

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES  
PATOGENICOS

CAMILA GACHET DE CASTRO

**Caracterização do compartimento nuclear e o papel dos fatores de  
*splicing* da célula hospedeira durante a infecção por *Trypanosoma cruzi***

RIBEIRÃO PRETO

2021

## RESUMO

GACHET-CASTRO, C. Caracterização do compartimento nuclear e o papel dos fatores de *splicing* da célula hospedeira durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2021.

O parasita *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas e sua interação com a célula hospedeira ainda é alvo de estudos, principalmente devido ao número crescente de indivíduos afetados mundialmente e à falta de tratamentos efetivos. Durante o processo de infecção, diversas alterações ocorrem na célula hospedeira após o contato com o parasito, levando a modificações no metabolismo celular e alterações morfológicas. Na literatura, já foi descrito que patógenos intracelulares são capazes de controlar a célula hospedeira durante a infecção podendo alterar o seu compartimento nuclear. No entanto, pouco se sabe sobre a organização nuclear e regulação da atividade transcricional da célula hospedeira quando infectada pelo *T. cruzi*. O objetivo desta tese de doutorado foi de investigar as proteínas envolvidas nos processos de transcrição e *splicing* em células não fagocíticas durante a progressão da infecção pelo *T. cruzi*. Estes estudos são uma continuação das investigações iniciadas no meu mestrado, onde demonstramos pela primeira vez que ocorre uma modulação em algumas proteínas das maquinarias de transcrição e *splicing* na célula hospedeira quando infectada pelo *T. cruzi*. Para realização da metodologia empregada utilizamos células não fagocíticas LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi*, as quais foram comparadas com células não infectadas (controle). Nossos dados se basearam em análises de imagens obtidas em microscópio confocal e eletrônica, análises de expressão gênica e proteica, além de checagem da atividade do *splicing*. Os resultados mostraram que durante a infecção, ao entrar na célula hospedeira, o parasita migra para perto do núcleo causando uma deformação no envelope nuclear e isto pode alterar a conformação da cromatina. Durante a infecção na célula hospedeira, a RNA polimerase II é regulada, de maneira dependente do tempo, resultando em uma pausa da sua atividade transcricional. Além disso, os fatores de *splicing* são regulados negativamente de maneira dependente do tempo, após 12 horas de

infecção, e isto ocorre paralelamente ao rompimento do vacúolo parasitóforo. Ainda, o fator auxiliar de splicing U2AF35 é sequestrado pelo parasita, impedindo que desempenhe seu papel no processamento do RNA no hospedeiro. Em conjunto, os resultados sugerem fortemente a existência de um mecanismo desenvolvido pelo *T. cruzi*, regulando o processo de *splicing* da célula hospedeira a seu favor, o que foi demonstrado através do ensaio de *splicing in vivo* usando o minigene repórter E1A. Esse trabalho fornece evidências de uma relação molecular complexa entre o *T. cruzi* e o núcleo da célula hospedeira durante a infecção favorecendo sua permanência e sobrevivência. Desta forma, este estudo pode contribuir na identificação de novas vias e alvos para a intervenção de quimioterápicos a serem utilizados para combater a Doença de Chagas.

**Palavras-chaves:** *Trypanosoma cruzi*, interação patógeno-hospedeiro, tripanossomatídeo, núcleo, compartimento nuclear, ribonucleoproteínas, fatores de *splicing*, RNAPII, U2AF35.

## ABSTRACT

GACHET-CASTRO, C. Characterization of the nuclear compartment and the role of host cell splicing factors during *Trypanosoma cruzi* infection. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2021.

The *Trypanosoma cruzi* parasite is the etiological agent of Chagas Disease. The host-pathogen interaction is still the target of studies, mainly due to the growing number of affected individuals worldwide and the lack of effective treatments. During the infection process, several changes occur in the host cell after contact with the parasite, leading to cell metabolism changes and morphological changes. The literature has already been described that intracellular pathogens can control the host cell during infection and alter its nuclear compartment. However, little is known about the nuclear organization and regulation of the host cell's transcriptional activity when infected with *T. cruzi*. The objective of this doctoral thesis was to investigate the proteins involved in the transcription and splicing processes in epithelial cells during the progression of infection by *T. cruzi*. These studies are a continuation of the research initiated in my master's degree, where we demonstrate a modulation in the protein transcription and splicing machinery. The methodology used in LLC-MK2 non-phagocytic cells infected with *T. cruzi* compared to uninfected cells (control) was based on analysis of images obtained in a confocal and electron microscope, of gene and protein expression, and the use of a mini reporter gene for check splicing *in vivo*. The results showed that the parasite migrates close to the nucleus causing deformation in the nuclear envelope, altering the chromatin conformation during the infection. We analyzed the RNA polymerase II from the host and observed that it is regulated, in a time-dependent manner, resulting in a pause in its transcriptional activity. Also, host splicing factors are negatively regulated in a time-dependent manner after 12 hours of infection and this occurs in parallel with the rupture of the parasitophorous vacuole. Also, the auxiliary factor for splicing U2AF35 is sequestered by the parasite, preventing it from playing its role in processing RNA in the host. Together, the results strongly suggest the existence of a mechanism developed by *T. cruzi*, regulating the splicing process of the host

cell in its favor, which was demonstrated through the in vivo splicing assay using the E1A reporter. This work provides evidence of a complex molecular relationship between *T. cruzi* and the host cell nucleus during infection, favoring its permanence and survival. Thus, this study can contribute to the identification of new pathways and targets for the intervention of chemotherapeutic drugs to be used to combat Chagas disease.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, host-pathogen interaction, trypanosomatid, nucleus, nuclear compartment, ribonucleoproteins, splicing factors, RNAPII, U2AF35.