

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA ZULKIEVICZ

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DA H2AZ EM *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2013

VANESSA ZULKIEVICZ

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DA H2AZ EM *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada à disciplina Estágio
Supervisionado em Biologia como requisito parcial
à conclusão do Curso de Ciências Biológicas -
Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr.^a Gisele Fernanda Assine Picchi
Co-orientadora: Prof.^a Teresa Cristina César Ogliari

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e todas as suas providências.

À minha família, em especial aos meus pais Sidney Joana D'arc Zulkievicz e Irene Pereira Zulkievicz e aos meus irmãos Bruna e Sidney Junior por toda confiança, dedicação e compreensão.

A todos os professores que tive até o presente momento por terem contribuído com a minha formação.

À pesquisadora Gisele Fernanda Assine Picchi pela oportunidade de estágio, por ter me acolhido sem indiferenças, por ter apostado e confiado em minha competência, pelo incentivo e apoio mediante adversidades e incertezas, pelo afeto e por todos os ensinamentos.

À professora Teresa Cristina César Ogliari por aceitar ser minha co-orientadora, confiar no meu comprometimento e auxiliar nos trâmites necessários para conclusão do trabalho.

À banca examinadora, professoras Márcia Helena Mendonça e Roseli Wassem, por aceitar avaliar e contribuir com a versão final do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos do Instituto Carlos Chagas, pelo acolhimento, pelas inúmeras dúvidas esclarecidas, por toda ajuda e momentos de descontração.

Aos amigos que souberam me ouvir e compreender minhas angústias, que me proporcionaram palavras de conforto e muitas risadas.

Aos técnicos do preparo de materiais do Instituto Carlos Chagas pelos primeiros ensinamentos e pela disposição em ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da UFPR pelo incentivo e oportunidade inicial às minhas atividades como Iniciação Científica.

E, é claro, à Rosane Cavet Martins que sempre foi muito prestativa, disposta a resolver problemas e esclarecer dúvidas, sem a qual o período acadêmico teria sido mais complicado.

RESUMO

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, enfermidade que acomete cerca de 8 milhões de pessoas em 21 países. Pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida, o parasita divergiu cedo na escala evolutiva, apresentando peculiaridades com relação a sua biologia molecular eucariótica. Em virtude também de seu complexo ciclo de vida, estudos vêm sendo realizados visando evidenciar processos e moléculas envolvidas na regulação da expressão gênica e encontrar possíveis alvos para o tratamento da doença de Chagas. Visto que a composição da cromatina pode fornecer diversas plataformas favoráveis às moléculas regulatórias, o presente trabalho teve como foco sua integrante H2AZ. Esta histona, variante da canônica H2A, além de ser evolutivamente bastante conservada, apresenta indícios de que pode tanto prevenir o espalhamento da heterocromatina quanto participar da ativação da transcrição gênica. Com o intuito de evidenciar as funções da H2AZ no *T. cruzi*, foi objetivado realizar construções gênicas que possibilitassem o nocaute condicional e duplo da histona e transfectá-las em *T. cruzi*, bem como obter a expressão heteróloga da H2A e H2AZ na fração solúvel do extrato bacteriano para ensaios de interação com proteínas endógenas do parasita e detecção de parceiros moleculares. Foram testadas três metodologias para PCR de fusão utilizando *primers* quiméricos, para obtenção dos produtos intermediários, e os *primers* 5' e 3' das extremidades das construções, para obtenção das mesmas. Para o nocaute condicional foi utilizada a fusão carboxi terminal do domínio desestabilizador FKBP na H2AZ e seus ligantes específicos rapamicina e Shld1. A metodologia mais eficiente consistiu em realizar a PCR com quantidades equivalentes a 1 molécula do produto de marcador de seleção para 5 moléculas dos demais produtos, sem suceder reações de fusão. Tal metodologia foi utilizada para produzir os 7 µg necessários para transfecção das construções gênicas no *T. cruzi*. As culturas foram repicadas semanalmente e após o período de seleção nenhum parasita foi encontrado em nenhuma das culturas. Este resultado, entretanto, não possibilita afirmar que o nocaute duplo da H2AZ ocorreu e que esta é vital ao parasita, uma vez que os parasitas do nocaute condicional também morreram. Para obtenção da expressão heteróloga das proteínas recombinantes H2A e H2AZ, fusionadas a seis resíduos de histidina e à GST, foram testadas três cepas de *Escherichia coli*. A expressão na fração solúvel do extrato bacteriano foi obtida apenas para proteínas fusionadas à GST, utilizando a cepa AD494(DE3). As proteínas recombinantes obtidas foram ligadas eficientemente à resina de glutationa, todavia não foi possível eluí-las com 10 mM nem com 20 mM de glutationa reduzida. Tal resultado, no entanto, não é prejudicial à realização dos ensaios de interação, uma vez que os complexos proteicos formados podem ser obtidos no final da purificação por meio de processos físicos. Com esse trabalho, conclui-se que algumas mudanças na estratégia inicial devem ser realizadas - testes com diferentes concentrações de rapamicina e Shld1 e com a fusão amino terminal do domínio desestabilizante - para evidenciar a função da H2AZ em *T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. H2AZ. Nocaute condicional e duplo. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

The flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, a sickness that affects about 8 million people in 21 countries. Belonging to the Trypanosomatidae family of the Kinetoplastida order, the parasite diverged early in the evolutionary scale, exhibiting peculiarities in relation to its eukaryotic molecular biology. Also because of its complex life cycle, studies have been conducted to demonstrate processes and molecules involved in the regulation of gene expression aiming to detect potential targets for the treatment of Chagas disease. Since the composition of chromatin can provide a variety of platforms to favorable regulatory molecules, the present work focuses on its integrant H2AZ. This histone, variant of the canonical H2A, besides being evolutionarily highly conserved, presents evidences that it can not only prevent the spread of heterochromatin, but also participate in the activation of gene transcription. In order to highlight the role of the H2AZ in *T. cruzi*, it was aimed to perform gene constructs, that allowed histone conditional and double knockout, and to transfect them into *T. cruzi*, as well as to obtain the heterologous expression of H2A and H2AZ in the soluble fraction of the bacterial cell extract for interaction assays with endogenous parasite proteins aiming the detection of molecular partners. Three fusion PCR methodologies were tested using chimeric primers to obtain the intermediated products and the borders 5' and 3' end primers of the constructions to obtain the entire fragment. For the conditional knockout the carboxi terminal fusion of the FKPB destabilizing domain in the H2AZ was used and its specific ligands rapamycin and Shld1. The best result was obtained performing PCR using the equivalent of 1 molecule of selection marker to 5 molecules of other products, without intermediary fusion reactions. This methodology was used to produce 7 µg of the gene constructs required for transfection in *T. cruzi*. The cultures were diluted weekly and after the selection period no parasites were detected. This result, however, does not allow to affirm that the double knockout of H2AZ occurred and that this histone is essential for the parasite's life, since the parasites of conditional knockout also died. Three different strains of *Escherichia coli* were tested aiming to obtain the heterologous expression of recombinant proteins H2A and H2AZ fused to six histidine residues and to GST. The expression in the soluble fraction of bacterial extract was obtained only for proteins fused to GST, using the bacterial strain AD494(DE3). The recombinant proteins were effectively bound to the glutathione beads, however it has not been possible to elute them with 10 mM or 20 mM reduced glutathione. This result, however, is not harmful to the tests of interaction, since the protein complexes formed can be obtained at the end of purification by means of physical processes. With this work we conclude that some changes in the initial strategy must be done - tests with different concentrations of rapamycin and Shld1 and the amino terminal fusion of the destabilizing domain - to highlight the role of H2AZ in *T. cruzi*.

Keywords: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. H2AZ. Conditional and double knockout. Heterologous expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVOS	8
2.1	GERAL	8
2.2	ESPECÍFICOS	8
3	REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1	DOENÇA DE CHAGAS	9
3.2	AGENTE ETIOLÓGICO	11
3.3	EXPRESSÃO E REGULAÇÃO GÊNICA	13
3.4	HISTONAS E A VARIANTE H2AZ	14
3.5	ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DA H2AZ	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	MEIOS, SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS	19
4.2	CONSTRUÇÕES GÊNICAS.....	20
4.2.1	Obtenção dos fragmentos	20
4.2.2	Purificação, quantificação e normalização das concentrações.	22
4.2.3	Fusão dos fragmentos.....	22
4.2.3.1	Fusão 1: PCR de fusão com concentração equivalente de produtos	23
4.2.3.2	Fusão 2: PCR de fusão com concentração não equivalente dos produtos...	23
4.2.3.3	Fusão 3: fusão com concentração não equivalente dos produtos seguida de PCR	24
4.3	TRANSFEÇÃO NO <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
4.4	TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	25
4.4.1	Transformação	25
4.4.2	Inóculo e indução da expressão.....	26
4.4.3	Lise celular	26
4.4.4	Purificação das proteínas recombinantes	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	CONSTRUÇÕES GÊNICAS.....	28
5.2	TRANSFEÇÃO NO <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
5.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	36
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, acomete cerca de 8 milhões de pessoas em 21 países, representando maior preocupação para os países da América Latina e apresentando forte incidência e elevada relevância em saúde pública no Brasil. A doença possui duas fases clínicas, a aguda, caracterizada por chagomas de inoculação, e a crônica, que ainda não possui tratamento preventivo ou curativo e se caracteriza por graves sintomas como cardiopatias, megaesôfago e megacólon, que debilitam e/ou levam muitas pessoas a morte.

O agente etiológico dessa tripanossomíase é o *Trypanosoma cruzi*, espécie pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Esse parasita flagelado possui um complexo ciclo de vida heteroxênico, com quatro estágios principais de desenvolvimento que se alternam entre formas replicativas e não replicativas em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. Além do homem, são infectados mamíferos silvestres e domésticos, sendo que os hospedeiros invertebrados e vetores da doença são hemípteros hematófagos da família Reduviidae.

O *T. cruzi* também apresenta peculiaridades com relação à sua biologia molecular eucariótica. A transcrição ocorre de forma policistrônica, originando pré-mRNAs que são processados por poliadenilação e trans-splicing. Ademais, ainda não foram encontrados promotores que regulem o início dessa transcrição, entretanto é sabido, a partir de organismos modelos, que alterações na estrutura da cromatina exercem importante papel sobre os processos dependentes de DNA. Modificações pós-traducionais das histonas e a troca de histonas canônicas por suas variantes são mecanismos epigenéticos pelos quais os nucleossomos se tornam mais instáveis, facilitando o acesso de enzimas e fatores proteicos necessários para a transcrição.

A histona variante H2AZ, isoforma não alélica da canônica H2A, é encontrada em diversos organismos, apresentando-se evolutivamente bastante conservada. Há relatos de que a H2AZ previne o espalhamento da heterocromatina, promove a instabilidade de cromossomos e participa da ativação da transcrição gênica.

Todavia, em *T. cruzi* as histonas são divergentes dos organismos modelo estudados e a relação entre cromatina e transcrição não tem sido muito explorada no parasita.

Nesse contexto, compreender a função da H2AZ em *T. cruzi* possibilita ampliar o conhecimento do papel da epigenética na regulação da expressão gênica e pode prover importantes informações que auxiliem na identificação de possíveis alvos para o tratamento da doença de Chagas, uma vez que são eucariotos evolutivamente divergentes dos organismos modelo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Caracterizar funcionalmente a histona variante H2AZ em *T. cruzi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter construções gênicas, por meio de PCR de fusão, que possibilitem o nocaute duplo e condicional do gene codificador da H2AZ em *T. cruzi*;
- Transfectar o *T. cruzi* com as construções gênicas;
- Expressar as proteínas recombinantes H2A e H2AZ na fração solúvel do extrato bacteriano;
- Purificar as proteínas recombinantes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas teve seus aspectos básicos de patologia e epidemiologia descritos já em 1909, quando Carlos Chagas encontrou parasitas flagelados no intestino de triatomíneos e estudou o primeiro caso humano da doença. Também denominada tripanossomíase americana (REY, 2008), a doença se estabeleceu como uma zoonose há 200-300 anos, como resultado do desequilíbrio ambiental causado pela invasão do homem aos habitats naturais de insetos silvestres vetores da doença. O desmatamento e a expansão da agricultura e da pecuária forçaram a adaptação dos vetores às áreas domiciliadas (BRASIL, 2009; ZINGALES, 2011) e as habitações mais pobres, como casas de pau-a-pique e casebres de palha nas zonas rurais, se tornaram ecótopos favoráveis para sua a colonização (REY, 2008).

Os vetores da doença de Chagas, popularmente denominados “barbeiros”, são hemípteros hematófagos pertencentes à família Reduviidae e à subfamília Triatominae, sendo que os gêneros de maior interesse para a medicina são *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Os triatomíneos voam bem e possuem hábitos noturnos, sua picada é indolor (REY, 2008) e geralmente ocorre em qualquer parte do corpo que esteja descoberta, a qual durante o sono muitas vezes é o rosto (WHO, 2002). Durante ou logo após o repasto sanguíneo os barbeiros contaminados costumam defecar, liberando formas infectantes do *T. cruzi*, que penetram pela lesão da picada causada na pele (REY, 2008; BRASIL, 2009).

Além da transmissão vetorial da doença há a transmissão congênita, via oral (quando ingeridos alimentos contaminados), por transfusão de sangue, acidente laboratorial, transplante de órgãos (WHO, 2002), manipulação de animais infectados e por meio do leite materno (BRASIL, 2009). Recentemente as formas mais comuns, entretanto, tornaram-se menos expressivas na América Latina devido ao rigor na seleção de doadores de sangue e ao controle dos triatomíneos (TARLETON *et al.*, 2007; WHO, 2012), fato associado à modernização das zonas rurais (BRASIL, 2004). A transmissão do parasita por intermédio de vetores domésticos, como o

Triatoma infestans, foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999, no Brasil em 2006 (RASSI JR *et al.*, 2010) e em grande parte da América Central em 2009 e 2010 (WHO, 2012).

Como enzootia, a tripanossomíase causada pelo *T. cruzi* é encontrada em quase todos os locais habitados por triatomíneos, todavia, como zoonose a doença estende-se desde a Argentina e o Chile até o sul dos Estados Unidos (REY, 2008). Atualmente estima-se que a incidência da doença chega a 8 milhões de pessoas em 21 países, sendo que devido à migração humana a enfermidade tem se espalhado por outras regiões não endêmicas (WHO, 2012), expondo à infecção cerca de 75 milhões de pessoas (ZINGALES, 2011). Na América Latina a doença apresenta elevado impacto econômico, uma vez que a maioria dos indivíduos infectados possuem idade economicamente ativa, causando perda da produtividade, além dos gastos com o tratamento dos enfermos (WHO, 2012).

A doença de Chagas possui duas fases clínicas distintas, uma aguda que, se não tratada, evolui para a crônica, sendo que as duas podem se apresentar tanto de forma sintomática quanto assintomática. No Brasil há casos identificados da fase aguda em diferentes estados, principalmente na região da Amazônia Legal, entretanto, atualmente prevalecem os casos crônicos provenientes da transmissão vetorial, com cerca de três milhões de pessoas infectadas (BRASIL, 2009).

No início da doença, durante a fase aguda, a sintomatologia é transitória e semelhante a outras enfermidades, podendo passar despercebida (REY, 2008), motivo pelo qual a proporção de casos agudos identificados sempre foi menor que a de crônicos (BRASIL, 2004). A febre, em geral, é pouco elevada e pode ser acompanhada de outros sintomas como cefaléia, dores pelo corpo e anorexia, todavia, em alguns casos, o período febril pode durar até 45 dias. Uma característica marcante dessa fase em que os tripanossomas são facilmente encontrados no sangue é a presença dos chagomas de inoculação, que são nódulos inflamatórios subcutâneos causados pela penetração dos parasitas na pele. Quando a penetração ocorre na região ocular o edema bipalpebral e unilateral origina o sinal de Romanã (REY, 2008). Os sintomas da fase aguda, mesmo não tratada, desaparecem espontaneamente após 4-8 semanas, caindo o nível da parasitemia, e a doença evolui para fase crônica (WHO, 2002; BRASIL, 2009).

Durante a fase crônica há raros parasitas circulando na corrente sanguínea e a doença pode apresentar-se em três formas clínicas distintas. A forma

indeterminada, a mais comum entre doentes crônicos, caracteriza-se por ser assintomática (BRASIL, 2009) e possuir prognóstico incerto, podendo evoluir para as formas crônicas típicas ou permanecer sem sintomas (REY, 2008). Indivíduos com a forma digestiva, cerca de 10% dos casos, apresentam alterações anatômicas e funcionais do aparelho digestivo, principalmente o megaesôfago e o megacólon. A forma cardíaca, também conhecida como cardiopatia chagásica crônica, é a consequência clínica mais importante, acometendo cerca de 30% dos casos e sendo a maior responsável pelos óbitos em chagásicos crônicos (BRASIL, 2009).

Os testes sorológicos, seguidos pelos parasitológicos, são os principais métodos para o diagnóstico da doença de Chagas, todavia apresentam sensibilidade (94% - 99.5%) e especificidade (94% - 96%) variável de acordo com o kit comercial utilizado. A cura também é detectada por sorologia, ao constatar o desaparecimento dos anticorpos anti-*T. cruzi*, que, no entanto, podem persistir por até cinco anos após a cura da doença (WHO, 2012).

O tratamento específico para a doença é direcionado para a fase aguda e para a infecção congênita. Os medicamentos Benzonidazol e Nifurtimox se mostram eficientes em mais de 60% dos casos agudos, no entanto esses nem sempre são diagnosticados (BRASIL, 2009), e em mais de 95% dos casos congênitos, se a criança for tratada durante seu primeiro ano de vida (WHO, 2002). O tratamento dura de 60 a 90 dias e o medicamento é administrado de acordo com o peso do paciente (RASSI JR *et al.*, 2010). O sucesso terapêutico parece depender também da suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* às drogas utilizadas, todavia ainda não está disponível um teste que avalie a resistência da estirpe infectante aos medicamentos (WHO, 2012). Durante a fase crônica o tratamento visa o alívio dos sintomas e a prevenção das complicações, uma vez que nesta fase não há cura para a doença (WHO, 2002).

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Os organismos pertencentes a esta ordem compreendem uma organela singular, auto-replicativa e com DNA abundante, o

cinetoplasto. Já a família dos tripanossomatídeos abrange espécies parasitas dotadas de um único flagelo e que apresentam modificações de morfologia e organização, de acordo com a fase evolutiva e do hospedeiro em que se encontram (REY, 2008).

O *T. cruzi*, além de parasitar os triatomíneos, vetores da doença de Chagas, possui uma gama de hospedeiros vertebrados, sendo que cerca de 100 espécies de mamíferos são susceptíveis a infecções natural ou experimental. Os mamíferos parasitados naturalmente pertencem às ordens Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Edentata, Marsupialia, Perissodactyla, Primates e Rodentia (WHO, 2002), e em laboratório é possível infectar cobaias, ratos, camundongos, porcos e carneiros (REY, 2008).

O ciclo de vida do parasita exhibe quatro principais formas que se alternam entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. A forma amastigota apresenta formato ovóide e não possui flagelo livre, a epimastigota é mais alongada com flagelo livre e curta membrana ondulante e as formas tripomastigotas sanguínea e metacíclica são mais delgadas com curto flagelo livre e longa membrana ondulante (REY, 2008).

Os tripomastigotas metacíclicos presentes nas excretas contaminadas dos triatomíneos, são liberados durante ou após o repasto sanguíneo e penetram no hospedeiro vertebrado através da lesão causada pela picada do inseto ou pela mucosa ocular. Ao invadir as células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, se transformam em amastigotas, que multiplicam-se rapidamente e transformam-se em tripomastigotas sanguíneos. Estes rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea, meio pelo qual se disseminam no organismo e invadem músculos e outros tecidos. Os insetos triatomíneos se infectam ao sugar sangue de um hospedeiro parasitado, ingerindo as formas sanguíneas do protozoário, as quais transformam-se em epimastigotas no intestino do inseto, se multiplicam e se modificam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) na ampola retal, concluindo o ciclo de vida do *T. cruzi* (REY, 2008).

Apesar de o parasita apresentar as características gerais supracitadas, foi verificado, a partir de mais de 60 cepas isoladas de hospedeiros vertebrados e invertebrados infectados, que o *T. cruzi* apresenta variações tanto morfológicas, fisiológicas e ecológicas, quanto de infectividade e patogenicidade. Com base

nestas informações e em estudos de genética de populações, em 1999 foram definidos no Brasil três grupos de *T. cruzi*: o grupo I e o III causam, esporadicamente, infecções assintomáticas ao homem, pois são predominantes em ciclos silvestres, sendo o grupo III o de ocorrência mais rara; o grupo II possui como principal vetor o *T. infestans* e é associado com o ciclo de transmissão doméstico, prevalece em áreas endêmicas da doença de Chagas e causa as formas sintomáticas e graves da doença (WHO, 2002; REY, 2008).

3.3 EXPRESSÃO E REGULAÇÃO GÊNICA

Estudos sobre regulação transcricional e epigenética de tripanossomatídeos tem se mostrado importantes para a compreensão da evolução da maquinaria requerida por esses processos, uma vez que os tripanossomatídeos, além de apresentarem características peculiares com relação à expressão gênica, são eucariotos que divergiram cedo na escala evolutiva (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

Diferentemente dos demais eucariotos, os organismos da ordem Kinetoplastida apresentam transcrição policistrônica, na qual são formados pré-mRNAs policistrônicos que, posteriormente, são individualizados em unidades funcionais pelo processamento a partir de trans-splicing e poliadenilação. A poliadenilação ocorre na extremidade 3' do pré-mRNA e é dependente do processo de trans-splicing (CLAYTON; SHAPIRA, 2007), que consiste na adição de uma sequência de 39 nucleotídeos, denominada de mini-exon ou sequência-líder, na extremidade 5' do mRNA (LIANG *et al.*, 2003). As unidades policistrônicas são separadas por regiões de troca de fita, sendo que a transcrição inicia em regiões divergentes e termina em regiões convergentes (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

Os genes pertencentes a uma mesma unidade policistrônica geralmente não codificam proteínas funcionalmente relacionadas e, mesmo sendo transcritos juntos, apresentam diferentes níveis de mRNA (MARTÍNEZ-CALVILLO, 2010). Em *T. cruzi* já foi relatado que a variação na quantidade total de mRNA ocorre gradualmente durante seu desenvolvimento e que, paralelamente, ocorre alteração no nível de condensação da cromatina, sendo menos condensada nas formas replicativas e

mais condensada nas formas infectivas (ELIAS *et al.*, 2001). Contudo, até o momento não foram encontrados promotores clássicos para o início da transcrição, corroborando a hipótese de que a regulação da expressão gênica ocorre a nível pós transcricional, por meio do processamento e estabilidade do mRNA (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Ademais, já foi verificado que modificações estruturais em histonas de *T. cruzi* (RESPUELA *et al.*, 2008) e a presença de histonas variantes em *Trypanosoma brucei* (SIEGEL *et al.*, 2009) direcionam a transcrição de genes, uma vez que promovem a instabilidade do nucleossomo.

3.4 HISTONAS E A VARIANTE H2AZ

As histonas são proteínas ricas em arginina e lisina e auxiliam tanto na compactação do DNA quanto na acessibilidade da informação genética nos eucariotos. Elas são responsáveis pelo primeiro nível de organização cromossômica, o nucleossomo, o qual consiste num octâmero de histonas envolto por dupla fita de DNA contendo 146 nucleotídeos. O octâmero é composto por quatro dímeros, sendo dois de H2A-H2B e dois de H3-H4, formados pela interação das histonas canônicas. Ao empacotarem o DNA, as histonas restringem o acesso de outras proteínas ao material genético, todavia, para que os processos de replicação, transcrição, reparo e recombinação ocorram, este acesso é essencial (ALBERTS *et al.*, 2004).

Modificações pós-traducionais na cauda amino terminal das histonas por adição de um grupo químico (acetilação, fosforilação, metilação e ribosilação) ou de polipeptídeos (ubiquitinação e sumoilação) criam plataformas específicas para ação de fatores de regulação (ALSFORD; HORN, 2004), facilitando ou inibindo processos como a transcrição (ADAM *et al.*, 2001). No entanto, apesar de vários estudos em andamento, ainda não estão totalmente evidenciadas as interações entre cromatina e a maquinaria de processos dependentes de DNA e suas consequências em eucariotos de ramificação inicial, como os tripanossomatídeos.

As histonas dos tripanossomatídeos, além de apresentarem mRNA poliadenilado, divergem das encontradas nos demais eucariotos principalmente com relação aos domínios na cauda amino terminal (ALSFORD; HORN, 2004),

extremidade que estende-se do nucleossomo (ALBERTS *et al.*, 2004). Em *T. cruzi*, algumas modificações específicas de histonas, acetilação das histonas H3 e H4 e trimetilação de H3K4, estão enriquecidas em regiões de troca de fita divergentes e não em regiões convergentes, nem em regiões intra ou intergênicas (RESPUELA *et al.*, 2008).

Os eucariotos também apresentam outra classe de histonas, as variantes. Estas, mesmo podendo apresentar sequência de aminoácidos similar a sua respectiva canônica, são codificadas por genes distintos e apresentam suas próprias funções (ALSFORD; HORN, 2004). Mediante os estudos já publicados, verifica-se que as histonas variantes também alteram a estabilidade dos nucleossomos que as incorporam. Desta forma sua presença contribui, junto com as modificações pós-traducionais, para gerar uma grande variedade de nucleossomos, provocando alterações na estrutura da cromatina, requeridas para a regulação da expressão gênica (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

A H2AZ, variante da H2A, é uma histona evolutivamente bastante conservada, apresentando apenas 60% de identidade com a sua canônica H2A e cerca de 80% de identidade entre a maioria dos organismos, com o membro mais divergente em tripanossomatídeos (~50-60%) (BONISCH; HAKE, 2012). De acordo com a revisão de Khorasanizadeh (2004), a área de superfície acessível de nucleossomos contendo H2AZ, vista a partir da estrutura de cristal da parte central do nucleossomo, apresenta apenas sutis diferenças comparada a de nucleossomos contendo H2A. A área de interação entre duas moléculas de H2AZ se mostra diferente da área correspondente do dímero de H2A, sugerindo que um dímero de H2AZ ou de H2A seja estavelmente incorporado em cada nucleossomo. Outros estudos têm relatado, ainda, o envolvimento da H2AZ com a alteração de estabilidade dos nucleossomos e com o início da transcrição.

Em levedura foi verificado que o enriquecimento de H2AZ em sítios de início da transcrição da RNA Polimerase II está correlacionado com a presença de nucleossomos menos estáveis, levando os autores a sugerir que a incorporação da H2AZ altera a estrutura da cromatina de modo a possibilitar a ativação transcricional de determinados genes (GUILLEMETTE *et al.*, 2005). Em células de vertebrados, também foi relatado que nucleossomos contendo H2AZ, juntamente com H3.3, são significativamente mais instáveis do que nucleossomos compostos apenas por histonas canônicas (JIN; FELSENFELD, 2007). A H2AZ também co-localiza com a

RNA polimerase em células humanas (BONISCH; HAKE, 2012). Em estudo com leveduras, ainda há relato de que a presença da H2AZ, componente intrínseco da eucromatina, reduz ou elimina a formação de heterocromatina, protegendo os genes contra o silenciamento (MENECHINI *et al.*, 2003).

Com relação aos tripanossomatídeos, Siegel *et al.* (2009) verificaram que em *T. brucei* a H2AZ e a H2BV (uma forma variante da histona H2B) estão presentes em regiões de troca de fita divergentes, sugerindo estarem associadas com a transcrição. Ainda observaram que nucleossomos contendo dímeros H2AZ/H2BV são menos estáveis do que nucleossomos contendo as histonas canônicas correspondentes. Ademais, os autores verificaram que as variantes H3V e H4V estão presentes em regiões de troca de fita convergentes, onde a transcrição provavelmente termina, corroborando o papel das variantes na modificação da cromatina.

Em alguns organismos, como nas leveduras, a perda da H2AZ altera apenas a taxa de crescimento, mas em outros organismos, como *Tetrahymena thermophila*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* (MARQUES *et al.*, 2010; BONISCH; HAKE, 2012) e *T. brucei* (LOWELL *et al.*, 2005), essa perda é letal, demonstrando que a função exercida pela H2AZ é fundamental para os distintos organismos.

3.5 ESTRATÉGIAS PARA O ESTUDO DA H2AZ

Estudos sobre a transfecção em tripanossomatídeos tem permitido a manipulação de genes, evidenciando a função de determinadas proteínas no controle de processos envolvendo o DNA, como a transcrição (WHO, 2002). A via de RNA de interferência (RNAi), que leva o mRNA alvo à degradação, é muito utilizada para diminuir a expressão de mRNA em tripanossomas africanos e demais organismos, no entanto o *T. cruzi* não possui toda a maquinaria necessária para tal via (DaROCHA *et al.*, 2004). Deste modo faz-se imprescindível o uso de outros mecanismos que interfiram na expressão de genes-alvo, como o nocaute gênico, ou que afetem diretamente o seu produto, como o domínio desestabilizador (DD).

A técnica de deleção de genes mediada por recombinação homóloga consiste em fazer cassetes contendo gene de resistência a algum antibiótico, utilizado para

selecionar células transfectadas, flanqueado por sequências presentes à jusante e à montante do gene de interesse, as quais são responsáveis pela recombinação homóloga. Devido à sua eficácia para nocautear um ou os dois alelos de um gene, essa técnica vem sendo aplicada tanto em *T. brucei* (ESTÉVEZ *et al.*, 1999) quanto em *T. cruzi* (MACRAE *et al.*, 2006).

A outra metodologia supracitada atua a nível traducional e consiste na fusão da proteína de interesse a um polipeptídeo, denominado domínio desestabilizador (DD), que, se não estabilizado por um ligante específico, direciona a proteína alvo ao complexo de degradação ubiquitina-proteossomo, de modo a controlar a concentração dessa proteína dentro da célula. Banaszynski *et al.* (2006) descreveram o sistema utilizando como DD o polipeptídeo FKBP12 (*FK506-binding protein*), que fica estável na presença de rapamicina, SLF* (análogo sintético da rapamicina) ou de Shld1 (derivado do SLF* com o grupo carboxila substituído por um grupo morfolina). Posteriormente, o sistema foi testado em *Plasmodium falciparum* (ARMSTRONG; GOLDBERG, 2007), em *Toxoplasma gondii* (HERM-GOTZ *et al.*, 2007), em *Leishmania major* (SILVA *et al.*, 2009) e em *T. cruzi* (MA *et al.*, 2012), resultando em uma regulação dose-dependente dos níveis proteicos analisados.

Tanto o silenciamento quanto o nocaute condicional de genes necessitam de construções que contenham um gene de resistência, para seleção dos organismos transfectados, flanqueado por regiões que permitam sua inserção no local de interesse do genoma. A técnica de clonagem gênica é amplamente utilizada para tais objetivos. Estévez *et al.* (1999) e MacRae *et al.* (2006) realizaram a técnica de clonagem gênica para obtenção das construções necessárias, respectivamente, ao nocaute do gene codificador da glutamato desidrogenase e à supressão do metabolismo da galactose em tripanossomatídeos.

Shevchuk *et al.* (2004) apresentam uma metodologia alternativa para obtenção de construções gênicas, a longa fusão múltipla. Esta metodologia consiste em amplificar os fragmentos necessários utilizando *primers* quiméricos, que possibilitam a posterior fusão destes fragmentos. Segundo os autores, a partir da longa fusão múltipla é possível realizar construções gênicas de 3 Kb a 20 Kb, fusionando três ou quatro fragmentos de forma precisa, e com maior rapidez e flexibilidade do que a clonagem por enzimas de restrição.

Além da inibição da expressão proteica ou da degradação do produto gerado, a função das proteínas também pode ser evidenciada a partir de ensaios que permitem identificar a dinâmica de interação da proteína-alvo. Loweel *et al.* (2005) utilizaram a técnica de co-imunoprecipitação e verificaram que as histonas variantes H2AZ e H2BV co-imunoprecipitam em *T. brucei*, sugerindo que possuem funções relacionadas. Já Adam *et al.* (2001) ao realizarem a técnica de *Pull Down*, com as proteínas GST-H2A e GST-H2AZ obtidas por expressão heteróloga e com o extrato de células de leveduras, identificaram que a região carboxi terminal da H2AZ interage com componentes da maquinaria de transcrição de levedura, sugerindo a atuação da histona neste processo molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS, SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS

Brometo de etídio: 0,5 µg/ml diluído em água ultrapura, armazenado na ausência de luz.

Meio LB (Luria Bertani): 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% de NaCl. Autoclavado e mantido a 4°C.

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): 0,5 % infuso de fígado, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, 0,5 % bacto-triptose, Na₂HPO₄ 56,4 mM, 0,0025% hemina, 10 % soro fetal bovino.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM. Filtrado em membrana de 0,45 µm e armazenado a 4°C.

Solução de coloração para gel de proteína: 0,3% coomassie blue dissolvido em 50% de metanol absoluto, adicionado de 10% de ácido acético glacial e filtrado em papel 3MM.

Solução de descoloração de gel de proteína: 30% de metanol, 10% de ácido acético.

Tampão de amostra para gel de agarose: 25% de Ficoll (tipo 400-Sigma), 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol. Ficoll dissolvido em TBE antes de adicionar os corantes.

Tampão de amostra para proteína: Tris-HCl pH 6.8 40 mM, 1% SDS, 2,5% de β-mercaptoetanol, 6% de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol. Armazenado a -20°C.

Tampão de eletroforese para gel desnaturante de poliacrilamida: Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, 0,1% de SDS.

Tampão de eletroporação para *T. cruzi*: NaCl 150 mM, Hepes ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM, pH 7,5.

Tampão de sonicação: Tris HCl pH 8 20 mM, NaCl 500mM.

Tampão isotônico: Hepes pH 7,4 20 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM.

TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

TE: Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1mM

4.2 CONSTRUÇÕES GÊNICAS

4.2.1 Obtenção dos fragmentos

Os fragmentos para as construções gênicas, que providenciarão o nocaute condicional da H2AZ a partir do DD e o nocaute duplo, foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando como moldes para as sínteses o DNA da cepa Dm 28c de *T. cruzi* selvagem, para amplificar regiões codificantes da H2AZ e intergênicas que a flanqueiam, o plasmídeo pNEO2, para amplificar o cassete de resistência à neomicina, e o DNA do domínio desestabilizador FKBP. Para obtenção de sínteses mais fiéis a esses DNAs moldes foi utilizada a enzima Platinum *Taq* DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen).

Para possibilitar a posterior fusão de todos os fragmentos obtidos, de acordo com Shevchuk *et al.* (2004), o *primer forward*, utilizado para amplificar um fragmento, possui na porção 5' uma sequência complementar a porção 5' do *primer reverse*, utilizado para amplificar o fragmento imediatamente anterior a esse em questão.

As reações foram submetidas às condições de desnaturação do DNA (94°C por 5') seguida por 35 ciclos de desnaturação, de anelamento dos *primers* e de extensão da fita, e por uma extensão final (68°C por 5'). A temperatura e tempo de anelamento foram ajustados de acordo com a especificidade dos *primers* e o tempo de extensão nos ciclos foi ajustado conforme o tamanho do fragmento.

Os produtos das PCRs foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Posteriormente, o gel foi corado em brometo de etídio, revelado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema de foto documentação (Loccus biotecnologia).

H2AZdd	<i>Primer F</i> 5' GGCCGATCAGACGAGTATTG 3'
	<i>Primer R</i> 5' GTTTCCACCTGCACTCCCATGCCTGCTCGCTTGGACTTCTTG 3'
DD	<i>Primer F</i> 5' ATGGGAGTGCAGGTGGAAAC 3'
	<i>Primer R</i> 5' TTCCGGTTTTAGAACTCCACAT 3'
ddK7NEO	<i>Primer F</i> 5' ATGTGGAGCTTCTAAAACCGGAACCGTCCATTTCTCTTCCGCACTC 3'
	<i>Primer R</i> 5' GATGGGCATGTAAATTCTGTTCAATGTAATTGTT 3'
IR2	<i>Primer F</i> 5'AACAATTACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCCACCTTCTCTCCGCATTACAC3'
	<i>Primer R</i> 5' GCACGCACAAGGGAATAAAC 3'

QUADRO 1 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLICAÇÃO DOS FRAGMENTOS NECESSÁRIOS PARA CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE NOCAUTE CONDICIONAL DA H2AZ
 NOTA: ddK7NEO para cassete de neomicina e IR2 para intergênica 2.

IR1	<i>Primer F</i> 5' GCCAGCGGAAGTCCTATCA 3'
	<i>Primer R</i> 5' GAGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGCTTCTTTGCCCTCCAAAC 3'
K7NEO	<i>Primer F</i> 5' CCGTCCATTTCTCTTCCGCACTC 3'
	<i>Primer R</i> 5' GATGGGCATGTAAATTCTGTTCAATGTAATTGTT 3'
IR2	<i>Primer F</i> 5'AACAATTACATTGAACAGAATTTAACATGCCCATCCACCTTCTCTCCGCATTACAC 3'
	<i>Primer R</i> 5' GCACGCACAAGGGAATAAAC 3'

QUADRO 2 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLICAÇÃO DOS FRAGMENTOS NECESSÁRIOS PARA CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE NOCAUTE DUPLO DA H2AZ
 NOTA: IR1 para intergênica 1, K7NEO para cassete de neomicina e IR2 para intergênica 2.

4.2.2 Purificação, quantificação e normalização das concentrações.

Os fragmentos obtidos foram purificados a partir de extração do gel de agarose com QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). A quantificação do DNA eluído foi realizada tanto a partir da visualização da intensidade das bandas formadas no gel de agarose quanto a partir da dosagem no NanoVue Plus (GE). Para a normalização da concentração dos produtos foi considerada a aproximação de que 1 pmol de uma molécula de DNA dupla fita com 1000 pb contém 660 ng.

4.2.3 Fusão dos fragmentos

As construções gênicas para o nocaute condicional e duplo da H2AZ, denominados adiante como construção A e B, respectivamente, foram realizadas sob três diferentes métodos, elaborados com base nos protocolos descritos por Shevchuk *et al.* (2004). Em todas as reações de PCR abaixo descritas, foram utilizados os *primers forward* do fragmento à esquerda e *reverse* do fragmento à direita da construção, os quais foram H2AZ-1F e IR2fuR para construção A (FIGURA 1) e IR1fuF e IR2fuR para construção B (FIGURA 2).

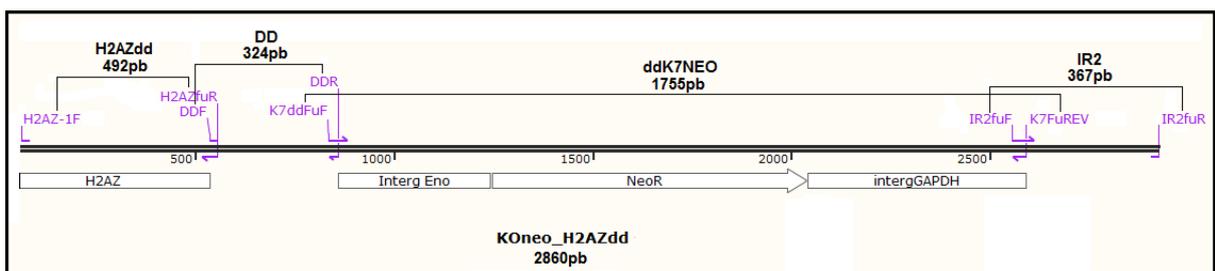


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA NOCAUTE CONDICIONAL DA H2AZ

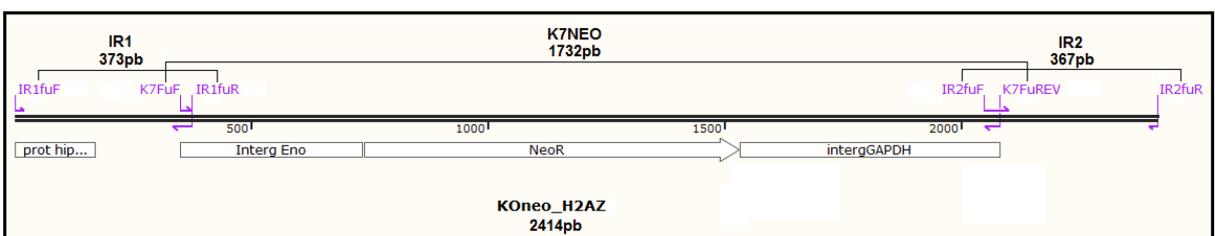


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PARA NOCAUTE DUPLO DA H2AZ

4.2.3.1 Fusão 1: PCR de fusão com concentração equivalente de produtos

Com a quantificação realizada a partir do gel de agarose, os produtos foram utilizados em concentrações equivalentes para as duas construções, sendo submetidos a reações de PCR de 25 µl com as seguintes condições: 1X tampão para *Taq* HiFi (Invitrogen), 2 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0,2 mM mix de dNTP, 0,6 U *Taq* HiFi e *primers* a 5 pmol e 0,5 pmol. As configurações para o termociclador foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5'; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45", anelamento a 55°C por 45" e extensão a 68°C por 3'25"; extensão final a 68°C por 10'.

Os produtos foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com High Pure PCR Product Amplification Kit (Roche).

4.2.3.2 Fusão 2: PCR de fusão com concentração não equivalente dos produtos

Os produtos dosados no NanoVue e com as concentrações normalizadas foram utilizados na proporção de 20 ng de marcador de seleção para cinco vezes mais moléculas dos demais produtos. As reações foram calculadas para volume final de 25 µl, utilizando 1X tampão para *Taq* HiFi, 2 mM MgSO₄, 0,4 mM mix de dNTP, 0,6 U *Taq* HiFi e 5 pmol de cada *primer*. As condições ajustadas no termociclador foram desnaturação inicial a 94°C por 5'; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45", anelamento a 54°C por 45" e extensão a 68°C por 3'15"; e extensão final a 68°C por 10'.

Os produtos foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com QIAquick Gel Extration Kit (QIAGEN).

4.2.3.3 Fusão 3: fusão com concentração não equivalente dos produtos seguida de PCR

Os produtos dosados no NanoVue e com as concentrações normalizadas foram utilizados na proporção acima descrita e submetidos a fusão dos fragmentos. Tanto para construção A quanto para a B, foram realizadas reações de 25 µl, na ausência de *primers*, contendo 1X tampão para *Taq* HiFi, 2 mM MgSO₄, 0,5 mM mix de dNTP, 1,5 U *Taq* HiFi. No termociclador foi programado a desnaturação inicial a 94°C por 2', seguida por 8 ciclos de desnaturação a 94°C por 20", anelamento a 53°C por 30" e extensão a 68°C por 2'30".

Os quatro produtos da construção A também foram separados em dois pares e fusionados nas condições acima. Tais produtos foram submetidos a uma nova reação de fusão (A1A2) de 50 µl com 12,5 µl de cada produto e com um aumento de 30" no tempo de extensão das fitas.

As reações de fusão serviram então de molde para as PCRs, contendo 3 µl de cada reação de fusão (A, B e A1A2), 1X tampão para *Taq* HiFi, 2 mM MgSO₄, 0,5 mM mix de dNTP, 1,5 U *Taq* HiFi e 5 pmol de cada *primer*, para um volume final de 25 µl. Os parâmetros ajustados no termociclador foram desnaturação inicial a 94°C por 5'; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45", anelamento a 54°C por 45" e extensão a 68°C por 3'15"; e extensão final a 68°C por 10'.

Os produtos foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

4.3 TRANSFEÇÃO NO *Trypanosoma cruzi*

Para transfecção das construções para obter o nocaute condicional e duplo da H2AZ foi utilizado formas epimastigotas do clone de *T. cruzi*, cultivadas por 3 dias em meio LIT, que já apresentavam o nocaute simples da histona variante por meio de um cassete de resistência à higromicina.

Os parasitas (2×10^8 células por ml) foram coletados a partir de centrifugação a 3000 x g, 25°C, por 5' foram lavados por duas vezes com 10 ml de tampão isotônico e o *pellet* ressuspenso em 2 ml de tampão de eletroporação. O volume de 400 µl da

suspensão de parasitas foi transferido para as cubetas de eletroporação (0,2 cm de *gap*, Bio-Rad), adicionadas de 7 µg da respectiva construção gênica e submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, no eletroporador GenePulser II Apparatus (Bio-Rad). O controle, 400 µl da suspensão de parasitas sem qualquer cassete, também foi eletroporado. As amostras foram transferidas para garrafas contendo 5 ml de meio LIT. Às garrafas contendo a construção A foi adicionado 1 µM de Shld1 ou de rapamicina.

As culturas foram então incubadas a 28°C e, após 24hs, receberam 500 µg/µl de higromicina e de neomicina. Semanalmente foram realizados repiques na diluição de 1 ml de cultura para 10 ml de meio LIT e adicionado 500 µg/µl de higromicina e de neomicina. Às garrafas contendo a construção A foi adicionado 1 µM de Shld1 ou de rapamicina.

4.4 TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas H2A e H2AZ recombinadas em vetores de expressão heteróloga pDEST 15 (Invitrogen), que contém etiqueta de seis resíduos de histidina, e pDEST 17 (Invitrogen), que contém etiqueta de Glutathione S-Transferase (GST), foram transformadas nas cepas BL21(DE3)pLysS (Invitrogen), BL21 Star(DE3) (Invitrogen) e AD494(DE3) (Novagen) cálcio competentes de *Escherichia coli*, a fim de obter as proteínas na fração solúvel do extrato bacteriano.

4.4.1 Transformação

As bactérias armazenadas a - 70°C foram descongeladas em banho de gelo e 50 µl foram adicionados sobre 0,5 µl dos plasmídios contendo as proteínas recombinantes. Após 10' em banho de gelo, foi dado choque a 42°C por 50" e retornado ao gelo por 2'. Sobre as células foram adicionados 500 µl de meio LB, dos quais 100 µl foram plaqueados em meio LB mais 100 µg/ml de ampicilina, devido à resistência presente nos vetores pDEST 15 e 17, e mais os antibióticos requeridos

conforme a resistência das cepas (25 µg/ml de canamicina para BL21 pLysS e 34 µg/ml de cloranfenicol para AD494). As placas ficaram em estufa a 37°C por 16hs.

4.4.2 Inóculo e indução da expressão

Com uma colônia de cada placa proveniente da transformação foi realizado um pré-inóculo com 2ml de LB mais antibióticos, o qual foi incubado a 37°C por 16hs, sob agitação (200 rpm). Deste foi feito um inóculo de 10 ml na diluição 1:10, o qual, após 1h, recebeu 0,5 µM de IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo) e permaneceu por mais 3hs a 37°C sob agitação (200 rpm), para indução da expressão das proteínas. Inóculos sem IPTG serviram como controle.

4.4.3 Lise celular

As bactérias foram coletadas por centrifugação (Centrifuge 5415D, Eppendorf) da cultura a 10000 x g, por 1'. O *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 400 µl de PBS (para BL21pLysS) ou tampão de sonicação (para BL21 Star e AD494) e submetido à lise mecânica por 5 pulsos de 6 segundos em ultrassom (Ultrasonic processor, Cole Parmer) com potência de 25%, seguida de centrifugação a 10000 x g por 10'. O sobrenadante foi reservado enquanto o precipitado foi ressuspenso em 400 µl da mesma solução utilizada anteriormente. Alíquotas de 20 µl do pós-sonicação, sobrenadante e precipitado foram retiradas para análise em gel desnaturante de poliacrilamida (14% para proteínas fusionadas à histidina e 12% para proteínas fusionadas à GST). Como padrão de peso molecular foi utilizado 5µl do BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). Para revelação, o gel foi incubado por 5' sob agitação (70 rpm) com solução de coloração para gel de proteínas, seguido por incubação por 2hs com solução de descoloração de gel de proteínas.

4.4.4 Purificação das proteínas recombinantes

Para purificação das proteínas fusionadas à GST foi utilizado 25 µl da resina de glutathione (Glutathione Sepharose 4 fast flow, GE), a qual foi lavada por três vezes com o tampão de sonicação mais 1% TritonX-100, sob centrifugação a 500 x g por 20". Com a resina equilibrada, esta foi misturada à fração solúvel do lisado bacteriano em tubo de microcentrífuga e incubada em banho de gelo por 1h sob agitação (150 rpm). Após centrifugar, o sobrenadante (proteína não-ligada) foi reservado e a resina foi lavada três vezes com a mesma solução.

Para eluição foi utilizado 30 µl de 10 mM e 20 mM de glutathione reduzida (SIGMA-ALDRICH) diluída em 50 mM de Tris HCl pH8. Aliquotas de 20 µl da fração solúvel, do não-ligado, das resinas e dos eluídos foram reservadas para análise em gel desnaturante de poliacrilamida (12%).

Como padrão de peso molecular foi utilizado 5µl do BenchMark Protein Ladder (Invitrogen). Para revelação, o gel foi incubado sob agitação (70 rpm) por 5' com solução de coloração para gel de proteínas seguido de incubação por 2hs com solução de descoloração de gel de proteínas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÕES GÊNICAS

Todos os 6 fragmentos, necessários para as duas construções gênicas, amplificaram de acordo com o tamanho esperado e de forma específica (FIGURA 3), a partir das seguintes condições de ciclagem:

- IR1: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45", anelamento a 55°C por 45" e extensão a 68°C por 30";
- H2AZdd: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45", anelamento a 53°C por 45" e extensão a 68°C por 1';
- IR2, K7NEO, DD, ddK7NEO: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30", anelamento a 54°C por 30" e extensão a 68°C por 2'30".

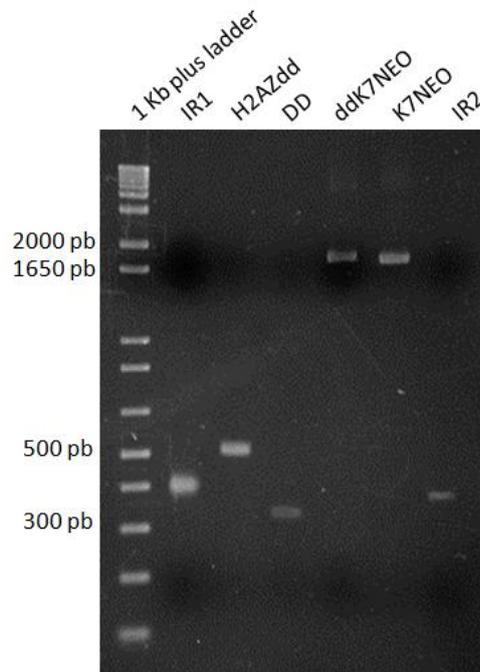


FIGURA 3 – OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS NECESSÁRIOS PARA AS CONSTRUÇÕES GÊNICAS

NOTA: Produtos IR1, K7NEO e IR2 necessários para a construção do nocaute duplo e produtos H2AZdd, DD, ddK7NEO e IR2 necessários para construção do nocaute condicional. Gel de agarose 1%.

Com base na metodologia para pequenas fusões triplas de 3 Kb de Shevchuk *et al.* (2004), os fragmentos amplificados foram purificados a partir de extração do gel agarose e submetidos às estratégias de fusão.

Para realização da Fusão 1, os fragmentos foram utilizados em concentrações equivalentes com intuito de não haver competição desigual entre os mesmos e assim ocorrer uma fusão completa. A estimativa de concentração dos fragmentos foi realizada de acordo com a intensidade das bandas presentes na figura 3. Para a construção A, as duas concentrações de *primers* utilizadas (5 pmol e 0,5 pmol) foram eficientes para amplificação, entretanto, para a construção B, a concentração de 0,5 pmol dos *primers* não teve eficiência similar a 5 pmol para realizar tal amplificação (FIGURA 4).

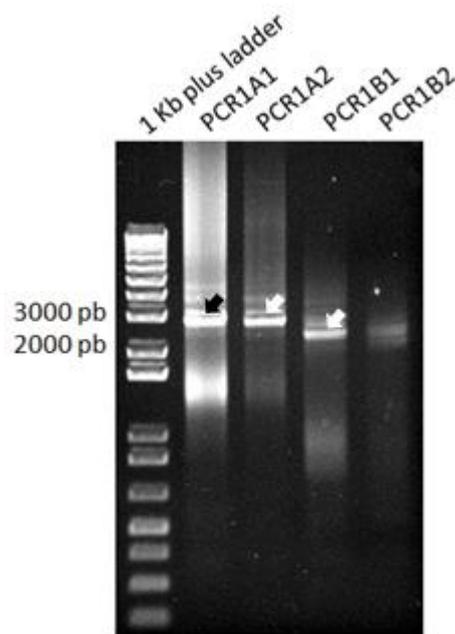


FIGURA 4 – OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES GÊNICAS POR MEIO DA FUSÃO 1

NOTA: PCR1A1 e PCR1B1 para as respectivas construções A e B com 5 pmol de *primers*; PCR1A2 e PCR1B2 para as respectivas construções A e B com 0,5 pmol de *primers*. As flechas indicam as bandas referentes às construções gênicas. Gel de agarose 0,8%.

Além de realizar fusões com concentrações equivalentes, Shevchuk *et al.* (2004) também apresentam bons resultados com reações contendo cinco vezes menos marcador de seleção do que os demais produtos. Modificando um pouco o protocolo, após dosar os produtos no NanoVue, foi realizada diretamente uma PCR com 20 ng de marcador de seleção (K7NEO e ddK7NEO) e cinco vezes mais

moléculas dos demais produtos. Apenas a concentração de 5 pmol de *primers* foi utilizada devido ao resultado apresentado pela Fusão 1. Essa estratégia da Fusão 2 também se mostrou eficiente, uma vez que as duas construções foram amplificadas, apresentando maior intensidade de bandas em detrimento das ampliações inespecíficas (FIGURA 5).

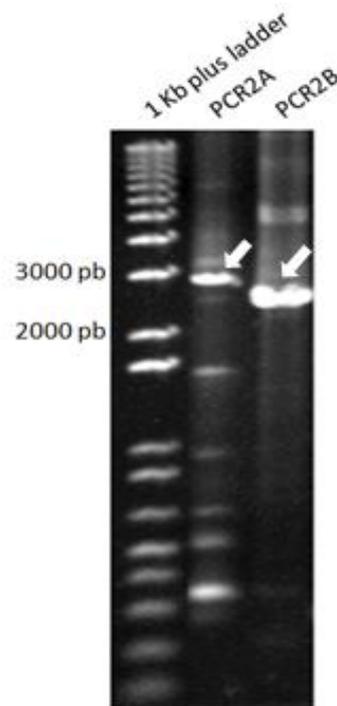


FIGURA 5 – OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES GÊNICAS POR MEIO DA FUSÃO 2.
 NOTA: As flechas indicam as bandas referentes às construções gênicas. Gel de agarose 0,8%.

Para a Fusão 3 a estratégia também foi baseada em outra metodologia apresentada por Shevchuk *et al.* (2004), a longa fusão quádrupla para 10.8 Kb, na qual os autores realizam reações de fusão que precedem a PCR. Essas reações consistem em realizar 12 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão das fitas, na ausência de *primers*. Posteriormente, quantidades equivalentes dessas duas reações são combinadas para uma nova reação de fusão de 12 ciclos, sem utilizar *primers*. Em seguida uma alíquota desta fusão é utilizada como molde para uma reação de PCR de 30 ciclos, à qual são adicionados os *primers* das extremidades da construção, com a finalidade de selecionar por amplificação o produto desejado.

Nesse contexto foi realizada a reação de fusão para os pares de fragmentos à direita e à esquerda da construção A, com 8 ciclos de desnaturação, anelamento e

extensão, na ausência de *primers*. Com alíquotas de 12,5 µl de cada fusão foi realizada uma nova reação de 8 ciclos (A1A2). Também foi testado realizar uma reação de fusão de 8 ciclos com todos os fragmentos da construção A e outra com todos os fragmentos da construção B. Posteriormente, uma alíquota de 3 µl de cada fusão (A, B e A1A2) serviu como molde para reação de PCR de 35 ciclos, a qual continha os *primers* das extremidades da respectiva construção gênica. Como na estratégia anterior (Fusão 2), manteve-se a concentração de 5 pmol de *primers*.

Essa estratégia (Fusão 3) de realizar reações de fusão anteriormente à PCR resultou na eficiente amplificação da construção B e na amplificação da construção A, a qual, entretanto, apresentou banda de menor intensidade comparada às Fusões 1 e 2. A PCR3A1A2 deveria ser amplificada de acordo com essa estratégia, uma vez que é adequada para construções com quatro fragmentos, no entanto, a metodologia não foi eficiente, pois não foi obtida a amplificação da construção A (FIGURA 6). Nesta PCR ainda houve amplificação de dois fragmentos inespecíficos, cujo tamanho do maior não corresponde ao marcador de seleção nem aos demais produtos ou à fusão parcial dos mesmos.

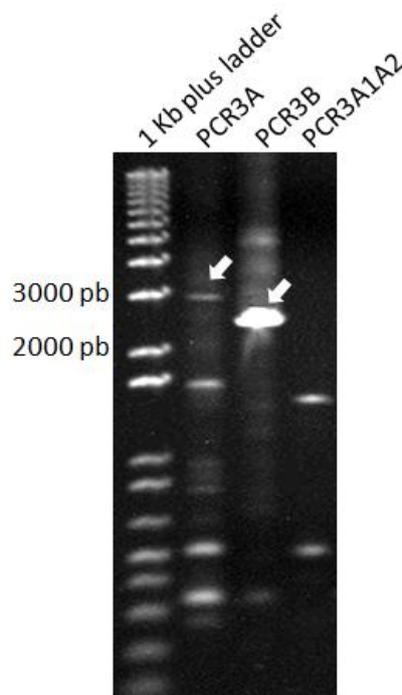


FIGURA 6 – OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES GÊNICAS POR MEIO DA FUSÃO 3.
 NOTA: As flechas indicam as bandas referentes às construções gênicas. Gel de agarose 0,8%.

Segundo Shevchuk *et al.* (2004), os *primers* quiméricos, utilizados para amplificação dos fragmentos a serem fusionados, devido ao fato de possuírem sequências homologas nas extremidades adjacentes, permitem que as pontas dos fragmentos amplificados atuem como *primers* durante a PCR de fusão. Ademais, conforme os autores, para que as fusões funcionem a temperatura de anelamento da reação deve ser baixa, uma vez que as extremidades complementares, além de estarem em baixa concentração, são curtas e apresentam baixa T_m (*melting temperature*). Já para a reação de PCR a temperatura de anelamento dos *primers* deve ser mais elevada ($\sim 68^\circ\text{C}$), a fim de garantir maior especificidade.

Diferentemente das condições supracitadas, as PCRs realizadas nas três estratégias de Fusão (1, 2 e 3) não compreenderam elevada temperatura, pois a T_m dos *primers* utilizados estava entre 56°C e 58°C , o que pode ter favorecido a amplificação de produtos inespecíficos.

Shevchuk *et al.* (2004) também relatam que o uso da *Taq* polimerase não é recomendável para amplificação dos fragmentos iniciais, devido ao fato desta enzima adicionar uma adenina na extremidade 3' dos mesmos, o que interferiria na complementariedade das regiões de sobreposição na reação de extensão da PCR. No entanto, no presente trabalho as reações de PCR para amplificação dos fragmentos intermediários foram realizadas com a Platinum *Taq* DNA Polimerase High Fidelity, e os produtos não foram tratados com a enzima T4 polimerase (como recomendado pelos autores), o que não impossibilitou a fusão dos fragmentos e a obtenção das construções gênicas (FIGURAS 4, 5 e 6).

As bandas com maior intensidade nas figuras 4, 5 e 6 correspondem às construções gênicas, todavia, como as amplificações não foram específicas, a purificação dos produtos se mostrou indispensável para a transfecção no *T. cruzi*. Uma vez que seria difícil excisar os limites das bandas da Fusão 1 formadas em gel de agarose, os produtos da PCR1 foram diretamente purificados com High Pure PCR Product Amplification Kit, enquanto que os produtos das demais PCRs (2 e 3) tiveram seu volume total purificado a partir de gel de agarose (0,8%) com QIAquick Gel Extration Kit. Apenas os melhores produtos, com bandas intensas e de tamanho aproximado ao esperado, foram purificados: PCR1A1, PCR1A2, PCR1B1, PCR2A, PCR2B, PCR3B (FIGURA 7).

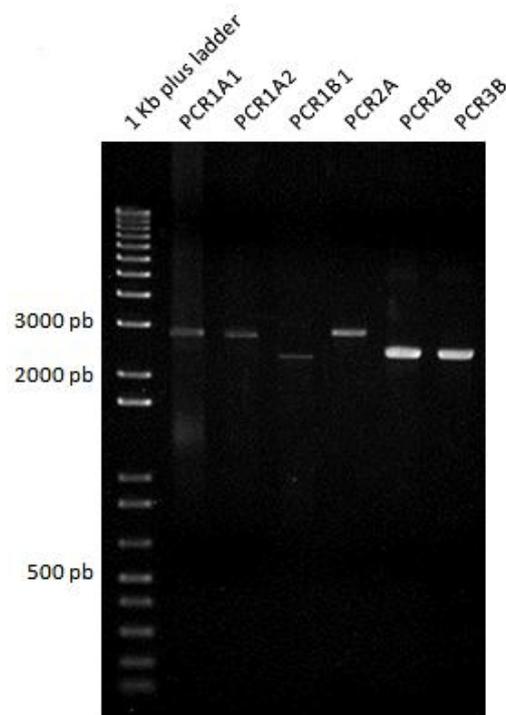


FIGURA 7 – PURIFICAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES GÊNICAS
 NOTA: Gel de agarose 0,8%.

De todos os produtos purificados, como é possível verificar na figura 7, as construções A e B da PCR2 apresentaram maior quantidade de DNA eluído de acordo com a intensidade das bandas formadas no gel de eletroforese (0,8%). Por este motivo, esta foi a metodologia de fusão (Fusão 2) selecionada para produzir a quantidade suficiente das construções gênicas para realizar a transfecção no *T. cruzi*.

5.2 TRANSFECÇÃO NO *Trypanosoma cruzi*

A transfecção da construção B, para o nocaute duplo da H2AZ, no *T. cruzi* foi objetivada com intuito de verificar se a H2AZ é vital ou não ao parasita. No entanto, se o parasita morrer após a transfecção há duas hipóteses para o ocorrido: 1) a construção é incorporada ao genoma do parasita por meio da recombinação homóloga, mas, mesmo sendo resistente ao meio com neomicina, o parasita morre devido ao nocaute duplo da histona; ou 2) a construção não é incorporada ao

genoma e, portanto, o parasita continua apresentando um alelo da histona, mas morre por não possuir resistência à neomicina.

Diante de tal dualidade, o nocaute condicional foi elaborado para distinguir o meio pelo qual o parasita morrerá, uma vez que a construção possui, além do gene de resistência à neomicina, o domínio desestabilizante que, se não estabilizado pelo ligante específico (rapamicina, SLF* ou Shld1), dirige a proteína à degradação. Neste caso, se os parasitas da cultura contendo a construção gênica para o nocaute duplo morrerem e os parasitas da cultura contendo a construção gênica para o nocaute condicional sobreviverem, constata-se que os primeiros morreram devido à falta da H2AZ. O fato ainda pode ser corroborado se, ao retirar o ligante específico da cultura do nocaute condicional, os parasitas vierem a morrer. Para confirmar o nocaute duplo da histona seria possível, também, transfectar o parasita conjuntamente com uma cópia episomal da H2AZ fusionada a uma etiqueta, desta forma os parasitas seriam resistentes à neomicina e a etiqueta permitiria identificar a origem da proteína expressa.

Outra finalidade atribuída ao nocaute condicional é a possibilidade de analisar o efeito da ausência da H2AZ sobre o parasita, como morfologia e taxa de crescimento, a partir da gradual retirada do ligante estabilizador do DD e consequente degradação dose-dependente da histona.

As transfecções, tanto para nocaute condicional quanto duplo da H2AZ, foram realizadas com 7 µg de cada construção (A e B) eletroporadas em formas epimastigotas de *T. cruzi* nocautes simples para H2AZ, e seguidas por cultivo em 5 ml de meio LIT, adicionado de rapamicina e Shld1 para o nocaute condicional, a 28°C. Após 24hs, para restabelecimento dos parasitas, as culturas foram suplementadas com higromicina, à qual o parasita já possui resistência, e neomicina. O repique das 4 culturas (nocaute duplo, nocaute condicional com rapamicina, nocaute condicional com Shld1 e controle) foi realizado semanalmente, na diluição 1/10 ml de meio LIT contendo os respectivos antibióticos e os ligantes do DD, e mantido em estufa a 28°C.

No dia do primeiro repique, cinco dias após a adição dos antibióticos, as culturas provenientes das transfecções ainda continham bastante parasitas vivos. Quatorze dias após tal repique, sob a análise de alíquotas em microscópio óptico, já não foi visualizado parasitas em nenhuma das culturas controle, nocaute condicional e nocaute duplo, provenientes tanto da transfecção quanto do repique. Após o

período de seleção dos transfectados, os parasitas resistentes à neomicina viriam a se multiplicar a ponto de serem detectados sob visualização em microscópio óptico.

Mesmo após 30 dias de cultivo das culturas do primeiro repique, ainda não foram detectados parasitas nestas culturas e nem nas provenientes da transfecção. No entanto, ainda não é possível afirmar que ocorreu o nocaute duplo da H2AZ, uma vez que os parasitas das culturas do nocaute condicional também morreram, inviabilizando a estratégia de reconhecimento do motivo da morte dos parasitas da cultura do nocaute duplo. Pelo mesmo motivo também não foi possível analisar os efeitos da ausência da H2AZ sobre o parasita.

Embora resultados significativos sejam alcançados com uma quantidade menor que 1 μ M de Shld1 (SILVA *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2012), Herm-Gotz *et al.* (2007) demonstraram que a eficiência do sistema DDFKPB sobre o nível de expressão da proteína pode ser ajustada regulando a concentração de Shld1 utilizada. Com relação à rapamicina, uma concentração maior é necessária para estabilizar o DD e preservar a proteína a ele fusionada, entretanto, esse ligante apresenta maior nível de toxicidade (SILVA *et al.*, 2009).

Além da concentração dos ligantes ser um fator que possa ter afetado negativamente o nocaute condicional, a localização do domínio desestabilizador também pode ter influenciado. De acordo com Banaszynski *et al.* (2006), fusões amino terminais podem prejudicar a função das proteínas devido a sua estrutura intrínseca ou mesmo aos requisitos para suas modificações pós-traducionais, e, uma vez que as histonas são modificadas em sua cauda amino terminal (ALSFORD; HORN, 2004), justifica-se a construção carboxi terminal realizada no presente trabalho. Herm-Gotz *et al.* (2007) relatam que, para proteína TgMyoA de *T. gondii*, não foi possível obter nocaute condicional a partir da fusão amino terminal do DDFKBP.

No entanto, Banaszynski *et al.* (2006) também demonstraram que o domínio desestabilizante fusionado a porção carboxi terminal da proteína-alvo é menos estável, fato corroborado no estudo realizado por Ma *et al.* (2012) em *T. cruzi*, onde tal estratégia resultou na ausência de regulação da proteína GFP. Ademais, em seu trabalho com levedura, Adam *et al.* (2001) relatam que a função da H2AZ está relacionada essencialmente ao seu domínio carboxi terminal e Lowell *et al.* (2005) relatam que a extensão amino terminal da H2AZ em *T. brucei* não é necessária para a viabilidade do parasita. Mediante tais indicações, alterar a construção, fusionando

o DD à porção amino terminal da H2AZ, demonstra ser uma estratégia possivelmente viável para o nocaute condicional da histona.

5.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

No intuito de obter as proteínas na fração solúvel do extrato bacteriano, três cepas de *E. coli* foram transformadas com as proteínas recombinantes H2A e H2AZ fusionadas à seis aminoácidos de histidina ou à GST. Os plasmídios de expressão utilizados, pDEST 15 e pDEST 17, são provenientes da Tecnologia Gateway, a qual funciona como sistema de clonagem que se baseia na recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda. A tecnologia permite utilizar variados tipos de sequências de DNA e proporciona rápida e alta eficiência na transferência destes a vetores de expressão de proteínas para análise funcional (INVITROGEN, 2010b).

Os plasmídios utilizados apresentam as seguintes características necessárias para expressão e purificação da proteína: RBS (*ribosome binding-site*), sítio de início (ATG), etiqueta (GST no pDEST 15 e 6xHis no pDEST 17), região de recombinação, resistência à ampicilina, origem de replicação e, ainda contêm, o promotor T7 e a região de terminação da transcrição T7 (que, respectivamente, antecede o RBS e sucede a região de recombinação) (INVITROGEN, 2011). Deste modo, as cepas de *E. coli* selecionadas para expressão das proteínas recombinantes deveriam conter a enzima T7 RNA polimerase para transcrever o gene codificante das histonas H2A e H2AZ.

As três cepas utilizadas possuem o lisógeno DE3 que carrega o gene para T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, que requer IPTG para indução da expressão. As células BL21 são deficientes das proteases dependentes de ATP e das proteases de membrana externa, reduzindo a degradação das proteínas heterólogas. O plasmídio pLysS, presente em uma das cepas BL21, além de apresentar resistência à cloranfenicol, produz a lisozima T7 que inibe a expressão basal da T7 RNA polimerase, controlando a produção de proteínas alvo que possam afetar o crescimento e viabilidade da bactéria (INVITROGEN, 2010c). A cepa BL21 Star ainda carrega o gene *rne* mutado, que codifica a enzima RNase E truncada, a qual não possui a capacidade de degradar mRNA, aumentando o nível de expressão

da proteína de interesse (INVITROGEN, 2010a). Já a cepa AD494 possui resistência à canamicina e possui potencial para produzir proteínas ativas devidamente dobradas, uma vez que é mutante para tioredoxina redutase (*trxB*), que permite a formação de ligações dissulfeto no citoplasma (NOVAGEN, 2003).

No entanto, mesmo com tais características propiciando a expressão das proteínas recombinantes, não foi possível obter as proteínas recombinantes na fração solúvel do extrato bacteriano das células BL21(DE3)pLysS (FIGURA 8) e BL21 Star(DE3) (FIGURA 9). Na figura 8 é possível verificar que as proteínas H2A e H2AZ fusionadas à GST (com 42,1 KDa e 46,4 KDa, respectivamente) e, na figura 9, fusionadas à histidina (com 17,1 KDa e 21,4 KDa, respectivamente) estão presentes apenas no pós-sonicação e na fração insolúvel do extrato bacteriano.

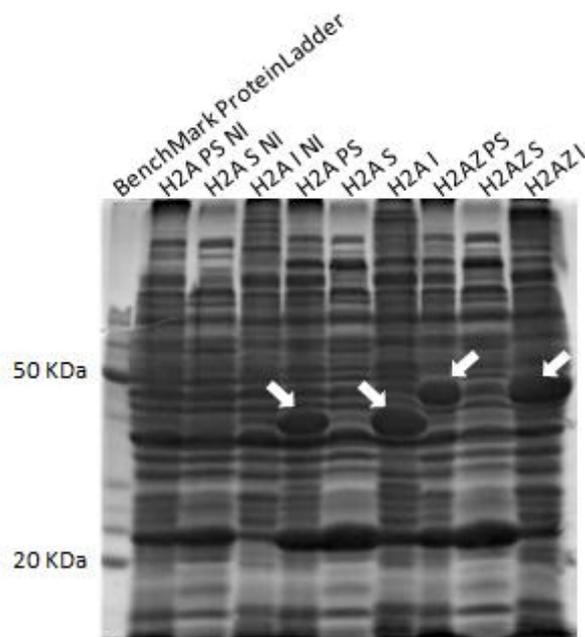


FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS H2A E H2AZ FUSIONADAS À GST EM BL21(DE3)pLysS

NOTA: NI para não induzido, PS para pós-sonicação, S para fração solúvel, I para fração insolúvel. As flechas indicam as bandas referentes às proteínas expressas no pós-sonicação e fração insolúvel. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

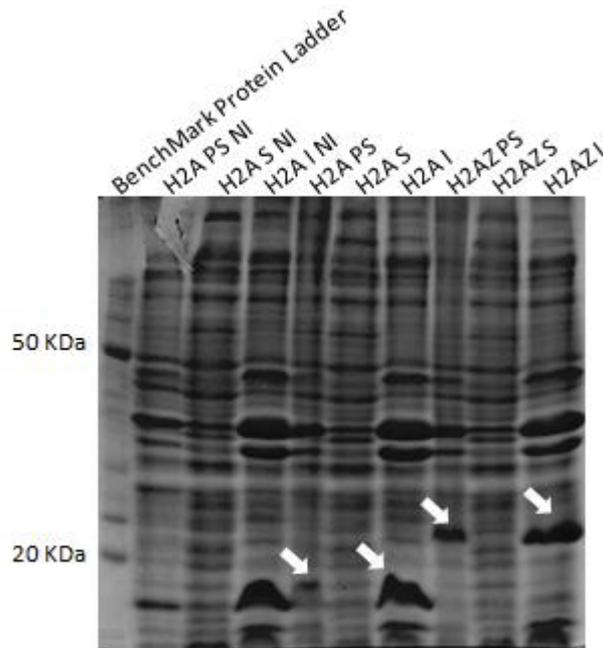


FIGURA 9 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS H2A E H2AZ FUSIONADAS À HISTIDINA EM BL21 STAR(DE3).

NOTA: NI para não induzido, PS para pós-sonicação, S para fração solúvel, I para fração insolúvel. As flechas indicam as bandas referentes às proteínas expressas no pós-sonicação e fração insolúvel. Gel desnaturante de poliacrilamida 14%.

De acordo com Brown (2003), quando a proteína não enovela corretamente, não assumindo sua conformação terciária funcional, fica insolúvel na bactéria e forma corpos de inclusão. A recuperação da proteína insolúvel pode ser realizada por desnaturação, entretanto, após sua renaturação não é garantido que a proteína enovele de forma correta, tornando-se inativa. Desta forma, necessita-se de uma cepa de *E. coli* que seja capaz de catalisar ligações dissulfeto, que permitem o enovelamento das proteínas.

Ao utilizar a cepa AD494(DE), que atende aos requisitos supracitados, foi possível obter a expressão das proteínas H2A e H2AZ fusionadas à GST na fração solução do extrato bacteriano (FIGURA 10).

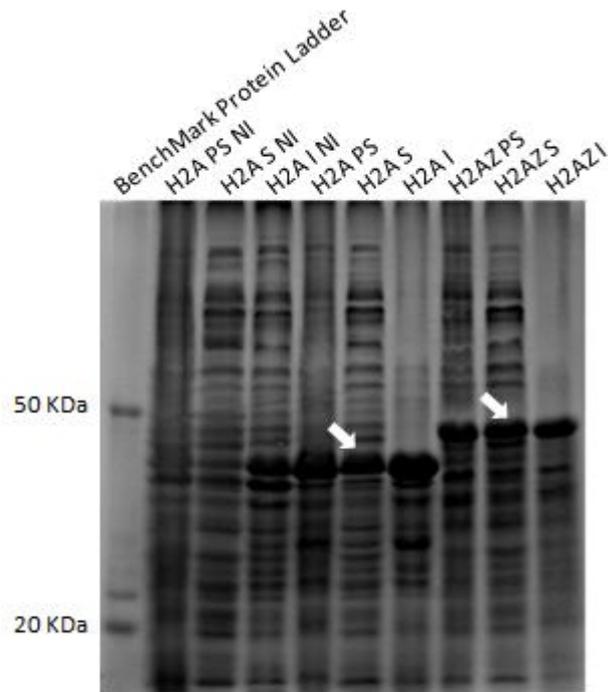


FIGURA 10 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS H2A E H2AZ FUSIONADAS À GST EM AD494(DE3).
 NOTA: NI para não induzido, PS para pós-sonicação, S para fração solúvel, I para fração insolúvel.
 As flechas indicam as bandas referentes às proteínas expressas na fração solúvel. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

Segundo Brown (2003), a proteína GST de *E. coli* fusionada às histonas permite estabilizar a expressão proteica e evita sua degradação pela célula hospedeira. Tal segmento bacteriano também pode contribuir com a purificação das histonas, por meio de cromatografia de afinidade em resina de glutationa.

Para purificar as histonas H2A e H2AZ foi utilizado 400 μ l da fração solúvel do extrato bacteriano de AD494(DE3), proveniente de 10 ml do inóculo induzido, e 25 μ l da resina de glutationa. A partir das alíquotas aplicadas no gel de poliacrilamida foi verificado que as proteínas se ligaram à resina, entretanto não foi possível eluir as histonas com 10 mM (resina 1 e eluído 1) nem com 20 mM (resina 2 e eluído 2) de glutationa reduzida, mesmo detectando menor quantidade de proteína nas resinas após a tentativa de eluição (FIGURAS 11 e 12).

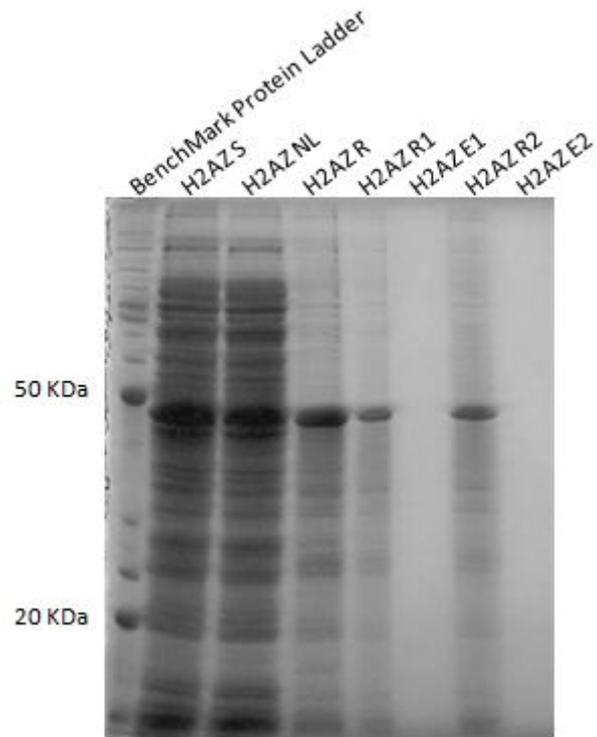


FIGURA 11 – PURIFICAÇÃO DA H2AZ EM RESINA DE GLUTATIONA.
 NOTA: S para fração solúvel, NL não ligado, R para resina, R1 para resina 1, E1 para eluído 1, R2 para resina 2 e E2 para eluído 2. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

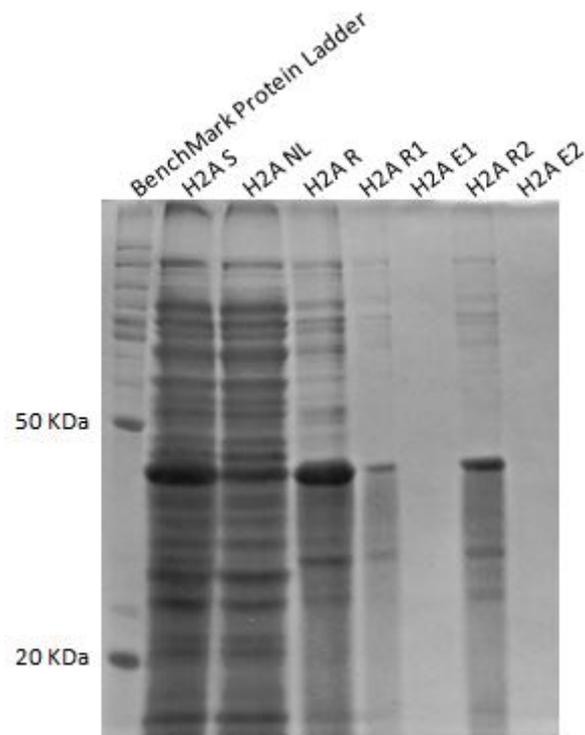


FIGURA 12 – PURIFICAÇÃO DA H2A EM RESINA DE GLUTATIONA.
 NOTA: S para fração solúvel, NL não ligado, R para resina, R1 para resina 1, E1 para eluído 1, R2 para resina 2 e E2 para eluído 2. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

Embora os testes de eluição não tenham funcionado, as metodologias de expressão das proteínas e ligação das mesmas à resina de glutarona podem ser realizadas em larga escala para ensaio de *Pull Down*. Para a análise das proteínas que interagem com H2A e H2AZ, o imprescindível é que as histonas estejam ligadas à resina, para que seja possível a formação de complexos proteicos a partir do extrato de *T. cruzi* passado pela coluna de cromatografia de afinidade. A posterior obtenção dos complexos, para análise por espectrometria de massa, pode ser realizada pelo processo de fervura das amostras.

Além das metodologias utilizadas, outras técnicas estão sendo realizadas pelo grupo de estudo do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos do Instituto Carlos Chagas, com a finalidade de alcançar o objetivo geral deste trabalho. A exemplo disso, as técnicas de co-imunoprecipitação, imunoprecipitação de cromatina e superexpressão gênica podem contribuir para a caracterização funcional da histona variante H2AZ no *Trypanosoma cruzi*.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados alcançados foram obtidas as seguintes conclusões:

- As construções gênicas para nocaute condicional e duplo da H2AZ em *T. cruzi* foram obtidas com sucesso por meio da estratégia de PCR de fusão;
- A metodologia mais eficiente para PCR de fusão foi realizar a reação a partir de 20 ng de marcador de seleção para cinco vezes mais moléculas dos demais produtos, utilizando 5 pmol dos *primers* das extremidades das construções gênicas;
- Não foi possível concluir se o nocaute duplo da H2AZ é viável para o *T. cruzi* ou se a histona é essencial a sua sobrevivência, uma vez que os parasitas provenientes das culturas do nocaute condicional, suplementadas tanto com rapamicina quanto com Shld1, assim como os parasitas do nocaute duplo também morreram;
- As proteínas recombinantes H2A e H2AZ fusionadas à GST foram obtidas na fração solúvel do extrato bacteriano quando expressas na cepa AD494(DE3) de *E. coli*;
- A ligação das proteínas H2A e H2AZ na resina de glutationa foi obtida com sucesso, entretanto sua eluição não foi passível de obtenção com 10 mM nem com 20 mM de glutationa reduzida.

Como perspectivas para os nocautes, concentrações mais elevadas de rapamicina e Shld1 deverão ser testadas com a finalidade de estabilizar o domínio desestabilizante, para que a H2AZ não seja direcionada à degradação, possibilitando assim reconhecer o motivo da morte dos parasitas submetidos ao nocaute duplo da histona variante. Deverá ser realizada, também, uma nova construção para o nocaute condicional, na qual o DDFKBP fique fusionado a porção amino terminal da histona. Com relação às proteínas recombinantes, as mesmas

deverão ser produzidas em larga escala para ensaio de *Pull Down*, com intuito de identificar, a partir de espectrometria de massas, complexos proteicos de interação com H2A e H2AZ nas fases epimastigota e tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ADAM, M.; ROBERT, F.; LAROCHELLE, M.; GAUDREAU, L. H2AZ is Required for Global Chromatin Integrity and for Recruitment of RNA Polymerase II under Specific Conditions. **Molecular and Cellular Biology**. v. 21, n. 18, p. 6270-6279, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. DNA e Cromossomos. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. Tradução de: VEIGA, A. B. G. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 191-234. Molecular Biology of the Cell.

ALSFORD, S.; HORN, D. Trypanosomatid histones. **Molecular Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 365-372, 2004.

ARMSTRONG, C. M.; GOLDBERG, D. E. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. **Nature Methods**. v. 4, n. 12, p. 1007-1009, 2007. Resumo. Disponível em: < <http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n12/full/nmeth1132.html>>. Acesso em: 15/02/2013.

BANASZYNSKI, L. A.; CHEN, L.; MAYNARD-SMITH, L. A.; OOI, A. G. L.; WANDLESS, T. J. A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. **Cell**. v. 126, n. 5, p. 995-1004, 2006.

BONISCH, C.; HAKE, S. B. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable?. **Nucleic Acids Research**. v. 40, p. 1-23, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doença de Chagas, caderno 10. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 7 ed., 2009. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 07/02/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde/Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN). Doença de Chagas Aguda. **Manual prático de subsídio à notificação obrigatória no SINAN**. 2004. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf>. Acesso em: 07/02/2013.

BROWN, T. A. Produção de Proteínas a Partir de Genes Clonados. In: _____. **Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma Introdução.** Tradução de: FERREIRA, H. B. e PASSAGLIA, L. M. P. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 277-298. Gene Cloning and DNA Analysis: an introduction.

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

DaROCHA, W. D.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M. R.; DONELSON, J. E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v. 133, p. 175-186, 2004.

ELIAS, M. C. Q. B.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v. 112, p. 79-90, 2001.

ESTÉVEZ, A. M.; KIERSZENBAUM, F.; WIRTZ, E.; BRINGAUD, F.; GRUNSTEIN, J.; SIMPSON, L. Knockout of the glutamate dehydrogenase gene inloodstream *Trypanosoma brucei* in culture has no effect on editing of mitochondrial mRNAs. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v. 100, p. 5-17, 1999.

GUILLEMETTE, B.; BATAILLE, A.R.; GEVRY, N.; ADAM, M.; BLANCHETTE, M.; ROBERT, F.; GAUDREAU, L. Variant Histone H2AZ is Globally Localized to the Promoters of Inactive Yeast Genes and Regulates Nucleosome Positioning. **PLoS Biology.** v. 3, n. 12, p. 2100-2110, 2005.

HERM-GOTS, A.; AGOP-NERSESIAN, C.; MÜNTER, S.; GRIMLEY, J. S.; WANDLESS, T. J.; FRISCHKNECHT, F.; MEISSNER, M. Rapid Control of Protein Level in the Apicomplexan *Toxoplasma gondii*. **Nat Methods.** v. 4, n. 12, p. 1003-1005, 2007.

INVITROGEN. **BL21 Star™(DE3) One Shot®, BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells.** 2010a. Manual do usuário.

INVITROGEN. **E. coli Expression System with Gateway® Technology - Gateway®-adapted destination vectors for cloning and high-level expression of native.** 2011. Manual do usuário.

INVITROGEN. **Gateway® Technology** - A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. v. E, 2010b. Manual de instruções.

INVITROGEN. **One Shot® BL21(DE3), One Shot® BL21(DE3)pLysS, One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells**. 2010c. Manual do usuário.

JIN, C.; FELSENFELD, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. **Genes & Development**. v. 21, p. 1519-1529, 2007.

KHORASANIZADEH, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. **Cell Press**. v. 116, p. 259-272, 2004.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. *trans* and *cis* splicing in Trypanosomatids: mechanism, factors and regulation. **Eukaryotic Cell**. v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LOWELL, J. E.; KAISER, F.; JANZEN, C. J.; CROSS, G. A. M. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**. v. 118, n. 24. p. 5721-5730, 2005.

MA, Y. F.; WEISS, L. M.; HUANG, H. A method for rapid regulation of protein expression in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**. v. 42, n. 1, p. 33-37, 2012.

MACRAE, J. I.; OBADO, S. O.; TURNOCK, D. C.; ROPER, J. R.; KIERANS, M.; KELLY, J. M.; FERGUSON, M. A. J. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 147, n. 1, p. 126-136, 2006.

MARQUES, M.; AMME, L. L.; GERVAIS, A. L.; GAUDREAU, L. Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. **Epigenetics**. v. 5, n. 4, p. 267-272, 2010.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. VIZUET-de-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ÂNGULO, E. E. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2010, 2010.

MENEGHINI, M. D.; WU, M.; MADHANI, H. D. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. **Cell**. v. 122, p. 725-736, 2003.

NOVAGEN. **Transformation/Transfection** - Competent Cells Overview. 2003. Manual de instruções.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**. v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RESPUELA, P.; FERELLA, M.; RADA-IGLESIAS, A.; ASLUND, L. Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 23, p. 15884-15892, 2008.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 20, 21, 22 e 23, p. 280-343.

SHEVCHUK, N. A.; BRYKSIN, A. V.; NUSINOVICH, Y. A.; CABELLO, F. C.; SUTHERLAND, M.; LADISCH, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic Acids Research**. v. 32, n. 2, p. 1-12, 2004.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; KEMP, L. E.; FIGUEIREDO, L. M.; LOWELL, J. E.; FENYO, D.; WANG, X.; DEWELL, S.; CROSS, G. A. M. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Development**. v. 23, p. 1063-1076, 2009.

SILVA, L. M. da.; OWENS, K. L.; MURTA, S. M. F.; BEVERLEY, S. M. Regulated expression of the Leishmania major surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. **Proc Natl Acad Sci**. v. 106, n. 18, p. 7583-7588, 2009.

TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The Challenges of Chagas Disease – Grim Outlook or Glimmer of Hope?. **PLoS Medicine**. v. 4, 2007.

WHO – World Health Organization. Control of Chagas Disease – Second Report of the WHO Expert Committee. **Who Technical Report Series**. n. 905. Geneva, 2002.

Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf>. Acesso em: 23/01/2013.

WHO - World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Who Technical Report Series**. n. 975. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf>. Acesso em: 12/06/2013.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 6b, p. 44-48, 2011.