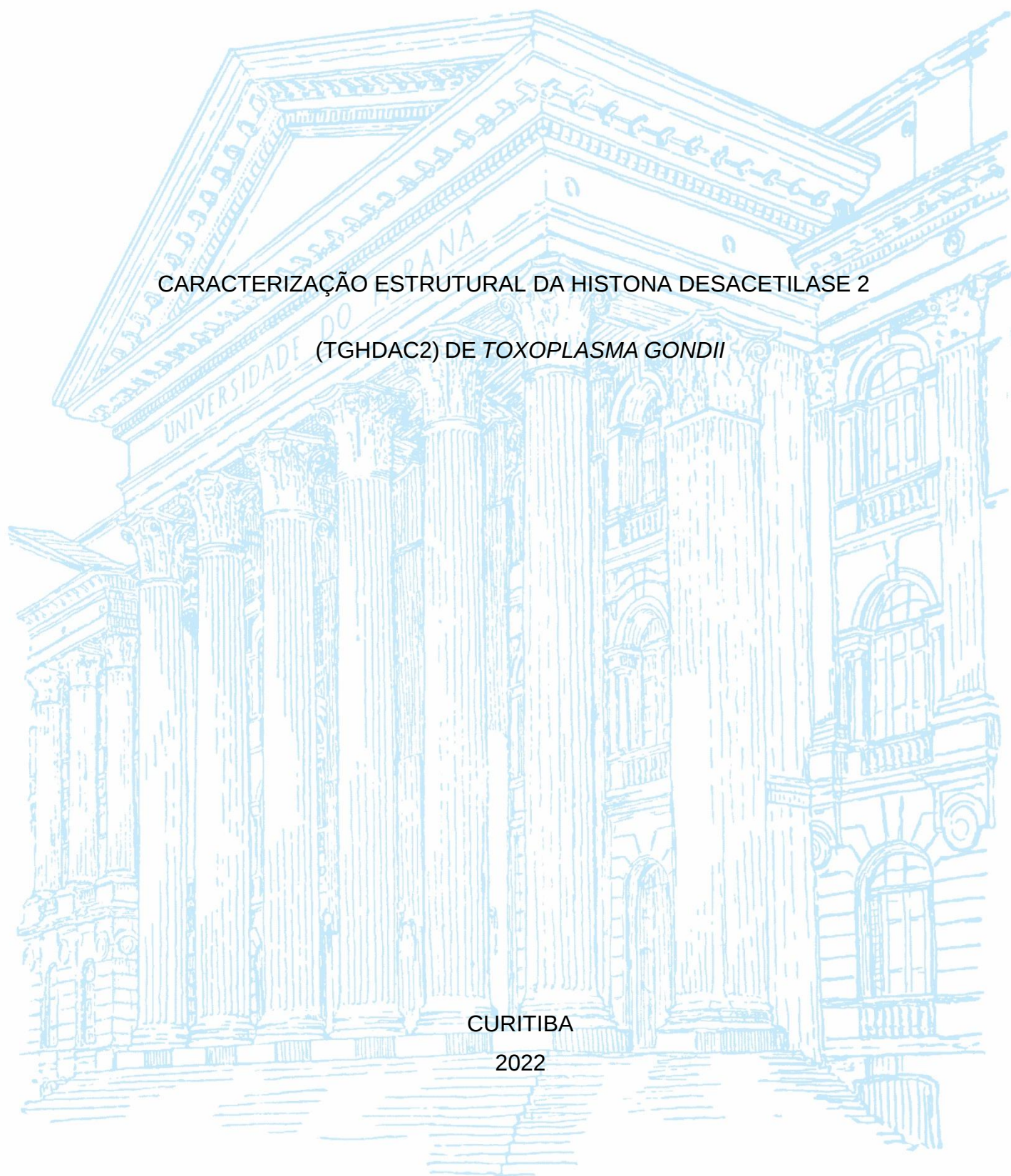


JULIA ZAMITH SCHWARTZ

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA HISTONA DESACETILASE 2
(TGHDAC2) DE *TOXOPLASMA GONDII*

CURITIBA

2022



JULIA ZAMITH SCHWARTZ

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA HISTONA DESACETILASE 2

(TGHDAC2) DE *TOXOPLASMA GONDII*

Monografia apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Sheila Cristina Nardeli

Coorientador(a): Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

CURITIBA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda equipe do laboratório LAPAPI, que me foi sempre muito acolhedora e disposta à ajudar. Um agradecimento especial à Sheila, que me aceitou no laboratório e me deu a oportunidade de trabalhar nesse grupo tão incrível, e à Carol, que dispôs de tempo e paciência para me ensinar e me ajudar nos experimentos, com quem aprendi muito e com quem comemorei junto cada clonagem bem sucedida. Um agradecimento também à pesquisadora Dra Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, que me acompanhou durante os ensaios biofísicos presentes nesse trabalho.

Um agradecimento enorme à minha família, que me deu suporte desde o vestibular ao fim do curso, em especial meus pais, ambos biólogos que amam a profissão e me inspiraram a seguir esse caminho.

Agradeço também à todos os meus amigos, com destaque às amigadas que fiz no curso, que tornaram essa trajetória muito mais divertida, com momentos de conversas e risadas no gramado do campus, dividir um almoço no R.U e comemorar quando passamos em alguma matéria.

Um agradecimento à todos os professores que tive na graduação, e todos os orientadores da UFPR que me aceitaram nos laboratórios, Marcelo Mueller, Vanessa Merlo Kava e Rose Adele Monteiro. Também agradeço aos meus co-orientadores da UFPR, que estiveram comigo no dia a dia do trabalho me ensinando, Adriano Stefanello e Lorena Carolina Pena.

Por último, um enorme agradecimento à Universidade Federal do Paraná, que me proporcionou uma trajetória acadêmica incrível e me formou como bióloga.

RESUMO

A manutenção do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) depende de mecanismos de regulação gênica, essenciais para a virulência e adaptação nos diferentes hospedeiros. A acetilação de histonas é um mecanismo epigenético de regulação da expressão gênica, mediado pela atividade de duas enzimas com atividades opostas, as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs). As HDACs retiram o grupo acetil das histonas (desacetilação) e levam ao silenciamento gênico ao promover maior interação entre as histonas e o DNA, impedindo o acesso de fatores de transcrição. A TgHDAC2 de *T. gondii*, objeto desse estudo, é uma HDAC de classe I, que possui duas inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC, algo exclusivo de *T. gondii* e membros mais próximos do filo, o que difere do padrão evolutivamente conservado dessas proteínas. Estas inserções não possuem função ou estrutura conhecidas, e ocupam uma fração considerável desse domínio, no qual se encontra o sítio ativo da enzima. Além dessa peculiaridade, TgHDAC2 desempenha um papel importante no ciclo celular, e na invasão à célula hospedeira. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi expressar, purificar, e caracterizar estruturalmente a TgHDAC2. Para tanto foram obtidas duas construções desta proteína: TgHDAC2 inteira (TgHDAC2 CDS) e TgHDAC2 sem as inserções aminoacídicas (TgHDAC2 Δ inserções). Análises de dicroísmo circular revelaram maior estruturação e estabilidade de TgHDAC2 Δ inserções, quando comparada a proteína inteira, o que indica um papel mais funcional do que estrutural destas inserções. Além disso, observamos uma clivagem proteolítica das inserções em sistema bacteriano, o que pode indicar um possível mecanismo de regulação pós traducional dessas proteínas, abrindo uma nova gama de alvos para drogas utilizadas em tratamentos anti-toxoplasmose.

ABSTRACT

The maintenance of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) life cycle depends on mechanisms of genetic regulation, essential for virulence and as an adaptation mechanism in different hosts. Histone acetylation is an epigenetic mechanism for gene expression regulation. Two enzymes mediate the process with opposite activity, histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). HDACs remove the acetyl group from histones (deacetylation) and lead to gene silencing by promoting higher interaction between histones and DNA, preventing the access of transcription factors. TgHDAC2 of *T. gondii*, the object of this study, is a class I HDAC, with two amino acid insertions inside the HDAC domain, something exclusive to *T. gondii* and a few other members of the phylum, which differs from the evolutionally conserved pattern of these proteins. These insertions have no known function or structure and occupy a considerable fraction of the HDAC domain where the enzyme's active site is found. In addition to this peculiarity, TgHDAC2 plays an important role in the cell cycle and host cell invasion. Therefore, this project aimed to express, purify and structurally characterize TgHDAC2. For that, two forms of this protein were obtained: the entire TgHDAC2 (TgHDAC2 CDS) and TgHDAC2 without the aminoacidic insertions (TgHDAC2 Δ insertions). Circular Dichroism analysis revealed better structuring and stability of TgHDAC2 Δ insertions compared to the whole protein, indicating a more functional than a structural role for the insertions. Furthermore, we observed a proteolytic cleavage of the insertions in the bacterial system, which may indicate a possible mechanism of post-translational regulation of these proteins, opening a new range of targets for drugs used in anti-toxoplasmosis treatment.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE TgHDAC2	17
FIGURA 2 – MODELAGEM IN SILICO DA ESTRUTURA DE TgHDAC2	18
FIGURA 3 – CONSTRUÇÕES DE TgHDAC2	25
FIGURA 4 – FRAGMENTO AMPLIFICADO DE TgHDAC2Seq1	33
FIGURA 5 – PCRs DE COLÔNIA	34
FIGURA 6 – PCRs DE COLÔNIA- CLONES POSITIVOS	35
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DA 1° CROMATOGRAFIA TgHDAC2CDS.....	36
FIGURA 8 – ANÁLISE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS NA CROMATOGRAFIA	36
FIGURA 9 – WESTERN BLOT DE CDS PURIFICADA POR AFINIDADE.....	37
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA 1° CROMATOGRAFIA TgHDAC2 Δ inserções....	38
FIGURA 11 – FRAÇÕES ELUÍDAS DA 1° CROMATOGRAFIA TgHDAC2CDS.....	39
FIGURA 12 – FRAÇÕES ELUÍDAS DA 2° CROMATOGRAFIA TgHDAC2CDS.....	39
FIGURA 13 –ESPECTRO DC EM 20°C.....	40
FIGURA 14 – ESPECTRO DC EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i> E TOXOPLASMOSE	20
3.2	CICLO DE VIDA DO <i>TOXOPLASMA</i> Erro! Indicador não definido.	
3.3	REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR HDACSErro! Indicador não definido.	
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Material Biológico Erro! Indicador não definido.25	
3.2	Erro! Indicador não definido.	
3.3	Clonagem em vetor pDEST17	27
3.3	Expressão de Proteína	28
3.3	Purificação das proteínas	30
3.3	Dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	Obtenção de TgHDAC2 Δ inserções e TgHDAC CDS Erro! Indicador não definido.33	
3.2	Erro! Indicador não definido.	
3.3	Dicroísmo circular	39
3.3	Discussão	42
6.	CONCLUSÃO	43
7.	Erro! Indicador não definido.	

1.INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), o agente causador da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Seu ciclo de vida é complexo e alterna entre o seu hospedeiro definitivo, o felino, e o hospedeiro intermediário, aves e mamíferos (BLACK; BOOTHROYD, 2000). As formas de vida dos parasitos possuem diferentes perfis de expressão gênica, fundamentais para a virulência, controle do ciclo celular e patogênese nos hospedeiros (RADKE et al, 2005). Sabe-se que mecanismos epigenéticos, mediados por enzimas como as desacetilases de histonas (HDACs), são importantes para regulação da expressão gênica destes parasitos. *Toxoplasma gondii* é um dos parasitos em que os mecanismos epigenéticos tem demonstrado um papel importante no controle temporal preciso da expressão gênica. O parasita completa seu ciclo de vida em hospedeiros diferentes e requer uma transição por diferentes estágios de desenvolvimento. *T.gondii* dominou esse processo, altamente coordenado, regulando a expressão de subconjuntos particulares de genes, necessários em momentos específicos do seu ciclo de vida (DIXON,2010). Histonas acetiltransferases (HATs), histonas desacetilases (HDACs) e histonas metiltransferases (HMTs) são considerados os maiores reguladores epigenéticos em protozoários parasitos. A inibição dessas enzimas resulta em uma significativa alteração nas modificações em histonas, o que traz consequências para os processos de transcrição e tradução do parasita (SETO, 2014). As HATs são responsáveis pela adição de grupos acetil nos resíduos de lisinas das histonas, neutralizando a carga positiva dessas proteínas, diminuindo sua afinidade pelo DNA negativo, e consequentemente, facilitando a transcrição gênica (ARROWSMITH et al, 2012). Antagonicamente, as HDACs retiram esse grupo acetil das histonas (desacetilação) e levam ao silenciamento gênico. Sendo assim, as HDACs estão envolvidas, principalmente, com repressão da transcrição ao promover maior interação entre as histonas e o DNA, favorecendo a compactação da cromatina e, dificultando o acesso ao DNA pela maquinaria de transcrição da célula (SETO; YOSHIDA, 2014). Nos últimos anos, as HDACs têm gerado grande interesse, visto que diversos inibidores destas enzimas têm se mostrado eficazes para o tratamento de muitas doenças, como câncer e até mesmo contra parasitas, como *Plasmodium* e *Leishmania*. Um esforço de caracterização de novas HDACs e novas estratégias de inibição, que se mostrem específicas e eficientes se fazem necessárias (DARKIN-

RATTRAY et al, 1996, SETO,2014). As HDACs com domínio clássico, ou seja, dependentes de zinco, são pertencentes as classes I, II e IV, e as de domínio não clássico estão na classe III, conhecidas por sirtuínas, que utilizam NAD⁺ como cofator. As HDACs de classe I são enzimas principalmente nucleares e constantemente expressas, embora em mamíferos algumas das enzimas desta classe sejam tecido-específicas (MICELLI; RASTELLI, 2015). As HDACs dessa classe possuem domínio bastante conservado estruturalmente, contendo basicamente um domínio formado por 8 folhas- β paralelas circundado por α -hélices (FINNIIN et al, 1999).

A TgHDAC2 de *T. gondii*, objeto desse estudo, é uma HDAC de classe I, única de Sarcocystidae, pois possui duas inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC característico (Figura 1). O papel dessa proteína no ciclo celular e invasão da célula hospedeira foi caracterizado previamente em nosso grupo, utilizando mutantes nocaute para o gene *tghdac2* (dados não publicados). O gene mostrou-se não essencial, porém fica claro a diminuição da proliferação do parasita e invasão da célula hospedeira. Apesar disso, a função dessas inserções aminoacídicas na atividade da proteína continua desconhecida, sendo que estas ocupam uma fração considerável do domínio HDAC (Figura 2)(SIQUEIRA,2018).



Figura 1 – Análise da sequência de TgHDAC2 utilizando o banco de dados de domínios conservados do NCBI (*Conserved Domains Database-CDD*). Podem ser visualizados os domínios HDAC (em verde). Fonte:NCBI.

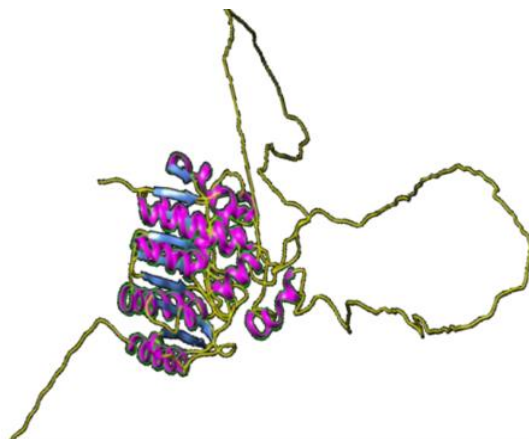


Figura 2 – Estrutura proteica modelada por homologia feita com o servidor HHPRED. A região globular é conhecida e é onde se encontra o sítio ativo da proteína. Destacado em amarelo estão as duas inserções no domínio HDAC para as quais não se conhece a estrutura terciária.

As HDACs são proteínas da via de regulação epigenética, porém também desempenham outros papéis em mecanismos como a replicação e o reparo do DNA. Além disso podem atuar em proteínas não-histonas, como aquelas do citoesqueleto, revelando uma gama de potenciais mecanismos afetados por essas enzimas. Por essa função em processos essenciais, nosso grupo vem buscando compreender como estas proteínas atuam em *T. gondii* de modo a compreender melhor a biologia do parasita. Além disso, inibidores dessas proteínas já se mostraram eficazes para o tratamento de muitas doenças, inclusive contra parasitoses.

A função de TgHDAC2 em *T. gondii* já vinha sendo estudado pelo nosso grupo, entretanto um de nossos interesses e que levou ao desenvolvimento deste projeto foi entender a contribuição das inserções aminoacídicas de TgHDAC2 para a estrutura da proteína, uma vez que não existe nenhuma estrutura resolvida semelhante a elas. Ou seja, são regiões completamente inéditas, das quais não se sabia nada a respeito de estrutura ou função.

Inserções em domínios funcionais são conhecidas por auxiliar no reconhecimento de fatores específicos de transcrição (HONG, 2009). Outra possibilidade é que essas inserções desempenhem um papel nas modificações pós traducionais da proteína (um mecanismo de regulação da função), como já foi reportado para domínios HDACs de outros organismos (SETO, 2014).

Entender o impacto dessas inserções na estrutura da proteína poderia revelar um novo mecanismo para ser explorado como potencial alvo de drogas anti-*Toxoplasma* a ser aplicado em estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente duas construções da Histona Desacetilase 2 de *Toxoplasma gondii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir uma proteína TgHDAC2 sem as inserções aminoacídicas (TgHDAC2 Δ domínio)
- Expressar e purificar TgHDAC2 inteira.
- Analisar estruturalmente todas as construções por dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz.

3 . REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TOXOPLASMA GONDII E TOXOPLASMOSE

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), a única espécie conhecida do gênero *Toxoplasma*, é um parasita intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose. Pertence ao filo Apicomplexa, junto com *Plasmodium* (causador da malária), *Cryptosporidium* (causador de um tipo de coccidiose) e *Babesia* (causador da babesiose, ou doença do carrapato). Os parasitas Apicomplexa são caracterizados pela presença de um complexo apical fundamentais para as etapas de virulência e invasão da célula hospedeira (dando origem ao nome 'Apicomplexa'). *Toxoplasma* ainda possui uma organela plastídeo-like, de origem endossimbiótica secundária, denominado apicoplasto, presente em alguns, mas não em todos os membros do filo (GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007).

A toxoplasmose é uma protozoonose que afeta a população do mundo inteiro, estimando-se que cerca de 1/4 da população mundial se encontra infectada, na maioria das vezes, de forma assintomática (GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007;DUNAY,2018). *Toxoplasma gondii* pode infectar praticamente todos os animais de sangue quente, incluindo seres-humanos, onde ocorre apenas a reprodução assexuada do parasita, atuando como potenciais hospedeiros intermediários e reservatórios. As vias de transmissão também são muito amplas, podendo acontecer pelo solo, água e por alimentos contaminados. Apesar da reprodução sexuada se limitar ao hospedeiro felino, o ciclo de vida do *Toxoplasma* não depende exclusivamente da infecção do hospedeiro definitivo, podendo haver transmissão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários (GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007).

A transmissão da toxoplasmose para humanos ocorre principalmente pela ingestão da carne, quando consumida crua ou mal-passada, podendo conter cistos teciduais (com bradizoítas). Também pode ser transmitido pela água, solo ou alimentos contaminados com fezes de gatos, que contenham oocistos esporulados do parasita. Outras possíveis vias de contágio são: transmissão vertical (da mãe ao feto, durante a gestação) e transfusão sanguínea, em que nesses últimos casos o contágio se dá pelos taquizoítas, presentes nos tecidos e fluídos corporais (GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007).

Os sintomas, quando aparecem, em indivíduos imunocompetentes, são semelhantes a uma infecção gripal, e em algumas semanas, o parasita entra em latência em forma de cistos teciduais, dando início à fase crônica da doença. Em pacientes imunossuprimidos costumam aparecer sintomas mais graves, como miocardite, pneumonite ou encefalite e toxoplasmose ocular (que pode levar à cegueira). Quando a primeira infecção ocorre durante a gestação (toxoplasmose congênita) isso pode trazer severas consequências ao feto, como prematuridade, aborto espontâneo, coriorenite, calcificações intracranianas, hidrocefalia, toxoplasmose ocular, entre outros.(GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007).

A combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico no estágio ativo da infecção é atualmente o padrão ouro para tratamento da toxoplasmose, mas as taxas de falha são significativas, sendo pouco efetivo por apresentar diversos efeitos colaterais. Nas últimas décadas não houveram grandes avanços no surgimento de novos tratamentos, fazendo-se necessário a concentração de esforços para a busca de tratamentos mais modernos para toxoplasmose (DUNAY,2018;GILOT-FROMONT;2012,ESCAFFIT,2007).

3.2 CICLO DE VIDA DO *TOXOPLASMA*

O ciclo de vida de *T. gondii* é complexo, apresentando uma morfologia e métodos de divisão distintos em cada estágio (sexual e assexual) e alternando a infecção entre os felinos (hospedeiros definitivos), onde ocorre a fase sexuada do ciclo e os hospedeiros intermediários (outros vertebrados, incluindo humanos), onde ocorre o ciclo assexuado (BARBOSA,2014;DUNAY,2018).

No hospedeiro definitivo, o ciclo se inicia quando um felino é infectado ao consumir alimentos contendo *T. gondii* em qualquer estágio de desenvolvimento. Os parasitas são liberados no sistema digestivo (se a infecção foi através de cistos), invadindo as células epiteliais do intestino delgado, onde o ciclo sexuada se inicia, com uma série de divisões celulares, que duram de 3 a 15 dias, e terminam em um estágio pré-gametogênese, onde os parasitas se encontram dispostos em forma de roseta. Nesse estágio são formados macrogametas e microgametas. Quando os microgametas são liberados das células intestinais, são atraídos por quimiotaxia até os macrogametas, ocorrendo a fecundação e originando o zigoto. O zigoto então produz uma parede biproteica ao seu redor, se tornando um oocisto, que rompe as células do intestino, sendo liberado no ambiente junto com as fezes do felino. Durante

alguns dias, os cistos passam por um processo de maturação chamado de esporogonia, um tipo de meiose que forma cistos esporulados (forma infectante), contendo em seu interior oito esporozoítos cada (BARBOSA,2014; GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007).

Quando os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos liberados nas fezes, ao alcançar o estômago, enzimas proteolíticas destroem a parede do oocisto, liberando os esporozoítas no intestino, onde se diferenciam em taquizoítas. No interior das células do epitélio intestinal, os taquizoítas localizam-se sempre em vacúolos parasitóforos. O parasita então alcança outros tecidos por meio da circulação sanguínea e/ou linfática, se multiplicando rapidamente por endodiogenia no interior do vacúolo parasitóforo. O ritmo dessa multiplicação é regulado pela resposta imunológica do hospedeiro (BARBOSA,2014).

Entre 7 e 10 dias após a infecção, por pressão do sistema imune do hospedeiro, o processo de endodiogenia passa a ocorrer de forma lenta com interconversão dos taquizoítas em bradizoítas e formação de cistos teciduais, localizados principalmente no sistema nervoso central e na musculatura esquelética e cardíaca (BARBOSA,2014).

Os cistos teciduais representam o estágio final do ciclo de vida de *T. gondii* e são predominantes durante a infecção crônica da doença, podendo permanecer latentes nos tecidos para o resto da vida do hospedeiro, comumente no sistema nervoso central, na retina e na musculatura esquelética e cardíaca. Esses cistos podem permanecer cronicamente nos tecidos sem gerar uma resposta inflamatória ou imunológica, evitando, assim, sua destruição (BARBOSA,2014).

Em alguns indivíduos, principalmente nos imunocomprometidos, os cistos teciduais podem se reativar, fazendo com que os bradizoítas se diferenciem em taquizoítas, voltando à fase aguda da doença (BARBOSA,2014;GILOT-FROMONT,2012; ESCAFFIT,2007;DUNAY,2018).

3.3. REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR HDACS

No centro da regulação epigenética estão as histonas, proteínas que participam do enrolamento da cromatina, formando nucleossomos, junto com o DNA. São pequenas proteínas de caráter básico, com alta proporção de aminoácidos

carregados positivamente, como lisinas e argininas. Esse caráter básico permite a atração do DNA (negativo) às histonas, mantendo a estrutura do DNA (HO,2020).

As histonas são suscetíveis a diversas modificações pós traducionais (MPTs) especialmente nas caudas N- e C-terminais expostas fora do nucleossomo, dentre elas alguns exemplos são a acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Entre as MPTs a acetilação reversível ganha destaque, seja por sua abundância, seja por desempenhar diversas funções regulatórias, principalmente regulando a transcrição gênica (BARBOSA,2014).

A acetilação favorece a expressão gênica, pois transforma os grupos aminas das cadeias laterais das lisinas em amidas, neutralizando as cargas positivas, e assim diminuindo a atração entre essas terminações das histonas com os grupos fosfato negativos do DNA. Consequentemente, diminui a interação das histonas com o DNA, tornando a cromatina mais relaxada (eucromatina), e possibilitando o acesso da RNA polimerase e fatores de transcrição, promovendo a transcrição gênica. A desacetilação de histonas causa o efeito contrário, tornando a cromatina mais condensada e reprimindo a expressão gênica. Esse processo de modificação das cadeias laterais das lisinas é feito por uma família de enzimas denominadas histona acetiltransferase (HATs), e é um processo reversível, portanto, uma outra família de enzimas é capaz de remover esses grupos acetil das lisinas das histonas, sendo essas as histonas desacetilases (HDACs). As HDACs aumentam as cargas positivas das histonas, reforçando a alta afinidade entre essas proteínas e o DNA, restituindo a heterocromatina, o estado condensado e não acessível da cromatina. O balanço acetilação/desacetilação feito pelas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) é um mecanismo importante de regulação transcricional (HO,2020).

A superfamília das HDACs possui 18 membros em eucariontes, levando em conta as análises filogenéticas, tendo diferentes origens evolutivas, e sendo divididas em quatro classes, de acordo com o domínio, cofator e similaridade na sequência de aminoácidos com as proteínas de levedura. As HDACs de classe I e II e IV são denominadas HDACs clássicas, por possuírem o domínio HDAC clássico e utilizar zinco como cofator. As de classe I são homólogas ao fator de transcrição Rpd3 de levedura, e são geralmente encontradas no núcleo. Já as de classe II, podem ser encontradas no núcleo e citoplasma e são homólogas à Hda1 de levedura. A classe IV possui apenas um representante em mamíferos, a HDAC11, que possui

características mistas entre as classes I e II. As HDACs clássicas apresentam alto nível de redundância e versatilidade, compensando o eventual déficit uma da outra (BARBOSA,2014;KRISTENSEN,2009).Na classe III estão as sirtuínas, que são homólogas à Sir2 de levedura, e possuem dependência de NAD⁺ para sua atividade, sendo encontradas no núcleo, citoplasma e mitocôndrias (BARBOSA,2014).

O sítio ativo das HDACs consiste em um bolso cilíndrico no qual os resíduos de lisina se encaixam quando a desacetilação acontece. Os aminoácidos que cobrem as paredes desse bolso são hidrofóbicos e aromáticos. Um íon de zinco se localiza perto do fundo desse bolso, coordenado por aminoácidos e uma única molécula de água. Durante a desacetilação, a molécula de água age como nucleófilo, atacando o carbonil do nitrogênio acetilado da lisina, em uma reação onde o íon de zinco ajuda a posicionar essa molécula de água.(KRISTENSEN,2009). Os resíduos de aminoácidos que formam esse bolso cilíndrico e a cavidade adjacente das classes I e II de HDACs são altamente conservados, assim, é possível desenhar fármacos inibidores de HDACs bastante específicos (KRISTENSEN,2009).

Além do papel de regulação epigenética pela desacetilação de histonas, foi descoberto que as HDACs interagem acetilando diversas outras proteínas, desempenhando também um papel regulatório na atividade destas. Grande parte dessas proteínas fatores de transcrição e cofatores(KRISTENSEN,2009).

Além do papel na regulação da expressão gênica, a expressão de HDACs clássicas tem sido relacionada com doenças como câncer e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esquizofrenia. Nesse sentido, fármacos inibidores de HDACs tem sido cada vez mais estudados, com alguns já aprovados pelo FDA para tratamento de diversos tipos de câncer. Esses inibidores atuam por diversos mecanismos de ação, promovendo a acetilação de histonas, e assim, induzindo a diferenciação de células tumorais, interrompendo a divisão celular e ativando a cascata de apoptose e aumento da sensibilidade das células aos tratamentos quimioterápicos (HO,2020;KRISTENSEN,2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Para avaliar a estrutura do domínio atípico com as inserções, duas construções foram utilizadas. Uma delas, TgHDAC2 CDS, já havia sido previamente construída pelo grupo e já se encontrava em vetor de expressão (pDEST17), (Figura 3). TgHDAC2 CDS trata-se da sequência inteira da proteína, já TgHDAC2 inserções se refere à região correspondente às inserções aminoacídicas presentes no domínio, entretanto devido a problemas metodológicos esta não foi utilizada no estudo. A última construção que foi realizada é uma proteína sem estas inserções, correspondente a um domínio HDAC característico completo.



Figura 3. Esquema ilustrativo das construções utilizadas de TgHDAC2.

4.2 Clonagem em vetor pET28A.

Para a obtenção da proteína sem as inserções aminoacídicas, e clonagem no vetor pET28a (Novagen), que insere uma etiqueta de 6x histidina na porção N-terminal da proteína, a estratégia de clonagem foi dividir este gene em duas sequências, uma a montante às inserções, que corresponde a 235 pb (seq1), e outra a jusante, tendo 1075 pb (seq2), deletando, então, a região entre os aminoácidos 74 e 276. Aos *primers* dessas sequencias foram adicionados sítios de restrição para duas endonucleases. Para a sequência 1 foram adicionados os sítios de reconhecimento das enzimas *NdeI* e *BamHI*, já para sequência 2 foram adicionados os sítios das enzimas *BamHI* e *HindIII*, sendo assim foi possível, primeiramente clonar a sequência 1 no vetor e posteriormente a sequência 2, uma vez que houve complementariedade de bases gerada pela digestão da enzima *BamHI*.

O cDNA de *Toxoplasma* foi utilizado como molde para a reação de PCR. Este, por sua vez, foi amplificado por RT-PCR, a partir do mRNA extraído do parasita. Para extração do RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrição do fabricante. Do cDNA obtido, utilizamos 2 µL como molde para uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction) convencional, utilizando os *primers* para amplificação das sequências 1 e 2 de *tghdac2*. Ao DNA foi adicionado tampão apropriado para a enzima diluído dez vezes, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgSO₄, 10 pmol de cada *primer* e 1 unidade da enzima de alta fidelidade *Platinum Taq HiFi DNA Polymerase* (Invitrogen), para uma reação final de 20 µL. A reação iniciou-se com uma etapa de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C durante 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto e 30 segundos, além de extensão final a 68°C por 10 minutos.

O resultado da amplificação foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (1 g de agarose para 100 mL de TBE-Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8). Foram utilizados 5 µL da reação de PCR em tampão de amostra para DNA (25% de Ficoll, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol). O gel de agarose com a amostra de PCR e o marcador de massa molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) foi submetido a um campo elétrico de 100 V por 40 minutos, submerso em tampão TBE. Para visualização do DNA, o gel foi submerso em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta. Após a confirmação, os produtos de PCR foram purificados com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Com os amplicons purificados, estes foram ligados, separadamente, ao plasmídeo pGEM pela reação da *T4 DNA ligase* (Invitrogen), em que 10 µg de vetor e 3,5 µg de inserto foram ligados pela ação da *T4 DNA ligase* (Invitrogen) a 16°C por 18 horas (1U/microlitro).

Parte desta reação foi transformada em bactérias *E. coli* Top 10, cálcio competentes. As bactérias adquiriram os plasmídeos 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 (LuriaBertani: triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) 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 LB e kanamicina.(SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As colônias obtidas foram confirmadas por PCR de colônia, e as que continham o inserto de tamanho correto foram crescidas em meio líquido para obtenção de massa para extração plasmidial (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os plasmídeos foram extraídos por meio de kit QIAprep® Miniprep (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para sequenciamento. Clones das duas sequências sem mutações foram clonados em pET28A previamente digerido com *NdeI* e *HindIII* e transformados em *E.coli* TOP10, conforme descrito acima. A seq1 foi previamente inserida no plasmídeo, seguida da ligação de seq2 neste. O plasmídeo foi novamente extraído e transformado por choque-térmico em bactérias de expressão *E. coli* ΔSlyD, Rosetta-gami e *E.coli* Tuner, submetendo-as a testes de expressão, para a escolha da melhor cepa.

4.3 Clonagem em vetor pDEST17

Para realizar a clonagem da sequência de DNA que codifica para a construção da proteína TgHDAC2 CDS e obtenção da proteína recombinante, foram utilizados os vetores pDONR™221 e pDEST™17, da plataforma Gateway (Invitrogen). Aos primers foram adicionadas as sequências attB, que recombina com os sítios attP no vetor pDONOR 221 (donor vector).

A região codificante de *tghdac2* foi amplificada a partir de 2 µL do cDNA obtido a partir do RNAm de *T. gondii* utilizando a enzima Platinum® Pfx DNA Polymerase (Thermo Fisher 45 Scientific). A reação contemplou as etapas de desnaturação inicial (94°C, 5 minutos) seguido de 30 ciclos (94°C, 15 segundos; 57°C, 30 segundos; 68°C 2 minutos e 30 segundos) e extensão final (68°C, 10 minutos), seguindo as demais instruções do fabricante. Os amplicons foram purificados com o kit de purificação de produtos de PCR (QIAquick PCR Purification Kit-QIAGEN), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a purificação, 50 fmol do produto de PCR purificado foi recombinado em 150 ng do vetor pDONR™221 (Invitrogen), adicionando-se 2 µL da enzima BP Clonase™ (Invitrogen) e mantido a 25°C por 18 horas. Da reação de recombinação, utilizamos 3 µL para transformação em *E. coli* DH5α através de choque térmico, como descrito, adicionando kanamicina para seleção. Quando ocorre a recombinação entre os sítios attB do amplicon e attP do vetor, este plasmídeo contendo o inserto possuirá então um novo sítio para recombinação denominado attL, que poderá ser recombinado em qualquer vetor de destino do sistema Gateway de

clonagem que contenha o sítio attR para recombinação. Neste caso foi usado o vetor de expressão pDEST™17 (Invitrogen) (SIQUEIRA, 2018).

Uma vez confirmados por PCR de colônia, os plasmídeos contendo o fragmento gênico foram extraídos por meio de kit QIAprep® Miniprep (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. 150 ng do plasmídeo de entrada (pDONR221) contendo o inserto foram recombinados em 150 ng do vetor de expressão pDEST™17 (Invitrogen), por meio da adição de 2 µL da enzima LR Clonase™ (Invitrogen), a 25°C por 3 horas. O vetor pDEST17 possui o promotor T7 proveniente do bacteriófago T7, que é considerado um promotor forte, que garantirá altos níveis de expressão da proteína. Este vetor também adiciona uma etiqueta de 6X histidina na porção N-terminal, permitindo a purificação da proteína em uma coluna de níquel, uma vez que a histidina tem afinidade por este metal.

4.4 Expressão de Proteína

Para expressão de TgHDAC2 CDS, as bactérias (oriundas de pré-inóculo) da cepa *E. coli* Rosetta gami™ 2 (DE3) pLysS, contendo o plasmídeo pDEST17 com a sequência de interesse, foram cultivadas em 3 L de meio LB com adição dos antibióticos ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm. Quando a cultura atingiu densidade óptica entre 0,6 e 0,8, foi adicionado 0,5 mM de IPTG (Isopropil β-D1-tiogalactopiranosida) ao meio e novamente as culturas foram mantidas a 37°C sob agitação durante 4 horas. Após o tempo de expressão da proteína, as bactérias foram sedimentadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Para o teste de expressão de TgHDAC2 Δinserções, as bactérias (oriundas de pré-inóculo) das cepas *E. coli* Δ SlyD, *E. coli* Rosetta-gami e *E. coli* Tuner (DE3) contendo o plasmídeo pET28A com a sequência de interesse, foram cultivadas em dois frascos de 5 ml de meio LB com adição de kanamicina (50mg/ml), cloranfenicol (34mg/ml) (para o cultivo de *E. coli* Δ SlyD e *E. coli* Rosetta-gami) e tetraciclina (para o cultivo de *E. coli* Rosetta-gami) em 37°C sob agitação constante a 200 rpm.

A cepa *E. coli* Δ SlyD traz a vantagem de expressar proteínas livres de SlyD, uma proteína nativa de *E. coli* que possui afinidade por matrizes metálicas, dificultando assim, a purificação por afinidade da proteína recombinante. As estirpes de *E. coli* Rosetta-Gami tem como vantagem a formação aprimorada de ligações dissulfeto e a maior expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raros em procariontes.

As estirpes de *E.coli* Tuner (DE3) contêm uma mutação no gene *Lac permease* (Lac ZY), o que permite a entrada de IPTG em todas as células da cultura, homogeneizando a indução.

Ao atingir a D.O. de 0,4, um dos frascos foi deixado na mesma temperatura e rotação, enquanto o outro foi transferido para temperatura de 20°C, na mesma rotação. Ao atingir a D.O. de 0,6, as bactérias de ambos os frascos foram induzidas com IPTG 0,5 mM. O frasco a 37°C foi deixado induzindo por 4 horas, enquanto o frasco a 20°C foi deixado induzindo por 16 horas. Após esse tempo, ambas as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram ressuspensos em 50 µL de tampão para sonicação (fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 e NaCl 500 mM), com os inibidores de proteases, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 0,1 M e benzamidina 5 mM, além de lisozima 10 µg/mL. A suspensão bacteriana foi submetida à lise por sonicação, com 8 ciclos de 15 segundos na amplitude de 5. Uma parte do lisado foi centrifugada a 25.000 x g por 30 minutos, e outra parte foi mantido o sobrenadante, para determinar se haveria proteína na fração do extrato total, e assim determinar sua solubilidade.

As frações do extrato total, solúvel e insolúvel foram submetidas a técnica eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 13%), no qual foi visto que a proteína se encontrava na fração insolúvel e o melhor nível de expressão foi na condição 20°C, 16h, na cepa de expressão *E.coli* Δ SlyD. Após definir o melhor protocolo para sua expressão, a proteína foi produzida em maior escala, em 3 L de LB.

A técnica eletroforética SDS-PAGE 13% seguiu o seguinte protocolo: As amostras proteicas foram ressuspensas em tampão de amostra (TA) 4X (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) na proporção de 3:1 de amostra e TA. As amostras foram submetidas a aquecimento a 95°C para desnaturação das proteínas, seguido de agitação vigorosa para quebra de DNA e uma breve centrifugação a 15.000 x g. As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 13% (LAEMMLI, 1970) em tampão de eletroforese apropriado, contendo SDS 1%. Como marcador de massa molecular foi utilizado PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Para visualização das bandas correspondentes as proteínas, os géis foram submersos em solução de coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético

10%), por cerca de 15 minutos. Após o tempo de coloração, os géis foram fervidos em água para retirada do excesso de corante, e visualização das bandas.

As proteínas expressas em larga escala foram então lisadas com a mesma metodologia citada anteriormente. O sobrenadante foi desprezado, uma vez que as proteínas se encontram na fração insolúvel. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de tampão A (Tampão fosfato de sódio 200 mM pH 7,5 suplementado com ureia 8 M e NaCl 500 mM).

4.5 Purificação das proteínas

A purificação foi feita utilizando técnica de cromatografia de afinidade em cromatógrafo AKTA pure (GE), utilizando uma coluna com resina de níquel HisTrap HP 1mL (GE), que possui afinidade pela cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes. Após a injeção da proteína na coluna, com adições crescentes do tampão A, a eluição foi feita com tampão B (fosfato de sódio 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 1 M, uréia 4 M em coeficiente linear. A cada etapa de purificação foi gerado um cromatograma e as frações eluídas foram analisadas em gel SDS-PAGE 13% para determinação da pureza da amostra, além de técnica de Western blot.

Para a realização da técnica de Western blot, após a corrida eletroforética, as amostras do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em cuba semi-seca (Semi-DryBIORAD), 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. A membrana foi lavada em água corrente deionizada e bloqueada em PBS/leite desnatado 5%, sob agitação por uma hora. Após o bloqueio, o anticorpo primário (anti-His 1:15.000) foi incubado também na presença de 5% de leite, por uma hora. 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 (1:15.000) por igual período, sob agitação. A revelação foi feita em fotodocumentador Odyssey.

Após a primeira etapa de purificação, as amostras foram dialisadas no mesmo tampão A, porém em concentrações decrescentes de ureia (3-0 M). As amostras dialisadas passaram por uma segunda etapa de purificação por afinidade, seguindo o mesmo protocolo, com a diferença que foram utilizados tampões A e B sem ureia nessa etapa. Também foram testadas técnicas de purificação por cromatografia de troca iônica, mas a que se mostrou mais eficiente foi a cromatografia de afinidade,

sendo apenas esta utilizada purificação das proteínas ao longo do projeto em andamento.

Os procedimentos de expressão e purificação por afinidade foram realizados sempre que necessário para realização de novos experimentos.

4.6 Dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz

Para realizar os experimentos de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz, as proteínas purificadas foram concentradas a 0,7 mg/mL (TgHDAC2 Δ inserções) e 0,17 mg/mL (TgHDAC2 CDS). As amostras foram colocadas em uma cubeta com caminho ótico de 1 mm no equipamento Jasco J815 CD Spectrometer, que possui o software Spectra Measure para aquisição dos espectros. Foi medido o comprimento de onda de 198 a 260 nanômetros (nm). As medidas em comprimentos de onda inferiores à 200 nm são importantes para estimativas de regiões desenoveladas (coil), já as medidas nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm são importantes para as estimativas do conteúdo de estrutura de α -hélice e em 215 nm as folhas- β . Dessa forma foi possível estimar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas e se elas não estavam desnaturadas.

Neste equipamento também foi possível realizar a desnaturação térmica da proteína, para saber sobre sua estabilidade em diferentes temperaturas. Para tanto, a temperatura foi elevada gradualmente de 20°C a 90°C, e o sinal de dicroísmo circular nos comprimentos de onda de 205, 208, 215 e 222 nm foram avaliados a cada elevação de 5°C. Após atingir 90°C, um espectro contínuo entre os comprimentos de onda de 190 e 260 nm foi coletado. A análise dos resultados do dicroísmo circular foi feita com o software Microsoft Excel 2013, onde foi avaliada a porcentagem de desnaturação térmica e o espectro obtido nos diferentes comprimentos de onda, nas diferentes temperaturas. O espalhamento dinâmico de luz (DLS), que avalia a estrutura quaternária da proteína através da detecção do espalhamento da luz incidida na amostra, foi obtido no equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt), utilizando o software Dynamics 7.17. Cerca de 4 μ L da amostra foi colocada na cubeta apropriada para o equipamento, que retornou resultados a respeito da homogeneidade, massa molecular e estado da proteína (monômeros ou agregados). Para complementar os resultados obtidos em DLS, foram feitas purificações com cromatografia de Gel filtração, com a finalidade de avaliar a homogeneidade e massa molecular das proteínas nas amostras. A cromatografia de Gel Filtração foi realizada utilizando 0,5

ml de amostra de proteína já purificada, suspendida em tampão A, NaCl 180 mM, sem ureia. A coluna utilizada foi Superdex 200 10/300 (GE).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse projeto foi realizado em colaboração com a Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza do Instituto Carlos Chagas.

5.1 Obtenção de TgHDAC2 Δ inserções e TgHDAC CDS

Para amplificar a sequência à montante das inserções, denominada seq1 (235pb), foi realizada uma RT-PCR a partir do mRNA extraído dos parasitas (*T. gondii* cepa RH Δ hxgprt Δ ku80), gerando o cDNA, de modo a obter a sequência sem os íntrons. O cDNA foi utilizado como molde para reação de PCR, que após análise em gel de agarose 1% confirmou a amplificação do fragmento de interesse (Figura 4). Devido a presença de bandas inespecíficas, a banda correspondente ao fragmento de interesse foi purificada com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. O fragmento gênico foi inserido em vetor pGEM T-easy (Promega) por reação de ligação com enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) e transformados em *E. coli* Top 10. As colônias positivas foram selecionadas por PCR de colônia que foram expandidas para purificação plasmidial. O plasmídeo purificado foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I para liberação do inserto seq1, e então inserido por ligação em pET28A, previamente tratado as mesmas enzimas.

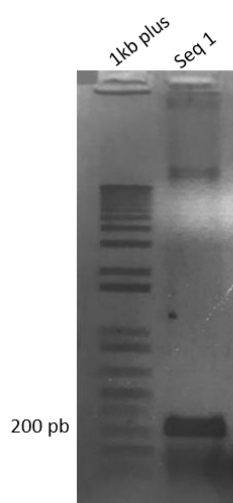


Figura 4. Gel de agarose 2% revelando o fragmento amplificado de TgHDAC2Seq1, de 235pb. Marcador: 1Kb Plus .

Após a realização de reação de PCR da sequência denominada seq2, de 1075 pb (à jusante das inserções) esta foi purificada e inserida em vetor pGEM T Easy, por reação de ligação com enzima *T4 DNA ligase* (clonagem conforme foi descrito para seq1). Para posterior clonagem em pET28A, o inserto seq2 foi liberado do plasmídeo por outra reação de digestão, com as mesmas enzimas. A reação de digestão foi analisada em gel de agarose 1%, e a banda correspondente ao fragmento de interesse foi removido do gel e purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O fragmento purificado foi então inserido por ligação em pET28A (o qual já continha o fragmento de seq1 inserido) previamente digerido com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, além do tratamento com 0,1 µl de enzima SAP (no próprio tampão utilizado para as enzimas de digestão), por 1h a 37°C, para evitar sua circularização novamente sem o inserto seq2.

O tratamento do vetor com a enzima SAP (uma fosfatase alcalina) se trata de uma reação de desfosforilação, em que o terminal 5' do plasmídeo linearizado é desfosfatado. Dessa forma, o plasmídeo não pode voltar ao estado circular pela reação de ligação com T4 ligase sem que um fragmento externo (o inserto de interesse) seja inserido. O “nick” gerado pela atividade desfosfatase é posteriormente corrigido pela própria maquinaria celular. Essa reação reduz a porcentagem de clones negativos, que não possuem o inserto no plasmídeo. Dessa forma se obteve o gene *tghdac2* sem a porção correspondente as inserções aminoacídicas. A proteína codificada possuirá uma etiqueta de histidina inserida em sua porção N-terminal. A ligação foi transformada em *E.coli* TOP10 foi feita anteriormente para expansão e confirmação, seguida de transformação em *E. coli* ΔSlyD. Para confirmação da presença do vetor com o inserto nos clones, foi feita uma PCR de colônia (Figura 5).

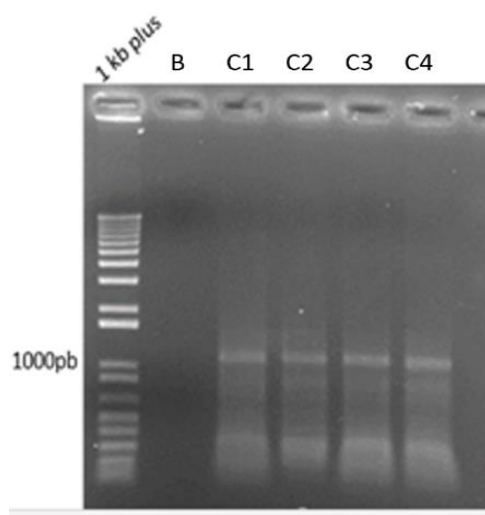


Figura 5. Gel de agarose 1% contendo os produtos de 4 PCRs de colônia. Observa-se o fragmento amplificado de TgHDAC2 Δ inserções, de 1310pb em vetor pET28A, nos poços C1, C2, C3 e C4. B:branco.

Demos continuidade com o clone 1 para proceder com a clonagem, em que foi feito minipreparação do plasmídeo contendo o inserto, na mesma metodologia descrita previamente, e este foi transformado em *E.coli* Δ SlyD confirmação da presença do inserto no tamanho esperado foi obtida por PCR de colônia (Figura 6).

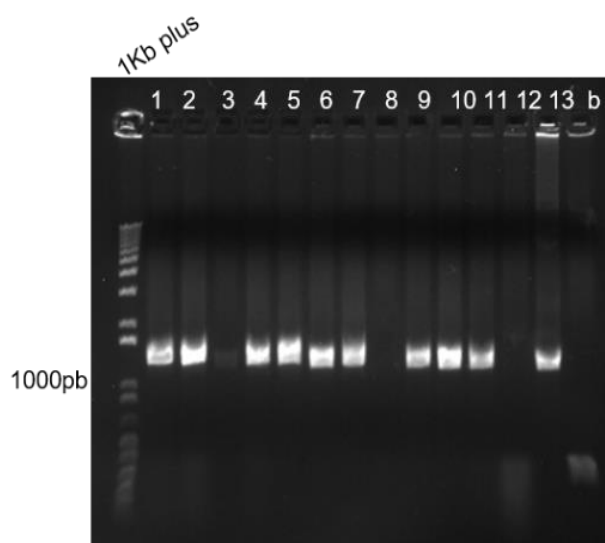


Figura 6. Análise em gel de agarose 1% dos produtos obtidos por PCR de colônia de 4 clones positivos. Pode-se observar o fragmento amplificado de TgHDAC2 Δ inserções de 1310 pb. Os números indicados (1-13) correspondem aos clones testados (1-13), sendo o último poço o controle negativo (b: branco).

5.2 Expressão e Purificação das proteínas

Para cada experimento em que foi necessário a expressão de Rosetta-gami pDEST17 TgHDAC2 CDS, a cepa foi cultivada em 3L de LB. Essa construção (CDS, proteína inteira) se mostrou de difícil expressão, sendo consideravelmente menos expressa que a construção truncada TgHDAC2 Δ inserções. As proteínas expressas foram purificadas por técnicas de cromatografia de afinidade, sempre em duas etapas (Figura 7). Porém, apesar das etapas de purificações, uma banda de menor tamanho (o mesmo tamanho da construção TgHDAC2 Δ inserções 47 KDa) continuava contaminando a amostra, como pode ser visto na figura 8.

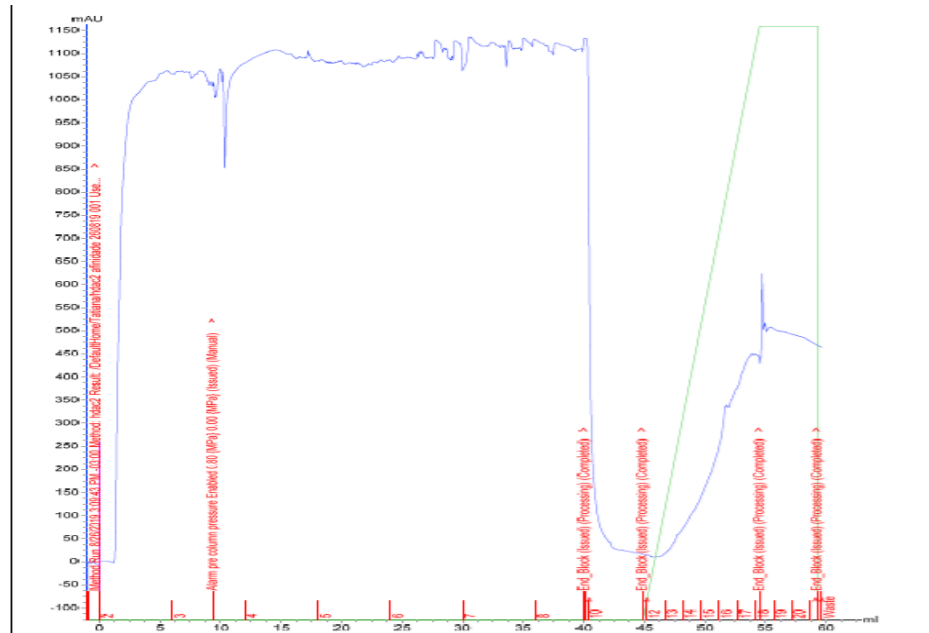


Figura 7. Cromatograma da purificação obtido na 1ª etapa de cromatografia de afinidade de TgHDAC2 CDS. As primeiras frações até 45 ml correspondem às lavagens com tampão A (pico de proteínas inespecíficas). A eluição aconteceu a partir das frações acima de 45, no qual o pico azul correspondente é da proteína TgHDAC2 CDS. O pico verde corresponde à concentração de sal na etapa de eluição.

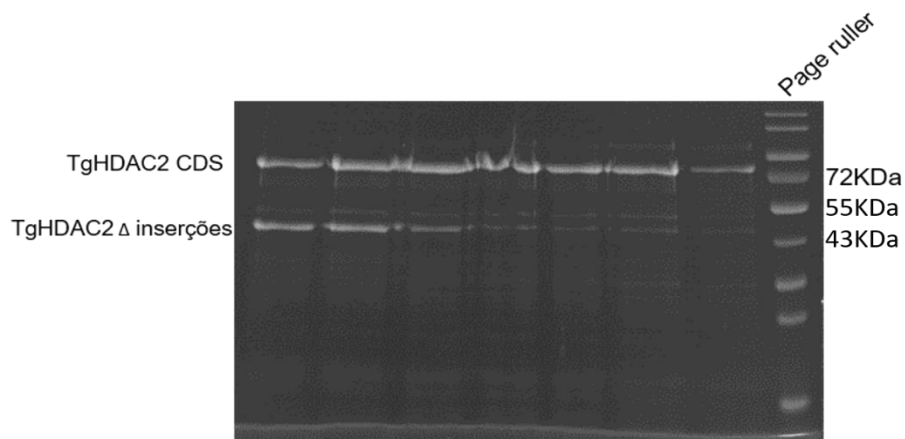


Figura 8. Análise das frações eluídas na cromatografia de afinidade em gel de eletroforese de poliacrilamida. A banda correspondente a 72 KDa é a construção CDS, e a banda abaixo de 47 KDa, possivelmente corresponde a construção TgHDAC2 Δinserções.

A partir desse resultado, foi feito um ensaio de Western blot com essa fração purificada de CDS, para conferir se realmente a banda de 47 KDa corresponde a TgHDAC2 Δinserções (Figura 9).

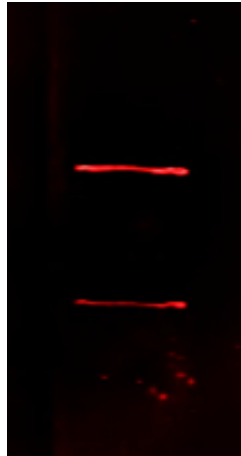


Figura 9. Western Blot de CDS purificada (banda superior) e a proteína truncada Δ inserções (banda inferior).

Com as duas bandas marcadas em Western blot, se conclui que *E.coli* a proteína sofre um processamento, em que as inserções do domínio HDAC são retiradas em pelo menos uma parte da população total de proteínas expressas.

Para cada experimento em que foi necessário a expressão de Δ SlyD TgHDAC2 Δ inserções, a cepa foi cultivada em 3 L de LB, dependendo da quantidade de proteína necessária para o experimento em questão. Essa construção (TgHDAC2 Δ inserções truncada) foi expressa em quantidades satisfatórias, bastante superior a construção da proteína completa CDS. As proteínas foram purificadas por técnicas de cromatografia de afinidade, conforme descrito anteriormente (Figura 10).

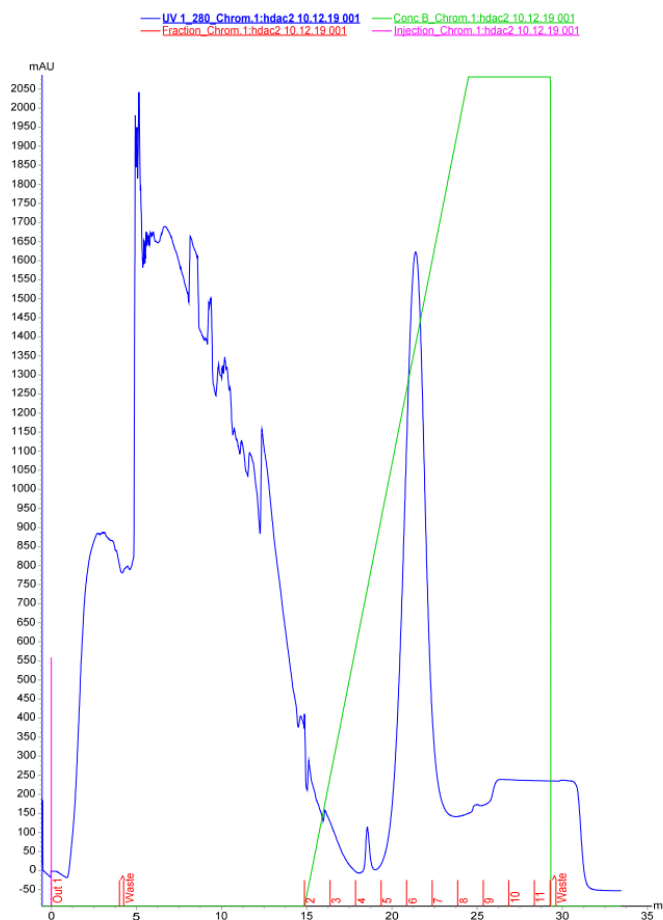


Figura 10. Cromatograma da purificação obtido na 1ª etapa de cromatografia de afinidade de TgHDAC2Δinserções. As primeiras frações até 15 ml correspondem às lavagens com tampão A (pico azul de proteínas inespecíficas). A eluição acontece a partir das frações acima de 15, no qual o pico azul correspondente é da proteína TgHDAC2Δinserções. O pico verde corresponde à concentração de imidazol na etapa de eluição.

Também foram realizadas purificações por cromatografia de troca iônica, para complementar as cromatografias de afinidade. Esta foi realizada em tampão Tris HCl 20 mM pH 7. A escolha desse pH permite que a proteína adote uma carga total negativa, visto que seu ponto isoelétrico teórico que é 5,44. Assim, para a cromatografia de troca iônica utilizamos a coluna HiTrap Q, que possui carga positiva, fazendo assim, uma cromatografia de troca aniônica. Porém, não foi obtido sucesso com essa técnica. Dessa forma, foi adotado apenas a técnica de purificação por cromatografia de afinidade para os posteriores experimentos (figura 11 e 12).

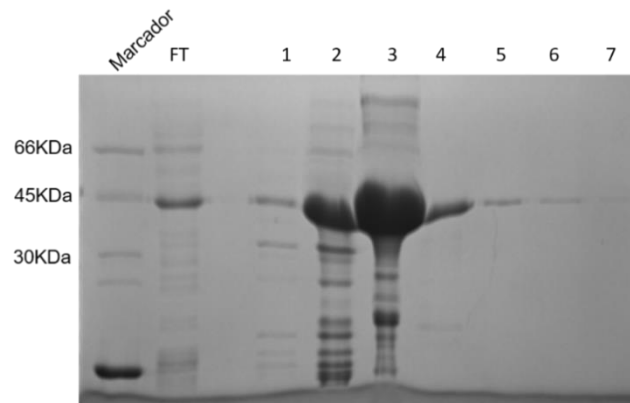


Figura 11. Análise em gel de poliacrilamida das frações eluídas de TgHDAC2 Δ inserções da primeira etapa de cromatografia de afinidade. Marcador caseiro.

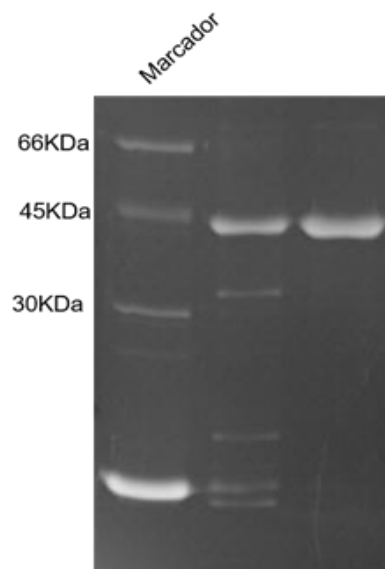


Figura 12. Análise em gel de poliacrilamida das frações eluídas de TgHDAC2 Δ inserções provenientes da segunda etapa de cromatografia de afinidade. Marcador caseiro.

5.3 Dicroísmo circular

Para realizar os experimentos de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz, as proteínas purificadas foram concentradas a 0,7 mg/ml (TgHDAC2 Δ inserções) e 0,17mg/ml (TgHDAC2 CDS) e dialisadas para tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,5 e NaCl 180mM. As análises de dicroísmo circular demonstraram que ambas as proteínas são estruturadas, possuindo uma carga mista entre α -hélices e folhas- β , indicado pelo sinal negativo observado nos comprimentos de onda de 222 e

208 (Figura 13). Entretanto, após analisar os dados de desnaturação térmica foi observado que a proteína inteira tem menos estabilidade térmica que a proteína truncada, o que pode ser observado no ensaio de estabilidade térmica, quando se aumenta gradativamente a temperatura de 20-90 °C e depois retorna a 20°C (renaturação), observando o comportamento estrutural das duas proteínas nessa variação de temperatura (Figura 14).

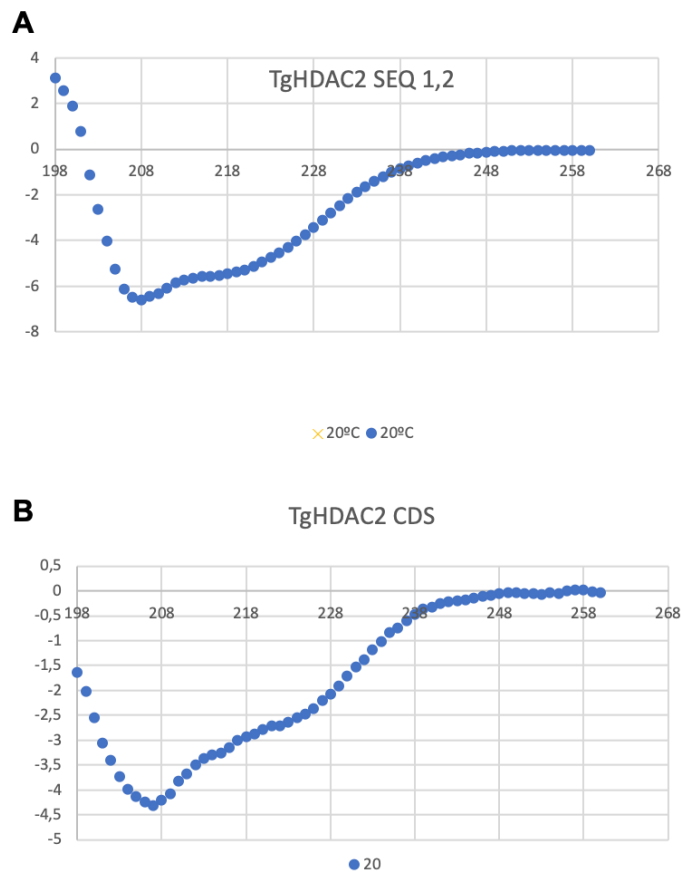


Figura 13. (A) Espectro do dicroísmo circular para TgHDAC2 Δ inserções a 20°C nos comprimentos de onda 198-258 nm. (B) Espectro do dicroísmo circular para TgHDAC2 CDS a 20°C nos comprimentos de onda 198-258 nm.

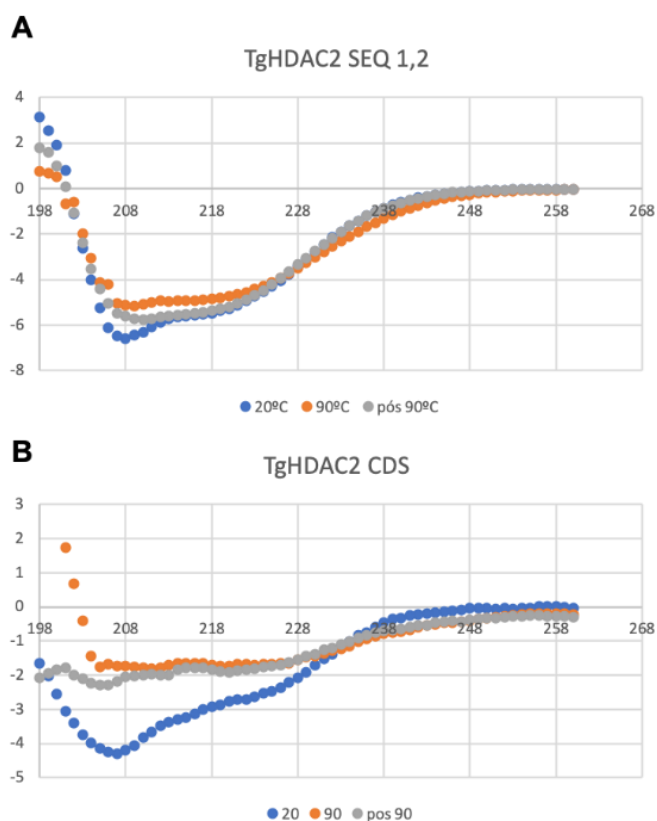


Figura 14. Espectros de Dicroísmo Circular de TgHDAC2 nas diferentes temperaturas: 20°C, 90°C e novamente 20°C (renaturação da proteína), nos comprimentos de onda de 198- 268 nm. (A) Percebe-se que a perda de estrutura (desnaturação) é bem acentuada na proteína inteira (TgHDAC2 CDS) e sua renaturação é ineficiente. (B) Em TgHDAC2 Δ inserções (referida como SEQ1,2), percebe-se que a perda de estrutura (desnaturação) não é acentuada nessa construção, e sua renaturação ocorreu de forma eficiente.

Para determinar a homogeneidade, massa molecular e estado das proteínas (monômeros ou agregados) foram realizados ensaios de espalhamento dinâmico de luz, complementado com uma etapa de gel filtração para confirmar a massa molecular e estados das proteínas (monômeros ou agregados). Adicionalmente, foi realizada uma etapa de purificação por gel filtração utilizando proteínas de tamanho conhecido como amostra, criando uma curva de calibração para servir de comparação com o tamanho das proteínas na amostra de TgHDAC2 CDS e TgHDAC2 Δ inserções.

O espalhamento dinâmico de luz confirmou o estado de agregação das proteínas, pois a massa molecular indicada foi maior que a esperada (aproximadamente 400 KDa).

5.4 Discussão

Com as duas bandas marcadas em Western blot, da fração purificada de CDS, se conclui que *E.coli* tem um processamento pós-traducional da proteína, em que as inserções do domínio HDAC são excluídas em uma parte da população total de proteínas expressas, porém ainda não há evidências de que ocorra também em *T. gondii*.

O mecanismo de clivagem proteolítica de proteínas, como forma de regulação pós-traducional, dando origem às formas ativas ou inativas das proteínas, é bem conhecido e descrito na literatura, incluindo HDACs de diversas espécies. Alguns dos exemplos na literatura de HDACs com atividades reguladas proteoliticamente incluem: remoção proteolítica de um domínio de 84KDa da Hda1 do milho, durante a germinação do embrião (PIPAL,2003), um fragmento proteolítico da HDAC4 humana, necessário para manutenção da performance cardíaca (LEHMANN,2018) e clivagem dependente de caspase da HDAC3 humana para indução de apoptose (ESCAFFIT,2007). Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para determinar o papel específico desse provável mecanismo de proteólise na TgHDAC2.

Sabe-se que a clivagem proteolítica é necessária para muitos processos críticos relacionados à virulência. Em particular, os parasitos intracelulares obrigatórios devem coordenar precisamente os eventos proteolíticos durante seu ciclo de vida altamente regulado dentro do ambiente das células hospedeiras. A clivagem proteolítica de proteínas específicas tem um importante papel em processos como: morte celular, progressão do ciclo celular, migração celular, invasão da célula hospedeira, catabolismo geral e ruptura de células (egresso). Assim, não é surpreendente que parasitos Apicomplexo como *T.gondii* possam depender de processos regulados proteoliticamente (LI, 2012).

Interessantemente, as proteases são alvos atrativos para desenvolvimento de drogas, porque a presença de um sítio ativo bem definido facilita o desenho do inibidor específico, e, portanto, muitas classes de inibidores de proteases já foram desenvolvidas. Tendo a proteólise como possível ponto chave para regulação da TgHDAC2, a protease se torna um potencial alvo para o tratamento da toxoplasmose. Portanto, esses avanços na compreensão do funcionamento da TgHDAC2 de *Toxoplasma* fornece uma base para validação de novos alvos enzimáticos que podem ser explorados para fins terapêuticos. (LI,2012).

Os resultados obtidos do Dicroísmo Circular indicam que essas inserções aminoacídicas no domínio HDAC não contribuem para a estrutura e estabilidade da proteína, e acabam por desestabilizar ainda mais essa estrutura do domínio, indicando uma possível região intrinsecamente desestruturada. Como os dados biofísicos não indicam maior estruturação das proteínas na presença das inserções, e sim uma perda da estabilidade nessas condições, se reforça a existência de um importante papel funcional destas para a ação dessa enzima em *Toxoplasma gondii*, como um possível sítio de regulação pós-traducional, visto que observamos a clivagem proteolítica na bactéria.

Possíveis papéis funcionais dessas inserções aminoacídicas na regulação pós-traducional mediada por clivagem proteolítica se encaixariam em aumento de atividade enzimática (valores de cinética enzimática), reconhecimento de fatores específicos de transcrição para silenciamento de genes específicos (HONG. 2009), ou algum outro papel ainda não descrito para HDACs.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o maior entendimento da estrutura e provável regulação da atividade da TgHDAC2 descrito neste trabalho pode ser aproveitado para futuros trabalhos mais aprofundados, pois dada a importância das HDACs na manutenção dos ciclos de vidas parasitários, estas têm sido cada vez mais visadas como alvos de drogas com atividade antiparasítica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARROWSMITH, C.H. et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*: v. 11, p. 384–400, 2012.

APAZA CALLA, Lourdes Fanny et al. Busca de inibidores de histonas desacetilases com atividade leishmanicida na infecção de macrófagos por *Leishmania braziliensis*. 2018.

BARBOSA, H.S., MUNO, R.M., and MOURA, M.A. O Ciclo Evolutivo. In: SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp. *Toxoplasmoses & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, pp. 33- 45. ISBN: 978-85-7541-571-9.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n.3, p. 607–623, 2000.

BOUGDOUR, Alexandre et al. Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*, v. 12, n. 4, p. 413-423, 2010.

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.

FINNIN, M. S.; DONIGIAN, J. R.; COHEN, A.; et al. letters to nature Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Letters to Nature*, v. 401, n. 9, p. 188–193, 1999.

DIXON, Stacy E. et al. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 173, n. 1, p. 1-9, 2010.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUNAY, Ildiko Rita et al. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, v. 31, n. 4, p. e00057-17, 2018.

ESCAFFIT, Fabrice et al. Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Molecular and cellular biology*, v. 27, n. 2, p. 554-567, 2007.

GILOT-FROMONT, Emmanuelle et al. The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. *Toxoplasmosis-recent advances*, v. 10, p. 2845, 2012.

HO, Terence CS; CHAN, Alex HY; GANESAN, A. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12460-12484, 2020.

HONG, Sohee et al. A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 10, p. 3539-3552, 2009.

KRISTENSEN, Lasse Sommer; NIELSEN, Helene Myrtue; HANSEN, Lise Lotte. Epigenetics and cancer treatment. *European journal of pharmacology*, v. 625, n. 1-3, p. 131-142, 2009.

LEHMANN, Lorenz H. et al. A proteolytic fragment of histone deacetylase 4 protects the heart from failure by regulating the hexosamine biosynthetic pathway. *Nature medicine*, v. 24, n. 1, p. 62-72, 2018.

LI, Hao; CHILD, Matthew A.; BOGYO, Matthew. Proteases as regulators of pathogenesis: examples from the Apicomplexa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1824, n. 1, p. 177-185, 2012.

MICELLI, C.; RASTELLI, G. Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. *Drug Discovery Today*: v. 20, Issue 6, P. 718-735, 2015 RADKE, J. R.

BEHNKE, M. S.; MACKEY, A. J.; et al. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. BMC Biology, v. 18, p. 1–18, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SÁNCHEZ, Liliana Torcoroma García. Subclonagem e expressão do domínio catalítico da jararagina: estudo do efeito das modificações pós-traducionais na atividade hemorrágica. 2004.

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 6, p. 1–26, 2014.

SIQUEIRA, Caroline de Moraes de et al. Caracterização da histona desacetilase 2 (TgHDAC2) de *Toxoplasma gondii*. 2018. Tese de Doutorado.

PIPAL, Alexandra et al. Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. The Plant Cell, v. 15, n. 8, p. 1904- 1917, 2003.

VERDIN, E; OTT, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology: v. 16, p. 258–264, 2015.