

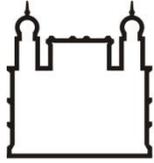
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**O PAPEL DA HISTONA DESACETILASE 4 (TgHDAC4) NA
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Toxoplasma*
*gondii***

MARIANA SAYURI ISHIKAWA FRAGOSO

CURITIBA/PR

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

MARIANA SAYURI ISHIKAWA FRAGOSO

O PAPEL DA HISTONA DESACETILASE 4 (TgHDAC4) NA REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO GÊNICA DE *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Sheila Cristina Nardelli

Co-orientadora: Dra. Andréa Rodrigues Ávila

CURITIBA/PR

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F811 Fragoso, Mariana Sayuri Ishikawa

O papel da histona desacetilase 4 (TgHDAC4) na regulação da expressão gênica de *Toxoplasma gondii* / Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso. – Curitiba, 2017.
xiv, 98 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2017.

Bibliografia: f. 88-98

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Histona desacetilase. 3. Apicoplasto. I. Título.

CDD 579.4



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Aos 10 dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, às 09 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Gisele Fernanda A. Picchi, Dra. Lysangela Ronalte Alves e Dra. Lia Carolina A. S. de Medeiros, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso**, intitulada: "**O papel da histona deacetilase 4 (TgHDAC4) na regulação da expressão gênica de *Toxoplasma gondii***", sob a orientação de Sheila Cristina Nardelli e co - orientação de Andréa Rodrigues Ávila, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Lysangela Ronalte Alves**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

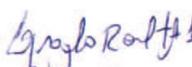
Aprovação da dissertação por unanimidade

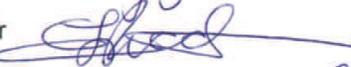
Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

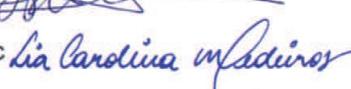
Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 10 de Fevereiro de 2017

Dra. Lysangela Ronalte Alves - ICC/Fiocruz-Pr 

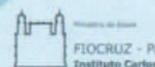
Dra. Gisele Picchi - ICC / Fiocruz-Pr 

Dra. Lia Carolina A.S. de Medeiros - Pos doc 

Candidato(a): Mariana Sayuri I. Fragoso 

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”

Jules Verne

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, principalmente meus pais e meu irmão, por sempre estarem ao meu lado, independente das minhas escolhas, sempre me deram forças para eu ir atrás dos meus sonhos.

Ao meu amor, Felipe, por todo carinho, pelo incentivo nas horas difíceis, por me apoiar e estar sempre comigo em todas as minhas batalhas e conquistas e principalmente, pela paciência.

À minha orientadora Dra. Sheila, pela oportunidade e por confiar e acreditar no meu potencial. Por todos os ensinamentos, dedicação, sempre presente em todos os momentos, me incentivando e orientando a seguir o melhor caminho.

À minha co-orientadora, Dra. Andrea, pela confiança e por toda ajuda, sempre estando disponível para tirar minhas dúvidas da melhor maneira possível.

À Carol e à Vanessa, pela amizade, pelo apoio, por alegrar meus dias e por toda ajuda durante os experimentos.

Às colegas Juliana Aggio e Patricia Domingues pelas conversas, os desabafos e pelas palavras amigas.

Aos colegas do Laboratório da Regulação da Expressão Gênica, pelo acolhimento, por todo auxílio durante os experimentos e pelas risadas.

Ao pessoal da microscopia, principalmente à M.^a Beatriz Borges, por toda ajuda, pela paciência e por deixar os dias mais engraçados.

Ao pessoal da citometria, principalmente à M.^a Priscila Hiraiwa, pela ajuda nos experimentos e com o citômetro.

À toda equipe do Instituto Carlos Chagas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao pessoal do preparo, limpeza e secretaria. Às bancas avaliadoras. Às instituições de apoio financeiro: Capes, CNPq e Fiocruz.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório membro do filo Apicomplexa e responsável pela toxoplasmose, doença que afeta um quarto da população mundial e para a qual não há cura até o momento. Para sobreviver às barreiras do sistema imune, *T. gondii* se diferencia em diferentes estágios, sendo este processo, regulado pelo controle da expressão gênica. A regulação epigenética parece ter um papel fundamental neste parasita e dentre as enzimas que atuam nessa via, estão as histonas desacetilases (HDACs). O *T. gondii* possui sete histonas desacetilases (HDACs e Sir2), que são agrupadas em quatro classes de acordo com seus domínios, seus cofatores e sua sequência. O objetivo da presente dissertação foi realizar a caracterização da TgHDAC4, uma desacetilase classe IV, cujo único membro caracterizado é a histona desacetilase 11 (HDAC11) encontrada apenas em metazoários. TgHDAC4 possui dois sinais preditos: um de exportação nuclear e um de clivagem, cujas funções não estão caracterizadas. A busca por sequências similares, mostram que TgHDAC4 é uma proteína conservada exclusivamente em parasitas apicomplexas, cuja única região comum com outras espécies é a região do domínio HDAC característico. Para o estudo dessa enzima, focamos na construção de ferramentas de genética reversa, como o etiquetamento da proteína endógena e o nocaute de TgHDAC4. As construções destas ferramentas foram dificultadas devido a um erro de anotação na região C-terminal do gene no banco de dados de *Toxoplasma*, onde encontra-se um domínio HDAC incompleto, resultando em massa molecular predita de 98 kDa. A partir do sequenciamento da porção final do gene, foi possível encontrar o códon de terminação em fase, resultando em dois éxons a mais do que o predito, o que resultaria em uma proteína de 124 kDa. Uma vez corrigido, realizamos o etiquetamento na porção C-terminal da proteína endógena, adicionando uma etiqueta de HA e a partir de ensaios de imunofluorescência indireta e co-localização, foi possível verificar que TgHDAC4 está localizada no apicoplasto, co-localizando com a proteína FDR (Ferrodoxina-NADP⁺ reductase). Ensaios de western blot identificaram uma proteína de cerca de 100 kDa, um pouco menor do que o esperado. Também foram feitas diversas tentativas de nocaute por PCR de fusão, porém, apesar de ocorrer uma seleção dos transfectantes a partir do uso de drogas, nunca foram obtidos parasitas nocaute para TgHDAC4. Foi utilizado também, o sistema CRISPR-Cas9, gentilmente cedido pelo Dr. Hakimi (University Grenoble Alpes-França). Os plasmídeos foram transfectados e ensaios de imunofluorescência mostraram o parasita com uma morfologia alterada, especialmente no núcleo, porém, não foi possível a obtenção de parasita com mutações no gene que codifica TgHDAC4. Nossos dados indicam pela primeira vez a presença de uma desacetilase de histona no apicoplasto de *Toxoplasma*, cuja sequência é única a parasitas Apicomplexa. O apicoplasto é uma organela de origem endossimbiótica secundária, sendo considerado o “calcanhar de Aquiles” do parasita, por se tratar de organela essencial para sua sobrevivência. Entender como essa proteína atua, poderá fornecer novos dados não somente quanto a biologia dessa organela, mas futuramente identificar potenciais alvos para o tratamento efetivo da toxoplasmose.

Palavras-chaves: *Toxoplasma gondii*, histona desacetilase, apicoplasto

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite member of the phylum Apicomplexa and is responsible for toxoplasmosis, a disease that affects a quarter of the world's population and which has no effective cure. In order to pass immune barriers, *T. gondii* differentiates between different stages, which is tightly regulated by controlling gene expression. Epigenetic regulation is one of the mechanisms controlling gene expression that seems to play an important role in *T. gondii*. One category of enzymes that act as epigenetic regulators are histone deacetylases (HDACs). *T. gondii* has seven histone deacetylases (HDACs and Sir2), which are classified into four classes according to their domains, cofactors and sequence. The aim of the present dissertation was to characterize TgHDAC4, a histone deacetylase of class IV, a class of which the only well characterized member is HDAC11, found only in metazoans. TgHDAC4 has two predicted signals: a possible nuclear export signal and a cleavage, whose functions have yet to be confirmed. Searches for similar sequences showed that TgHDAC4 is conserved in some members of the phylum Apicomplexa, and the only region common to other species is the typical HDAC domain. In order to characterize TgHDAC4, we focused on construction of epitope tagged lines and knockouts. The construction of these tools was delayed due to misannotation of the C-terminal portion of *tghdac4* gene present on ToxoDB (the *T. gondii* database). According to ToxoDB, TgHDAC4 is a large protein with an incomplete HDAC domain at the C-terminal domain, resulting in a predicted molecular mass of 98 kDa. After resequencing the final portion of *tghdac4*, we identified the correct stop codon, which resulted in two more exons than predicted, and an approximate protein size of 124 kDa. With the correct sequence, we constructed endogenous tagged lines, adding a HA tag to the C-terminal portion of TgHDAC-4. By indirect immunofluorescence and co-localization assays, we verified that TgHDAC4 is located in the apicoplast, also co-localizing with FDR protein (*Ferredoxin-NADP+ reductase*). Western blot assays identified a protein smaller than expected, of about 100 kDa. Several attempts to construct knockout lines failed, despite successful drug selection. This is likely due to a misannotation problem. As an alternative, we used the CRISPR/Cas9 system (constructs provided by Dr. Hakimi-University of Grenoble Alpes, France). Plasmids were transfected and used for immunofluorescence assays. Parasites that stained positively for GFP showed atypical morphology, especially in nuclei. On the other hand, so far it was not possible to identify parasite clones with specific mutations on *tghdac4*. Our data indicate for the first time the presence of a histone deacetylase in the *T. gondii* apicoplast, which seems to be unique to Apicomplexa parasites. The apicoplast is an organelle acquired from endosymbiotic origin, considered the "Achilles' Heel" of the parasite, due to its importance for parasite survival. Understanding how this protein works could provide new insights into the metabolism of the apicoplast and in addition reveal a potential drug target for the effective treatment of toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, histone deacetylase, apicoplast

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de formas distintas de <i>T. gondii</i>	16
Figura 2: Ciclo de vida <i>Toxoplasma gondii</i>	18
Figura 3: Complexo apical de formas taquizoítas de <i>T. gondii</i>	21
Figura 4: Origem do apicoplasto.....	23
Figura 5: Quadro com as etapas da regulação gênica.....	24
Figura 6: Código das histonas de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Figura 7: Histonas desacetilases de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Figura 8: Esquema da clonagem independente de ligação (LIC).....	41
Figura 9: Seleção das enzimas para confirmar clonagem.....	42
Figura 10: Mapa do vetor pTOXO_Cas9_CRISPR em PUC57_simp.....	52
Figura 11: Amplificação de fragmentos das regiões 5' e 3'-UTRs do gene <i>tghdac4</i>	55
Figura 12: PCR de fusão em duas etapas.....	56
Figura 13: PCR para confirmação do nocaute de <i>tghdac4</i>	57
Figura 14: Amplificação e purificação do fragmento do gene <i>tghadc4</i>	58
Figura 15: Confirmação dos clones 2 e 5 por digestão com enzimas de restrição.....	59
Figura 16: Confirmação da inserção da etiqueta de HA.....	60
Figura 17: Dados depositados no banco de dados (toxodb.org) para o gene <i>tghdac4</i>	61
Figura 18: Análises de domínios conservados em TgHDAC4 e proteína hipotética.....	62
Figura 19: Dados do RNAseq.....	63
Figura 20: PCR para sequenciamento de <i>tghdac4</i>	64
Figura 21: Sequência obtida após o sequenciamento da porção final do gene <i>tghdac4</i>	64
Figura 22: Características da sequência de TgHDAC4.....	67
Figura 23: Amplificação da porção final do gene <i>tghadc4</i>	68
Figura 24: Confirmação dos clones 3 e 10 por digestão com enzimas de restrição.....	69
Figura 25: Ensaio de western blot utilizando anticorpo anti-HA.....	70
Figura 26: PCR para confirmação da presença da etiqueta de 3X HA.....	71
Figura 27: Localização de TgHDAC4-HA por imunofluorescência indireta.....	72

Figura 28: Ensaio de co-localização com GRASP.....	73
Figura 29: Ensaio de co-localização com FNR.	75
Figura 30: Análise dos parasitas transfectantes para Cas9.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para realizar o primeiro etiquetamento de <i>tghdac4</i>	38
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para realizar o segundo etiquetamento de <i>tghdac4</i> após o sequenciamento.....	38
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para realizar confirmação da etiqueta de 3X HA após o gene <i>tghdac4</i>	46
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões 5' e 3' não traduzidas de <i>tghdac4</i>	48
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para realizar a PCR de fusão.....	49
Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gene de seleção.....	50
Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos para sequenciamento da porção final de <i>tghdac4</i>	51
Tabela 8: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar um fragmento na região do RNA guia utilizado.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- graus Celsius
µg	- microgramas
µL	- microlitros
ng	- nanogramas
pmol	- picomol
acetilCoA	- Acetyl Coenzima A
AGO	- proteína argonauta
AP2	- Apetala 2
BSA	- Albumina de soro bovino
CDD	- <i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	- DNA complementar
ChiP	- Imunoprecipitação da cromatina
CO ₂	- Dióxido de Carbono
CpG	- Citosina-Guanina
CRISPR/ Cas 9	- <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats, associated protein-9 nuclease</i>
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
dCTP	- desoxicitidina trifosfato
dGTP	- desoxiguanosina trifosfato
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNMT	- citosina-5 DNA metiltransferase
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	- Dithiothreitol
DsRed	- <i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>
EDTA	- ácido etilendiamino tetra-acético
EGTA	- ácido etileno glicol tetra-acético
FDA	- <i>US Food and Drug Administration</i>
FNR	-Ferrodoxina-NADP ⁺ reductase
GFP	- <i>Green fluorescent protein</i>
GNAT	- <i>Gcn5-related acetyltransferases</i>

GRASP	- Proteína de Organização e Compactação do Golgi
H3K18	- Lisina 18 da histona H3
HA	- Hemaglutinina
HAT	- Histona acetiltransferase
HDAC	- histona desacetilase
HEPES	- <i>2-4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
HFF	- <i>human foreskin-fibroblasts</i>
hxgprt	- <i>Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i>
Ig	- Imunoglobulina
Kb	- kilo bases
kDa	- kilo daltons
LIC	- <i>Ligation Independent Cloning</i>
lncRNA	- longos RNAs não codificadores
Meio LB	- Meio Luria Bertani
MICs	- Proteínas de Micronemas
miRNAs	- micro RNAs
mL	- Mililitros
MPT	- modificação pós-traducional
MYST	- Moz, Ybf2/Sas3, Sas2 e Tip60
mRNA	- RNA mensageiro
NAD+	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	- <i>National Center of Biotechnology Information</i>
ncRNAs	- RNAs não codificadores
pb	- pares de base
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RdRp	- <i>RNA-dependente RNA polymerase</i>
RFP	- <i>Red fluorescent protein</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
RNAi	- RNA de interferência
ROPs	- Proteínas de Róptrias
rpm	- rotações por minuto
SDS PAGE	- <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIR2	- <i>silent information regulator-2</i>

siRNAs	- pequenos RNAs de interferência
SSTFs	- Sequências específicas de fatores de transcrição
TBE	- Tris/Borato/EDTA
TrisHCl	- Trisaminometano ácido clorídrico
TSA	- Tricostantina A
U	- Unidade (de enzima)
UTR	- <i>untranslated region</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2 Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	16
1.3 TOXOPLASMOSE	19
1.4 FILO APICOMPLEXA	20
1.4.1. Complexo Apical	21
1.4.2 Apicoplasto	22
1.5 REGULAÇÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS	24
1.6 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA	25
1.6.1 Os nucleossomos e as MPTs	25
1.7 REGULAÇÃO GÊNICA EM <i>Toxoplasma gondii</i>	26
1.8 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM <i>Toxoplasma gondii</i>	27
1.8.1 Metilação de DNA	27
1.8.2 RNAs reguladores	28
1.8.3 Modificações pós traducionais de histonas	28
1.9 DESACETILASES DE HISTONAS	31
1.9.1 Desacetilases de histona em <i>Toxoplasma gondii</i>	32
1.10 JUSTIFICATIVA	34
2. OBJETIVO	35
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 CULTURA DE <i>T. GONDII</i> :	36
3.2 ETIQUETAMENTO DO GENE <i>TGHDAC4</i> :	37
3.2.1 Extração de DNA genômico	37
3.2.2 Síntese dos oligonucleotídeos para o etiquetamento	37
3.2.3. Amplificação gênica por PCR	38
3.2.4 Eletroforese de DNA	39
3.2.5 Eletroeluição:	39
3.2.6 Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT	40
3.2.7 Transformação Bacteriana	41
3.2.8 Seleção dos clones positivos por PCR de colônia	41
3.2.9 Seleção dos clones positivos por digestão enzimática	42
3.2.10 Transfecção em <i>T. gondii</i>:	43

3.3 VERIFICAÇÃO DOS TRANSFECTANTES:.....	44
3.3.1 Preparação dos extratos proteicos	44
3.3.2 Western Blotting.....	45
3.3.3. PCR para confirmação da etiqueta	46
3.3.4 Imunofluorescência indireta.....	46
3.3.5 Clonagem dos transfectantes	47
3.3.6 Ensaios de co-localização	47
3.4 NOCAUTE DE <i>TGHDAC4</i> :.....	48
3.4.1 Amplificação das regiões 5' e 3'-UTRs:.....	48
3.4.2 PCR de fusão:.....	49
3.4.3 PCR para confirmação do nocaute	50
3.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E OBTENÇÃO DO cDNA	50
3.5.1 Sequenciamento de <i>tghdac4</i>	51
3.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE <i>TGHDAC4</i>	51
3.7 SISTEMA CRISPR/CAS9.....	52
4. RESULTADOS.....	54
4.1 NOCAUTE DE <i>TGHDAC4</i> ;.....	54
4.2 TGHDAC4 É UMA PROTEÍNA LOCALIZADA NO APICOPLASTO	57
4.2.1 Construção do plasmídeo para o etiquetamento de <i>tghdac4</i>	57
4.2.2 Obtenção de linhagens expressando TgHDAC4 fusionada a 3X HA.....	60
4.2.3 Confirmação da expressão de TgHDAC-HA na população selecionada...70	
4.2.4 Confirmação da inserção no genoma da etiqueta HA.....	70
4.2.5 Confirmação da expressão de TgHDAC4-HA por imunofluorescência indireta	71
4.3 ENSAIO DE CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE TGHDAC4 E APICOPLASTO.....	72
4.4 NOCAUTE GÊNICO UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/CAS9	75
5.DISSCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um parasita intracelular obrigatório e membro do filo Apicomplexa que inclui mais de 5.000 espécies, sendo algumas, importantes patógenos humanos, como o *Plasmodium sp.*, causador da malária e o *Cryptosporidium sp.*, causador da criptosporidíase. *T. gondii* é de extrema importância para saúde pública por ser o agente causador da toxoplasmose, doença que acomete grande parte da população mundial.

O parasita foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux, que identificaram o parasita em um roedor norte-africano na Tunísia, e no mesmo ano, por Splendore, em um estudo com coelhos realizado no Brasil (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). Em 1909, Nicolle e Manceaux sugeriram o nome *Toxoplasma*, derivado do grego, onde *toxon* significa arco e *plasma* significa criatura, devido a estrutura arqueada do parasita em sua forma proliferativa. O nome da espécie, *gondii*, é devido ao roedor no qual ele foi identificado, *Ctenodactylus gundi* (FERGUSON, 2009; NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

O *T. gondii* possui um ciclo de vida complexo, com a fase sexuada ocorrendo nos hospedeiros definitivos, que são membros da família Felidae, e a fase assexuada ocorrendo nos hospedeiros intermediários que são os demais animais de sangue quente, incluindo o homem. Durante o ciclo, o parasita possui diversos estágios de desenvolvimento, sendo estas três as melhores caracterizadas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (Figura 1). Os taquizoítas são descritos como a forma de multiplicação rápida, altamente virulentos e teoricamente podendo infectar qualquer célula nucleada. Já os bradizoítas são caracterizados pelo crescimento lento, formando os cistos teciduais. Por fim, os esporozoítas são resultado da esporulação dos oocistos que ocorre no ambiente de 1 a 5 dias após sua liberação pelas fezes dos felinos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Finalmente, os membros do filo Apicomplexa apresentam características únicas, como a presença de um complexo apical que compreende organelas que auxiliam a invasão ativa na célula e ainda uma organela de origem simbiótica denominada apicoplasto, presente na maioria dos membros. O ciclo de vida e

aspectos celulares e moleculares das formas do parasita serão abordados em detalhes ao longo da introdução.

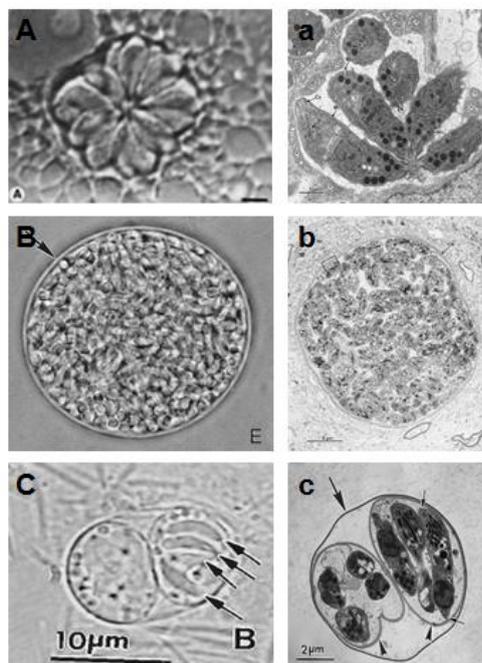


Figura 1: Estrutura de formas distintas de *T. gondii*. As imagens obtidas por microscopia óptica estão representadas por letras maiúsculas, enquanto as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão estão representadas por letras minúsculas. (Aa) Formas taquizoítas; (Bb) Cistos teciduais (bradizoítas) obtidas de cérebro de camundongo. A seta mostra a parede do cisto e (C) oocisto esporulado. As setas representam os esporozoítos. (c) Oocisto esporulado envolvidos pela parede do oocisto (seta maior). As cabeças de setas revelam os esporocistos, enquanto que as pequenas setas destacam os esporozoítas (Adaptado de DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

1.2 CICLO DE VIDA DO *Toxoplasma gondii*

O ciclo sexuado inicia quando os felinos (domésticos ou selvagens) ingerem cistos presentes no tecido dos hospedeiros intermediários. Nos felinos, um único bradizoíta proveniente do cisto é capaz de estabelecer a infecção. Os cistos possuem uma parede rígida que é destruída pelas enzimas digestivas, liberando os bradizoítas, que irão invadir enterócitos. Os bradizoítas diferenciam-se em esquizontes através de um processo que envolve o desenvolvimento de cinco estágios morfológicamente diferentes de *T. gondii*, ainda antes do início da gametogonia, que dá origem as formas sexuadas. Estes estágios foram classificados nos tipos A, B, C, D e E. Pouco se sabe a respeito desse processo, uma vez que não é possível sua manutenção *in vitro*, tornando difícil a aquisição dos parasitas, mas sabe-se que os estágios mais tardios (D-E) se multiplicam por

esquizogonia (processo de multiplicação onde o núcleo divide-se algumas vezes sem a separação do citoplasma). Ao final desse processo ocorre então a formação dos merozoítas, altamente multiplicativos, chegando ao fim o processo assexual.

O início da fase sexuada começa cerca de 2 dias após a ingestão do cisto, gerando os macro e microgametas (DUBEY, 1998, 2009; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ESCH; PETERSEN, 2013; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010). Os microgametas possuem um flagelo que auxilia no deslocamento para fertilização dos macrogametas e levar a formação do zigoto. Uma parede é formada ao redor do zigoto e os novos oocistos são liberados no lúmen do intestino e finalmente liberados nas fezes dos felinos onde atingem o ambiente externo. Uma vez no ambiente externo, ocorre a esporogonia. Cada felino pode liberar até 100 milhões de oocistos nas fezes, podendo infectar um grande número de hospedeiros intermediários, principalmente através de água e alimentos contaminados. A parede destes oocistos é muito resistente, protegendo o parasita de danos mecânicos e químicos. Cada oocisto possui 2 esporocistos que são esporulados de 1 a 5 dias após sua liberação no ambiente, dependendo da temperatura e aeração, liberando 4 esporozoítos (ver Figura 1) (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Quando os hospedeiros intermediários consomem água ou comida contaminada com oocistos, os esporozoítas são liberados e invadem células do epitélio intestinal, iniciando o ciclo assexuado. Os esporozoítas são diferenciados em taquizoítas, a forma proliferativa e altamente virulenta que é responsável pela fase aguda da toxoplasmose. Esta forma se replica por endodiogenia, processo onde duas células filhas são formadas no interior de uma célula mãe que se degenera no fim do processo. Os taquizoítas são capazes de infectar praticamente qualquer tipo celular, sendo que célula hospedeira é rompida quando não pode mais suportar o crescimento dos parasitas, geralmente após 64 ou 128 parasitas terem sido acumulados. A replicação do parasita ocorre dentro do vacúolo parasitóforo com um tempo de geração de 6 a 8 horas (BLACK; BOOTHROYD, 2000; BLADER; SAEIJ, 2009; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; NISHI et al., 2008; SHEFFIELD; MELTON, 1968; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

O *T. gondii* utiliza vários mecanismos para evasão do sistema imune, o que permite sua sobrevivência e proliferação. Porém, a pressão do sistema imunológico leva a diferenciação dos taquizoítas em bradizoítas que é a forma latente do

parasita. Os bradizoítas costumam aparecer de 7 a 10 dias após a infecção e também se dividem por endodiogenia, embora muito mais lentamente. Estas formas se tornam cistos que podem permanecer latentes pelo resto da vida do hospedeiro, preferencialmente no cérebro e musculatura, caracterizando a fase crônica da toxoplasmose. Vale ressaltar, que esses cistos teciduais apresentam uma parede extremamente resistente, o que facilita sua sobrevivência, pois tornam o parasita efetivamente “invisível” ao sistema imune e aos tratamentos disponíveis.

Existe uma taxa de reativação espontânea, onde os bradizoitos se diferenciam novamente em taquizoitos. No caso de pacientes imunocompetentes, a reativação é controlada rapidamente pelo sistema imune, mas, para pacientes imunocomprometidos, esta taxa de reativação é frequente, podendo causar graves lesões e até a morte. A ingestão de carne mal passada contaminada com cistos teciduais por um novo hospedeiro permite então a liberação destes cistos no intestino. A ruptura destes cistos libera os bradizoítas que infectam as células do epitélio intestinal iniciando o ciclo de infecção (Figura 2). A transmissão ainda pode ocorrer congenitamente, pois durante a gravidez, o parasita é capaz de atravessar e placenta e infectar o feto (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2009; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

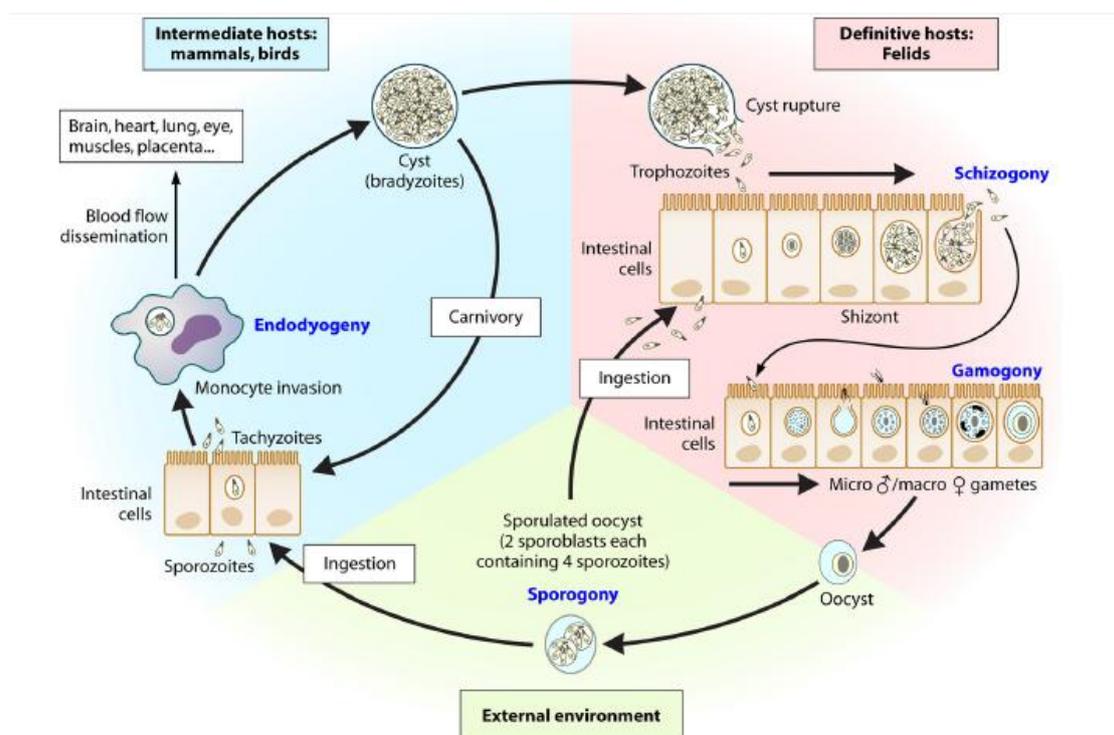


Figura 2: Ciclo de vida *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* possui um ciclo de vida complexo onde os hospedeiros definitivos são os felinos, e os hospedeiros intermediários são

os demais animais de sangue quente. Nos felinos, ocorre a fase sexuada, onde são gerados macro e microgametas. Após a fertilização, ocorre a formação do zigoto, e conseqüentemente do oocisto, que é liberado pelas fezes. Os oocistos, no ambiente externo, são esporulados, infectando hospedeiros intermediários a partir do consumo de água ou alimentos contaminados. Nestes hospedeiros, os esporozoítos são diferenciados em taquizoítos, a forma proliferativa. Com a pressão do sistema imunológico, os taquizoítos se diferenciam para bradizoítos, a forma latente, que formam cistos que podem permanecer latentes pelo resto da vida do hospedeiro (Fonte: ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.3 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença de ampla distribuição mundial, onde cerca de um quarto da população encontra-se atualmente infectada por *T. gondii*. A prevalência da doença é bem variada, sendo que as menores taxas de soroprevalências são encontradas em países da América do Norte, Ásia e Europa. As maiores taxas de soroprevalências são encontradas na América Latina e na África. Mesmo no território nacional, a incidência da doença é extremamente variável (entre 20-80%), e essa dispersão está relacionada a diversos fatores: climáticos, econômicos, sociais, étnicos e culturais (LÜDER; BOHNE; SOLDATI, 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; WEISS; DUBEY, 2009).

Em pacientes imunocompetentes a toxoplasmose é geralmente assintomática. Cerca de 10% dos pacientes apresentam sintomas que muito se assemelham a uma gripe. No entanto, como patógeno oportunista, o *Toxoplasma* é considerado o maior causador de infecções em indivíduos imunocomprometidos, podendo causar por exemplo encefalite, retinite e miocardite, e quando adquirida durante a gravidez, pode levar ao aborto ou causar defeitos congênitos (BLADER; SAEIJ, 2009; FURTADO et al., 2011; MAUBON et al., 2010).

Apesar de existir fármacos para o tratamento da toxoplasmose, a doença não tem cura, e os medicamentos atuais possuem efeitos colaterais graves, sendo associados à citopenia e reações alérgicas. Além disso, os remédios têm como alvo apenas a forma taquizoíta e, portanto, quando ocorre o encistamento desencadeado pela pressão do sistema imune do hospedeiro, os medicamentos não têm acesso, fazendo com que os cistos permaneçam intactos (BLADER; SAEIJ, 2009; MAUBON et al., 2010).

Finalmente, a ausência de sintomas específicos faz com que muitos pacientes não procurem um tratamento contra a toxoplasmose, explicando o porquê de tantas pessoas ao redor do mundo estarem atualmente infectadas, muitas sem diagnóstico.

Problematicamente, acreditava-se que esses cistos, especialmente no cérebro dos pacientes, eram inofensivos e não resultavam em danos severos ao organismo. Nos últimos anos, todavia, tem-se associado esses cistos a problemas comportamentais ou mentais, que incluem alterações de humor, depressão, inclinação ao suicídio e principalmente esquizofrenia (ELSHEIKHA; BÜSSELBERG; ZHU, 2016; HSU; GROER; BECKIE, 2014).

1.4 FILO APICOMPLEXA

Alguns membros do filo Apicomplexa causam altas taxas de morbidade e mortalidade, e possuem importância econômica, tanto para área da saúde como para agrícola e pecuária. A maioria das espécies não é patogênica, mas aquelas que causam doenças apresentam características e hospedeiros distintos entre si. Apesar disso, todos os membros do filo apresentam um ancestral comum o que faz com que todos possuam características morfológicas similares (ANDERSON-WHITE et al., 2012; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002).

Todos os membros são parasitas intracelulares obrigatórios, sendo que a maioria cresce e replica dentro de um compartimento não fagossomal denominado vacúolo parasitóforo. Quando ocorre a invasão pelo parasita na célula hospedeira, iniciam diversos ciclos de replicação, com a lise da célula hospedeira e liberação dos parasitos. Uma vez no ambiente extracelular, os parasitas não conseguem realizar a divisão celular e devem invadir uma nova célula para sua sobrevivência. Este ciclo de invasão das células hospedeiras, replicação dos parasitas e a consequente lise das células é responsável por grande parte dos danos teciduais associados às infecções por parasitas apicomplexas (MORRISSETTE; SIBLEY, 2002)

O nome Apicomplexa deve-se à uma presença de um complexo de organelas na extremidade apical (complexo apical) que é necessário para vários processos relacionados à infecção no hospedeiro. Fazem parte deste complexo, os micronemas, as rôptrias e o conóide. Estas organelas são exclusivas de parasitas apicomplexas, bem como, o apicoplasto, uma organela de origem endossimbiótica secundária (ANDERSON-WHITE et al., 2012; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

1.4.1. Complexo Apical

O complexo apical (Figura 3) é composto pelas rôptrias, os micronemas e o conóide, sendo este último, apenas presente em coccídeos, uma subclasse que inclui o *Toxoplasma* (MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

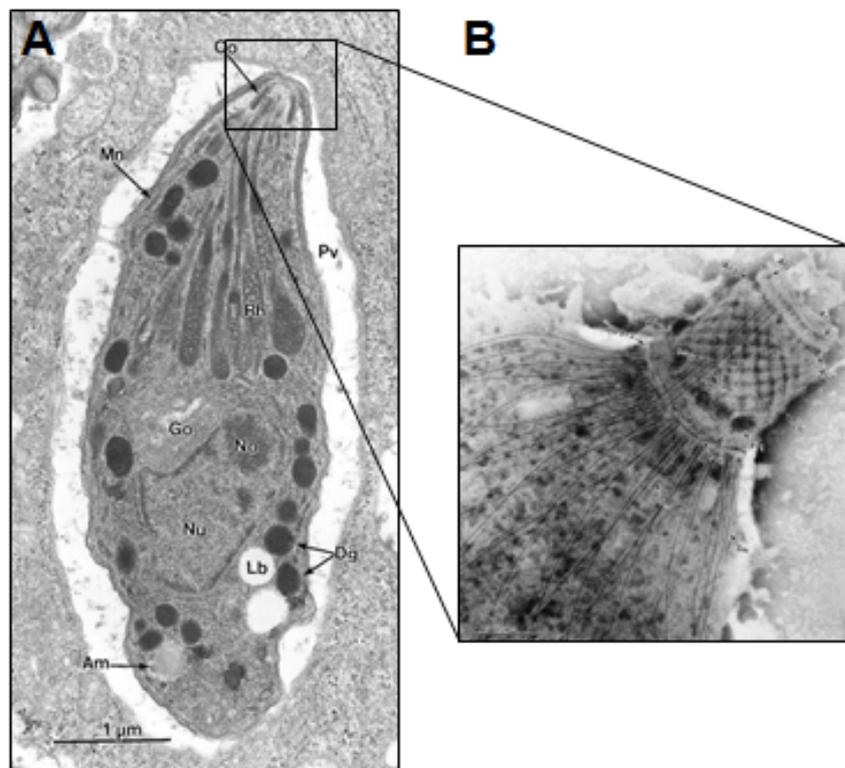


Figura 3: Complexo apical de formas taquizoítas de *T. gondii*. Característica única de parasitas do filo Apicomplexa. (A) Imagem de um parasita *T. gondii*, forma taquizoíta, obtida por microscopia eletrônica de transmissão, destacando as organelas do complexo apical (Mn: Micronema; Rh: Rôptrias; Co: Conóide) e outros (Go: Complexo de Golgi; Nu: Núcleo; No: Nucléolo; Lb: Corpos lipídicos; Dg: Grânulos densos; Ag: Grânulo de amilopectina e Pv: Vacúolo parasitóforo). (B) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região do conóide de formas taquizoítas (Adaptado de DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

As rôptrias e micronemas são organelas secretórias necessárias para motilidade, adesão e invasão na célula hospedeira assim como a formação do vacúolo parasitóforo. O principal alvo do conteúdo dessas organelas é a membrana

plasmática da célula hospedeira durante a invasão do parasita (BLACKMAN; BANNISTER, 2001; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002). Os micronemas são pequenas estruturas, que contém um grande número de proteínas denominadas MICs. Estas proteínas medeiam interações com componentes presentes na superfície da célula hospedeira, sendo liberadas em um processo regulado por cálcio nos momentos iniciais da interação com a célula. Muitas dessas proteínas funcionam como adesinas, auxiliando na adesão do parasita na superfície da célula hospedeira para sua invasão. Esta organela também está relacionada com a formação da junção móvel, que se forma entre as membranas do parasita e da célula hospedeira durante a invasão (LOVETT et al., 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

As róptrias são organelas maiores do que os micronemas, sendo que cada apicomplexa possui uma quantidade diferente, podendo ainda variar dependendo do estágio do ciclo de vida. Sabe-se que o *Toxoplasma* possui 8 róptrias em sua forma taquizoíta. As proteínas desta organela, denominadas ROPs, são secretadas na célula hospedeira através de vesículas. Estas vesículas carregam proteínas e estruturas membranares que irão fazer parte da membrana do vacúolo parasitóforo (BLACKMAN; BANNISTER, 2001; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

O conóide é uma pequena estrutura em forma de cone, que se encontra no ápice extremo do parasita. Esta organela é constituída por um conjunto de filamentos espiralados semelhantes aos microtúbulos, e desempenha um papel mecânico na invasão. Esta organela possui 3 anéis, sendo que o mais inferior é o anel polar, que é um dos 3 centros necessários para a organização dos microtúbulos nestes parasitas (BLACKMAN; BANNISTER, 2001; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA, 1974).

1.4.2 Apicoplasto

O apicoplasto é uma organela única de Apicomplexas, presente em quase todos os parasitas do filo. Esta organela possui um DNA circular de cerca de 35 kb, que inicialmente acreditava-se ser um DNA mitocondrial, mas análises de relação filogenética com outros organismos mostraram que trata-se de um genoma semelhante ao de cloroplasto de algas. A sua origem endossimbiótica secundária é justificada pela presença de quatro membranas, onde inicialmente, uma cianobactéria foi engolfada por uma alga, estabelecendo um estilo de vida

intracelular, e então, organismos não fotossintéticos adquiriram essas algas resultando em plastídeos secundários. As quatro membranas seriam resultado deste processo, onde as 2 membranas mais internas seriam da cianobactéria, a terceira seria a membrana plasmática da alga e a última é derivada do compartimento endossomal do hospedeiro, como mostra a figura 4. Em *Toxoplasma*, esta organela é não-fotossintética, localizada na região anterior ao núcleo e próximo ao complexo de Golgi, tendo como função a síntese de ácidos graxos do tipo II, síntese de isoprenóides e síntese de heme, auxiliando em algumas vias metabólicas. Além disso, a organela mantém as funções essenciais para sua manutenção, como síntese de DNA e proteínas (MCFADDEN; WALLER, 1997; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010; STRIEPEN, 2011; WILSON et al., 1991).

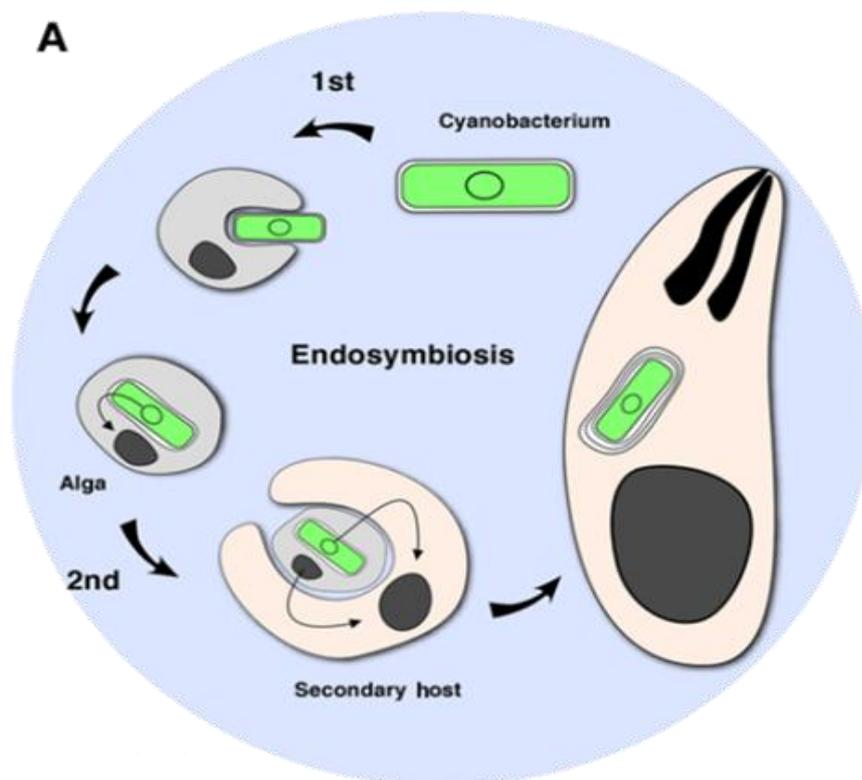


Figura 4: Origem do apicoplasto. O apicoplasto é uma organela única de parasitas apicomplexas, de origem endossimbiótica secundária, onde primeiramente, uma cianobactéria foi engolfada por uma alga, e esta alga foi posteriormente engolfada por um hospedeiro, resultando na obtenção de um plastídeo secundário (Fonte: STRIEPEN, 2011).

1.5 REGULAÇÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

Atualmente, grande parte dos estudos em eucariotos concentram-se em compreender mecanismos de regulação da expressão gênica e como esses mecanismos afetam os processos biológicos, como a diferenciação celular. Sabe-se que diferentes tipos celulares de um organismo se tornam distintos pois são capazes de sintetizar e acumular diferentes conjuntos de moléculas de RNA e proteína, isso, sem alterar a sequência de DNA das células. Basicamente, segundo Alberts et al., existem 6 etapas para a regulação da expressão gênica, como mostra a figura 5. As seis etapas são: 1: a capacidade da célula de controlar quando e como um determinado gene é transcrito; 2: controle de como o transcrito de RNA é submetido ao *splicing* ou como é processado; 3: Seleção de quais RNAs mensageiros (mRNA) são exportados do núcleo para o citoplasma e sua localização; 4: Seleção de quais mRNAs são traduzidos pelos ribossomos; 5: Desestabilização de moléculas de mRNAs no citoplasma e 6: Ativação, inativação ou compartimentalização de proteínas específicas após a tradução.

Dentre a capacidade da célula de controlar principalmente a transcrição, um outro nível de regulação gênica tem se destacado nas últimas décadas: a regulação epigenética. Esse tipo de regulação afeta a estabilidade da cromatina, interferindo com processos dependentes de DNA, como a própria transcrição gênica, como será descrito no item abaixo (ALBERTS et al., 2010).

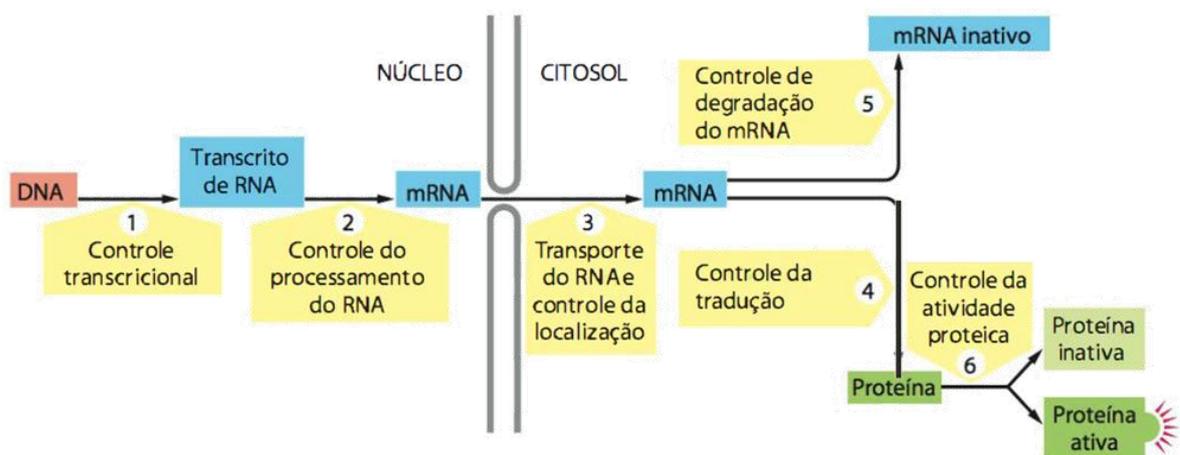


Figura 5: Quadro com as etapas da regulação gênica. As seis etapas da regulação gênica, desde o controle transcricional, que ocorre no núcleo, até a inativação da proteína no citoplasma (Fonte:ALBERTS et al., 2010).

1.6 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA

As alterações epigenéticas são mudanças na expressão gênica que não refletem alterações na sequência de DNA, e que são mitoticamente e/ou meioticamente herdáveis. A regulação epigenética pode ser estável, como por exemplo a inativação do cromossomo X, ou dinâmica. Quando a regulação epigenética é dinâmica, ela é descrita como memória epigenética, que seria quando uma mudança na expressão gênica é herdada ou quando um comportamento é induzido por um estímulo anterior (D'URSO; BRICKNER, 2014).

Existem três eixos que compreendem a regulação epigenética: a metilação de DNA, a regulação via RNAs não codificadores (do inglês: *non coding RNAs* - *ncRNAs*) e as modificações pós traducionais de histonas (MPTs).

A metilação de DNA compreende a adição covalente de um grupo metil ao átomo de carbono 5 do anel da pirimidina citosina em um dinucleotídeo CpG (citosina-guanina). Esse processo pode silenciar genes, uma vez que restringe o acesso da maquinaria de transcrição.

O segundo eixo envolve diferentes classes de ncRNAs que podem se ligar ao DNA e mudar sua conformação, ou ainda, no caso de microRNAs, silenciar genes através de controle pós-transcricional (HAMM; COSTA, 2011).

Por último, a modificação pós traducional de histonas, que afeta indiretamente o DNA. As histonas são alvos de cerca de 20 modificações pós traducionais como acetilação, fosforilação, metilação, sumoilação, ubiquitinação, entre outros. Essas modificações podem alterar as interações eletrostáticas entre o DNA e as histonas, afetando a acessibilidade de diferentes maquinarias, como as de transcrição e reparo de DNA. Além disso, muitas dessas modificações podem gerar sítios para ligação de outras proteínas podendo ativar vias celulares específicas.

1.6.1 Os nucleossomos e as MPTs

No centro da regulação epigenética está o nucleossomo, considerado a unidade fundamental da cromatina. Os nucleossomos são compostos por DNA e histonas, onde 147 pb de DNA envolvem um octâmetro de histona, que é formado por duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3, H4 ou histonas variantes). Esses nucleossomos são estabilizados por uma cópia da histona H1 (histona-*linker*), que auxilia a compactação da cromatina, especialmente para a formação da fibra de 30 nm, mas cuja presença é questionável em alguns organismos, inclusive em

Toxoplasma gondii (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; KOUZARIDES, 2007; LUGER et al., 1997; VANAGAS et al., 2012).

As histonas canônicas são proteínas pequenas, básicas e conservadas, capazes de regular o acesso a informações contidas no DNA. Estas histonas possuem um domínio globular conservado, responsável principalmente pelas interações entre as histonas e porções flexíveis menos conservadas N- e C-terminais, que estão expostas fora do nucleossomo, sendo alvo de intensas modificações pós traducionais (LUGER et al., 1997).

Algumas dessas modificações, como a acetilação, afetam diretamente a interação entre as histonas e o DNA, alterando a arquitetura da cromatina e resultando em cromatina mais frouxa (eucromatina) ou densamente compactada (heterocromatina). No entanto, esse é apenas um dos aspectos afetados pelas MPTs. Elas ainda podem funcionar como substrato para ligação de proteínas, desencadeando na ativação/silenciamento de outras vias biológicas. Várias proteínas que reconhecem essas modificações já foram identificadas e são conhecidas como leitores (do inglês, *readers*). Por exemplo, proteínas que reconhecem acetilação contém um domínio chamado bromodomínio, metilação, cromodomínio e fosforilação, 14-3-3 (NARDELLI et al., 2013; STRAHL; ALLIS, 2000).

Essas modificações são extremamente dinâmicas gerando inúmeras combinações possíveis, o que levou a proposta do código das histonas por Strahl e Allis (2000). A teoria do código das histonas determina que MPTs possam atuar combinadas ou sequencialmente, sendo lidas por moléculas efetoras, afetando diversos processos que utilizam o DNA como substrato (BOUGDOUR et al., 2010; KHORASANIZADEH, 2004; NARDELLI et al., 2013; STRAHL; ALLIS, 2000).

1.7 REGULAÇÃO GÊNICA EM *Toxoplasma gondii*

Assim como nos demais eucariotos, o processo de diferenciação de *Toxoplasma* consiste num refinado controle da expressão gênica. Análises de microarranjo determinaram que cerca de 18% nos RNAs mensageiros foram identificados como estágio-específicos, ressaltando a importância da regulação a nível transcricional nesses parasitas. Apesar disso, os mecanismos moleculares que regulam a expressão de genes em Apicomplexa ainda não são totalmente conhecidos (BOUGDOUR et al., 2009; RADKE et al., 2005; SAKSOUK et al., 2005).

A transcrição de eucariotos é normalmente regulada por sequências específicas de fatores de transcrição (SSTFs), elementos cis localizados na região promotora e pela estrutura da cromatina. SSTFs típicas estão ausentes em *T. gondii*, e a presença de elementos cis únicos sugere que as SSTFs também sejam únicas neste parasita. Em 2005, Balaji et al. identificaram *in silico* a presença de domínios semelhantes ao AP2 (Apetala2) de plantas, mostrando que parasitas apicomplexa podem estar usando fatores de transcrição semelhante ao de plantas (BALAJI et al., 2005; DIXON et al., 2010; GISSOT; KIM, 2008).

Por outro lado, sabe-se que o *Toxoplasma* possui um rico repertório de enzimas que auxiliam na remodelação da cromatina, sugerindo que a regulação epigenética desempenhe um papel importante no controle da expressão gênica nesse parasita (BOUGDOUR et al., 2009).

1.8 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA EM *Toxoplasma gondii*

1.8.1 Metilação de DNA

Como já dito anteriormente, a metilação da citosina em dinucleotídeos CpG está relacionada ao silenciamento gênico. A enzima citosina-5 DNA metiltransferase (DNMT) é a responsável por catalisar a metilação do DNA. Já foi identificado um homólogo de DNMT2 no genoma de *T. gondii*, mas não foi possível identificar nenhuma citosina metilada no DNA genômico de *Toxoplasma*. Não pode-se descartar a presença de citosinas metiladas em outras etapas do ciclo, uma vez que apenas formas taquizoítas foram analisadas. Talvez a metilação de DNA ocorra em pequeno número, ou estaria relacionada a eventos específicos, não sendo possível sua detecção com a metodologia utilizada. Contudo a ausência desta base modificada em *Plasmodium falciparum* e *Cryptosporidium parvum*, sugere que a metilação do DNA não é um mecanismo importante para regulação da expressão gênica em parasitas apicomplexas, pelo menos nas formas assexuadas (CHOI; KEYES; HORROCKS, 2006; CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; GISSOT et al., 2008; GISSOT; KIM, 2008).

1.8.2 RNAs reguladores

No processo de silenciamento mediado por RNA, denominado RNA de interferência (iRNA), pequenos RNAs não codificadores são produzidos pela RNase-II Dicer e estes RNAs guiam as proteínas Argonautas (AGO) para formação do complexo RISC e ativação da degradação do mRNA. Esse mecanismo é utilizado para regulação transcricional e pós transcricional. Em *Toxoplasma*, já foram identificados alguns membros da via de RNA de interferência (iRNA), como a proteína Dicer, um membro da família AGO e uma RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*). Como base nas características estruturais das proteínas identificadas, sugere-se que o mecanismo de RNAi de *Toxoplasma* é filogeneticamente e funcionalmente relacionado à maquinaria de plantas e fungos (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011; ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

Adicionalmente, foram identificadas 2 classes de RNAs: microRNAs (miRNAs), semelhantes com os de metazoários e siRNAs (pequenos RNAs de interferência, do inglês- *small interference RNA*), que são moléculas derivadas de sequências repetitivas e semelhantes com as de plantas. Braun et al. identificaram que siRNAs estão relacionados com proteínas necessárias para o silenciamento gênico, incluindo a desacetilase TgHDAC3, sugerindo que esses RNAs podem estar relacionados com a formação da heterocromatina. Também foi visto que os miRNAs sedimentam com poliribossomos, indicando que tenham papel na regulação traducional. A presença de TgAGO foi encontrada relacionada com as duas classes, reafirmando a função de silenciamento desses RNAs. Apesar da identificação da maquinaria para RNAi, ainda não se sabe em detalhes como ocorre o silenciamento por RNA, mas esses dados sugerem que os RNAs reguladores possuem um papel na regulação epigenética de *Toxoplasma* (ATAYDE; TSCHUDI; ULLU, 2011; BRAUN et al., 2010; ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

1.8.3 Modificações pós traducionais de histonas

Toxoplasma possui todos os genes que codificam as histonas canônicas, H2A, H2B, H3 e H4, como cópia única, com exceção de H2B que possui duas isoformas (denominadas H2Ba e H2Bb), onde H2Ba está presente nas formas taquizoítas, enquanto que H2Bb parece estar mais presente nos estágios sexuais. As histonas canônicas possuem alta similaridade de sequência com a de humanos, principalmente H3 e H4 (90% e 94% de identidade respectivamente), enquanto que

H2A e H2B apresentam mais diferenças, especialmente na porção N-terminal (79% e 75% de identidade respectivamente).

Além das histonas canônicas, *T. gondii*, possui 5 histonas variantes: H3 centromérico (CenH3), H3.3, H2A.X, H2A.Z e H2Bv (uma variante específica de protozoários). Em *Toxoplasma*, já se sabe que CenH3 possui função conservada como histona centromérica, e que H2A.Z e H2B.Z interagem entre si e estão localizadas em locais de início de transcrição. A variante H2A.X está relacionada a genes silenciados e ao reparo de DNA (BROOKS et al., 2011; DALMASSO et al., 2006, 2009; NARDELLI et al., 2013).

Em um trabalho de Nardelli et al., foi mapeado o código das histonas de *Toxoplasma gondii*, revelando modificações únicas, e em sua maioria conservadas nas histonas canônicas e variantes desse parasita. Ao todo foram identificados 249 peptídeos com 108 modificações, em combinações diferentes, como mostra a figura 6. Variantes como H2A.Z e H2B.Z possuem suas regiões N-terminal com vários resíduos acetilados, o que corrobora com os dados obtidos por Dalmaso et al. Embora a função dessas modificações não estejam elucidadas em *Toxoplasma*, o mapeamento das MPTs constituem um primeiro passo para entender a importância dessas modificações neste parasita (DALMASSO et al., 2009; NARDELLI et al., 2013).

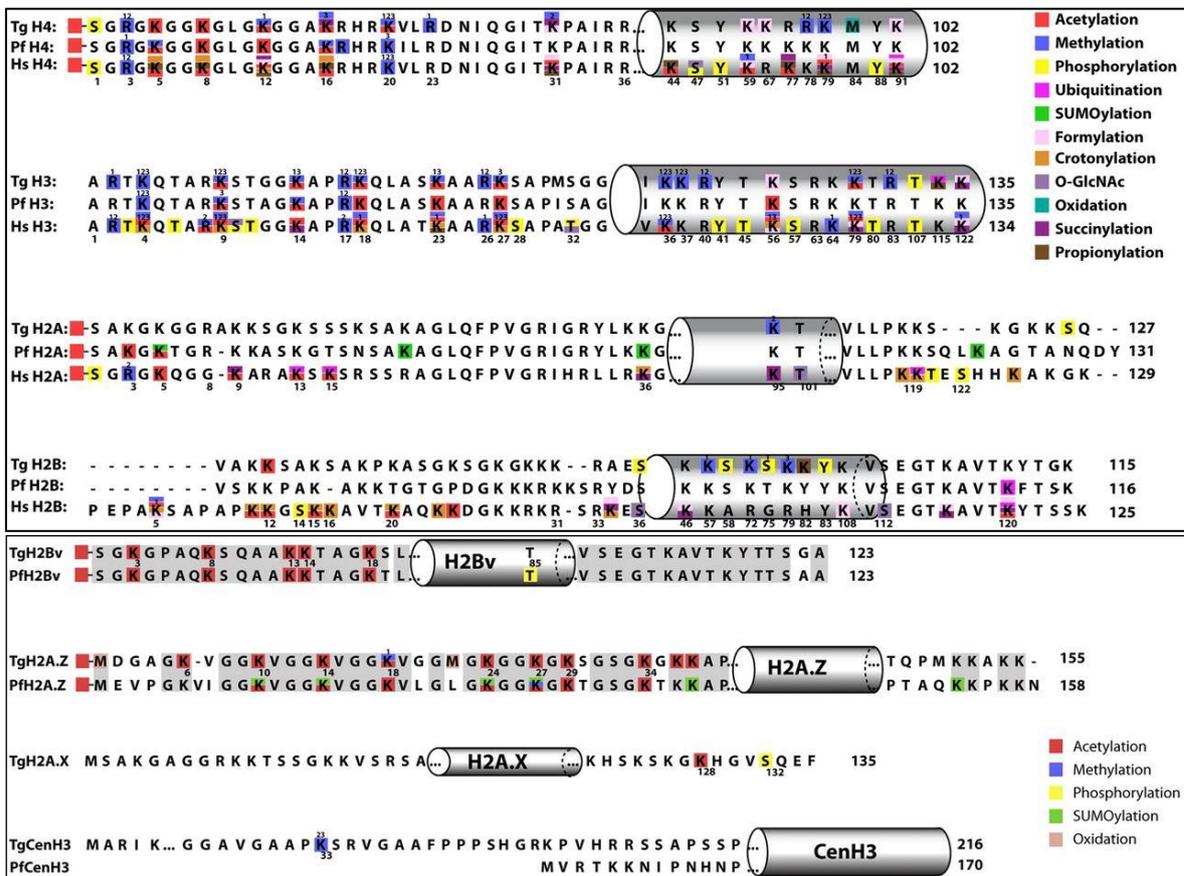


Figura 6: Código das histonas de *Toxoplasma gondii*. As modificações pós-traducionais identificadas nas histonas canônicas (painel superior) e variantes (painel inferior) de *Toxoplasma*, alinhadas com as modificações já identificadas de *Plasmodium falciparum* (Pf) e *Homo sapiens* (Hs) (Fonte: NARDELLI et al., 2013).

Em *Toxoplasma*, uma das modificações mais estudadas é a acetilação de histonas, principalmente por afetar a interação das histonas com o DNA, interferindo diretamente com o controle da expressão gênica. A acetilação é um processo reversível feita por acetiltransferases de histonas (HATs) enquanto que a desacetilação é feita por desacetilases de histona (HDACs) (MAUBON et al., 2010; VANAGAS et al., 2012).

As HATs são classificadas em 3 famílias principais: GNAT (*Gcn5-related acetyltransferases*), MYST (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60) e p300/CBP. Essas enzimas transferem grupamentos acetil de Acetil-CoA para lisinas presentes principalmente na cauda das histonas. A adição de um grupo acetil, neutraliza a carga positiva das lisinas, fazendo com que diminua sua interação com o DNA, deixando a cromatina mais frouxa, facilitando o acesso pelas maquinarias transcricionais. Por outro lado, as HDACs removem as acetilações dos resíduos de lisinas, restaurando suas cargas positivas, o que acarreta no aumento da interação com o DNA, resultando na repressão transcricional (CARROZZA et al., 2003;

KOUZARIDES, 2007; VERDONE; CASERTA; DI MAURO, 2005; YANG; SETO, 2003). A acetilação/desacetilação de histonas pode afetar muitos processos, como a expressão gênica, estabilidade de mRNAs, interações proteicas, estabilidade de proteínas e atividade enzimática (MICELLI; RASTELLI, 2015; SPANGE et al., 2009).

Em *Toxoplasma*, foram identificadas 4 acetiltransferases, TgGCN5-A, TgGCN5-B, TgMYST-A e TgMYST-B. Apesar de TgGCN5-A e TgGCN5-B possuírem domínios semelhantes, já sabe-se que acetilam diferentes substratos. TgGCN5-A acetila especificamente a lisina 18 da histona H3 (H3K18), e possui um papel importante na diferenciação da forma taquizoíta para bradizoíta, porém, parece ser dispensável para o parasita. Por outro lado TgGCN5-B, acetila múltiplas lisinas na cauda de H3, e parece ser essencial para o parasita, pois seu nocaute não foi bem-sucedido. O nocaute de TgMYST-A, assim como a superexpressão, também não foram viáveis, sugerindo que seja necessária uma regulação precisa. Esta enzima possui duas formas, uma longa e uma curta, e ambas estão presentes no núcleo e citoplasma do parasita (BHATTI et al., 2006; SMITH et al., 2005; VANAGAS et al., 2012).

1.9 DESACETILASES DE HISTONAS

As HDACs são classificadas em 4 classes, de acordo com análises filogenéticas e similaridade com as sequências de levedura. As classes I, II e IV são consideradas HDACs clássicas, possuindo zinco como cofator e conhecidas por serem inibidas por TSA (Tricostantina A), enquanto que a classe III é considerada não clássica, onde as enzimas usam NAD⁺ como cofator e são conhecidas como sirtuínas.

As HDACs de classe I são homologas à Rpd3 de levedura e estão localizadas principalmente no núcleo. Elas possuem seu domínio catalítico na porção N-terminal. A classe II possui homologia à Hda1 de levedura e transitam entre o núcleo e o citoplasma. A classe III possui homologia com a Sir2 de levedura. Já a classe IV é classificada separadamente, pois não possui similaridade nem com Rpd3, nem como Hda1, sendo a HDAC11 de humanos, a mais caracterizada desta classe (DE RUIJTER et al., 2003; GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004; MICELLI; RASTELLI, 2015; VANAGAS et al., 2012).

O domínio catalítico das HDACs clássicas é formado por cerca de 390 aminoácidos conservados, resultando estruturalmente em um único e compacto

domínio α/β composto por 8 folhas β em paralelo centrais, cercadas por várias α -hélices de ambos os lados (DE RUIJTER et al., 2003; FINNIN et al., 1999; MICELLI; RASTELLI, 2015).

As HDACs clássicas catalisam a hidrólise do grupamento acetil presente nos grupamentos ϵ -amino dos resíduos de lisina (acetil-L-lisina) em histonas e proteínas não histonas para produzir L-lisina e acetato. Como elas possuem um domínio catalítico bastante conservado, assume-se que todas possuem um mecanismo catalítico semelhante. Neste processo, o substrato carbonilo, presente no resíduo de lisina acetilado, é polarizado pelo zinco e pela ligação de hidrogênio, facilitando o ataque nucleofílico no carbonilo, que se liga à molécula de água (FINNIN et al., 1999; LOMBARDI; COLE, 2011; MICELLI; RASTELLI, 2015).

1.9.1 Desacetilases de histona em *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* possui 7 histonas desacetilases (5 HDACs e 2 sirtuínas) que foram agrupadas em 4 classes de acordo com seus domínios, seus cofatores e sua sequência, conforme figura 7 (HAKIMI; DEITSCH, 2007; VANAGAS et al., 2012).

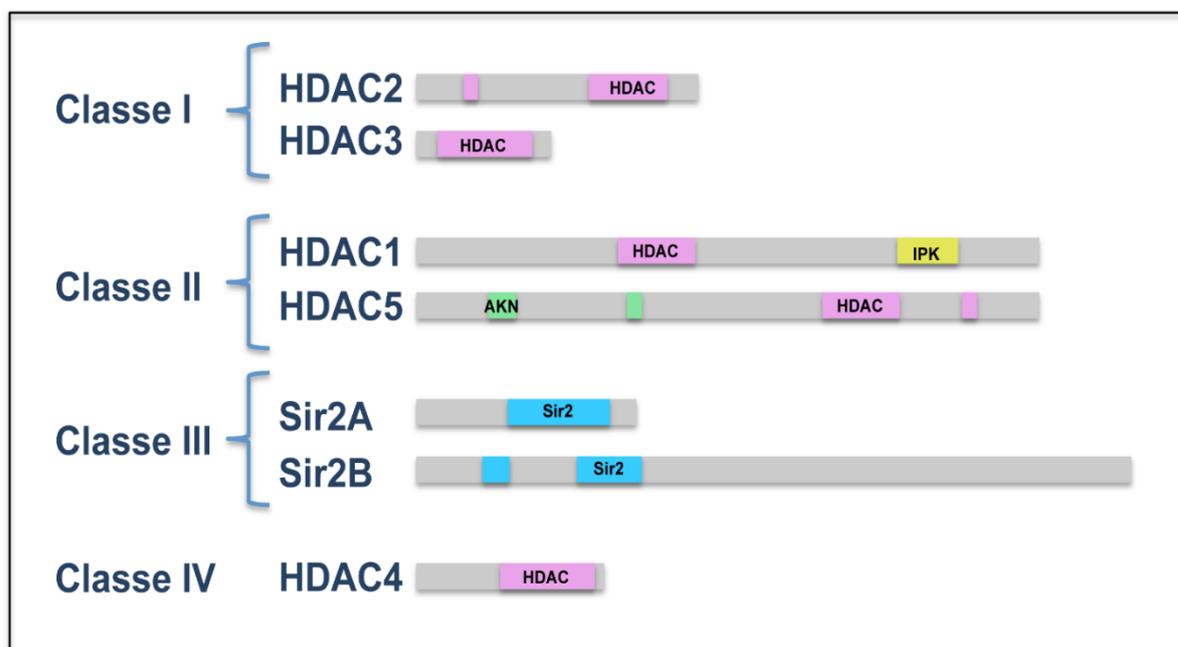


Figura 7: Histonas desacetilases de *Toxoplasma gondii*. O parasita possui 7 histonas desacetilases, que foram classificadas em 4 classes (Classes I a IV). As enzimas foram agrupadas de acordo com similaridade de sequências com HDACs de levedura, seus cofatores (Nad^+ ou Zn^{2+}) e domínios (Adaptado de VANAGAS et al., 2012).

Em parasitas apicomplexa, a atenção voltou-se as HDACs quando em 1996, houve a descoberta da apicidina, um composto anti protozoário isolado de fungo que

inibe especificamente HDACs em Apicomplexa (DARKIN-RATTRAY et al., 1996). Inibidores de HDACs já haviam mostrado grande potencial terapêutico para doenças parasitárias e em outras doenças, como câncer. Isso ocorre pois ao inibir desacetilases de histonas, o processo de transcrição de certos genes pode ser reativado, com consequências diversas para reversão das doenças (VANAGAS et al., 2012). Atualmente existem quatro fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), agência americana responsável pela regulamentação, que estão em uso para o tratamento de câncer, e que inibem seletivamente HDACs. Além disso, existem muitos compostos que estão em fase experimental voltados para o tratamento de diversas doenças (ZWERGEL et al., 2016).

Em *Toxoplasma* foi investigado o modo de ação do composto FR235222, um inibidor específico de HDAC3 que diminuiu significativamente o crescimento do parasita e que é capaz de induzir a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos *in vitro* (BOUGDOUR et al., 2009).

As HDACs de *Toxoplasma* ainda não foram investigadas com profundidade, com exceção da HDAC3, que como mencionado acima, possui um importante papel na diferenciação do taquizoíto para forma bradizoíta. Importaneamente, foi verificado, por análises de imunoprecipitação de cromatina, que TgHDAC3 se encontra nas regiões promotoras de genes específicos de bradizoítas que estão silenciados na forma taquizoítas utilizada nos estudos. Em contrapartida, esses taquizoítos apresentam a acetiltransferase TgGCN5-A localizada na região promotora de genes transcricionalmente ativos, ressaltando mais uma vez a importância dessas enzimas para a regulação da expressão gênica e diferenciação de *T. gondii* (SAKSOUK et al., 2005).

As histonas desacetilases têm como principal alvo as histonas, mas já foram identificados outros substratos para essas enzimas. Recentemente, um trabalho de Jeffers et al. identificou peptídeos acetilados de *Toxoplasma* a partir do uso de espectrometria de massas. Neste trabalho, foram identificados resíduos acetilados em proteínas conhecidas, como em histonas e na tubulina, além de 411 novos sítios de acetilação em 274 proteínas de taquizoítas. As proteínas acetiladas estão envolvidas em diversas funções celulares, possuindo diferentes localizações, inclusive em organelas específicas de parasitas apicomplexa, como o apicoplasto (JEFFERS; SULLIVAN, 2012).

1.10 JUSTIFICATIVA

Toxoplasma possui um repertório completo de enzimas remodeladoras da cromatina. Dentre elas, as desacetilases de histona se destacam principalmente pelo papel no silenciamento gênico. Nos últimos anos, a atenção às HDACs aumentou, em virtude de inibidores dessas enzimas terem mostrado grande potencial terapêutico, sendo utilizados para o tratamento de diversas doenças, principalmente o câncer. Da mesma forma, o interesse nessas enzimas em parasitas do filo Apicomplexa também foi ampliado com a descoberta da apicidina, composto que inibe HDACs em *Plasmodium* e o composto FR235222 que inibe especificamente HDAC3 de *Toxoplasma* (BOUGDOUR et al., 2009; DARKIN-RATTRAY et al., 1996).

Dentre as sete HDACs de *Toxoplasma*, apenas a TgHDAC3 foi parcialmente caracterizada, com funções relacionadas ao silenciamento gênico e a diferenciação do parasita (SAKSOUK et al., 2005). Das outras seis desacetilases, a TgHDAC4 se destaca por ser a única enzima de classe IV em *T. gondii*, classe da qual há poucas informações disponíveis, além de possuir dois sinais preditos: um de exportação nuclear e um de clivagem, cujas funções não estão caracterizadas. Ainda, não há similaridade com outras espécies, exceto parasitas do filo Apicomplexa, sendo, portanto, o foco desse estudo.

2. OBJETIVO

Determinar o papel da histona desacetilase 4 de *Toxoplasma* (TgHDAC4) na regulação da expressão gênica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a localização celular da TgHDAC4 através de microscopia de imunofluorescência;
2. Realizar o nocaute gênico de TgHDAC4;
3. Identificar as variações fenotípicas advindas da deleção de TgHDAC4, especialmente na organização nuclear.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE *T. gondii*:

As cepas de *T. gondii* são divididas em três grupos (I, II e III) de acordo com sua virulência e a eficiência de diferenciação em bradizoítas (HUYNH; CARRUTHERS, 2009). Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado cepa RH $\Delta hxgp rt \Delta ku80$, que é altamente virulenta e pouco diferencia. Esse parasita é nocaute para dois genes: o *HXGPRT* (*hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyltransferase* – Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase), posteriormente utilizado como marcador de seleção e o *Ku80*, gene da via de recombinação não homóloga.

Teoricamente, *T. gondii* é capaz de infectar qualquer célula nucleada, tendo preferência por células em monocamadas a células em suspensão. Aqui usamos cultura primária de fibroblastos HFF (*human foreskin fibroblastos*-fibroblastos de prepúcio humano), principalmente por fornecer uma ampla área permitindo ao parasita diversas etapas de replicação antes da ruptura e também por ser mais resistente a diversos compostos, facilitando a seleção dos parasitas (ROOS et al., 1994).

Células HFFs foram crescidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-Gibco), suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de streptomocina e mantidas a 37°C com 5% de CO₂. Após atingirem confluência, as células foram infectadas com formas taquizoítas do parasita na razão de 3-5 parasitas por célula. Para o repique das células HFFs, o meio foi retirado e as células, lavadas com 5 mL de PBS 1X estéril (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄, 1,5 mM de KH₂PO₄). Retirou-se o PBS e foi adicionado tripsina (Sigma) (quantidade variável, de acordo com a quantidade de células- 1 mL para garrafas T25 e 2 mL para garrafas T75). Após 2-5 minutos, as células ficam totalmente desaderidas e são diluídas em meio DMEM e distribuídas para novas garrafas na diluição de 1:5.

3.2 ETIQUETAMENTO DO GENE *TgHDAC4*:

3.2.1 Extração de DNA genômico

Para realizar a extração do DNA genômico de *T. gondii* cepa RH, cerca de 3×10^7 parasitas foram centrifugados a 2.000 rpm, e depois lavados duas vezes com PBS 1X, na mesma velocidade. Os parasitas foram lisados com 500 μ L de tampão TELT (50 mM de Tris-HCl, 62,5 mM de EDTA, 2,5 M de LiCl, 4% Triton X-100), homogeneizados por inversão e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Então, foi adicionado 300 μ L de fenol/clorofórmio e centrifugado por 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto, e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente na mesma velocidade por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em Thermomixer comfort (Eppendorf) a 50 °C. O DNA foi ressuspendido em 50 μ L de água milliQ e tratado com 20 μ g/mL de RNase A como descrito em Sambrook e Russel, 2001.

3.2.2 Síntese dos oligonucleotídeos para o etiquetamento

A estratégia de obtenção do etiquetamento da proteína endógena envolve amplificação de aproximadamente 1000 pb da porção final do gene de interesse (HDAC4 ID: TGME49_257790), excluindo o códon de terminação e sua respectiva clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT, que adiciona um etiqueta de 3x HA (hemaglutinina do vírus influenza) na região C-terminal da proteína (HUYNH; CARRUTHERS, 2009). Para isso, utilizamos os dados do sequenciamento da cepa ME49 de *T. gondii*, presentes no banco de dados (toxodb.org), como molde para desenho dos oligonucleotídeos.

Dados presentes na literatura, descrevem que quando o vetor é linearizado na região central do inserto, gerando porções de pelo menos 300 pb, aumenta a eficiência da recombinação homóloga de 10 a 1000 vezes (HUYNH; CARRUTHERS, 2009; SZOSTAK et al., 1983). Sendo assim, a escolha da sequência a ser amplificada dependeu de uma análise quanto a presença de sítios únicos para digestão por uma enzima de restrição cujo sítio seja inexistente no vetor e que corte mais ou menos na metade do fragmento gênico a ser recombinado. Para identificação de tal sítio, utilizamos o software SerialCloner, disponível gratuitamente

online. Para o desenho dos oligonucleotídeos foi utilizado o programa Custom Primers - OligoPerfect™ Designer da Thermo Fisher Scientific. É necessário adicionar aos oligonucleotídeos uma sequência complementar ao vetor denominada LIC (de *Ligation Independent Cloning*), destacada em negrito na tabela 1, tornando possível o anelamento ao vetor por complementariedade de sequência.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para realizar o primeiro etiquetamento de *tghdac4*. Em negrito, sequências LIC necessárias para realizar a clonagem.

Nome:	Sequência:
TgHDAC4 Primer F	TACTTCCAATCCAATTTAATG CCACTGAAACAAGGGATCGC
TgHDAC4 Primer R	TCCTCCACTTCCAATTTTAG CGCCTACCTCGTTTAACTGACG

Após a reanotação do gene *tghdac4*, que encontra-se incompleto no banco de dados ToxoDB, foi realizado um segundo etiquetamento da proteína de interesse. Foi obtida a sequência correta do gene de interesse e novos oligonucleotídeos foram sintetizados conforme descrito abaixo (tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para realizar o segundo etiquetamento de *tghdac4* após o sequenciamento. Em negrito, sequências LIC necessárias para realizar a clonagem.

Nome:	Sequência:
TgHDAC4.2 Primer F	TACTTCCAATCCAATTTAATG CTACGCTCATGGCCTAGGC
TgHDAC4.2 Primer R	TCCTCCACTTCCAATTTTAG CCTCTGAGCTCCAGGCCTTG

3.2.3. Amplificação gênica por PCR

A região foi amplificada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando como molde o DNA genômico extraído de *T. gondii* cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*. Para realizar a PCR com a enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Thermo Fisher Scientific), foi adicionado à reação: 1X do tampão fornecido pelo fabricante, 0.3 mM de cada dNTPs, 1 mM de MgSO₄, 10 μ mol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 100 ng de DNA genômico e 1 U da enzima *Pfx*. O programa utilizado foi: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos oligos, 68° C

para extensão dos fragmentos, por 90 segundos, e então 68° C por 10 minutos para extensão final.

Para amplificação com a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), foi adicionado à reação: 1X do tampão fornecido pelo fabricante, 0,2 mM de cada dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 10 μmol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 100 ng de DNA genômico e 1 U da enzima. O programa utilizado foi: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos oligos, 68° C para extensão dos fragmentos por 90 segundos, e então 68° C por 10 minutos para extensão final.

Para amplificação com a *Taq DNA Polimerase* recombinante (produzida e fornecida pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná-IBMP), foi adicionado à reação 1X do tampão fornecido pelo fabricante, 200 μM de dNTPs, 150 μM de MgCl₂, 10 μmol de cada oligonucleotídeo e 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* recombinante. O programa utilizado foi: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos oligos, 72° C extensão dos fragmentos, por 90 segundos e então 72°C por 10 minutos para extensão final.

3.2.4 Eletroforese de DNA

Para verificação dos produtos da PCR, foi feita uma eletroforese em gel horizontal de agarose 1 % submerso em tampão TBE 1X (89 mM de Tris Base; 89 mM Ácido Bórico e 2 mM de EDTA, pH 8,3), conforme descrito por Sambrook e Russel, 2001. Para corrida foram utilizados 5 μL da reação de PCR acrescido de tampão de amostra para DNA 1X (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) foram submetidos à um campo elétrico de 100 Volts por 1 hora. A visualização do perfil eletroforético do DNA foi obtida em transiluminador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia), após incubação em solução de brometo de etídio (0,5 μg/ mL).

3.2.5 Eletroeluição:

Devido ao aparecimento de bandas inespecíficas no produto de PCR , foi feito uma eletroeluição. Primeiramente foi preparado um gel de agarose 1%, onde a amostra foi separada. A partir da coloração com brometo de etídio, foi possível

visualizar e excisar a banda de interesse do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. A banda foi colocada em membrana de diálise (SnakeSkin Dialysis Tubing, 22 mm (Thermo Fisher Scientific)), e eletroeluída em TBE 1 X, 100 volts por 1 hora. Decorrido esse tempo, os pólos foram invertidos por 1 minuto. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e 200 mM de NaCl.

3.2.6 Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT

A clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT (HUYNH; CARRUTHERS, 2009), envolve clonagem independente de ligação (*Ligation Independent Cloning-LIC* vector). Ao contrário das técnicas usuais de clonagem e ligação, que envolvem digestão com enzimas de restrição e posterior ligação por enzimas DNA ligases, essa técnica utiliza a atividade 3'→ 5' exonuclease da *T4 DNA polimerase* para criar sequências complementares entre o vetor e o inserto. O anelamento entre vetor e inserto ocorrerá então por complementariedade de sequências, o que resulta em alta eficiência de clonagem, de acordo com dados na literatura (HUYNH; CARRUTHERS, 2009).

Para realizar a clonagem, primeiramente foi feito um tratamento do vetor e inserto com a enzima *T4 DNA Polimerase*, como mostra a figura 8. Para o tratamento do inserto foi adicionado à reação de 20 µL: 1 µmol do inserto, 1X do tampão específico da *T4 DNA Polimerase*, 5 mM de dithiothreitol (DTT), 4 mM **dCTP** e 1 U da enzima *T4 DNA polymerase* (Novagen LIC qualified). A solução foi incubada à 22°C por 30 minutos, e depois à 75°C por 20 minutos. Para o tratamento do vetor, 2 µg do vetor foram linearizados com a enzima *PacI* (New England Biolabs), sendo utilizado 2 U da enzima e 1X do tampão específico por 2 horas à 37°C, e então foi incubado em uma reação similar a utilizada para o inserto, dessa vez de 60 µL, utilizando **dGTP** ao invés de **dCTP**. A ligação entre vetor e inserto ocorreu através da incubação de 5 µL do inserto tratado e 1 µL de vetor por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição de 1 µL de EDTA 25 mM, e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente para interromper a reação.

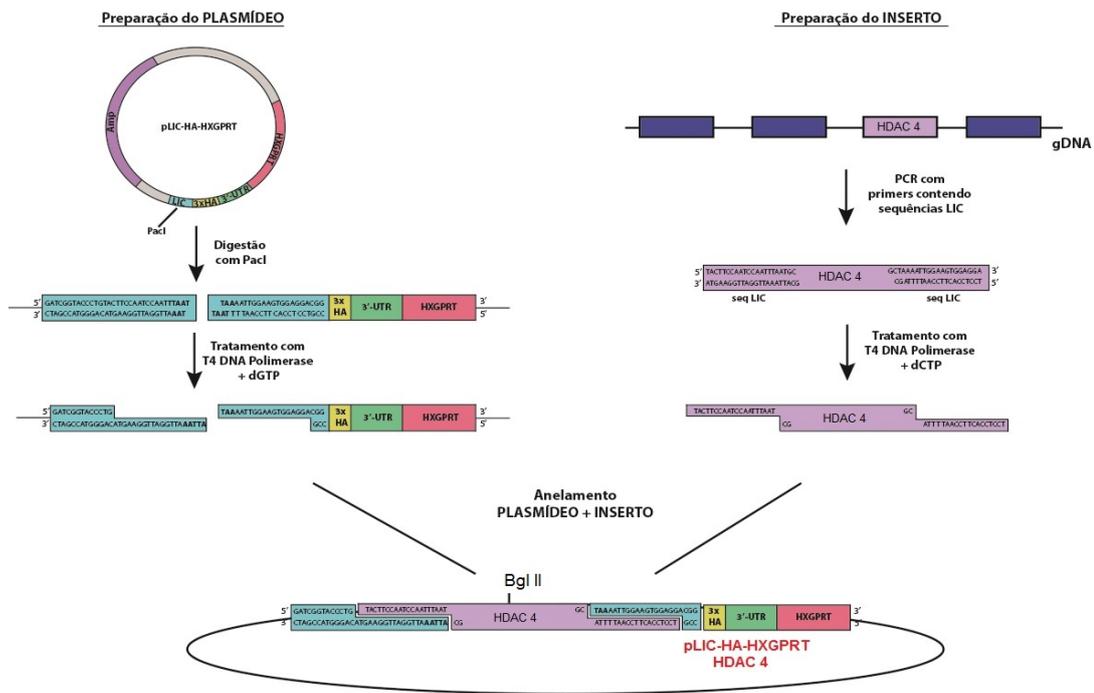


Figura 8: Esquema da clonagem independente de ligação (LIC). Representação do método de clonagem independente de ligação de *tghdac4* em vetor pLIC.HA.HXGPRT. Para realizar a clonagem, vetor e produto da PCR foram tratados utilizando a enzima T4 DNA Polimerase, cuja atividade 3'→5' exonucleolase cria sequências complementares. Após tratamento, vetor e inserto são anelados por complementariedade.

3.2.7 Transformação Bacteriana

A transformação foi feita em bactérias *E. coli* cálcio-competentes, cepa *DH5α* através da metodologia de choque térmico como descrito por Sambrook e Russel, 2001. 2 µL do plasmídeo foram incubados com as bactérias por 30 minutos, no gelo. Após esse período, as bactérias foram submetidas ao choque térmico (2 minutos à 42°C e 2 minutos no gelo). Após o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB (triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) sem antibióticos e as bactérias foram incubadas à 37°C, por 1 hora em agitação constante para recuperação bacteriana. Após a recuperação, as bactérias foram semeadas em placa com LB com 100 µg/mL de ampicilina.

3.2.8 Seleção dos clones positivos por PCR de colônia

As colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia, utilizando os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento gênico. Esta análise permite verificar a presença do plasmídeo com o inserto correto. A técnica baseia-se na aplicação direta da colônia em um tubo, onde foi adicionada os demais componentes da reação, utilizando a Taq DNA polimerase recombinante (IBMP)

(item 3.2.3) . A lise da parede bacteriana e desnaturação do DNA será então obtida no próprio termociclador. Paralelamente, foi realizada, uma placa mãe para estoque das colônias. A análise dos produtos da PCR de colônias foi obtida em gel de agarose conforme descrito em 3.2.4.

No caso de clones positivos, suas respectivas colônias foram expandidas em meio líquido LB com 100 µg/mL de ampicilina, à 37°C por 12 horas. Após o crescimento das bactérias, os plasmídeos foram purificados utilizando o método de extração plasmidial pela lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.2.9 Seleção dos clones positivos por digestão enzimática

Para uma segunda etapa de confirmação, realizamos um mapa de restrição, onde a presença do inserto foi verificada por digestão individual ou combinada com as enzimas de restrição, *NotI*, *SphI*, *BgIII*, *Xho* e *EcoRV* (todas fornecidas por New England Biolabs). As enzimas *XhoI* e *NotI*, cortam dentro do vetor e *SphI* e *BgIII*, dentro do fragmento gênico de *tghdac4* utilizado para o primeiro etiquetamento, enquanto que *EcoRV*, corta dentro da sequência utilizada para o segundo etiquetamento. A seleção das enzimas foi feita utilizando o programa Serial Cloner, como mostrado na Figura 9.

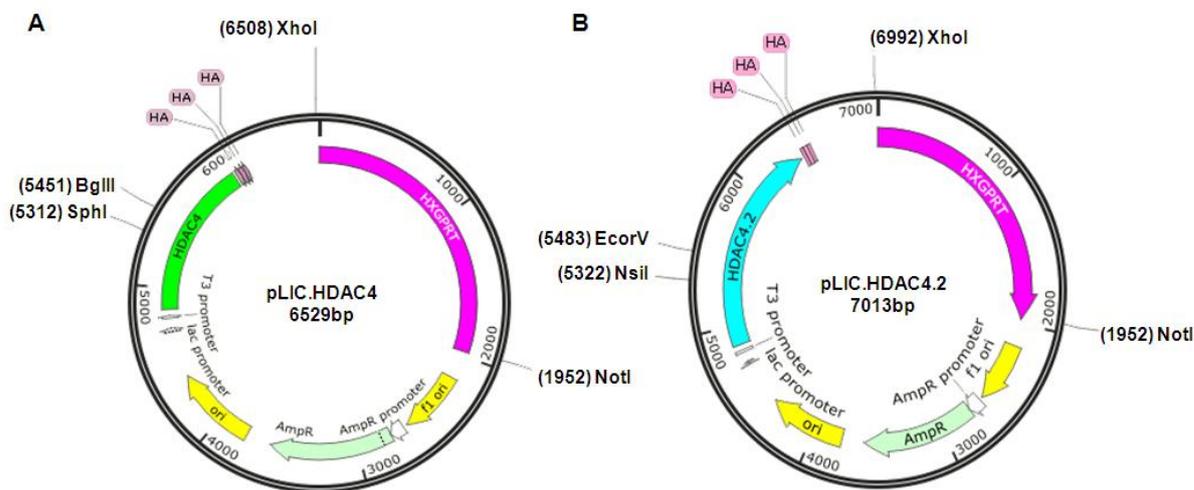


Figura 9: Seleção das enzimas para confirmar clonagem. (A) Mapa do vetor pLIC.HA.HXGPRT com o fragmento do primeiro etiquetamento de *tghdac4* (verde), mostrando as enzimas que cortam dentro do cassete (*BgIII* e *SphI*) e dentro do vetor (*XhoI* e *NotI*). (B) Mapa do vetor pLIC.HA.HXGPRT com o fragmento do segundo etiquetamento de *tghdac4* (azul), mostrando as enzimas que cortam dentro do cassete (*EcoRV* e *NsiI*) e dentro do vetor (*XhoI* e *NotI*)

As reações foram obtidas misturando 0,5 µg de DNA, 0,5 U de cada enzima e 1X do tampão específico. A digestão ocorreu à 37 °C por 4 horas. Para verificar a digestão, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% conforme 3.2.4.

Os clones positivos confirmados foram novamente purificados, dessa vez pelo kit QIAprep® Miniprep da Qiagen, conforme descrição do fabricante e submetidos a sequenciamento de DNA para confirmação e verificação da presença de possíveis mutações decorrentes da amplificação pela *DNA Polimerase*.

Para realizar a transfecção, é necessária a linearização do plasmídeo. O plasmídeo do primeiro etiquetamento foi linearizado com *SphI* (New England Biolabs) sendo na reação, adicionado 10 µg de DNA, 10 U da enzima e 1X do tampão específico. A digestão ocorreu à 37°C por 4 horas. Para o segundo etiquetamento, o plasmídeo foi linearizado com *NsiI* (New England Biolabs), nas mesmas condições descritas acima.

Posteriormente cerca de 5 µg dos plasmídeos linearizados foram precipitados. Para precipitação foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M pH 5,2. A precipitação ocorreu durante a noite a -20°C ou por 30 minutos, no gelo seco.

3.2.10 Transfecção em *T. gondii*:

A concentração mínima de amostra recomendada para transfecção é de cerca de 5 µg de plasmídeo purificado para 10⁷ parasitas. Um total de 10⁷ parasitas foram centrifugados por 10 minutos, à 1.800 rpm, à 4°C e lavados uma vez com 5 mL de Cytomix (2 mM EDTA, 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂), nas mesmas condições. Os parasitas foram ressuspensos em 650 µL de Cytomix com adição de 2 mM de ATP. O DNA precipitado foi ressuspensado com 50 µL de Cytomix também com adição de 2 mM de ATP e misturado aos 650 µL de parasitas. A transfecção do plasmídeo foi feita por eletroporação (Gene Pulser Xcell™- Bio-Rad) de acordo com especificações presentes na literatura (dois pulsos de 1.5kV. e capacitância de 25mF) em cubeta de 0,4 cm de gap (Gene Pulser®/Micropulser™ electroporation cuvettes- Bio-Rad).

Alternativamente, a eletroporação foi feita com eletroporador Nucleofector II (Amaxa Lonza), onde foi utilizado o programa T16. As cubetas utilizadas são específicas para este aparelho (Nucleofector® Cuvette). Nessas cubetas, o volume total para transfecção é de 100 µL.

Os parasitas transfectados foram colocados em placas de 6 poços previamente preparadas contendo células HFF confluentes, em meio DMEM e mantidos à 37°C com 5% de CO₂.

Após 24 hs, foi adicionada à cultura 25 mg/mL de ácido micofenólico e 50 mg/mL de xantina, específicos para o marcador HXGPRT. A seleção é possível através da reinserção do gene HXGPRT, presente no vetor, que participa da via de síntese de purinas. O *T. gondii* possui 2 vias para produção de purinas, a via de HXGPRT e a da adenosina kinase (AK). Ambos são cópia única, sendo que é necessário pelo menos uma das duas vias para a sobrevivência do parasita (CHAUDHARY et al., 2004). O ácido micofenólico bloqueia a AMP deaminase da via AK e a xantina é um substrato da via HXGPRT (DONALD et al., 1996). Como os parasitas utilizados para transfecção são nocaute para o gene *hxgprt*, eles só sintetizam purinas pela via AK, mas uma vez inibida pelo ácido micofenólico, apenas os parasitas que tiverem o vetor sobreviveram pela reativação da via *hxgprt*.

Vale ressaltar que a seleção dos parasitas leva pelo menos duas semanas, ou seja, o tempo necessário para que o controle (sem plasmídeo) esteja completamente morto. Decorrido esse período, a população transfectada foi verificada quanto a presença da etiqueta de 3X HA conforme descrito abaixo.

3.3 VERIFICAÇÃO DOS TRANSFECTANTES:

3.3.1 Preparação dos extratos proteicos

Para preparação dos extratos proteicos, parasitas que recém evadiram das células hospedeiras foram sedimentados por centrifugação por 10 minutos à 1.800 rpm, à 4°C, e lavados uma vez com PBS 1X, nas mesmas condições. O PBS foi retirado cuidadosamente e os parasitas foram ressuspensos em tampão de amostra para proteínas (40 mM de Tris-HCl, 1% de SDS 10%, 2,5% de β-mercaptoetanol 14,7 M, 6% Glicerol, 0,005% de Azul de Bromofenol). As amostras foram desnaturadas à 95°C por 5 minutos, misturadas vigorosamente e centrifugadas por 2 minutos à velocidade máxima. Para ambos os etiquetamentos, as amostras foram preparadas sob as mesmas condições.

3.3.2 Western Blotting

Para a separação das proteínas, foi preparado um gel vertical desnaturante SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) e o conteúdo proteico correspondente a cerca de 10^7 parasitas foi aplicado em cada canaleta, além do marcador BenchMark pré-corado (Invitrogen). A corrida foi feita à 25 mA em tampão SDS PAGE 1X (25 mM de TRIS-base, 192 mM de glicina e 0,1 % de SDS), o tempo necessário para separar bandas de maior peso molecular (o tamanho da proteína TgHDAC4 é de 124 kDa). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Optitran BA-S 85 Nitrocellulose Membrane, 0.45 μ m, GE Healthcare) a 20 V por 18 horas, segundo (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Após as 18 horas, aumentamos a voltagem por 60 V por 2 horas adicionais. Para visualização das bandas, as membranas foram coradas com 0,5% de Ponceau S e 1% de ácido acético.

Posteriormente à identificação das bandas, a membrana foi descorada com água e bloqueada com PBS 1X com 5 % de leite em pó Molico por 1 hora, sob agitação e a temperatura ambiente. Então a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-HA de camundongo (1:200) (Invitrogen) por 18 horas, à 4°C, sob agitação, em PBS 1X. Alternativamente, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HA de rato na diluição de 1:500 (Clone 3F10-Roche). A membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS 1X contendo 0,05% do detergente Tween-20 e incubada com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase por 1 hora, sob agitação, a temperatura ambiente. Para a membrana incubada com anti-HA de rato, foi utilizado o anticorpo secundário anti-rato conjugado com fosfatase alcalina (1:1000, Sigma). A membrana foi lavada 2 vezes por 10 minutos com PBS 1X, 0,05% de Tween-20 e uma vez somente com PBS 1X por 10 minutos.

Para reação de quimioluminescência, foi utilizado o kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), conforme recomendações. A revelação ocorreu utilizando filme fotográfico (Hyperfilm ECL-Amersham) ou alternativamente o fotodocumentador de membranas L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

Para revelação com fosfatase alcalina, foi feita a solução de revelação com 5 mL do tampão de revelação (100 mM de Tris-HCl pH 9.0, 150 mM de NaCl, 1 mM de $MgCl_2$), 33 μ L de NBT (nitro blue tetrazolium) e 16,5 μ L de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). A membrana foi submersa na solução e foi incubada de 5 a 15

minutos, sob agitação, na ausência de luz. Para interromper a reação, a membrana foi submersa em água destilada acrescida de EDTA.

3.3.3. PCR para confirmação da etiqueta

Para confirmação de ambas as etiquetas, foram sintetizados oligonucleotídeos para a verificação da correta inserção da etiqueta no final do gene de interesse. A sequência dos oligonucleotídeos é mostrada na tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para realizar confirmação da etiqueta de 3X HA após o gene *tghdac4*.

Nome:	Sequência:
HA-R	AAGCTTATCGATACCGTCG
HA-F	TACGACGTCCCGGACTACG
HA-INT-R	GCATAATCGGGCACATCATAG
F1 –F	GCGCATCCTCATTCTGGA

Para realizar a PCR, foram extraídos os DNAs genômicos (conforme item 3.2.1) da população dos dois transfectantes com TgHDAC4 etiquetada. Os oligonucleotídeos HA-R e HA-F foram utilizados apenas para a verificação da presença da etiqueta. Para verificação da correta inserção, foi utilizado o oligonucleotídeo HA-INT-R em conjunto com os oligonucleotídeos *forward* utilizados para amplificação de ambas as etiquetas (Tabela 1 e 2). Para o segundo etiquetamento, foi utilizado um oligonucleotídeo mais externo (F1-F) mostrado na tabela 3. Para amplificação da PCR, foram utilizadas as enzimas *Taq DNA Polimerase* recombinante (IBMP) e *Platinum Pfx DNA Polimerase*, conforme descrito em 3.2.3, utilizando 56°C para anelamento dos oligonucleotídeos e 2 minutos para extensão dos fragmentos.

3.3.4 Imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados para a localização celular de TgHDAC4 etiquetada com 3XHA. Primeiramente, foram crescidas células HFF em lamínulas em placa de 24 poços. As células, já confluentes, foram infectadas com 5×10^5 parasitas. Após 24 horas o meio de cultura foi retirado e as células foram cuidadosamente lavadas com PBS 1X. O PBS foi completamente retirado e foi

adicionado paraformaldeído 4% em PBS 1X para fixação das células, por 20 minutos. As células já fixadas foram lavadas três vezes com PBS 1X e permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,25% por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS 1X e o bloqueio foi feito em solução contendo 1% BSA e 0,2% Triton X-100 em PBS 1X por uma hora, sob agitação. Após o bloqueio foi adicionado o anticorpo primário anti-HA de rato (Roche), na diluição 1:250, por 18 horas à 4 °C, com agitação. Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e foram incubadas com anticorpo secundário anti-rato conjugado com Alexa-Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific), na diluição 1:600 e com 10 µM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 1 hora em temperatura ambiente, com agitação e na ausência de luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X e montadas com N-propil galacto, para preservar a fluorescência e analisadas com microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000 B, associado a um software de deconvolução (Leica AF6000).

3.3.5 Clonagem dos transfectantes

Após a verificação dos transfectantes, os parasitas contendo TgHDAC4 com etiqueta de 3XHA foram clonados pelo método de diluição seriada. Parasitas que recém evadiram das células foram contados e foi feita a diluição seriada até a concentração final de 1 parasita a cada 100 µL (1 parasita/poço). Esses parasitas foram adicionados a placa contendo células HFF confluentes e mantidos a 37°C com 5% de CO₂.

3.3.6 Ensaio de co-localização

Os ensaios de co-localização foram feitos com a população clonal do segundo etiquetamento de TgHDAC4. A co-localização de TgHDAC4 foi feita com proteína do apicoplasto e do complexo de Golgi. Para isso, foram utilizados vetores que expressam FNR (ferredoxina-NADP⁺ reductase) e GRASP (Proteína de Organização e Compactação do Golgi) etiquetados com DsRed (*Discosoma* sp. *red fluorescent protein*) e RFP (*red fluorescent protein*) respectivamente (HE et al., 2001a; HU et al., 2002; NISHI et al., 2008). Para transfecção, os plasmídeos foram transformados conforme descrito em 3.2.11. As bactérias foram expandidas em meio líquido LB com 100 µg/mL de ampicilina, a 37°C por 12 horas. Após o crescimento das bactérias, os plasmídeos foram purificados pelo método de extração plasmidial pela

lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os plasmídeos foram transfectados conforme item 3.2.10, sem adição de drogas de seleção e foi realizada a imunofluorescência indireta dos parasitas após 24 hs, conforme descrito em 3.3.5.

3.4 NOCAUTE DE *TGHDAC4*

3.4.1 Amplificação das regiões 5' e 3'-UTRs

Para realização do nocaute, cerca de 1000 pb e 2000 pb da região 5' e 3' não traduzidas (UTR-*Untranslated region*) do gene *tghdac4* foram amplificadas por PCR. Foi necessário adicionar aos oligonucleotídeos *forward* da região 5' e *reverse* da região 3' sequências para o anelamento ao gene de seleção (HXGPRT) destacados em negrito na tabela 4. Nesta reação, foi utilizada a enzima *Taq DNA Polimerase* (IBMP), como descrito em 3.2.3, não sendo necessária uma enzima de alta fidelidade. Para reação da PCR foi utilizado 58°C para anelamento dos oligonucleotídeos e 2 minutos para extensão dos fragmentos.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões 5' e 3' não traduzidas de *tghdac4*. Em negrito, sequências necessárias para o anelamento do gene de seleção HXGPRT.

Nome:	Sequência:
5' 1000 Primer F	GTCACGTGGGTCCTGTTTCGTAC
5' 2000 Primer F	CGCTTTGTGCCTCTCGTGTC
5' Primer R	CCGCGGGCGGGTTTGAATGCAAGGTTTCGTGCTGCCGCAACAA TGGGTTTCTG
3' Primer F	GTTCTGGCAGGCTACAGTGACACCGCGGTGGGAGAGGTTTATAT GGCGGTGGAC
3' 1000 Primer R	GCAGCGTAAGCCAATCAGGG.
3' 2000 Primer R	CAGGCGCATTTCGCTGATTAC

Para verificação do tamanho do produto das amplificações, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (conforme item 3.2.4). As amostras que geraram produtos do tamanho esperado foram purificadas utilizando o Kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

3.4.2 PCR de fusão

A PCR de fusão foi realizada de modo a gerar um cassete contendo a região 5', o gene *hxgprt* para seleção (utilizando o vetor pLIC-HA-HXGPRT como molde) e a região 3', respectivamente. Isso é possível devido às regiões complementares que foram inseridas nos oligonucleotídeos (5' R e 3' F- representadas em letras negrito no item acima). Para realizar a PCR de fusão, foram feitas duas PCRs; Na primeira, é adicionado 5×10^{11} número de cópias da PCR purificada da região 3' e 5' e 5×10^{10} número de cópias do vetor (onde está contido o gene de seleção), 1X de buffer específico para *Taq Phusion* (New England Biolabs), 200 μ M de dNTP, 0,3 mM de $MgCl_2$ e 1U da *Taq Phusion*. Nesta primeira etapa não houve adição de oligonucleotídeos. O programa utilizado na primeira PCR foi: 98°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 20 ciclos de 98° C por 10 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 3 minutos, e então 72° C por 8 minutos para extensão. Na segunda PCR, é adicionado 2 μ L do produto da primeira PCR, 1X de tampão, 200 μ M de dNTP, 0,3 mM de $MgCl_2$, 1U da *Taq Phusion*, 10 μ mol dos oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (Tabela 5). Alternativamente, para aumentar a estringência da reação, foi adicionado 1% de formamida ou 1X de Betaína (Sigma). O programa utilizado na segunda PCR foi: 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de 98° C por 10 segundos, 58° C por 30 segundos, 72° C por 2:30 minutos, e então, 72° C por 8 minutos. Para verificação, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%. Foi visto novamente, o aparecimento de bandas extras, além da banda de interesse, portanto, foi feita uma eletroeluição como descrito no item 3.2.5. O cassete obtido (3775 pb) foi transfectado e selecionado utilizando o mesmo protocolo da transfecção dos plasmídeos (descrito no item 3.2.10).

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados para realizar a PCR de fusão.

Nome:	Sequência:
TgHDAC4 Fusion Primer F	GGCCTGTTACTGAGTCTCCCT
TgHDAC4 Fusion Primer R	AGCTGAGGCAAAGATCCAAG

3.4.3 PCR para confirmação do nocaute

Para confirmação do nocaute, foram sintetizados oligonucleotídeos para verificação da presença do gene de seleção HXGPRT, mostrados na tabela 6. Também foram utilizados os oligonucleotídeos anteriormente utilizados para amplificação da porção final de *tghdac4* para o etiquetamento (tabela 1)

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gene de seleção.

Nome:	Sequência:
HXGPRT-R	GAAAAGAGAGGAAAACGAGAGA
HXGPRT-F	CCAAACCCATTGAAGACTAC

Para realizar a PCR, foi extraído o DNA genômico (conforme item 3.2.1) da população selecionada para o nocaute. A enzima utilizada para amplificação foi a *Taq DNA Polimerase* (IBMP), conforme descrito em 3.2.3.

3.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E OBTENÇÃO DO cDNA

Para extração do RNA total, primeiramente foram centrifugados 5×10^8 taquizoítas cepa RH $\Delta hxgp rt \Delta ku80$ a 2.000 rpm por 10 minutos à 4°C. Para extrair o RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrição do fabricante. Os parasitas foram ressuspensos em uma mistura com 350 μ L de tampão RLT (kit), 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.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado 1 μ g do RNA extraído e diluído em 5,6 μ L de água livre de RNase e acrescentado 10 mM de oligo dT, 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 adicionado à reação: 1X do tampão fornecido pelo fabricante para enzima, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de cada dNTP, 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 por 60 minutos (2 vezes) e 70 °C 15 minutos.

3.5.1 Sequenciamento de *tghdac4*

Em virtude da porção final do gene *tghdac4* estar mal anotada no banco de dados de *Toxoplasma*, foi necessário realizar o sequenciamento dessa região. Para obtenção da sequência correta, foram realizadas PCRs a partir do cDNA do parasita (para retirada de íntrons), onde cerca de 100 ng de cDNA foram utilizados. A reação foi feita com *Taq DNA Polimerase* recombinante (IBMP) conforme descrito em 3.2.3. Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados a partir da sequência disponível no banco de dados de *Toxoplasma* e estão detalhados na tabela 7.

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos para sequenciamento da porção final de *tghdac4*.

Nome:	Sequência:
F1 seq Primer F	GCGCATCCTCATTCTGGA
R1 seq Primer R	GTGGTGTCTCGAGGGAGG
R2 seq Primer R	TACTGAAAAAGAATAGCGTGCC

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose conforme 3.2.4 e submetido ao sequenciamento na empresa Macrogen- Korea.

3.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE *TGHDAC4*

Para obtenção de maiores informações sobre a TgHDAC4 completa, foi utilizada a sequência da proteína disponibilizada no banco de dados de *Toxoplasma* (ID: TGME49_257790-toxodb.org). Utilizamos os dados de sequenciamento da cepa ME49 (tipo II), por esta apresentar melhores dados de anotação até o momento. Primeiramente, foi utilizado o algoritmo de busca *Protein Blast* (blastp-NCBI), para localizar regiões de similaridade entre sequências e identificar possíveis domínios conservados (CDD-*Conserved Domain Database*). Foi realizado um alinhamento com o programa Clustal Omega, utilizando os dados obtidos com a busca no *Protein Blast*. No ToxoDB consta que essa proteína possui um peptídeo sinal e um sinal de clivagem, e utilizamos o programa SignalP 4.1 Server, que identifica regiões hidrofóbicas para confirmação dessas informações ou ainda identificar possíveis regiões transmembranares. Finalmente, foi utilizado o programa ValidNESs, que localiza sequências ricas em leucinas para identificação de possíveis sinais de

exportação nuclear. O banco de dados de *Toxoplasma* também foi utilizado para obtenção de dados da proteína em estudo, como localização cromossômica, peso molecular, sequência de aminoácidos e nucleotídeos, e resultados de experimentos em larga escala realizados por outros grupos, principalmente o sequenciamento em larga escala de RNA.

3.7 SISTEMA CRISPR/CAS9

Os vetores para utilização do sistema CRISPR/CAS9 foram construídos e cedidos gentilmente pelo Dr. Mohamed Ali Hakimi (University Grenoble Alpes-França). Neste sistema, é utilizado o vetor pTOXO_Cas9_CRISPR em PUC57_simp (Figura 10) (CURT-VARESANO et al., 2016), onde está contido o gene para codificação da endonuclease bacteriana CAS9, juntamente com uma etiqueta de HA e GFP (*green fluorescent protein*), além do RNA guia (5'-GCTGTTGCTGAAGCCCAGGCTGG-3') específico para *tghdac4*, sob controle do promotor TgU6.

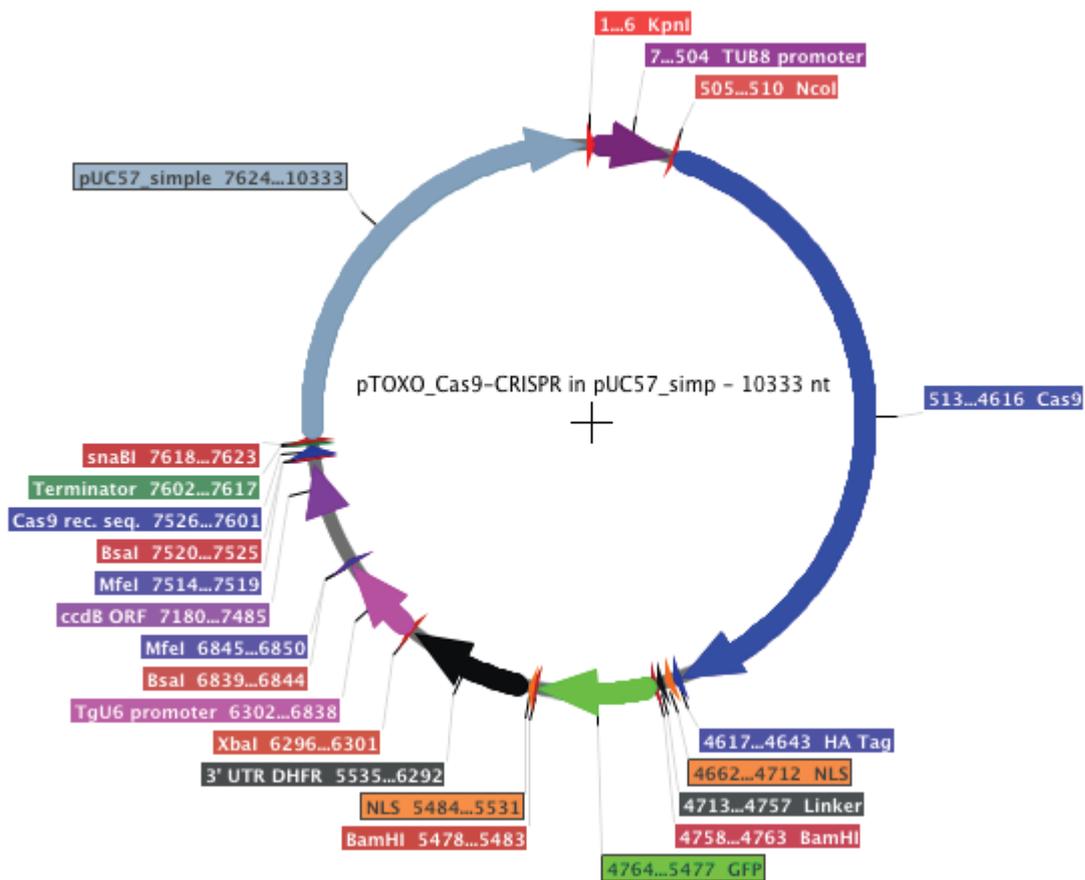


Figura 10: Mapa do vetor pTOXO_Cas9_CRISPR em PUC57_simp. Em azul, a enzima Cas9, possuindo um sinal de localização nuclear e uma etiqueta de HA e GFP. Neste vetor, o RNA guia (não demonstrado) está sob controle do promotor TgU6 (Fonte: CURT-VARESANO et al., 2016).

Para realizar a transfecção, os plasmídeos foram primeiramente transformados conforme descrito em 3.2.11. As bactérias foram expandidas em meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina, à 37°C por 12 horas. Após o crescimento das bactérias, os plasmídeos foram purificados pelo kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) conforme informações do fabricante. A transfecção foi realizada conforme descrito em 3.2.10, sem a adição de drogas de seleção.

Para confirmação da transfecção, foi realizada visualização em microscópio invertido Nikon eclipse TE300, para verificar a eficiência da transfecção pela presença de Cas9-GFP no núcleo dos parasitas. Para verificar a morfologia dos parasitas, realizamos ensaios de imunofluorescência conforme item 3.3.5. Para visualizar melhor a GFP que é considerada instável, utilizamos o anticorpo anti-GFP de camundongo na diluição de 1:100 (Invitrogen). O anticorpo secundário utilizado foi anti-camundongo conjugado com Alexa-Fluor 488 (Sigma), na diluição 1:600 e 10 µM de DAPI. As imagens foram obtidas no microscópio Nikon eclipse 80i.

Os parasitas foram clonados por *cell sorting* (BD FACSAria II). Foi extraído o DNA genômico dos parasitas conforme 3.2.2 e amplificada uma região onde está contido o RNA guia, utilizando os oligonucleotídeos da tabela 8. Foi utilizada a enzima *Taq DNA Polimerase* recombinante (IBMP) conforme descrito em 3.2.3. O produto da PCR foi submetido ao sequenciamento, na empresa Macrogen- Korea, para verificação de possíveis mutações geradas pela Cas9.

Tabela 8: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar fragmento na região do RNA guia utilizado.

Nome:	Sequência:
Cas9-F	ATGGGCCACCCTCCTC
Cas9-R	CTTGCTTCGTCGGGG

4. RESULTADOS

4.1 NOCAUTE DE *TgHDAC4*;

Para a caracterização de *TgHDAC4*, optamos por realizar o nocaute gênico, uma abordagem muito utilizada para estudos genéticos sobre a função do gene. Como o *Toxoplasma* é um organismo haplóide e o gene *tghdac4*, como a maioria dos genes de *T. gondii*, é cópia única, torna o nocaute gênico uma abordagem mais frequentemente viável se comparado a outros parasitas cujos genes estão presentes em múltiplas cópias na sua maioria. Por isso, tentamos investir na obtenção de parasitas nocaute para o gene *tghdac4*.

Para tanto, investimos na abordagem clássica de substituição do gene por um marcador de seleção, utilizando para isso as regiões intergênicas do gene de interesse fusionadas ao gene *hxgprt*. Ao que se refere à estrutura do gene *tghdac4* (ID: TGME49_257790-toxodb.org), a anotação no banco de dados de *Toxoplasma* indica que o gene possui uma única cópia localizada no cromossomo VII, com 4 éxons, transcrito de 2796 pb que codifica para uma proteína de 931 aminoácidos e massa molecular de 98 kDa. Para construção do cassete para o nocaute de *tghdac4*, foram amplificados fragmentos de cerca de 1000 pb e 2000 pb presentes nas regiões 5' (869 pb e 1965pb) e 3' (987 pb e 1988pb) não traduzidas, tamanhos estes recomendados para o sucesso do método nesse parasita. Os produtos de amplificação de tamanho esperado foram obtidos, exceto para porção 3' de 2000pb, como mostra a Figura 11.

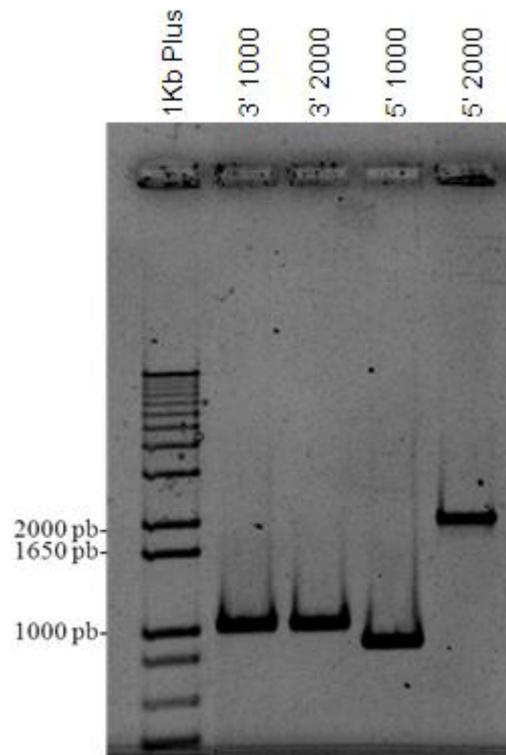


Figura 11: Amplificação de fragmentos das regiões 5' e 3'-UTRs do gene *tghdac4*. Para construção do cassete, as regiões 5' e 3' foram amplificadas, no tamanho de 1000 ou de 2000 pb, usando como molde o DNA genômico de *T. gondii*. Os produtos da porção 5', de 1000 e 2000 pb, mostraram o tamanho esperado, sem aparentes bandas inespecíficas, assim como 3' de 1000 pb. Foi utilizado como molde para PCR o DNA genômico de *T. gondii*, cepa RH *hxgpirt-ku80-*. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

Posteriormente, as porções de 1000 pb, tanto da região 3' quanto da região 5'-UTR, foram purificadas e submetidas à reação de PCR de fusão juntamente com o gene *hxgpirt*, amplificado a partir do vetor pLIC-HXGPRT-HA. Diversos protocolos e enzimas DNA polimerases foram testados, mas sempre ocorria ampliações inespecíficas. Finalmente, o melhor protocolo foi a técnica de duas reações sequenciais de PCR, onde na primeira, sem os oligonucleotídeos, ocorre o anelamento da região complementar à *hxgpirt*, presente nas regiões 5' e 3'. Em uma segunda reação de PCR, são adicionados os oligonucleotídeos externos 5'-*forward* e 3'-*reverse*, resultando na amplificação de todo o cassete (cerca de 3800 pb). O resultado pode ser visualizado na Figura 12A e embora a amplificação foi bem sucedida, com a presença de uma banda de maior intensidade com tamanho esperado de 3775 pb, ainda apresentou ampliações inespecíficas. Por conta disso, a banda de interesse foi purificada por eletroeluição. Optamos pela eletroeluição, pois entre os protocolos testados para a purificação da banda (Promega, GE Helthcare, QIAGEN), este foi o que resultou em maior rendimento de

DNA. A purificação resultou na obtenção de uma única banda, conforme mostra a Figura 12B.

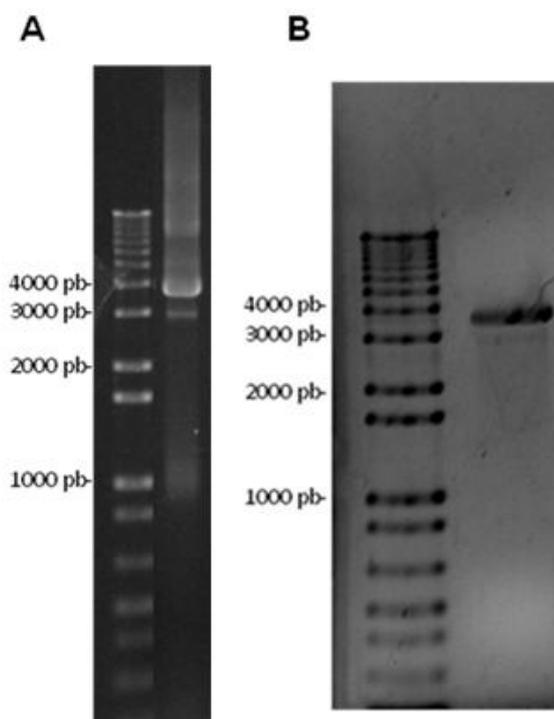


Figura 12: PCR de fusão em duas etapas. (A) Para amplificação do cassete necessário para nocaute de *tghdac4*, as regiões 5' e 3' foram fusionadas ao gene *hxgprt* através de PCR de fusão utilizando a enzima *Phusion*. Nota-se a presença de mais bandas, além da banda de interesse (3775pb). (B) Resultado da banda eletroeluída, com o tamanho de 3775 pb. Marcador 1Kb plus (Invitrogen).

Cerca de 5 µg do cassete, quantidade mínima recomendada, foi transfectado em formas taquizoítas de *Toxoplasma*. Após a seleção dos parasitas, foi realizada uma PCR (Fig. 13A, PCR1) para confirmação da deleção do gene *tghdac4* com os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento de 1063 pb no protocolo de etiquetamento. A presença do gene de seleção *hxgprt* também foi confirmada por PCR (Fig. 13A, PCR2). Apesar de ter sido obtida uma população sob pressão seletiva com ácido micofenólico e xantina, os resultados das PCRs mostram que estes parasitas não continham a deleção do gene *tghdac4*, visto que o mesmo ainda era amplificado (Fig. 13B). Foram feitas quatro tentativas para obtenção de parasitas nocaute porém, sem sucesso, sugerindo que a recombinação homóloga poderia estar ocorrendo em outra região, uma vez que aparentemente os parasitas possuíam o marcador de seleção (gene *hxgprt*) (Fig. 13C), no entanto, ainda possuíam a cópia do gene *tghdac4*. Por isso, não foi possível concluir os estudos genéticos através da análise de fenótipo após nocaute do gene.

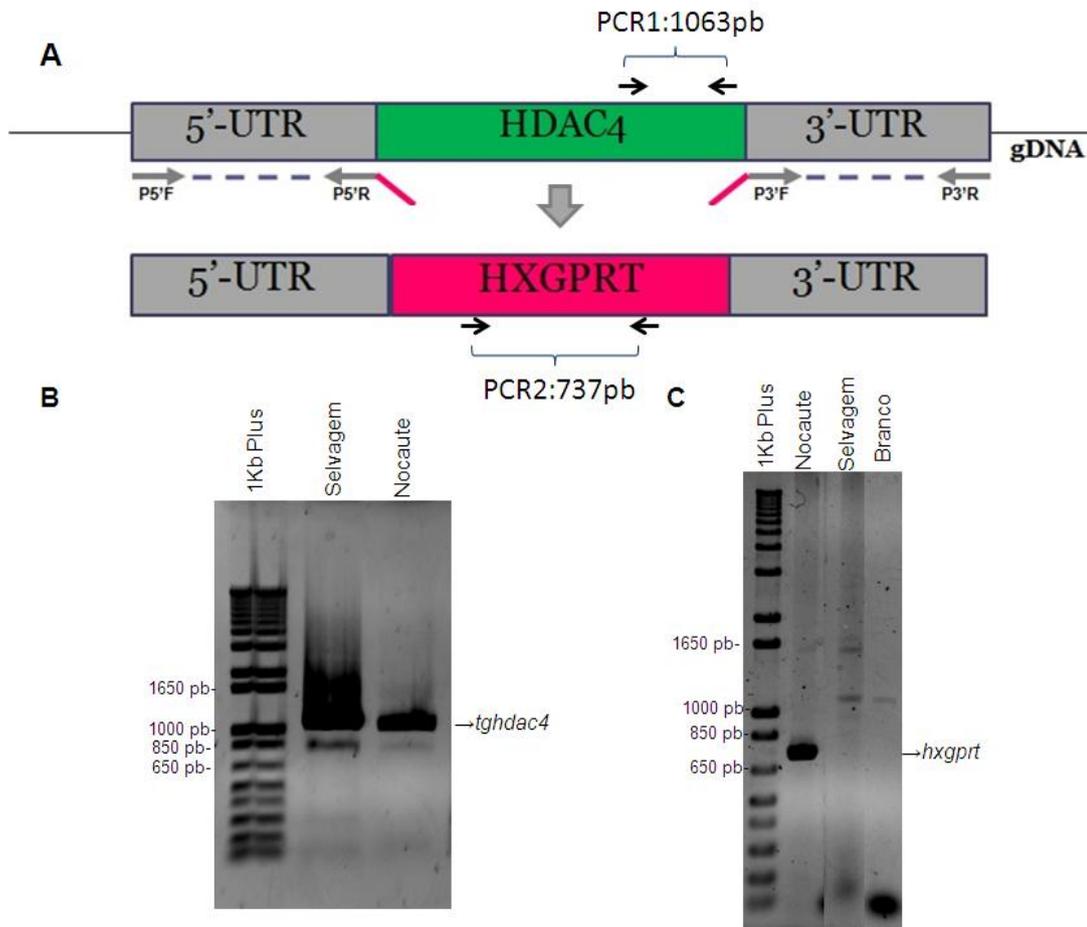


Figura 13: PCR para confirmação do nocaute de *tghdac4*. (A) Esquema do método de PCR de fusão. Na parte superior, o gene *tghdac4* no genoma. As porções UTRs foram amplificadas, sendo que os oligonucleotídeos 5' R e 3' F possuem uma pequena sequência que anela ao gene *hxgpert*. Uma segunda PCR com oligonucleotídeos externos, une os três fragmentos. Os oligonucleotídeos utilizados para confirmação do nocaute estão representados na figura. (B) Resultado da amplificação de *tghdac4* (1063pb) na população nocaute e selvagem, mostrando que o gene ainda estava presente. (C) Amplificação do gene de seleção *hxgpert* (737pb) na população transfetada com a PCR de fusão. Para amplificação foi utilizado como molde o DNA genômico da população transfetada com a PCR de fusão e DNA genômico de *T. gondii*, cepa RH *hxgpert-ku80*. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

4.2 TGHDAC4 É UMA PROTEÍNA LOCALIZADA NO APICOPLASTO

4.2.1 Construção do plasmídeo para o etiquetamento de *tghdac4*

Para as análises de localização celular optamos por gerar linhagens expressando a proteína fusionada a uma etiqueta 3X HA na região C-terminal. A estratégia utiliza um vetor que insere a etiqueta no gene endógeno. Para isso, foi necessária a amplificação de cerca de 1000 pb da porção final do gene *tghdac4* por PCR. Para tanto, utilizamos a enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen), uma enzima de alta fidelidade evitando que eventuais mutações alterassem a sequência da proteína e assim afetassem sua expressão. Como molde, utilizamos o DNA genômico da cepa RH *hxgpert-ku80*. A amplificação resultou em um fragmento

do tamanho esperado de 1063 pb, além de fragmentos de tamanhos diferentes que devem ter sido resultado de amplificações inespecíficas (Fig. 14A). Devido a isso, foi necessário fazer a excisão da banda do gel seguida de eletroeluição para purificar a banda de interesse (Fig. 14B).

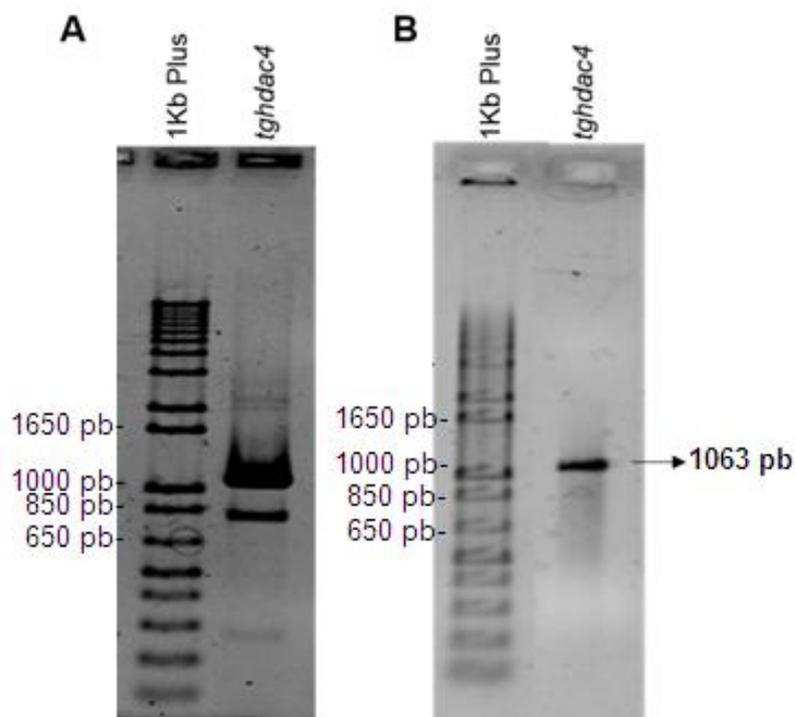


Figura 14: Amplificação e purificação do fragmento do gene *tghdac4*. (A) Resultado da amplificação do fragmento de *tghdac4* resolvida em gel de agarose 1%, mostrando a banda do tamanho esperado (1063pb) e uma banda inespecífica (aproximadamente 800 pb), além de outras menos abundantes. Para amplificação foi utilizado como molde o DNA genômico de *T. gondii*, cepa RH *hxgprt-ku80*. (B) Resultado da purificação da banda de 1063 pb que foi retirada do gel e eletroeluída. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

Uma vez obtida a quantidade necessária (1 pmol), tanto o inserto, quanto o vetor foram tratados com a enzima *T4 DNA polimerase* (esquema representado na figura 8 da seção de Material e Métodos).

Após o tratamento, foi feito o anelamento entre o fragmento de *tghdac4* e o vetor seguido de transformação em bactéria *E.coli* DH5 α cálcio-competente. A ligação efetiva entre vetor e inserto ocorre na própria bactéria pelo sistema de reparo da mesma.

Para uma primeira verificação da presença de clones positivos, foi feita uma PCR de colônia. Dez clones foram testados e dois deles (clones 2 e 5) foram selecionados para cultivo em meio LB. Estas culturas foram utilizadas para

purificação dos plasmídeos pela técnica de lise alcalina que foram então analisados por um mapa de restrição enzimática. O resultado obtido foi comparado com um mapa de restrição feito de forma virtual utilizando o programa Serial Cloner. Esta comparação pode ser vista na Figura 15A, e o resultado confirma que os dois clones selecionados possuem o inserto com tamanho e orientação correta (Fig. 15B). Ambos os clones foram sequenciados, confirmando a sequência de *tghdac4*.

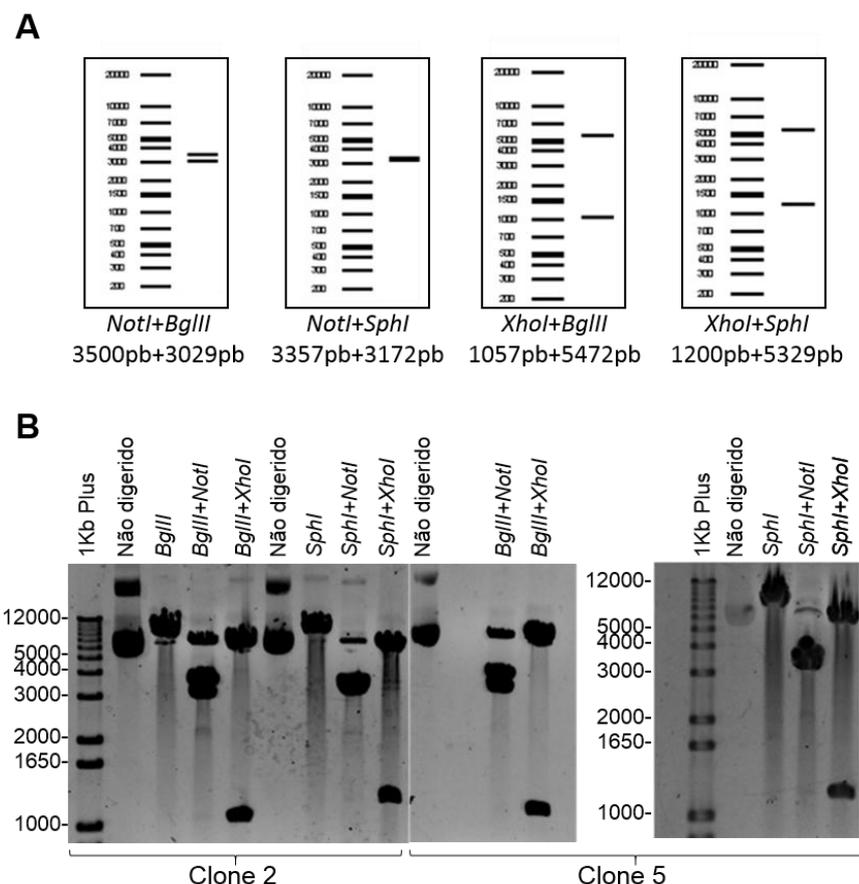


Figura 15: Confirmação dos clones 2 e 5 por digestão com enzimas de restrição. (A) Digestão virtual dos clones com as enzimas presentes no inserto (*BglII* ou *SphI*) ou no vetor (*NotI* e *XhoI*). O programa utilizado foi o Serial Cloner. (B) Resultado das reações de digestão sozinhas (linearização- *BglII* ou *SphI*) ou combinadas (*NotI* + *BglII* ou *XhoI* + *BglII* ou *NotI* + *SphI* ou *XhoI* + *SphI*). *BglII* e *SphI* foram utilizadas para linearizar, gerando fragmento único de cerca de 6529 pb. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

Para realizar a transfecção, os plasmídeos foram linearizados com a enzima *SphI*. A seleção foi feita utilizando ácido micofenólico e xantina. A seleção levou cerca de duas semanas e as populações transfectadas para ambos os clones foram selecionadas.

4.2.2 Obtenção de linhagens expressando TgHDAC4 fusionada a 3X HA

Após a seleção dos transfectantes, a população dos parasitas foi utilizada para extração de DNA genômico que foi utilizado como molde em reações de PCR para confirmar a presença da etiqueta de 3X HA logo após o gene *tghdac4* (Figura 16A). Inicialmente, a reação foi realizada utilizando oligonucleotídeos que amplificam apenas a região da etiqueta de HA, que consiste em três sequências em tandem (3X HA-591pb) (Fig 16B). Também foi utilizado o oligonucleotídeo reverso que havia sido utilizado anteriormente para a amplificação do fragmento de 1063 pb de *tghdac4*, em conjunto com um oligonucleotídeo *reverse* que anela no interior da etiqueta de HA (HA-INT-R), resultando em um fragmento de 1141pb (Figura 16C). Embora os parasitas tenham sido selecionados e a inserção da etiqueta confirmada por PCR, os resultados de western blot e imunofluorescência indireta não detectaram a presença da proteína TgHDAC4 com a etiqueta.

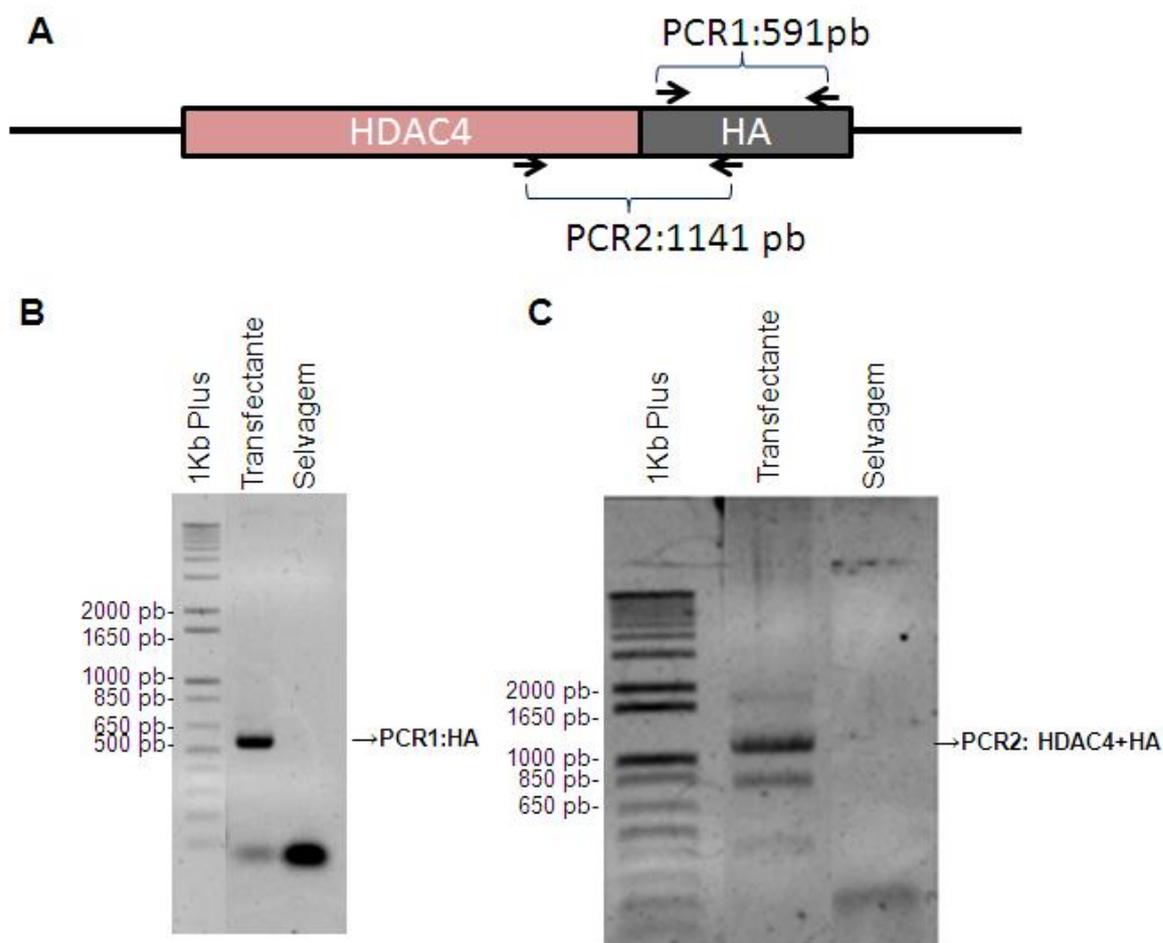


Figura 16: Confirmação da inserção da etiqueta de HA. (A) Esquema dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação da presença da etiqueta de 3X HA. (B) Resultado da amplificação da etiqueta de HA, mostrando a banda do tamanho esperado (591pb). Para amplificação foi utilizado como molde o DNA genômico da população transfectada. (C) Resultado da amplificação de *tghdac4*

com a etiqueta de HA (1141pb), confirmando a presença da etiqueta após o gene de interesse. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

Na tentativa de entender porque sucessivas tentativas de etiquetamento e nocaute para o gene *tghdac4* foram malsucedidas, resolvemos investigar mais dados sobre a estrutura do gene. Neste caso, foram utilizados dados de RNA-seq depositados no banco de dados de *Toxoplasma* (toxodb.org) e os dados referentes a anotação de outras cepas. Para nossa surpresa, o tamanho referente ao mRNA de *tghdac4* era muito maior do que o tamanho da sequência codificante que está anotada no banco de dados, como mostra a figura 17A. Além disso, observamos nos dados correspondentes apenas à cepa VEG, que existe uma sequência anotada como proteína hipotética logo após o gene *tghdac4* (Fig 17B).

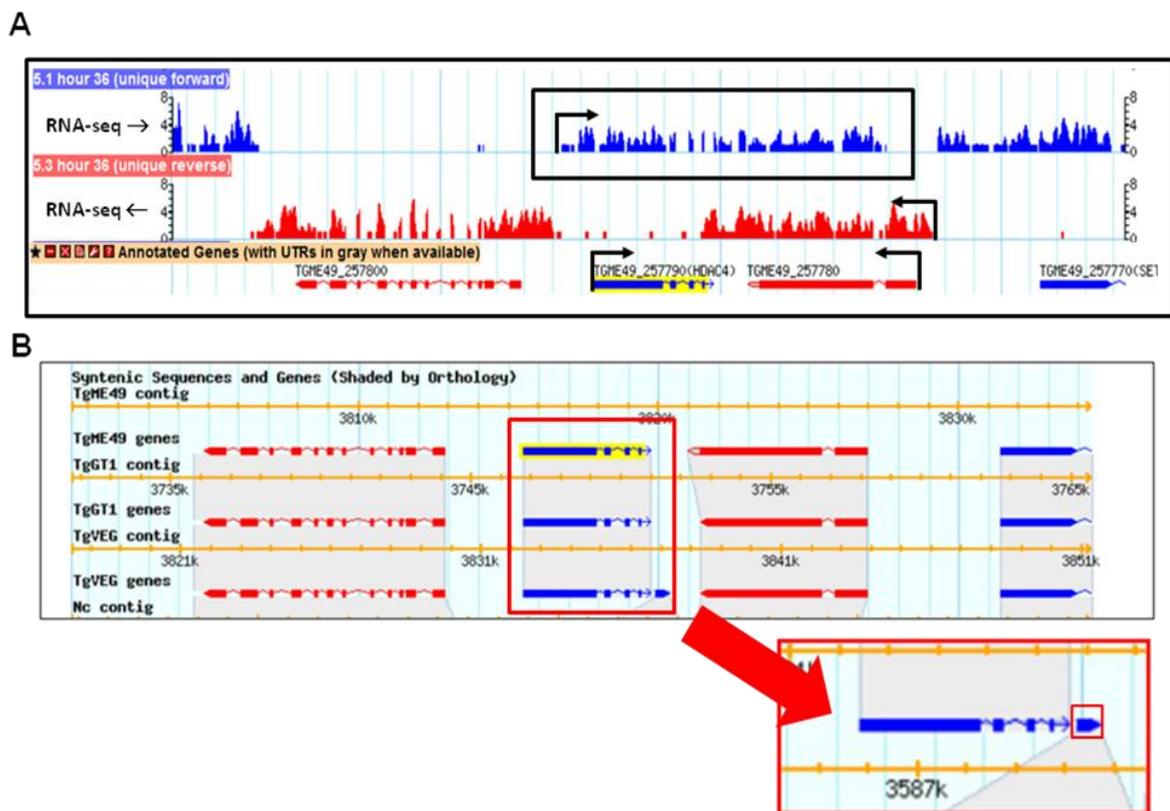
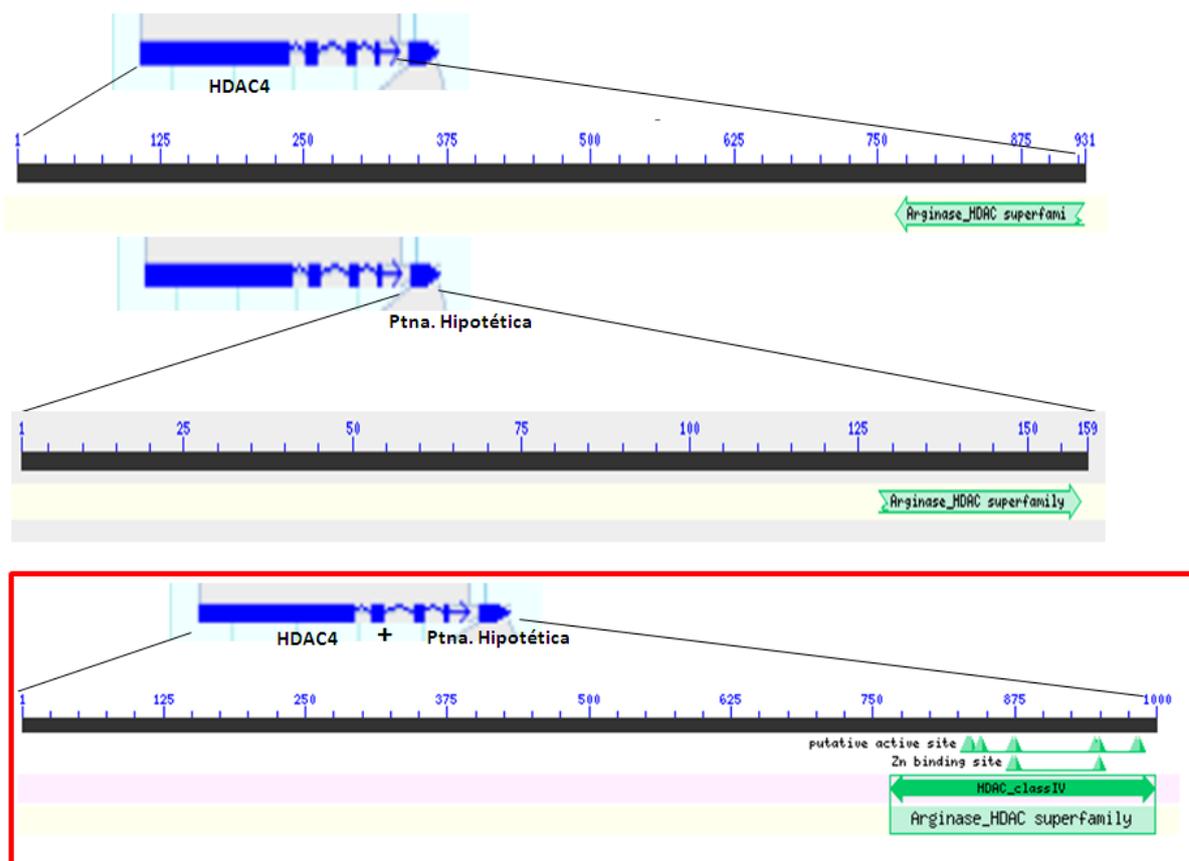


Figura 17: Dados depositados no banco de dados (toxodb.org) para o gene *tghdac4*. (A) Gráfico referente ao RNA-seq, onde em azul está representado o mRNA referente à genes na fita positiva e em vermelho, à fita negativa. Nota-se em azul (destacado com o retângulo preto), o tamanho do RNA referente ao gene da HDAC4, possuindo tamanho maior do que o esperado. (B) Dados de sintenia para o gene *tghdac4* no banco de dados, onde é destacado o gene em três diferentes cepas (ME49, GT1 e VEG) e a presença de uma proteína hipotética a jusante de *tghdac4* anotado apenas na cepa VEG (quadrado vermelho).

Investigando do que se tratava esta proteína hipotética através de busca em banco de dados de domínios (*Conserved Domains Database CDD-NCBI*), foi revelado que a proteína hipotética codificada pelo gene posicionado a jusante a *tghdac4* possui parte de um domínio HDAC típico (Fig 18). Deduzimos que poderia haver um erro de anotação, visto que o domínio HDAC de *tghdac4* estava incompleto, assim como o domínio presente na proteína hipotética. Por isso, juntamos as duas sequências e realizamos novamente uma análise no banco de dados que revelou a presença de um domínio HDAC completo, confirmando nossa ideia de que existe um problema na anotação no gene que codifica TgHDAC4 no banco de dados de *Toxoplasma*.



Fonte: Conserved Domains (NCBI)

Figura 18: Análises de domínios conservados em TgHDAC4 e proteína hipotética. Através de uma busca em banco de dados de domínios conservados (CDD), da proteína TgHDAC4 e da proteína hipotética separadamente (dois primeiros painéis), é possível visualizar que ambas apresentam parte do domínio HDAC, e que juntas, apresentam um domínio HDAC completo (último painel).

Como o tamanho do mRNA era considerado maior que o esperado, entramos em contato com o grupo do Dr. Arnab Pain (King Abdullah University of Science and Technology- Arábia Saudita) que trabalha com RNAs antisense em *T. gondii*. Um membro do grupo do Dr. Pain reanalisou os dados do RNA-seq e nos auxiliou na

remontagem do gene de *tghdac4*, que conforme suas análises possuía dois éxons a mais do que estaria anotado no banco de dados de *Toxoplasma*, como mostra a figura 19.

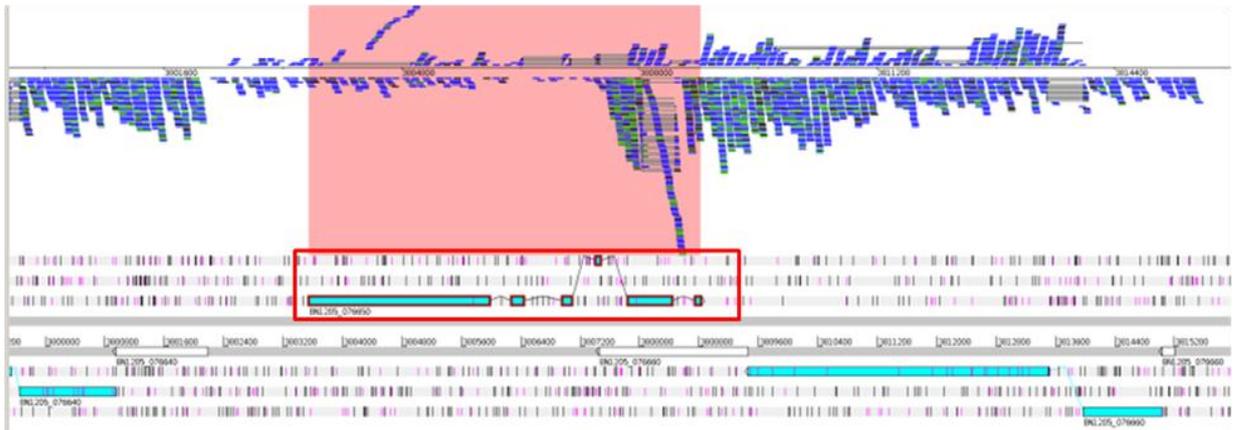


Figura 19: Dados do RNaseq. Figura fornecida pelo grupo do Dr. Pain, onde é possível verificar que o gene *tghdac4* completo possui 6 éxons.

Para elucidar esta questão, desenhamos novos oligonucleotídeos, baseados nos dados cedidos pelo Dr. Pain e na anotação presente no ToxoDB (Fig 20A). Os fragmentos que corresponderiam a porção final do gene *tghdac4* foram amplificados com sucesso utilizando como molde o cDNA, como mostra a figura 20B. Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento.

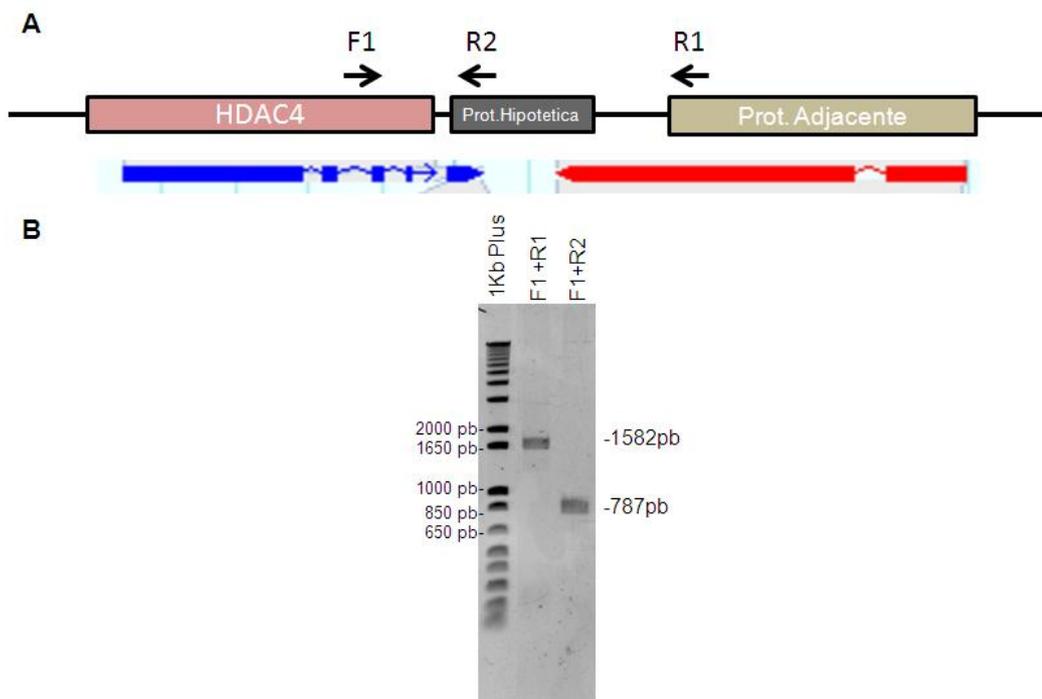


Figura 20: PCR para sequenciamento de *tghdac4*. (A) Esquema dos oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento de *tghdac4*. (B) Resultado da amplificação dos fragmentos utilizados para realizar o sequenciamento da porção final do gene *tghdac4*. Para amplificação foi utilizado como molde o cDNA de *T. gondii*, cepa RH *hxgprt-ku80*. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

A análise do sequenciamento revelou que o códon de terminação da sequência de *tghdac4* do ToxoDB foi realmente erroneamente anotado. A partir dos dados do sequenciamento, foi possível identificar a fase de leitura completa e correta, determinando o códon de terminação real, como mostra a figura 21, confirmando que a sequência do gene é maior do que o foi predito no banco de dados de *Toxoplasma*. Este resultado também condiz com os dados do RNA-seq obtidos pelo grupo do Dr.Pain. Sendo assim, concluímos que *tghdac4* possui 6 éxons e uma sequência codificadora de 3459 pb, que resulta em uma proteína de 1153 aminoácidos e massa molecular de 124 kDa.

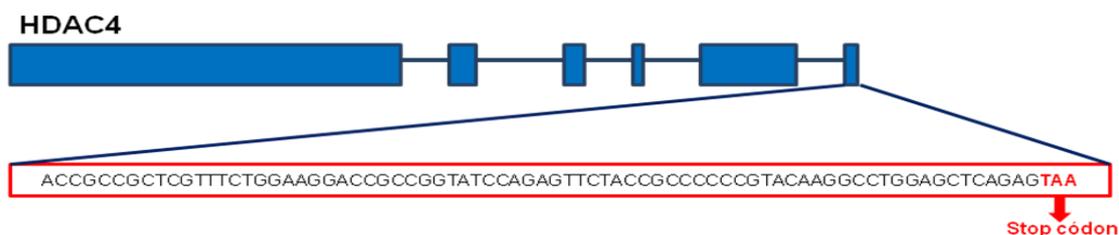
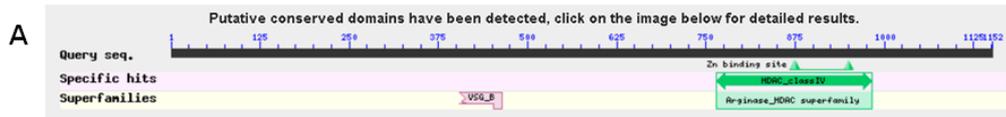


Figura 21: Sequência obtida após o sequenciamento da porção final do gene *tghdac4*. Com a análise dos dados obtidos pelo sequenciamento de fragmentos da porção final de *tghdac4*, foi possível encontrar o códon de terminação em fase, completando assim o gene da HDAC4.

Para obtenção de maiores informações sobre a conservação e estrutura da proteína TgHDAC4 completa, foram feitas análises utilizando o algoritmo Protein Blast (blastp-NCBI), juntamente com o banco de dados de domínios conservados-CDD (*Conserved Domain Database*). Os resultados indicaram a presença de um domínio de desacetilase de histona (HDAC) de classe IV dos aminoácidos 765-982 (Fig. 22A). Adicionalmente, foi observada uma parte de um domínio VSG (*variant surface glycoprotein*) presente em tripanossomatídeos, correspondente aos aminoácidos 404-464, porém trata-se apenas de uma pequena região.

As análises de conservação foram realizadas a partir do alinhamento, onde foi demonstrado que a sequência completa da proteína apresenta similaridade apenas com proteínas de membros do filo Apicomplexa (*Hammondia hammondi* e, em menor extensão, *Neospora caninum*) ressaltando que TgHDAC4 é uma proteína conservada exclusivamente em parasitas deste filo (Fig. 22B). A única região da proteína com sequência conservada em proteínas de outras espécies, principalmente bactérias, é a do domínio HDAC.



B

Toxoplasma	MGHPPPWTASPLFFLLLF-WHAPPSLVSSCLHAGHALHVHPAHNPSLPLSLPSDRPG--
Hammondia	MGHPPAWTASPLFFLLLF-WPGPPSRVFSFLHAGHALHVHPSHKPSLPLSLSSDRSG--
Neospora	-MAARWAAASPLILLLLFSPVTSRDAFAAPVAHELYHSPSSRLSLSPRGRHRSWPGPP
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	----AAGDGQTGASLVHNARAALPLCASRVFAGGALQPSTAVPPRTQPLHRCARRYA-P
Hammondia	----AAGGAQTGVSLEPTAIAALPPCASDVFAGGALQPTTAVPPRTPLHRRARRHA-P
Neospora	DRCGRCASDGGLVLSLEPTARPSLPLPPLPGIRVGDSPATAAVSPRTGGLRRPVDRRRPP
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	SGRLLLKPRLLGLKALPIHEVAEGRAEQEDRARPPDPSVSGRTLTCVTLRTKETCNDADCG
Hammondia	SVALLLKPRLLGLKATPHEVAEECAEREYDARPPDPSISGRSTLVTLRTRETGTGANRG
Neospora	PAALPRAPRAGRSSQATHA-RGACAARRKEALPAFPCLPGSGSESANRHQQ--THGVK--
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	GLACRTGNATIAGRGARASDGRQPPTKQEGVFPVATSFRRF---SSRSLRSSTPLSRYFLS
Hammondia	ALPRRTGNATVAGRARANDGTQPMKQEGVFPVATSFRRF---SSSLRSSPLSRSLLS
Neospora	-----EGGRLSR-----ERRDVSSRPTHFSPLIRDSRPLLLSPSVSRW--V
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	SSPENKFEFHFLSYTVT-AELPTSAFTFVDA-PQSLTSCADVMSHPCRAFVFFPLQRS
Hammondia	SSPENKFEFRHLFSYTVT-AELPASAFTFVDV-PQSPASCADVMSRPRRA-SFSSLQRS
Neospora	SSPERKKLPRHFVAFSTRAYPPVPAFTLLSATARFLCSAYVWAPRRHASAASPRRRR
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	RTSVGFSPSSHSIRPSRR-WF-----SSVNLALRASFGSIASSCSSPVGPDHSSLT
Hammondia	RSSVGVSASSHLIHPSFR-WF-----SSVRLCALRVSSGSIASSCSSPIGPDHSSLT
Neospora	GHPGCLACSCVTCVSTRRRSLSDASSRSPSPALFGSPFPVSVTSACPSSLGREGAMR
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	VPRTHSPRPPRSVGSAAASPSSGGPRVQSEGTPSGP--VDSPLSPTSRGSCSYSTPSVSC
Hammondia	VPCTHPLRPPQSAGSAAASPSSGVARVSHDGTTPSGP--AESPLSPTSCGSRSYSTPSVSC
Neospora	IPCTHAAP-SQSASSAPSPSSVSPGSPHSPADPPAAAPPVPPSRSRSNFRFCSDSC
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	PGGLLLSLPSVSPVSLSTSLRHFLVSYTSPFPARSLPLIFVDAGLSLASEASLQGARPVG
Hammondia	PGGLLLGLPSVSPVSLSTSLRHFLVSHYSPFPARSLPLIFVDAGLSLASEASLQGARPVG
Neospora	REGLLALPSVSPSTLPELKHFLISYTSAFPASRLPLLYVDAVQ-AASPASAHTEATAE
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	LSQEHRET CASALGSLIDTAVASNAVAQTSCECRPRGLPIVYSPRLVPPSPFRNHCLQPQ
Hammondia	LSQEHRET CASALGSLIDTAVAGNTVWQTSCECRPRGLPIVYTPRLVPPSPFRNHCLQPQ
Neospora	LSAEQRQTCAAAVGPLVGTADGRISAAYTHCDDRPSGLPIVYTPCVPPSPFRNHCLQPQ
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	KLGRFLSFLTHPSGASNLRTPESGVTKTWEAREAE-----IAKATS-----GV
Hammondia	KLGRFLFAFLAHPSGASNLRTPESGSTKIWEASEAE-----IAKATS-----GA
Neospora	KLGRFLFAHLAHQSERRDARALDEGRREQRSEAPEAVETADAKQIARRDPRDLAGRASRKG
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----

Toxoplasma	EGSHEFRWDYVTVHSDLRPKRLNSD--HPVTKAGIGVGENRGREKNGEDGRPSEAGCEKS
Hammondia	EGGHEFRCDNVTVHSDLRPKRLNSD--HPIAKAGIAGVKNNSGRER--EDGRPSEAGCEKP
Neospora	EPEGDLRHS CADARGLLRGTRTLDSDPRDPTTPTGA-----GTEKSGRATESADKSCDTG
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	TS----PSHALSPSASVPHGPVDATRQNGCGRDDPPRCTHPAGVQVTAGNELNRNPLLA
Hammondia	TS----PFYALSPSASVPHGSVDATGQNGCERDDSPRHTDP-GVQVTAGNELERNELLA
Neospora	PRREGHVPASSALSVSPRHCPGHPAAENRCGRDGRRTSTAPQTRRLTDAHEPAQTNNVQA
Gloeobacter	-----MDLPLVYSPRYEALP
Pseudomonas	-----MPLPLVYHEDYSPFPF
:	
Toxoplasma	GSHDQHMDSTRAT---L-GTSVSSCFSLFSPIHADAVTRAWLQVHAPYVCAASAVALS
Hammondia	ASHGQYNDGTRAS---L-GTSVASCFSLFSPIHADAVTRAWLRVHAPDYVRAASSAALS
Neospora	ASQARRVAPARRA---L-GTSVASRFSLSFPIQDADVTCAWLRVHTADYVRAASAAALS
Gloeobacter	VGHRFPNGKFGHLYRYLLTSGIARPEQFWL--PERAGWEWLTLVHAPSYVADFCAGRLS
Pseudomonas	AGHRFPMEKFRLLRDHLVDSGLTTDAELQR---PELCPAEILALVHCPDYIARYMAGELS
	.: : * :.: : .: * * * .*: :. **
Toxoplasma	EEEEKIGFPVTKGYADKSLAEVSSTVLGTWLAHFHGLACVWGGGTHHAKTDSGGKFCVF
Hammondia	EAEERKIGLPVTKGYAQKSLAEVSSTVLGTWLAHFHGLACVWGGGTHHAKTDSGGKFCVF
Neospora	EAEERKIGLPVTKGYASKSLAEVSSTVLGTWLAHFHGLACVWGGGTHHAKAHGGKFCVF
Gloeobacter	EREFRRIGLPWSPAIVERTCTAVGGTVLSARLAISHGLACNIAGGTHHAFADFGSGFCIF
Pseudomonas	YEDQRRLLGLPWSDALARRTVRAVGGSLTAEALHHGLACHLAGGTHHAYDFPSPGFCIF
	: * : * * : . . : : * . : * : ** . * * * : . * * * * : . * * * :
Toxoplasma	NDVAVAAALALKQGIARILILDLDVHQGDGTAEIFSNPRVKTVSIHCDNFPFPKAQS
Hammondia	NDVAVAAALALKQGIARILILDLDVHQGDGTAEIFSNPRVKTVSIHCDNFPFPKAQS
Neospora	NDVAVAAALALKQGIADRILILDLDVHQGDGTAEIFANPRVKTVSIHCDNFPFPKAQS
Gloeobacter	NDLAVAARVLLAEGRVSRLIVDLDVHQGDGTARIFAQEPAVFTFSMHCEQNFPAKQQS
Pseudomonas	NDLAVIARYLLEAGRVHRVLIIFDCDVHQGDGTARLLEDEPDVAVSLHCEQNFPAKQQS
	** : * * * * * * . * : * * * * * * * * * * : : * * . * : * * * : * * * * *
Toxoplasma	DVDIGLPAGTGDEVYLRQLNEVLPRLVLEHRPTLILYVAGVDIHEQDTFGNFQITDAGLR
Hammondia	DVDIGLPAGTGDEAYLRQLNEVG-----
Neospora	DVDVALPAGTGDEVYLHHINEVLPRLREHCPSLVFYVAGVDIHERDTLGNFQITDAGIK
Gloeobacter	DLDVSLPIGTGDAVYLRTLREYLPDLLDRVRPDLVLYDAGVDPHRRDRLGKLDLSDGLY
Pseudomonas	DWDIPLPRGMGDENYLKVVDDILNYLLPIYQPDVLYDAGVDVHKDDALGYLQLTDAGLA
	* * : * * * * * * * * : : :
Toxoplasma	MREELVFSHCLRYNQAILRHRHQIEARLRSPDAEEKQAKHPREPRTAEGQTSNSSGQSTS
Hammondia	-----
Neospora	KREELVFSHCLRYNQELMRRATQSEERPRTPDAAAERGASPCPEPGTTPRPSGALGVTI-
Gloeobacter	ERDLEVIGSCLRRRV-----
Pseudomonas	ARDEAVLQHCLGRDI-----
Toxoplasma	SPEDLFSRSPGRSQTWEDLGEREVPVEQRVGVSQHEVQGNAGSLPDRKESRDARAVHAET
Hammondia	-----
Neospora	QGRDGPAGTHGRRTTWTQHPDREASLEQEVGTLTHGVKA--DSLPHNRPGDATPGRAET
Gloeobacter	-----
Pseudomonas	-----
Toxoplasma	LKTVTHADTCHPVAICSVVAGGYSDDIAHTVRRHAILFQTAARFWKDRRYPEFYRPPYKA
Hammondia	-----
Neospora	SKTPAHAVARRPVAICSVVAGGYSDDIQTTVESHAILFETAAYFWTERRFPDFYTPPYRA
Gloeobacter	-----AVAGVIGGGYDDDLQALVQRHSLHRAASALYRTL-----
Pseudomonas	-----PVLGVIGGGYSKDHAALARRHGILHHSAAARVWAARGLG-----
Toxoplasma	WSSE-
Hammondia	----
Neospora	HCWPY
Gloeobacter	----
Pseudomonas	----

Figura 22: Características da sequência de TgHDAC4. (A) Resultado da busca por domínios conservados, utilizando a sequência proteica completa de TgHDAC4, onde é verificada a presença de um domínio HDAC completo na porção C-terminal (B), Alinhamento da sequência da TgHDAC4 completa, sugerindo que é única de alguns membros do filo Apicomplexa (*Hammondia hammondi* e

Neospora Caninum, mostrando similaridade com outros organismos, em sua maioria bactérias (*Gloeobacter* e *Pseudomonas*), apenas na região do domínio.

Também foi utilizado o programa SignalP 4.1 Server, através do qual foi possível identificar um provável sinal de clivagem no aminoácido 26, com probabilidade de 72% e um peptídeo sinal da via secretória com probabilidade de 95%. Como diversas HDACs transitam entre núcleo e citoplasma, optamos por buscar sinais de transporte nuclear utilizando o programa ValidNESs. Neste caso, o programa identificou um provável sinal de exportação nuclear entre os aminoácidos 12 a 18, do tipo rico em leucina (LFFLLLF) com probabilidade de 45%.

Com base na sequência correta do gene, foram sintetizados novos oligonucleotídeos para o etiquetamento gênico de *tghdac4* com 3X HA. A amplificação foi feita com a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), onde foi obtida a banda do tamanho correto, 1548 pb, como mostra a Figura 23.

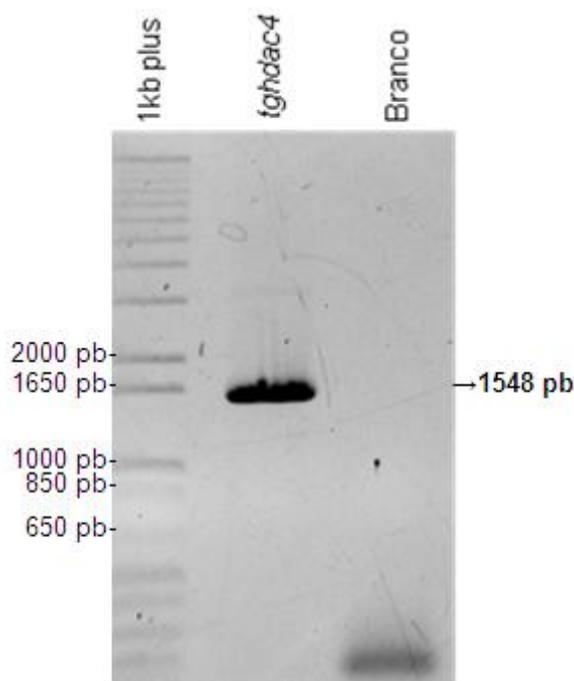


Figura 23: Amplificação da porção final do gene *tghdac4*. Resultado da amplificação do fragmento de *tghdac4*, mostrando a banda do tamanho esperado (1548pb). Para amplificação foi utilizado como molde o DNA genômico de *T. gondii*, cepa RH *hxgprt-ku80*⁻. Marcador 1Kb plus (Invitrogen).

Após a purificação do fragmento, foi feito o tratamento com a *T4 DNA Polimerase* e a ligação entre a região de *tghdac4* e o vetor pLIC.HA.HXGPRT. A reação foi transformada em bactéria *E.coli* DH5 α cálcio-competente. Os clones foram analisados por PCR de colônia, e aqueles selecionados (clones 3 e 10) foram

cultivados em meio LB. Estas culturas foram usadas para purificação plasmidial por lise alcalina e a confirmação do inserto foi feita através da digestão com as enzimas *EcoRV*, cujo sítio está presente no gene de interesse, e *XhoI* e *NotI* cujos sítios estão presentes no vetor. Da mesma forma que anteriormente, o resultado da digestão (Fig. 24B) foi comparado com o esquema de digestão virtual obtido com o programa Serial Cloner, como mostra a Figura 24A. Os clones foram analisados também por sequenciamento.

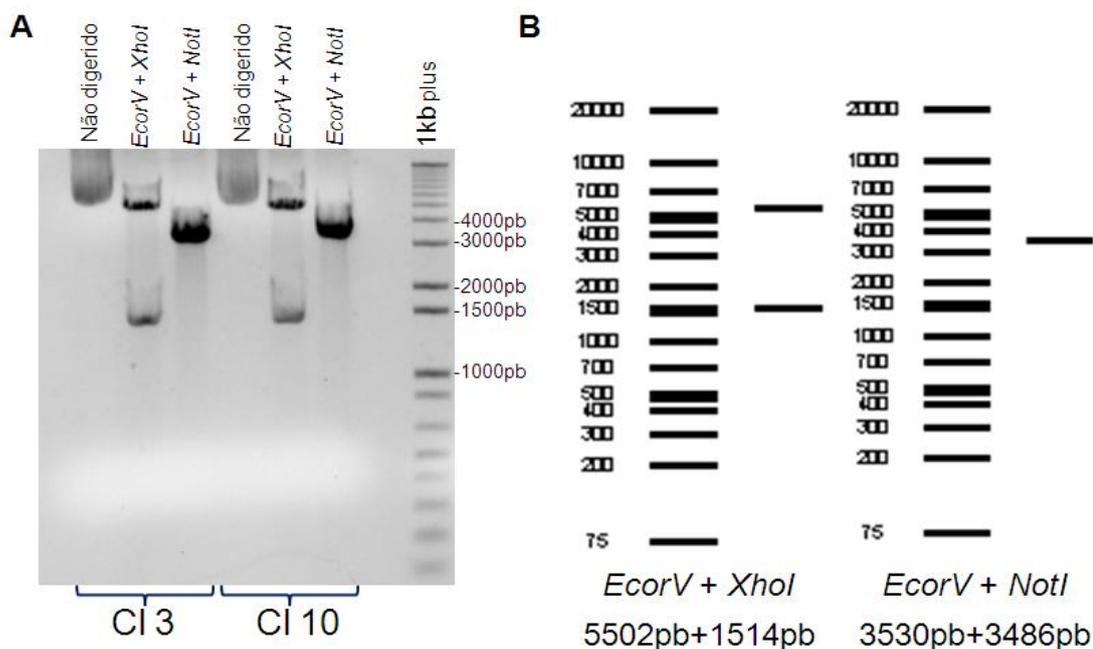


Figura 24: Confirmação dos clones 3 e 10 por digestão com enzimas de restrição. (A) Resultado das reações de digestão, onde primeiramente, temos os plasmídeos não digeridos e depois digeridos com *EcoRV*+*XhoI* e *EcoRV*+*NotI*. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen). (B) Digestão virtual dos clones com a enzima *EcoRV* que corta no inserto e *NotI* e *XhoI*, que cortam no vetor. O programa utilizado foi o Serial Cloner.

Com a confirmação de que o inserto clonado estava correto, cerca de 5 µg do plasmídeo correspondente ao clone 10 foi linearizado com a enzima *NsiI*, para realizar a transfecção em formas taquizoítas do parasita. Os parasitas foram então selecionados por pressão seletiva com ácido micofenólico e xantina.

4.2.3 Confirmação da expressão de TgHDAC4-HA na população selecionada

Para confirmar se os parasitas da população selecionada expressavam a proteína TgHDAC4 com etiqueta de 3X HA, foram preparados extratos proteicos dos transfectantes e da cepa selvagem. Após separação em gel SDS PAGE 10% as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo monoclonal anti-HA (Roche). O resultado de western blot pode ser visualizado na Figura 25. A massa molecular esperada da proteína é de 124 kDa, porém, o anticorpo detectou uma proteína que parece ter massa molecular em torno de 100 kDa.

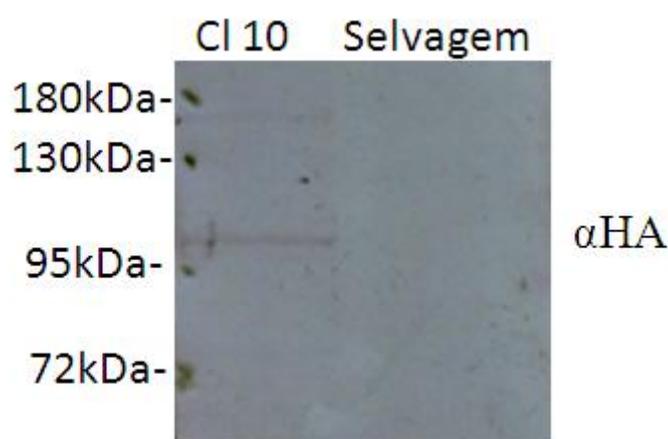


Figura 25: Ensaio de western blot utilizando anticorpo anti-HA. Ensaio de western blot para verificação da presença da etiqueta de HA na proteína TgHDAC4. Anticorpo primário monoclonal anti-HA (1:500, Roche). Anticorpo secundário: anti rato conjugado com fosfatase alcalina (1:1000, Sigma).

4.2.4 Confirmação da inserção no genoma da etiqueta HA

Com base nos resultados de western blot, seria promissor partir para clonagem dos parasitas transfectantes. Assim, após a clonagem da população de parasitas por diluição seriada, diferentes clones (A3, A10 e G7) foram analisados para confirmar a presença da etiqueta no genoma através de PCR. Foi extraído o DNA genômico dos clones para ser utilizado como molde em reações de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram: o oligonucleotídeo reverso que havia sido utilizado anteriormente para a amplificação de *tghdac4.2*, em conjunto com um oligonucleotídeo *reverse* que anela na etiqueta de HA (HA-INT-R) e um oligonucleotídeo mais externo (F1) em conjunto com o oligonucleotídeo HA-INT-R

(Fig 26A). O resultado da PCR foi observado em gel de agarose 1% (Fig. 26B), confirmando a presença da etiqueta no gene *tghdac4*.

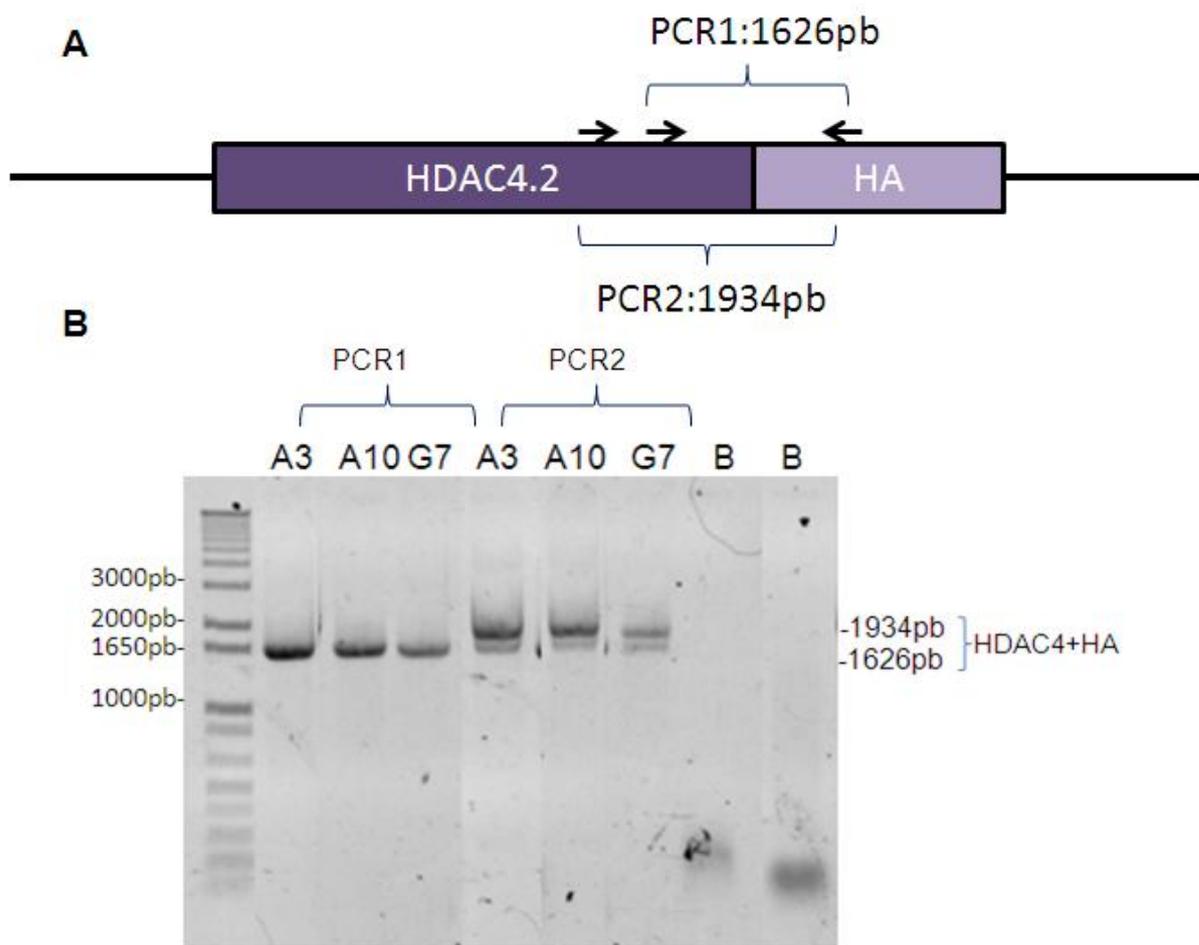


Figura 26: PCR para confirmação da presença da etiqueta de 3X HA. (A) Esquema da PCR realizada. (B) Resultado da amplificação de *tghdac4* com a etiqueta de 3XHA. Para amplificação foi utilizado como molde o DNA genômico dos clones A3, A10 e G7. Marcador: 1Kb Plus (Invitrogen).

4.2.5 Confirmação da expressão de TgHDAC4-HA por imunofluorescência indireta

Uma vez confirmada a inserção da etiqueta de 3X HA no local correto do genoma por PCR, utilizamos quatro clones para análise de localização por imunofluorescência indireta. Para tanto, utilizamos o anticorpo primário monoclonal anti-HA (Roche) e o secundário IgG de rato conjugado a Alexa-Fluor 488 (diluição 1:600, Invitrogen) e DAPI para marcação do núcleo e apicoplasto. Foi possível visualizar que o anticorpo anti-HA reconheceu uma proteína localizada próxima ou dentro do apicoplasto (Fig. 27). Como o mesmo resultado foi obtido para todos os clones testados, seguimos o trabalho utilizando apenas o clone denominado G7.

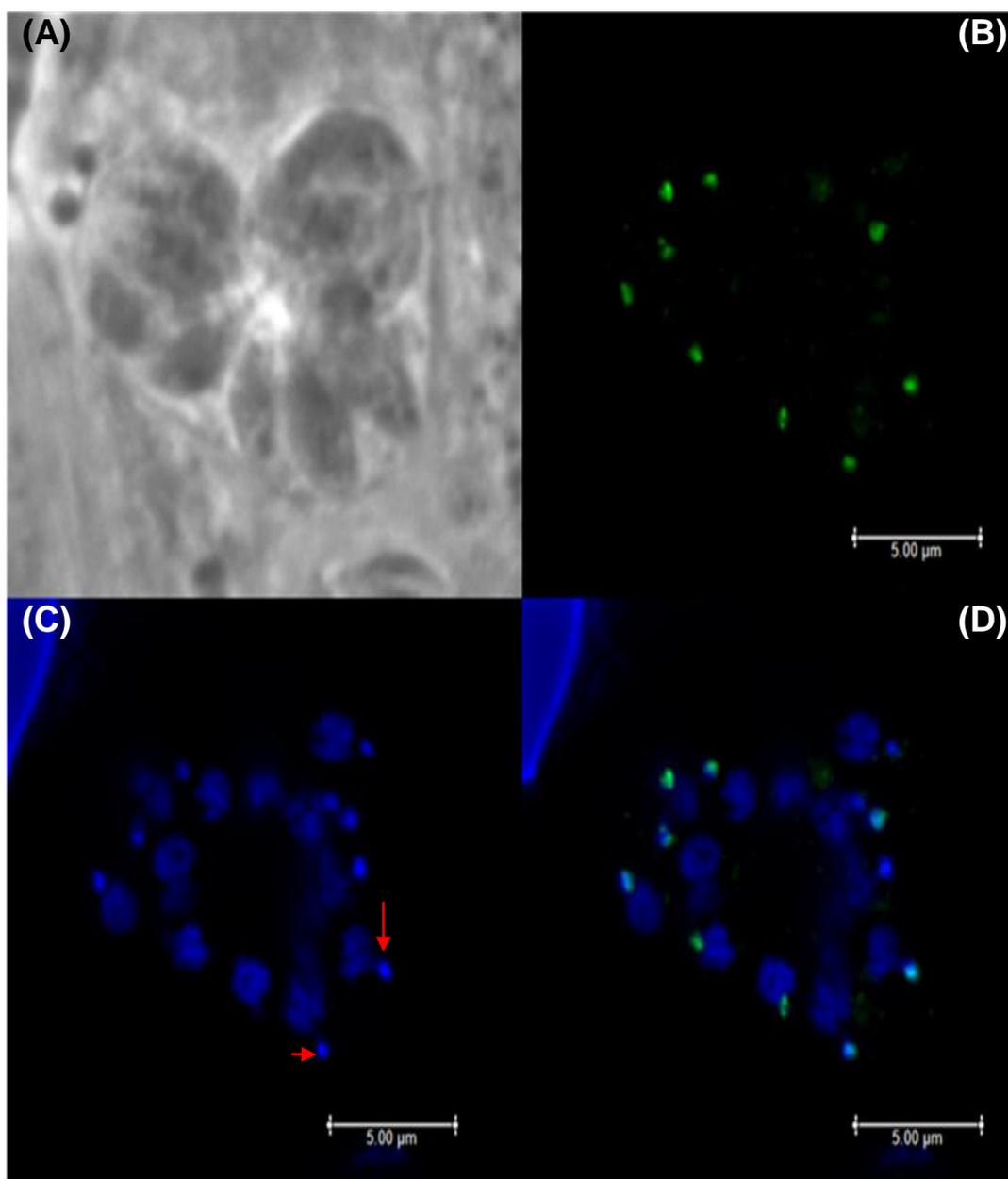


Figura 27: Localização de TgHDAC4-HA por imunofluorescência indireta. (A) Contraste de fase mostrando um vacúolo de formas taquizoítas em célula HFF. (B) Em verde, a marcação obtida para TgHDAC4-HA (anti-HA). (C) Núcleo e apicoplasto (setas em vermelho) dos parasitas corados com DAPI (D) Sobreposição do anti-HA com o DAPI, mostrando que a TgHDAC4 tem uma possível localização no apicoplasto. Anticorpo primário anti-HA (Diluição 1:250, Roche) e secundário IgG de rato conjugado a Alexa-Fluor 488 (diluição 1:600, Thermo Fisher Scientific).

4.3 ENSAIO DE CO-LOCALIZAÇÃO ENTRE TGHDAC4 E APICOPLASTO

As imagens obtidas no primeiro ensaio de microscopia revelaram que a marcação de TgHDAC4 está adjacente ao núcleo e, de acordo com a distribuição das organelas de *Toxoplasma*, isso representaria potencialmente uma localização

em duas organelas: o apicoplasto, ou o complexo de Golgi. Para esclarecer esta localização, primeiramente foi feito um ensaio de co-localização com a proteína GRASP (Proteína de organização e compactação do Golgi), que marca o complexo de Golgi. Para tanto, utilizamos o clone G7 para transfectar o vetor ptubGRASP-mRFP (HU et al., 2002), que expressa de forma transiente a proteína GRASP fusionada a proteína vermelha fluorescente (RFP). Após 24 hs da transfecção, analisamos os parasitas por microscopia de imunofluorescência (Figura 28).

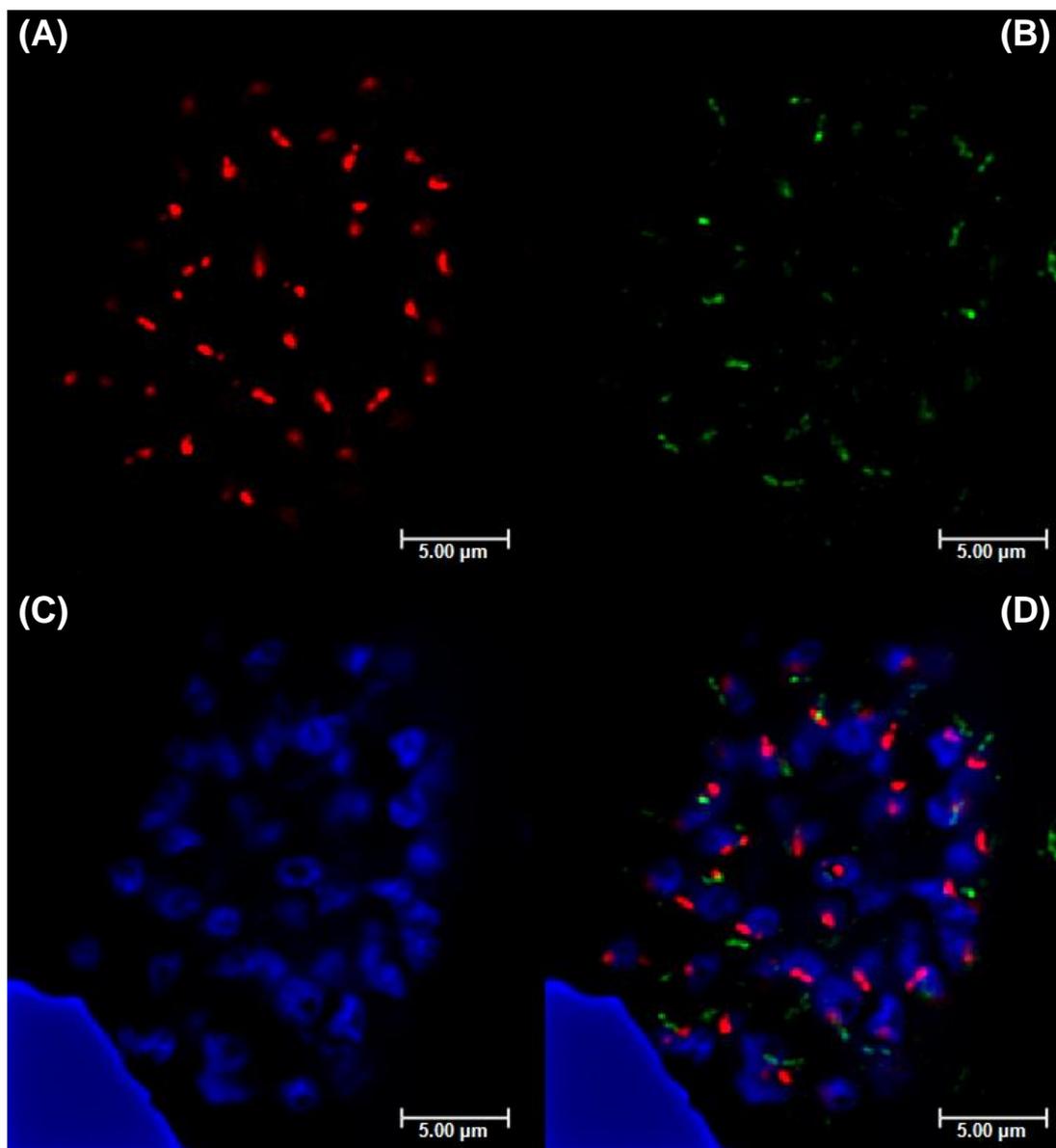


Figura 28: Ensaio de co-localização com GRASP. (A) A proteína GRASP em vermelho que está fusionada a RFP. (B) A proteína TgHDAC4-HA em verde. (C) O núcleo e apicoplasto dos parasitas corados com DAPI (D) Sobreposição de TgGRASP e TgHDAC4 com o DAPI, Anticorpo primário anti-HA (Diluição 1:250, Roche) e secundário IgG de rato conjugado a Alexa-Fluor 488 (diluição 1:600, Thermo Fisher Scientific)

A imagem obtida pelo ensaio de microscopia mostra que TgHDAC4 (verde) não co-localiza com TgGRASP (vermelho), descartando o complexo de Golgi como organela onde TgHDAC4 estaria localizada. Aparentemente a marcação de TgHDAC4 é muito semelhante à do apicoplasto marcado com DAPI e por isso, a segunda etapa foi conferir se havia co-localização neste caso. Para tanto, realizamos ensaios de microscopia de imunofluorescência indireta para detecção da FNR (ferredoxina-NADP⁺ reductase), proteína localizada no apicoplasto. Neste caso, o clone G7 foi transfectado com o vetor ptubFNRL-DsRed (HE et al., 2001b), para expressão transiente de FNR. Após 24 hs da transfecção, os parasitas foram analisados por microscopia (Figura 29). Como é observado na imagem obtida, TgHDAC4 e TgFNR co-localizam, sugerindo fortemente que TgHDAC4 está mesmo localizada no apicoplasto.

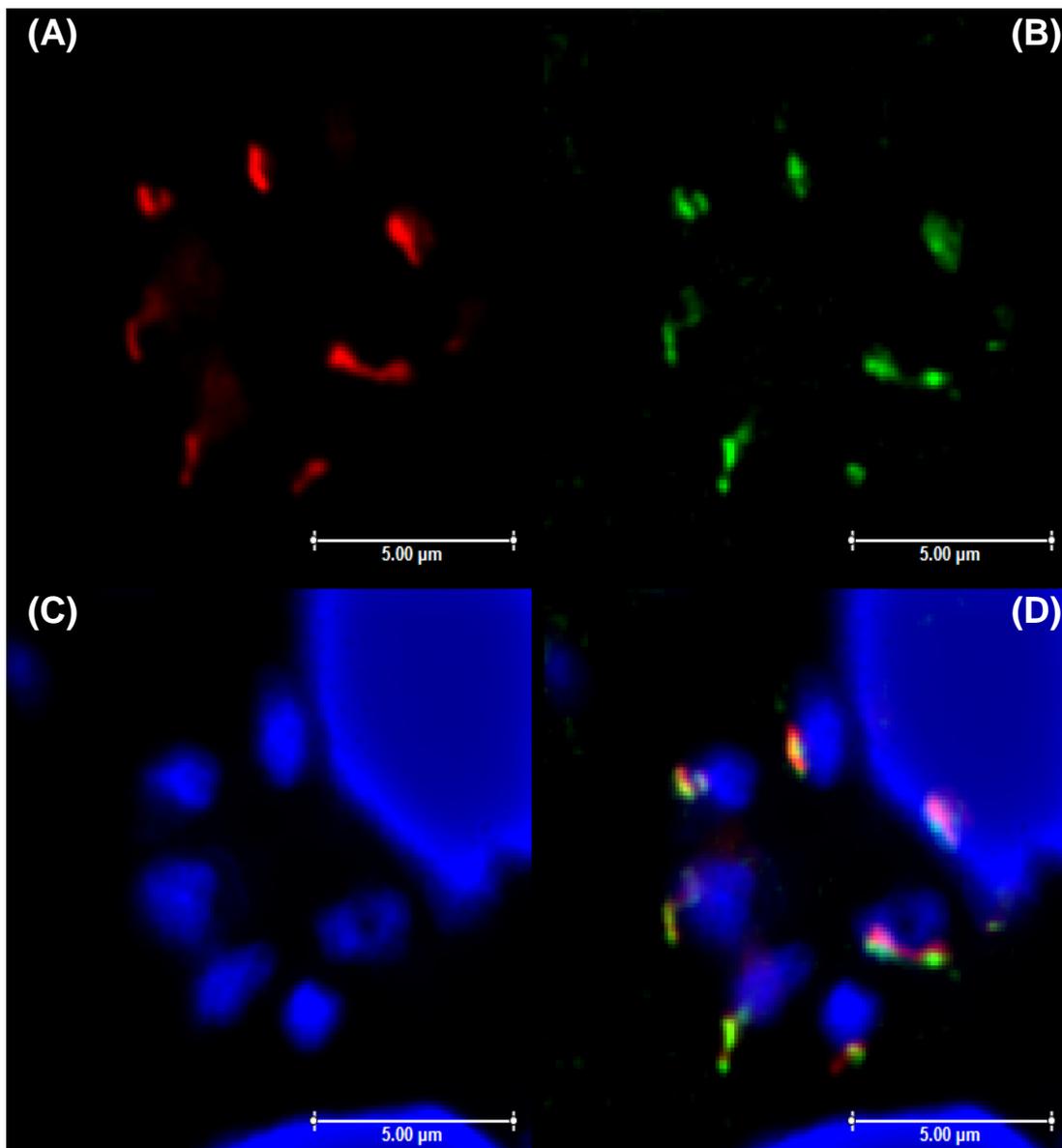


Figura 29: Ensaio de co-localização com FNR. (A) A proteína FNR em vermelho fusionada à DsRed. (B) A proteína TgHDAC4-HA em verde. (C) O núcleo e apicoplasto dos parasitas corados com DAPI. (D) Sobreposição de TgFNR e TgHDAC4 com o DAPI, mostrando que a HDAC4 co-localiza com a proteína de apicoplasto. Anticorpo primário anti-HA (Diluição 1:250, Roche) e secundário IgG de rato conjugado a Alexa-Fluor 488 (diluição 1:600, Thermo Fisher Scientific)

4.4 NOCAUTE GÊNICO UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/CAS9

Visto que a deleção do gene *tghdac4* não foi obtida pela metodologia de PCR de fusão e que posteriormente foi verificado que a anotação no banco de dados estava errada, resolvemos tentar o método de nocaute baseado no sistema CRISPR/Cas9. Neste caso, o vetor já contendo a sequência de RNA guia para o gene *tghdac4* já estava construído e foi cedido gentilmente pelo Dr. Hakimi.

Inicialmente, o plasmídeo enviado foi transformado em bactéria *E.coli* DH5 α cálcio-competente para amplificação e obtenção de quantidade suficiente para transfecção em *Toxoplasma*. Cerca de 10 μ g de plasmídeo foi transfectado em

formas taquizoítas do parasita, e a eficiência da transfecção foi observada em microscópio invertido Nikon eclipse TE300. Analisamos a eficiência da transfecção pela presença de GFP no núcleo dos parasitas (no vetor, a Cas9 está fusionada à GFP e à um sinal de localização nuclear-NLS) e com isso pudemos observar a baixa taxa de transfecção, onde cerca de apenas 1% dos parasitas apresentavam marcação para GFP. Além disso, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta e verificou-se que os parasitas GFP-positivos estavam com uma morfologia alterada, possuindo em alguns casos, um núcleo maior do que os parasitas sem fluorescência (Figura 30).

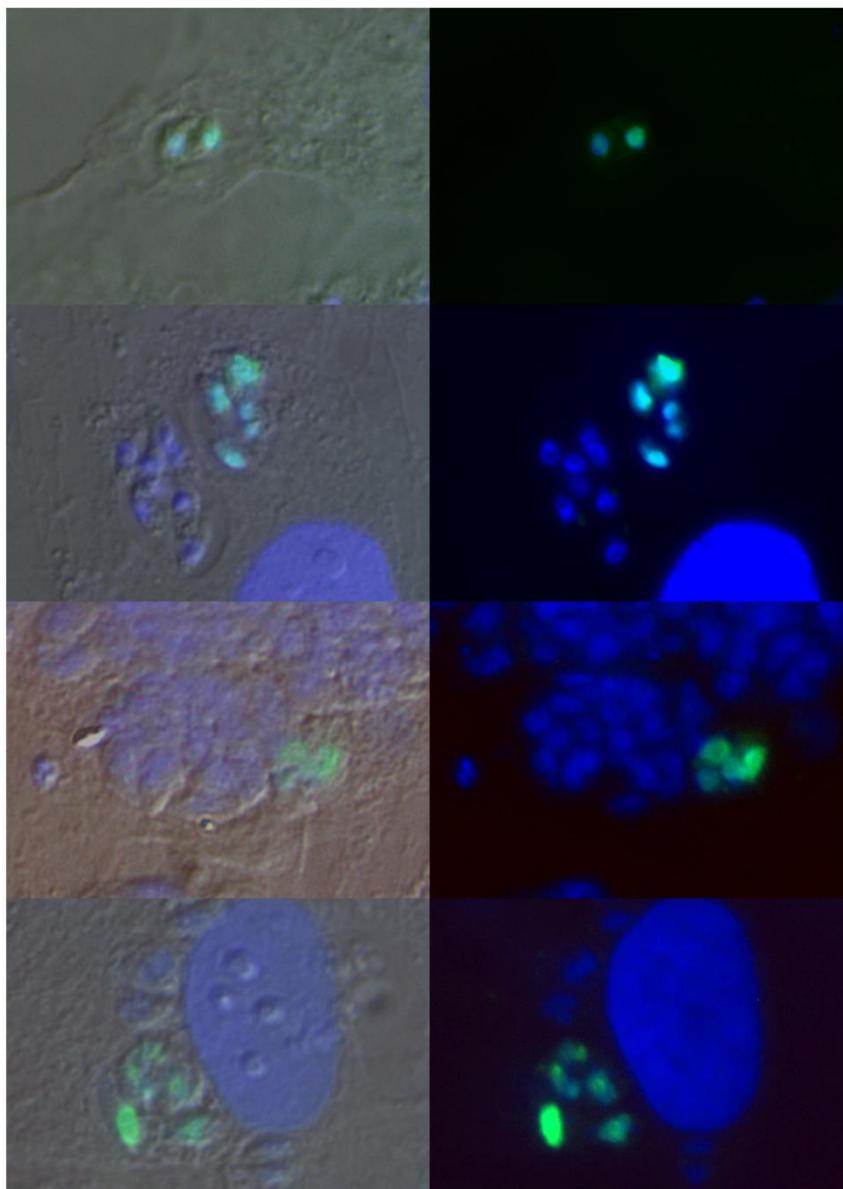


Figura 30: Análise dos parasitas transfectantes para Cas9. Parasitas transfectados com o vetor pTOXO_Cas9_CRISPR em PUC57_simp com RNA guia para *tghdac4*. Após 24 hs, realizamos

ensaios de imunofluorescência. Em verde, a Cas9 fusionada a GFP e em azul núcleo e apicoplasto corados com DAPI. Na coluna da esquerda, a sobreposição do DIC, Cas9-GFP e DAPI e na direita apenas Cas9-GFP e DAPI.

Para confirmar a eficiência da interferência do gene pela Cas9, os parasitas positivos para GFP foram selecionados por Cell Sorting e utilizados para extração de DNA genômico que foi usado para amplificar a região alvo do RNA guia. Este material foi analisado por sequenciamento e verificou-se que a região analisada não possuía qualquer mutação, que seria o esperado pela ação da Cas9, ou seja, a sequência do gene *tghdac4* estava íntegra.

5. DISCUSSÃO

Para que processos celulares que dependem de DNA possam ocorrer, é necessário que as maquinarias ultrapassem a barreira imposta pela arquitetura da cromatina, uma estrutura dinâmica e bem organizada que restringe o acesso por tais maquinarias. O controle epigenético está entre as estratégias utilizadas pela célula para alterar a estrutura da cromatina. Neste caso, pode-se destacar o processo reversível de acetilação de histonas, que afeta diretamente a estrutura da cromatina em virtude da alteração na interação dos nucleossomos com a mesma, tornando-a mais ou menos acessível às maquinarias. Fatores chaves da acetilação são as acetiltransferases (HATs) que adicionam um grupo acetil aos resíduos de lisina presentes nas histonas, bloqueando sua carga positiva e diminuindo então a interação dos nucleossomos com o DNA, tornando a cromatina mais acessível. As desacetilases (HDACs) por outro lado, removem essas modificações, restaurando a interação forte entre nucleossomos e DNA, tornando a cromatina densamente compactada, uma característica de regiões de transcrição inativa.

As HDACs clássicas são divididas em três classes dependendo da similaridade com as HDACs de levedura: classe I (similar a Rpd3), classe II (similar a Hda1) e classe IV (baixa similaridade com as enzimas de classe I e II). Dentro das histonas de *Toxoplasma*, a TgHDAC4 foi classificada como único membro da classe IV, pois não possui semelhanças nem com Rpd3, nem tampouco com Hda1.

Na verdade, há poucos membros conhecidos para a classe IV em metazoários, e HDAC11 de humanos é a única caracterizada até o momento. Sabe-se que a HDAC11 se encontra no núcleo, regulando negativamente a expressão de interleucina-10 (IL-10) em células apresentadoras de antígeno, interagindo com a região promotora do gene (VILLAGRA et al., 2009). HDAC11 está associada com HDAC6 (Classe II), que é uma proteína ativadora da transcrição de IL-10. Esta associação é a primeira demonstração de duas HDACs de funções contrárias atuando no mesmo promotor (CHENG et al., 2014; VOELTER-MAHLKNECHT; HO; MAHLKNECHT, 2005). Enquanto HDAC11 tem uma localização nuclear, TgHDAC4 se encontra no apicoplasto do parasita, indicando que apesar de ambas serem membros da classe IV, TgHDAC4 possui função diferente em *Toxoplasma*.

O fato de TgHDAC4 estar no apicoplasto pode não ser algo tão inesperado, visto que uma histona desacetilase presente em um plastídeo já foi identificada em um estudo com arroz (*Oryza sativa*). Interessantemente, esta histona (OsHAD6),

cuja função ainda não foi elucidada, foi descrita como membro da classe IV e está presente no cloroplasto (CHUNG et al., 2009). Sabe-se ainda que o apicoplasto é uma organela plastídeo-*like* sem atividade fotossintética, de origem endossimbiótica secundária de uma alga vermelha com um ancestral apicomplexa. Esta organela é exclusiva de parasitas Apicomplexa, e possui um genoma de cerca de 35 kb circular, possuindo pelo menos 25 cópias (MATSUZAKI et al., 2001) e é importante para síntese de ácidos graxos, aminoácidos, isoprenóides e está relacionado com a mitocôndria para síntese de heme (ROOS et al., 2002; SATO, 2011).

O fato de TgHDAC4 ser a primeira HDAC encontrada no apicoplasto de *Toxoplasma* ressalta a importância de estudar a essencialidade desta enzima na biologia do parasita e sua função na atividade da organela, uma vez que foi demonstrado que a inibição da replicação do seu genoma pelo uso de drogas inibe também a replicação do parasita, mostrando ser uma organela essencial à sua sobrevivência (FICHERA; ROOS, 1997). Não é surpresa que o genoma do apicoplasto é muito semelhante com o de bactéria, possuindo componentes da maquinaria de replicação, transcrição e tradução similares. Já existem várias drogas antibacterianas que tem como alvo essas maquinarias, e elas tem se mostrado eficiente para matar parasitas apicomplexas (DAHL; ROSENTHAL, 2008; MCCONKEY; ROGERS; MCCUTCHAN, 1997; MCFADDEN; ROOS, 1999). Com isso, o apicoplasto é considerado o “calcanhar de Aquiles” desses parasitas e um dos potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas.

Um outro fato que chamou atenção em nossos dados foi de a proteína TgHDAC4 fusionada a 3X HA possuir cerca de 100 kDa quando detectada em ensaios de western blot, sendo que a massa molecular predita seria de 124 kDa. Essa diferença poderia ser decorrente de alterações na mobilidade da proteína no gel ou de processamentos pós-traducionais que alteram a estrutura da proteína no parasita. Já foi descrito, que proteínas do apicoplasto costumam apresentar duas bandas em ensaios de western blot, referentes a uma proteína imatura, quando ainda não ocorreu a clivagem da sequência sinal, e uma da proteína madura, após a clivagem (GLASER et al., 2012; SHEINER et al., 2015; VAN DOOREN et al., 2008). Sabe-se que durante a evolução, quase todos os genes que codificam proteínas do apicoplasto foram transferidos para o núcleo. Sendo assim, proteínas de apicoplasto costumam ser codificadas no núcleo e importadas para o apicoplasto após a tradução. Essas proteínas possuem uma sequência bipartida na sua porção N-terminal, contendo primeiramente uma sequência sinal destinada ao retículo

endoplasmático, fazendo com que a proteína entre na via secretória. Quando isso ocorre, a sequência sinal é clivada, permitindo acesso à um peptídeo de trânsito que direciona a proteína para o apicoplasto. Este peptídeo de trânsito é rico em resíduos básicos hidroxilados e medeia a importação da proteína para a organela (FLEIGE; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2010; TONKIN; ROOS; MCFADDEN, 2006). Esses peptídeos sinais não possuem um motivo comum, sendo também muito variáveis em comprimento, mas o fato de possuir aminoácidos carregados positivamente parece ser essencial para o transporte (TONKIN; ROOS; MCFADDEN, 2006). Também já foram realizados estudos que mostram proteínas repórteres sendo direcionadas ao apicoplasto quando fusionadas com essas sequências bipartidas (DEROCHER et al., 2000; YUNG; UNNASCH; LANG-UNNASCH, 2001).

A análises por domínios e sinais na sequência de TgHDAC4 permitiram a predição com alta probabilidade de uma sequência sinal na região N-terminal. Por isso, uma explicação para a diferença de massa molecular de TgHDAC4 entre a proteína predita e a detectada em ensaios de western blot poderia ser de que ela sofre clivagem quando entra na via secretória para ser direcionada ao apicoplasto. No nosso caso, não foi possível visualizar duas bandas para TgHDAC4, que corresponderia a proteína imatura e madura. Uma explicação seria a velocidade que ocorre a clivagem, não sendo possível a detecção da proteína imatura no gel.

Apesar do apicoplasto, assim como nos cloroplastos, possuir DNA próprio, não foram identificadas a presença de histonas típicas nesta organela em *Toxoplasma*. No entanto, foi identificada uma proteína histona-like, similar a proteína HU encontrada em plastídeos de algas vermelhas e em bactérias. O papel de TgHU ainda não é completamente elucidado, mas sabe-se que se encontra no apicoplasto e que pode ser importante na compactação do DNA desta organela. Interessantemente, tanto a TgHU, quanto TgHDAC4 possuem um peptídeo sinal, identificado pelo TargetP 1.1, para direcionamento a via secretória. E assim como TgHDAC4, TgHU é uma proteína com massa molecular menor que a predita, reforçando a ideia de que TgHDAC4 sofre clivagens durante seu direcionamento ao apicoplasto.

Em bactérias, a HU é uma proteína estrutural de ligação ao DNA, que atua na compactação, estabilidade, transcrição, início da replicação e reparo do DNA e já foi visto que TgHU é capaz de complementar a função de HU em mutantes bacterianos (Δ HU), indicando que TgHU pode ter uma função semelhante a HU de bactérias

(REIFF; VAISHNAVA; STRIEPEN, 2012). Um homólogo de HU em *Plasmodium* também já foi identificado e se localiza no apicoplasto do parasita além de ter a capacidade de se ligar e condensar o DNA *in vitro* (RAM et al., 2008). Adicionalmente, foi demonstrado em outros organismos que proteínas HU sofrem acetilação em diferentes lisinas, mas não se sabe se o mesmo ocorre com a TgHU de *Toxoplasma* (GHOSH et al., 2016). No acetiloma de *T. gondii* foram identificadas proteínas acetiladas no apicoplasto, sendo elas GAPDH II (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), acetil coenzima A carboxilase, diidrolipoil desidrogenase, ACP (proteína carreadora de acil) e uma proteína que possui um domínio catalítico 2-oxo ácido desidrogenase aciltransferase (JEFFERS; SULLIVAN, 2012). Logo, especulamos que essas proteínas poderiam ser alvos de TgHDAC4, uma vez que já foi demonstrado que HDACs não desacetilam apenas histonas e até o momento é a única desacetilase localizada nessa organela. Sendo assim, análises genéticas são necessárias para ajudar na investigação da função de TgHDAC4 no apicoplasto.

Outro fato interessante, é que proteínas de apicoplasto possuem similaridade com proteínas de bactérias (GLASER et al., 2012; REIFF; VAISHNAVA; STRIEPEN, 2012; SHEINER et al., 2015; VAN DOOREN et al., 2008). Já foi relatado que as proteínas procarióticas AcuC (proteína de utilização de acetoina) e Apah (acetilpoliamina Amidohidrolase) podem ter divergido de um ancestral em comum e evoluíram para dar origem às HDACs eucarióticas classes I e II, respectivamente. Ainda que HDAC11 de humanos seja de classe IV, ela parece estar relacionada com a proteína AcuC procariótica, possuindo similaridade de sequência em seu sítio ativo (CHUNG et al., 2009; GAO et al., 2002; GROZINGER; HASSIG; SCHREIBER, 1999). Também já foi visto que HDACs desta classe possuem uma estreita relação filogenética com proteínas de eubactérias (LEDENT; VERVOORT, 2006).

Podem ser utilizadas diversas ferramentas de genética reversa no *Toxoplasma*, além de ser um organismo haplóide e de fácil cultivo, o que o tornam um excelente modelo experimental. Optamos por investir no nocaute do gene como ferramenta para análise da sua função. Infelizmente, nossas tentativas em obter parasitas nocaute para TgHDAC4 não tiveram sucesso. Uma possibilidade seria de que o cassete possa estar integrando no local errado, pois apesar do gene não ser deletado, os parasitas são resistentes as drogas de seleção e o gene de resistência *hxgprt* esta sendo amplificado do genoma do transfectantes. Shen et al., comentam que ao utilizar o gene de seleção *hxgprt*, pode ocorrer uma resistência espontânea às drogas de seleção (ácido micofenólico e xantina), enquanto Rommerein et al.,

afirmam que a persistência episomal pode ser uma das razões para não obtenção do nocaute, não ocorrendo a recombinação do plasmídeo. Essa persistência parece ser determinada pelas sequências contidas nas regiões 5' e 3', onde aproximadamente 5-10% dos plasmídeos exibem essa resistência. Porém, não sabemos se este mesmo fenômeno poderia ocorrer com fragmentos gerados por PCR de fusão.

De qualquer forma, devemos ressaltar que as construções utilizadas nas tentativas não sucedidas, foram geradas antes de verificarmos que na verdade existe um erro na anotação do gene. Sendo assim, a região 3' utilizada como alvo para recombinação, não era mais correspondente à UTR correta e sim a uma porção que codifica o domínio HDAC. Mesmo assim, acreditamos que a porção removida causaria danos suficientes para proteína, não explicando o fato de a sequência do gene ainda estar presente em transfectantes resistentes às drogas. Uma possibilidade seria o gene ter função essencial, e portanto as populações com o gene deletado não sobreviveriam, sobrando apenas aqueles que de alguma forma adquiriram resistência as drogas. De qualquer forma, nada impede que possamos com base na anotação correta insistir em novas construções para tentar um nocaute eficiente.

Recentemente, trabalhos vem mostrando a viabilidade do sistema CRISP/Cas9 como uma ferramenta eficiente e viável para interrupção de genes em *Toxoplasma* em estudos funcionais. Este técnica baseia-se no sistema imune de *Streptococcus pyogenes*, onde o RNA guia, seguido da sequência PAM, deve ser complementar à sequência alvo, guiando a Cas9 para o gene a ser mutado (CURT-VARESANO et al., 2016; SHEN et al., 2014, 2017; SIDIK et al., 2014). Aqui, usamos um plasmídeo cedido pelo Dr. Hakimi já contendo a sequência de RNA guia cujo alvo seria a TgHDAC4. Neste sistema, é necessário a transfecção de apenas um plasmídeo, pois nele estão contidas as sequências do RNA guia e da proteína Cas9 associada à GFP. Este método tem como vantagem a não utilização de antibióticos, além de aumentar a taxa de mutação em pelo menos 100 vezes se comparados com métodos de recombinação homóloga (SIDIK et al., 2014). A presença do GFP confirma a presença da Cas9, funcionando como um marcador para a eficiência da transfecção, facilitando a identificação dos parasitas positivos. Logo, após 24 horas da transfecção, já é possível ver a fluorescência de GFP no núcleo do parasita. Em nossos primeiros ensaios, este método não permitiu a seleção e análise do fenótipo causado pela interrupção de TgHDAC4. Conseguimos detectar parasitas com núcleo

fluorescente, mas a porcentagem era muito baixa e observamos alteração na morfologia dos parasitas com marcação para GFP, o que poderia indicar toxicidade pela presença de Cas9, como já foi notado em alguns trabalhos (ROMMEREIM et al., 2013; SHEN et al., 2017). Para controlar a atividade da Cas9, alguns autores estão utilizando técnicas para indução de sua expressão ou desestabilização (SERPELONI et al., 2016; ZHU; GONZÁLEZ; HUANGFU, 2014).

Além disso, Sidik et al., descreveram que em cerca de sete dias, normalmente ocorre a perda do plasmídeo e a consequente perda da Cas9 com a etiqueta, tornando mais difícil a clonagem e seleção dos parasitas. Estes autores também descrevem dados demonstrando que essa seleção não é trivial e que dos clones selecionados cerca de 80% não mostraram qualquer mutação gênica (SIDIK et al., 2014). Recentemente, Long, Wang e Sibley, mostraram que a adição de dois RNAs guia, colocados próximos à extremidade 5' e 3', auxiliam na remoção de toda a sequência codificadora, podendo ser substituída por um gene de seleção, sendo esta estratégia, extremamente eficiente (LONG; WANG; SIBLEY, 2016). Shen et al., ressaltam que para obtenção de parasitas com alterações genômicas desejadas é necessário a utilização de marcadores de seleção, tornando a seleção mais eficiente (SHEN et al., 2017). A metodologia que nós empregamos não utiliza marcadores de seleção o que pode ter dificultado o isolamento de parasitas com mutação em *tghdac4*. Logo, isso poderia ser uma estratégia interessante para dar continuidade aos estudos funcionais de TgHDAC4.

Apesar da não obtenção do nocaute pela técnica de PCR de fusão e pelo sistema CRISPR/Cas9, nós acreditamos que os parasitas resultantes do primeiro etiquetamento de *tghdac4* possam estar com TgHDAC4 mutada, funcionando como um possível nocaute desta proteína, pois a etiqueta foi adicionada no meio do domínio catalítico, resultando em uma proteína truncada o que a inviabilizaria. A presença da etiqueta de 3X HA foi confirmada por PCR, porém, não foi possível a detecção da proteína em ensaios de Western Blot e imunofluorescência indireta utilizando anticorpo anti-HA, sugerindo que a proteína possa estar sendo degradada. Porém, são necessárias análises da população em questão para realizar uma análise fenotípica destes parasitas.

Acreditamos que os investimentos em ferramentas genéticas são importantes para dar continuidade a este tipo de estudo, visto que a investigação sobre as HDACs em parasitas Apicomplexas se intensificou após a descoberta da apicidina, um tetra-peptídeo cíclico isolado de fermentações de *Fusarium ssp.* que possui

efeito inibitório contra HDACs destes parasitas. Apicidina foi capaz de induzir alterações transcricionais em múltiplos estágios de *P. falciparum* intraeritrocítico, causando a rápida ativação de muitos genes que normalmente eram suprimidos. A inibição da HDAC pela apicidina causou modificações em histonas e regulação de fatores de transcrição estágio-específicos resultando na desregulação da cascata transcricional do ciclo intraeritrocítico. No entanto, a apicidina mostrou alguns problemas de toxicidade, causando efeitos antiproliferativos em células HeLa, eliminando o seu possível uso para o tratamento parasitário (CHAAL et al., 2010; DARKIN-RATTRAY et al., 1996; MUKHERJEE et al., 2008).

Outra droga antiparasitária que vem sendo estudada é o composto denominado FR235222, que também é um tetra-peptídeo cíclico, isolado do caldo de fermentação de espécies de *Acremonium*. Esta droga também inibe HDACs, especificamente a HDAC3 de *Toxoplasma*. Foi verificado que esta droga inibe o crescimento intracelular de *T.gondii*, impedindo a formação de células filhas. Esta droga, também é capaz de induzir a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos. Um fato interessante, é que esse composto parece ser capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e do sistema nervoso central, chegando até a localização dos cistos. Este composto é promissor, pois chegando a localização dos cistos, pode inibir que pacientes com toxoplasmose crônica, sofram recidivas, sendo de extrema importância para pacientes imunodeprimidos. Este composto também mostrou bloquear o crescimento e diferenciação de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei* (BOUGDOUR et al., 2009; MAUBON et al., 2010).

Com exceção de TgHDAC3, as demais seis desacetilases de histonas de *Toxoplasma*, ainda não foram caracterizadas. Por outro lado, as HDACs de *Plasmodium* tem sido foco de estudo, principalmente para o desenvolvimento de inibidores destas enzimas. A busca por drogas anti-maláricas tem sido foco de estudo de muitos grupos, uma vez que os parasitas adquirem resistência às drogas utilizadas (ANDREWS et al., 2009). Sabe-se, que a sobrevivência do *Plasmodium falciparum* no hospedeiro, deve-se principalmente à mudança fenotípica entre membros polimórficos dos genes da família *var*. Esta variação antigênica permite ao parasita a evasão do sistema imune e sua consequente sobrevivência. *Plasmodium falciparum* possui 5 desacetilases, dessas, sabe-se que PfHda2 (Histona desacetilase 2) silencia a expressão de genes *var*, mostrando que o nocaute desta enzima, leva a expressão desregulada desses genes. Além disso, a cada ciclo assexuado do parasita no estágio sanguíneo, uma pequena porção da população se

converte em gametócitos sexuais, e PfHda2 parece controlar essa mudança do ciclo assexual para o sexual (ANDREWS, 2012; COLEMAN et al., 2014). Além desta enzima, há estudos sobre a PfSir2 que possui uma localização nuclear e mostrou desacetilar a porção N-terminal de histonas H3 e H4. Ela também tem uma função ADP-ribose sobre histonas e a si mesma, sendo que sua atividade de desacetilação depende de sua ADP-ribosilação. Essa enzima mostrou estar presente em regiões sub-teloméricas, possuindo, assim como PfHda2, controle epigenético em genes *var* (MERRICK; DURAISINGH, 2007). Também já foi identificada a PfHDAC1, que é nuclear, sendo expressa predominantemente nos gametócitos e nos parasitas maduros do estágio sanguíneo (JOSHI et al., 1999).

Enfim, nos últimos anos os estudos de HDACs tem despertado interesse de diversos grupos, incluindo parasitologistas, decorrente de seu papel na remodelagem da cromatina e no silenciamento gênico. Como mencionado acima, inibidores de HDACs têm sido testados com sucesso contra doenças parasitárias, provavelmente por reverterem a transcrição de genes silenciados, o que afeta processos fundamentais à sua sobrevivência, incluindo divisão e diferenciação. Aqui, demos início a caracterização de TgHDAC4, uma enzima localizada especificamente no apicoplasto do parasita. Esse dado por si só, indica sua função única em *Toxoplasma*, e uma das ideias sobre sua função seria de que esteja afetando a compactação no DNA da organela através de seu envolvimento no processo de desacetilação de outras proteínas presentes nesta organela. Logo, novas abordagens serão necessárias para elucidar a importância de TgHDAC4 nesse parasita, o que poderia a longo prazo, indicar um novo alvo quimioterápico para o tratamento da toxoplasmose, uma doença ainda sem cura efetiva.

6. CONCLUSÕES

Nessa dissertação, demos início a caracterização da histona desacetilase 4 de *T. gondii* (TgHDAC4). Através de análises *in silico*, verificamos que ela é exclusiva de alguns membros do filo Apicomplexa, sendo que a única região em comum com outros organismos, é a região do domínio HDAC. Além disso, ela faz parte da classe IV de histonas desacetilases, sendo a classe menos descrita até o momento. TgHDAC4 também possui um peptídeo sinal, um sinal de exportação nuclear e de clivagem preditos, cujas funções ainda não foram caracterizadas.

Neste trabalho foram utilizadas ferramentas de genética reversa para a caracterização de TgHDAC4, o etiquetamento da proteína endógena e o nocaute gênico. Após diversas tentativas malsucedidas para a obtenção do etiquetamento, foi verificado que o gene *tghdac4* estava mal anotado em sua região C-terminal no banco de dados de *Toxoplasma*. Dessa forma, realizamos o sequenciamento desta região, sendo possível encontrar o códon de terminação correto. Com a sequência completa, foi possível realizar a clonagem da porção final de *tghdac4*. Com a proteína etiquetada, foi possível localizar TgHDAC4 no apicoplasto co-localizando com FNR, uma proteína dessa organela. Ensaios de western blot confirmaram a presença da etiqueta em uma proteína um pouco menor do que o esperado, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa.

Até o momento, não foi possível obter o nocaute de TgHDAC4, possivelmente pela integração incorreta do cassete. Alternativamente, foi utilizado o sistema CRISPR/Cas9 e, apesar da baixa eficiência de transfecção, foi possível a visualização dos parasitas transfectados possuindo GFP no núcleo. Os parasitas apresentaram uma morfologia atípica, especialmente no núcleo. É cedo afirmar que essa morfologia é decorrente da mutação do gene, uma vez que não foi identificar nenhuma mutação nos clones que selecionamos até agora.

Embora preliminares, alguns dados importantes sobre TgHDAC4 foram obtidos. O fato desta proteína se encontrar no apicoplasto levanta muitos questionamentos sobre como esta enzima estaria atuando nesta organela, quais proteínas estaria desacetilando e em quais processos estaria participando, já que é a única histona desacetilase encontrada no apicoplasto de *Toxoplasma* até o momento. Ainda são necessários estudos sobre essa proteína para o entendimento de sua função nesta organela. Isso pode trazer não apenas respostas para a função

de TgHDAC4, mas também, um melhor entendimento da função e metabolismo do apicoplasto, que é único e essencial para parasitas Apicomplexas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ANDERSON-WHITE, B. et al. **Cytoskeleton assembly in Toxoplasma gondii cell division Brooke**. [s.l: s.n.]. v. 298

ANDREWS, K. Towards Histone Deacetylase Inhibitors as New Antimalarial Drugs. **Current Pharmaceutical Design**, p. 3467–3479, 2012.

ANDREWS, K. T. et al. Targeting histone deacetylase inhibitors for anti-malarial therapy. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, p. 292–308, 2009.

ATAYDE, V. D.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. The emerging world of small silencing RNAs in protozoan parasites. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 321–327, 2011.

BALAJI, S. et al. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 13, p. 3994–4006, 2005.

BHATTI, M. M. et al. Pair of unusual GCN5 histone acetyltransferases and ADA2 homologues in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 1, p. 62–76, 2006.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 607–623, 2000.

BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 11–25, 2001.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between Toxoplasma gondii and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, n. 5–6, p. 458–476, 2009.

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, p. 953–66, 2009.

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

2010.

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 Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–20, 2010.

BROOKS, C. F. et al. Toxoplasma gondii sequesters centromeres to a specific nuclear region throughout the cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3767–3772, 2011.

CARROZZA, M. J. et al. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 6, p. 321–329, 2003.

CHAAL, B. K. et al. Histone deacetylases play a major role in the transcriptional regulation of the Plasmodium falciparum life cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, 2010.

CHAUDHARY, K. et al. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31221–31227, 2004.

CHENG, F. et al. Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. **Molecular Immunology**, v. 60, n. 1, p. 44–53, 2014.

CHOI, S. W.; KEYES, M. K.; HORROCKS, P. LC/ESI-MS demonstrates the absence of 5-methyl-2'-deoxycytosine in Plasmodium falciparum genomic DNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 350–352, 2006.

CHUNG, P. J. et al. Subcellular localization of rice histone deacetylases in organelles. **FEBS Letters**, v. 583, n. 13, p. 2249–2254, 2009.

COLEMAN, B. I. et al. A Plasmodium falciparum Histone Deacetylase Regulates Antigenic Variation and Gametocyte Conversion. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 2, p. 177–186, 2014.

CROKEN, M. M.; NARDELLI, S. C.; KIM, K. Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 5, p. 202–213, 2012.

CURT-VARESANO, A. et al. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the Toxoplasma GRA16 and GRA24 effectors into host cells. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 151–167, 2016.

D'URSO, A.; BRICKNER, J. H. Mechanisms of Epigenetic Memory. **Trends Genet.**, v. 30, n. 6, p. 230–236, 2014.

DAHL, E. L.; ROSENTHAL, P. J. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 279–284, 2008.

DALMASSO, M. C. et al. Toxoplasma gondii has two lineages of histones 2b (H2B) with different expression profiles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 148, n. 1, p. 103–107, 2006.

DALMASSO, M. C. et al. Toxoplasma H2A Variants Reveal Novel Insights into Nucleosome Composition and Functions for this Histone Family. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 1, p. 33–47, 2009.

DARKIN-RATTRAY, S. J. et al. Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase (cyclic tetrapeptide Apicomplexa antiparasitic malaria coccidiosis). **Medical Sciences**, v. 93, n. November 1996, p. 13143–13147, 1996.

DE RUIJTER, A. J. M. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **The Biochemical journal**, v. 370, n. Pt 3, p. 737–49, 2003.

DEROCHER, A et al. Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the Toxoplasma gondii plastid branches off the secretory system. **Journal of Cell Science**, v. 113 (Pt 2, p. 3969–3977, 2000.

DIXON, S. E. et al. A decade of epigenetic research in Toxoplasma gondii Stacy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 173, n. 1, p. 1–9, 2010.

DONALD, R. G. K. et al. Insertional Tagging , Cloning , and Expression of the Toxoplasma gondii Hypoxanthine-Xanthine-Guanine. v. 271, n. 24, p. 14010–14019, 1996.

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

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–177, 1972.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

ELSHEIKHA, H. M.; BÜSSELBERG, D.; ZHU, X. Q. The known and missing links between *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 4, p. 749–759, 2016.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FICHERA, M. E.; ROOS, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. **Nature**, v. 390, n. 6658, p. 407–9, 1997.

FINNIN, M. S. et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**, v. 401, n. 6749, p. 188–193, 1999.

FLEIGE, T.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Apicoplast: keep it or leave it. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 253–262, 2010.

FURTADO, J. et al. Toxoplasmosis: A global threat. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 281, 2011.

GAO, L. et al. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25748–25755, 2002.

GHOSH, S. et al. Lysine acetylation of the *Mycobacterium tuberculosis* HU protein modulates its DNA binding and genome organization. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 577–588, 2016.

GISSOT, M. et al. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 3, p. 537–540, 2008.

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.

GLASER, S. et al. Tic22 is an essential chaperone required for protein import into the apicoplast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39505–39512, 2012.

GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; 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.

GROZINGER, C. M.; HASSIG, C. A.; SCHREIBER, S. L. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 9, p. 4868–4873, 1999.

HAKIMI, M.-A.; DEITSCH, K. W. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 4, p. 357–62, 2007.

HAMM, C. A.; COSTA, F. F. The impact of epigenomics on future drug design and new therapies. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 13–14, p. 626–635, 2011.

HE, C. Y. et al. Targeting and Processing of Nuclear-encoded Apicoplast Proteins in Plastid Segregation Mutants of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28436–28442, 2001a.

HE, C. Y. et al. A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **EMBO Journal**, v. 20, n. 3, p. 330–339, 2001b.

HSU, P.-C.; GROER, M.; BECKIE, T. New findings: Depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 26, n. 11, p. 629–637, 2014.

HU, K. et al. Daughter Cell Assembly in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 6, p. 2170–2179, 2002.

HUYNH, M. H.; CARRUTHERS, V. B. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, p. 530–539, 2009.

JEFFERS, V.; SULLIVAN, W. J. Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 6, p. 735–742, 2012.

JOSHI, M. B. et al. Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 11–19, 1999.

- KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 259–272, 2004.
- KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEDENT, V.; VERVOORT, M. Comparative genomics of the class 4 histone deacetylase family indicates a complex evolutionary history. **BMC biology**, v. 4, p. 24, 2006.
- LOMBARDI, P.; COLE, K. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. **Current opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 6, p. 735–743, 2011.
- LONG, S.; WANG, Q.; SIBLEY, L. D. Analysis of non-canonical calcium dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii* by targeted gene deletion using CRISPR/Cas9. **Infection and Immunity**, v. 84, n. January, p. IAI.01173-15, 2016.
- LOVETT, J. L. et al. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)/ryanodine-sensitive stores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 25870–25876, 2002.
- LÜDER, C. G. K.; BOHNE, W.; SOLDATI, D. Toxoplasmosis: A persisting challenge. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 460–463, 2001.
- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251–260, 1997.
- MATSUZAKI, M. et al. Large amounts of apicoplast nucleoid DNA and its segregation in *Toxoplasma gondii*. **Protoplasma**, v. 218, n. 3–4, p. 180–191, 2001.
- MAUBON, D. et al. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on *Toxoplasma gondii*: Inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4843–4850, 2010.
- MCCONKEY, G. A.; ROGERS, M. J.; MCCUTCHAN, T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* Protein Synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, p. 2046–2049, 1997.
- MCFADDEN, G. I.; ROOS, D. S. Apicomplexan plastids as drug targets. **Trends in**

Microbiology, v. 7, n. 8, p. 328–333, 1999.

MCFADDEN, G. I.; WALLER, R. F. Plastids in parasites of humans. **Bioessays**, v. 19, n. 11, p. 1033–1040, 1997.

MERRICK, C. J.; DURAISINGH, M. T. Plasmodium falciparum Sir2: An unusual sirtuin with dual histone deacetylase and ADP-ribosyltransferase activity. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 2081–2091, 2007.

MICELLI, C.; RASTELLI, G. Histone deacetylases: Structural determinants of inhibitor selectivity. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 6, p. 718–735, 2015.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 1, p. 21–38; table of contents, 2002.

MUKHERJEE, P. et al. Structural insights into the Plasmodium falciparum histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5254–5265, 2008.

NARDELLI, S. C. et al. The Histone Code of Toxoplasma gondii Comprises Conserved and Unique Posttranslational Modifications. **mBio**, v. 4, n. 6, p. 1–12, 2013.

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

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C R Acad Sci**, v. 148: 369, 1909.

NISHI, M. et al. Organellar dynamics during the cell cycle of Toxoplasma gondii. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 9, p. 1559–68, 2008.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, 2009.

RADKE, J. R. et al. The transcriptome of Toxoplasma gondii. **BMC biology**, v. 3, p. 26, 2005.

RAM, E. V. S. R. et al. DNA organization by the apicoplast-targeted bacterial histone-like protein of Plasmodium falciparum. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 15, p. 5061–5073, 2008.

REIFF, S. B.; VAISHNAVA, S.; STRIEPEN, B. The HU protein is important for apicoplast genome maintenance and inheritance in Toxoplasma gondii. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 7, p. 905–915, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

ROMMEREIM, L. M. et al. Genetic manipulation in Deltaku80 strains for functional genomic analysis of Toxoplasma gondii. **Journal of Visualized Experiments**, n. 77, p. 1–11, 2013.

ROOS, D. S. et al. Molecular Tools for Genetic Dissection of the Protozoan Parasite Toxoplasma gondii. **Methods in Cell Biology**, v. 45, 1994.

ROOS, D. S. et al. Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 357, n. 1417, p. 35–46, 2002.

SAKSOUK, N. et al. Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite Toxoplasma gondii Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite Toxoplasma go. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 23, p. 10301–10314, 2005.

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

SATO, S. The apicomplexan plastid and its evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 8, p. 1285–1296, 2011.

SERPELONI, M. et al. UAP56 is a conserved crucial component of a divergent mRNA export pathway in Toxoplasma gondii. **Molecular Microbiology**, 2016.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. The Fine Structure and Reproduction of Toxoplasma gondii. **Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 209–226, 1968.

SHEINER, L. et al. Toxoplasma gondii Toc75 Functions in Import of Stromal but not Peripheral Apicoplast Proteins. **Traffic**, v. 16, n. 12, p. 1254–1269, 2015.

SHEN, B. et al. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR / CAS9 Efficient Gene Disruption in Diverse. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–11, 2014.

SHEN, B. et al. Development of CRISPR/Cas9 for Efficient Genome Editing in *Toxoplasma gondii* Bang. **In Vitro Mutagenesis: Method and Protocols**, v. 1498, 2017.

SIDIK, S. M. et al. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SMITH, A. T. et al. MYST Family Histone Acetyltransferases in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* MYST Family Histone Acetyltransferases in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. v. 4, n. 12, p. 2057–2065, 2005.

SOUZA, W. DE. Fine Structure of the coinoid of *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst Med. trop**, v. 16, n. 1, p. 32–38, 1974.

SOUZA, W. DE; MARTINS-DUARTE, É. S.; LEMGRUBER, L. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, p. 131–143, 2010.

SPANGE, S. et al. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 185–198, 2009.

SPLENDRE, A. Um nuovo protozoa parassita de' conigli, incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Nota preliminare pel. Rev Soc Scien São Paulo**, v. 3, p. 109–12, 1908.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000.

STRIEPEN, B. The apicoplast: a red alga in human parasites. **Essays in Biochemistry: Molecular Parasitology**, v. 51, p. 111–125, 2011.

SZOSTAK, J. W. et al. The double-strand-break repair model for recombination. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 1983.

TONKIN, C. J.; ROOS, D. S.; MCFADDEN, G. I. N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 192–200, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 509–519, 2004.

VAN DOOREN, G. G. et al. Toxoplasma gondii Tic20 is essential for apicoplast protein import. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13574–9, 2008.

VANAGAS, L. et al. Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v. 2, n. 10, p. 1–15, 2012.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochem Cell Biol**, v. 83, p. 344–353, 2005.

VILLAGRA, A. et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. **Nat Immunol**, v. 10, n. 1, p. 92–100, 2009.

VOELTER-MAHLKNECHT, S.; HO, A. D.; MAHLKNECHT, U. Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. **International journal of molecular medicine.**, v. 16, n. 4, p. 589–598, 2005.

WEISS, L.; DUBEY, J. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009.

WILSON, R. J. M. et al. Have malaria parasites three genomes? **Parasitology Today**, v. 7, n. 6, p. 134–136, 1991.

YANG, X. J.; SETO, E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 13, n. 2, p. 143–153, 2003.

YUNG, S.; UNNASCH, T. R.; LANG-UNNASCH, N. Analysis of apicoplast targeting and transit peptide processing in Toxoplasma gondii by deletional and insertional mutagenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 11–21, 2001.

ZHU, Z.; GONZÁLEZ, F.; HUANGFU, D. The iCRISPR platform for rapid genome editing in human Pluripotent Stem Cells. **Methods Enzymol**, n. 546, p. 215–250, 2014.

ZWERGEL, C. et al. Histone Deacetylase Inhibitors : Updated Studies in Various Epigenetic - Related Diseases. **Journal of Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2016.