta e oito horas após a transfecção a porcentagem de parasitos expressando GFP foi avaliada por microscopia de fluorescência. Resultado referente á média de três experimentos independentes.

Após a otimização do protocolo de transfecção utilizando *nucleofector*, o nosso próximo objetivo foi tentar otimizar um sistema de expressão regulado por tetraciclina em *T. cruzi*, o qual, por estar muito bem estabelecido para o *T. brucei*, tornou-se uma poderosa ferramenta para se investigar a função de genes nesse parasito. Em 2004, DaRocha e colaboradores desenvolveram um sistema para expressão regulada em *T. cruzi* [38]. Eles utilizaram o plasmídeo pLEW13 (figura 7) para estabelecimento de linhagens expressando a T7 RNA pol e o repressor da tetraciclina de forma constitutiva. O pLEW13 é um plasmídeo de expressão em *T. brucei*, por esse motivo, possui sequências para adição da sequência SL e cauda poli A, deste organismo. Para avaliar se a presença do promotor de rRNA do *T. cruzi* resultaria em maiores níveis de expressão da T7 RNA pol e do repressor da tetraciclina, DaRocha e colaboradores clonaram a sequência correspondente ao promotor ribossômico do *T. cruzi* no plasmídeo pLEW13. Em seguida os parasitos transfectados com pLEW13 + promotor ribossômico do *T. cruzi* foram transfectados com um plasmídeo contendo a expressão do gene que codifica a luciferase de vagalume (FLuc) e do gene que confere resistência a higromicina sob o controle do operador da tetraciclina e o promotor da T7 RNA pol ( $pP_{T7}O^{tet}/Luc$ ). Esse plasmídeo foi desenvolvido para integrar no gene não essencial *TCR27*. Após a indução da expressão de FLuc com tetraciclina, análises de ensaio da atividade de luciferase dessas linhagens demonstraram uma alta expressão de FLuc antes da adição da tetraciclina.

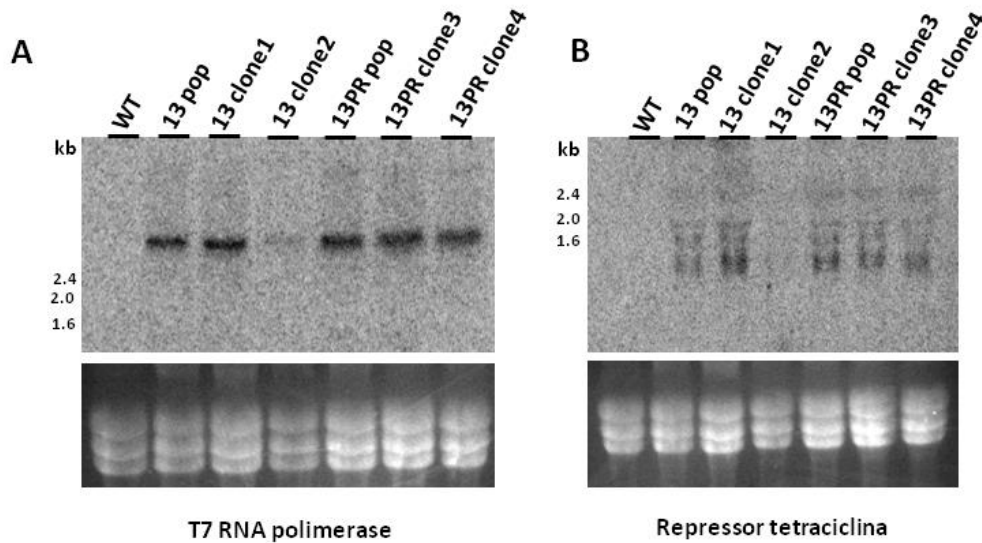


**Figura 7. Plasmídeo pLEW13.** O plasmídeo pLEW13 foi desenvolvido para expressão de T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina no *T. brucei* [36]. Retirado de [http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2\\_plasmids.html](http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_plasmids.html).



Da mesma forma como foi feito por DaRocha e colaboradores em 2004, a sequência correspondente ao promotor de rRNA do *T. cruzi* foi clonada no pLEW13, para avaliar se isso implicaria em um aumento nos níveis de proteína em relação ao vetor sem o promotor. Para isto, o plasmídeo pROCKGFPNeo, foi utilizado como molde em uma PCR para amplificação da sequência correspondente ao promotor ribossômico (iniciadores PRcruziF e PRcruziR). O fragmento de 583 pares de bases foi clonado no TOPO, digerido com *Mlu*I, purificado do gel de agarose e clonado no plasmídeo pLEW13, previamente digerido com *Mlu*I, gerando o plasmídeo pLEW13PR. Em seguida os plasmídeos pLEW13 e pLEW13PR foram digeridos com a enzima de restrição *Not*I, para linearização, e transfectados separadamente. Após a seleção dos parasitos com G418, foi feita a clonagem de células por diluição limitante em placas de 96 poços. Para a análise da expressão da T7 RNA pol e o repressor da tetraciclina, RNA total foi extraído dos clones, separado em gel de agarose e transferido para membranas de nitrocelulose e incubado com sondas correspondentes a região codificadora da T7 RNA pol (figura 8A) ou do repressor da tetraciclina (figura 8B) marcadas com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP. As sondas foram obtidas por reações de PCR utilizando o plasmídeo pLEW13 como molde e iniciadores anelando no início e no final das regiões codificadores da T7 RNA pol e repressor da tetraciclina (iniciadores SondaT7F e SondaT7R para T7 RNA pol e SondaTetrF e SondaTetrR para o repressor). Como mostra a figura 8, o mRNA para T7 RNA pol do tamanho esperado (2,6 kb) pode ser detectado e a introdução do promotor de rRNA do *T. cruzi* no pLEW13 não resultou em aumento nos níveis de mRNA de T7 RNA pol ou do repressor da tetraciclina. Entretanto, um padrão de bandas semelhante a um padrão de

degradação do RNA, observado na figura 8B pode ser referente ao processamento incorreto do mRNA do repressor de tetraciclina, visto que as sequências presentes no pLEW13 para processamento do mRNA são derivadas do genoma do *T. brucei*. As sequências para adição do SL e cauda poli-A no mRNA de T7 RNA pol, presentes no pLEW13 são derivadas do gene que codifica a proteína aldolase. Para o gene do repressor, as sequências responsáveis pelo processamento do mRNA são derivadas do gene de actina e podem não conter os elementos necessários para o correto processamento do mRNA do repressor no *T. cruzi*.



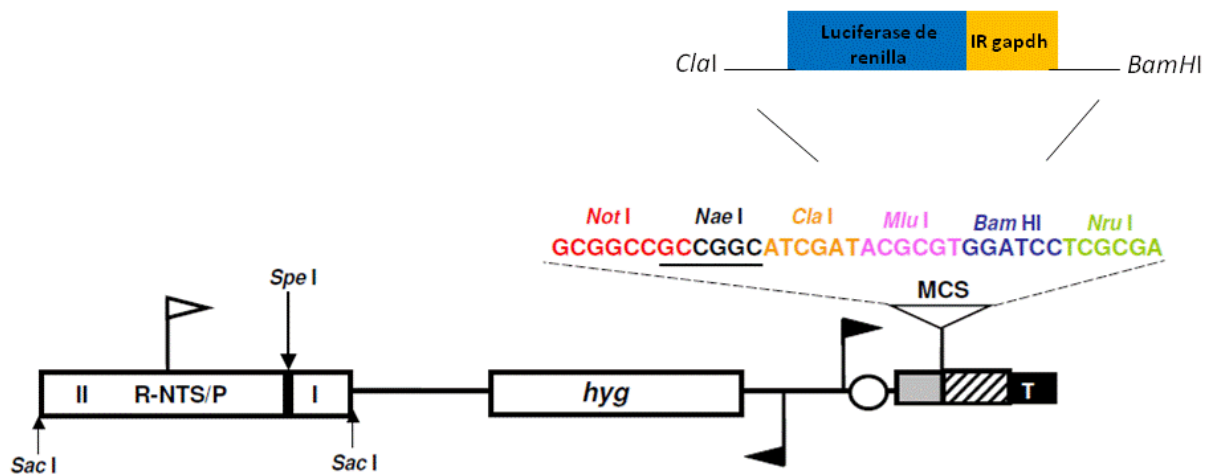
**Figura 8. Northern blot para detecção da expressão da T7 RNA polimerase e repressor da tetraciclina.** RNA total de parasitos transfectados com o pLEW13 e pLEW13PR foi extraído, transferido para membranas de nitrocelulose e incubadas com uma sonda correspondente a região codificadora da T7 RNA polimerase (A) ou do repressor da tetraciclina (B). Tamanho predito da sequência de DNA correspondente à região codificadora da T7 RNA pol – 2.6 kb. Tamanho predito da sequência de DNA correspondente à região codificadora do repressor da tetraciclina – 624 pares de base. WT - não transfectado, 13 pop – transfectado com pLEW13, população; 13 clone – transfectado com pLEW13, clone; 13PR pop – transfectado com pLEW13 com promotor de rRNA de *T. cruzi*, população; 13PR clone - transfectado com pLEW13 com promotor de rRNA de *T. cruzi*, clone.

Considerando que o sistema de expressão regulado por tetraciclina utilizado por DaRocha e colaboradores em 2004 apresentou altos níveis de expressão da proteína antes da adição da tetraciclina, resolvemos utilizar o plasmídeo pTcINDEX [39], ao invés do pP<sub>T7</sub>O<sup>tet</sup>/Luc, para os testes de expressão regulado por tetraciclina. Uma diferença importante entre esses dois plasmídeos é o fato do pTcINDEX possuir um fragmento da sequência do rRNA o que possibilita sua integração no espaçador de rRNA, enquanto que o plasmídeo pP<sub>T7</sub>O<sup>tet</sup>/Luc, integra no locus do gene *TCR27*. Além disso, o pTcINDEX possui dois promotores da enzima T7 RNA pol direcionados para lados opostos. De um lado a T7 RNA pol promove a transcrição do gene de resistência a higromicina e do lado oposto do gene de interesse, sob a regulação do operador da tetraciclina. Dessa forma a seleção dos parasitos após a transfecção é independente da adição de tetraciclina. Com o objetivo de melhorar o desempenho do pTcINDEX, resolvemos fazer algumas modificações neste plasmídeo. Em primeiro lugar decidimos utilizar como gene repórter a luciferase de renilla (Rluc), pois os ensaios da atividade dessa proteína resultam em valores maiores de unidade de luz em comparação com o ensaio da atividade de Fluc. Em segundo lugar utilizamos a IR do gene *gapdh* como sequência responsável pela adição da cauda poli A, visto que DaRocha e colaboradores já demonstraram que esta sequência é capaz de promover o correto processamento de mRNAs em *T. cruzi* [27]. O plasmídeo pTcDUALuc [19] foi utilizado em uma reação de PCR com iniciadores contendo sítio de restrição das enzimas *ClaI* e *BamHI* anelando no início da região codificadora da Fluc e no final da IR de *gapdh* (iniciadores renillaClaF e renillaBamR). O produto de PCR de 1.6 kb foi clonado no vetor TOPO 2.1 e bactérias

quimiocompetentes foram transformadas com essa ligação. Os clones positivos foram selecionados por PCR de colônia utilizando os iniciadores M13. Em seguida um clone positivo foi digerido com as enzimas de restrição *ClaI* e *BamHI*, purificado do gel de agarose e clonado no plasmídeo pTcINDEX, gentilmente cedido pelo Professor Martin Taylor da Universidade de Londres, previamente digerido com as mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo pTcINDEXrenilla (figura 9).

Para os ensaios da atividade de luciferase, as linhagens 13 clone1 e 13PR clone4 foram transfectadas com o plasmídeo pTcINDEXrenilla e após a seleção com higromicina, a expressão de Rluc foi induzida com 0,5 µg/mL de tetraciclina (tabela III) por 24 horas. Extratos correspondentes a  $2 \times 10^7$  parasitos (tabela III) ou  $2 \times 10^5$  (tabela IV) foram incubados com o substrato de Rluc, coelenterazina, e a bioluminescência produzida foi determinada. A tabela III mostra a relação  $Tet^+/Tet^-$  que foi obtida para cada uma das duas linhagens. Considerando que os parasitos transfectados com o pLEW13 contendo o promotor de rRNA do *T. cruzi*, apresentaram uma maior expressão de Rluc após a adição da tetraciclina, essa linhagem foi utilizada para seleção de clones. Em seguida três clones (denominados 13PR/3 clone a, 13PR/3 clone c e 13PR/3 clone e) foram utilizados para análise da expressão de Rluc por meio de ensaios da atividade desta enzima, como já descrito acima. Como mostra a tabela IV, foram obtidas leituras da atividade de luciferase antes e após a adição de tetraciclina que forneceram uma relação obtida  $Tet^+/Te^-$  melhor para o clone c, alcançando uma relação de 4,7. Essa relação está muito abaixo da relação que é obtida para expressão regulada por tetraciclina no *T. brucei*, no qual um aumento de até 1000 vezes na expressão do gene de interesse é

obtido após a adição de tetraciclina [36]. A alta expressão de Rluc antes da adição da tetraciclina no sistema aqui desenvolvido está provavelmente ligada aos baixos níveis de repressor que estão sendo produzidos pelo *T. cruzi*. Dessa forma mesmo antes da adição da tetraciclina, a quantidade de repressor produzida pelo parasito não é suficiente para impedir a transcrição do gene da luciferase de renilla pela T7 RNA pol.



**Figura 9. Esquema do plasmídeo de expressão regulada por tetraciclina pTcINDEX.** R-NTS/P (*ribosomal non-transcribed spacer and promoter region*) região espaçadora de RNA e promotor utilizado para integrar o plasmídeo no genoma do parasito. Os números romanos I e II indicam as duas partes da sequência alvo que foram clonadas na posição oposta em que estão no genoma. A sequência correspondente a luciferase de renilla + IR do gene *gapdh* foi clonada no pTcINDEX utilizando os sítios de restrição de *ClaI* e *BamHI*. A bandeira branca indica o local de início da transcrição pela RNA pol I. O sítio de *SpeI* é utilizado para linearização do plasmídeo, para subsequente integração no genoma do parasito. As bandeiras pretas indicam o promotor da T7 RNA polimerase. A bola branca indica o operador da tetraciclina. MCS- sítio múltiplo de clonagem, quadrado cinza – sequência HXI do *T. cruzi*, quadrado com listras – região intergênica do gene que codifica actina, quadrado com T - terminador da T7 RNA polimerase. Adaptado de Taylor & Kelly, 2006 [39].

<b>Linhagem</b>	<b>Tet-</b>	<b>Tet+</b>	<b>Tet-/Tet+</b>
<b>13clone1</b>	<b>11.415.398</b>	<b>31781.756</b>	<b>2,7</b>
<b>13PRclone3</b>	<b>2.498.331</b>	<b>34.271.341</b>	<b>13,7</b>

**Tabela III. Ensaio da atividade de Rluc.** Extratos de parasitos cultivados na presença (Tet+) ou ausência (Tet-) de 0,5 µg/mL de tetraciclina por 24 horas foram lisados, incubados com substrato e a bioluminescência obtida medida utilizando Luminômetro. A leitura de cada extrato foi realizada em triplicata. A atividade está representada como a média relativa à unidade de luz (RLU) por  $2 \times 10^7$  parasitos. 13clone1- parasitos transfectados com pLEW13 clone 1, 13PRclone3 – parasitos transfectados com pLEW13 contendo o promotor de rRNA de *T. cruzi*.

<b>Linhagem</b>	<b>Tet-</b>	<b>Tet+</b>	<b>Tet-/Tet+</b>
<b>13PR/3clone a</b>	<b>528.599</b>	<b>928.065</b>	<b>1,7</b>
<b>13PR/3clone c</b>	<b>376.565</b>	<b>1.806.010</b>	<b>4,7</b>
<b>13PR/3clone e</b>	<b>266.328</b>	<b>287.653</b>	<b>1</b>

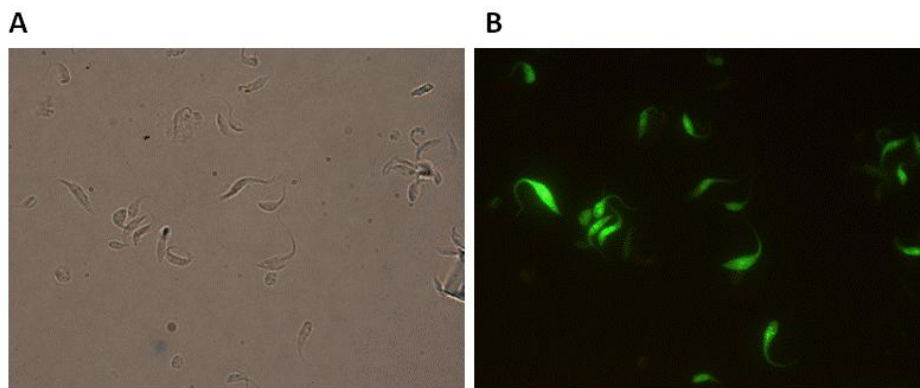
**Tabela IV. Ensaio da atividade de Rluc com clones.** Extratos de parasitos cultivados na presença (Tet+) ou ausência (Tet-) de 0,5 µg/mL de tetraciclina por 24 horas foram lisados, incubados com substrato e a bioluminescência obtida foi medida utilizando Luminômetro (Lumat LB9501). A leitura de cada extrato foi realizada em triplicata. A atividade está representada como a média relativa à unidade de luz (RLU) por  $2 \times 10^5$ . 13PR/3clone – clones de parasitos transfectados com pLEW13 contendo o promotor de rRNA de *T. cruzi* e com o plasmídeo pTcINDEX.



## 4.2 Edição do genoma do *T. cruzi* utilizando ZFNs

### 4.2.1 Geração de linhagem de *T. cruzi* expressando GFP constitutivamente

Para construção do vetor pROCKeGFPNeo, o plasmídeo pPRdeINA183GFP157 [84], gentilmente cedido pelo Doutor Alexandre Machado do Instituto de Pesquisa René Rachou, contendo o gene que codifica a proteína *enhanced* GFP (eGFP) foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Sa*II, liberando um fragmento de 738 pares de bases. O fragmento foi purificado do gel de agarose e clonado no plasmídeo pROCKGFPNeo, previamente digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I, resultando na substituição do gene que codifica a proteína GFP pelo gene que codifica eGFP, dando origem ao plasmídeo pROCKeGFPNeo. Para confirmação da clonagem, os clones positivos foram digeridos com as enzimas *Xba*I e *Sph*I, devendo liberar um fragmento de 5,6 e um de 2,0 kb (dados não mostrados). Após a confirmação da clonagem, formas epimastigotas do clone CL14 em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas com o plasmídeo pROCKeGFPNeo e selecionadas por 4 semanas em meio LIT contendo o antibiótico G418. Após a seleção, a população de parasitos expressando eGFP, foi plaqueada em placas ágar-sangue para obtenção de clones, 12 dos quais foram analisados por microscopia de fluorescência (figura 10).

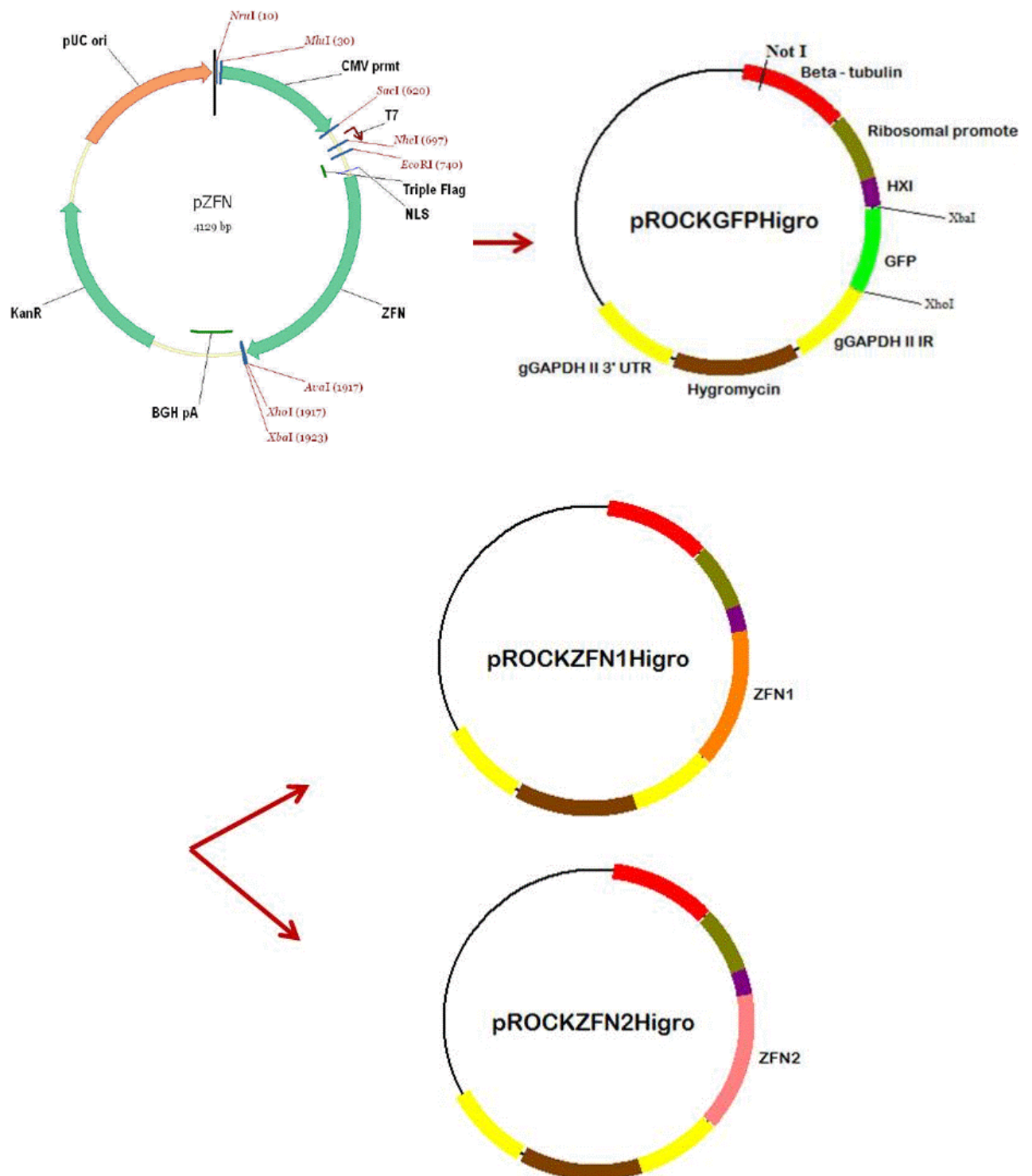


**Figura 10. Formas epimastigotas do *T. cruzi* expressando eGFP constitutivamente.** Parasitos do clone CL14 foram transfectados com o plasmídeo pROCKeGFPNeo e após a seleção da população resistente à neomicina, clones foram selecionados por meio de plaqueamento em ágar-sangue. (A) Campo claro, (B) Fluorescência de eGFP.

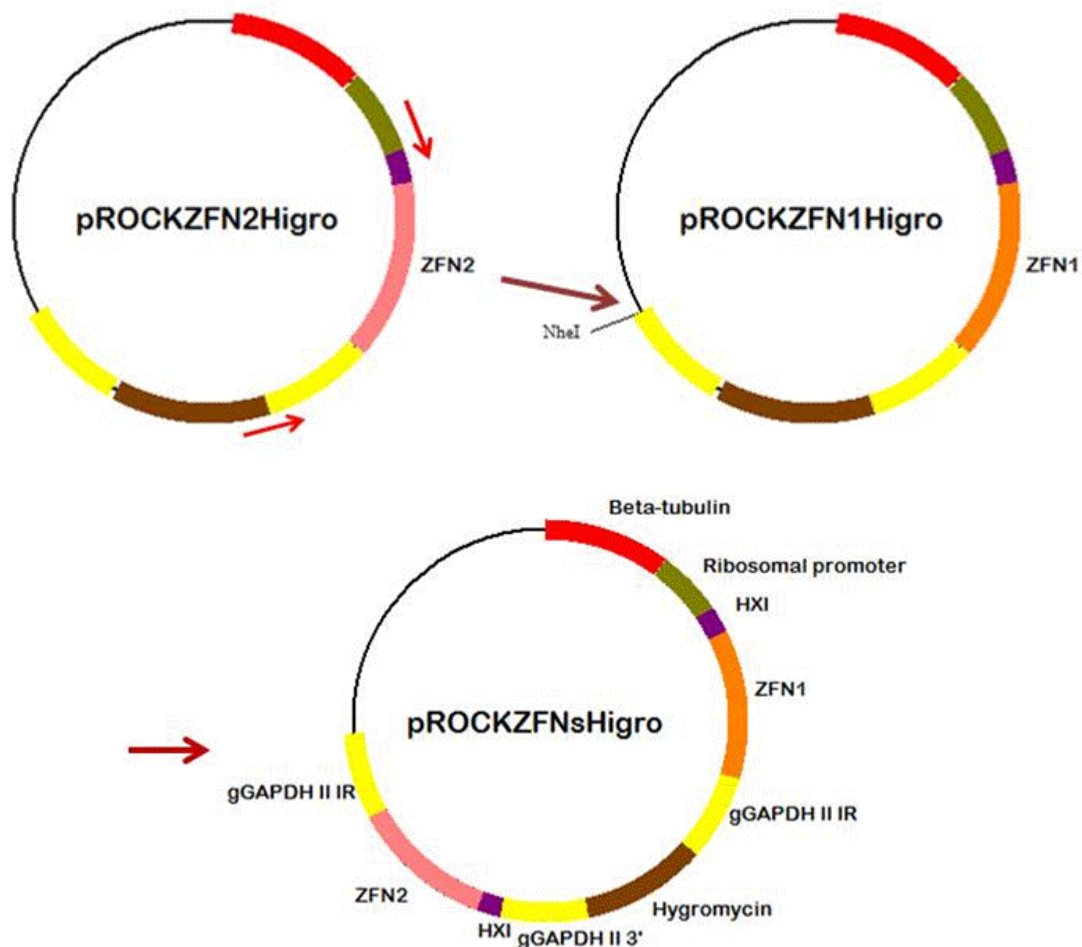
#### 4.2.2 Construção do plasmídeo para expressão de um par de ZFNs em *T. cruzi*

Para obtenção dos plasmídeos contendo os pares de ZFNs, os plasmídeos pZFN1 e pZFN2, contendo as sequências codificadoras de ZFN1 ou a ZFN2 construídas pela empresa Sigma Aldrich para terem as sequências de *egfp* ou de *gp72* como alvos, foram digeridos com as enzimas *NheI* e *XhoI*, liberando os fragmentos correspondentes às sequências das ZFNs. Os fragmentos correspondentes a ZFN1 e 2 foram clonados separadamente no vetor pROCKGFPHigro, previamente digerido com as enzimas *XbaI* e *XhoI*, para substituição de GFP por ZFN, gerando os plasmídeos pROCKZFN1<sup>eGFP</sup>, pROCKZFN2<sup>eGFP</sup>, pROCKZFN1<sup>GP72</sup> e pROCKZFN2<sup>GP72</sup> (figura 11A). Reações de PCR utilizando iniciadores anelando no início da sequência correspondente a HXI e no final da IR de *gapdh* foram feitas para amplificação da sequência de ZFN2 (iniciadores ZFN2NheF e ZFN2NheR). O fragmento de 2.1 kb foi inicialmente clonado no vetor de clonagem TOPO 2.1, e em seguida digerido com a enzima de restrição *NheI*. O fragmento correspondente a HXI-ZFN2-gGAPDH foi purificado do gel de agarose e clonado no plasmídeo pROCKZFN1<sup>eGFP</sup>Higro, para a ZFN tendo *egfp* como alvo ou pROCKZFN1<sup>GP72</sup>Higro, para a ZFN que tem o gene *gp72* como alvo, dando origem aos plasmídeos pROCKZFNs<sup>eGFP</sup>Higro e pROCKZFNs<sup>GP72</sup>Higro (figura 11B). Como mostra a figura 11B, para ambos os pares de ZFNs (tendo como alvos sequências de *egfp* e a sequência de *gp72*) os vetores construídos possuem as sequências codificadoras de ZFNs flanqueadas por sinais de adição de SL do gene da proteína ribossômica TcP2β e *gapdh*. Ambas as sequências são transcritas pelo promotor de rRNA.

A



B



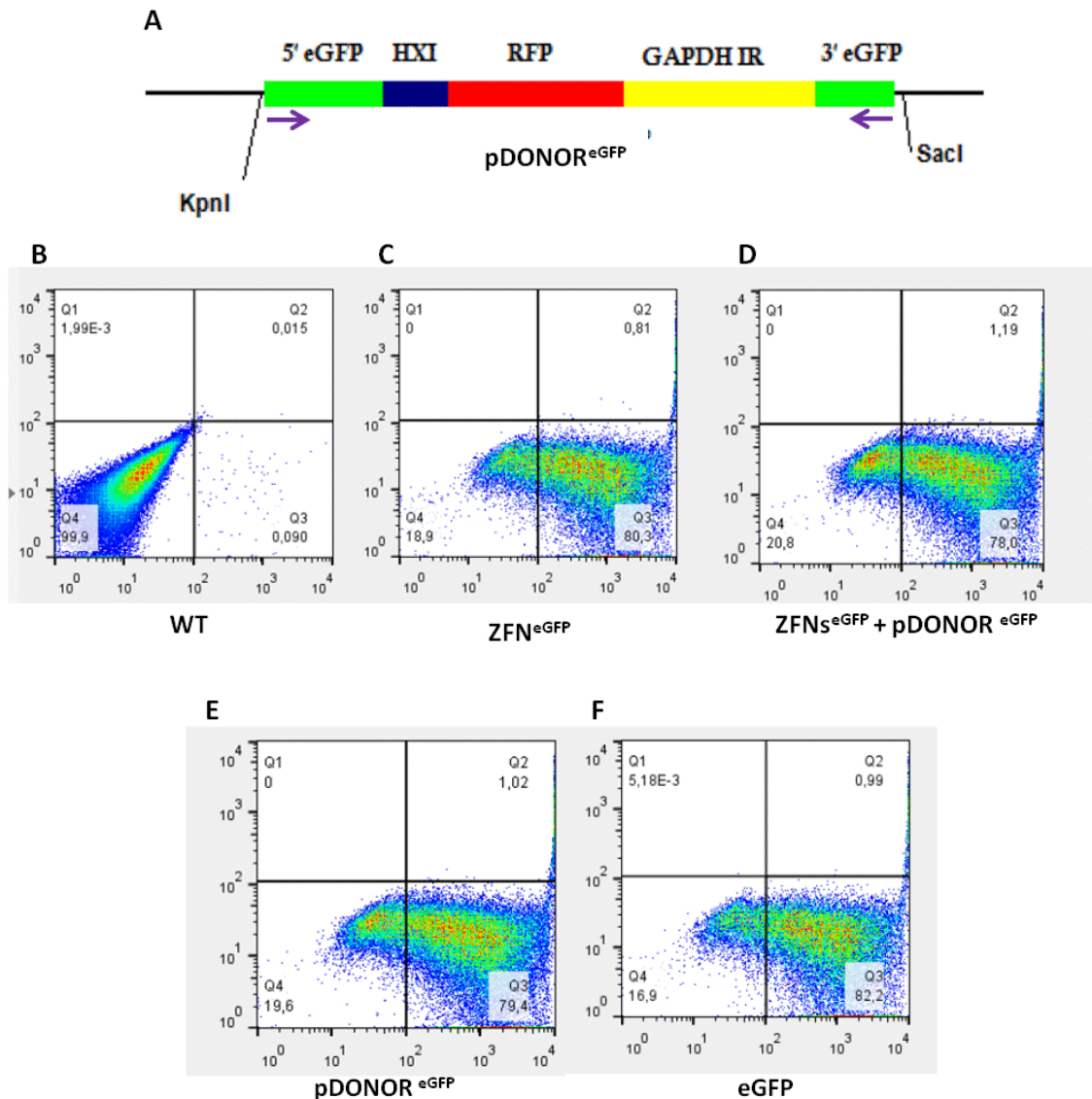
**Figura 11. Construção dos plasmídeos de expressão constitutiva contendo o par de ZFNs que tem *egfp* ou *gp72* como alvo.** Ambas as ZFNs possuem uma *tag* N-terminal de 3x FLAG e um sinal de endereçamento nuclear (NLS) de SV 40. O plasmídeo desenvolvido pela empresa Sigma Aldrich pZFN contendo a ZFN1 e/ou ZFN2 foi digerido com *NheI* e *XhoI* e os fragmentos liberados foram clonados separadamente no plasmídeo pROCKHigro, dando origem aos plasmídeos pROCKZFN1Higro e pROCKZFN2Higro (A). Em seguida foram utilizados iniciadores com sítio da enzima de restrição *NheI*, anelando nas sequências correspondentes a HXI e gGAPDH II IR para amplificar a sequência correspondente a ZFN2. O fragmento amplificado foi clonado no plasmídeo pROCKZFN1Higro previamente digerido com a mesma enzima de restrição, dando origem aos plasmídeos pROCKZFNs<sup>eGFP</sup>Higro e pROCKZFNs<sup>GP72</sup>Higro.

#### 4.2.3 Determinação do fenótipo dos parasitos expressando ZFNs que tem o gene *egfp* como alvo

Os parasitos expressando eGFP foram transfectados com o plasmídeo pROCKZFNs<sup>eGFP</sup>Higro e após a seleção com higromicina, foram analisados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. O resultado esperado se as ZFNs estivessem clivando o gene *egfp*, seria a perda da fluorescência verde, visto que o único mecanismo que o *T. cruzi* possui para reparar uma quebra na dupla fita quando uma sequência com homologia não está disponível é por MMEJ, mecanismo que insere deleções na sequência de DNA, e consequentemente a perda de sua função [54]. No entanto, após a transfecção e seleção dos parasitos com as ZFNs<sup>eGFP</sup>, não foi observada perda de fluorescência verde (dados não mostrados). Decidimos então transfectar os parasitos com uma sequência contendo o gene que codifica a proteína mRFP flanqueado por sequências de *egfp* (pDONOR<sup>eGFP</sup> - figura 12A), a fim de promover a recombinação com o gene *egfp* previamente inserido no genoma do parasito e avaliar se a presença das ZFNs resultaria em uma maior eficiência de recombinação. Para construção do pDONOR<sup>eGFP</sup> foram utilizados iniciadores para amplificação da sequência referente à região codificadora do gene *mrfp* (*monomeric red fluorescent protein*) flanqueado pelas sequências de HXI e IR de *gapdh* e contendo o sítio de restrição das enzimas *Bam*HI e *Spe*I (iniciadores HXI-mRFPF e *gapdh*R). O fragmento amplificado foi clonado no plasmídeo TOPO 2.1, digerido com *Bam*HI e *Spe*I e o produto liberado foi clonado no plasmídeo pBluescript II SK (+), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, dando origem ao plasmídeo pBmRFP. Logo após as sequências correspondentes a 5' *upstream* e 3' *downstream* do gene

*egfp* foram amplificadas (iniciadores 5'eGFPP, 5' eGFPR, 3'eGFPP e 3'eGFPR) e clonadas no pBmRFP dando origem ao plasmídeo pDONOR<sup>eGFP</sup>.

Para avaliar se a co-transfecção do pDONOR<sup>eGFP</sup> com o plasmídeo contendo o par de ZFNs acarretaria em uma maior eficiência de recombinação, decidimos transfectar parasitos expressando eGFP de forma transiente com as ZFNs junto com o pDONOR<sup>eGFP</sup>. Iniciadores anelando no início da sequência 5'eGFP e no final da sequência 3'eGFP (iniciadores 5'eGFPP e 3'eGFPR) foram utilizados em uma reação de PCR tendo o plasmídeo pDONOR<sup>eGFP</sup> como molde, a fim de gerar uma sequência linear que pudesse ser usada para recombinar com o gene de *egfp* integrado no genoma do parasito. Inicialmente 5 µg e 45 µg de pDONOR<sup>eGFP</sup> linear foram utilizados em diferentes transfecções juntamente com 10 µg de pROCKZFNs<sup>eGFP</sup>Higro. Como não foi observado nenhum fenótipo decidimos aumentar a quantidade do pDONOR<sup>eGFP</sup> linear e desta forma, foi utilizado 100 µg deste plasmídeo. Quarenta e oito horas após as transfecções, os parasitos foram fixados em solução de paraformaldeído 2% e analisados por citometria de fluxo. Como mostra a figura 12E, 82% da população CL14 eGFP expressa eGFP. Após a transfecção com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> e com o pDONOR<sup>eGFP</sup> não houve diminuição da expressão de *egfp*, tampouco ganho de fluorescência vermelha (12C).



**Figura 12. Análise por citometria de fluxo dos parasitos transfectados de forma transiente com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> e um plasmídeo contendo seqüências para recombinar com *egfp*.** Para testar a capacidade das ZFNs<sup>eGFP</sup> de aumentar a eficiência de HR no *T. cruzi*, formas epimastigotas expressando eGFP e transfectadas com o plasmídeo pROCKZFNs<sup>eGFP</sup>Higro circular, foram transfectadas com plasmídeo pDONOR<sup>eGFP</sup> linear (ZFNs<sup>eGFP</sup> +pDONOR<sup>eGFP</sup>), ilustrado na figura A. As setas roxas indicam os iniciadores utilizados para gerar a sequênciã linear do pDONOR<sup>eGFP</sup>. Quarenta e oito horas após a transfecção, os parasitos foram analisados por citometria de fluxo. Como controles parasitos não transfectados (WT), parasitos transfectados apenas com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> (ZFNs<sup>eGFP</sup>), parasitos transfectados apenas com o pDONOR<sup>eGFP</sup> (pDONOR<sup>eGFP</sup>) e parasitos expressando eGFP (eGFP), também foram analisados.



Como não foi observada a perda da fluorescência verde após a transfecção dos parasitos com o par de ZFNs, na ausência e na presença de sequências de DNA que possam favorecer o reparo da DSB por recombinação homóloga, decidimos analisar a expressão das ZFNs por *western blot*. Extratos proteicos de parasitos transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> foram separados em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo anti-FLAG. Como mostrado na figura 11A, as sequências dos pares de ZFNs fabricadas pela Sigma possuem em sua extremidade N-terminal uma *tag* de 3X-FLAG, possibilitando a detecção da expressão dessas proteínas por meio da utilização de um anticorpo anti-FLAG. Na figura 14A é possível observar que não foi detectada a expressão das ZFNs com o tamanho esperado de 45 kD, nem mesmo nos parasitos transfectados apenas com uma das ZFNs que compõem o par (ZFN2). Como os resultados dos *westerns blots* utilizando esse anticorpo sempre apresentaram bandas correspondentes à ligações inespecíficas com proteínas do parasito (veja por ex., nas canaletas correspondentes aos parasitos não transfectados [WT] ou aos parasitos transfectados somente com o gene de *egfp*), decidimos gerar parasitos transfectados com ZFNs contendo um *tag* de hemaglutinina (HA) na região N-terminal. Para isso, iniciadores contendo a sequência que codifica a *tag* de HA anelando no início da região codificadora da ZFN1 (iniciador HA-ZFN1FXba) e no final da região codificadora da ZFN1 (iniciador HA-ZFN1RXho) foram utilizados em uma reação de PCR tendo o plasmídeo pZFN1<sup>eGFP</sup> como molde. Em seguida, o produto de PCR foi clonado no TOPO e digerido com *Xba*I e *Xho*I. Após a purificação do produto de PCR do gel de agarose, este foi clonado no plasmídeo pROCKGFP<sub>H</sub>igro, previamente

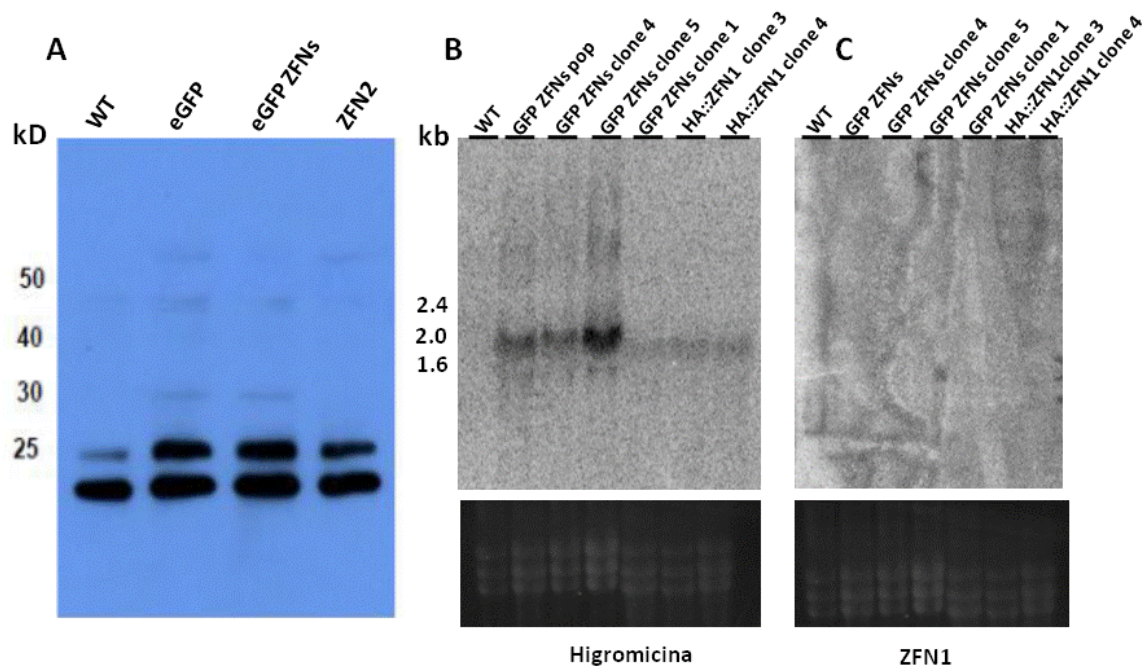
digerido com as mesmas enzimas, liberando GFP e dando origem ao plasmídeo pROCKHA::ZFN1Higro. Logo após o sequenciamento do plasmídeo para confirmação da clonagem correta, formas epimastigotas do clone CL14 WT ou expressando eGFP foram transfectadas com o plasmídeo pROCKHA::ZFN1Higro. Após seleção da população, foram gerados clones e, estes foram utilizados em ensaios de *western blot* com anticorpo anti-HA. Novamente, parasitos transfectados com o plasmídeo pROCKHA::ZFN1Higro, resistentes a higromicina, não apresentaram nenhuma banda correspondente à ZFN1 (dados não mostrados).

Como não foi possível detectar a expressão das ZFNs por *western blot*, decidimos verificar se o mRNA dessas proteínas estava sendo transcrito. Para isso, RNA total de parasitos WT, parasitos expressando eGFP e transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> e parasitos WT transfectados apenas com a HA::ZFN1<sup>eGFP</sup>, foi extraído, separado em gel de agarose e transferido para membranas de nitrocelulose. Visto que a sequência nucleotídica das duas ZFNs<sup>eGFP</sup> (1 e 2) compartilham 97% de identidade, é possível utilizar tanto a ZFN1 ou ZFN2 como sondas para detecção desses mRNAs (figura 13). A figura 14, mostra que embora tenha sido detectada a presença de mRNA correspondente ao gene de resistência à higromicina de aproximadamente 1,8 kb (figura 14B), não foram observadas bandas na membrana hibridizada com uma sonda referente à região codificadora da ZFN1 (figura 14C). Em resumo, os resultados de expressão de eGFP, dos *western blots* e dos *northern blots* indicam que os parasitos transfectados com o plasmídeo contendo o par de ZFNs ou apenas uma ZFN, apesar de estarem expressando o gene de

resistência a higromicina presente no plasmídeo, não expressam os genes correspondentes as ZFNs.



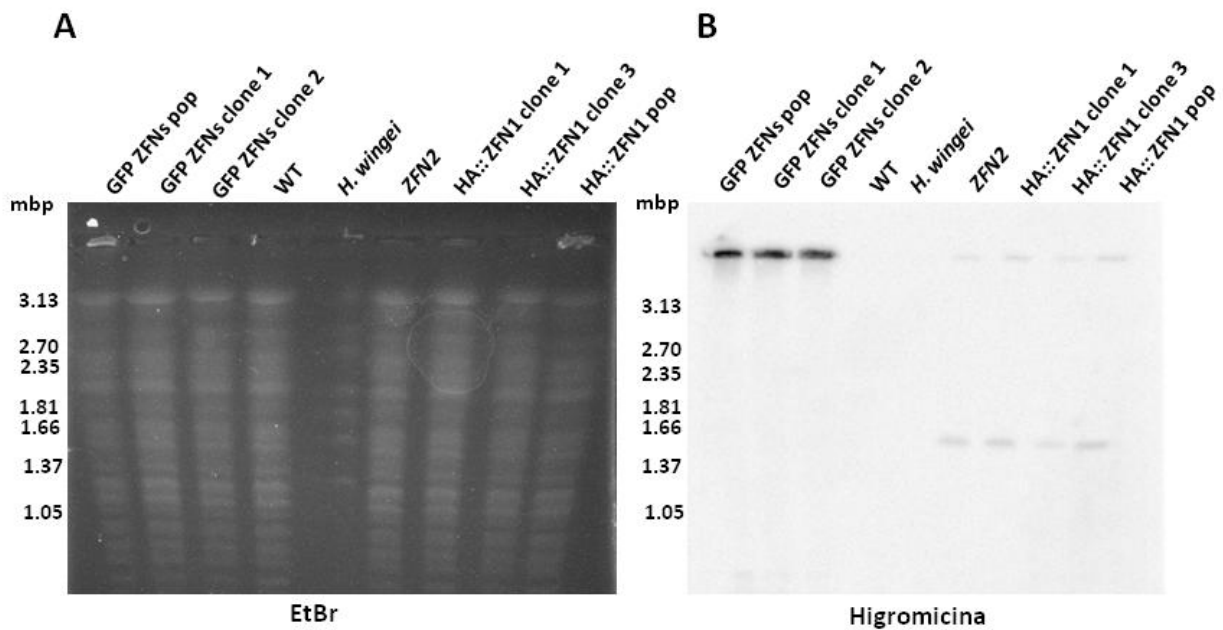
Figura. 13. Alinhamento das seqüências de DNA referentes às regiões codificadoras da ZFN1<sup>eGFP</sup> e ZFN2<sup>eGFP</sup>. As seqüências de DNA referente à região codificadora do par de ZFNs<sup>eGFP</sup> foram alinhadas utilizando o programa MultAlin, disponível em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.



**Figura 14. Análise da expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> por *western* e *northern blot*.**

(A) Extratos de parasitos não transfectados (WT), expressando eGFP (eGFP), expressando eGFP e transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> (eGFP ZFNs) e transfectados apenas com a ZFN2 (ZFN2) foram separados em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo anti-FLAG. Tamanho predito das ZFNs – 45 kD. Para análise da expressão das ZFNs por *northern blot*, RNA total de parasitos não transfectados (WT), a população de parasitos expressando eGFP e transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> (GFP ZFNs pop), clones gerados a partir da população de parasitos expressando eGFP e transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> (GFP ZFNs clone 4; clone 5 e clone 1) e clones de parasitos transfectados apenas com a ZFN1 com *tag* N-terminal de HA (HA::ZFN1 clone 3 e HA::ZFN1 clone 4) foi extraído e separado em gel de agarose. Em seguida os RNAs foram transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com uma sonda correspondente a região codificadora do gene que confere resistência a higromicina (B), ou da ZFN1 (C). Tamanho predito da sequência codificadora de higromicina - 1,0 kb, tamanho predito da sequência codificadora das ZFNs 1.2 kb.

Diante dos resultados negativos dos *western blots* e *northern blots*, decidimos avaliar se a sequência de DNA das ZFNs estaria integrada no genoma do parasito por meio de ensaios de *Southern blots* a partir do DNA dos parasitos transfectados separados por eletroforese de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE – figura 15A). Após transferência do DNA para membranas de nitrocelulose e incubação com uma sonda correspondente a região codificadora do gene de resistência a higromicina ou do gene de ZFN1, verificamos que, apesar dos parasitos transfectados com o par de ZFNs apresentarem o gene de resistência a higromicina, não foi possível detectar nenhum sinal correspondente a hibridização com sequências de ZFNs presentes no genoma dos parasitos. É importante ressaltar que os sinais correspondentes ao gene de resistência a higromicina sugerem que esse gene encontra-se na forma epissomal, visto que foram detectadas bandas de alto peso molecular, características de moléculas de DNA formando estruturas concatenadas (figura 15B). É possível também observar bandas de tamanho molecular mais baixo, correspondente ao gene de resistência a higromicina integrado no genoma do parasito, nos parasitos transfectados apenas com a ZFN1. Os resultados de *Southern blot* indicam que, por meio de um mecanismo de recombinação que não sabemos definir exatamente, o parasito é capaz de manter o gene de resistência a droga presente no plasmídeo, e é capaz de excluir o gene que codifica as proteínas ZFNs. Com base nesses resultados levantamos a hipótese de que a expressão dessas nucleases seria tóxica para o *T. cruzi*.



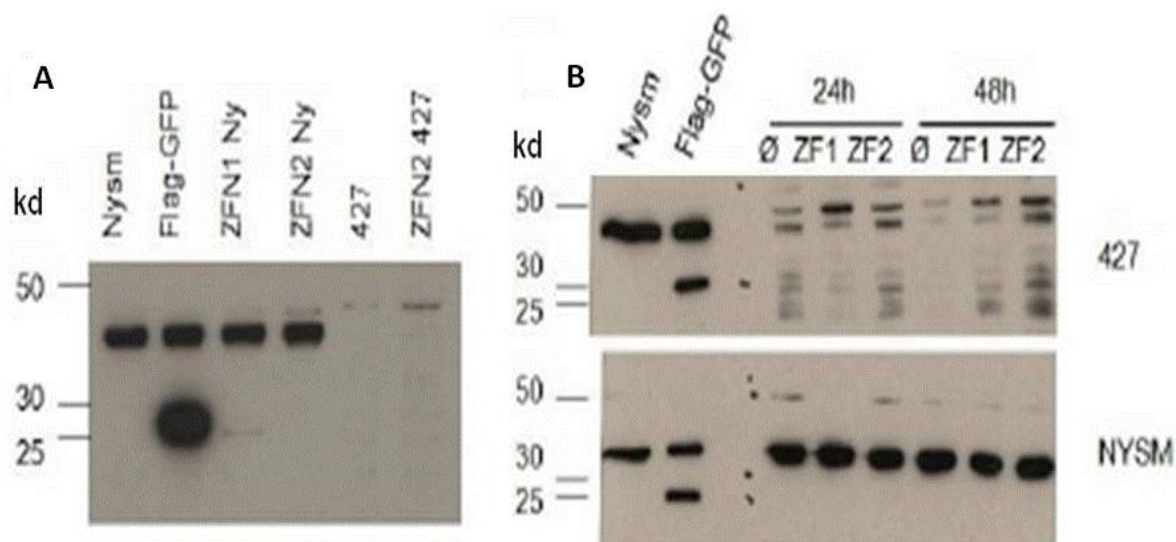
**Figura 15. Análise dos parasitos transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> por PFGE e Southern blot.** DNA gênomico total da população de parasitos expressando eGFP e transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> (GFP ZFNs pop), clones gerados a partir da população de parasitos expressando eGFP e transfectados com as ZFNs<sup>eGFP</sup> (GFP ZFNs clone1 e GFP ZFNs clone2), a população de parasitos transfectados com a ZFN1<sup>eGFP</sup> com tag N-terminal de HA (HA::ZFN1 pop), clones gerados a partir da população de parasitos transfectados com a ZFN1 com tag N-terminal de HA (HA::ZFN1 clone 1 e HA::ZFN clone 3), a população de parasitos transfectados com a ZFN2 com tag N-terminal de 3x FLAG (ZFN2) e parasitos não transfectados (WT), foi extraído e imobilizado em blocos de agarose. Os cromossomos foram separados por eletroforese de campo pulsado por 135 horas com voltagem constante. Ao final da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (A) e em seguida transferido para membranas de nitrocelulose que, logo após, foram incubadas com uma sonda referente a região codificadora de higromicina (B) ou ZFN1 (dado não mostrado), marcadas [ $\alpha$ -32P]. *H. wingei* - Padrão de peso molecular, cromossomos de *Hansenula wingei* (Bio-Rad).

#### 4.2.4 Edição do genoma do *T. brucei* utilizando ZFNs que possuem *egfp* como alvo

Os dados obtidos ao tentarmos obter a expressão de ZFNs construídas para clivar a sequência de *egfp* no genoma do *T. cruzi* indicam que essas nucleases poderiam ser tóxicas para o parasito. Como em *T. cruzi*, um sistema de expressão regulado por tetraciclina não mostrou-se ainda suficientemente otimizado, decidimos testar a expressão das mesmas ZFNs em *T. brucei*, visto que nesse parasito, vetores de expressão controlada por tetraciclina são altamente eficientes. Entretanto antes de testar a expressão das ZFNs regulada por tetraciclina, decidimos avaliar se seria possível expressar as ZFNs<sup>eGFP</sup> de forma estável ou transiente no *T. brucei*. Formas procíclicas e sanguíneas expressando eGFP, foram estavelmente transfectadas com um plasmídeo contendo o par de ZFNs<sup>eGFP</sup>. Após a seleção dos parasitos não foi observada perda da fluorescência verde, por esse motivo, foi feita a análise da expressão das ZFNs por meio de *western blot*. Formas sanguíneas e procíclicas foram transfectadas com um plasmídeo contendo apenas a ZFN1<sup>eGFP</sup> ou a ZFN2<sup>eGFP</sup>. A figura 16A mostra que não foi observado nenhuma banda correspondente as ZFNs, que possuem um tamanho predito de 45 kD, em formas sanguíneas estavelmente transfectadas apenas com a ZFN1<sup>eGFP</sup> (ZFN1 Ny), ou ZFN2<sup>eGFP</sup> (ZFN2 Ny), pois as bandas que foram detectadas correspondem a bandas inespecíficas do anticorpo que reagiu com proteínas do extrato dos parasitos, visto que elas também aparecem nos parasitos não transfectados (Nysm e 427). A figura também mostra que não foi possível detectar a expressão da ZFN2<sup>eGFP</sup> em formas procíclicas estavelmente transfectadas com a ZFN2 (ZFN2 427).

Com base nos dados mostrados para *T. cruzi* e considerando a hipótese de que a expressão das ZFNs possa ser tóxica também para *T. brucei*, formas sanguíneas e procíclicas foram transientemente transfectadas com a ZFN1<sup>eGFP</sup> ou ZFN2<sup>eGFP</sup> na tentativa de diminuir a toxicidade dessas proteínas e desta maneira detectar sua expressão. A figura 16B, mostra que não é possível observar nenhuma banda corresponde a expressão das ZFNs em formas procíclicas transientemente transfectadas com a ZFN1 ou com a ZFN2 (painel de cima – 427), pois todas as bandas detectadas correspondem a ligação inespecífica do anticorpo com proteínas do extrato do *T. brucei*, visto que as mesmas bandas aparecem nos parasitos não transfectados ( $\emptyset$  e NySM). O mesmo resultado foi observado para as formas sanguíneas (painel de baixo - NYSM). Vale ressaltar que nas figuras 16A e 16B, é possível observar uma banda correspondente ao controle positivo do *western blot* (Flag-GFP). O controle positivo foi gerado pela transfecção de formas sanguíneas com um plasmídeo contendo GFP com uma tag N- terminal de 3x FLAG.





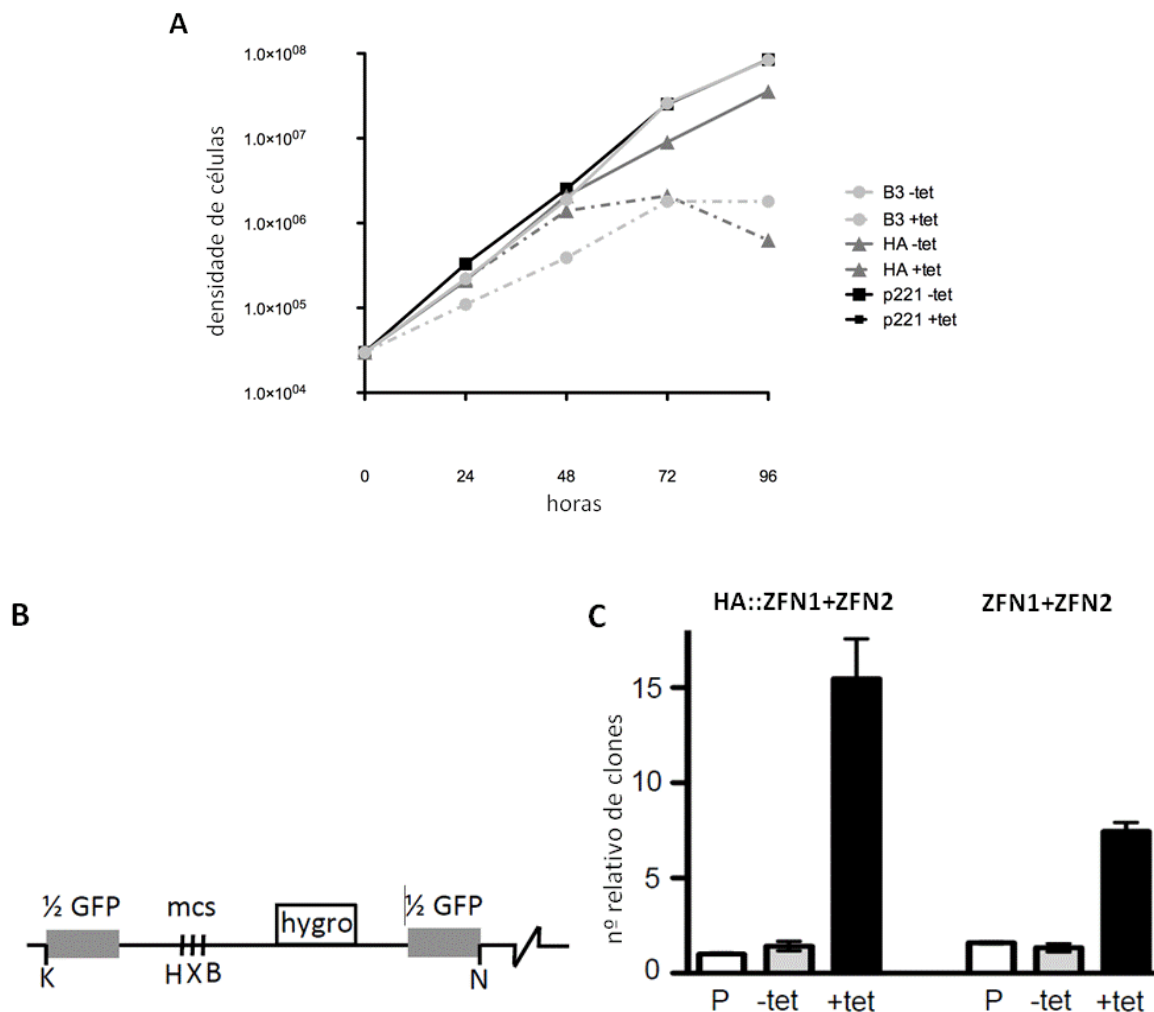
**Figura16. Análise da expressão das ZFNs no *T. brucei* por western blot .**

Extratos correspondentes a  $5 \times 10^6$  parasitos foram separados em gel de poliacrilamida e analisados com anticorpo monoclonal anti-FLAG (online.com antibodies). (A) *Western blot* com extrato de parasitos estavelmente transfectados com as ZFNs, Nysm – formas sanguíneas não transfectadas, Flag-GFP – controle positivo de Flag, ZFN1 Ny – formas sanguíneas transfectadas com ZFN1, ZFN2 Ny – formas sanguíneas transfectadas com ZFN2, 427 – formas procíclicas não transfectadas, ZFN2 427 – formas procíclicas transfectadas com ZFN2. (B) *Western blot* com extrato de parasitos 24 e 48 horas após transfecção transiente das ZFNs. Ø – não transfectado, ZFN1 – transfectado com ZFN1, ZFN2 – transfectado com ZFN2. Dados gerados pela aluna Mônica Kangussu-Marcolino na Universidade de Berna/Suíça

A fim de testar se de fato as ZFNs seriam tóxicas para o parasito, foram construídos vetores para expressão dessas nucleases regulada por tetraciclina utilizando uma cepa de parasito denominada *New York single marker* (NYSM) [36] e o plasmídeo pLEW100. Essa cepa possui o gene que codifica a T7 RNA pol e o repressor da tetraciclina integrados no locus de  $\beta$ -tubulina (para mais detalhes ver referência Wirtz *et al*, 1999 [36]). No pLEW100 o promotor da prociclina é responsável pela transcrição do gene de interesse, sob a regulação do operador da tetraciclina. Também está presente o promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 que é responsável pela transcrição do gene de resistência a bleomicina, no sentido oposto, desta forma a seleção dos parasitas após transfecção com este plasmídeo é independente da adição de tetraciclina. O pLEW100 possui parte da sequência *upstream* do promotor do gene do rRNA 18S, referido como espaçador de rRNA, o que permite sua integração nesse locus do genoma. Ensaios de *run-on* em *T. brucei*, indicam que esta região do genoma do parasito é transcricionalmente inativa [85]. Por este motivo, esta região é utilizada para integração de vetores com expressão regulada por tetraciclina para diminuir a expressão basal da proteína de interesse.

A sequência correspondente à região codificadora do par de ZFNs foi clonada no plasmídeo pLEW100 dando origem ao plasmídeo pLEW100ZFN1+ZFN2. Também foi gerado um plasmídeo contendo a ZFN1 com uma *tag* N-terminal de HA (pLEW100HAZFN1+ZFN2). Formas sanguíneas expressando eGFP (p221) foram transfectadas com 10  $\mu$ g do plasmídeo pLEW100ZFN1+ZFN2 ou pLEW100HAZFN1+ZFN2. Após a seleção dos parasitos a expressão das ZFNs foi induzida por 3 ou 96 horas. Como mostra a

figura 17, uma diminuição significativa na curva de crescimento dos parasitos ocorre após a indução da expressão das ZFNs, indicando novamente que a expressão dessas nucleases é tóxica para o *T. brucei*. Utilizando esse sistema de expressão controlada foram feitos testes de eficiência de transfecção dos parasitos transfectados com pLEW100ZFN1+ZFN2 ou pLEW100HA:ZFN1+ZFN2 e tratados com tetraciclina por 3 horas. Em seguida os parasitos foram transfectados com um plasmídeo contendo o gene de resistência á higromicina flanqueado por sequências de *egfp* (pDONOR<sup>eGFP</sup><sub>brucei</sub> - figura 17B). Em paralelo parasitos controle, os quais foram cultivados na ausência de tetraciclina, também foram transfectados com pDONOR<sup>eGFP</sup><sub>brucei</sub>. Logo após a transfecção clones foram selecionados em placas de 96 poços e após duas semanas o número de clones foi analisado. A figura 17C mostra que a eficiência de transfecção nos parasitos nos quais a expressão das ZFNs foi induzida, é até 15 vezes maior em comparação com os parasitos que não expressão essas nucleases (ver parasitos transfectados com HA::ZFN1+ZFN2).



**Figura 17. Expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> regulada por tetraciclina no *T. brucei*.** Formas sanguíneas expressando T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina (linhagem Nysm) foram transfectadas com o plasmídeo pLEW100ZFN1+ZFN2 ou pLEW100HA:ZFN1+ZFN2. Após seleção dos parasitos a expressão das ZFNs foi induzida com 1 µg/mL de tetraciclina por 96 horas (A). Linhas sólidas – não induzido, linhas tracejadas – induzido, B3 – clone parasitos transfectados com pLew100ZFN1+ZFN2, HA - clone parasitas transfectados com pLEW100HA:ZFN1+ZFN2, p221 – linhagem parental (Nysm) expressando eGFP. Para teste da eficiência de transfecção, a expressão das ZFNs foi induzida por 3 horas e em seguida os parasitos foram transfectados com um plasmídeo contendo o gene de resistência á higromicina flanqueado por sequências de *egfp*, esquematizado na figura B. Após a seleção dos parasitos, a eficiência de transfecção foi avaliada pela relação entre o número de clones resistentes á higromicina nos parasitos nos quais a expressão das ZFNs foi induzida (+tet) com o número de clones obtidos nos parasitos não induzidos (-tet) (C). Dados gerados pela aluna de pós-doutorado Gabriela Schumann, na Universidade de Berna/Suíça.

Embora o pLEW100 esteja integrado em uma região quiescente do genoma, ocorre “vazamento” da expressão da proteína de interesse antes da adição de tetraciclina. A expressão basal das ZFNs no *T. brucei*, sendo elas aparentemente tóxicas para este parasito pode acarretar em uma diminuição na eficiência de transfecção. Com o objetivo de obter uma maior eficiência de transfecção utilizando as ZFNs, decidimos integrar o pLEW100ZFN1+ZFN2 no minicromossomo do *T. brucei*. Os minicromossomos (MCs), contém entre 30-150 kb, são ricos em repetições denominadas de 177 e são transcricionalmente inativos [86]. Para avaliar se a integração do pLEW100 contendo o par de ZFNs nos minicromossomos acarretaria em uma maior eficiência de transfecção, a região repetitiva 177 foi amplificada do vetor p2T7Bern [83] utilizando iniciadores com sítio de restrição da enzima *PspOMI* (iniciadores 177PspOMIF e 177PspOMIR). Em seguida o produto de PCR de 543 pares de base foi purificado e clonado no vetor pGEM-T-easy. O vetor pGEM-T-easy contendo a repetição 177 foi digerido com a enzima de restrição *PspOMI*, e o produto da digestão clonado no vetor pLEW100ZFN1+ZFN2 previamente digerido com a enzima de restrição *NotI*, gerando o plasmídeo pLEW100ZFNs177. Em seguida o vetor foi digerido com a enzima de restrição *NotI*, para linearização do plasmídeo, e usado para transfecção de formas sanguíneas do *T. brucei*. Na figura 18 é possível observar que os clones 2 e 3 apresentaram uma pequena queda na curva de crescimento após a indução da expressão das ZFNs. Tal fenótipo, como já discutido anteriormente, indica que esses clones estão expressando as ZFNs<sup>eGFP</sup>. Em seguida os clones 2 e 3 foram utilizados para os subsequentes testes de eficiência de transfecção, por acreditarmos que os outros clones não estejam expressando as ZFNs. Os

parasitos foram cultivados por três horas na presença de tetraciclina e em seguida transfectados com o pDONOR<sup>eGFP</sup>brucei. Após a seleção dos clones foi observado um aumento na eficiência de transfecção similar a eficiência obtida utilizando o plasmídeo pLEW100ZFN1+ZFN2 , cuja integração ocorre na região do espaçador de rRNA (dados não mostrados). Esses resultados foram obtidos em colaboração com a aluna de pós-doutorado Gabriela Schumann, do grupo da Profa. Isabel Roditi, na Universidade de Berna/Suíça, durante o período de doutorado sanduíche realizado nessa Universidade.

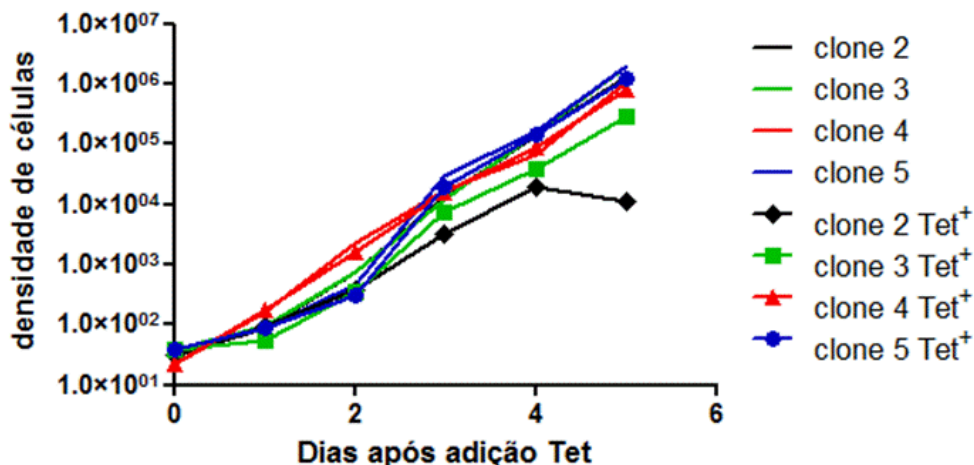


Figura 18. Curva de crescimento de formas sanguíneas do *T. brucei* transfectados com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> integrado na região dos minicromossomos. Após a transfecção de formas sanguíneas expressando eGFP com o plasmídeo pLEW100ZFNs177 e geração de clones, a expressão das ZFNs foi induzida com 1 µg/mL de tetraciclina e a curva de crescimento dos parasitos foi acompanhada.

#### 4.2.5 Edição do gene de *gp72* de *T. cruzi* utilizando ZFNs.

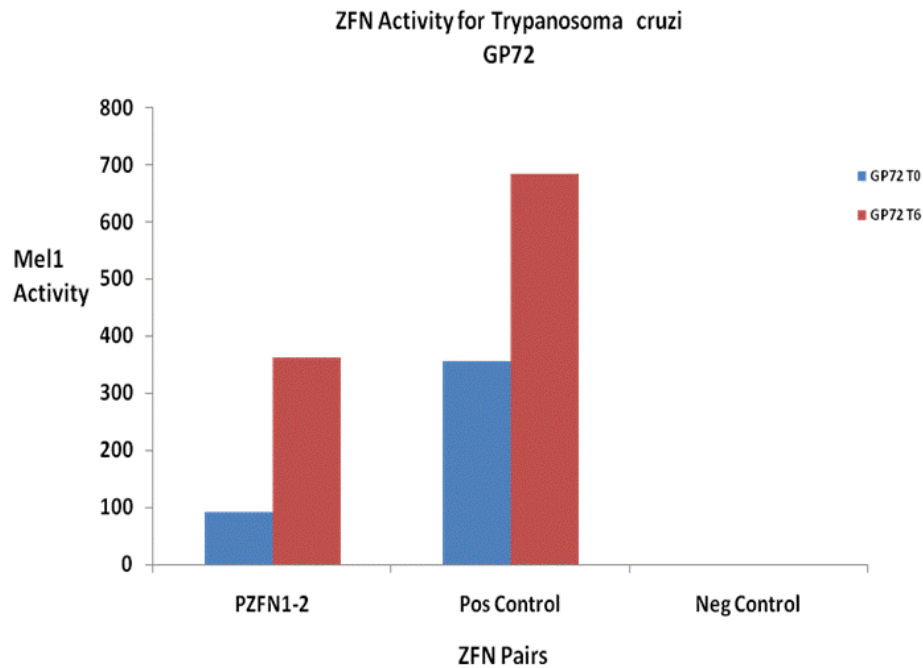
Embora os experimentos com as ZFNs<sup>eGFP</sup> tenham indicado que essas proteínas são tóxicas para *T. cruzi* e que por esta razão não é possível obter linhagens transfectadas do parasito expressando essas ZFNs, decidimos testar outro par de ZFNs. Considerando que a toxicidade das ZFNs está relacionada com a ligação e quebra inespecífica, nossa hipótese é a de que outro par de ZFNs poderia ser não tóxico.

Decidimos testar um par de ZFNs que tem como alvo o gene que codifica a glicoproteína GP72 visto que o nocaute desse gene gera um fenótipo facilmente detectado, pois resulta no descolamento do flagelo do corpo basal do parasito [81,87]. A proteína GP72 é uma proteína de superfície que está envolvida na adesão do flagelo à membrana plasmática [87]. Como no caso das ZFNs direcionadas para o gene de *egfp*, a síntese do par de ZFNs<sup>GP72</sup> foi encomendada à empresa Sigma Aldrich e subseqüentes análises realizadas pela empresa, utilizando o ensaio desenvolvido por Doyon e colaboradores em 2008 [88], indicaram que o par de ZFNs sintetizado possui a capacidade de clivar a seqüência do gene de *gp72* (figura 19).

O ensaio desenvolvido por Doyon e colaboradores para análise da capacidade de clivagem de um par de ZFNs baseia-se no fato já bem estabelecido de que em leveduras de brotamento a quebra da dupla fita induzida entre duas seqüências pequenas espaçadas por uma seqüência heteróloga leva a resseção inteira do DNA interveniente e restauração da integridade do cromossomo pelo anelamento de fita simples entre as duas seqüências. Desta forma, o gene que codifica a forma secretada da  $\alpha$ -galactosidade (*MEL-1*) é interrompido pelo gene alvo do par de ZFNs. A



expressão das ZFNs é então induzida na levedura e se o par de ZFNs testado for capaz de clivar o alvo, ocorre à restauração do gene *MEL-1* [88].



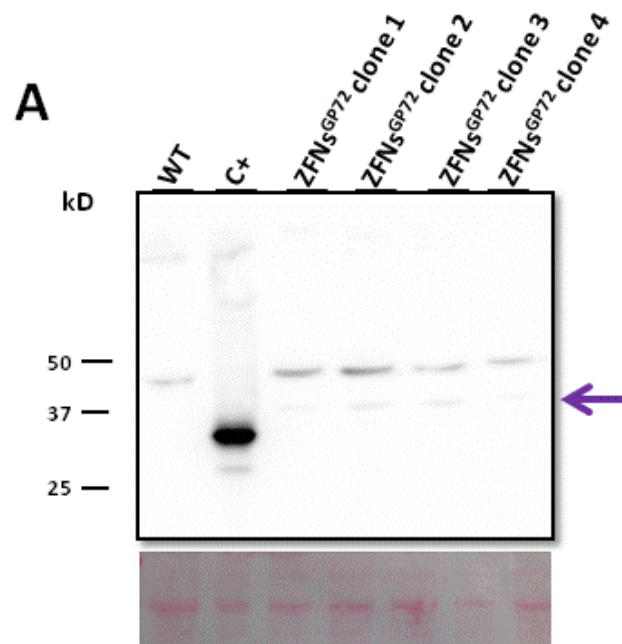
**Figura 19. Capacidade de clivagem das ZFNs<sup>GP72</sup> medida por meio do ensaio repórter de levedura *MEL-1*.** A atividade de clivagem das ZFNs que tem o gene *gp72* como alvo (pZFN1-2) é medida antes (0h, barra azul) e depois (6h, barra vermelha) da indução da expressão das ZFNs em levedura. Os níveis de MEL1 se correlacionam positivamente com a capacidade das ZFNs de criar DSB no seu alvo. As ZFNs que apresentam um sinal >50% relativo ao controle positivo (Pos Control), após 6 horas de indução, são consideradas como úteis para experiências de edição gênica.

As duas sequências de ZFNs<sup>GP72</sup> foram digeridas dos plasmídeos pZFN1 e pZFN2 e inseridas no plasmídeo de expressão em *T. cruzi*, como descrito no item 4.2.2 (figura 11), dando origem ao plasmídeo pROCKZFNs<sup>GP72</sup>Higro. Em seguida formas epimastigotas foram transfectadas com 10 µg deste plasmídeo. Após a seleção com higromicina, foram gerados clones por meio de diluição limitante. Extratos proteicos correspondentes a 106 parasitos foram separados em gel de poli-acrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-FLAG (Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody-Sigma). Como indicado anteriormente às sequências das ZFNs foram construídas de forma a codificar o epítipo de FLAG na região N-terminal da proteína. Na figura 20A é possível observar um sinal fraco correspondente a uma banda de aproximadamente 45 kDa presente nos clones transfectados mas ausente nos extratos de parasitos WT. Como descrito anteriormente, a clivagem do gene *gp72* pelas ZFNs<sup>GP72</sup> deve resultar em um fenótipo de descolamento do flagelo da membrana celular. Havendo a clivagem do gene, na ausência de uma sequência capaz de promover o reparo por homologia, o mecanismo de reparo de quebra de dupla fita realizado é o de MMEJ, que devera resultar na deleção de algumas bases da sequência do gene, gerando parasitos nocaute para *gp72*. No entanto, os parasitos nos quais a expressão das ZFNs<sup>GP72</sup> foi detectada, não apresentaram o fenótipo característico do nocaute de *gp72*. Entretanto, quando esses parasitos foram transfectados com uma sequência contendo o gene de resistência a neomicina flanqueado por sequências de *gp72* (pDONOR<sup>GP72</sup> – figura 21B) foi possível observar o fenótipo de nocaute. Para construir essa sequência, iniciadores contendo os sítios de restrição para as enzimas *HindIII* e *BamHI* foram

utilizados em uma reação de PCR contendo gDNA do clone CL14, para amplificar a região *upstream* do gene *gp72* (iniciadores GP725'FHind e GP725'RBam). Em seguida o produto de PCR foi digerido com as enzimas *HindIII* e *BamHI* e clonadas no plasmídeo TOPO-HXI-NEO-GAPDH [43], previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo TOPO5'GP72-HXI-NEO-GAPDH. Em seguida iniciadores contendo os sítios das enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI*, foram utilizados em uma reação de PCR, contendo gDNA do clone CL14 como molde, para amplificar a região 3'*downstream* do gene *gp72* (iniciadores 3'GP72FXho e 3'GP72RXba). O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI* e clonado no plasmídeo TOPO5'GP72-HXI-NEO-GAPDH, dando origem ao plasmídeo pDONOR<sup>GP72</sup> (figura 21B).

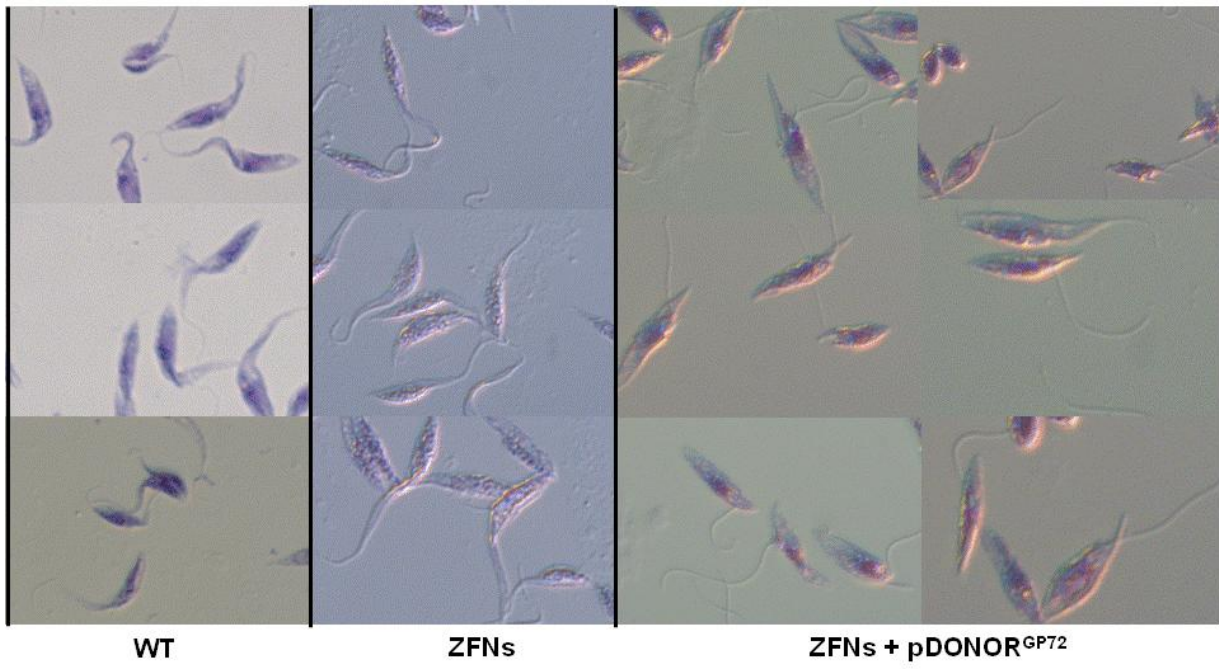
Para gerar uma sequência linear do pDONOR<sup>GP72</sup>, iniciadores anelando no início da sequência 5'GP72 (iniciador 5'GP72FHind) e no final da sequência 3'GP72 (iniciador 3'GP72RXba) foram utilizados em uma reação de PCR, tendo o plasmídeo pDONOR<sup>GP72</sup> circular como molde. Em seguida o clone 2 expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> foi transfectado com 10 µg do pDONOR<sup>GP72</sup> linear e selecionado com 200 µg/ml de G418. Após a seleção, os parasitos foram analisados por microscopia de luz, após coloração com Giemsa. A figura 21A mostra que, enquanto os parasitos transfectados com o par de ZFNs<sup>GP72</sup> apresentam um fenótipo similar aos parasitos WT, a linhagem expressando ZFNs<sup>GP72</sup> transfectada com o pDONOR<sup>GP72</sup>, apresentou um claro fenótipo de deleção do gene *gp72*. Importante salientar que 90% dos parasitos observados na lâmina apresentam este fenótipo, o que indica que, após a clivagem do gene de *gp72* pelas ZFNs o reparo por recombinação homóloga ocorre com

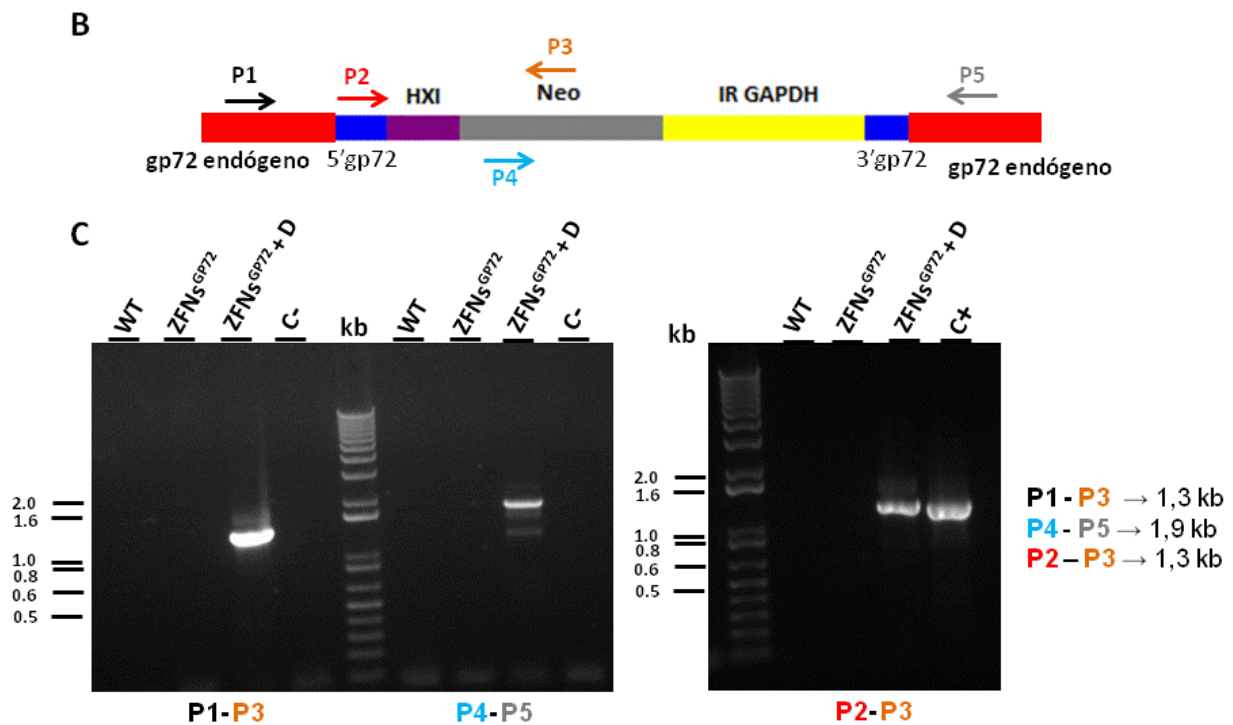
alta eficiência. Apesar de não ter sido realizado o experimento de nocaute do gene *gp72* pela metodologia convencional, ou seja, por HR, na ausência de nucleases, é importante ressaltar que esse processo requer inicialmente a deleção de um dos alelos do gene pela inserção de um gene de resistência e em seguida, após a seleção de clones resistentes heterozigotos, é feita uma segunda etapa de transfecção, quando ocorre o nocaute do segundo alelo. Vários estudos realizados pelo nosso grupo mostram que esse processo requer no mínimo 3 meses [43,89]. Os resultados obtidos com as ZFNs mostram que, em vez de 3 meses, os dois alelos foram interrompidos em uma única transfecção, e que a geração dos nocautes pode ser concluída em um período de 2 semanas e meia. Para confirmar a integração do plasmídeo pDONOR<sup>GP72</sup> no locus de *gp72*, gDNA dos parasitos foi extraído e utilizado como molde em reações de PCR. Reações de PCR utilizando iniciadores anelando no gene *gp72* e no gene que confere resistência a neomicina presente no pDONOR<sup>GP72</sup>, confirmaram a integração do pDONOR<sup>GP72</sup> no local esperado, interrompendo o gene *gp72* (figura 21C, conjunto de primers P1-P3 → 1,3 kb e P4-P5 → 1,9 kb). Além disso, a reação de PCR utilizando iniciadores anelando na sequência 5' *upstream* de *gp72* e no gene de resistência a neomicina, ambas sequências presentes no pDONOR<sup>GP72</sup>, amplificou um fragmento do tamanho esperado (conjunto de iniciadores P2-P3 → 1,3 kb).



**Figura 20. Análise da expressão das ZFNs que tem o gene *gp72* como alvo.** Extratos de clones de parasitos transfectados com o par de ZFNs<sup>GP72</sup> (ZFNs<sup>GP72</sup> clone1, 2, 3 ou 4), não transfectados (WT) ou transfectados com GFP com uma tag N-terminal de FLAG (C+) foram separados em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-FLAG. A seta roxa indica a banda correspondente as ZFNs, que possuem um tamanho predito de 45 kD. No painel de baixo, parte da membrana após transferência dos extratos corada com Ponceau S para controle das quantidades de amostra aplicada em cada canaleta.

A





**Figura 21. Obtenção de parasitos nocautes para *gp72* utilizando as ZFNs.**

(A) Parasitos expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> foram transfectados com a sequência linear do pDONOR<sup>GP72</sup> conforme a representação mostrada em B. Após a seleção da população com G418, os parasitos foram corados com Giemsa e analisados por microscopia de luz. As imagens dos parasitos transfectados com o pDONOR (ZFNs<sup>GP72</sup>+D) foram comparadas com as imagens dos parasitos selvagens (WT) e com imagens de parasitos expressando ZFNs<sup>GP72</sup> antes da transfecção com o pDONOR<sup>GP72</sup> (ZFNs). DNA genômico total dos parasitos selvagens (WT), expressando as ZFNs<sup>GP72</sup>, e expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> e transfectados com o pDONOR<sup>GP72</sup> foi extraído e utilizado como molde em reações de PCR, utilizando diferentes combinações de iniciadores como indicado na figura B (C). C+ - plasmídeo pDONOR<sup>GP72</sup>, C- reação de PCR sem DNA.

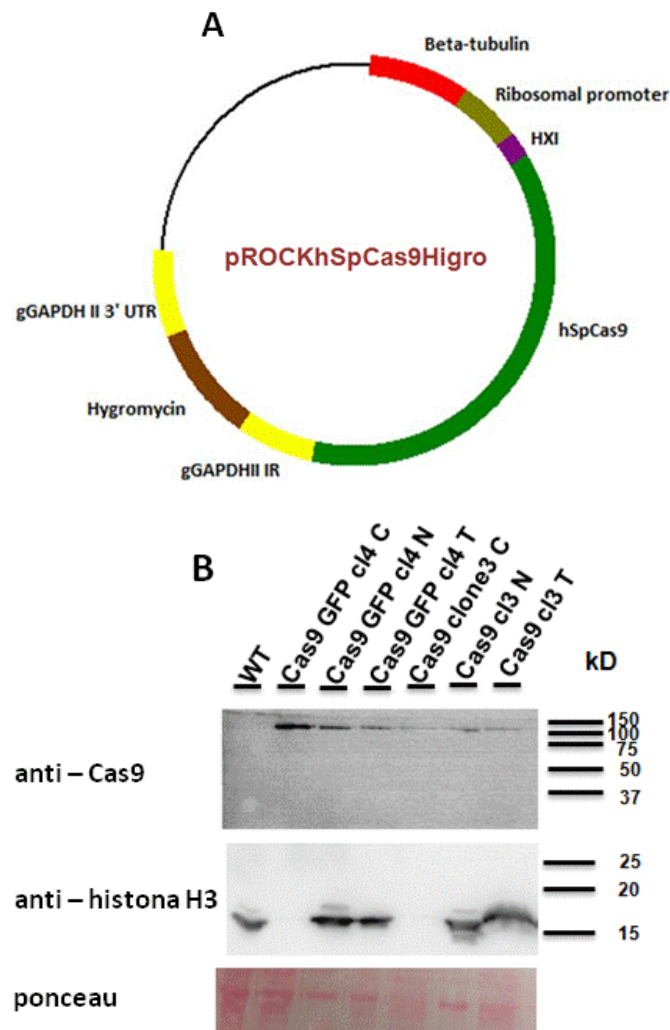


### 4.3 Edição do genoma do *T. cruzi* utilizando o sistema de CRISPR/Cas9

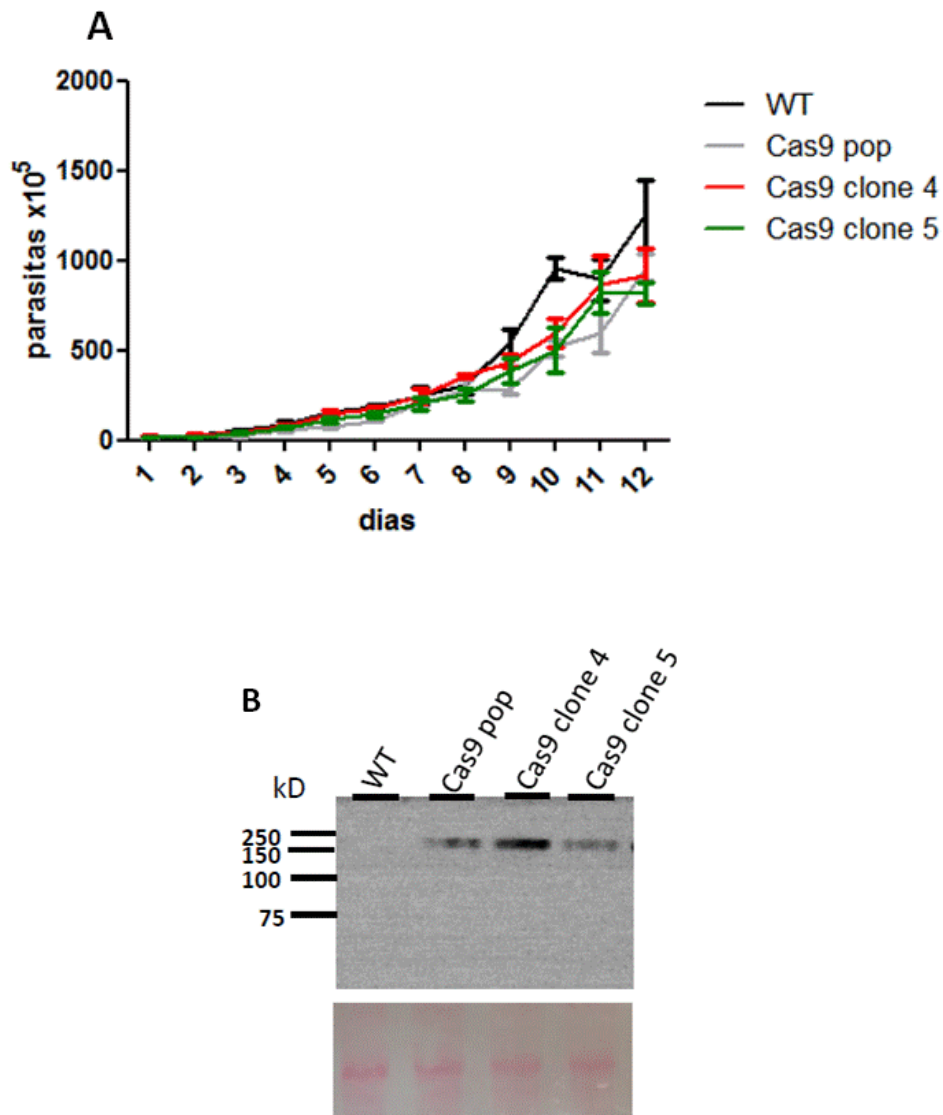
#### 4.3.1 Expressão de Cas9 de forma constitutiva

Diferente do processo de edição de genoma com ZFNs, a edição com o sistema CRISPR/Cas9 requer a expressão da nuclease Cas9 e do sgRNA que se associa com a Cas9 nuclease e se liga no alvo de interesse por complementaridade de bases. Para construção do plasmídeo de expressão constitutiva da Cas9 nuclease em *T. cruzi*, o plasmídeo pTrex-b-NLSpCas9 [78], gentilmente cedido pelo Prof. Rick Tarleton, da Universidade da Georgia - USA, foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I. O fragmento liberado, correspondente a sequência codificadora da Cas9 nuclease, foi clonado no plasmídeo pROCKGFPHygro, previamente digerido com as mesmas enzimas, substituindo desta forma o gene de *gfp* por Cas9 e gerando o plasmídeo pROCKhSpCas9Hygro (figura 22A). Em seguida formas epimastigotas do clone CL14 foram transfectadas com esse plasmídeo e selecionadas com o antibiótico higromicina. Após a seleção de clones por diluição limitante, extratos proteicos correspondentes às frações nuclear e citoplasmática dos parasitos foram preparados e separados em gel de poli-acrilamida 10% e analisados por meio de *western blot* com o anticorpo monoclonal anti-CRISPR-Cas9 (abcam) e anticorpo anti-histona H3, gentilmente cedido pelo Prof. Sergio Schenkman, da UNIFESP. A figura 22B mostra a expressão da Cas9 nuclease, que possui um tamanho predito de 160 kD, tanto na fração citoplasmática quanto na fração nuclear de dois clones derivados dos parasitos transfectados com o plasmídeo pROCKhSpCas9Hygro. Como controle a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti histona H3, a qual reconhece a banda correspondente a histona H3 somente nas frações nucleares.

Em um dos trabalhos recentemente publicados e que demonstraram a utilização do sistema de CRISPR-Cas9 para deleção de genes em *T. cruzi*, Peng e colaboradores [78] mostraram que a expressão constitutiva de Cas9 afeta o crescimento dos parasitos, sendo, portanto considerada tóxica para o *T. cruzi*, assim como observamos nos nossos estudos com ZFNs. Para avaliar se a expressão da Cas9 nuclease seria tóxica para o *T. cruzi*, parasitos WT e expressando a Cas9 nuclease na fase logarítmica de crescimento foram diluídos para uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL e seu crescimento foi acompanhado durante 12 dias. Para verificar se os parasitos continuaram mantendo a expressão da Cas9 nuclease durante todo o período analisado, no sétimo dia da curva, extratos proteicos dos parasitos foram analisados por *western blot* com o anticorpo anti-CRISPR-Cas9. A figura 23A mostra que os parasitos expressando a Cas9 nuclease constitutivamente apresentam uma pequena redução nos pontos mais tardios da curva de crescimento (acima de  $5 \times 10^7$  células/mL). A análise da expressão da Cas9 nuclease por *western blot* no sétimo dia da curva de crescimento confirma que os parasitos estão expressando essa nuclease (23B).



**Figura 22. Análise da expressão e localização da proteína Cas9 nuclease.** Parasitos WT ou expressando eGFP foram transfectados com o plasmídeo pROCKhSpCas9Hygro representado na figura A. Após a seleção, extratos dos parasitos correspondentes as frações citoplasmática (C), nuclear (N) ou total (T), foram separados em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti CRISPR-Cas9 (Abcam) ou anti-histona H3. WT – parasitos não transfectados, Cas9 GFP cl4 C – fração citoplasmática do extrato dos parasitos expressando GFP transfectados com Cas9 nuclease clone 4; Cas9 GFP cl4 N - fração nuclear do extrato dos parasitos expressando GFP transfectados com Cas9 nuclease clone 4; Cas9 GFP cl4 T – extrato total dos parasitos expressando GFP transfectados com Cas9 nuclease clone 4; Cas9 cl3 C - fração citoplasmática do extrato dos parasitos transfectados com Cas9 nuclease clone 3; Cas9 cl3 N - fração nuclear do extrato dos parasitos transfectados com Cas9 nuclease clone 3; Cas9 cl3 T – extrato total dos parasitos transfectados com Cas9 nuclease clone 3. O painel de baixo mostra parte da membrana corada com reagente Ponceau S, após a transferência dos extratos, para controle da quantidade de amostra aplicada em cada canaleta. Tamanho predito Cas9 nuclease – 160 kD.

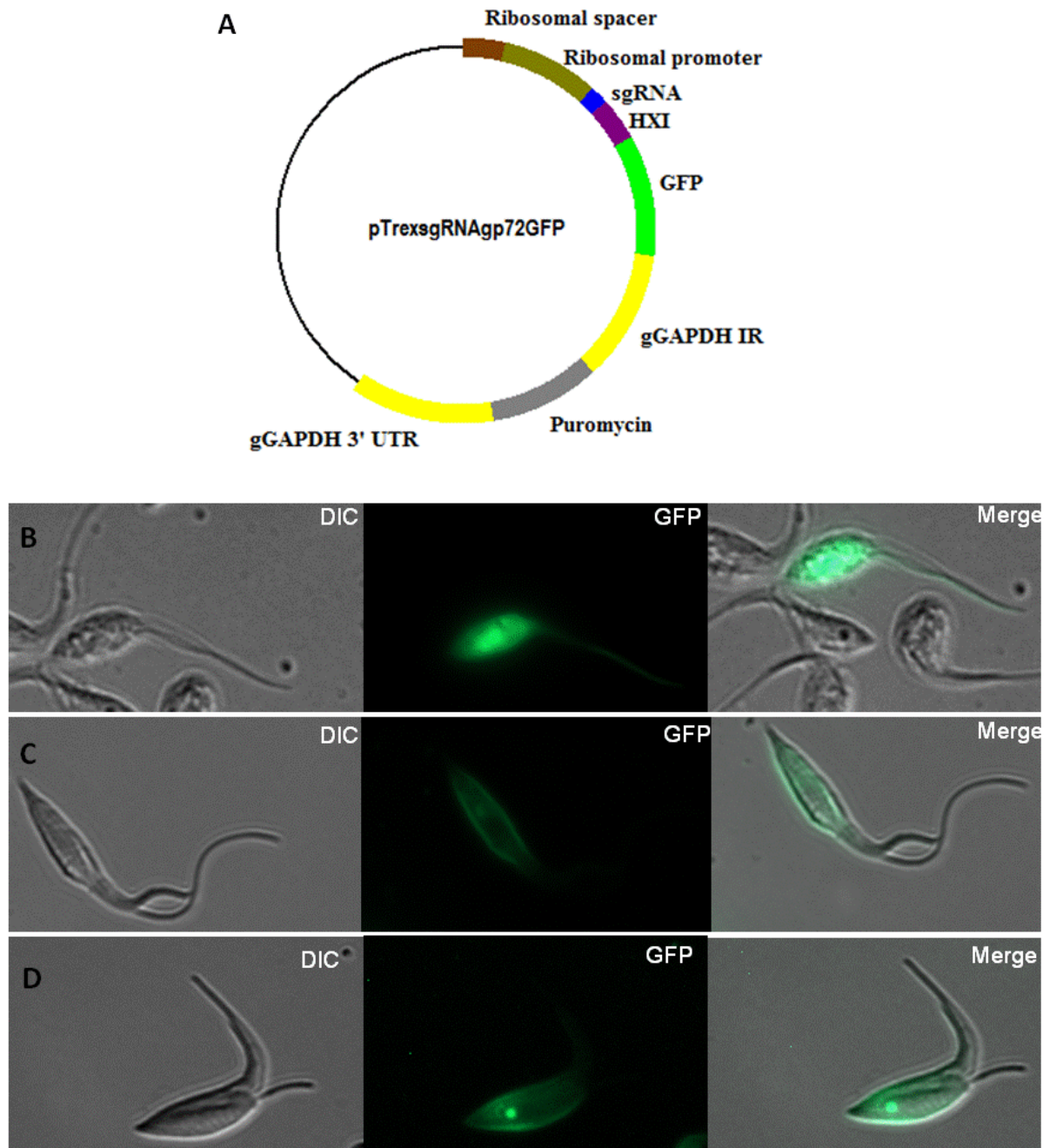


**Figura 23. Curva de crescimento dos parasitos expressando a Cas9 nuclease.** Formas epimastigotas selvagens (WT), a população de parasitos expressando Cas9 nuclease (Cas9 pop) ou clones gerados a partir da população expressando Cas9 nuclease (Cas9 clone 4 e Cas9 clone 5), foram diluídas para uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL e o crescimento dos parasitos foi acompanhado por 12 dias (A). No sétimo dia da curva de crescimento, extrato total dos parasitos foi extraído, separado em gel de poli-acrilamida, transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com anticorpo anti-CRISPRCas9 (B). O painel de baixo mostra parte da membrana após a transferência dos extratos, corada com reagente Ponceau S, para a visualização da quantidade de amostra aplicada em cada canaleta. Tamanho predito Cas9 nuclease – 160 kD.

#### 4.3.2 Detecção do fenótipo dos parasitos transfectados com sgRNA que tem *gp72* como alvo

Existem duas maneiras diferentes para expressão do sgRNA no *T. cruzi*: a transcrição *in vitro* [78], ou a expressão do sgRNA pelo próprio parasito, sob o controle do promotor de rRNA [80]. Optamos pela expressão do sgRNA sob o controle do promotor de rRNA do *T. cruzi* utilizando o plasmídeo pTrex. Também foi utilizada a mesma sequência do sgRNA que tem o gene *gp72* como alvo, que foi utilizada por Lander e colaboradores (2015) [80]. Iniciadores contendo um pedaço da sequência codificadora do gene *gp72* (20 nucleotídeos), foram utilizados em uma reação de PCR contendo o plasmídeo pAc-sgRNA-Cas9 [90] como molde (iniciadores sgRNAGP72Bam e sgRNAScRSacBgl). Esse plasmídeo contém uma sequência com 80 nucleotídeos, denominada *scaffold* do sgRNA, que é a sequência responsável pela formação da estrutura em forma de grampo importante para a associação da Cas9 nuclease com o sgRNA e foi gentilmente cedido pelo Prof. João Marques, da UFMG. O produto de PCR foi clonado no TOPO, digerido com as enzima de restrição *BamHI* e *BglI* e transferido para o plasmídeo pTrexGFPPac (figura 24A). Nesse plasmídeo, a sequência do sgRNA é transcrita a partir do promotor de rRNA, mas por ter sido inserido upstream da sequência de HX1, o RNA não sofre as reações de processamento para adição de *SL* e de cauda poli-A. Além disso, o gene de *gfp* presente no pTrex, quando expresso nos parasitos transfectados, podem informar a porcentagem de parasitos que receberam o DNA. Parasitos expressando a Cas9 nuclease foram transientemente transfectados com 10 µg desse plasmídeo na forma circular e quarenta e oito horas após a transfecção foram fixados em solução de paraformaldeído 2% e analisados por microscopia de fluorescência. Como

resultados, observamos que 1% dos parasitos que expressavam GFP apresentavam o fenótipo para deleção do gene *gp72* (24C e 24D), com descolamento do flagelo do corpo do parasito. Também foi observado que alguns parasitos expressando GFP (aprox. 2%) apresentavam o fenótipo selvagem (24B).



**Figura 24. Análise por microscopia de fluorescência dos parasitos expressando Cas9 nuclease transfectados com sgRNA que tem o gene *gp72* como alvo.** Formas epimastigostas expressando a Cas9 nuclease foram transfectadas com o plasmídeo pTrexsgRNAgp72GFP circular, esquematizado na figura A. Quarenta e oito horas após a transfecção, os parasitos foram analisados por microscopia de fluorescência. Foi observado que em torno de 1% dos parasitos expressando GFP apresentaram o flagelo descolado (C e D). Também foi observado parasitos expressando GFP que não apresentaram o fenótipo de deleção do gene *gp72* (B).

## 5. Discussão

A manipulação genética do *T. cruzi*, apesar de desafiadora, tem contribuído de forma fundamental na caracterização deste organismo. A expressão e deleção de genes neste organismo baseiam-se na integração de plasmídeos por HR. Contudo a baixa eficiência de transfecção e recombinação limitam a manipulação genética deste organismo. Além disso, o *T. cruzi* não possui a maquinaria de RNAi funcional, por esta razão a única forma de se investigar a função de genes por genética reversa, é por meio da deleção gênica por HR. Por ser uma técnica laboriosa e demorada, após a primeira publicação demonstrando a utilização de deleção gênica por HR, há mais de vinte anos atrás, um número limitado de trabalhos demonstrando o desenvolvimento de parasitos KO foram publicados [18,81,91-94]. Muitas vezes observa-se que na tentativa de deletar os dois alelos de um gene essencial por substituição gênica, via HR, utilizando dois genes de resistência diferentes, são gerados parasitos resistentes a ambos antibióticos, no entanto, os parasitos duplicam o gene alvo em outro lugar de seu genoma [89,95]. Cardoso e colaboradores (2013), demonstraram que é possível interromper um dos alelos do gene *TcGPI8* por substituição gênica utilizando um gene de resistência flanqueado por sequências de *GPI8*. No entanto, quando um outro gene de resistência era inserido por HR para deleção do segundo alelo, parasitos duplo resistentes eram gerados mas reações de PCR utilizando gDNA dessas linhagens ainda apontavam a presença do gene *GPI8*. Ademais, ensaios de *northern blot* com RNA total dos parasitos duplo resistentes, apontaram a presença de mRNAs aberrantes que hibridizaram com uma sonda correspondente a *GPI8* [89] De forma similar, Taylor e colaboradores (2015),



conseguiram deletar apenas um alelo do gene *TcAPx* [95]. As inúmeras tentativas de se gerar parasitos duplo nocaute para esse gene, resultavam em linhagens resistentes a ambos os genes de resistência utilizados, mas contendo uma terceira cópia do gene *TcAPx*. Para contornar esse problema eles utilizaram uma estratégia elegante. Primeiro foram gerados parasitos *single knockouts* por HR utilizando o gene de resistência a puromicina flanqueado por sequências de *TcAPx*. Em seguida essa linhagem foi transfectada e selecionada com o plasmídeo pTEX circular contendo o gene *TcAPx* e o gene de resistência a neomicina, para expressão ectópica da proteína. Os parasitos duplo resistentes (*PAC* e *NEO*) foram então transfectados com um terceiro gene de resistência (blasticidina) flanqueado por sequências de *TcAPx*, para deleção do segundo alelo. Após a seleção com blasticidina, os parasitos passaram a ser cultivados em meio de cultura sem neomicina. Trinta dias após a retirada do antibiótico neomicina do meio, ensaios de *western blot* e *Southern blot*, demonstraram que os parasitos duplo resistentes (*PAC* e *BLAST*) deixaram de expressar de forma ectópica a proteína *TcAPx* e que ambos os alelos haviam sido deletados. Em contraste com o *T. cruzi*, inúmeros trabalhos já foram publicados descrevendo a caracterização de proteínas do *T. brucei*, utilizando a técnica de RNAi. [96-101]. Uma grande vantagem da utilização do RNAi em relação ao nocaute gênico por HR é a possibilidade de se avaliar a função de genes essenciais.

O desenvolvimento de protocolos de transfecção mais eficientes é o primeiro passo para melhoria dos métodos de transfecção nesse organismo. Em 2004 DaRocha e colaboradores desenvolveram um protocolo de transfecção para *T. cruzi* baseado em protocolos utilizados para transfecção de

*Leishmania* e *T. brucei*. Como resultados, eles observaram que vinte e quatro horas após a transfecção transiente de formas epimastigotas com 60 µg do plasmídeo pTREXGFP, utilizando o *gene pulser system* (BioRad), 8% dos parasitos expressavam GFP [27]. Baseado nos trabalhos publicados para *Plasmodium* [102] e *T. brucei* [32] utilizando o sistema do *nucleofector* para transfecção, avaliamos a eficiência de transfecção utilizando o *nucleofector* e comparamos com a eficiência obtida utilizando o sistema convencional de eletroporação, o *gene pulser system* da empresa BioRad [32,102-104]. Para utilização do sistema de transfecção *nucleofector*, é necessário a compra do *kit* fornecido pelo fabricante Lonza, que contém tampões célula específicos (cuja fórmula não é revelada) e cuvetas 0,2 mm. Nossos testes mostraram que a utilização de cuvetas de outras marcas, não interfere na eficiência de transfecção (dados não mostrados). Essas análises também indicaram que a transfecção com 10 µg de pTREXGFP utilizando a solução II do kit resultava em uma eficiência de transfecção em torno de 13%. Decidimos utilizar o tampão de transfecção desenvolvido por Schumann *et al*, 2011 [83] utilizado para transfecção do *T. brucei* no sistema do *nucleofector*. A utilização deste tampão resultou na mesma eficiência de transfecção comparada com a solução II, como mostra a tabela II (*nucleofector* 10 µg). Também foi demonstrado que é possível obter uma eficiência de transfecção maior utilizando uma quantidade bem menor de DNA, com o sistema de transfecção *nucleofector*. Utilizando apenas 10 µg de pTrexGFP no sistema do *nucleofector* foi observado que 14% dos parasitos expressavam GFP, enquanto que no *gene pulser system* com a mesma quantidade de DNA não foi observado nenhum parasito expressando GFP. Tendo em vista que as técnicas para extração de DNA plasmidial em

larga escala são laboriosas e demoradas, a possibilidade de se utilizar menores quantidades de plasmídeo é uma grande vantagem em relação ao sistema convencional de transfecção. Além disso, para transfecções estáveis foi observado que o tempo de seleção dos parasitos transfectados no *nucleofector* é menor. Enquanto a seleção de parasitos transfectados pelo sistema de eletroporação convencional leva em torno de 4 semanas, no sistema de transfecção *nucleofector* demora 2,5 - 3 semanas. O aumento conseguido na eficiência de transfecção utilizando o *nucleofector* está provavelmente relacionado com os parâmetros elétricos utilizados neste aparelho, que devem aumentar a permeabilidade da célula. Esse aumento na permeabilidade pode aumentar o número de cópias de plasmídeo englobado pela célula, aumentando a chance da integração do plasmídeo por HR. Isso explicaria o menor tempo de seleção dos parasitos em transfecções estáveis. Outra possibilidade é que o aumento da permeabilidade aumente a quantidade de células que incorporam o plasmídeo desta forma uma quantidade maior de células integram o plasmídeo e sobrevivem a seleção com antibiótico.

Além da otimização de protocolos de transfecção mais eficientes, a utilização de técnicas mais robustas para modificar a expressão de proteínas e deleção de genes também são importantes. A expressão de proteínas exógenas no *T. cruzi*, bem como a deleção gênica, é baseada na integração de DNA por HR no genoma do parasito. Um dos eventos iniciais que acionam o processo de HR em um organismo é a presença de DSB no DNA. Tendo em vista o trabalho de Smih e colaboradores (1995), com células de mamífero [47] e mais tarde o trabalho de Glover e colaboradores (2009), com *T. brucei* [48], que indicam que a indução sítio específica de DSB pode aumentar a eficiência

de integração de plasmídeos, decidimos testar dois sistemas diferentes para esta finalidade e que foram recentemente descritos como protocolos extremamente eficientes em outros organismos e que são baseados na atividade das proteínas ZFNs e o sistema de CRISPR/Cas9 [58,78,80].

A idéia inicial deste projeto era inserir genes que poderiam estar relacionados com virulência, da cepa de referência CL Brener, no clone não virulento CL14 [105]. Para isso seria utilizado uma linhagem de CL14 expressando *egfp* e um par de ZFNs que tem *egfp* como alvo, para facilitar a integração de plasmídeos por HR. Desta forma os genes a serem testados poderiam ser inseridos nos parasitos do clone CL14 por HR, interrompendo o gene *egfp*. No entanto, após a transfecção estável de parasitos expressando eGFP com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup>, não foi observado o fenótipo esperado de perda da fluorescência verde, em decorrência da clivagem do gene *egfp* pelas ZFNs. Considerando que não foi possível detectar a expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> por *western blot* e por *northern blot*, decidimos analisar a presença do gene que codifica as ZFNs por *Southern blot*. Surpreendentemente, foi possível detectar a presença no genoma das células transfectadas, do gene de resistência ao antibiótico higromicina, o qual faz parte do plasmídeo contendo o par de ZFNs<sup>eGFP</sup>, mas no entanto, nenhuma banda foi detectada na membrana hibridizada com uma sonda correspondente a ZFN1.

Em um trabalho recente, Singer e colaboradores (2015), observaram que alguns clones de esporozoítos de *Plasmodium. berghei* obtidos após a transfecção com um par de ZFNs que tem o gene *egfp* como alvo, não haviam perdido a expressão deste gene [59]. A análise por genotipagem revelou que esses clones diminuíram o número de cópias das ZFNs por meio da formação

de uma ZFN híbrida, composta pela recombinação entre regiões homólogas contidas em ambas as ZFNs. Como a dimerização do domínio *FokI* é necessário para que ocorra a clivagem, a ZFN híbrida não é capaz de causar DSB [59]. Esse dado chama a atenção, pois as sequências de DNA do par de ZFNs utilizado neste trabalho possuem alta homologia entre si. No entanto, se o *T. cruzi* estivesse formado uma ZFN híbrida pela recombinação da ZFN1 com a 2, seria possível detectar a banda relativa a essa ZFN na análise por *Southern blot* utilizando a sonda para ZFN1 (figura 15, ítem 4.2.3). Nossa hipótese é a de que esse par de ZFNs que tem *egfp* como alvo seja tóxico para os parasitos por se ligar de forma inespecífica ao genoma do parasito causando DSB; e por esta razão, o *T. cruzi* utiliza algum mecanismo para manter apenas o gene de resistência e deletar a sequência das ZFNs. No entanto, esse resultado não significa que todas as ZFNs sejam tóxicas para o *T. cruzi*, pois foi possível gerar parasitos expressando um par de ZFNs que tem o gene *gp72* como alvo. Além disso, a transfecção dos parasitos expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> com uma sequência doadora construída para interromper o gene *gp72*, foi capaz de aumentar a taxa de recombinação homóloga, tendo em vista que em apenas uma transfecção os dois alelos de *gp72* foram interrompidos.

Os experimentos realizados com *T. brucei* mostram que também não foi possível detectar a expressão constitutiva do par de ZFNs<sup>eGFP</sup> em formas sanguíneas e procíclicas, por *western blot* ou *northern blot*, novamente indicando que esse par de ZFNs é tóxico para os parasitos. De fato, a toxicidade das ZFNs nucleases já foi demonstrada para outros organismos. Bibikova e colaboradores (2002), observaram que a expressão de uma das ZFNs que compõem o par (ZFN1), sob o controle do promotor do gene da *heat*

*shock protein* era letal para as larvas e embriões de *Drosophila melanogaster* [56]. A toxicidade das ZFNs está associada à quebra inespecífica da dupla fita do DNA, o que pode ser proveniente de ligação inespecífica ou homodimerização de uma ZFN [49]. Pruett-Miller e colaboradores (2009), demonstraram que uma forma de diminuir a toxicidade das ZFNs pode ser feita por meio da regulação dos níveis de proteína [60]. Esses autores observaram que a expressão regulada dessas nucleases em células HEK293 resultou em uma menor toxicidade para a célula sem afetar as taxas de recombinação que eram obtidas na presença de uma sequência com homologia.

O efeito da expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> regulado por tetraciclina foi investigado em *T. brucei*. Mesmo após a expressão das ZFNs em formas sanguíneas do *T. brucei*, regulada por tetraciclina, não foi possível detectar a sua expressão por *western blot*. No entanto, o declínio da curva de crescimento dos parasitos após a indução da expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> com tetraciclina, indica que essas proteínas estão sendo expressas, e reforça a hipótese de que esse par de ZFNs é tóxica para o *T. brucei*. Mesmo assim, foi possível demonstrar que a eficiência de recombinação no *T. brucei* aumenta com a expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> após três horas de indução. Nesse experimento, os parasitos que foram transfectados com um plasmídeo linear contendo a sequência do gene de resistência a higromicina flanqueado por sequências de *egfp* apresentaram uma eficiência de integração do gene de resistência 15 vezes maior comparada aos parasitos nos quais a expressão das ZFNs<sup>eGFP</sup> não foi induzida.

Embora o sistema de expressão induzida por tetraciclina do *T. brucei* seja fortemente regulado, ocorre um pouco da expressão da proteína de

interesse antes da adição da tetraciclina, o que chamamos de “vazamento do sistema” ou “leaky expression”. Considerando que as ZFNs<sup>eGFP</sup> são aparentemente tóxicas para o *T. brucei*, formulamos a hipótese de que o “vazamento” da expressão das ZFNs poderia resultar em uma menor eficiência de transfecção, após transfecção com o pDONOR<sup>eGFP</sup>. Em uma tentativa de aumentar a eficiência de transfecção, o plasmídeo contendo o par de ZFNs foi integrado no minicromossomo do *T. brucei*, uma região com um bom potencial para integração de vetores induzíveis, pois não possui nenhum gene ativo. Wickstead e colaboradores (2002), observaram que a integração de um plasmídeo de expressão regulada por tetraciclina expressando GFP nos minicromossomos do *T. brucei*, resultou em uma melhor regulação da expressão deste gene comparado ao plasmídeo integrado na região do espaçador de rRNA [106]. Entretanto, no presente trabalho, após a transfecção e seleção de parasitos com o plasmídeo pLEW100 contendo o par de ZFNs e a sequência 177, responsável pela integração deste plasmídeo no minicromossomo por HR, não foi observado um aumento da eficiência de transfecção, comparado ao plasmídeo integrado na região do espaçador de rRNA.

Para a expressão regulada por tetraciclina do par de ZFNs<sup>eGFP</sup> em *T. cruzi*, decidimos utilizar um sistema diferente do inicialmente utilizado pelo nosso grupo para obtenção de expressão regulada nesse parasito [38]. Como descrito anteriormente, os sistemas existentes não são eficientes por possuírem uma alta expressão da proteína de interesse antes da adição da tetraciclina. Após a transfecção e seleção de parasitos com o plasmídeo pLEW13, para expressão da T7 RNA polimerase e do repressor da tetraciclina,

ensaios de *northern blot* mostraram que o mRNA do repressor da tetraciclina não está sendo corretamente processado. Ensaios da atividade de luciferase de renilla com linhagens transfectadas com o plasmídeo pTcINDEXrenilla, demonstraram uma baixa relação da expressão de luciferase de renilla entre parasitos cuja expressão foi induzida e aqueles não induzidos (Tet+/Tet-). Estes resultados contrastam com os resultados demonstrados para expressão regulada por tetraciclina em *T. brucei*, no qual uma expressão até 1000 vezes maior do induzido comparada com o não induzido é obtida [36]. É possível especular que no caso do *T. cruzi*, a expressão do repressor é muito baixa devido ao processamento incorreto do mRNA, como indicado pelos resultados de *northern blot*. Para otimizar esse sistema é necessário desenvolver um vetor contendo o gene do repressor flanqueado por sequências do *T. cruzi* para que ocorra o correto processamento do mRNA. Isso provavelmente resultará em níveis adequados de repressor da tetraciclina.

Como não foi possível gerar um sistema regulado de expressão induzida para o *T. cruzi*, decidimos expressar as ZFNs<sup>eGFP</sup> de forma transiente considerando que isto implicará em níveis menores de expressão em comparação com a transfecção estável. Após a co-transfecção transiente dos parasitos com o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> e uma sequência contendo o gene *mrfp* flanqueado por sequências de *egfp*, não foi observada perda de fluorescência verde, tampouco ganho de fluorescência vermelha. Esses resultados indicam que também não é possível expressar esse par de ZFNs de forma transiente no *T. cruzi*. Nossa hipótese é a de que a toxicidade desse par de ZFNs esteja relacionada com a ligação e quebra inespecífica de genes tanto no *T. cruzi* quanto no *T. brucei*.



Diante da inabilidade de expressar o par de ZFNs<sup>eGFP</sup> no *T. cruzi*, decidimos testar um par de ZFNs que clivasse um gene endógeno do parasito. Desta forma escolhemos como alvo o gene que codifica a glicoproteína GP72, pois a deleção desse gene já foi descrita e é fácil de ser visualizada [81,87].

Após a transfecção estável de parasitos com esse par de ZFNs, não foi observado o fenótipo esperado para deleção deste gene. No entanto, a análise da expressão por *western blot* com extrato desses parasitos indicou que essas nucleases estão sendo expressas em níveis extremamente baixos. Os parasitos expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> foram então transfectados uma sequência doadora contendo o gene de resistência a neomicina flanqueado por sequências de *gp72*. Notavelmente, 24 dias após a seleção dos parasitos com neomicina foi possível obter uma população 90% nocaute para *gp72*. Isso indica que em apenas uma transfecção e utilizando apenas um gene de resistência foi possível deletar os dois alelos de *gp72* com uma eficiência muito alta. Importante ressaltar que esta população foi obtida sem a necessidade de gerar clones e com menos de um mês de seleção.

O fato dos parasitos transfectados apenas com as ZFNs<sup>GP72</sup> não apresentarem um fenótipo de deleção de *gp72* chama atenção, pois o único mecanismo que o *T. cruzi* possui para o reparo de DSB no DNA na ausência de uma sequência que forneça homologia é por MMEJ, mecanismo que insere deleções no gene e consequentemente perda de sua função [54]. Peng e colaboradores demonstraram que na ausência de uma sequência homóloga, a quebra na dupla fita no gene *egfp*, utilizando o sistema de CRISPR/Cas9, é reparada por MMEJ. O sequenciamento de clones nos quais foi observada perda da fluorescência verde, demonstrou que uma deleção de 33 pares de

bases, no sítio de clivagem da Cas9 nuclease, é responsável pela perda da função do gene *egfp*. Essa deleção ocorria sempre dentro de uma região flanqueada por 10 nucleotídeos com homologia, característico do mecanismo de MMEJ [78]. Diante desses dados, nos questionamos o que ocorre com as linhagens que expressam as ZFNs<sup>GP72</sup> constitutivamente. Uma hipótese para explicar esse resultado é a de que nessas linhagens, enquanto as ZFNs clivam um alelo, a sequência do segundo alelo seja utilizada para reparar a quebra na dupla fita por HR. Podemos também especular, que pelo fato das ZFNs clivarem o DNA deixando pontas coesivas nas extremidades uma ligase presente no *T. cruzi* consiga religar as pontas sem que haja deleção de nucleotídeos. Uma análise mais aprofundada dessas linhagens é necessária para que essa questão seja melhor compreendida. A síntese de primers flanqueando as regiões de clivagem das ZFNs para sequenciamento do DNA genômico de seis clones expressando as ZFNs<sup>GP72</sup> está em andamento para melhor esclarecer esta questão.

Nos últimos dois anos, a aplicação do sistema de CRISPR/Cas9 para manipulação genética teve um avanço impressionante. A edição gênica utilizando esse sistema foi demonstrada para *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania*, *T. cruzi* e muitos outros organismos [75,77-80,107,108]. Em contraste com as ZFNs, devido ao seu fácil *design* e aplicação, a lista de genes e organismos modificados pelo sistema de CRISPR/Cas9, é exaustiva. A revista *Science* elegeu o sistema de CRISPR/Cas9 como descoberta do ano de 2015.

Neste trabalho com o objetivo de comparar a eficiência da utilização das ZFNs com o do sistema de CRISPR/Cas9 para edição gênica, foram geradas

linhagens de parasitos expressando constitutivamente a Cas9 nuclease. A curva de crescimento dessas linhagens demonstrou que a expressão da Cas9 nuclease de forma constitutiva resulta em uma leve redução no crescimento dos parasitos em momentos tardios de sua curva de crescimento (mais de  $5 \times 10^7$  células/mL). No entanto, em contraste com o que foi observado no presente trabalho, Peng e colaboradores (2015), demonstraram que a expressão constitutiva da Cas9 nuclease no *T. cruzi*, resultava em forte redução no crescimento dos parasitos [78]. De forma muito interessante eles também demonstraram que esse fenótipo podia ser revertido quando os parasitos foram transfectados com um sgRNA tendo a Cas9 nuclease como alvo [78]. A diferença observada entre nosso trabalho e o de Peng e colaboradores (2015), em relação a redução no crescimento dos parasitos expressando Cas9 nuclease, pode ser resultado do número de cópias do plasmídeo contendo esta nuclease integrado no genoma do parasito. Enquanto no nosso trabalho foi utilizado um plasmídeo linear, cuja integração ocorre no locus de  $\beta$ -tubulina, no trabalho de Peng *et al*, 2015, foi utilizado o plasmídeo pTrex circular, que pode se integrar no locus de rRNA. Lander e colaboradores (2015), também utilizaram o pTrex para expressão da Cas9 nuclease, no entanto, neste trabalho foi utilizada uma Cas9 nuclease fusionada com a proteína GFP [80]. Considerando que no trabalho de Lander *et al*, 2015 também não foi observada redução no crescimento dos parasitos expressando Cas9 nuclease de forma constitutiva, essa diferença poderia ser atribuída a alguma mudança conformacional adotada pela Cas9 nuclease fusionada com GFP. Tendo em vista que Lander e colaboradores (2015), utilizaram a cepa Y do *T. cruzi*, Peng e colaboradores (2015), utilizaram a cepa CL e no presente

trabalho foi utilizado o clone CL14, essa diferença também pode estar relacionada com a susceptibilidade de diferentes cepas do *T. cruzi* ao dano por DSB

Após a geração de linhagens expressando a Cas9 nuclease constitutivamente, esses parasitos foram transientemente transfectados com um plasmídeo contendo GFP e um sgRNA que tem o gene *gp72* como alvo. O gene que codifica a proteína GFP foi inserido no plasmídeo para facilitar o monitoramento de parasitos com o flagelo descolado, bem como para controle da eficiência de transfecção. Quarenta e oito horas após a transfecção, aproximadamente 1% dos parasitos que expressavam GFP, apresentavam o fenótipo para deleção dos dois alelos do gene *gp72*. Também foi observado parasitos que expressavam GFP (em torno de 2%) e não exibiam o fenótipo para deleção deste gene. Uma explicação para esse resultado é a de que esses parasitos estejam expressando níveis menores de Cas9 nuclease. Peng e colaboradores (2015), observaram que após a transfecção de parasitos expressando a Cas9 nuclease constitutivamente com um sgRNA que tem o gene *egfp* como alvo, alguns parasitos não apresentavam perda da fluorescência verde. Ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio de imunoadsorção enzimática) demonstraram que os parasitos eGFP positivos expressavam níveis menores de Cas9 nuclease em relação aos parasitos eGFP negativos.

É importante destacar que no presente trabalho, a eficiência de transfecção obtida após eletroporação dos parasitos com o plasmídeo pTrex contendo o sgRNA que tem *gp72* como alvo, por algum motivo desconhecido, foi muito baixa (em torno de 3% dos parasitos incorporaram o plasmídeo). Por

esse motivo, poucos parasitos contendo a deleção dos dois alelos do gene *gp72* foram obtidos. Como já foi discutido no item 4.1 a eficiência de transfecção utilizando 10 µg de plasmídeo e o sistema de transfecção *nucleofector* pode alcançar uma eficiência de 14% dos parasitos expressando o gene de interesse.

A deleção do gene *gp72* utilizando o sistema de CRISPR/Cas9, já havia sido demonstrada por Lander *et al*, 2015 [80]. Diferente do demonstrado no presente trabalho, Lander e colaboradores (2015) deletaram o gene *gp72* transfectando parasitos de forma estável com um plasmídeo contendo a sequência do sgRNA que tem *gp72* como alvo. Mesmo após a seleção de parasitos com sgRNA, não foi obtida uma população 100% nocaute para *gp72*.

Em resumo, neste trabalho foram testadas duas abordagens diferentes para edição do genoma do *T. cruzi*, tendo como alvo o mesmo gene. As ZFNs foram capazes de promover a deleção gênica por recombinação homóloga com uma eficiência maior do que aquela obtida pelo método convencional, enquanto que o sistema de CRISPR/Cas9 foi capaz de gerar parasitos com a deleção do gene *gp72* sem a necessidade da seleção dos parasitos com uma sequência doadora para que ocorra HR. Além disso, as ZFNs<sup>GP72</sup> foram constitutivamente expressas no *T. cruzi*, enquanto que o sgRNA, foi transientemente expresso. Isso indica que não é necessário grandes quantidades do sgRNA para que o sistema de CRISPR/Cas9 seja funcional no *T. cruzi*.

Lander e colaboradores (2015), também demonstraram que, assim como as ZFNs, o sistema de CRISPR/Cas9 promove a deleção gênica por recombinação homóloga com alta eficiência. Similar aos nossos resultados, eles foram capazes de gerar uma população 100% nocaute para o gene *PFR2*,

quando uma sequência linear contendo um gene de resistência flanqueada por sequências de *PFR2* foi co-transfectada junto com a sequência do sgRNA que tem este gene como alvo.

Desvantagens relacionadas à utilização das ZFNs incluem o fato de seu *design* ser complexo, laborioso e como a síntese do gene codificador da ZFN precisa ser encomendada à uma empresa especializada, o custo torna-se muito elevado. Além disso, as ZFNs podem oferecer toxicidade relacionada com quebra inespecífica. Em contrapartida a síntese do sgRNA é simples e pode ser feita utilizando técnicas rotineiras de biologia molecular. Ademais o sistema de CRISPR/Cas9 oferece menores riscos de toxicidade por *off targets*, considerando que a Cas9 nuclease precisa se associar com o sgRNA para encontrar e clivar seu alvo. A necessidade da existência do motivo PAM, para que a Cas9 nuclease se ligue e clive seu alvo, oferece mais uma “proteção” contra quebra inespecífica. O presente trabalho demonstrou que a utilização das ZFNs nucleases para induzir quebra de dupla fita, aumenta a eficiência de recombinação homóloga no *T. cruzi*. A utilização dessas proteínas facilita a geração de linhagens nocaute por HR de forma extraordinária, considerando que em apenas uma transfecção é possível deletar dois alelos com um alta eficiência. De forma similar o sistema de CRISPR/Cas9 possui a capacidade de gerar linhagens nocaute sem a necessidade de utilizar uma sequência para recombinar por HR. No entanto, dependendo do objetivo do experimento, a utilização de uma sequência doadora aumenta a eficiência de deleção gênica. A escolha do sistema a ser utilizado, depende do objetivo do experimento, dos reagentes disponíveis no laboratório e da experiência do pesquisador.

O sistema de CRISPR/Cas9 também pode ser eficiente para *knockdown* de genes, de forma similar como ocorre no sistema de RNAi, esse sistema tem sido denominado de CRISPR *interference* (CRISPRi) [109]. Gilbert e colaboradores (2013), demonstraram que é possível diminuir a expressão de um gene repórter (GFP), bem como de genes endógenos, em células de mamífero e também em *S. cerevisiae*, utilizando uma versão da Cas9 nuclease que não possui atividade catalítica, denominada dCas9. A repressão da expressão parece ser mediada pelo bloqueio da transcrição, já que a ligação da dCas9 nuclease ao seu DNA alvo, impede a transcrição pela RNA polimerase. Por meio de RNA seq Gilbert e colaboradores (2013), demonstraram que a repressão na transcrição ocorre de forma específica, visto que foi observado que nas células HEK293 transfectadas com a dCas9 e um sgRNA que tem o gene *gfp* como alvo, apenas o gene *gfp* apresentava expressão diminuída. A aplicação do sistema de CRISPR/Cas9 para bloqueio da transcrição gera muitas perspectivas em relação a utilização dessa sistema para *knockdown* de genes. O sistema de CRISPRi poderia ser utilizado, por exemplo, para *knockdown* de genes essenciais em organismos que não possuem o sistema de RNAi, como é o caso do *T. cruzi*.

Como perspectivas pretendemos utilizar os parasitos expressando a T7 RNA polimerase (item 4.1, figura 8) para expressar o sgRNA que tem *gp72* como alvo. Para isso essas linhagens foram transfectadas com a Cas9 nuclease e sua expressão foi confirmada por *western blot* (dados não mostrados). Um plasmídeo contendo a sequência do sgRNA<sup>GP72</sup> sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase, denominado pBluesgGP72, também foi gerado. Em seguida pretendemos testar se a transfecção transiente dos

parasitos expressando a T7 RNA polimerase e a Cas9 nuclease com o pBluesgGP72 resultará em uma eficiência de deleção de GP72 maior em relação a transfecção transiente do sgRNA com o pTrex sob o controle do promotor de rRNA do *T. cruzi* (como mostra a figura 24 no item 4.3.2).

Como o sistema de CRISPR/Cas9 demonstra ser mais vantajoso em relação à utilização das ZFNs, também estamos planejando iniciar estudos relacionados à função dos genes transialidase e amastina em *T. cruzi* utilizando os parasitos que foram gerados expressando Cas9 e a síntese de sgRNAs contendo as sequências alvos desses genes.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, et al. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480.
2. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, et al. (2009) Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72: 441-446.
3. Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 31-40.
4. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 73: 845-867.
5. Kropf SP, Sa MR (2009) The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 16 Suppl 1: 13-34.
6. Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93: 203-214.
7. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375: 148-159.
8. Legros D, Ollivier G, Gastellu-Etcheberry M, Paquet C, Burri C, et al. (2002) Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *Lancet Infect Dis* 2: 437-440.
9. Teixeira SM, daRocha WD (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* 2: 148-158.
10. LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7: 996-1007.
11. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8: 491-501.
12. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
13. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplast parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.



14. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.
15. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, et al. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.
16. Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, et al. (2014) Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3176.
17. Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL (2009) Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10: 255.
18. Campos PC, Silva VG, Furtado C, Machado-Silva A, Darocha WD, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol* 176: 8-16.
19. Araujo PR, Burle-Caldas GA, Silva-Pereira RA, Bartholomeu DC, Darocha WD, et al. (2011) Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. *Parasitol Int* 60: 161-169.
20. dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, et al. (2012) The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1779.
21. Doyle PS, Zhou YM, Hsieh I, Greenbaum DC, McKerrow JH, et al. (2011) The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS Pathog* 7: e1002139.
22. Clayton CE (1999) Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today* 15: 372-378.
23. Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20: 3963-3969.
24. Martinez-Calvillo S, Hernandez R (1994) *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142: 243-247.
25. Martinez-Calvillo S, Lopez I, Hernandez R (1997) pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 199: 71-76.
26. Vazquez MP, Levin MJ (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239: 217-225.
27. DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, et al. (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* 92: 113-120.
28. Curto Mde L, Lorenzi HA, Moraes Barros RR, Souza RT, Levin MJ, et al. (2014) Cloning and expression of transgenes using linear vectors in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 44: 447-456.
29. Gomes ML, Araujo SM, Chiari E (1991) *Trypanosoma cruzi*: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 131-132.
30. Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas LH, Jr., Uemura H, Schenkman S (2000) The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 111: 235-240.
31. Li F, Gottesdiener KM (1996) An efficient method for stable transfection of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 24: 534-535.
32. Burkard G, Fragoso CM, Roditi I (2007) Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 220-223.
33. Laufer G, Schaaf G, Bollgong S, Gunzl A (1999) In vitro analysis of alpha-amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 19: 5466-5473.
34. ten Asbroek AL, Mol CA, Kieft R, Borst P (1993) Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 59: 133-142.

35. Hara T, Yasuda K, Fukuma T (2002) Effective gene transfer into *Trypanosoma brucei* bloodstream forms by particle bombardment. *Mol Biochem Parasitol* 119: 117-119.
36. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 89-101.
37. Wen LM, Xu P, Benegal G, Carvahó MR, Butler DR, et al. (2001) *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. *Exp Parasitol* 97: 196-204.
38. DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 133: 175-186.
39. Taylor MC, Kelly JM (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* 6: 32.
40. Burle-Caldas Gde A, Grazielle-Silva V, Laibida LA, DaRocha WD, Teixeira SM (2015) Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 203: 25-33.
41. Ma Y, Weiss LM, Huang H (2015) Inducible suicide vector systems for *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 17: 440-450.
42. Otsu K, Donelson JE, Kirchhoff LV (1993) Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. *Mol Biochem Parasitol* 57: 317-330.
43. Grazielle-Silva V, Zeb TF, Bolderson J, Campos PC, Miranda JB, et al. (2015) Distinct Phenotypes Caused by Mutation of MSH2 in *Trypanosoma* Insect and Mammalian Life Cycle Forms Are Associated with Parasite Adaptation to Oxidative Stress. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003870.
44. Kangussu-Marcolino MM, Cunha AP, Avila AR, Herman JP, DaRocha WD (2014) Conditional removal of selectable markers in *Trypanosoma cruzi* using a site-specific recombination tool: proof of concept. *Mol Biochem Parasitol* 198: 71-74.
45. Sauer B (1987) Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 2087-2096.
46. Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, Herman JP (2003) Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res* 31: e131.
47. Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin M (1995) Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 23: 5012-5019.
48. Glover L, Horn D (2009) Site-specific DNA double-strand breaks greatly increase stable transformation efficiency in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 166: 194-197.
49. Porteus MH, Carroll D (2005) Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23: 967-973.
50. Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, et al. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 33: 5978-5990.
51. Bhattacharyya MK, Norris DE, Kumar N (2004) Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infect Genet Evol* 4: 91-98.
52. Wu J, Kandavelou K, Chandrasegaran S (2007) Custom-designed zinc finger nucleases: what is next? *Cell Mol Life Sci* 64: 2933-2944.
53. Passos-Silva DG, Rajao MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, et al. (2010) Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids* 2010: 840768.
54. Glover L, Jun J, Horn D (2011) Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 39: 1372-1380.

55. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, et al. (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21: 289-297.
56. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161: 1169-1175.
57. Hoher T, Wallace L, Khan K, Cathomen T, Reichelt J (2012) Highly efficient zinc-finger nuclease-mediated disruption of an eGFP transgene in keratinocyte stem cells without impairment of stem cell properties. *Stem Cell Rev* 8: 426-434.
58. Straimer J, Lee MC, Lee AH, Zeitler B, Williams AE, et al. (2012) Site-specific genome editing in *Plasmodium falciparum* using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Methods* 9: 993-998.
59. Singer M, Marshall J, Heiss K, Mair GR, Grimm D, et al. (2015) Zinc finger nuclease-based double-strand breaks attenuate malaria parasites and reveal rare microhomology-mediated end joining. *Genome Biol* 16: 249.
60. Pruett-Miller SM, Reading DW, Porter SN, Porteus MH (2009) Attenuation of zinc finger nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. *PLoS Genet* 5: e1000376.
61. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29: 143-148.
62. Smidler AL, Terenzi O, Soichot J, Levashina EA, Marois E (2013) Targeted mutagenesis in the malaria mosquito using TALE nucleases. *PLoS One* 8: e74511.
63. Sugi T, Sakuma T, Ohtani Y, Yamamoto T (2014) Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ* 56: 78-85.
64. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509-1512.
65. Moore FE, Reyon D, Sander JD, Martinez SA, Blackburn JS, et al. (2012) Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *PLoS One* 7: e37877.
66. Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
67. Mali P, Esvelt KM, Church GM (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10: 957-963.
68. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
69. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
70. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826.
71. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, et al. (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 41: 4336-4343.
72. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, et al. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31: 227-229.
73. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, et al. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-918.
74. Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL (2013) Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep* 4: 220-228.
75. Zhang C, Xiao B, Jiang Y, Zhao Y, Li Z, et al. (2014) Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *MBio* 5: e01414-01414.
76. Shen B, Brown KM, Lee TD, Sibley LD (2014) Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. *MBio* 5: e01114-01114.

77. Sollelis L, Ghorbal M, MacPherson CR, Martins RM, Kuk N, et al. (2015) First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol* 17: 1405-1412.
78. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL (2015) CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio* 6: e02097-02014.
79. Zhang WW, Matlashewski G (2015) CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. *MBio* 6: e00861.
80. Lander N, Li ZH, Niyogi S, Docampo R (2015) CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *MBio* 6: e01012.
81. Cooper R, de Jesus AR, Cross GA (1993) Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J Cell Biol* 122: 149-156.
82. Camargo EP (1964) Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.
83. Schumann Burkard G, Jutzi P, Roditi I (2011) Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol Biochem Parasitol* 175: 91-94.
84. Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2002-2007.
85. Rudenko G, Blundell PA, Taylor MC, Kieft R, Borst P (1994) VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 13: 5470-5482.
86. Sloof P, Bos JL, Konings AF, Menke HH, Borst P, et al. (1983) Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol* 167: 1-21.
87. de Jesus AR, Cooper R, Espinosa M, Gomes JE, Garcia ES, et al. (1993) Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J Cell Sci* 106 ( Pt 4): 1023-1033.
88. Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, et al. (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26: 702-708.
89. Cardoso MS, Junqueira C, Trigueiro RC, Shams-Eldin H, Macedo CS, et al. (2013) Identification and functional analysis of *Trypanosoma cruzi* genes that encode proteins of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2369.
90. Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL (2014) Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol Open* 3: 42-49.
91. Perez Brandan C, Padilla AM, Xu D, Tarleton RL, Basombrio MA (2011) Knockout of the *dhfr-ts* gene in *Trypanosoma cruzi* generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1418.
92. Li ZH, Alvarez VE, De Gaudenzi JG, Sant'Anna C, Frasch AC, et al. (2011) Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 286: 43959-43971.
93. Jimenez V, Docampo R (2015) TcPho91 is a contractile vacuole phosphate sodium symporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 97: 911-925.
94. da Silva Augusto L, Moretti NS, Ramos TC, de Jesus TC, Zhang M, et al. (2015) A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 11: e1004618.
95. Taylor MC, Lewis MD, Fortes Francisco A, Wilkinson SR, Kelly JM (2015) The *Trypanosoma cruzi* vitamin C dependent peroxidase confers protection against oxidative stress but is not a determinant of virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003707.
96. LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, Bangs JD, Donelson JE (2003) Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. *J Biol Chem* 278: 24658-24664.

97. Mbang-Benet DE, Sterkers Y, Crobu L, Sarrazin A, Bastien P, et al. (2015) RNA interference screen reveals a high proportion of mitochondrial proteins essential for correct cell cycle progress in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 16: 297.
98. de Macedo JP, Schumann Burkard G, Niemann M, Barrett MP, Vial H, et al. (2015) An Atypical Mitochondrial Carrier That Mediates Drug Action in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 11: e1004875.
99. Velez-Ramirez DE, Florencio-Martinez LE, Romero-Meza G, Rojas-Sanchez S, Moreno-Campos R, et al. (2015) BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 142: 1563-1573.
100. Wilson CS, Chang AJ, Greene R, Machado S, Parsons MW, et al. (2015) Knockdown of Inner Arm Protein IC138 in *Trypanosoma brucei* Causes Defective Motility and Flagellar Detachment. *PLoS One* 10: e0139579.
101. Koch H, Raabe M, Urlaub H, Bindereif A, Preusser C (2016) The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: characterization of the functional poly(A) polymerase. *RNA Biol*: 0.
102. Janse CJ, Franke-Fayard B, Mair GR, Ramesar J, Thiel C, et al. (2006) High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol Biochem Parasitol* 145: 60-70.
103. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP (2006) High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 1: 346-356.
104. Jongco AM, Ting LM, Thathy V, Mota MM, Kim K (2006) Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 146: 242-250.
105. Lima MT, Jansen AM, Rondinelli E, Gattass CR (1991) *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol Res* 77: 77-81.
106. Wickstead B, Ersfeld K, Gull K (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 125: 211-216.
107. Ghorbal M, Gorman M, Macpherson CR, Martins RM, Scherf A, et al. (2014) Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol* 32: 819-821.
108. Sidik SM, Hackett CG, Tran F, Westwood NJ, Lourido S (2014) Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 9: e100450.
109. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, et al. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154: 442-451.

## **7. Anexo**

### **7.1 Anexo I**

Artigo publicado na revista *Molecular & Biochemical Parasitology* (2015).

Burle-Caldas, Gde A, Grazielle-Silva V, Laibida L A, DaRocha W D, Teixeira SM (2015). Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 203(1-2):25-33

## **7.2 Anexo II**

Artigo a ser submetido à revista *Molecular & Biochemical Parasitology* como *Short technical report*.

Burle-Caldas, Gde A, Grazielle-Silva V, DaRocha W D, Burkard-Schumann G, Roditi I, Teixeira S M. Editing the *Trypanosma cruzi* genome with Zinc Finger and Cas9 Nucleases.