



FIOCRUZ

Concurso Público Fiocruz 2023

Pesquisador em Saúde Pública

Prova Discursiva

PE49

Genética molecular de tripanossomatídeos patogênicos - Curitiba

Espelho de Resposta

Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

Questão 01

- a) O RNA poderia ser sintetizado por transcrição in vitro a partir de um DNA contendo as sequências de interesses e um promotor. Neste processo, se utiliza uma enzima denominada RNA polimerase. Geralmente esta enzima pode ser obtida comercialmente e reconhece uma sequência específica inserida em um plasmídeo a montante da sequência do gene da luciferase. O plasmídeo poderia ser obtido por clonagem ou preparado de maneira sintética. Em ambos os casos ele seria propagado em bactéria (*Escherichia coli*) e utilizado após ser linearizado após a sequência codificadora de interesse.
- b) Para que ocorra a tradução em eucariotos e particularmente em Trypanosomatídeos é necessário que o RNA mensageiro (mRNA) contenha sequências específicas tanto na região 5' como 3' do mensageiro. Na região 5' é necessário que o RNA contenha modificações nas primeiras bases, denominadas de capacete (cap). Em Trypanosomatídeos esta modificação ocorre com a adição de 4 metilações em uma sequência líder (SL) de 33-39 bases, adicionada por "trans-splicing" ao pré-mRNA. Então a sequência original deve conter o SL com a modificação do cap. Isto é feito com uma enzima comercial que metila a extremidade do RNA. Na região 3', após o códon de terminação deve haver uma sequência reguladora, de preferência já presente no plasmídeo inicial e a montante uma sequência de várias adeninas (denominadas de polyA). Isto pode também ser feito pela adição de uma polyA polimerase e o nucleotídeo ATP ao RNA sintético.
- c) A síntese proteica depende da presença de todos os aminoácidos, para serem incorporados na cadeia polipeptídica. Também a mistura deve conter níveis adequados de ATP que fornece energia para o sistema. Algumas reações da síntese proteica dependem também da presença de GTP. Todos estes fatores devem estar em condições similares a que ocorre no interior da célula e para isso se controle o pH, concentração de íons e temperatura da reação.
- d) Uma vez que a enzima produzida na reação de síntese proteica é a luciferase, após a reação de tradução, esta pode ser detectada pela adição de luciferina e ATP, o que vai gerar luz. Isto pode ser feito em um equipamento que detecte esta luz, ou seja um luminômetro, incorporado em um leitor de placas, por exemplo.

- e) Como controle positivo poderia se utilizar inibidores de síntese proteica bem conhecidos como cicloheximida, e aminoglicosídeos. Como controle negativo, poderia se omitir o RNA mensageiro a reação.
- f) Para saber se o composto é específico teria que ser testado na inibição da síntese proteica de outras células. Técnicas complementares podem ser usadas, mas é essencial que se determine se o composto inibe células humanas em ensaios de síntese proteica ou ensaios de toxicidade.

Questão 02

a) Em Tripanosomatídeos os mRNAs possuem 39nt conservados na extremidade 5' que é chamado de "spliced-leader (SL)", região não codificadora 5' (5'UTR), a região codificadora, região não codificadora 3' (3'UTR) e cauda poli A na extremidade 3'. Os genes em *T. cruzi* são transcritos em unidades policistrônicas (UP) que são processadas por "trans-splicing" e poliadenilação gerando unidades monocistrônicas. Logo, diferentes genes são transcritos em níveis similares na UP, mas podem apresentar níveis diferenciados de mRNA por controle pós-transcricional. Por exemplo, pela ação de proteínas/complexos que ligam ao RNA e alteram a meia vida do mRNA. A interação das proteínas ligadoras de RNA (RBPs) costuma ocorrer em regiões não traduzidas, que costumam ser longas em mRNAs diferencialmente expressos. É importante ressaltar que não há atuação do sistema de interferência de RNA em *T. cruzi*.

b) Desde dados da anotação do gene no banco de dados TriTrypDB, uma vez que este gene ou genes ortólogos já podem ter sido previamente descritos/caracterizados. De qualquer forma, análises in silico, tipo Blast, e/ou busca de domínios, análises de hidrofobicidade, predição de localização celular podem ajudar na elucidação da função.

c) A fim de determinar a localização celular podem ser adotadas as seguintes estratégias:

- Imunolocalização nas diferentes formas do parasito utilizando anticorpos gerados contra a proteína recombinante ou peptídeos sintéticos;

Limitação: expressão da proteína recombinante, modificações pós-traducionais, e imunogenicidade da proteína, mas é a que detecta a proteína produzida em condições naturais.

- Superexpressão da ORF fusionada a etiquetas como GFP, HA, FLAG, seguida de imunolocalização ou imunofluorescência;

Limitação: mais fácil e rápido, mas as condições de superexpressão e a adição de etiqueta podem alterar a localização.

- "Tagging" do gene endógeno pela inserção de etiqueta (p.ex.: GFP, HA, etc) juntamente com cassete de resistência ou utilizando a metodologia de CRISPR-Cas9 para facilitação do evento de integração.

Limitação: construção do cassete de integração na estratégia clássica, ou por síntese de genes/fragmentos. No caso de tagging por inserção de cassete os problemas de expressão são similares ao da superexpressão. No tagging usando CRISPR-Cas9 é possível a inserção apenas da etiqueta que acabará por manter níveis de expressão similares ao do gene selvagem.

Para a identificação de proteínas parceiras poderiam ser realizados experimentos de imunoprecipitação (pull-down) utilizando anticorpos específicos para o gene de interesse ou anti-etiqueta no caso de utilização de parasitos superexpressores. Os produtos de imunoprecipitação poderão ser analisados por SDS-PAGE e espectrometria de massas, utilizando-se controles. Também seria possível aplicar técnicas baseadas em BiOID (sistema que utiliza uma biotina ligase promiscua) juntamente com espectrometria de massas para identificação de parceiras.

d) Das metodologias utilizadas nos principais Tripanosomatídeos, o silenciamento por RNAi só é possível em parasitas com *T. brucei*, e algumas espécies de *Leishmania*. Em *T. cruzi* é possível aplicar a deleção por recombinação homóloga clássica, e a deleção ou interrupção de genes por CRISPR-Cas9, seja pela inserção de cassetes de resistência ou sequências contendo códons de paradas com sequências para recombinação que flanqueiam os sítios alvos para os sgRNAs.

Na recombinação homóloga clássica é necessário construir dois cassetes de resistência (^genes de resistência pra cada alelo do par de homólogos) contendo sequências homólogas que flanqueiam a região a ser deletada para a substituição dos genes homólogos. No caso de genes essenciais é impossível deletar ambos os alelos e obter parasitos nocautes, mas como é um gene com maior expressão em amastigotas, talvez seja possível deletar o gene em epimastigotas, mas que torne impossível obter amastigotas caso seja essencial nesta forma.

Utilizando o sistema CRISPR-Cas9, um sistema que depende de pelo menos 2 componentes, a proteína Cas9 (que pode ser expressa pelo parasito ou pelo fornecimento da proteína recombinante) e do sgRNA, que é desenhado com base na sequência genômica para alvejar apenas o gene de interesse. Utilizando apenas estes dois componentes o gene será interrompido pelo reparo da quebra gerada pelo complexo Cas9-sgRNA por união de pontas por micro-homologia (MMEJ). Caso haja interesse numa interrupção ou deleção do gene de forma direcionada poderá ser fornecido um terceiro componente para reparo por recombinação homóloga, que normalmente é realizado pelo fornecimento de cassetes de resistência similares ao sistema de deleção clássico, sendo que os braços de homologia podem ser muito curtos (25-30 nt), ou por oligonucleotídeos fita simples contendo braços de homologia flaqueando códons de parada. Os braços de homologia são complementares ao ponto de clivagem pela Cas9. A deleção ou interrupção de genes essenciais pode ser comprometida e apenas um dos alelos como no sistema clássico.

Tanto no sistema clássico quanto com o sistema CRISPR-Cas9 são obtidos clones nocautes que precisam ter as alterações genômicas confirmadas por técnicas como PCR, sequenciamento, ou Southern blot, ou combinações destas. Logicamente, a não expressão do gene pode ser também determinada no nível do mRNA (p.ex. qPCR), ou proteico (p.ex. western blot). Confirmadas as alterações é necessário complementar os parasitos nocautes pela transfecção com plasmídio para a superexpressão do gene (Controle add-back) e plasmídio vazio (controle negativo), a fim de confirmar que prováveis alterações fenotípicas foram realmente devidas as alterações genômicas confirmadas, mas não a outras mutações não desejadas que possam ter ocorrido no resto do genoma.

Normalmente, todas essas modificações genômicas e a obtenção de controles são realizadas em formas epimastigotas, logo para a análise funcional em amastigotas, as formas epimastigotas terão que ser diferenciadas em formas tripomastigotas para serem usadas em ensaios de infecção de culturas de células de mamíferos. Sendo assim as alterações fenotípicas poderão ser realizadas por análises por diferentes técnicas de microscopia e/ou citometria com marcação de DNA para indicar replicação ou por contabilização de formas amastigotas. Apesar de ser um gene super-expresso numa forma, este poderá ter papel nas outras formas e deverá ser analisado.