

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR**

CAROLINE DE MORAES DE SIQUEIRA

O PAPEL DE TGHDAC-2 EM *Toxoplasma gondii*

CURITIBA

2015

CAROLINE DE MORAES DE SIQUEIRA

O PAPEL DE TGHDAC-2 EM *Toxoplasma gondii*

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora externa: Dr.^a Sheila Cristina Nardelli
Orientador Interno: Prof. Dr. Wanderson Da Rocha

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser uma fonte inesgotável de fé, esperança e inspiração.

Agradeço a minha família pelo incentivo constante, em especial á minha mãe, pelo amor incondicional e á minha irmã pela amizade, pois desde sempre estiveram ao meu lado me encorajando, para sempre seguir em frente e sempre acreditaram e confiaram em mim. Ao meu pai *in memorian*, pela vida e pelo belo exemplo deixado em vida que sempre me motivou.

Ao meu amor pela inspiração, pelos bons momentos, por sempre estar ao meu lado e por poder compartilhar minhas conquistas.

A minha orientadora, Dr^a Sheila Cristina Nardelli, por me orientar da melhor forma possível, por estar sempre presente durante os experimentos, apoiando, ensinando e tornando o trabalho mais divertido.

A minha colega e amiga de bancada, Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso, pela grande ajuda durante os experimentos e por não me deixar desanimar quando as coisas davam errado.

A Dr^a Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza pelo auxílio.

A todos os colegas do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica do Instituto Carlos Chagas pelo apoio e acolhimento.

Aos colegas de curso por trilharem comigo este extenso caminho ao longo da graduação.

Ao Instituto Carlos Chagas e a todos os seus funcionários pelo suporte e á Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização do curso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Muito obrigada!

“The only way to discover the limits of the possible is to venture beyond them into the impossible”. (Arthur C. Clarke)

RESUMO

Toxoplasma gondii pertence ao filo Apicomplexa e é o agente causador da toxoplasmose. Seu ciclo de vida é bastante complexo e alterna entre o seu hospedeiro definitivo, felinos, e o hospedeiro intermediário, animais de sangue quente, incluindo o homem. As formas de vida do parasita possuem diferentes perfis de expressão gênica que são fundamentais para a virulência e como mecanismo de adaptação nos diferentes hospedeiros. Nos últimos 15 anos, fatores epigenéticos tem sido associados como parte fundamental do controle da expressão gênica nestes parasitas, dentre eles a modificação em histonas que tem um papel especial na regulação gênica do parasita. *T. gondii* possui as 4 histonas canônicas conservadas, além de diversas enzimas remodeladoras de cromatina, que ordenadamente adicionam ou removem modificações pós-traducionais em histonas, afetando a arquitetura da cromatina e processos dependentes de DNA. Entre elas encontram-se as deacetilases de histona (HDACs), que removem o grupo acetil de lisinas acetiladas em histonas, e conseqüentemente tornam a cromatina mais compactada, silenciando a expressão dos genes. *T. gondii* possui sete HDACs, dentre elas a HDAC-2 que é o objeto do presente estudo. Embora seja aparentemente uma HDAC clássica de classe I e similar aos demais eucariotos, a HDAC-2 de *T. gondii* possui duas inserções nucleotídicas que acrescentam 170 nucleotídeos dentro do domínio HDAC característico, que a tornam única de parasita do filo Apicomplexa e cuja função permanece desconhecida. Além disso, a expressão de HDAC-2 encontra-se aumentada durante a fase S do ciclo celular, conforme resultados presentes no banco de dados. Por ser tão singular, o objetivo principal desta pesquisa foi caracterizar a Histona Deacetilase-2 de *Toxoplasma gondii*, sua localização celular, bem como seu papel em processos dependentes de DNA, como replicação e regulação da expressão gênica do parasita. Para tanto, partimos para ensaios de etiquetamento da proteína endógena, utilizando uma repetição de 3x HA para localização da proteína por imunofluorescência. Porém após inúmeras tentativas de transfecção na cepa RH Δ HX Δ Ku80 de *T. gondii*, não foi possível obter mutantes com a proteína etiquetada, e com isso os objetivos de identificar complexos e genes a ela associados não foram possíveis até o momento. Entretanto, o nocaute gênico foi obtido com sucesso por PCR de fusão, utilizando as regiões adjacentes ao gene *hdac-2*. Análises preliminares de imunofluorescência revelaram que parasitas HDAC-2 KO falham em deacetilar mais especificamente a histona H4, e não a histona H3. Adicionalmente, por meio de ensaio de formação de placa, observamos que as placas de lise nos parasitas KO são menores e em menor número, um dado que sugere que essa deacetilase está relacionada à replicação do parasita e possivelmente afete sua virulência. Confirmamos que o mRNA de *hdac-2* possui splicing alternativo retendo o primeiro íntron. Até o momento, nossos dados indicam uma participação de HDAC-2 no processo de replicação do parasita, envolvendo possivelmente a deacetilação da histona H4, embora mais estudos devem ser feitos a fim de elucidar a função dessa deacetilase atípica em *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Epigenética. Modificações em histonas. HDACs.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a member of the phylum Apicomplexa and is the causative agent of toxoplasmosis. *T. gondii*'s life cycle is complex and alternates between its final host, the cats, and the intermediate host, warm-blooded animals, including humans. Different stage forms have different gene expression profiles a key factor for virulence and as an adaptation mechanism in different hosts. Over the past 15 years, epigenetic factors have been associated as a fundamental part of gene expression control in these parasites, including the post translation modification of histones (PTMs) *T. gondii* has all four canonical histones conserved and several chromatin remodeling enzymes, that add or remove post-translational modifications of histones, affecting the architecture of chromatin and DNA-dependent processes. Among them, are the histone deacetylases (HDACs) that remove the acetyl group of lysines, which results in more condensed chromatin and transcription silencing. *T. gondii* has seven HDACs, among them, HDAC-2 the main interested of this project. Although apparently is a typical class I HDAC similar to other eukaryotes, the HDAC-2 of *T. gondii* has two nucleotide insertions within the characteristic HDAC domain, which make HDAC-2 unique to Apicomplexa parasites and whose function remains unknown. In addition, HDAC-2 expression is found increased during the S phase of the cell cycle, according to *Toxoplasma* database. For its unique characteristics, our main goal is to characterize the Histone Deacetylase-2 of *Toxoplasma gondii*, its cellular localization, its protein partners and its role in DNA-dependent processes such as replication and gene expression regulation. We start by endogenous protein assay using a 3X HA repeat. However, after several attempts the transfection in Δ HX Δ Ku80 RH strain was not possible. Consequently, some aims such protein complex identification and genes associated with HDAC-2 have not been possible so far. On the other hand, gene knockout has been successfully obtained by fusion PCR using the adjacent regions to *hdac-2* gene. Preliminary immunofluorescence analysis, revealed that HDAC-2 knockout parasites fail to deacetylate more specifically the histone H4, but not histone H3. Additionally, using plaque assay, we observed that plaques formed in the knockout parasites are smaller and fewer, suggesting that HDAC-2 is related to parasite replication and can affects its virulence. So far, our data indicate a participation of HDAC-2 in the replication process, possibly involving the deacetylation of histone H4, though more studies should be done in order to elucidate the function of this atypical deacetylase in *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Epigenetics. Histone modification. HDACs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1– Esquema ilustrativo do ciclo de vida do <i>T. gondii</i> nos hospedeiros definitivos (felinos) e intermediários (mamíferos e aves).	14
FIGURA 2 – Classificação das HDACs.	19
FIGURA 3 - Vetor pLIC.HA.HXGPRT.....	28
FIGURA 4 - Representação da estratégia para o nocaute da <i>hdac-2</i> no genoma do parasita.	33
FIGURA 5 - Variação de HDAC-2 durante o ciclo celular.	37
FIGURA 6 - Variação de HDAC-2 durante o ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	39
FIGURA 7 -Homologia da Sequência do gene <i>hdac-2</i>	40
FIGURA 8 - Estrutura 3D de HDAC-2	41
FIGURA 9- Amplificação do gene <i>hdac-2</i> por meio de PCR.	42
FIGURA 10 - Amplificação do inserto correspondente à HDAC-2 por PCR de colônia.	43
FIGURA 11 - Digestão virtual e obtida experimentalmente para confirmação dos clones.....	44
FIGURA 12 – Análise da linearização dos vetores.....	45
FIGURA 13 - Foto da revelação de Western Blot por Odyssey.....	46
FIGURA 14- Eficiência de transfecção.....	47
FIGURA 15– Localização de HDAC-2 por imunofluorescência.....	47
FIGURA 16 – Análise da PCR de Fusão.....	48
FIGURA 17 - Desenho esquemático dos amplicons utilizados no sequenciamento.	49
FIGURA 18- Confirmação do Nocaute por PCR.	49
FIGURA 19- Imunofluorescência indireta com Anticorpos para acetilação de Histonas	51
FIGURA 20 - Plaque Assay.....	53
FIGURA 21 - Amplificação do primeiro e terceiro Íntrons a partir de cDNA.	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>hdac-2</i>	26
TABELA 2- Representação das etapas de PCR para a amplificação do gene <i>hdac-2</i>	26
TABELA 3- Sequência dos <i>primers</i> para amplificação das UTRs	34
TABELA 4- Representação das etapas da primeira PCR.	34
TABELA 5 - Sequência de <i>primers</i> para confirmação do nocaute	35
TABELA 6 - Sequência de <i>primers</i> para os íntrons.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

acetilCoA	- Acetyl Coenzima A
AGO	- proteína argonauta
BSA	- soro fetal bovino
CDD	- Conserved Domain Database
cDNA	- DNA complementar
CRISPR/ Cas 9	- <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , associado ao gene 9
DAPI	- 4'6'-diamidino-2-fenilindol
dCTP	- desoxicitidina trifosfato
dGTP	- desoxiguanosina trifosfato
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNMT	- citosina-5 DNA metiltransferase
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	- ácido etileno glicol tetra acético
FDA	- US Food and Drug Administration
GFP	- <i>Green fluorescent protein</i>
GNAT	- GCN5 N-acetiltransferases
HAT	- Histona acetiltransferase
HDAC	- histona deacetilase
HEPES	- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic ácido
HFF	- <i>human foreskin-fibroblastos</i>
hxgprt	- Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase
IFI	- Imunofluorescência indireta
Kb	- kilo bases
KD	- <i>knock down</i>
kDa	- kilo daltons
KO	- <i>knock out</i>
LIC	- <i>Ligation Independent Cloning</i>
lncRNA	- longos RNAs não codantes
Meio LB	- Meio Luria Bertani

miRNAs	- micro RNAs
MPT	- modificação pós-traducional
mRNA	- RNA mensageiro
NAD+	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	- <i>National Center of Biotechnology Information</i>
NHEJ	- <i>Nonhomologous end joining</i>
NIAID-NIH	- <i>National Institute of Allergies and Infectious Diseases</i>
pb	- pares de base
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	- <i>protein data bank</i>
RdRp	- RNA-dependente RNA polymerase
RNAi	- RNA de interferência
rpm	- rotações por minuto
SAM	- S-adenil metionina
SDS PAGE	- <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIR2	- <i>silent information regulator-2</i>
sRNAs	- <i>small RNAs</i>
TBE	- Tris/Borato/EDTA
TrisHCl	- Trisaminometano ácido clorídrico
U	- Unidade (de enzima)
UTR	- <i>untranslated region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2	REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.3	JUSTIFICATIVA.....	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	GERAL:.....	23
2.2	ESPECÍFICOS:.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	24
3.1.1	Modelagem <i>in silico</i>	24
3.2	CULTURA DE <i>Toxoplasma gondii</i>	25
3.3	ETIQUETAMENTO DO GENE <i>hdac-2</i>	25
3.3.1	Eletroforese em gel de agarose	26
3.4	CLONAGEM EM VETOR pLIC.HA.HXGPRT	27
3.4.1	Transformação bacteriana	29
3.5	SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS	29
3.5.1	Confirmação dos clones: Digestão Enzimática e sequenciamento:	30
3.5.2	Precipitação de DNA	31
3.6	TRANSFEÇÃO EM <i>T. gondii</i>	31
3.7	ENSAIO DE IMUNOFLOURESCENCIA INDIRETA.....	31
3.8	WESTERN BLOT.....	32
3.9	NOCAUTE GÊNICO DE <i>hdac-2</i>	33
3.10	PLAQUE ASSAY.....	35
3.11	CONFIRMAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO DE <i>hdac-2</i>	35
3.11.1	Extração de RNA e obtenção de cDNA	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	HDAC-2 NO TOXODB: O BANCO DE DADOS DE <i>Toxoplasma</i>	37
4.1.1	Análise da sequência de HDAC-2	39
4.1.2	Estrutura proteica	40
4.2	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA HDAC-2.....	42
4.3	CLONAGEM EM VETOR pLIC.HA.HXGPRT E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS.....	42

4.4	DIGESTÃO ENZIMÁTICA E TRANSFECCÃO EM <i>T. gondii</i>	44
4.5	WESTERN BLOT	45
4.6	LOCALIZAÇÃO CELULAR DE HDAC-2	47
4.7	NOCAUTE GÊNICO DE <i>hdac-2</i>	48
4.8	CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS NOCAUTE PARA HDAC-2.....	50
4.8.1	Imunofluorescência	50
4.8.2	Plaque Assay	52
4.9	CONFIRMAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO DE HDAC-2	54
5	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) (SPLENDORE, 1908; NICOLLE e MANCEAUX, 1908), é um parasita intracelular obrigatório, que pode infectar e se replicar teoricamente em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves (SOUZA, et al, 2010), causando a toxoplasmose. Este parasita pertence ao filo Apicomplexa, do qual também fazem parte outros parasitas de importância médica como *Plasmodium* e *Cryptosporidium*.

O ciclo de vida (FIGURA 1) é bastante complexo e varia entre as fases sexuadas, no hospedeiro felino, e assexuada em demais mamíferos e aves. A fase sexuada se inicia geralmente com a ingestão de cistos teciduais pelos felinos, que no intestino se multiplicam através de uma forma especializada de esquizogonia, (DUBEY, et al, 1998), dando origem aos macro e micro gametas. Ao se fusionarem, os gametas formam os oocistos, liberados nas fezes do animal e que tornam-se esporulados no ambiente externo pelo processo de meiose (SOUZA, et al, 2010). Os esporozoítos por sua vez, são altamente infectivos e resistentes, (FULL *Toxoplasma*, 2010) e podem ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários através de água ou alimentos contaminados. Uma vez no aparelho digestivo, estes esporozoítos infectam as células do epitélio intestinal e originam os taquizoítos, culminando na fase aguda da doença (SOUZA, et al, 2010).

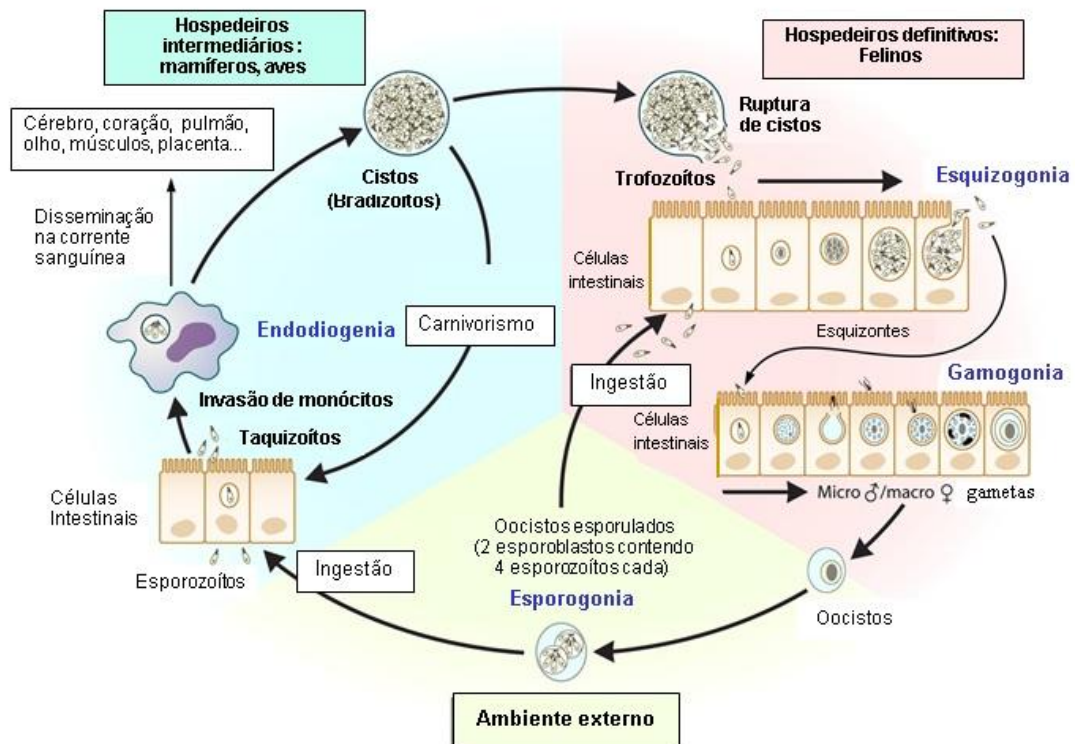


FIGURA 1– Esquema ilustrativo do ciclo de vida do *T. gondii* nos hospedeiros definitivos (felinos) e intermediários (mamíferos e aves).

Fonte: adaptado de ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012.

Os taquizoítos são formas de proliferação rápida, encontrados nas células dos hospedeiros intermediários apenas na fase aguda da doença. São células polarizadas e alongadas, em cuja região anterior está o complexo apical, formado pelos anéis polares, o conóde, as róptrias e os micronemas, sendo que o núcleo está localizado na região mediana abaixo do apicoplasto (SOUZA, et al, 2010). Os taquizoítas dividem-se por um processo denominado de endodiogenia (FEGURSON e HUTCHISON, 1987), ou seja, as células-filhas se desenvolvem dentro da célula mãe. Estes taquizoítos podem se transformar em bradizoítos pela pressão do sistema imune do hospedeiro, e esta mudança de forma caracteriza a fase crônica da toxoplasmose, para a qual não existe cura.

Assim como taquizoítas, os bradizoítas dividem-se por endodiogenia, no entanto, muito mais lentamente, sendo que nessa forma o parasita pode permanecer latente durante toda a vida do hospedeiro. Estes cistos podem se desenvolver em vários tipos de tecidos, porém existe uma preferência pelo tecido neural e muscular, onde podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem causar nenhuma resposta inflamatória (DUBEY, et al, 1998). Estruturalmente os bradizoítos diferem pouco dos

taquizoítos, apesar de serem mais delgados, o núcleo está localizado mais posteriormente e possuem mais grânulos de amilopectina, que funcionam como reserva energética (DUBEY, et al, 1998) .

Grande parte da população está infectada com *Toxoplasma*, mas muitos desses indivíduos nem tem conhecimento, pois a infecção é geralmente assintomática em indivíduos saudáveis e, portanto, raramente é buscado tratamento (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). Porém, pode ser bastante grave em gestantes e em indivíduos imunocomprometidos. A transmissão congênita pode causar hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracraniais, cegueira, retardo psicomotor ou mental, entre outros (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). Complicações como a retinocoroiditis, encefalite toxoplasmica e pneumotite, decorrentes da toxoplasmose são as principais doenças observadas em indivíduos após o nascimento, principalmente imunocomprometidos, como recém-transplantados e portadores do vírus HIV (ELMORE, et al, 2010).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *Toxoplasma gondii*, sendo que grande parte se concentra na América do Sul, incluindo o Brasil, onde os índices podem atingir 80%, dependendo da região. Além disso, no Brasil foi observado maior variabilidade genética do parasita, o que provavelmente é a causa da maior severidade da doença encontrada em território nacional (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

1.2 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM *Toxoplasma gondii*

O termo epigenética se refere a todas as modificações na expressão gênica, que não envolvem alterações na sequência do DNA. Três mecanismos estão envolvidos: a metilação de DNA, mecanismos dependentes de RNA e modificações pós-traducionais em histonas (EGGER, et al, 2004).

A metilação de DNA ocorre quase que exclusivamente nos dinucleotídeos CpG, dentro do sulco maior da dupla-hélice de DNA e interfere na transcrição, pois impede o contato dos fatores de transcrição, (BIRD e WOLFFE, 1999). A enzima responsável pela catalise da metilação de DNA é a citosina-5 DNA metiltransferase (DNMT), que transfere um grupamento metil da S-adenosil metionina (SAM) ao carbono 5 da citosina-(5-metilcitosina) (GISSOT e KIM, 2008). Gissot e Kim (2008) detectaram a presença da proteína Dnmt2, pertencente à família de proteínas DNMT, no genoma de *Toxoplasma gondii*. Porém não encontraram evidências de

metilação em taquizoítos com a abordagem utilizada, de forma que a metilação de DNA em *Toxoplasma* pode estar presente em algum estágio de desenvolvimento específico, ou em regiões muito restritas, ainda não identificadas.

Por outro lado, mecanismos dependentes de RNA, não só foram identificados, como se mostraram funcionais em *Toxoplasma*. As proteínas AGO, Dicer e RdRp, envolvidas na via de RNA de interferência (RNAi), foram encontradas no genoma de *Toxoplasma gondii* (ULLU, TSCHUDI e CHAKRABORTY, 2004). A proteína AGO de *T. gondii* foi caracterizada em 2006 por Al Riyahi e colaboradores, onde demonstraram que o parasita possui uma via de RNAi funcional. A via de RNAi de *Toxoplasma* não é apenas funcional, como também bastante complexa, pela diversidade de sRNAs (*small RNAs*) presentes e pela natureza dos componentes da via (BRAUN, et al, 2010). Adicionalmente, a presença de micro RNAs (miRNAs) e longos RNAs não codificantes (lncRNA) já foi comprovada e a relevância dos mesmos está sendo investigada em *Toxoplasma* (XU, et al, 2013). Estudos indicam a importância desses mecanismos para processos como a virulência e diferenciação do parasita.

Finalmente, a modificação pós-traducional em histonas (MPT) é o mecanismo de regulação epigenética mais caracterizada em diversos eucariotos e talvez, a mais importante em *Toxoplasma gondii*. A modificação em histonas representa um mecanismo para regulação diferencial da atividade da cromatina, podendo afetar vários processos dependentes de DNA (STRAHL E ALLIS, 2000).

Em eucariotos em geral, o nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina e é formado por um octâmero de duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4), ao redor das quais, 147 pares de bases (pb) de DNA estão envolvidas (KOUZARIDES, 2007). Adicionalmente uma cópia da histona H1, está presente entre os nucleossomos, enovelando cerca de 20 pb adicionais, fornecendo um maior grau de compactação do DNA (KOUZARIDES, 2007).

T. gondii possui as quatro histonas canônicas, presentes em cópias únicas, exceto a histona H2B que é representada por duas isoformas (H2Ba e H2Bb), que diferem por apenas seis aminoácidos (NARDELLI, et al, 2013). Entretanto, essa pequena diferença é suficiente para conferir expressão diferencial durante o ciclo de vida, com H2Ba mais expressa em taquizoítos e H2Bb expressa apenas durante o ciclo sexuado (DALMASSO, et al, 2006). As histonas estão entre as proteínas mais conservadas ao longo da evolução e o mesmo acontece em *Toxoplasma*. As

histonas H3 e H4 são histonas mais conservadas com humanos, enquanto que as H2A e H2B são mais divergentes, especialmente na porção N-terminal (NARDELLI, et al, 2013). Até o momento, uma H1 típica não foi identificada em *Toxoplasma gondii* (DIXON, et al, 2010). Além destas, *T. gondii* possui as histonas variantes CenH3, H3.3, H2A.X, H2A.Z e H2Bv, esta última específica de parasitas (NARDELLI, et al, 2013). Ensaio de imunoprecipitação da cromatina, mostraram que H2A.Z e H2Bv interagem nos mesmos nucleossomos e estão associadas a genes transcricionalmente ativos enquanto que H2A.X está associada a genes silenciados e reparo de DNA (DALMASSO, et al, 2009).

Consideradas componentes estruturais na cromatina, as histonas também são componentes integrais da maquinaria de regulação da transcrição, além de desempenhar importantes papéis em outros processos, tais como a replicação, reparo de DNA e segregação cromossômica (STRAHL E ALLIS, 2000). Estas proteínas possuem um domínio globular que fica em contato com o DNA e com as outras histonas do octâmero e porções flexíveis expostas, que estão mais sujeitas a modificações pós-traducionais (MPTs), como: acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação (KOUZARIDES, 2007; STRAHL E ALLIS, 2000). As diferentes combinações geradas por essas modificações, e nos diferentes resíduos da cauda das histonas, atuam em conjunto sinalizando para modificar a estrutura da cromatina, tornando-a mais densa ou frouxa dependendo da necessidade celular. Estas combinações são conhecidas por código de histonas, o qual é lido e interpretado por diferentes proteínas que podem atuar na ativação ou silenciamento de diferentes processos (STRAHL E ALLIS, 2000).

Recentemente, mais de 100 diferentes MPTs foram identificadas em histonas e histonas variantes de *T. gondii* por espectrometria de massas, sendo que dessas, algumas possuem funções conservadas com demais eucariotos (NARDELLI, et al, 2013; GISSOT, et al, 2007), sendo a metilação e acetilação de lisinas e metilação de argininas as MPT em histonas melhor caracterizadas no parasita (GISSOT e KIM, 2008).

Das diversas modificações encontradas em histonas de diferentes eucariotos, a acetilação de lisinas é a MPT mais estudada e é comumente associada à ativação da transcrição gênica. Isso ocorre pois sua adição neutraliza a carga positiva da lisina, causando a redução da interação entre o DNA e as histonas, descondensando a cromatina (KHORASANIZADEH, 2004; KOUZARIDES, 2007;

STRAHL E ALLIS, 2000). Embora mais estudada quanto a sua participação na ativação da transcrição, a acetilação em resíduos específicos pode também, regular a replicação do DNA, deposição de histonas e reparo de DNA pelo recrutamento de proteínas com bromodomínio, domínio que reconhece resíduos acetilados e recruta outros fatores proteicos (KHORASANIZADEH, 2004).

Histonas acetiltransferases (HATs) são as responsáveis pela transferência do grupo acetil da acetil Coenzima A (acetilCoA) para o grupo NH_3^+ dos resíduos de lisinas das histonas (CAROZZA, et al, 2003), sendo agrupadas em duas classes (tipo A e tipo B), dependendo de sua localização celular (VANAGAS, et al, 2012; ROTH, DENU e ALLIS, 2001). Dentro do tipo A cuja localização é nuclear, são encontradas as famílias GNATs (GCN5 N-acetiltransferases), MYSTs, p300/CBP (*CREB-binding protein*), fator geral de transcrição HATs e HATs relacionadas a hormônios nucleares (CAROZZA, et al, 2003; VANAGAS, et al, 2012). Já no tipo B são classificadas proteínas com localização citoplasmática envolvidas na acetilação de histonas recém-sintetizadas (VANAGAS, et al, 2012). Dentre as famílias citadas, *Toxoplasma* possui homólogos para as GCN5 e MYST (DIXON, et al, 2010).

A reversão do estado acetilado das histonas é catalisada pelas histonas deacetilases (HDACs) que antagonicamente às HATs, estão relacionadas à silenciamento gênico. Estas proteínas são membros de uma família antiga, encontrada em diversos organismos, incluindo plantas, fungos e bactérias (GROGORETTI, LEE e GODSON, 2004). Em eucariotos são divididas em quatro grupos de acordo com a similaridade de sequência e cofator (FIGURA 2). As HDACs clássicas são dependentes de zinco e compreendem as classes I, II e IV (DELCUVE, KHAN e DAVIE, 2012). Em mamíferos foram encontradas 18 deacetilases de histona, sendo que *Toxoplasma* possui apenas sete (HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, SIR 1 e SIR 2).

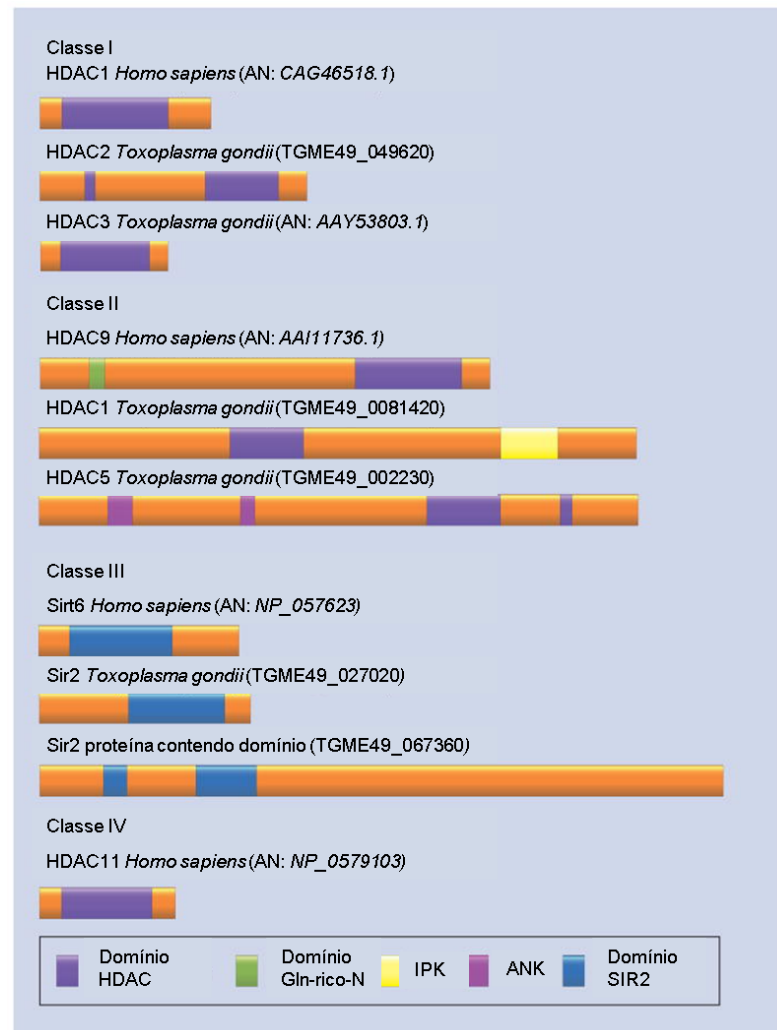


FIGURA 2 – Classificação das HDACs.

Na figura são mostradas as HDACs de *Toxoplasma* e suas homólogas em humanos. São mostrados os números de acesso (AN – *accession number*) ou identificação do gene. Os Gln-rico-N (N-terminal rico em glicina), Inositol fosfato quinase (IPK), ANK, histona deacetilase e *silent information regulator-2* (SIR2) são evidenciados.

Fonte: adaptado de VANAGAS, et al, 2012.

As HDACs classe I são homólogas à Rpd-3 de levedura, são predominantemente nucleares e em mamíferos são representadas pelas HDACs 1, 2, 3 e 8 (FISCHER, et al, 2010) e em *Toxoplasma gondii* pelas HDACs 2 e 3. A classe II de HDACs é caracterizada por serem proteínas maiores, pois podem conter outros domínios regulatórios e como possuem sinal de exportação nuclear podem transitar entre o núcleo e o citoplasma, esta classe compreende as HDACs 4- 7, 9 e 10 em mamíferos e no parasita pela HDAC-1 e HDAC-5. (VANAGAS, et al, 2012).

A classe III compreende as sirtuínas, denominadas de SIR2 (de *silent information regulator-2*), que são deacetilases que necessitam de NAD⁺ como cofator (DELCUVE, KHAN e DAVIE, 2012). De acordo com dados do banco de dados, *Toxoplasma* possui duas proteínas que possuem o domínio característico

das SIR2. A classe IV é representada apenas pela HDAC-11 de mamíferos e possivelmente HDAC-4 de *T. gondii*. (VANAGAS, et al, 2012).

Nos últimos anos, inibidores de histonas deacetilases tem sido utilizados para o tratamento de desordens mentais em humanos, como doença de Huntington, Alzheimer, esquizofrenia e depressão (FISCHER, et al, 2010). Isso tem ocorrido, pois estudos realizados em animais sugerem que os processos de aprendizagem e memória requerem aumento de acetilação e com o passar da idade há diminuição da acetilação em resíduos de lisinas também envolvidos nesses processos. Além disso, na presença de diversas desordens mentais, foi verificado aumento considerável nos níveis de acetilação. Inibidores de HDACs também estão sendo utilizados para o tratamento do câncer, pois induzem a morte de células cancerosas, e atualmente já foi liberada para uso no tratamento do linfoma cutâneo de células T, pelo *US Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América para controle de medicamentos (MOTTAMAL, et al, 2015). Além deste, diversos outros inibidores estão em fase de testes clínicos, como recentemente revisado por West e Johnstone (2014).

A utilização de inibidores de HDACs também tem se mostrado promissora em parasitas do Filo Apicomplexa. A apicidina, um composto isolado de fungos, se mostrou eficiente contra *Plasmodium*, inibindo a proliferação do parasita (DARKIN-RATTRAY, et al, 1996), enquanto que o composto FR235222, inibidor da HDAC-3, inibiu significativamente o crescimento de *Toxoplasma gondii*, porém aumentou a taxa de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos *in vitro* (BOUGDOUR, et al, 2009). Como consequência, as histonas deacetilases tem se tornado alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas, e tem despertado interesse de diversos grupos, incluindo o nosso. Acreditamos que o estudo dessas enzimas possa revelar informações fundamentais sobre processos essenciais para a sobrevivência do parasita, como a virulência e diferenciação, o que futuramente poderá contribuir na busca a tratamentos mais eficientes contra a toxoplasmose.

1.3 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que cerca de 25 a 30% da população mundial estejam infectados por *T. gondii*, sendo que essa porcentagem depende da situação econômica e social, além dos hábitos alimentares (ROBERT-GANGNEUX e DARDE, 2012; MONTOYA e LISENFELD,

2004). No Brasil, esse índice pode chegar a 80% dependendo da região. Esse alto índice se dá principalmente pela facilidade de contágio e profilaxia ineficientes. Por conta disso o National Institute of Allergies and Infectious Diseases (NIAID-NIH) dos Estados Unidos, elevou *T. gondii* a agente de categoria B no índice de prioridades, a fim de controlar a doença através de profilaxia e diagnósticos mais eficientes.

Embora assintomática na maioria dos indivíduos, a doença pode ser bastante grave em mulheres grávidas e pacientes imunocomprometidos, sendo considerado um dos maiores causadores de infecções nesses pacientes, como aqueles HIV-positivos. Tratamentos são eficientes quando a doença é diagnosticada ainda na fase aguda, porém uma vez que atinge a fase crônica, medicamentos são ineficazes, fazendo do estudo de *T. gondii* altamente relevante.

Componentes da maquinaria epigenética vêm se mostrando possíveis alvos quimioterápicos para diversas doenças e como consequência, tem despertado o interesse de diversos grupos, incluindo parasitologistas. O interesse foi intensificado com estudo da apicidina, uma droga anti-parasitas, que inibe a ação de histonas deacetilases em *Plasmodium*, sugerindo que seu mecanismo de ação contra parasitas, seja devido a uma alteração na transcrição gênica que envolve a acetilação de histonas (DARKIN-RATTRAY, et al, 1996). O mesmo foi observado em *Toxoplasma*, onde o inibidor de deacetilase FR235222, mostrou grande potencial na inibição do crescimento em parasitas do filo Apicomplexa e elevou o nível de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos (BOUGDOUR, et al, 2009), mostrando que fatores epigenéticos são fundamentais para o controle da expressão gênica nestes organismos e, também podem agir como potenciais alvos quimioterápicos. Além disso, deacetilases de histonas têm sido identificadas como reguladores da expressão de genes essenciais para virulência dos parasitas, como os genes var de *Plasmodium* (TONKIN, 2009) e as VSGs de *Trypanosoma brucei* (WANG, KAWAHARA e HORN 2010).

Nosso modelo de estudo é o *Toxoplasma*, uma vez que dispõe de diversas ferramentas de genética reversa consideradas inviáveis em outros parasitas (como *Plasmodium* ou *Trypanosoma*) (SOLDATI, 2007; MEISSNER, 2007). Além disso, é de fácil manipulação em laboratório e a etapa assexuada do ciclo de vida (taquizoíta-bradizoíta), pode ser obtida *in vitro*. Nosso grupo tem interesse em entender como ocorre a regulação epigenética nesses parasitas, particularmente as

deacetilases de histona e seu envolvimento em processos biológicos essenciais ao parasita.

A importância dessas enzimas na inibição e silenciamento gênico é bastante conhecido e vem sendo estudado a décadas em diversos organismos. No entanto HDACs desempenham funções em outros diferentes processos essenciais para o desenvolvimento do parasita, como a replicação do DNA e o ciclo celular. Esse foi um dos motivos que nos levou a escolha da histona deacetilase 2 (HDAC-2) de *Toxoplasma gondii* como foco de estudo. HDAC-2 é a única deacetilase de *Toxoplasma* cuja expressão está aumentada durante a fase S do ciclo celular, o que sugere uma função relacionada à replicação do DNA. Associado a isso, ela possui um domínio HDAC peculiar, distinto a outros eucariotos, com duas grandes inserções nucleotídicas cuja função ainda é desconhecida. Além disso, dados recém-publicados por Yeoh et al (2015) indicam que a HDAC-2 de *Toxoplasma gondii* possui um possível splicing alternativo com a retenção do primeiro e terceiro íntrons e que poderia dar origem a duas proteínas distintas.

Estudos utilizando inibidores de HDACs resultaram em morte de células cancerígenas através da inibição do ciclo celular e ativação do reparo de DNA desenfreado durante a fase S (LEE, et al, 2010). Isso ocorreu provavelmente devido a hiperacetilação das histonas durante a progressão da forquilha de replicação, o que desencadeou em recrutamento da maquinaria de reparo de DNA. Esses dados ressaltam a importância de se estudar o papel dessas enzimas em processos além da transcrição gênica, o que pode levar a descoberta de novos mecanismos mediados por deacetilases que até o momento são pouco compreendidos em protozoários parasitas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Caracterizar a Histona Deacetilase-2 de *Toxoplasma gondii*, sua localização celular, bem como seu papel em processos dependentes de DNA, como replicação e regulação da expressão gênica do parasita.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Clonar o gene *tghdac2* em vetor para etiquetamento do gene endógeno do parasita;
- Determinar a localização celular da HDAC-2 através de microscopia de imunofluorescência por meio de anticorpos específicos que reconhecem a etiqueta adicionada a proteína.
- Produzir mutantes *hdac-2* KO
- Caracterizar parasitas *hdac-2* KO por ensaios de imunofluorescência para histonas conservadas e plaque assay.
- Verificar a presença de splicing alternativo no mRNA de *hdac-2*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIA

Para análise em bancos de dados, utilizamos a proteína TGME49_249620 anotada no banco de dados de *Toxoplasma* como HDAC-2, (toxodb.org¹), como molde para as buscas e análises. Primeiramente realizamos uma busca utilizando o algoritmo BLASTp² (NCBI³), de modo a confirmar sua anotação e domínio. O algoritmo Blastp utiliza a sequência proteica como isca para busca em banco de dados de proteínas não redundantes de diversos organismos, gerando resultados baseados em homologia de sequência e presença de domínios conservados (CDD-*Conserved Domain Database*).

O banco de dados de *Toxoplasma*, por outro lado, foi utilizado para obter maiores detalhes sobre a proteína. Neste banco de dados estão depositadas informações como localização cromossômica, peso molecular da proteína, expressão durante o ciclo de vida, ciclo celular, transcriptoma entre outros resultados de experimentos em larga escala, realizado por outros grupos e depositados no banco de dados.

3.1.1 Modelagem *in silico*

Com o intuito de conhecer a estrutura da proteína e maiores detalhes sobre as inserções no domínio foi feita uma modelagem *in silico* utilizando o método de modelagem por homologia. Este método é baseado na busca de proteínas com mais de 50% de similaridade com a proteína de interesse, de acordo com a sequência de aminoácidos, que tenha a estrutura resolvida.

Para tanto foi feito um alinhamento com o programa *Protein Blast* utilizando o banco de dados de estrutura PDB (*protein data bank*). A proteína com mais porcentagem de homologia foi utilizada como molde para a construção da estrutura da HDAC-2. O alinhamento entre a proteína de interesse e a com estrutura primária

¹ GAJRIA, B. et al. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic Acids Res.**, November 14, 2007; (2007) gkm981v1.

²ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990) "**Basic local alignment search tool.**" *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

³ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

similar foi feito com o servidor HHPRED⁴, que possui o software Modeller⁵ em sua interface e com isso é possível encontrar o modelo da estrutura 3D da proteína (SÖDING, BIEGERT e LUPAS, 2005). Com o alinhamento feito a estrutura 3D pode ser visualizada com o auxílio do software PyMOL⁶. A pesquisadora do Instituto Carlos Chagas Dr^a Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza auxiliou na realização de todas as etapas.

3.2 CULTURA DE *Toxoplasma gondii*

Nesse trabalho utilizamos formas taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH, cepa do tipo I, caracterizada por ser mais virulenta e de baixa diferenciação, quando comparada aos outros dois tipos de cepas isoladas do hemisfério norte. Utilizamos a cepa RH com dois genes deletados, denominada RH Δ hxgp Δ ku80. O primeiro gene codifica para a proteína HXGPRT (*hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase*), que participa da via de síntese de purinas e é utilizado como marcador de seleção para construção de nocautes e vetores para etiquetamento de proteínas. O segundo nocaute é o Ku80, que é um gene envolvido com a via de reparo por recombinação não homóloga (NHEJ-*Nonhomologous end joining*) (HUYNH e CARRUTHERS, 2009; FOX, et al, 2009; UPADHYA, et al, 2011).

Como se tratam de parasitas intracelular-obrigatórios, eles foram cultivados por infecção de fibroblastos provenientes de prepúcio humano (HFF-*human foreskin fibroblastos*), numa razão de 3 a 5 taquizoítos por célula. Estas células possuem ampla área para a replicação do parasita e são resistentes às drogas de seleção, por isso ideal para este propósito. O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 µg de Gentamicina e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

3.3 ETIQUETAMENTO DO GENE *hdac-2*

Para o etiquetamento da proteína endógena, foi necessário à amplificação de uma região de aproximadamente 1000 pares de base da porção final do gene,

⁴ SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. (2005) **The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction.** *Nucleic Acids Research* 33, W244--W248 (Web Server issue). doi:10.1093/nar/gki40.

⁵ WEBB, B.; SALI, A. **Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller.** *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32, 2014.

⁶ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.

excluindo o códon de terminação. Os *primers* (Tabela 1) foram desenhados baseados em resultados de sequenciamento presentes em banco de dados (toxodb.org). Nestes *primers* foram adicionadas as sequências LIC (de *Ligation Independent Cloning*), que são complementares às sequências LIC presentes no vetor de etiquetamento (pLIC.HA.HXGPRT) (HUYNH e CARRUTHERS, 2009).

TABELA 1- Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *hdac-2*

Nome	Sequência
HDAC-2 Foward	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGAAGTAAAGAGTCTGCAAAGAGGC
HDAC-2 Reverse	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCCCACGATTCTGTTCGA

Fonte: a autora

Esta região foi então amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reaction*), utilizando 100 ng de DNA genômico extraído de *T. gondii* cepa RH Δ HX Δ Ku80 através da lise com tampão TELT (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 62,5 mM EDTA, pH 9,0; 2,5 M LiCl; 4% (v/v) Triton X-100), seguido de extração com Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK, FRISTSCH e MANIATIS, 1989). Ao DNA foi adicionado tampão apropriado para a enzima diluído dez vezes, 0,2 mM de dNTP, 1,5mM de MgSO₄, 10 pmol de cada *primer* e 1 unidade da enzima de alta fidelidade *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), para uma reação final de 50 μ L. As condições de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão foram feitas conforme descrito na tabela 2.

TABELA 2- Representação das etapas de PCR para a amplificação do gene *hdac-2*

Temperatura	Tempo	
94 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	} 30x
57 °C	30 segundos	
68 °C	1 minuto e 30 segundos	
68 °C	10 minutos	
16 °C	∞	

Fonte: a autora

3.3.1 Eletroforese em gel de agarose

O sucesso da amplificação foi conferido por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (1g de agarose para 100 mL de TBE). Foram utilizados 5 μ L da reação de PCR em tampão de amostra para DNA (25% de Ficoll , 0,25% de azul de

bromofenol e 0,25% de xileno cianol). O gel de agarose com a amostra e o marcador de massa molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) foi submetido a um campo elétrico de 100V por 40 minutos, banhados em tampão TBE (Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8.0). Após a eletroforese o gel foi corado com de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado em um transluminador com luz ultravioleta. O produto de PCR, foi purificado com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen), seguindo instruções do fabricante.

3.4 CLONAGEM EM VETOR pLIC.HA.HXGPRT

Nesse trabalho, utilizamos vetor para etiquetamento do tipo LIC (*Ligation Independent Cloning*), que não necessita de digestão com enzimas de restrição, tampouco ligação com DNA ligase (HUYNH e CARRUTHERS, 2009). Em contrapartida, este vetor possui as sequências LIC, sequências de aproximadamente 20 nucleotídeos, também adicionadas aos *primers* para a amplificação do gene de interesse, de modo a obter extremidades complementares entre vetor e inserto. O vetor contém ainda os genes para seleção na bactéria e no parasita (Ampicilina e HXGPRT, respectivamente) e a sequência da etiqueta de HA (pequeno peptídeo presente na proteína hemaglutinina do vírus Influenza), repetida três vezes (peptídeo YPYDVPDYA) em tandem. O mapa do vetor pode ser visto na Figura 3.

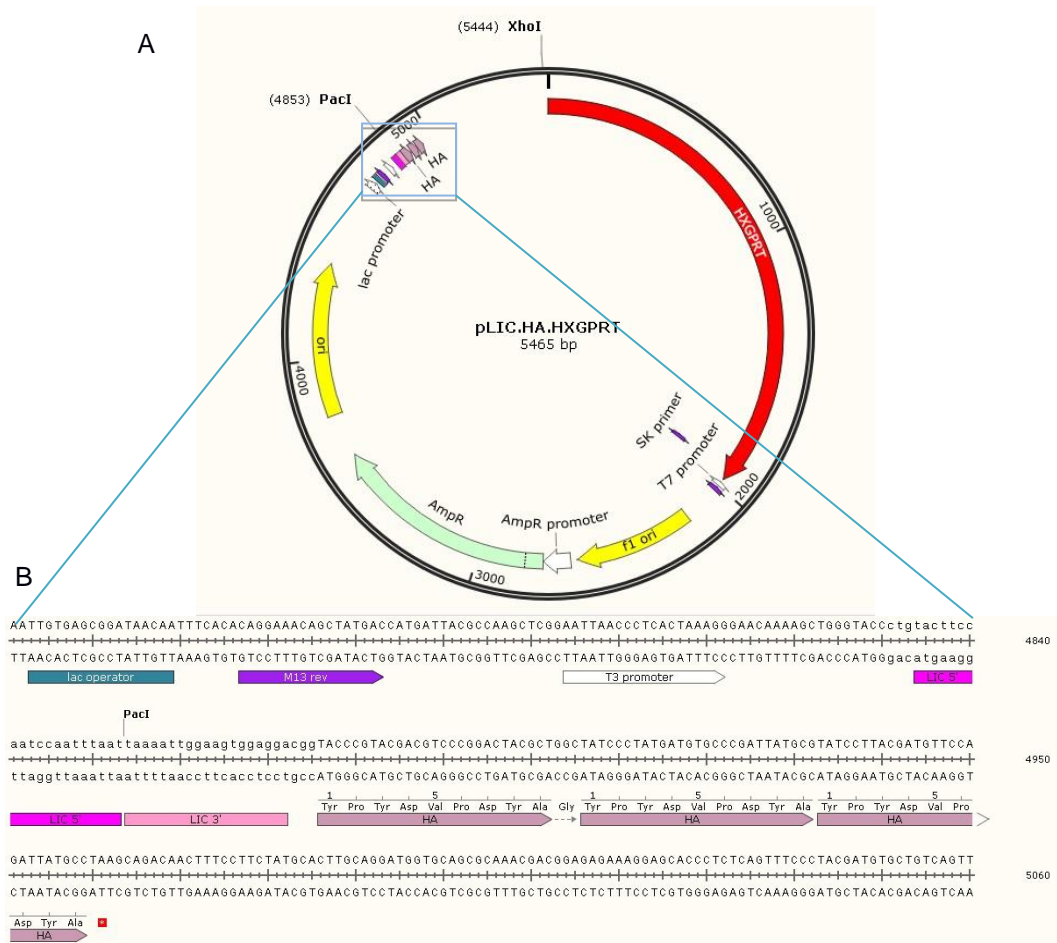


FIGURA 3 - Vetor pLIC.HA.HXGPRT.

(A) mostra o mapa do vetor pLIC.HA.HXGPRT evidenciando os dois genes de resistência, AmpR (ampicilina) em verde e HXGPRT (*hipoxantina xantina guanina fosforibosiltransferase*) em vermelho e as origens de replicação (ori) em amarelo. (B) Sequências LIC (*Ligation Independent Cloning*) 5' e 3' flanqueadas pelo sítio de *PacI* e as três sequências em tandem do peptídeo HA.

Fonte: a autora, criado com SnapGene software (de GSL Biotech; Disponível em: snapgene.com)

Essa metodologia de clonagem, utiliza a dupla função da enzima T4 DNA polimerase, que além de atuar como polimerase, possui atividade 3'→ 5' exonuclease, que cliva e remove os nucleotídeos da sequência LIC, presentes tanto no vetor, quanto no inserto, gerando extremidades complementares. Isto requer extremidades simples-fita, que no caso do vetor ocorre após o vetor ser linearizado com a enzima *PacI*. O anelamento entre vetor e inserto ocorrerá então por complementariedade de sequências, através do sistema de reparo da própria bactéria utilizada na transformação, o que resulta em alta eficiência de clonagem, de acordo com dados na literatura. Conforme essa metodologia, tratamos vetor e inserto com a enzima T4 DNA polymerase (Novagen LIC qualified).

O tratamento do inserto consistiu em 2 µl de tampão para T4 DNA Polimerase 5X, 1 µl de DTT (100mM), 0,8 µl de **dCTP** (100mM), 0,5 µl da enzima T4 DNA

polimerase (Novagen LIC qualified), 10,7 µl de água e 5 µl da amostra (a 0,2 pmol/µl). A reação foi incubada a 22 °C durante 30 minutos e em seguida a 75 °C por 20 minutos. O tratamento do vetor seguiu o mesmo princípio. Após a linearização do vetor com a enzima *PacI* (para gerar extremidades simples-fita), o mesmo foi tratado com T4 DNA Polimerase na seguinte reação: 12 µl do tampão 5X, 3 µl DTT (100mM), 2.4 µl **dGTP** (100mM), 1.5 µl T4 DNA polimerase (Novagen LIC qualified), 35.1 µl dH₂O e 6 µl do vetor linearizado (a 200-300 ηg/ul). Da mesma forma que o inserto, esta reação foi incubada a 22°C por 30 minutos, e depois a 75°C por 20 minutos. O anelamento entre vetor e inserto ocorreu por complementariedade de sequências ao misturá-los numa proporção de 1:6, por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi parada com 2 µL de EDTA 25mM. A ligação entre vetor e inserto ocorreu através da via de reparo da própria bactéria. A transformação foi feita em bactérias *E. coli*, cepa DH5α, pelo método de choque térmico (detalhado abaixo).

3.4.1 Transformação bacteriana

A transformação foi feita em bactérias *E. coli*, cepa DH5α cálcio-competentes, adicionando-se a clonagem do item anterior a 50 µL de bactérias. As bactérias adquiriram o plasmídeo por choque térmico ao serem deixadas em gelo por 30 minutos, em seguida a 42 °C por 2 minutos e novamente em gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB ao tubo e colocado em estufa à 37°C durante 1 hora, sob agitação, para recuperação das bactérias recém transformadas. Decorrido este tempo, as bactérias foram semeadas em placa contendo ampicilina (100 µg/ML) como antibiótico de resistência.

3.5 SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS

As colônias crescidas em placa após a transformação foram submetidas a PCR de colônia, utilizando os *primers* específicos para detecção do inserto. Foi retirada uma pequena quantidade das colônias escolhidas, com o auxílio de um palito, que foram colocadas diretamente em um tubo de 0,2 mL, onde foram colocados os demais reagentes (150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1 U da enzima DNA Polimerase). Nesse caso, a Taq DNA polimerase utilizada foi a recombinante produzida no Instituto de Biologia Molecular do Paraná,

uma vez que não era necessário alta fidelidade nesse caso. Vale mencionar, que ao mesmo tempo em que a colônia foi aplicada no tudo, ela foi semeada em placa de LB/Ampicilina, de modo a manter uma “placa-mãe” como estoque das colônias.

O próprio ciclo de temperatura da PCR é suficiente para romper a membrana das bactérias e expor o molde para a reação. Esta reação de PCR seguiu o mesmo protocolo daquela feita para amplificação do gene (Tabela 2), exceto a temperatura de extensão, que no caso da enzima utilizada aqui, foi de 72°C. Após a reação de PCR os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente.

As colônias positivas foram expandidas em meio líquido LB com adição de ampicilina a 37°C, durante a noite. Após o crescimento os plasmídeos foram purificados por meio de kit QIAprep® Miniprep (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

3.5.1 Confirmação dos clones: Digestão Enzimática e sequenciamento:

Três clones foram selecionados para confirmação enzimática. Utilizamos as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* em uma dupla digestão para confirmar se os clones selecionados haviam, de fato, recebido o inserto. A enzima *NheI* corta especificamente dentro do inserto, enquanto que *XhoI* corta uma vez no vetor e duas vezes no inserto. A reação foi feita utilizando 500 ng do plasmídeo, tampão CutSmart 1x e 2,5 unidades das enzimas. A reação foi realizada por 4 horas a 37 °C.

Para transfectar o plasmídeo com o inserto nas formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* é necessário que o plasmídeo esteja linear para que ocorra a recombinação homóloga. Para tanto a enzima escolhida foi a *NheI*, pois possui um sítio único no centro do inserto, aumentando a eficiência de recombinação entre dez e mil vezes, segundo Huynh e Carruthers (2009). A reação foi feita utilizando cerca de 5 µg de plasmídeo purificado, 10 unidades de enzima e tampão apropriado. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C.

Após o tempo de incubação, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, como previamente descrito, para verificar a completa digestão do plasmídeo.

3.5.2 Precipitação de DNA

Para a transfecção, as amostras linearizadas foram precipitadas adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M pH 5,2 ou cloreto de sódio 200mM. A precipitação ocorreu durante a noite a -20°C ou por 20 minutos, envolvido por gelo seco.

3.6 TRANSFECÇÃO EM *T. gondii*

Formas taquizoítas de *T. gondii* recém lisadas da célula hospedeira (10^7 por transfecção) foram centrifugadas por 10 min a 2000 rpm, lavadas uma vez com tampão CYTOMIX pH 7,6 (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 25mM HEPES 7,6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl_2) e ressuspensas em 0,7 ml de CYTOMIX por transfecção.

Aos 0,7 ml desta suspensão foram adicionados cerca de 5 μg de plasmídeo previamente linearizado com *NheI* linearizado em uma cuveta de eletroporação de 2 mm, mantida em gelo, e a mistura foi submetida a dois pulsos com 1,7 kV em eletroporador (Bio-Rad-X-cell electroporator). Após o pulso, os parasitas foram colocados em placas de 6 poços contendo fibroblastos confluentes. Vinte e quatro horas depois foram adicionadas ao meio 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido micofenólico e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de xantina para a seleção. A inserção no genoma deveria ocorrer por recombinação homóloga em cepa RH depletada de *hxgprt* e *ku80* (FIGURA 4). A população será confirmada por imunofluorescência e Western blot.

Todos os experimentos envolvendo manuseio dos parasitas vivos foram feitos pela Dra. Sheila Cristina Nardelli e pela mestranda Mariana Fragoso por questões de segurança.

3.7 ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

Para ensaios de imunofluorescência, tanto para localização celular da HDAC-2 quanto para caracterização de parasitas nocaute (KO) para a mesma proteína, utilizamos formas taquizoítas de *T. gondii* para infectar fibroblastos confluentes previamente crescidos em lamínulas. Após cerca de 24hs, foi retirado o meio de cultura e adicionado paraformaldeído 4% para fixar as células. Com as células já fixadas, elas foram permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,25% por 10 minutos e lavadas com PBS. O bloqueio foi feito com PBS/BSA 1% por uma hora. Após o

bloqueio adicionamos o anticorpo primário anti-HA (Invitrogen), na diluição 1:200 para localização celular da proteína. Além desse, utilizamos anti-H3 acetilada (1:400-Abcam) ou anti-H4 acetilada (1:400-Abcam) para caracterização dos parasitas nocaute e incubado também em PBS/BSA 1% por uma hora. Passado esse período, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS. As lâminas foram incubadas com anti-IgG de coelho ou camundongo, conjugado a Alexa-fluor na diluição 1:600 (488 e 594) por 40 minutos em PBS/BSA 1%. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com 10 μ M de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As lâminas foram montadas com N-propil galacto, para preservar a fluorescência e analisadas com microscópio de fluorescência Nikon eclipse 80i.

3.8 WESTERN BLOT

Para preparação de amostras proteicas, utilizamos formas taquizoítas lisados completamente e recentemente das células hospedeiras. Os parasitas foram sedimentados a 2000 rpm por 10 minutos, seguido de uma lavagem em PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4). Os parasitas foram ressuspensos em tampão de amostra para proteínas (40 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1 % de SDS, 2,5 % de β -mercaptoetanol, 6 % de glicerol e 0,005 % de azul de bromofenol). Este tubo foi submetido a aquecimento a 95°C para desnaturação das proteínas, seguido de agitação vigorosa para quebra de DNA.

As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) em tampão de eletroforese apropriado, contendo 25 mM de TRIS-base, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS. Para cada amostra foi calculado a aplicação de aproximadamente 10⁷ parasitas por poço. Após a corrida eletroforética, as amostras do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por transferência em cuba semi-seca (Semi-Dry-BIORAD), por 1 hora a 20 V em tampão com 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina e 20% de metanol. O sucesso da transferência foi confirmado por coloração reversível com 0,5% de Ponceau S e 1% de ácido acético. Esta membrana foi lavada em água corrente deionizada e bloqueada em PBS/leite desnatado 5%, sob agitação, por uma hora. Após o bloqueio o anticorpo anti-HA foi incubado também em leite, por uma hora (1:500). Passado o tempo de incubação do anticorpo primário, a membrana foi lavada com PBS/Tween 0,05% e incubado com o anticorpo secundário, anti-camundongo, por igual período, sob agitação e protegido

da luz. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-camundongo conjugado à fluoróforo IR-Dye Alexa 488 ou 594 (Li-Cor) diluído 1:15000. O método de revelação utilizado foi o de fluorescência (Odyssey).

3.9 NOCAUTE GÊNICO DE *hdac-2*

Outra abordagem utilizada para a caracterização de HDAC-2 foi a retirada do gene do genoma do parasita. Para tanto utilizamos o método de PCR de fusão, no qual foram amplificadas as regiões 3' e 5' não traduzidas (UTR-Untranslated region) a 1000 pb do gene *hdac-2*, que foi fusionada ao gene *hxgprt*, que será utilizado como marcador de seleção. Para que a fusão ocorra foi adicionado aos *primers*, utilizados para amplificar estas regiões, uma pequena região que é complementar ao gene *hxgprt*, que irá substituir *hdac-2* no genoma. Como mencionado anteriormente, este gene foi deletado na cepa RH e pode ser utilizado como marcador de seleção, pela adição de ácido micofenólico e xantina (PFEFFERKORN e BOROTZ, 1994). *Toxoplasma* possui duas vias para síntese de purinas. Uma delas envolve a enzima IMP dehydrogenase (IMPDH), que converte IMP em XMP. A outra envolve a enzima HXGPRT. O parasita utilizado nesse trabalho teve o gene que codifica para HXGPRT deletado, o que deixa o parasita somente com a IMPDH como fonte de purinas. Quando adicionamos ácido micofenólico, bloqueamos especificamente esta via, levando o parasita à morte, a menos que no mesmo tenha sido inserido o vetor pLIC, que contém o gene HXGPRT como marcador de seleção. A Xantina nesse caso é também adicionada e funciona como substrato para a HXGPRT sintetizar purinas.

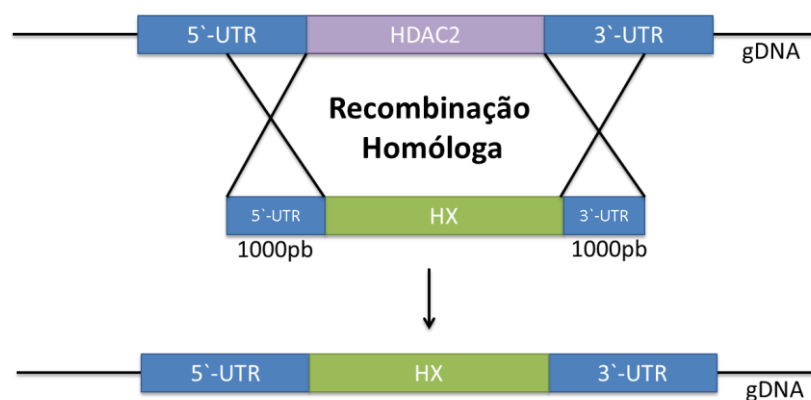


FIGURA 4 - Representação da estratégia para o nocaute da *hdac-2* no genoma do parasita. Cerca de 1000 pb das regiões 5' e 3' do gene *hdac-2* foram amplificadas e fusionadas ao gene da HXGPRT (em verde). Esse fragmento foi transfectado em formas taquizoítas de *T. gondii*. Por meio de recombinação homóloga, o gene *hdac-2*, é substituído pelo gene de seleção *hxgprt*.

Fonte: a autora

A PCR de fusão foi feita em três etapas. Primeiramente amplificamos as regiões UTRs (Tabela 3) que foram, então, purificadas com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) seguindo instruções do fabricante.

TABELA 3- Sequência dos *primers* para amplificação das UTRs

Nome	Sequência
5' 2000 Foward	CTTCTTGAACCAAAGTCCGACG
5' 1000 Foward	AGCCTCGAGGGGGAGGTC
5' 2000 Reverse	ccgcgggcgggttgaatcaaggtttcgtgctgGGCAGCCGACCCTGACAAC
3' 2000 Foward	gttctggcaggctacagtacaccgcggtggAGAACGGAAGGAGACGAAGAAAAAC
3' 1000 Reverse	CAGACAGAGGCAAAGGTAGGTAAATG
3' 2000 Reverse	CGAAAGATACCCTTTGCTACACACC

Fonte: a autora.

Como molde para amplificação de *hxgpri*, utilizamos o vetor pLIC-HA-HXGPRT, que juntamente as UTRs purificadas, foram submetidas á uma reação de PCR, porém sem a adição de *primers* (tabela 3). Essa primeira reação aumenta a eficiência da PCR de fusão, uma vez que permite a correto posicionamento e anelamento das sequências, na região que sobrepõe o gene *hxgpri*. Dois microlitros desta primeira reação são usados como molde para uma segunda PCR, desta vez com os *primers* específicos. Em ambas PCRs a enzima utilizada foi a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs).

TABELA 4- Representação das etapas da primeira PCR⁷.

Temperatura	Tempo	
98 °C	30segundos	
98 °C	10 segundos	} 20x
50 °C	30 segundos	
72 °C	3 minutos	
72 °C	8 minutos	
16 °C	∞	

Fonte: a autora

Cerca de 5 µg foram utilizados para transfectar formas taquizoítas, conforme indicado no item 3.6. Após a transfecção e seleção dos transfectantes, o DNA genômico dos parasitas foi extraído e confirmado por PCR. Foi testado se o cassette havia integrado corretamente, com *primers* (Tabela 5) que pareiam dentro do gene de seleção (denominado HX detection), amplificando aproximadamente 800pb, e em uma porção do mesmo (denominado HX integration) e na 5' UTR, que amplifica

⁷ Nesta PCR não são adicionados os *primers*, apenas os primeiros amplificados, o vetor com o gene de seleção e os demais reagentes para PCR.

aproximadamente 1200pb e ainda utilizando outro *primer* que abrange uma região maior da 5' UTR, cujo produto é uma banda de aproximadamente 2200 pb. Adicionalmente, utilizamos os *primers* que amplificam os 1000 pb do gene *hdac-2* (item 3.3), para confirmar que o gene foi nocauteado.

TABELA 5 - Sequência de *primers* para confirmação do nocaute

Nome	Sequência
HX detection Foward	CCAAACCCATTGAAGACTAC
HX detection Reverse	GAAAAGAGAGGAAAACGAGAGA
HX integration Reverse	CCCGAGAAAAGAAACGAACAGA

Fonte: a autora

3.10 PLAQUE ASSAY

O plaque assay é geralmente utilizado para avaliar a replicação dos parasitas pela análise da quantidade de placas de lise formadas pela ruptura das células hospedeiras. De modo geral, o tamanho das placas estão associadas à replicação/evasão, enquanto que o número de placas normalmente está associado a virulência.

Placas de seis poços com células HFF confluentes foram infectadas com 500, 1000 ou 2000 taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH Δ HX Δ Ku80 (cepa controle) ou taquizoítas nocautes para *hdac-2*. Após seis dias de incubação o meio de cultura foi retirado, lavado com PBS e fixado 5 minutos com metanol 100% gelado e deixado secar a temperatura ambiente. Seguiu-se coradas com Giemsa (Invitrogen), diluído em PBS 1X (3 gotas de giemsa para cada mL de PBS) por 20 minutos. O corante foi retirado e as placas foram lavadas em água, apenas para tirar o excesso de corante. As placas secaram em temperatura ambiente.

3.11 CONFIRMAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO DE *hdac-2*

Segundo Yeoh et al (2015) a HDAC-2 de *Toxoplasma* é um potencial produto de splicing alternativo. Em comunicação pessoal com o autor, o mesmo nos informou que encontrou dois possíveis sítios de splicing alternativo. A retenção do primeiro íntron (cerca de 860 pb) foi encontrada em suas análises com um bom grau de confiança já a retenção entre o terceiro e quarto éxons (cerca de 490 pb) tinha baixa confiabilidade, segundo ele. Isto posto, *primers* foram planejados para ambas as regiões (TABELA 6) para amplificação utilizando cDNA sintetizado a partir do RNA-mensageiro de HDAC-2.

TABELA 6 - Sequência de *primers* para os íntrons

Nome	Sequência
HDAC-2 intron 1 Foward	ATGGGGAGGAGGAAGAGC
HDAC-2 intron 1 Reverse	CACGATGTCCATGCTTTGAA
HDAC-2 intron 3 Foward	AAACCGCTGAAGCCCG
HDAC-2 intron 3 Reverse	CTGGGAGAAGTGTAGAACGCTTC

Fonte: a autora

3.11.1 Extração de RNA e obtenção de cDNA

Para extrair o RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrição do fabricante. Primeiramente, aproximadamente 5×10^8 parasitas foram centrifugados a uma velocidade de 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao precipitado de parasitas uma mistura com 350 μ L de tampão RLT, acrescido de 3,5 μ L de β -mercaptoetanol e seguiram-se as instruções do fabricante. O tratamento com DNase foi feito diretamente na coluna de maneira apropriada.

Do RNA extraído foi retirado 3 μ L (1 μ g) e diluído em 5,6 μ L de água livre de RNase e acrescentado 1 μ L de oligodT (10mM), para amplificação somente dos RNAs mensageiros. Esta mistura foi incubada a 70 °C por 5 minutos e em gelo por mais 5 minutos. Após este tempo foi acrescido 4 μ L de tampão (5x), 2,4 μ L de cloreto de magnésio (25mM), 1 μ L de dNTP (10mM), 1 μ L de enzima RNase Out (40u/ μ L) e 1 μ L da enzima Improm II RT (Promega). A reação para obtenção de cDNA foi feita em termociclador, seguindo um ciclo de 25 °C por 5 minutos, 42 °C 60 minutos (2 vezes) e 70 °C 15 minutos. 1 μ L deste cDNA foi usado como molde para uma PCR convencional utilizando os *primers* para o íntron 1 e 3, conforme item 3.10.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 HDAC-2 NO TOXODB: O BANCO DE DADOS DE TOXOPLASMA

Deacetilases de histona são bem conhecidas por remover o grupamento acetil dos resíduos de lisina, aumentando a interação das histonas com o DNA, resultando em cromatina mais compactada e silenciada transcricionalmente. Sendo assim, a relação entre a transcrição gênica e acetilação/ deacetilação é bem conhecido e possivelmente a mais estudada, dentre as funções das HDACs. Conforme o banco de dados ToxoDB (toxodb.org), *Toxoplasma gondii* possui sete HDACs, divididas em 4 classes distintas. HDAC-2, juntamente com HDAC-3 estão na classe I das HDACs, e são normalmente nucleares. Dados referentes à expressão dessas enzimas ao longo do ciclo celular revelam que HDAC-3 apresenta um aumento pequeno apenas no início da fase S, além de aumento na fase G1. Por outro lado HDAC-2 mostra aumento significativo logo no início da fase S (FIGURA 5), onde atinge seu nível máximo de expressão e depois diminui, atingindo o ponto menos expresso no término dessa fase. Esses dados de análise de expressão por microarranjo de RNA ao longo do ciclo de vida foram feitas pelo grupo do Dr. Michael White (University of South Florida, USA) e depositadas no banco de dados de *Toxoplasma*.

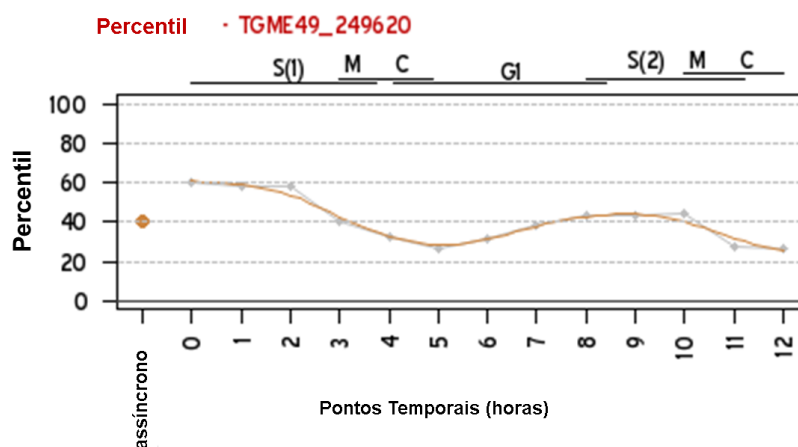


FIGURA 5 - Variação de HDAC-2 durante o ciclo celular.
Fonte: ToxoDB

Esse dado foi o que nos motivou a seguir com a caracterização da HDAC-2, uma vez que é potencialmente a única que desempenha papel durante a síntese de DNA, ressaltando a importância de estudar o papel dessas enzimas em processos além da transcrição. A síntese de DNA ocorre acoplada a síntese de histonas, que são depositadas na fita recém-sintetizada. Além disso, as demais histonas, já

associadas à fita molde de DNA, devem ser retiradas para serem recicladas à medida que a replicação acontece. Todos esses processos juntamente com a própria replicação, são estritamente controlados e é nosso interesse ajudar a desvendar o papel de HDAC-2 nesses processos.

Dados na literatura mostram a importância das HDACs de classe I (HDAC-1 e HDAC-2 de humanos) durante a replicação do DNA, ressaltando que a deacetilação específica em H4K16ac ajuda a manter a integridade da cromatina após o processo de replicação. Esta acetilação impede que a cromatina se reestabeleça, deixando o DNA recém-replicado sensível à ação de nucleases. (BHASKARA, et al, 2013). Além disso, estas HDACs são recrutadas em caso de dano ao material genético nesta fase, um evento recorrente durante a replicação. Neste contexto nos intriga a HDAC-2 de *T. gondii* estar mais expressa nessa fase, o que nos motiva a desvendar seu papel durante a replicação de DNA nesse parasita. Vale ressaltar que o ciclo de *Toxoplasma* é mais simples que demais eucariotos, sendo composto de fase G1, S (Síntese) que sobrepõe à fase M (Mitose) e C (citocinese) e sem uma distinta fase G2 (RADKE, et al, 2001).

Adicionalmente, ao verificar os dados referentes à HDAC-2 no ToxoDB.org encontramos que a *hdac-2* está localizada no cromossomo XII de *T. gondii* e que o gene inteiro possui 8657 pb de comprimento, abrigando 11 éxons e 10 íntrons. A sequência codificante possui 1875 pb e resulta em uma proteína de 624 aminoácidos e aproximadamente 67 kDa. Dados referentes ao ciclo de vida mostram que HDAC-2 encontra-se constitutivamente expressa, ressaltando sua importância em todas as formas de desenvolvimento do parasita.

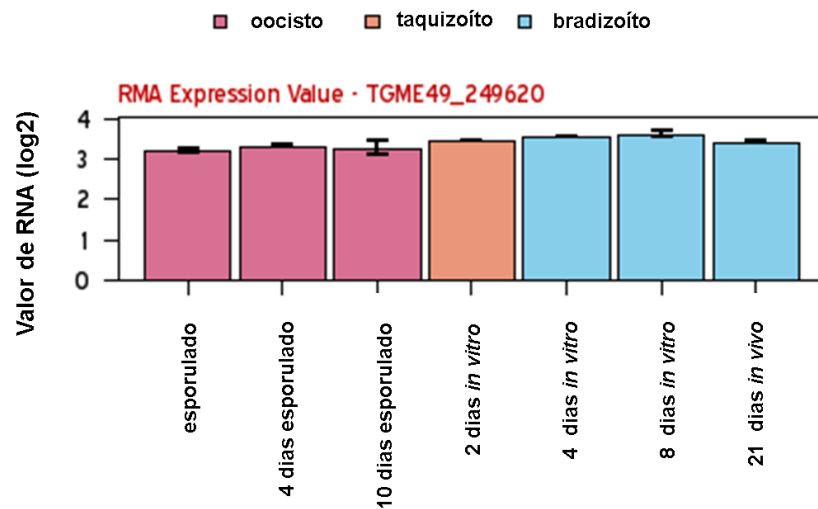


FIGURA 6 - Variação de HDAC-2 durante o ciclo de vida de *T. gondii*.
Fonte: ToxoDB

4.1.1 Análise da sequência de HDAC-2

Após obter maiores informações sobre a HDAC-2 em *Toxoplasma*, fomos analisar a homologia de sequência, utilizando o algoritmo *Protein Blast* (Blastp). A proteína HDAC-2 é constituída basicamente por um grande domínio HDAC, que é caracterizado por uma folha $\alpha\beta$ central e oito folhas β paralelas e a ligação com o zinco ocorre nas alças 4 e 7 (LOMBARDI, et al, 2011). Surpreendentemente, verificamos que exceto por parasitas Apicomplexa, os demais apresentam um grande *gap* no alinhamento de sequência. De acordo com o Banco de dados de domínios conservados (*Conserved Domain Data Base- CDD* NCBI), esses *gaps* contêm duas inserções nucleotídicas justamente dentro do domínio HDAC característico, (posições 74 a 147 e 159 a 256), que são únicas a parasitas do Filo Apicomplexa (FIGURA 7). Também foi possível identificar que o domínio HDAC está na posição N-terminal e o sítio de dependência de zinco mais próximo á região C-terminal, caracterizando a proteína como uma histona deacetilase classe 1. Aparentemente, a presença das inserções nucleotídicas não interferem com os sítios ativos, identificados com auxílio do CDD como presentes na porção C-terminal do domínio.

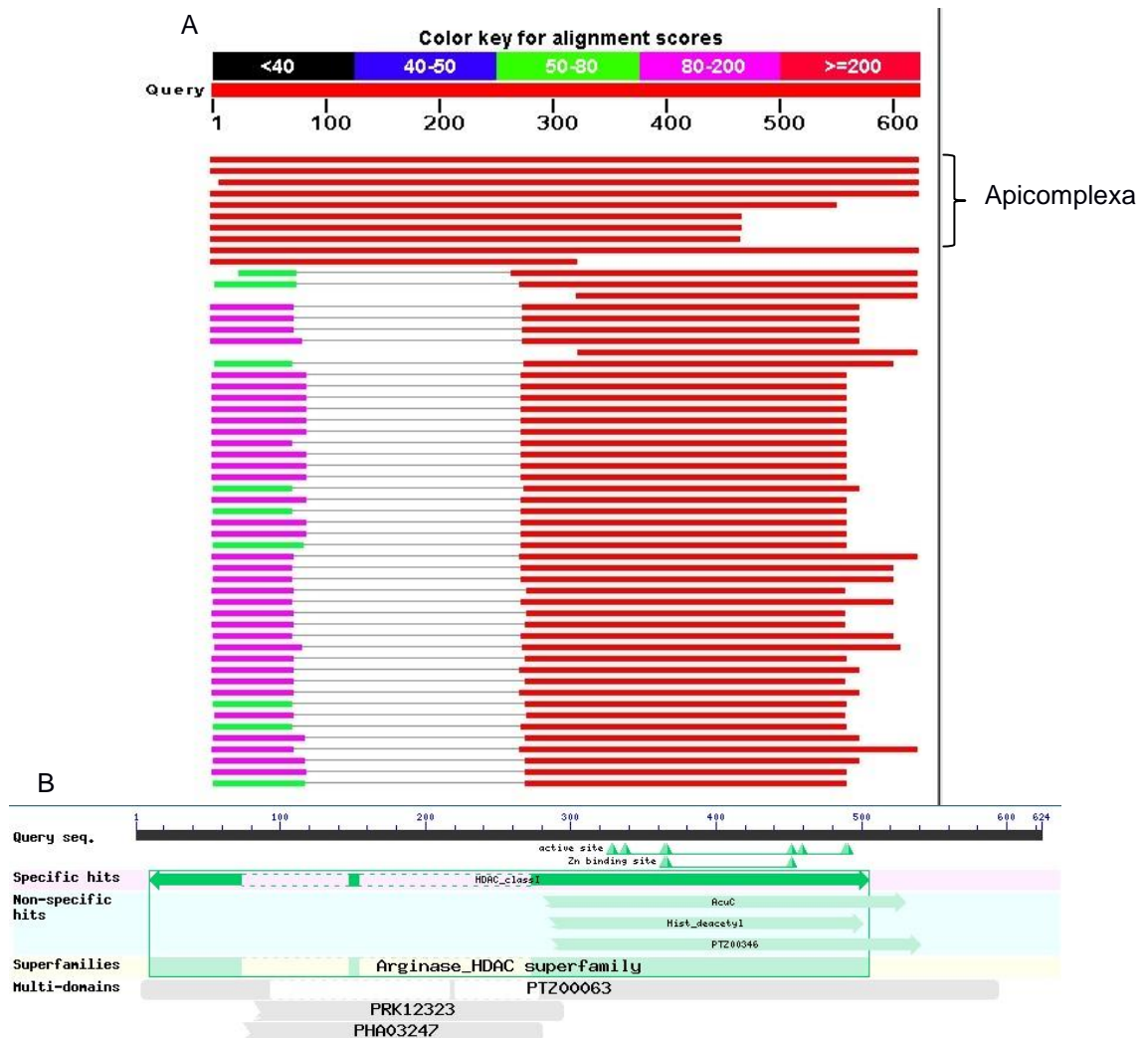


FIGURA 7 -Homologia da Sequência do gene *hdac-2*

(A) Busca em banco de dados (NCBI) mostram que a sequência de aminoácidos de HDAC-2 é conservada com demais parasitas do filo Apicomplexa. Por outro lado, quando comparada a demais eucariotos, apresenta um grande *gap*, na porção N-terminal ao meio da proteína, muito embora o restante da sequência mostre-se bastante similar. (B) Domínios presentes em HDAC-2, segundo o CDD (NCBI). HDAC-2 compreende um grande domínio HDAC-2 que compreende quase toda extensão da proteína. As inserções nucleotídicas estão dentro desse domínio (representadas pelas linhas pontilhadas em verde), Os sítios ativos da proteínas estão representados por triângulos.

Fonte: NCBI

4.1.2 Estrutura proteica

Conforme mencionado acima, HDAC-2 possui duas sequências atípicas presentes dentro do domínio HDAC, únicas de Apicomplexa. Para verificar como essas sequências se comportam de maneira a interferir na estrutura da proteína, recorreremos para modelagem tridimensional dessa proteína, baseada em homologias com sequências semelhantes, cujas estruturas foram resolvidas e estão presentes no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*-<http://www.rcsb.org/pdb/home/home>).

No entanto, ao procurar proteínas com sequências similares à HDAC-2 foi encontrada a proteína 4BKX com apenas 55% de homologia. 4BKX é o código no

banco de dados, para a HDAC-1 de *Homo sapiens*, que é a que mais se parece em estrutura primária com a HDAC-2, e que possui estrutura resolvida. Ao terminar todas as etapas da modelagem por homologia, foi obtida a estrutura da HDAC-2 (FIGURA 8). O que se observa é a presença do domínio HDAC característico (em verde) e de um laço rosa desestruturado. Esse laço é justamente a região das inserções atípicas no domínio HDAC e se mostra dessa forma, por não apresentar estrutura conhecida, não significando que ela possui esta morfologia de fato.

Embora não façam parte do sítio ativo da enzima, não podemos deixar de especular que se essas inserções poderiam funcionar como um domínio auxiliar para melhorar a atividade da enzima, ou ainda seriam retiradas em alguma etapa de processamento da proteína. Assim como a HDAC-2 a proteína SOCS3 (uma enzima que controla a resposta à interleucina 6, em mamíferos), também possui uma inserção dentro de seu domínio catalítico (domínio SH2). Essa inserção, por outro lado, é um motivo já conhecido, o motivo PEST (pequena sequência rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina), e foi demonstrado através de diversos experimentos que este motivo não altera a estrutura do domínio SH2, nem tampouco sua função, porém ele contribui para a estabilidade de SOCS3 dentro da célula e sua atividade é diminuída na ausência deste motivo (BABON, et al, 2006).

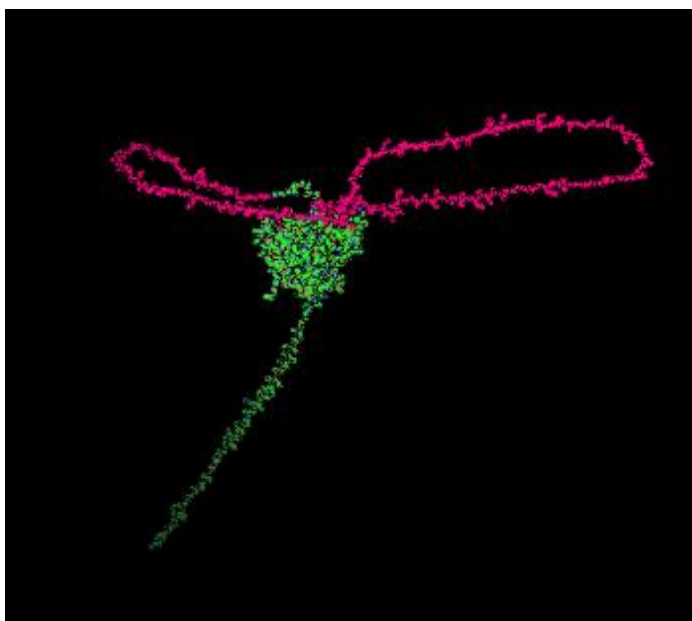


FIGURA 8 - Estrutura 3D de HDAC-2
Estrutura proteica modelada por homologia feita com o servidor HHPRED. A região globular é conhecida e é onde se encontra o sítio ativo da proteína. Destacado em rosa estão as duas inserções no domínio HDAC para as quais não se conhece a estrutura terciária. A visualização da estrutura da proteína foi feita com o software PyMol.
Fonte: a autora

4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA HDAC-2

A importância de se caracterizar a HDAC-2 é clara e para atingir esse fim, partimos para o método de etiquetamento do gene endógeno. Para tanto o gene da HDAC-2 foi amplificado do genoma do parasita por meio de reação de PCR. Em *Toxoplasma*, a maioria dos genes estão presentes em cópias únicas, como é o caso da HDAC-2, bem como o parasita é haplóide, resultando, portanto na amplificação a partir de um único molde. Para confirmar que o gene certo foi amplificado, os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação do tamanho. Foi possível ver que o tamanho amplificado correspondia ao fragmento esperado, de 1002pb, como mostrado na Figura 9 e não observamos a presença de bandas inespecíficas. Nesse caso utilizamos enzima *Platinum*, que permite alta fidelidade de amplificação, uma vez que esse fragmento gênico será integrado no genoma, e qualquer mutação poderia levar a problemas na síntese proteica.

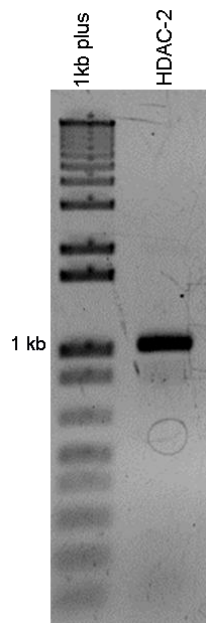


FIGURA 9- Amplificação do gene *hdac-2* por meio de PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Banda correspondente a 1002 pb conforme esperado.

Fonte: a autora

4.3 CLONAGEM EM VETOR pLIC.HA.HXGPRT E SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS.

Como descrito anteriormente, o fragmento amplificado de 1002 pb foi purificado e tratado com a T4 DNA polimerase. No caso dos insertos, uma pequena

região LIC, complementar ao vetor foi adicionada aos *primers* e a extremidade simples-fita necessária foi gerada pela ação da própria T4 DNA Polimerase através de sua atividade exonuclease. Para gerar complementariedade de sequência, na reação com a T4 Polimerase foi adicionada citocina ao invés da guanina no vetor. Vetor e insertos foram anelados e transformados em *E. coli* cepa DH5 α cálcio competentes através de choque térmico.

Para verificar quais eram as colônias que possuíam o inserto foi feita uma PCR de colônia. Novamente, os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O resultado pode ser visualizado na imagem a seguir, mostrando que foram obtidas 14 amplificações de tamanho esperado, ressaltando a alta eficiência do método LIC de clonagem.

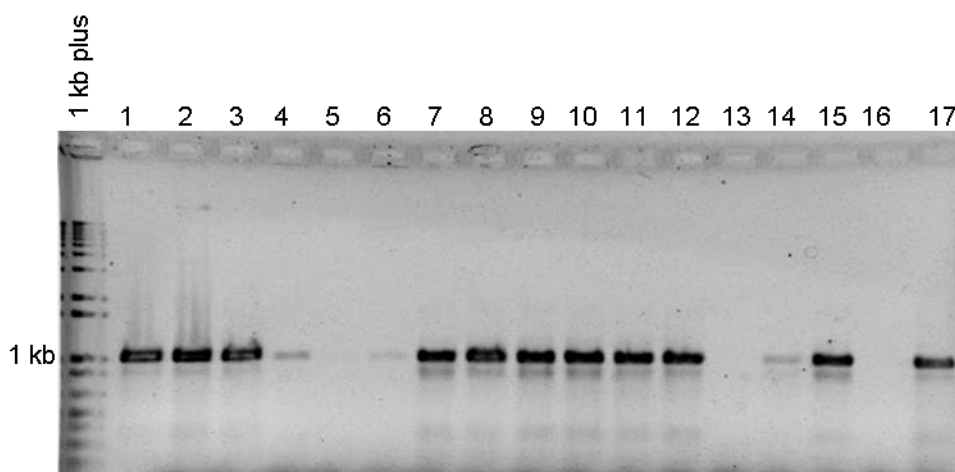


FIGURA 10 - Amplificação do inserto correspondente à HDAC-2 por PCR de colônia. Algumas das colônias obtidas após o choque térmico foram submetidas diretamente a uma PCR. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Bandas com tamanho esperado de 1002 pb são observadas para 14 das colônias testadas.
Fonte: a autora

Para confirmar que tratava-se do fragmento esperado e se o mesmo foi inserido corretamente no vetor, os possíveis clones positivos foram expandidos em meio LB, purificados e a dupla digestão enzimática. As enzimas escolhidas foram a *NheI*, que possui sítio único no inserto e a *XhoI* que possui um sítio no vetor e dois no inserto. Sendo assim, espera-se encontrar três bandas após eletroforese, como mostra a digestão virtual abaixo. Dos cinco clones selecionados, 3 mostraram o resultado esperado após digestão enzimática, indicando alguns resultados falso-positivos obtidos pelo método de PCR de colônia. Falso-positivos em PCR de colônia são relativamente comuns, pela presença de quantidade excessivas de

inserto e vetor durante a transformação. Esses que não foram eficientemente transformados podem acabar sendo utilizados como molde para reação de PCR de colônia, resultando na amplificação do fragmento no tamanho esperado.

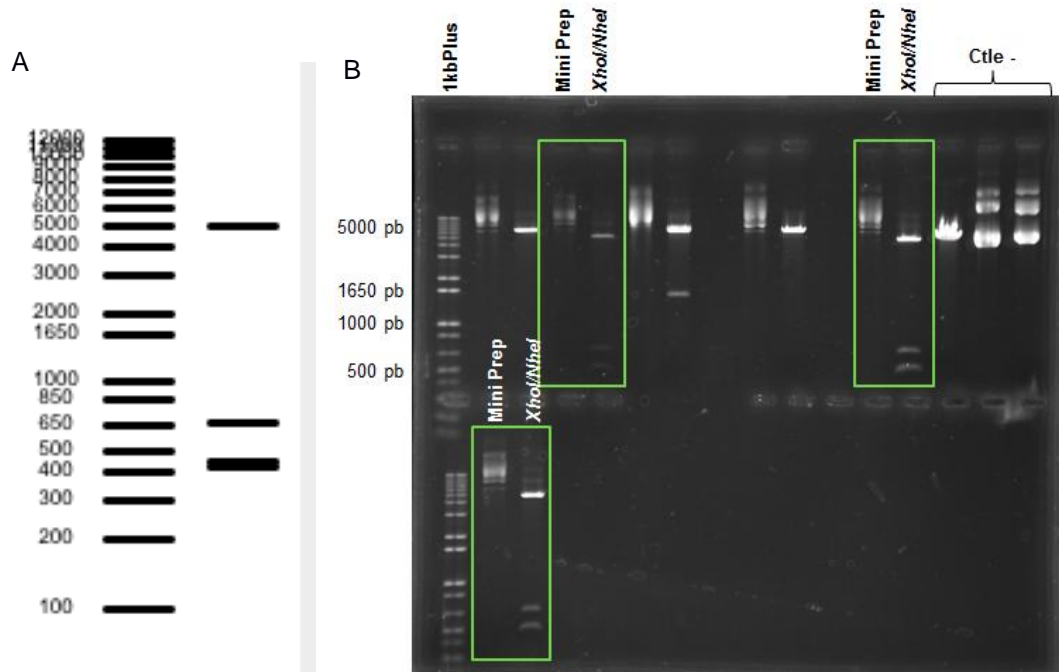


FIGURA 11 - Digestão virtual e obtida experimentalmente para confirmação dos clones (A) Digestão virtual obtida através do software Serial Cloner. (B) Digestão dos plasmídeos oriundos de colônias positivas, com as enzimas *NheI* e *XhoI*. Padrão de bandas semelhante à figura 3A são considerados positivos para o inserto. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Fonte: a autora

Por conta disso, 3 dos possíveis clones foram submetidos à sequenciamento, cujo resultado mostrou que o inserto trata-se da HDAC-2 e que o fragmento gênico está clonado na região certa do vetor.

4.4 DIGESTÃO ENZIMÁTICA E TRANSFECCÃO EM *T. gondii*

Para aumentar a eficiência de recombinação homóloga, é necessária a digestão com uma endonucleases de restrição que possui seu sítio de clivagem aproximadamente no centro do inserto. Isso gera dois fragmentos de tamanho apropriados para recombinação homóloga, aumentando consideravelmente sua eficácia (HUYNH e CARRUTHERS, 2009). Portanto a enzima utilizada foi a *NheI*. Utilizamos dois dos plasmídeos que foram confirmados pelos métodos descritos acima, sendo denominados clones 12 e 19.

Assim, referentes plasmídeos foram totalmente linearizados com *NheI* (FIGURA 12), precipitados e transfectados nas formas taquizoítas de *T. gondii*.

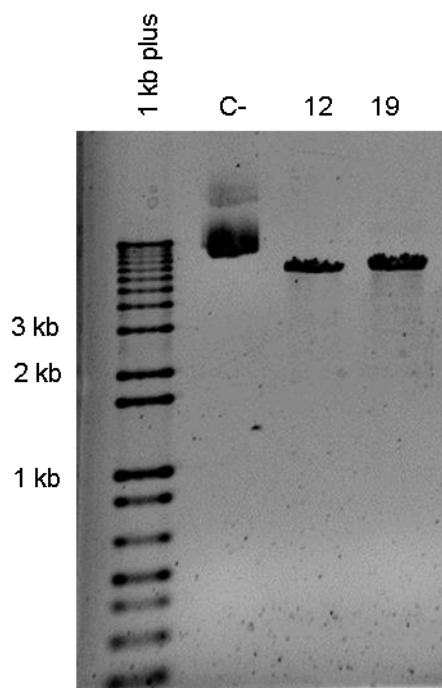


FIGURA 12 – Análise da linearização dos vetores.

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando a total linearização dos vetores dos clones 12 e 19, o que é evidente pela presença da banda única. C- corresponde ao vetor não linearizado.

Fonte: a autora

4.5 WESTERN BLOT

Para seleção dos parasitas positivos, utilizamos xantina e ácido micofenólico. Tendo ocorrido a seleção a população de parasitas sobreviventes foi submetida a ensaio de western blot, seguindo o protocolo já descrito. Foram feitas inúmeras tentativas de transfecção, e os parasitas sempre sofriam o efeito da seleção conforme esperado, porém a proteína com etiqueta de HA, nunca foi detectada. (FIGURA 13).

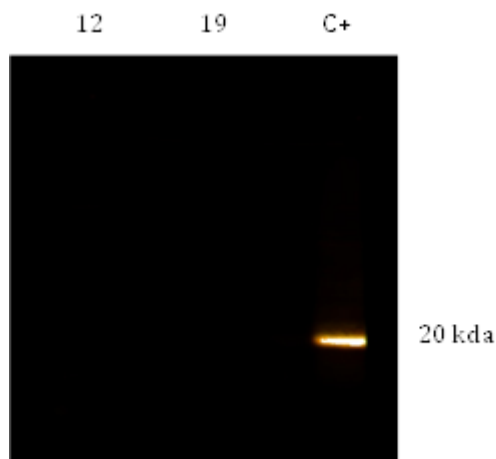


FIGURA 13 - Foto da revelação de Western Blot por Odyssey. Onde 12 e 19 são extratos de clones selecionados e C+ é uma proteína controle positivo de 20 kDa. Neste caso a membrana foi incubada com dois anticorpos secundários, um com excitação em comprimento de onda correspondente ao verde e outro ao vermelho, como ambos funcionaram a cor observada é uma mistura das duas.
Fonte: a autora

A eficiência do anticorpo foi testada pela presença de uma proteína nuclear controle fusionada a HA, conforme figura acima. Outros aspectos para seleção negativa podem estar relacionados ao *locus* gênico onde ela se encontra, que pode ser, difícil de manipular experimentalmente, ou o inserto pode estar integrando no local errado randomicamente e por isso a seleção ocorre, mas a proteína não é detectada. Alternativamente, durante a transferência para a membrana a proteína pode se renovar parcialmente e esconder o epítipo. Essa última possibilidade será mais explorado em breve.

Shen et al (2014) e Sidik et al (2014) demonstraram a eficiência da edição de genes por recombinação homóloga em *Toxoplasma gondii* utilizando o método de CRISPR/Cas 9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, associado ao gene 9) ao transfectar ambos os vetores juntos. Este método tem sido bastante utilizado para diversos organismos e consiste basicamente na introdução de duplas quebras em uma sequência alvo de DNA (SHEN et al, 2014). Este é um mecanismo que ocorre naturalmente e é encontrado em arqueas e bactérias como defesa a DNA exógeno (SHEN , et al, 2014). Quando associado ao gene 9, uma endonuclease, este complexo cliva a sequência alvo de DNA ao ser direcionado por um RNA guia. Atualmente este sistema já está adaptado para manipulação genética.

Através da colaboração com a Dra. Natalie de Monerri, obtivemos dois vetores que expressam RNAs guias alternativos para HDAC-2 e a Cas9 fusionada a GFP (o que permite comprovar os parasitas que foram eficientemente

transfectados). Após transfectar esses vetores em *T. gondii*, verificamos uma baixa taxa de eficiência (FIGURA 14), o que também pode explicar a ausência de transfectantes positivos para o etiquetamento da proteína endógena. Estamos avaliando métodos alternativos de transfecção de modo a aumentar a eficiência e obter os transfectantes, tanto para avaliar a metodologia de CRISPR-Cas9, quanto às etiquetas de HA.

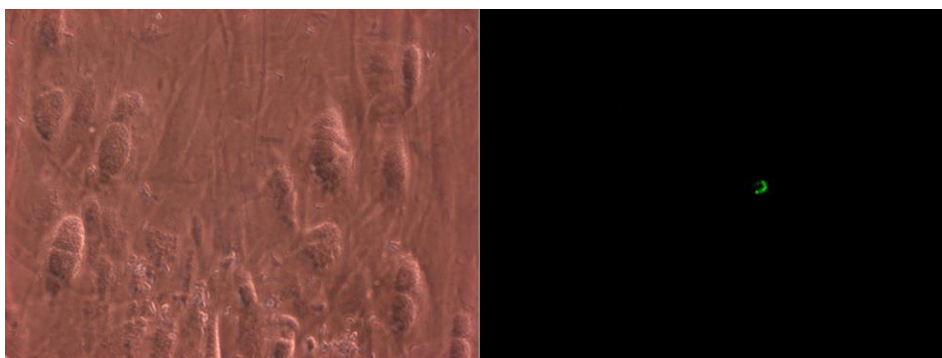


FIGURA 14- Eficiência de transfecção.

Parasitas foram transfectados com vetor CRISPR/CAS9 sem RNA-guia, expressando GFP episomal.

Fonte: a autora

4.6 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE HDAC-2

Mesmo com o resultado negativo para o western blot foi realizado ao mesmo tempo, um ensaio de imunofluorescência indireta com os parasitas selecionados. Em caso de epítipo mascarado durante a transferência para membrana, isso não seria problema em ensaios de imunofluorescência. No entanto, semelhante ao western blot, não foi encontrada nenhuma marcação específica nos parasitas, ou seja, a proteína não foi localizada o que corrobora a transfecção de falsos-positivos.

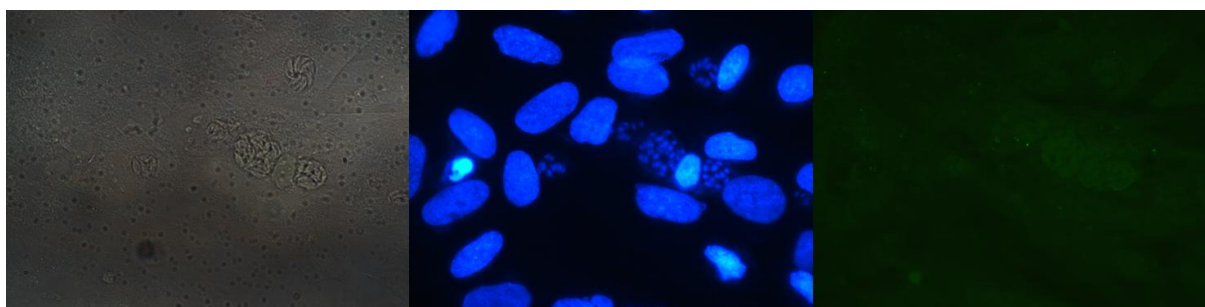


FIGURA 15– Localização de HDAC-2 por imunofluorescência.

Imunofluorescência com anticorpo anti-HA para a etiqueta acrescentada ao gene foi realizada. Na foto à esquerda o contraste diferencial de fase. No centro, o núcleo das células hospedeiras e dos parasitas foram corados com dapi. À direita a marcação com anti-HA. Nenhuma marcação específica foi detectada.

Fonte: a autora

4.7 NOCAUTE GÊNICO DE *hdac-2*

Uma vez que o etiquetamento da proteína não está sendo bem sucedido, partimos para o nocaute gênico, a fim de buscar dados que ajudem a elucidar a função dessa proteína. Como descrito, as porções 5' e 3' não traduzidas (~1000pb) de HDAC-2 foram amplificadas e fusionadas a *hxgprrt*, o gene de seleção. A fusão foi confirmada por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose, seguindo os princípios já mencionados. A análise do gel (FIGURA 16) mostrou que a fusão estava correta com a banda esperada na altura de 4 kb, correspondendo à fusão dos três fragmentos (1000 pb 3' UTR + 1000 pb 5' UTR + 1800 pb HXGPRT ~4000pb)

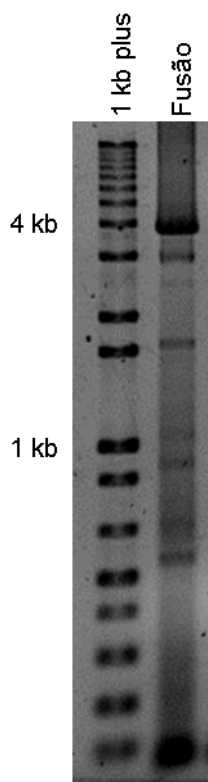


FIGURA 16 – Análise da PCR de Fusão.

Fusão dos fragmentos 3' UTR, 5' UTR e HXGPRT, constituem uma banda de aproximadamente 4 kb como esperado do produto da fusão dos fragmentos 1000 pb 3' UTR + 1000 pb 5' UTR + 1800 pb HXGPRT ~ 4000pb

Fonte: a autora

Como pode ser observado na Figura acima, diversas bandas inespecíficas foram detectadas fazendo-se necessário extrair a banda do gel e purificar. A purificação foi feita com Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com instruções do fabricante. A banda extraída do gel também foi enviada para sequenciamento. Nesse caso, utilizamos *primers* internos, a fim de cobrir uma

maior quantidade da sequência e verificar a correta fusão. Os *primers* internos foram desenhados com intuito de apanhar a região do gene de seleção e a região de recombinação (FIGURA 17).

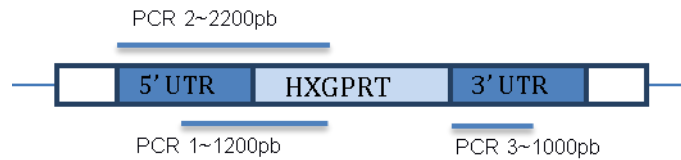


FIGURA 17 - Desenho esquemático dos amplicons utilizados no sequenciamento. Para confirmar que os amplicons haviam fusionado corretamente foram sequenciados três produtos de PCR. Estes *primers* também foram utilizados depois para confirmar a recombinação e troca do gene *hdac-2* por *hxgprt*.
Fonte: a autora

Após a confirmação que o cassete continha as sequências corretas, o transfectamos no parasita conforme descrito anteriormente, em uma concentração de aproximadamente 5 μ g. A seleção foi feita conforme já descrito e após alguns dias parasitas transfectantes foram selecionados.

Para confirmar se os parasitas selecionados são de fato nocautes para HDAC-2 e não falso-positivos como anteriormente, o DNA genômico desses parasitas foi extraído e utilizado como molde para PCR para o gene *tghdac2*, para parte interna do gene *hxgprt* e com os *primers* utilizados anteriormente no sequenciamento (FIGURA 17).

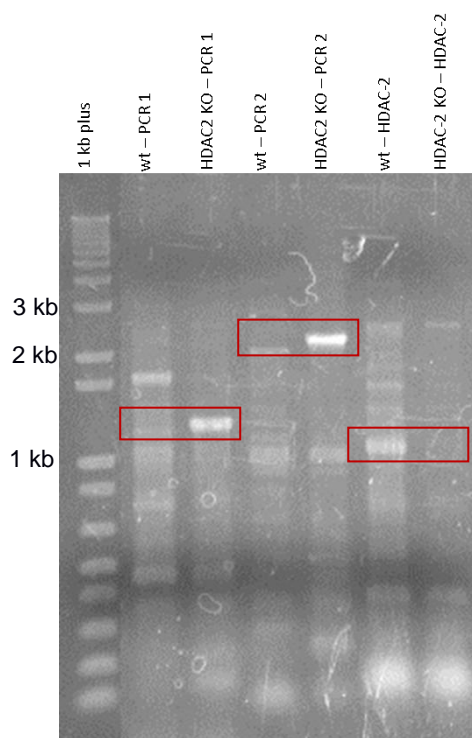


FIGURA 18- Confirmação do Nocaute por PCR.

PCR com DNA genômico extraído de parasitas HDAC-2 KO ou selvagem (wt) para confirmar a integração de *hxgprt* no genoma do parasita. PCR 1 e 2 correspondem ao esquema da Figura 17, nos quais são esperados 1200 pb e 2200 pb respectivamente. Para confirmar que o gene *hdac-2* não está no genoma foram utilizados os mesmos *primers* para amplificação de 1002 pb do gene (item 3.3).

Fonte: a autora

Com isso a integração correta do cassete no genoma foi confirmada e o gene *tghdac2* foi corretamente removido do genoma do parasita. Embora trata-se de uma população heterogênea, somente pelo fato de haverem parasitas nocaute para o gene da HDAC-2, entende-se que o mesmo não é essencial para o parasita. Embora com apenas 7 HDACs no genoma, as HDACs podem ter funções redundantes, ou seja outra HDAC nuclear, talvez HDAC-3 que faria o papel de deacetilase de histona em *T. gondii*, como acontece com HDAC-1 e HDAC-2 em mamíferos (JURKIN, et al, 2011).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS NOCAUTE PARA *hdac-2*

4.8.1 Imunofluorescência

As histonas H3 e H4 são as histonas mais conservadas e as que possuem mais sítios de acetilação identificados (NARDELLI, et al, 2013). Para saber a implicação da retirada do gene *hdac-2* dos parasitas, foi analisado o efeito sobre a acetilação das histonas H3 e H4 (FIGURA 19). Anticorpos anti acetilação destas histonas já são comercializados e amplamente utilizados. Ao analisar a imunofluorescência referente à acetilação da histona H3 não foi possível ver uma diferença evidente em relação ao controle, indicando que outra HDAC é responsável pela deacetilação da maioria dos resíduos de H3. Entretanto quando se analisa a imunofluorescência com anticorpos para anti H4 acetilada percebe-se uma grande diferença na intensidade de fluorescência em relação ao controle, o que sugere uma especificidade na deacetilação da histona H4. Vale destacar, que por esse experimento, não podemos descartar que HDAC-2 deacetila um resíduo específico em H3, assim como não é possível afirmar que HDAC-2 deacetila todos os resíduos de H4. Para tanto será necessário utilizar anticorpos específicos para os resíduos acetilados.

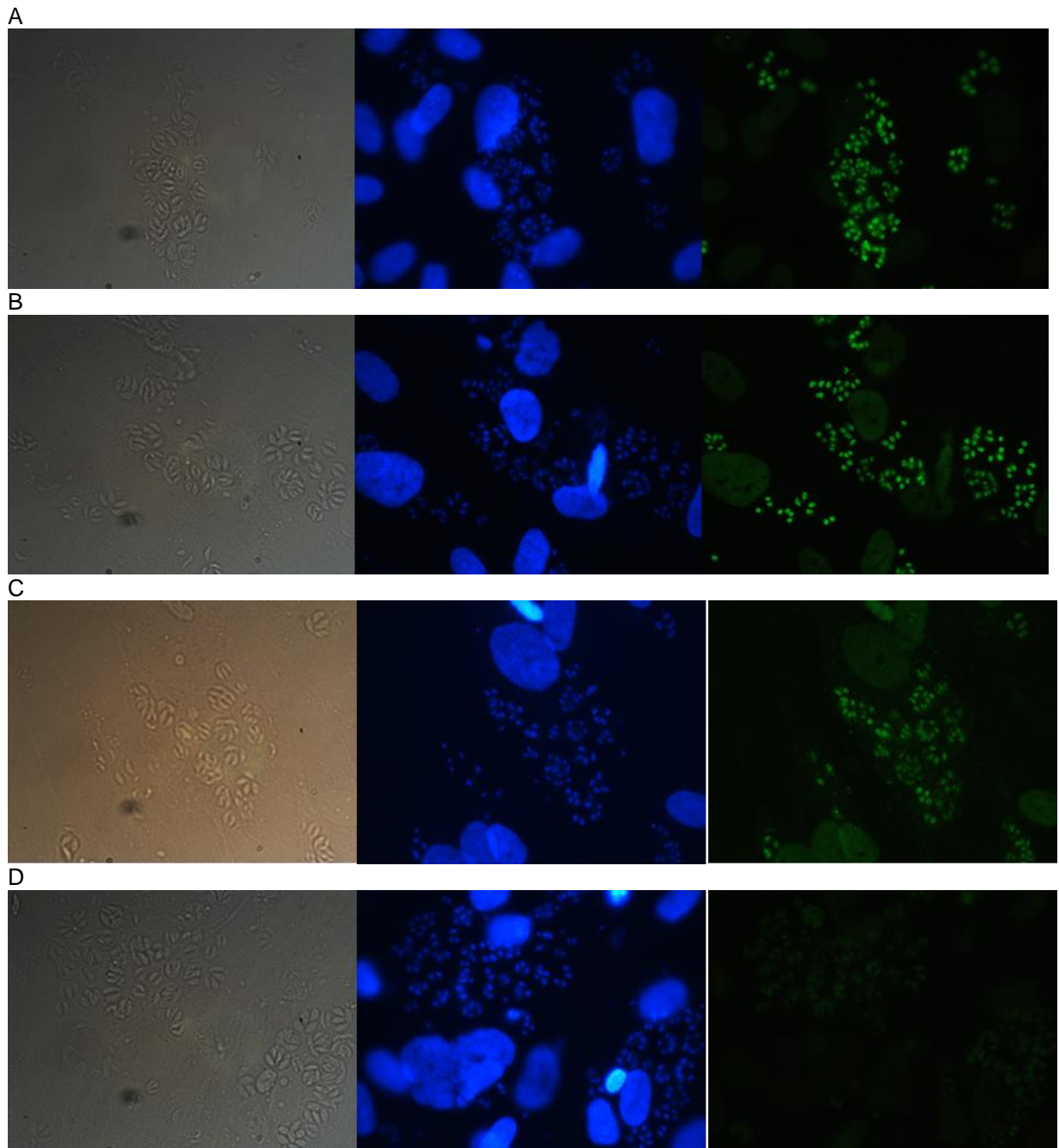


FIGURA 19- Imunofluorescência indireta com Anticorpos para acetilação de Histonas (A) parasitas HDAC-2 KO marcados para acetilação na histona H3. (B) parasitas controle marcados para acetilação na histona H3. (C) parasitas HDAC-2 KO marcados para acetilação na histona H4. (D) parasitas controle marcados para acetilação na histona H4. Fonte: a autora

É importante ressaltar que o núcleo da célula hospedeira também fica marcado com os anticorpos, o que é esperado, pois a célula hospedeira também possui histonas acetiladas em sua cromatina, sendo essas proteínas e suas modificações pós traducionais altamente conservadas.

O aumento nos níveis de acetilação na histona H4 em imunofluorescência (FIGURA 19) corroboram com o encontrado por Yamaguchi et al (2009) onde a proteína homóloga à HDAC-2 de *T. gondii*, HDAC-1 de mamíferos, foi também nocauteada e houve aumento de aproximadamente 1,5 vezes na massa total de acetilação em histonas H4 e aumento moderado específico nos resíduos H4K5ac, H4K8ac e H4K12ac. Porém, a acetilação total em histonas H3 não foi afetada o que concorda, novamente com nossos dados. Yamaguchi et al (2009) e Lager et al (2002) mostram que a HDAC-1 de mamíferos, quando deletada aumenta os níveis de expressão e atividade de uma outra histona deacetilase classe I (a HDAC-2 de mamíferos), evidenciando que ela possui uma função redundante que pode ser compensada por outra HDAC, o que também pode acontecer em *Toxoplasma* e talvez esse seja o motivo pelo qual a HDAC-2 não é essencial para o parasita.

4.8.2 Plaque Assay

Yamaguchi et al (2009) e Lager et al (2002) encontraram que as células nocaute possuem uma lenta taxa de proliferação. Este número reduzido de células, no entanto, não tem relação com aumento da apoptose, mas sim com a regulação de proteínas do ciclo celular. Experimentos feitos por ambos os grupos mostraram que a HDAC-1 de mamíferos (homóloga à HDAC-2 de *T. gondii*) controla diversas ciclinas, CDKs e outras proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular. As células HDAC-1 KO se encontram predominantemente em fase G1, com um grande aumento na expressão das proteínas p21, p57, cdk2 e ciclina D2, com redução da ciclina B1, ciclina A e ciclina E (YAMAGUCHI, et al, 2009; LAGGER, et al, 2002), todas reguladoras do ciclo celular, envolvidas principalmente na progressão da fase G1 para a fase S. A HDAC-1 regula diretamente a expressão de p21 (YAMAGUCHI, et al, 2009) e está na região promotora deste gene e de p27, onde o nocaute causa uma hiperacetilação da região (LAGGER, et al, 2002). Yamaguchi et al (2009) também utilizaram células com genótipo HDAC-1 KO/HDAC-2 KD (KD do inglês *knock down*) as quais possuíam um fenótipo de bloqueio no ciclo celular. A grande maioria das células ficava estocada em G1 e não progredia para a fase S, diferentemente de HDAC-1 KO nas quais algumas células se encontravam em S.

Embora de forma preliminar, também observamos uma redução na proliferação celular de *T. gondii* HDAC-2 KO em ensaios de imunofluorescência (não mostrado) e *plaque assay* (FIGURA 20) o que sugere que algo similar possa

acontecer em *T. gondii*. Como pode ser observado na figura 20, parasitas da cepa RH controle possuem diversas placas de lise (representadas pelas regiões translúcidas na placa ou “buracos”). Isso acontece, pois o parasita é desprovido de flagelo, e quando lisa a célula, utiliza um movimento de deslizamento até a célula mais próxima. Após replicação, essa célula é lisada e assim sucessivamente, originando em placas de lise visíveis a olho nú.

No entanto, quando analisamos as placas referentes à HDAC-2 KO, observamos placas muito menores e em menor número. Esse dado pode ser explicado, pelo retardamento na replicação, o que resulta em menos células infectadas em um mesmo local. Menos placas observadas nos parasitas HDAC-2 KO, no entanto, está relacionado provavelmente a uma menor virulência do parasita. No entanto, embora bastante evidente, será importante quantificar o tamanho dessas placas e o número de placas por poço, a fim de se obter um dado mais confiável.

Adicionalmente, é possível sugerir que a HDAC-2 de *Toxoplasma* também possa participar da regulação da expressão de genes envolvidos com o ciclo celular. Salientamos, contudo, a necessidade de mais estudos acerca da HDAC-2 de *Toxoplasma* para esclarecer sua função no ciclo celular e outros processos.

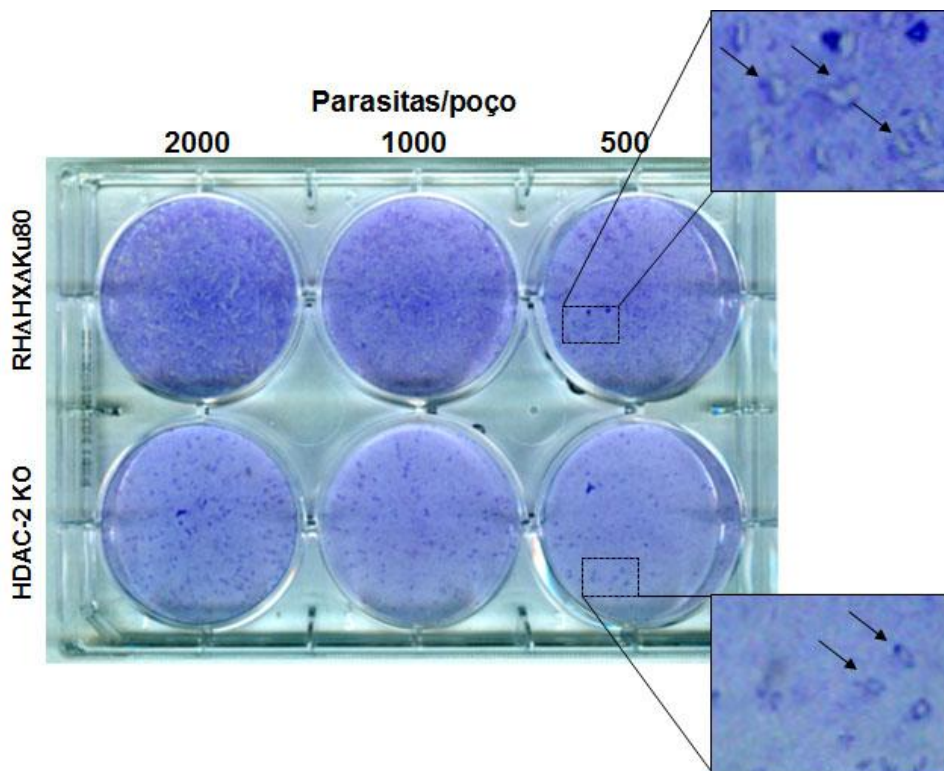


FIGURA 20 - Plaque Assay.

Células HFF foram infectadas com parasitas controle ou HDAC-2 KO nas quantidades indicadas. Após seis dias, as células foram fixadas e coradas com giemsa e é possível observar a formação de

placas de lise em ambos os controle e nocaute. À direita, um aumento mostra algumas placas de lise formadas (setas), evidenciando que há menos placas de lise em parasitas HDAC-2 KO.

Fonte: a autora

4.9 CONFIRMAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO DE *hdac-2*

Os objetivos iniciais deste projeto não envolviam analisar se a HDAC-2 sofreria splicing alternativo. Esse processo é fundamental para manter uma a maior variabilidade proteica encontrada em muitos eucariotos. Yeoh et al (2015) ressaltam a importância deste processo para eucariotos que possuem genomas pequenos, como *T. gondii*. Conforme seus dados, o mRNA de HDAC-2 é mais expresso em sua variante ausente de íntrons, mas pouco pode ser expresso com a retenção do primeiro ou terceiro íntron. Segundo Yeoh et al (2015) o primeiro íntron poderia ser retido em alguns casos, no entanto muito menos abundante do que o mRNA totalmente ausente de íntrons. Essa retenção intrônica era desconhecida em *hdac-2* e sua função desconhecida em *Toxoplasma*. Como os dados obtidos envolveram a superexpressão de um fator de splicing, procuramos confirmar essa informação em condições normais nos mRNAs de *Toxoplasma*.

Primeiramente o cDNA foi obtido e utilizado para amplificar os fragmentos correspondentes aos íntrons 1 e 3. Utilizamos também o íntron 3 pois foi visualizado nas análises de Yeoh et al (2015), quando os parâmetros utilizados foram menos estritos e conseqüentemente menos confiáveis. Ao analisar o resultado da amplificação, foi encontrada uma banda correspondente à amplificação do íntron 1, mas não do íntron 3 (FIGURA 21). Este resultado é bastante interessante e suscita futuras investigações para saber se este splicing alternativo leva a formação de duas proteínas.

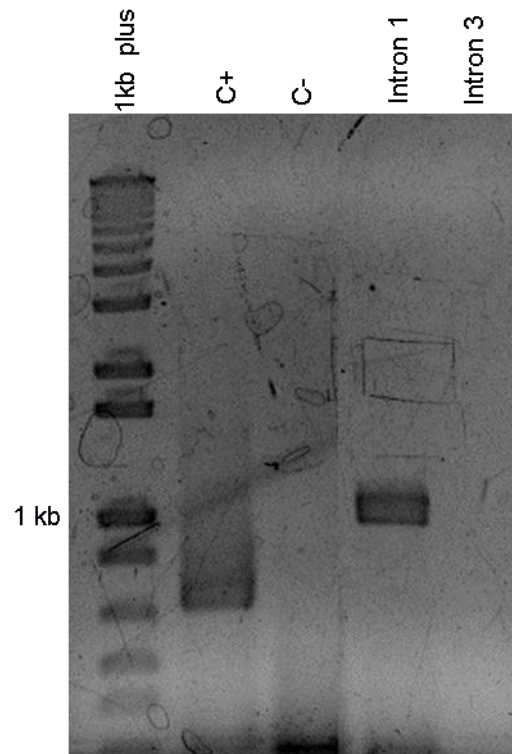


FIGURA 21 - Amplificação do primeiro e terceiro Íntrons a partir de cDNA. Análise de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, onde é confirmada a existência de splicing alternativo no mRNA de HDAC-2.
Fonte: a autora

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foram utilizadas diferentes abordagens, como nocaute, etiquetamento do gene endógeno para avaliar a função de HDAC-2 em *Toxoplasma*. De maneira geral, o banco de dados ToxoDB, é bastante completo, o que contribuiu tanto para a escolha da HDAC-2 como foco de estudo, tanto para obter maiores informações referentes ao gene, expressão e localização gênica. Interessantemente, a proteína é única de parasitas apicomplexa, pois possui duas inserções nucleotídicas atípicas dentro do domínio característico, de função desconhecida.

As inserções nucleotídicas no domínio HDAC provavelmente não interferem no sítio ativo da enzima, mas não foi possível determinar a estrutura terciária destas inserções com a modelagem por homologia, uma vez que é uma estrutura única que não existe similaridade com estruturas conhecidas.

A clonagem da porção final do gene *hdac-2* no vetor pLIC.HA.HXGPRT foi bem sucedida assim como a transfecção e seleção de parasitas transfectantes, porém a proteína não pode ser localizada por western blot ou imunofluorescência indireta com anticorpos anti HA.

O nocaute de *hdac-2* foi obtido com sucesso utilizando o método de PCR de fusão e integração do gene *hxgprt* por recombinação homóloga em *Toxoplasma gondii* RH Δ HX Δ Ku80. A correta integração de *hxgprt* e eliminação de *hdac-2* foram confirmadas por PCR.

A imunofluorescência para acetilação em histonas H3 e H4 para parasitas HDAC-2 KO mostra um aumento na acetilação total de histonas H4 em relação ao controle, mas não há diferença perceptível em H3 com o método utilizado, corroborando com dados presentes na literatura para a proteína homóloga à HDAC-2 em mamíferos. O nocaute de HDAC-2 também manifesta fenótipo de menor taxa de proliferação em comparação com o controle, entretanto ainda não é possível afirmar se a ausência de HDAC-2 interfere com a divisão celular, invasão ou evasão do parasita. Não obstante, ressaltamos a necessidade de mais experimentos e análise estatística para maior confiabilidade destes dados. Em adição, dados preliminares indicam que o nocaute de HDAC-2 leva a uma proliferação mais lenta.

A HDAC-2 de *Toxoplasma* possui splicing alternativo com a retenção do primeiro íntron, mas não do terceiro íntron, confirmando os dados encontrados por Yeoh et al (2015).

Alguns resultados preliminares importantes para a caracterização de HDAC-2 foram obtidos, todavia são necessários muito mais estudos para desvendar o papel desta enzima em *Toxoplasma*. Ainda é importante a obtenção da etiqueta endógena ou anticorpos policlonais para realização de outros experimentos importantes para a caracterização da proteína, tais como: imunoprecipitação da cromatina e PCR quantitativo para conhecer a quais genes está especificamente relacionada. Parasitas HDAC-KO deverão ser clonados a fim de se ter informações mais precisas acerca da ausência de HDAC-2 em *Toxoplasma gondii*. A caracterização de uma proteína deacetilase exclusiva de Apicomplexa é fundamental para o entendimento da biologia e patogênese da doença, e potencialmente pode revelar um importante alvo para ação de inibidores que controlem a proliferação do parasita e conseqüentemente da toxoplasmose, um problema de saúde pública em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

- AL RIYAH, A. et al. Single argonaute protein from *Toxoplasma gondii* is involved in the double-stranded RNA induced gene silencing. **Int. J.Parasitol.** v.36 n. 9 p.1003–1014. 2006. Acesso em: 15 out. 2015, doi:10.1016/j.ijpara.2006.04.014
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. "**Basic local alignment search tool.**" *J. Mol. Biol.* v.215 p.403-410. 1990. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 08 ago. 2015
- BABON, J.J.; et al. The Structure of SOCS3 Reveals the Basis of the Extended SH2 Domain Function and Identifies an Unstructured Insertion That Regulates Stability, **Molecular Cell**, v.22, n 2, p.205-216 21. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.024>>. Acesso em: 20 out. 2015.
- BHASKARA, S. et al. Histone deacetylases 1 and 2 maintain S-phase chromatin and DNA replication fork progression. **Epigenetics & Chromatin**, p.6-27. 2013. Disponível em: < <http://www.epigeneticsandchromatin.com/content/6/1/27> >. Acesso em: 19 maio. 2015
- BIRD, A. P.; WOLFFE, A. P. Methylation-induced repression: belts, braces, and chromatin. **Cell**: v.99 n. 5 p.451–454, 1999. Acesso em: 22 set. 2015, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81532-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81532-9)
- BOUGDOUR, A. et al. Drug Inhibition of HDAC3 and Epigenetic Control of Differentiation in Apicomplexa Parasites. **The Journal of Experimental Medicine**: v. 206 n.4 953–966. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715132/>>. Acesso em: 2 set. 2015.
- BRAUN, L. et al. A complex small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-like machinery and effected by a metazoan-like Argonaute in the single-cell human parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**: v. 6 n. 5 p. 2010. Acesso em: 22 out. 2015, doi:10.1371/journal.ppat.1000920.
- CARROZZA, M. J. et al, The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends in Genetics**: v. 19, n 6, p. 321-329. 2003. Acesso em: 26 set. 2015, doi:10.1016/S0168-9525(03)00115-X
- DALMASSO, M.C. et al. *Toxoplasma gondii* hastwolineages of histones 2b (H2B) with different expression profiles. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.148 p.103–107. 2006. Acesso em: 26 set. 2015, doi:10.1016/j.molbiopara.2006.03.005
- DALMASSO, M.C. et al. *Toxoplasma* H2A variants reveal novel insights into nucleosome composition and functions for this histone family. **J. Mol. Biol.** V.392 p.33–47. 2009. Acesso em: 15 out. 2015, doi:10.1016/j.jmb.2009.07.017

DARKIN-RATTRAY, S.J. et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**: v.93 p.13143-13147. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24060/>>. Acesso em: 7 jan. 2015

DELCUVE, G.P.; KHAN, D.H.; DAVIE, J.R. 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. **Clinical Epigenetics** : v. 4 n.5. Acesso em: 22 set. 2015, doi:10.1186/1868-7083-4-5

DIXON, S.E. et al. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.173 p.1–9. 2010. Acesso em: 17 out. 2015, doi:10.1016/j.molbiopara.2010.05.001

DUBEY, J. P. *et al.* Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**: v. 11, n. 2. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106833/>>. Acesso em: 26 set. 2015

EGGER, G. et. al., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, **Nature**: v.429, p.457-463, 2004. Acesso em: 4 out. 2015, doi 10.1038/nature02625

ELMORE, S. A. et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n 4, p.190-196, 2010. Acesso em 25 set. 2015, doi:10.1016/j.pt.2010.01.009

FERGUSON, D. J. P.; HUTCHISON, W. M. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitology Res.** v.73 n. 6 p.483–491.1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2F00535321>> . Acesso em: 22 set. 2015

FISCHER, A. et al. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. **Trends in Pharmacological Sciences** : v. 31 n. 12 p. 605-617. 2010. Acesso em: 2 set. 2015, doi:10.1016/j.tips.2010.09.003.

FOX, B.A. et al. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. **Eukaryot Cell**: v.8 p.520-529. 2009. Acesso em 28 out. 2015, doi: 10.1128/EC.00357-08

FULL *Toxoplasma*. **Toxoplasma Full-Length cDNA project**. 2010. Disponível em<<http://fullmal.hgc.jp/tg/docs/toxoplasma.html>>. Acesso em 26. set.2015

GAJRIA, B. et al. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic Acids Res.** 2007; gkm981v1.

GISSOT, M. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.** v3 n. 6 p.709-719. 2007. Acesso em: 22 set. 2015, DOI: 10.1371/journal.ppat.0030077

GISSOT, M. et al. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. **Eukaryot.Cell:** v. 7 n. 3 p. 537-540. 2008. Acesso em: 17 out. 2015, doi:10.1128/EC.00448-07

GISSOT, M.; KIM, K. How epigenomics contributes to the understanding of gene regulation in *Toxoplasma gondii*. **J Eukaryot Microbiol:** v. 55 n. 6 p.476-480. 2008. Acesso em: 6 jan. 2015, doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00366.x

GREGORETTI, I.V.; LEE, Yun-Mi; GOODSON, H. V., Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. **Journal of Molecular Biology:** v. 338 n. 1 p. 17-31. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604001408>>. Acesso em: 6 nov. 2015.

HUYNH, M.H.; CARRUTHERS, V.B. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. **Eukaryot Cell:** v. 8 n. 4 p.530-539. 2009. Acesso em: 17 maio. 2015, doi:10.1128/EC.00358-08.

JURKIN, J. et al. Distinct and Redundant Functions of Histone Deacetylases HDAC1 and HDAC2 in Proliferation and Tumorigenesis. **Cell Cycle:** v. 10 n.3 p.406–412. 2011. Acesso em: 9. Nov. 2015, doi: 10.4161/cc.10.3.14712.

KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation, **Cell**, v. 116,n 2. p. 259-272. 2004. Acesso em: 6 jan. 2015, doi:10.1016/S0092-8674(04)00044-3

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell** v.128 p.693-705.2007. Acesso em: 6 jan. 2015, doi 10.1016/j.cell.2007.02.005

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227 n.5259 p.680-685. 1970. Acesso em: 4 out. 2015, doi:10.1038/227680a0

LAGGER, G. et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. **EMBO J.** v. 21 n.11 p.2672–2681.2002. Acesso em: 6 nov. 2015, doi: 10.1093/emboj/21.11.2672

LEE, J.-H. et al. Histone Deacetylase Inhibitor Induces DNA Damage, Which Normal but Not Transformed Cells Can Repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America:** v. 107 n.33 p.14639–14644.2010. Acesso em: 14 ago. 2015, doi: 10.1073/pnas.1008522107

LOMBARDI, P. M. et al. Structure, Mechanism, and Inhibition of Histone Deacetylases and Related Metalloenzymes. **Current Opinion in Structural Biology**, v.21 n.6, p. 735–743. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.004>>. Acesso em: 6 nov. 2015

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res.** v.43 p.222- 226. 2015. Acesso em 6 nov. 2015, doi:10.1093/nar/gku1221

MEISSNER, M. et al. Molecular genetic tools in Toxoplasma and Plasmodium: achievements and future needs. **Current Opinion Microbiology**: v.10 p.349-356. 2007. Acesso em: doi:10.1016/j.mib.2007.07.006

MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The lancet** ,v. 363 n. 9425 p. 1965-1976. 2004. Acesso em: 14 ago. 2015, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOTTAMAL, M. et al. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer. **Agents Molecules**, v.20, p. 3898–3941. 2015. Acesso em: 17 out. 2015, doi:10.3390/molecules20033898

NARDELLI, S.C., et al. The histone code of Toxoplasma gondii comprises conserved and unique posttranslational modifications. **mBio** v.4 n.6 .2013. Acesso em: 6 jan. 2015, doi: 10.1128/mBio.00922-13..

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 17 ago. 2015

NICOLLE, C., MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Acad Sci**: v.147 n. 736. 1908.

PFEFFERKORN, E.R.; BOROTZ, S.E. Toxoplasma gondii: Characterization of a Mutant Resistant to 6-Thioxanthine. **Experimental Parasitology**, v. 79, n.3, 1994, p. 374-382. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1006/expr.1994.1099>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

RADKE, J. R. et al. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of Toxoplasma gondii. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.115 n.2 p. 165-175.2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00284-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00284-5)>. Acesso em: 28 ago. 2015.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2. 2012. Acesso em: 26 set. 2015, doi:10.1128/CMR.05013-11.

ROTH, S.Y.; DENU, J.M.; ALLIS, D. Histone Acetyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**: v. 70 p. 81-120. 2001. Acesso em: 24 set. 2015, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.81.

Serial Cloner software de Serial Basics, versão 2.6.1. Disponível em: <http://serialbasics.free.fr/Home/Entries/2013/4/3_Serial_Cloner_2.6.1_update.html>

SHEN, B.; et al. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. **mBio**: v.5 n.3. 2014. Acesso em: 14 ago. 2015, doi:10.1128/mBio.01114-14.

SIDIK, S.M.; et al. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. **PLoS ONE**: v.9 n. 6. p.100450. 2014. Acesso em: 17 ago. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0100450.

SnapGene software de GSL Biotech. Disponível em: <snapgene.com>

SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, 33 (Web Server issue), W244–W248. 2005. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gki408>>. Acesso em: 26 set. 2015

SOLDATI, B.S.D. **Genetic Manipulation of *Toxoplasma gondii***, 1 ed. 2007

SOUZA, W. et al. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**; v. 20, n. 1, p. 131-143. 2010. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewFile/5957/4881>>. Acesso em: 26 set. 2015

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo** n. 3 p.109-112. 1908

STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modifications. **Nature** v.403 p.41–45. 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6765/full/403041a0.html>>. Acesso em: 6 jan. 2015

The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.7.4 Schrödinger, LLC.

TONKIN, C.J. et al. Sir2 paralogues cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **PLoS Biol**: v. 7 n. 4. 2009. Acesso em: 20 set. 2015, doi: 10.1371/journal.pbio.1000084

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v.6 p.509–519. 2004. Acesso em: 19 set. 2015, doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00399.x

UPADHYA, R. et al. Improved techniques for endogenous epitope tagging and gene deletion in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Microbiology Methods**. v.85 n. 2 p.103-113. 2011. Acesso em: 29 out. 2015, doi:10.1016/j.mimet.2011.02.001

VANAGAS, L. et al. *Toxoplasma* histone acetylation remodelers as novel drug targets. **Expert Rev Anti Infect Ther**: v.10 n.10 p.1189–1201. 2012. Acesso em: 17 fev. 2015, doi:10.1586/eri.12.100.

WANG, Q-P.; KAWAHARA, T.; HORN, D. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. **Molecular Microbiology**: v.77 n.5 p.1237-1245. 2010. Acesso em: 6 out. 2015, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07284.x.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32, 2006. Acesso em: 15 set. 2015, doi: 10.1002/0471250953.bi0506s15

WEST, A.C.; JOHNSTONE, R.W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **J Clin Invest**: v.124 n.1 p.30-9. 2014. Acesso em: 30 set. 2015, doi: 10.1172/JCI69738

XU, M.J. et al. Comparative characterization of microRNA profiles of different genotypes of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**: v. 140 n.9 p. 1111-1118. 2013. Acesso em: 18 set. 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S003118201300053X>

YAMAGUCHI, T. et al. 2009. Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. **Genes Dev**. V.24 p. 455-469. 2010. Acesso em: 6 nov. 2015, doi:10.1101/gad.552310

YEOH, L. M. et al. A serine–arginine-rich (SR) splicing factor modulates alternative splicing of over a thousand genes in *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Reserch**: v. 43 n. 9. 2015. Acesso em: 2 ago. 2015, doi:10.1093/nar/gkv311