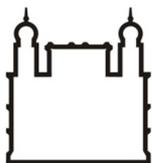


INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

IDENTIFICAÇÃO DE UMA POSSÍVEL HISTONA-*LINKER* EM
Toxoplasma gondii

VANESSA ROSSINI SEVERO

CURITIBA/PR
2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

VANESSA ROSSINI SEVERO

IDENTIFICAÇÃO DE UMA POSSÍVEL HISTONA-*LINKER* EM *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

2018

***“Somente aquele que se dispõe a fazer coisas
pequenas, que sabe e pode, virá a saber e a
poder realizar grandes coisas. Qualquer
subida exige passos e degraus”
Emmanuel – Chico Xavier***

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, meus pais e meu irmão, por sempre apoiarem minhas escolhas me incentivando e dando forças para correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu amor e companheira de vida, Júlia, pela dedicação, carinho e companheirismo sempre. Por me fazer sorrir nos dias difíceis, por conhecer cada olhar e iluminar meus dias me mostrando o quão leve pode ser a vida.

Às pessoas que considero minha segunda família, Karol, Raquel, Vanir e Gabriel, obrigado pelo apoio e disposição em ajudar sempre. Vocês foram essenciais nesse processo de evolução e amadurecimento.

À minha orientadora Dra. Sheila, pela oportunidade e confiança. Pelos ensinamentos, dedicação, paciência e incentivo, acreditando em mim quando nem eu mesma acreditava no meu potencial.

À minha co-orientadora, Dra. Andrea, pela confiança e disponibilidade, sempre com ótimas ideias e simplificando o que parecia impossível de se entender.

À Carol e à Mari, por toda ajuda nos meus primeiros passos no laboratório, pelo companheirismo e paciência com tantos questionamentos, e pelas risadas proporcionadas na nossa rotina de bancada.

Aos colegas do Laboratório da Regulação da Expressão Gênica, pela receptividade, pelo auxílio nos experimentos sempre que necessário e pelo alegre convívio do dia a dia.

À Devânia de Jesus por todo seu auxílio no cultivo celular, mas principalmente pela vivência e boas risadas que compartilhamos.

Ao pessoal da microscopia, principalmente à Msc Beatriz Borges, por ser essa pessoa alegre e sempre disposta a ensinar e a ajudar no que for preciso.

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, Fundação Araucária e Fiocruz.

RESUMO

A estrutura da cromatina é uma barreira que limita o acesso ao DNA pelos complexos proteicos. A alternância do nível de compactação da cromatina é regulada principalmente pelas histonas e suas modificações pós traducionais (MPTs). *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) possui as quatro histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4), mas até o momento a quinta histona, H1 (ou histona-*linker*) não foi identificada. Em outros eucariotos, a histona H1 é parte fundamental na compactação da cromatina e sua ausência poderia levar a um estado menos compactado da cromatina em *T. gondii*. Identificamos uma possível histona H1, similar a H1-*like* de *Kinetoplastidae*, e que corresponde apenas à porção C-terminal de uma histona H1 típica, a qual denominamos TgH1-*like*. Através de análise estrutural *in silico*, verificamos que a proteína apresenta características comuns a histonas como um potencial eletrostático bastante positivo, devido à abundância em lisinas e argininas nessas proteínas. Para predição da função de TgH1-*like*, utilizamos o servidor ProFunc, onde obtivemos correspondência com modelo de histona h1b, sugerindo que TgH1-*like* poderia ter função de histona em *Toxoplasma*. Para caracterizar TgH1-*like*, realizamos o etiquetamento do epitopo do gene endógeno. Através de ensaio de imunofluorescência, foi possível verificar que a TgH1-*like* está localizado exclusivamente no núcleo do parasita. No entanto, por ensaios de western blot, TgH1-*like*-HA migrou como uma proteína de ~20 kDa, ao invés dos 9 kDa esperados para sua massa prevista. As histonas H1, assim como as demais histonas, são alvo de diversas MPTs, como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. Recentemente foram identificados diversos sítios de ubiquitinação em proteínas de *Toxoplasma*, incluindo TgH1-*like*, o que corresponderia a um aumento de tamanho compatível com o encontrado. Para verificar se TgH1-*like* está associada a cromatina de *T. gondii*, realizamos um protocolo de extração de histonas por fracionamento celular, onde confirmamos a sua localização nuclear, e observamos uma parcela associada ao DNA juntamente com outras histonas, como a H4. Essa interação foi confirmada por ensaio de co-imunoprecipitação, mostrando que a histona H4 precipita juntamente com a TgH1-*like*. Em busca de dados funcionais, realizamos o nocaute de *tgh1-like*, que não mostrou-se essencial a sobrevivência do parasita. Ensaio preliminares com parasitas Δ TgH1-*like*, através de ensaio de placa, resultou em um número de placas de lise maior quando comparado a parasitas controles, indicando que a replicação celular está alterada nesses parasitas. Corroborando esses dados, ensaios de imunofluorescência indicaram um número maior de parasitas por vacúolo. Juntos, nossos dados indicam que TgH1-*like* está associada ao DNA e forma um complexo com outras histonas. Além disso, parasitas nocautes apresentaram alteração no ciclo celular do parasita, embora mais evidências sejam necessárias para corroborar tal alteração. Mostramos que TgH1-*like* apresenta características de histonas, não é essencial ao parasita, e outras análises funcionais estão em andamento para confirmarmos seu papel em *T. gondii*.

Palavras-chaves: *Toxoplasma gondii*, cromatina, histona

ABSTRACT

Chromatin structure is a barrier limiting the access to DNA by protein complexes. The alternation of chromatin compaction level is mainly regulated by histones and their posttranslational modifications (PTMs). *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) has all four canonical histones (H2A, H2B, H3 and H4), but to date, the fifth histone H1 (or linker histone) has not been identified. In other eukaryotes, histone H1 is a fundamental part of chromatin compaction and its absence in *T. gondii* could result in a less compacted state of the chromatin. Here, we identified a possible histone H1, similar to the H1-like of *Kinetoplastidae*, which corresponds only to the C-terminal portion of a typical histone H1, named TgH1-like. Using *in silico* analysis, we verified that the protein shows common characteristics to histones, such as positive electrostatic potential, due to the abundance of lysines and arginines in these proteins. In order to imply TgH1-like function, we used the ProFunc server, which obtained correspondence with histone h1b model, suggesting that TgH1-like could have histone function in *Toxoplasma*. To characterize TgH1-like, we performed the epitope tagging of the endogenous gene. By immunofluorescence analysis, it was possible to verify that TgH1-like-HA is located exclusively in the nucleus of the parasite. However, by Western blot assays, TgH1-like-HA migrated as a ~20 kDa protein, rather than the expected 9 kDa for its predicted mass. Histones H1, as well as other histones, are targets for several PTMs, such as methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination. Recently, several ubiquitination sites on *Toxoplasma* were identified, including TgH1-like, which would correspond to the observed increase in size. To verify if TgH1-like is associated with *T. gondii* chromatin, we performed a histone extraction protocol by cell fractionation, confirming its nuclear localization, and we also observed a portion associated with DNA and other histones, such as H4. This interaction was confirmed by co-immunoprecipitation assay, showing that histone H4 co-immunoprecipitates with TgH1-like. In search of functional data, we performed the knock-out of tgh1-like, which did not show to be essential to survival of the parasite. Preliminary assays with Δ TgH1-like parasites, through plaque assay, resulted in a greater number of plaques lysis when compared to control parasites, indicating that cell replication is altered in these parasites. Corroborating these data, immunofluorescence assays indicated a larger number of parasites per vacuole. Together, our data indicate that TgH1-like is associated with DNA and forms a complex with other histones. In addition, tgh1-like knockout parasites present alterations in the parasite's cell cycle, although more evidence is needed to corroborate such alteration. We thus show that TgH1-like presents histone characteristics, is not essential for parasite survival, and further functional analysis are underway to define its role in *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, chromatin, histone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	11
Figura 2. Ultraestrutura da forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figura 3. Vetor pLIC.HA.HXGPRT.....	25
Figura 4. Representação da clonagem independente de ligação (LIC).....	26
Figura 5. Mapa do vetor pLIC.HXGPRT.h1-like.3xHA com as enzimas selecionadas.....	28
Figura 6. Representação da metodologia para nocaute de <i>tgh1-like</i>	32
Figura 7. Alinhamento de sequências múltiplas.....	39
Figura 8. Alinhamento de sequências múltiplas da histona H1 de humanos e TgH1- <i>like</i>	40
Figura 9. Predição da estrutura terciária de TgH1- <i>like</i> e o seu potencial eletrostático.....	41
Figura 10. Estruturas correspondentes encontradas através do servidor ProFunc.....	41
Figura 11. Amplificação do gene <i>tgh1-like</i>	42
Figura 12. Análise dos clones positivos por PCR de colônia.....	43
Figura 13. Análise da construção dos plasmídeos por digestão com enzimas de restrição.....	44
Figura 14. Análise por Western blot da população transfectante utilizando anticorpo anti-HA.....	45
Figura 15. Análise por Western blot dos extratos proteicos tratados com DTT.....	46
Figura 16. Análise da presença da etiqueta 3X HA por PCR.....	47
Figura 17. Imunofluorescência indireta dos parasitas selvagens.....	48
Figura 18. Localização de TgH1- <i>like</i> por imunofluorescência indireta.....	49
Figura 19. Localização de TgH1- <i>like</i> por imunofluorescência indireta, em maior aumento.....	49
Figura 20. Análise por Western blot do ensaio de extração ácida de histonas por fracionamento celular.....	50
Figura 21. Co-imunoprecipitação.....	51
Figura 22. Análise da padronização dos ensaios de imunoprecipitação de TgH1- <i>like</i>	52
Figura 23. Análise da amplificação dos fragmentos das porções 5' e 3' UTRs do gene <i>tgh1-like</i>	53
Figura 24. PCR de fusão.....	54

Figura 25. Análise da seleção de parasitas nocaute de <i>tgh1-like</i>	55
Figura 26. Ensaio de placa.....	56
Figura 27. Comparação do número de placas entre $\Delta tgh1-like$ e parasitas controles..	56
Figura 28. Imunofluorescência indireta dos parasitas controles.....	58
Figura 29. Imunofluorescência indireta dos parasitas nocautes para <i>tgh1-like</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene de <i>tgh1-like</i>	23
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da etiqueta.	31
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das porções 5' e 3' UTRs de <i>tgh1-like</i>	33
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gene de seleção.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- graus Celsius
µg	- microgramas
µL	- microlitros
µm	- micrômetro
µM	- micromolar
ng	- nanogramas
pmol	- picomol
ATP	- adenosina trifosfato
BCIP	- <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
BSA	- albumina de soro bovino
CO ₂	- dióxido de Carbono
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
dCTP	- desoxicitidina trifosfato
dGTP	- desoxiguanosina trifosfato
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	- dithiothreitol
EDTA	- ácido etilendiamino tetra-acético
HA	- hemaglutinina
HEPES	- <i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
HFF	- <i>human foreskin fibroblasts</i>
hxppt	- <i>Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i>
Kb	- kilo bases
kDa	- kilo daltons

LIC	- <i>Ligation Independent Cloning</i>
M	- molar
mA	- miliampère
Meio LB	- meio Luria Bertani
mL	- mililitros
mm	- milímetro
mM	- milimolar
MPT	- modificação pós-traducional
NBT	- <i>nitro blue tetrazolium</i>
nm	- nanômetro
pb	- pares de base
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	- <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RNA	- ácido ribonucleico
SDS PAGE	- <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	- soro fetal bovino
TBE	- Tris/Borato/EDTA
Tris-HCl	- trisaminometano ácido clorídrico
U	- unidade (de enzima)
UTR	- <i>untranslated region</i>
v	- <i>volt</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.2 CICLO DE VIDA	10
1.3 TOXOPLASMOSE.....	12
1.4 ORGANIZAÇÃO CELULAR.....	13
1.5 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA CROMATINA.....	14
1.6 HISTONAS E VARIANTES DE HISTONAS	16
1.7 HISTONAS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	18
1.8 JUSTIFICATIVA.....	19
2. OBJETIVO.....	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQUÊNCIA DE <i>tgh1-like</i>	21
3.2 ANÁLISE ESTRUTURAL <i>in silico</i>	21
3.3 CULTIVO DE <i>Toxoplasma gondii</i>	22
3.4 ETIQUETAMENTO DO GENE	22
3.4.1 Extração de DNA genômico.....	22
3.4.2 Síntese dos oligonucleotídeos para o etiquetamento.....	23
3.4.3 Amplificação do gene.....	23
3.4.4 Eletroforese em gel de agarose	24
3.4.5 Purificação da PCR.....	24
3.4.6 Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT	25
3.4.7 Transformação bacteriana	26
3.4.8 Seleção dos clones positivos por PCR de colônia	27
3.4.9 Confirmação dos clones positivos por digestão enzimática	27
3.4.10 Transfecção	28
3.5 ANÁLISE DOS TRANSFECTANTES	29
3.5.1 Preparação dos extratos proteicos.....	29
3.5.2 Western blot.....	29
3.5.3 PCR para confirmação da etiqueta	30
3.5.4 Tratamento do extrato proteico com DTT	31
3.5.5 Imunofluorescência indireta	31

3.5.6 Clonagem dos transfectantes	32
3.6 NOCAUTE DE <i>tgH1-like</i>	32
3.6.1 Amplificação das porções 5' e 3' UTRs.....	32
3.6.2 PCR de fusão.....	33
3.6.3 Purificação de DNA a partir de gel de agarose	33
3.6.4 PCR para confirmação do nocaute	34
3.7 ANÁLISE DOS PARASITAS NOCAUTES.....	34
3.7.1 Ensaio de placa	34
3.7.2 Imunofluorescência Indireta dos parasitas nocautes	35
3.8 EXTRAÇÃO DE HISTONAS.....	35
3.9 IMUNOPRECIPITAÇÃO	36
3.9.1 Coloração por Nitrato de Prata	37
3.10 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 A PROTEÍNA HIPOTÉTICA TGH1-LIKE É SIMILAR A HISTONA H1 DE <i>Kinetoplastidae</i>	39
4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL <i>in silico</i>	40
4.3 TGH1-LIKE É UMA PROTEÍNA EXCLUSIVAMENTE NUCLEAR	42
4.3.1 Construção do plasmídeo para etiquetamento de TgH1- <i>like</i>	42
4.3.2 Obtenção das linhagens expressando TgH1- <i>like</i> fusionada a etiqueta 3X HA.....	44
4.3.3 Imunolocalização de TgH1- <i>like</i>	47
4.4 TGH1-LIKE ESTÁ PRESENTE EM ISOLADO DE HISTONAS	50
4.5 TGH1-LIKE INTERAGE COM A HISTONA H4.....	51
4.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TGH1-LIKE PARA ANÁLISE DE PROTEÔMICA.....	51
4.7 NOCAUTE DE TGH1-LIKE.....	52
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux, que o isolaram do roedor *Ctenodactylus gundi* no norte da África e no mesmo ano, por Splendore no Brasil, em estudos com coelhos. O nome do gênero foi sugerido por Nicolle e Manceaux, com base no formato de arco do parasita em sua forma proliferativo (derivado do grego onde, *toxon* = arco e *plasma* = forma). Já a espécie *gondii* foi sugerida baseada no roedor onde o parasita foi identificado inicialmente, *Ctenodactylus gundi* (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908).

O *T. gondii* é membro do filo Apicomplexa, que apresenta mais de 5.000 espécies e inclui patógenos de grande importância na saúde pública, como o *Cryptosporidium sp.*, causador da criptosporidíase e o *Plasmodium sp.*, causador da malária. *Toxoplasma* é um parasita intracelular obrigatório, capaz de infectar virtualmente qualquer célula nucleada, possuindo uma gama de hospedeiros intermediários. Ele é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença de ampla distribuição mundial, sendo uma das infecções parasitárias mais comuns em humanos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

Apesar de o parasita ter sido descrito em 1908, o ciclo de vida do *T. gondii* foi elucidado 47 anos após a identificação do protozoário. O parasita apresenta um ciclo complexo com alternância de hospedeiros, sendo que a fase sexuada ocorre nos hospedeiros definitivos, membros da família Felidae, e a fase assexuada nos hospedeiros intermediários, demais animais de sangue quente, entre eles o homem. O *T. gondii* possui três principais estágios de desenvolvimento: taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta. O taquizoíta é o estágio de multiplicação rápida do parasita no hospedeiro intermediário e nas células epiteliais não intestinais do hospedeiro definitivo e são altamente virulentos. Por outro lado, os bradizoítas apresentam uma multiplicação lenta e formam cistos teciduais. Já os esporozoítas, resultam da esporulação dos oocistos liberados no ambiente pelas fezes dos felinos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

1.2 CICLO DE VIDA

A fase sexuada do ciclo de vida do parasita ocorre apenas nos felídeos, e inicia-se após a ingestão de taquizoítas, bradizoítas ou esporozoítas, sendo o mais comum, a ingestão dos cistos de bradizoítas presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários através do carnivorismo. Logo após a ingestão, a parede do cisto é destruída por enzimas proteolíticas liberando bradizoítas, que irão invadir os enterócitos, diferenciando-se em esquizontes, dando início a fase do ciclo conhecido como entero-epitelial. Nessa fase, cinco etapas de multiplicações assexuadas morfologicamente distintas ocorrem, onde no final do processo, merozoítas são liberados dos esquizontes, iniciando a fase sexuada com a formação dos macro e microgametas. Os microgametas utilizam seus dois flagelos para se deslocar e fertilizar o macrogameta dando início ao processo de formação da parede do oocisto. Os oocistos formados são liberados no lúmen intestinal pela ruptura dos enterócitos e alcançam o ambiente externo pelas fezes dos felinos. Após alguns dias, ocorre o processo de esporogonia, com a formação de um oocisto esporulado contendo dois esporocistos e cada um contendo quatro esporozoítas (DUBEY, 1998, 2009; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ESCH; PETERSEN, 2013).

Mais de 100 milhões de oocistos podem ser liberados no ambiente através das fezes de um felídeo contaminado, podendo infectar um grande número de hospedeiros intermediários, tanto através do carnivorismo quanto do consumo de água e alimentos contaminados. Os oocistos podem permanecer no ambiente por muito tempo graças à alta resistência de suas paredes, que protegem o parasita de danos químicos e mecânicos (DUBEY, 1998, 2009; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ESCH; PETERSEN, 2013; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

Uma vez que os oocistos são ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os esporozoítos são liberados e penetram o epitélio intestinal do hospedeiro, onde se diferenciam em taquizoítas. A forma taquizoíta é altamente virulenta, pois é a forma proliferativa do parasita e a responsável pela fase aguda da toxoplasmose. Os taquizoítas podem infectar praticamente qualquer tipo celular e se replicam pelo processo conhecido com endodiogenia, onde duas células filhas são formadas dentro de uma célula mãe. Uma vez dentro da célula hospedeira, o parasita é rodeado por um vacúolo parasitóforo, uma forma de proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Após vários ciclos de replicação, ocorre o rompimento da célula hospedeira e as formas taquizoítas são liberadas, infectando as células

vizinhas. (ESCH; PETERSEN, 2013; HILL; DUBEY, 2014; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O aumento da pressão do sistema imune do hospedeiro causa a diminuição nas taxas de multiplicação e isso induz a diferenciação da forma taquizoíta em bradizoíta. Essa última é a forma latente do parasita, que permanece dentro da célula hospedeira rodeada por uma fina parede elástica e altamente resistente, formando os chamados cistos teciduais, que surgem cerca de 7 a 10 dias após a infecção. Os bradizoítas ainda se dividem por endodiogenia, porém, muito mais lentamente. Um cisto tecidual pode abrigar centenas de bradizoítas que podem permanecer latentes pelo resto da vida do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da toxoplasmose. Há um tropismo por tecidos musculares e cerebrais, mas os cistos podem ser encontrados em outros órgãos, como olhos, pulmões, rins e outros (HILL; DUBEY, 2014; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Uma pequena taxa de reativação espontânea pode ocorrer, fazendo com que os bradizoítas se diferenciem novamente em taquizoítas, mas essa reativação é facilmente controlada pelo sistema imune de indivíduos imunocompetentes. No entanto, esta reativação ocorre com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos, podendo causar maiores complicações (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2009; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

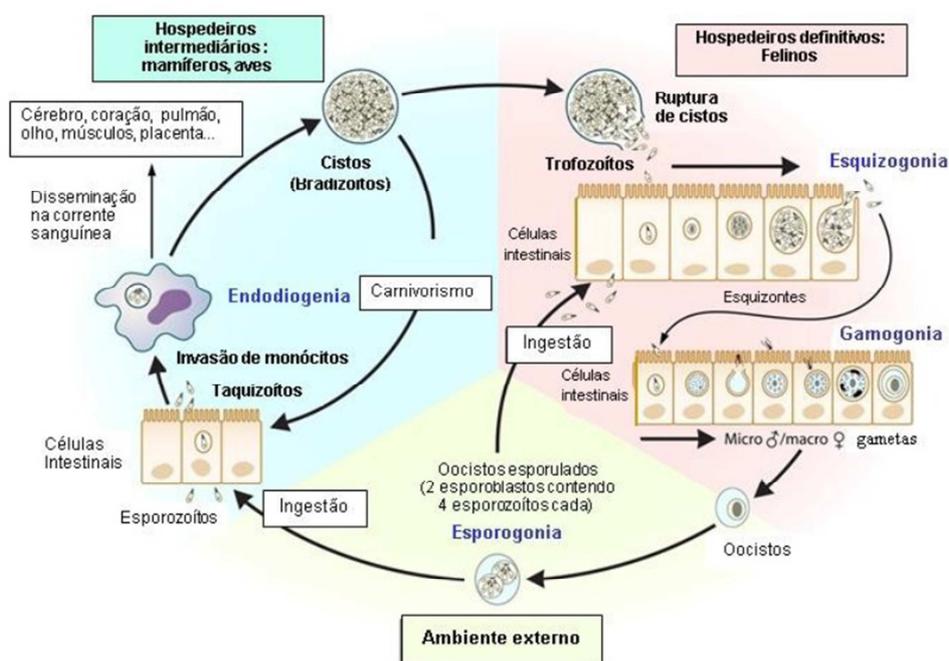


Figura 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. O complexo ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* intercala entre os hospedeiros definitivos, os felinos, e hospedeiros intermediários, demais animais de sangue quente. Nos

felinos ocorre a fase sexuada com a formação dos gametas, que após a fertilização culmina na liberação de oocistos que chegam ao ambiente pelas fezes do animal. No ambiente, estes oocistos são esporulados e a infecção dos hospedeiros intermediários ocorre através do consumo de água ou alimentos contaminados. Nos hospedeiros intermediários, incluindo o homem, os esporozoítos se diferenciam em taquizoítas, formas proliferativas que se disseminam através da corrente sanguínea para vários tecidos e órgãos do hospedeiro. Em virtude da pressão do sistema imune, estes taquizoítas se diferenciam em bradizoítas, formando cistos teciduais que podem permanecer latentes no hospedeiro (Adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.3 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença infecciosa e não contagiosa, que pode ser adquirida pela ingestão de carne crua ou malcozida, pela ingestão de oocistos presentes na água e alimentos contaminados, ou ainda de forma congênita por via transplacentária. Em indivíduos sadios ou imunocompetentes, na maioria das vezes a infecção pelo *T. gondii* é assintomática ou em menor extensão, causando sintomas leves, similares a um resfriado ou gripe. Por outro lado, em indivíduos imunocomprometidos, observa-se uma multiplicação rápida dos parasitas levando a necroses tissulares, sendo as lesões cerebrais, oculares e pulmonares as principais lesões observadas. Contudo, as manifestações clínicas vão depender do estado imune do indivíduo, variando desde encefalite, a manifestações do tipo psicose, ansiedade e transtornos motores ou de personalidade. Em casos de infecção congênita, quando a gestante é infectada entre a concepção e o sexto mês de gestação, a toxoplasmose pode ocasionar sintomas severos ao feto, como má formação, cegueira, lesões cerebrais, podendo levar inclusive ao aborto (DUBEY; JONES, 2008; HILL; DUBEY, 2014; LOUIS; DUBEY, 2009; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Nos Estados Unidos e Europa, a toxoplasmose é a causa mais comum de uveítes, ocorrendo a inflamação do coróide e da retina, podendo deixar cicatrizes retinocoroidais residuais. Essas lesões oculares resultam da infecção aguda ou da reativação dos parasitas nos cistos teciduais. Por muito tempo os cistos de bradizoítas foram considerados inofensivos e sem a capacidade de causar danos severos ao organismo. Atualmente, além da reativação, a própria presença desses cistos no sistema nervoso central tem sido associada a neuropatologias e distúrbios comportamentais, inclusive a esquizofrenia, uma vez que a infecção pelo *T. gondii* leva a alteração de processos neuronais, afetando estrutura e funções celulares (DUBEY; JONES, 2008; ELSHEIKHA; BUSSELBERG; ZHU, 2016; HILL; DUBEY, 2014; HOLLAND, 1999; HSU; GROER; BECKIE, 2014; MERRILL et al., 1996).

Estima-se que um quarto da população mundial se encontra atualmente infectada, sendo a América Latina e a África as regiões com maior prevalência, e a

América do Norte, a Ásia e a Europa as de menor prevalência. A variação da prevalência entre regiões está relacionada a fatores sociais, econômicos, culturais e climáticos. No Brasil, é possível observar uma incidência extremamente variável entre as regiões do país, alterando de 20 a 80% (LOUIS; DUBEY, 2009; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O tratamento da toxoplasmose é realizado preferencialmente com a associação dos fármacos sulfadiazina e pirimetamina, porém, esse tratamento é eficaz apenas na fase aguda da infecção, pois atinge apenas a forma taquizoíta. Uma vez que ocorre a diferenciação para bradizoíta com o encistamento do parasita, o tratamento não é mais eficaz, não havendo, portanto, cura para toxoplasmose até o momento (CHIRGWIN et al., 2002; GUERINA et al., 1994; HILL; DUBEY, 2014).

1.4 ORGANIZAÇÃO CELULAR

Todos os estágios de desenvolvimento do parasita apresentam uma morfologia similar, sendo que a forma taquizoíta é a melhor elucidada de *T. gondii*, devido à facilidade de obtenção *in vivo* e *in vitro*. Essa forma apresenta aproximadamente 2 µm de largura por 8 µm de comprimento, sendo formado pelo citoesqueleto e organelas eucarióticas comuns, como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, uma única mitocôndria, ribossomos e o núcleo. Além disso, *T. gondii* possui o complexo apical, que dá o nome ao filo e é constituído por organelas exclusivas de parasitas apicomplexas: as rôptrias, os micronemas e o conóide. Adicionalmente, há a presença do apicoplasto, e dos grânulos densos (BLACKMAN; BANNISTER, 2001; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

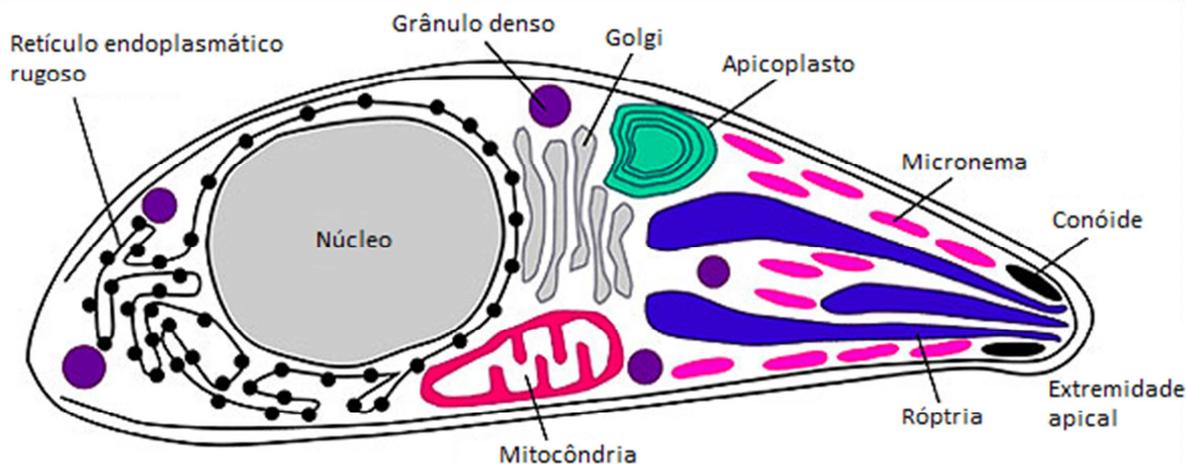


Figura 2. Ultraestrutura da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* apresenta organelas exclusivas de apicomplexas: o micronema, o conóide e as róptrias, todos situadas na extremidade apical do parasita, bem como, o apicoplasto, localizado próximo ao núcleo. Além disso, o parasita possui organelas eucarióticas, como o núcleo, o aparelho de Golgi, o retículo endoplasmático e uma única mitocôndria, além dos grânulos densos que atuam como organelas secretórias (Adaptado de AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001).

Na extremidade apical encontra-se o conóide, uma estrutura móvel, cilíndrica e oca formada por tubulina, que desempenha um papel mecânico na invasão da célula hospedeira. As róptrias e os micronemas são organelas que secretam proteínas necessárias para a motilidade, adesão e invasão das células hospedeiras, assim como para a formação do vacúolo parasitóforo. Finalmente, existem os grânulos densos que, dentro da classe das organelas secretoras, liberam proteínas após a entrada do parasita na célula hospedeira, auxiliando em diferentes etapas, inclusive a modulação da expressão gênica do hospedeiro (BOUGDOUR et al., 2013; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

O apicoplasto é uma organela única de Apicomplexas, mas que não está presente em todos os membros do filo. Possui origem endossimbiótica secundária e vias metabólicas próprias, como a síntese de ácidos graxos do tipo II, síntese de isoprenóides e síntese de heme. O apicoplasto também possui um DNA circular, presente em múltiplas cópias, realizando, portanto, sua própria síntese de DNA e de proteínas necessárias para sua manutenção (BLACKMAN; BANNISTER, 2001; MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

1.5 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA CROMATINA

A cromatina é composta por DNA e proteínas associadas, incluindo histonas. As histonas são responsáveis pelo primeiro nível de organização do DNA, formando a unidade básica da cromatina denominada nucleossomo. Este, é composto por

duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3, H4 ou histonas variantes), formando um octâmero de histonas envolto por cerca de 147 pb de DNA. Cada nucleossomo é estabilizado por uma cópia única da histona H1 ou histona-*linker* que auxilia na compactação da cromatina e aproxima os nucleossomos em cerca de 20 pb. Isso propicia um maior grau de compactação do DNA e auxilia na formação da fibra de cromatina de 30 nm. A ligação entre DNA e o cerne de histonas, ocorre através de ligações iônicas entre os grupos fosfatos do DNA e as cadeias laterais das histonas ricas em lisinas e argininas, que são altamente positivas. A estrutura do nucleossomo também é estabilizada por mais de 140 ligações de hidrogênio formadas entre DNA e as histonas (ALBERTS et al., 2010; KHORASANIZADEH, 2004; LUGER et al., 1997; MARIÑO-RAMÍREZ et al., 2005).

Dois diferentes níveis de compactação da cromatina são encontrados no núcleo: a heterocromatina e a eucromatina. A heterocromatina é a forma mais compactada e está relacionada ao silenciamento gênico, uma vez que a proximidade entre os nucleossomos dificulta o acesso ao DNA pelas maquinarias de transcrição. A eucromatina, por outro lado, é menos condensada e por isso está relacionada à transcrição ativa. No núcleo, a cromatina é organizada de um modo que a heterocromatina é distribuída preferencialmente na periferia, enquanto a eucromatina é distribuída mais ao centro, próxima ao nucléolo e as maquinarias de transcrição. Essa organização é altamente dinâmica, tanto que quando um gene passa a ser necessário, ocorre a descondensação da cromatina e o reposicionamento do gene para o centro do núcleo onde estão presentes as fábricas transcripcionais e os compartimentos de processamento de RNA (ALBERTS et al., 2010; THERIZOLS et al., 2014).

A estrutura da cromatina pode ser modulada através de interação com proteínas, incluindo fatores de transcrição e complexos remodeladores da cromatina, ou através de modificações pós traducionais (MPTs) em histonas (ALBERTS et al., 2010; CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012). Diversas MPTs já foram identificadas, entre elas acetilação, metilação de lisinas ou argininas, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, entre outras, e novas vem sido identificadas. As MPTs podem ocorrer em combinação ou em sequências específicas, fornecendo sítios de ligação a proteínas que reconhecem especificamente essas modificações, desencadeando ou bloqueando um determinado processo, ou ainda, alterar a arquitetura da cromatina, afetando os processos que dependem de DNA (ALBERTS et al., 2010; CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012).

1.6 HISTONAS E VARIANTES DE HISTONAS

Histonas são pequenas proteínas básicas, ricas em lisinas e argininas e que correspondem a cerca de 50% da massa total da cromatina na célula. São proteínas bastante conservadas, que apresentam caracteristicamente um domínio globular e regiões flexíveis nas porções N- e C-terminais e têm sido alvo de estudos graças ao seu envolvimento em diversos processos celulares, principalmente na regulação da expressão gênica. Além das histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4), há as variantes de histonas, que podem apresentar desde poucos aminoácidos de diferença na sequência, até a presença de domínios adicionais, e a substituição de histonas canônicas por suas variantes, pode alterar a interação entre as proteínas e a estrutura da cromatina, devido à alteração das propriedades bioquímicas do nucleossomo (KHORASANIZADEH, 2004; LUGER et al., 1997; MARIÑO-RAMÍREZ et al., 2005; TALBERT; HENIKOFF, 2010).

Histonas H3 e H4

A histona H4 é a mais conservada evolutivamente das histonas, e possui maior interação com as outras histonas no octâmero. Não há evidências de variantes para essa histona em eucariotos superiores, apenas em protozoários (tripanossomatídeos) e em alguns organismos do subfilo urochordata. Em *T. brucei*, a H4v está enriquecida nos sítios de terminação da transcrição (BUSCHBECK; HAKE, 2017; MOOSMANN et al., 2011; SIEGEL et al., 2009).

Já a histona H3 apresenta algumas variantes, como a CENP-A, a mais divergente das variantes de histonas H3 e que está associada a regiões centroméricas em diversos organismos. As variantes H3.1, H3.2 e H3.3 diferem em apenas alguns aminoácidos, mas possuem funções distintas. Enquanto que H3.1 e H3.2 estão relacionadas com a replicação, H3.3 está associada a sítios de transcrição ativa (AHMAD; HENIKOFF, 2002; LOYOLA, 2007; MALIK; HENIKOFF, 2003; MARIÑO-RAMÍREZ et al., 2005).

Histonas H2A e H2B

A histona H2A é a que possui o maior número de variantes entre as histonas do *core*, que se destacam principalmente por possuir uma cauda C-terminal divergente. A variante encontrada em mamíferos, H2A.Z, apresenta 59% de identidade com a H2A canônica e está envolvida em diferentes processos distintos,

podendo atuar tanto na ativação como no silenciamento gênico, compactação da cromatina e viabilidade celular. A variante H2ABbd possui a cauda C-terminal truncada e está localizada em regiões de cromatina transcricionalmente ativa, devido à instabilidade no nucleossomo causado pela sua presença. Outra variante, macroH2A, é específica de vertebrados, encontrada na cromatina de cromossomos X inativos e possui um macro domínio característico. Já H2A.X possui uma porção C-terminal única, com sítios de fosforilação associados ao reparo de DNA por recombinação homóloga em diferentes organismos.

Outras variantes já foram descritas para H2B, porém, são menos frequentes, possuem mínimas variações e aparentemente não causam alterações estruturais na cromatina (BONENFANT et al., 2006; KHORASANIZADEH, 2004; MARIÑO-RAMÍREZ et al., 2005; MOLDEN et al., 2015; PUSARLA; BHARGAVA, 2005).

HISTONA H1

A histona H1 compreende a família que contém mais variantes e a menos conservada entre as histonas. Em humanos, por exemplo, há 11 variantes para histona H1, sendo seis delas tecido-específicas. Em geral, elas apresentam um domínio globular característico, formado por três alfa-hélices e uma folha beta, que é flanqueado por regiões flexíveis, representadas tipicamente por um pequeno N-terminal e um grande C-terminal. O domínio globular é o responsável pelo contato nas regiões de entrada e saída do DNA no nucleossomo, protegendo cerca de 20 pb de DNA contra a ação de nucleases. Contudo, são as porções flexíveis as responsáveis pela maior compactação da cromatina, principalmente por intermediar o contato com histonas de nucleossomos adjacentes, sendo a porção C-terminal a principal responsável pela estabilidade da fibra de 30 nm. Entretanto, a estrutura das histonas H1 varia em vários organismos, sendo que há histonas com dois domínios globulares e outras sem domínio algum, como é o caso da Hho1p, a histona-*linker* de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), e a H1 de *Tetrahymena*, respectivamente, sendo esta última correspondendo apenas ao equivalente do domínio C-terminal de metazoário. A comparação entre as sequências das proteínas histona H1 homólogas de *S. cerevisiae* e de *Homo sapiens* apresenta apenas 31% de identidade e 44% de similaridade, enquanto que as histonas mais conservadas, como a histona H4, possuem 92% de identidade e 96% de similaridade entre as proteínas homólogas destas espécies (HARSHMAN et al., 2013; IZZO; KAMIENIARZ; SCHNEIDER, 2008; LANDSMAN, 1996).

A histona H1 está sujeita a modificações pós traducionais assim como as outras histonas, afetando a compactação da cromatina e regulando a expressão de diversos genes em vários organismos. Dentre as MPTs, a fosforilação, metilação, acetilação e ubiquitinação são as mais descritas para esta histona (IZZO; SCHNEIDER, 2015).

Em geral, o nocaute das histonas é algo inviável, devido à essencialidade dessas proteínas. Por outro lado, embora a histona H1 participe de diversos processos DNA-dependente, em geral ela não é essencial à sobrevivência dos organismos. Acreditava-se que a H1 desempenhava um papel apenas estrutural, auxiliando na maior compactação da cromatina, e que sua deleção levaria a um aumento generalizado na expressão gênica, o que de fato não ocorreu para os organismos analisados. Observou-se de fato uma alteração na estrutura da cromatina, mas que não foi suficiente para uma alteração global na expressão gênica. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, o nocaute da H1 causou efeitos na expressão de genes específicos e inibição do reparo de DNA, enquanto que em *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), causou alteração na formação da heterocromatina. Ainda em *D. melanogaster*, foi verificada a ausência de H1 nas regiões promotoras de genes ativos, o que poderia explicar a regulação somente de alguns genes. No protozoário *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), a H1 está envolvida na condensação da cromatina e regulação de genes transcritos pela RNA polimerase I, além de desempenhar papel no reparo de DNA. Já em *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), o papel desta histona não está claro, mas parece estar relacionada com a organização da cromatina no nucléolo, sendo também modulada no ciclo celular por fosforilação (DOWNS et al., 2003; GUTUYAMA; CHAGAS DA CUNHA; SCHENKMAN, 2008; HELLAUER; SIRARD; TURCOTTE, 2001; LU et al., 2009; PENA et al., 2014).

1.7 HISTONAS DE *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* apresenta as histonas canônicas H3, H4 e H2A em cópia única, enquanto que a H2B apresenta duas isoformas: H2Ba presente na forma taquizoíta e H2Bb presente na fase sexuada do ciclo do parasita. Assim como nos demais organismos, as histonas H3 e H4 são mais conservadas e possuem identidade em torno de 90-95% com as respectivas histonas de humanos. Por outro lado, H2A e H2B são mais divergentes apresentando identidade em torno de 75-79%, com maior divergência na porção N-terminal. Até o momento, a histona H1 não foi descrita em

T. gondii (BOGADO et al., 2014; BROOKS et al., 2011; DALMASSO et al., 2009; NARDELLI et al., 2013).

Cinco histonas variantes também estão presentes em *T. gondii*, sendo elas: H3 centromérica (CenH3), H3.3, H2A.X, H2A.Z e uma variante exclusiva de protozoários, a H2Bv. A variante CenH3 possui função conservada como histona centromérica. Sabe-se que há interação entre H2A.Z e H2Bv e que estão localizadas em sítios de início de transcrição, enquanto que a variante H2A.X está relacionada com silenciamento gênico e reparo de DNA (BOGADO et al., 2014; BROOKS et al., 2011; DALMASSO et al., 2009; NARDELLI et al., 2013).

Assim como nos demais organismos, as histonas e variantes de *T. gondii*, estão sujeitas a diversas modificações pós-traducionais. Algumas modificações já foram identificadas e muitas delas são conservadas com outros eucariotos. Dentre as enzimas responsáveis por essas modificações, poucas foram caracterizadas, mas o parasita apresenta um amplo repertório dessas proteínas, sugerindo uma complexa regulação epigenética (DIXON et al., 2010; NARDELLI et al., 2013).

1.8 JUSTIFICATIVA

As histonas e suas modificações pós traducionais regulam principalmente a alternância do nível de compactação da cromatina. *T. gondii* possui as quatro histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4), mas até o momento a quinta histona, H1, não foi identificada. Em outros eucariotos, a H1, ou histona-*linker*, auxilia na compactação e não se sabe as consequências que sua ausência representaria na compactação da cromatina em *T. gondii*. No entanto, identificamos uma pequena e básica proteína de aproximadamente 9 kDa, a qual denominamos TgH1-*like*, muito similar a H1-*like* de *Kinetoplastidae* e com similaridade apenas com a porção C-terminal da H1 de eucariotos superiores. Esta proteína será o foco deste estudo, onde pretendemos avaliar se tal proteína trata-se de uma histona-*linker* em *Toxoplasma gondii*.

2. OBJETIVO

Avaliar a presença de uma histona-*linker* em *Toxoplasma gondii*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a sequência de TgH1-*like* com ferramentas de bioinformática e análise estrutural *in silico*;
2. Determinar a localização celular da TgH1-*like* através de microscopia de imunofluorescência;
3. Analisar a função da proteína através de nocaute gênico de TgH1-*like*;
4. Analisar as proteínas que interagem com a proteína TgH1-*like*;
5. Determinar a associação de TgH1-*like* à cromatina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA SEQUÊNCIA DE *tgh1-like*

O banco de dados de *Toxoplasma* (toxodb.org- versão 27) foi utilizado para obtenção de dados da proteína em estudo (ID: TGME49_315570), como sequência de nucleotídeos e aminoácidos, peso molecular e localização cromossômica. Os dados de sequenciamento da cepa ME49 (tipo II) foram utilizados, por apresentar os melhores dados de anotação. Até o momento, a proteína de nosso interesse, a qual denominamos TgH1-*like*, está anotada no banco de dados como proteína hipotética.

Para análise de alinhamento de sequência, utilizamos o algoritmo Clustal Omega (disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os alinhamentos foram realizados entre a histona H1 de humanos (GenBank: AAN06699.1) e a proteína hipotética de *T. gondii*, e entre a H1 de *T. brucei* (GenBank: CAB76182.1) e a proteína hipotética em estudo.

3.2 ANÁLISE ESTRUTURAL *in silico*

Para a predição da estrutura terciária da proteína, utilizou-se o método de modelagem por homologia, onde a construção de modelos é baseada na estrutura tridimensional de proteínas homólogas. Foi realizado uma busca por modelos experimentais similares baseado na estrutura secundária de forma remota pelo servidor HHpred – *Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison* - Detecção de Homologia e predição de estrutura por comparação utilizando modelos escondidos de Markov (disponível em: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) , que permite busca em vários bancos de dados de proteínas (SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005). A estrutura obtida com maior identidade foi escolhida como molde para modelagem realizada no software Modeller (disponível em: <https://salilab.org/modeller/>).

A partir do modelo obtido, foi calculado o potencial eletrostático da proteína utilizando o servidor PBEQ Solver (disponível em: <http://www.charmm-gui.org/?doc=input/pbeqsolver>), que utiliza as constantes eletrostáticas de Poisson-Boltzmann para estimar a energia de solvatação eletrostática de um soluto, no caso, a proteína em questão (JO et al., 2008) e visualizado no *software* PyMol (disponível em: <https://www.pymol.org/>). Além disso, utilizamos o servidor ProFUNC (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/ProFunc/>), que utiliza a estrutura terciária para analisar a possível função da proteína (LASKOWSKI; WATSON; THORNTON, 2005).

3.3 CULTIVO DE *Toxoplasma gondii*

Neste trabalho, foi utilizada a cepa RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 8 0$. A cepa RH é uma cepa do tipo I, com características como alta taxa de virulência e baixa taxa de diferenciação para bradizoítas. A cepa utilizada possui nocaute para o gene *hxgprt* (*hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyltransferase* – Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase), utilizado como marcador de seleção posteriormente, e nocaute para o gene *ku80*, um gene fundamental para o funcionamento da via de reparo por recombinação não homóloga (NHEJ- *Nonhomologous end joining*).

Formas taquizoítas de *T. gondii* foram utilizadas para infectar células HFF (*Human Foreskin Fibroblast* – Fibroblasto de prepúcio humano), numa razão de 3 a 5 parasitas por célula, em meio DMEM (*Dulbecco's Modification of Minimum Essential Media*) com adição de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina e 100 µg/mL de penicilina/streptomicina, e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

3.4 ETIQUETAMENTO DO GENE

3.4.1 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico de *T. gondii* cepa RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 8 0$, foram utilizados 3×10^7 taquizoítas recém lisados, que foram centrifugados a 600 x g por 10 minutos, seguido de duas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS 1X – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄), nas mesmas condições de centrifugação. A lise dos parasitas foi realizada com 500 µL de tampão TELT (50 mM de Tris-HCl; 62,5 mM de EDTA; 2,5 M de LiCl, 4% Triton X-100), que foram homogeneizados por inversão e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 300 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1) e centrifugado por 5 minutos a 15.700 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 2 volumes de etanol absoluto seguido de centrifugação por 10 minutos a 15.700 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente por 10 minutos a 15.700 x g. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco a 50°C em Termomixer comfort (Eppendorf) e ressuscendido em 50 µL de água ultrapura e 20 µg/mL de RNase A, conforme descrito por Sambrook e Russel, 2001.

3.4.2 Síntese dos oligonucleotídeos para o etiquetamento

Para o etiquetamento da proteína endógena foi utilizada a estratégia de substituir por recombinação, a porção final do gene de interesse. Para tanto foi necessário à amplificação de cerca de 1.000 pares de base (pb) da porção final do gene *tgh1-like*, excluindo o códon de terminação. Esse fragmento gênico foi clonado em vetor pLIC.HA.HXGPRT, que adicionou uma etiqueta de 3X HA (hemaglutinina do vírus influenza) na porção C-terminal da proteína. Para o desenho dos oligonucleotídeos, ou também chamado *primers*, utilizamos os dados de sequenciamento da cepa ME49 no banco de dados de *T. gondii* (toxodb.org) (HUYNH; CARRUTHERS, 2009; SZOSTAK et al., 1983).

Dados da literatura indicam que quando o vetor é linearizado no centro do inserto anteriormente a transfecção, formando porções de no mínimo 300 pb, a eficiência de recombinação aumenta de 10 a 1.000 vezes (HUYNH; CARRUTHERS, 2009; SZOSTAK et al., 1983). Dessa forma, buscou-se uma região que possuísse sítio único de restrição no centro do inserto através do software SerialCloner (disponível em: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) e alternativamente utilizamos o software SnapGene (disponível em: <http://www.snapgene.com/>). Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa Custom Primers – OligoPerfect Designer da Thermo Fischer Scientific (disponível em: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools/oligoperfect.html>). Aos oligonucleotídeos foi adicionado a sequência complementar ao vetor denominada LIC (*Ligation Independent Cloning*), necessária para estratégia de clonagem independente de ligação (em negrito na tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene de *tgh1-like*. As sequências LIC encontram-se destacadas em negrito.

Nome	Sequência
TgH1- <i>like</i> Primer F	5' TACTTCCAATCCAATTTAATGCGT GTGCGCACGAAGGAAATTC 3'
TgH1- <i>like</i> Primer R	5' TCCTC CACTTCCAATTTTAGCTTTTCTTGCCCTTGCCCTT 3'

3.4.3 Amplificação do gene

A região de interesse foi amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) com a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e foi utilizado como molde o DNA genômico extraído da

cepa RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 8 0$. Para a reação foi adicionado: 1X do tampão fornecido pelo fabricante, 2 mM de $MgSO_4$, 0,2 mM de cada dNTP, 10 μ mol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 100 ng do DNA genômico e 1 U da enzima. Foi utilizada a temperatura de 94°C por 5 minutos na etapa de desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 68°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão do fragmento, seguido da extensão final a 68°C por 7 minutos.

Em casos que não era necessário a alta fidelidade de amplificação, como nos casos de confirmação da clonagem, foi utilizada para amplificação, a enzima *Taq DNA polimerase* recombinante (Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP). Na reação foi adicionado 1X do tampão da enzima, 10 μ mol de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 150 μ M de $MgCl_2$ e 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* recombinante. Para desnaturação inicial do DNA foi utilizada a temperatura de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos de desnaturação, 56°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e 72°C por 7 minutos para extensão final.

3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para confirmação da amplificação do gene no tamanho correto, o produto da reação de PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 1 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 1X (89 mM de Tris Base; 89 mM ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,3). Foi submetido à eletroforese, 5 μ L da reação de PCR em tampão de amostra para DNA 1X (25% de Ficoll; 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) e como padrão de massa molecular foi utilizado o marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). O gel de agarose foi submetido a um campo elétrico de 100 volts por 1 hora, e após, incubado em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL e visualizado em transluminador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia) para visualização do perfil eletroforético da amostra. Alternativamente, foi utilizado o corante de ácidos nucleicos GelRedTM (Biotium) em concentração final de 1X (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2001).

3.4.5 Purificação da PCR

Depois de confirmado em gel de agarose, o produto da PCR foi purificado através do kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), conforme orientação do

fabricante. Para quantificar o rendimento da purificação, foi utilizado o sistema NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

3.4.6 Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT

A clonagem foi realizada em vetor pLIC.HA.HXGPRT, um vetor que permite clonagem independente de ligação (LIC), pois possui sequencias LIC, complementares as adicionadas aos *primers* do gene de interesse. A ligação baseia-se na atividade 3' – 5' exonuclease da enzima T4 DNA polimerase que gera porções complementares entre o inserto e o vetor e dessa forma, o anelamento entre inserto e vetor ocorre por complementaridade de sequências, resultando em uma alta eficiência de clonagem, conforme dados da literatura (HUYNH; CARRUTHERS, 2009). O vetor possui ainda, genes para seleção bacteriana (Ampicilina) e no parasita (*hxgprt*), e a etiqueta de HA repetida três vezes conforme mostrado na figura 3.

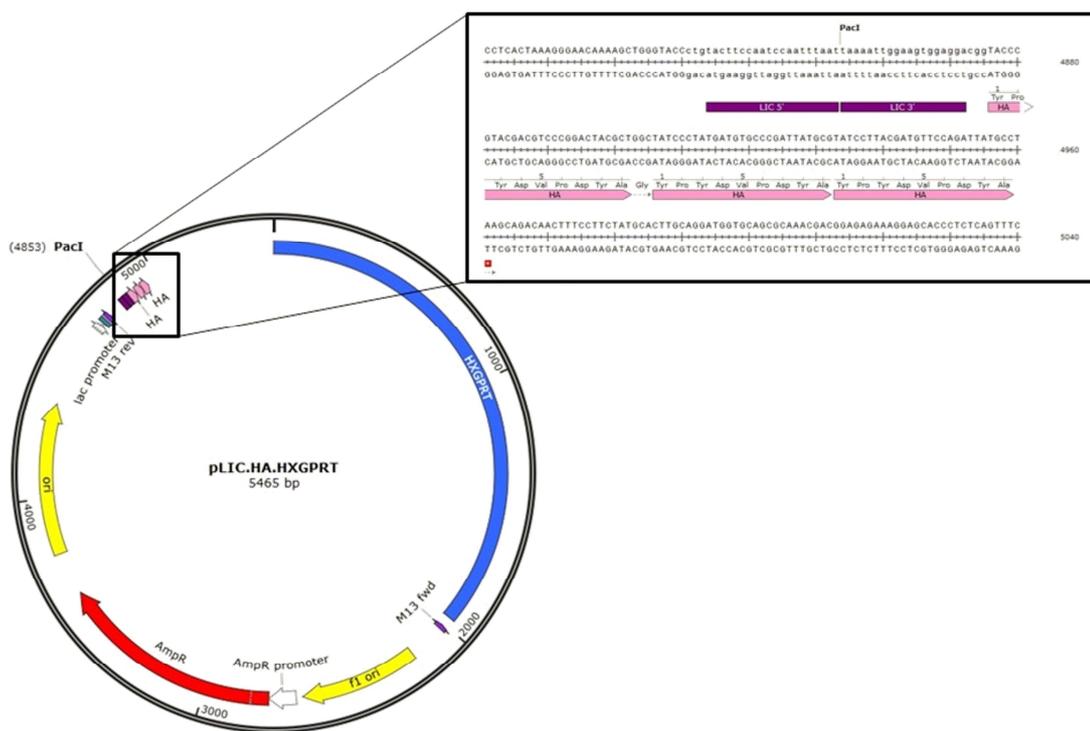


Figura 3. Vetor pLIC.HA.HXGPRT. Vetor contendo os genes de seleção HXGPRT em azul e ampicilina, AmpR, em vermelho. Em amarelo as origens de replicação, em roxo as sequências LIC 5' e 3' e em rosa as etiquetas de HA. Em destaque, as sequências LIC com sítio de restrição para PACI e as 3 sequências em *tandem* da etiqueta de HA. Fonte: A autora. Realizado no software SnapGene.

Primeiramente, 2 µg do vetor foram linearizados com a enzima *PacI* (New England Biolabs), onde 2 U da enzima e 1X do tampão específico foram incubados por 2 horas à 37°C. Após, vetor linearizado e inserto foram tratados com a enzima

T4 DNA polimerase (Novagen LIC qualified), onde para a reação de 60 μ L do vetor foram adicionados: 1X do tampão para *T4 DNA polimerase*, 5 mM de dithiothreitol (DTT), 4 mM de dGTP e 1 U da enzima *T4 DNA polimerase*. Para o inserto, em uma reação de 20 μ L e de composição similar foi adicionado dCTP ao invés de dGTP. As reações foram incubadas por 30 minutos à 22°C seguido de 20 minutos à 75°C. Para a ligação entre vetor e inserto (figura 4), foram incubados 1 μ L do vetor e 5 μ L do inserto por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 1 μ L de EDTA 25 mM e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente.

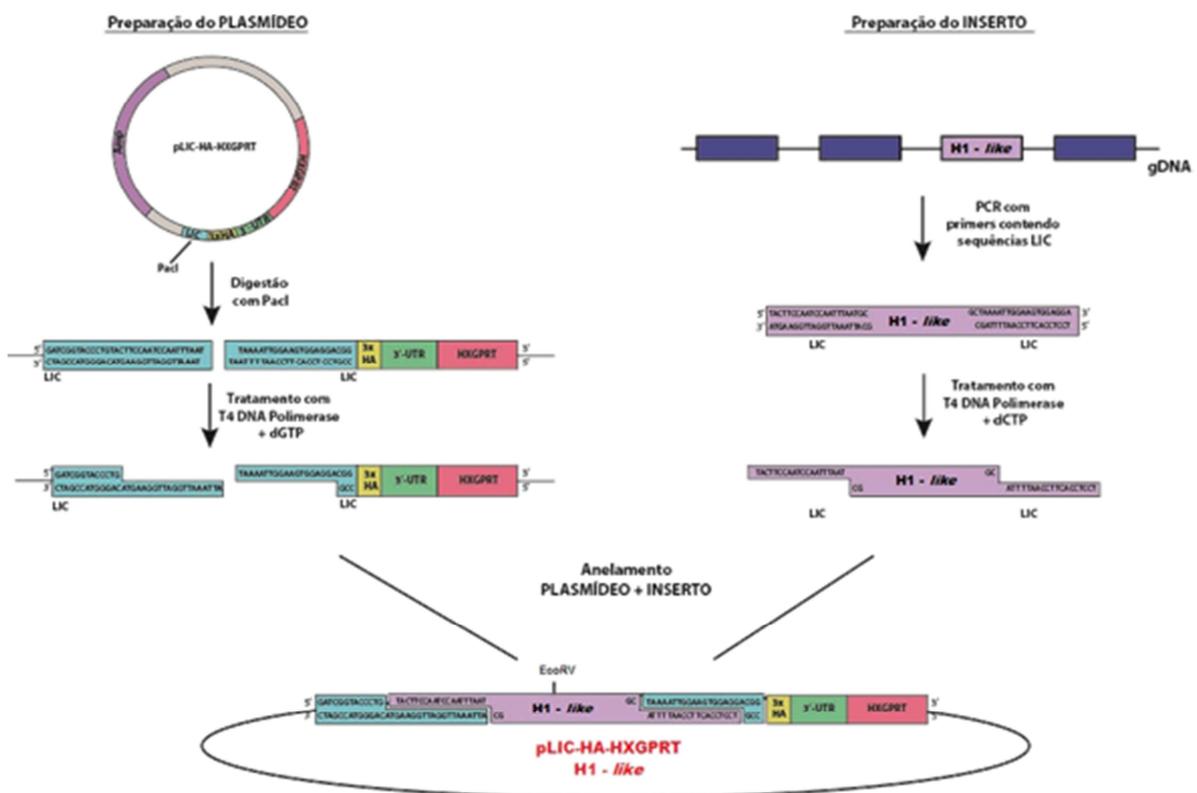


Figura 4. Representação da clonagem independente de ligação (LIC). Esquema da metodologia de clonagem pelo sistema LIC onde inserto e vetor são tratados com a enzima *T4 DNA polimerase* que forma porções complementares através da sua atividade 3' \rightarrow 5' exonuclease. Essas porções complementares permitem que após o tratamento, plasmídeo e inserto sejam anelados por complementariedade. Fonte: A autora.

3.4.7 Transformação bacteriana

A transformação dos plasmídeos foi realizada em bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α cálcio-competentes pelo método de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2001). Sete microlitros de plasmídeos foram adicionados a 50 μ L de bactérias e incubados por 30 minutos no gelo, seguida de incubação por 2 minutos à 42°C e 2 minutos novamente no gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani: triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) sem antibióticos e incubado por 1 hora à 37°C sob agitação para recuperação das bactérias. Decorrido

esse período, as bactérias foram semeadas em placa com LB contendo 100 µg/mL de ampicilina.

3.4.8 Seleção dos clones positivos por PCR de colônia

Para verificar a presença do plasmídeo com o inserto de tamanho correto, realizamos uma PCR de colônia, utilizando os mesmos *primers* utilizados na amplificação do gene de interesse. A colônia bacteriana foi adicionada em um tubo contendo os componentes para a reação de PCR utilizando a *Taq DNA polimerase* recombinante (IBMP), de modo que a lise bacteriana e desnaturação do DNA são realizadas no próprio termociclador, em altas temperaturas. Os componentes da reação de PCR e condições para amplificação foram feitos conforme descrito no item 3.4.3. As colônias selecionadas foram semeadas em paralelo, em outra placa para estoque (placa-mãe) e os produtos da PCR de colônias analisadas em gel de agarose conforme descrito em 3.4.4.

Os clones positivos selecionados foram expandidos em meio LB com 100 µg/mL de ampicilina, por 12h à 37°C e os plasmídeos purificados pelo método de extração plasmidial por lise alcalina segundo Sambrook e Russel, 2001, ou alternativamente, utilizando o kit comercial de minipreparação plasmidial (QIAprep Spin Miniprep Kit-Qiagen). Os clones foram enviados para sequenciamento na empresa Magrogen (<http://foreign.macrogen.co.kr/eng/>).

3.4.9 Confirmação dos clones positivos por digestão enzimática

Ainda para confirmação dos clones positivos, utilizando o programa SnapGene, realizamos um mapa de restrição, especialmente para verificar se o inserto está na posição correta no vetor. As enzimas de restrição selecionadas contêm sítios únicos nos clones obtidos, sendo que a *EcoRV* corta uma única vez dentro do inserto, combinada separadamente com *HindIII*, *NotI*, *XhoI*, que cortam apenas uma vez dentro do vetor como mostrado na figura 5 (todas as enzimas foram fornecidas por *New England Biolabs*).

Para a reação enzimática, foi utilizado 0,5 µg de DNA com adição de 0,5 U de cada enzima e 1X do seu tampão específico. A reação foi incubada por 2 horas à 37°C e aplicado em gel de agarose para análise da digestão enzimática.

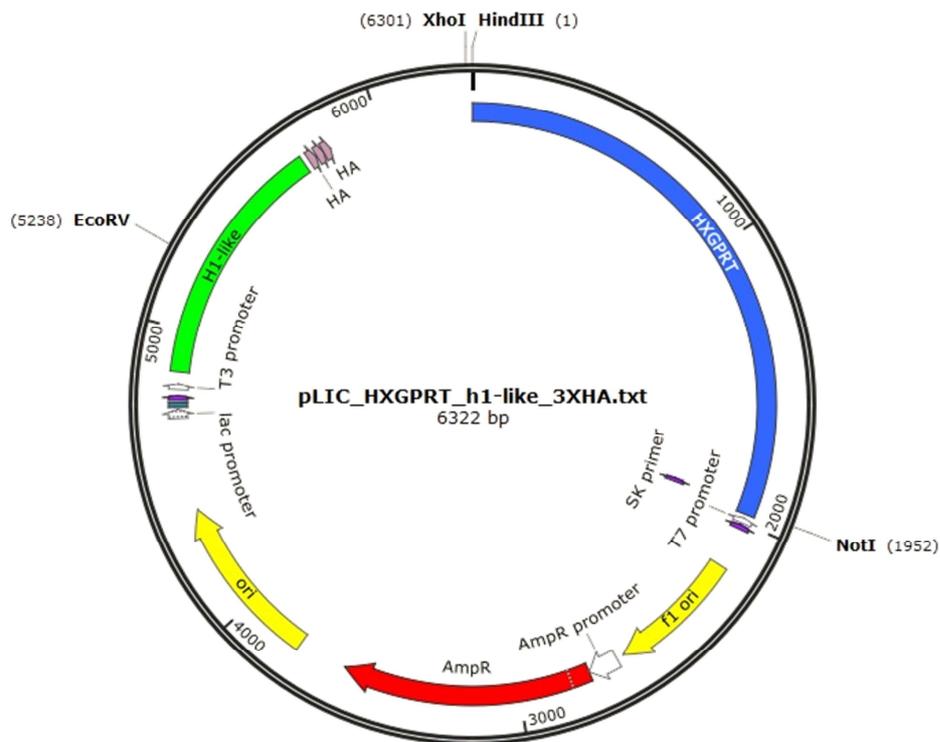


Figura 5. Mapa do vetor pLIC.HXGPRT.h1-like.3XHA com as enzimas selecionadas. O mapa do vetor mostra a enzima *EcoRV* que corta dentro do inserto e as enzimas com sítio único de restrição no vetor, *HindIII*, *NotI* e *XhoI*. Mapa realizado no programa Snappgene. Fonte: A autora.

3.4.10 Transfecção

Para realização da transfecção, o plasmídeo foi linearizado com a enzima *EcoRV* (*New England Biolabs*), que corta no meio do inserto. Para tal reação, foi adicionado 10 µg de DNA, 10 U da enzima e 1X do tampão específico. A reação ocorreu à 37°C por 12 horas.

Aproximadamente 5 µg de plasmídeos linearizados foram precipitados adicionando 2 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e armazenado à -20°C durante a noite para precipitação.

Um total de 10^7 parasitas (taquizoítas) da cepa RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$, recém-saídos da célula hospedeira, foram utilizados para cada transfecção. Os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 500 x g à 4°C e lavado 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). Os parasitas foram ressuspensos em 100 µL de Cytomix com adição de 2 mM de ATP e esta solução, foi misturada ao DNA precipitado anteriormente. A transfecção foi realizada por eletroporação com eletroporador Nucleofector II (Amxa Lonza), utilizando o programa T16 em pulso único, em cubetas específicas do aparelho (Nucleofector® Cuvette-gap de 4 mm) em um volume total de 100 µL (UPADHYA et al., 2011).

Após a eletroporação, os parasitas foram colocados em placas de 6 poços, contendo células HFF confluentes em meio DMEM e mantidos em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

Após 24 horas, foram adicionados à cultura 25 mg/mL de ácido micofenólico (Sigma-Aldrich) e 50 mg/mL de xantina, para a seleção dos parasitas com o marcador HXGPRT. O *T. gondii* possui duas vias para a síntese de purinas: a via pela enzima adenosina quinase (AK) e a via por HXGPRT. O ácido micofenólico é um inibidor da via por AK e a xantina é substrato para a via por HXGPRT. O parasita utilizado para a transfecção é nocaute para o gene *hxgprt*, sendo a via pela AK, a única forma de síntese de purinas nesses parasitas, porém, devido à inibição dessa via pelo ácido micofenólico, apenas os parasitas onde houve a inserção do vetor contendo o gene para HXGPRT, e conseqüentemente a reativação dessa via, sobrevivem (CHAUDHARY et al., 2004; DONALD et al., 1996).

Foram utilizados parasitas da cepa RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$ como controle sofrendo apenas o processo de eletroporação, mas sem a adição do plasmídeo. Estes foram mantidos nas mesmas condições que os parasitas transfectantes e após o período de seleção, que levou em torno de duas semanas foi possível verificar a completa morte dos parasitas controles.

3.5 ANÁLISE DOS TRANSFECTANTES

3.5.1 Preparação dos extratos proteicos

Para preparação dos extratos proteicos, foi utilizado o conteúdo de um poço onde todos os parasitas haviam egressado recentemente das células hospedeiras. Após centrifugação por 10 minutos à 4°C, a 500 x g, o precipitado contendo os parasitas foi lavado com PBS 1X, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspendido em tampão de amostra para proteínas (40 mM de Tris-HCl; 1% de SDS; 2,5% de β -mercaptoetanol 14,7 M; 6% glicerol; 0,005% de azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos à 95°C, misturadas vigorosamente e centrifugadas por 1 minuto à velocidade máxima (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2001).

3.5.2 Western blot

Os extratos proteicos foram submetidos à corrida em gel desnaturante SDS-PAGE 15% para separação das proteínas de acordo com o tamanho (LAEMMLI, 1970), e como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de proteínas

BenchMark pré-corado (Invitrogen). A corrida foi realizada em tampão SDS-PAGE 1X (25 mM Tris base, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS) a 25 mA. Após, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Optitran BA-S 85 Nitrocellulose Membrane 0,45 µm, GE Healthcare) no sistema de transferência semi-seco Trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-rad), por 1 hora a 20 v. Para visualização das bandas correspondentes as proteínas, a membrana foi corada com 0,5% de Ponceau S e 1% de ácido acético. A membrana foi então descorada em água destilada e bloqueada com solução de leite em pó desnatado Molico 5%, em PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação. Decorrido esse período, a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal anti-HA de rato, na diluição 1:500 (Clone 3F10-Roche) por 1 hora sob agitação, em PBS 1X e em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos cada, em solução de PBS 1X com 0,05% de Tween-20. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-rato conjugado a fosfatase alcalina (1:1.000, Sigma) seguida de duas lavagens com PBS 1X com 0,05% de Tween-20 e uma vez por 10 minutos com PBS 1X.

Para revelação, foi preparada a solução contendo 5 mL de tampão de revelação (100 mM de Tris-HCl pH 9,0; 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂), 33 µL de NBT (nitro blue tetrazolium) e 16,5 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). Essa solução de revelação foi adicionada sobre a membrana, e foi incubada aproximadamente 15 minutos sob agitação e protegida da luz. A reação foi parada com a submersão da membrana em solução de EDTA 0,5 M.

Alternativamente, foi utilizado o anticorpo secundário anti-rato conjugado a peroxidase (1:10.000) e seguida a reação nas mesmas condições. Para revelação, foi utilizado o kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) conforme recomendações do fabricante. Para visualização da revelação foi utilizado o foto documentador de membranas L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia).

3.5.3 PCR para confirmação da etiqueta

Para confirmação da correta inserção da etiqueta na porção final do gene de interesse, foram sintetizados oligonucleotídeos mostrados na tabela 2.

Utilizando o DNA genômico dos transfectantes extraído conforme o item 3.4.1, foi realizada a amplificação por PCR com a enzima *Taq DNA polimerase* recombinante (IBMP) conforme item 3.4.3. Utilizamos os oligonucleotídeos HA-F e HA-R para verificar a presença da etiqueta de HA, e os oligonucleotídeos HA-INT-R

(que anela na porção interna da etiqueta) e TgH1-*like* Primer F (tabela 1- utilizado anteriormente na amplificação do gene), para verificar a correta inserção da etiqueta.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da etiqueta.

Nome	Sequência
HA-F	5' TACGACGTCCCGGACTACG 3'
HA-R	5' AAGCTTATCGATACCGTCG 3'
HA-INT-R	5' GCATAATCGGGCACATCATAG 3'

3.5.4 Tratamento do extrato proteico com DTT

Extratos proteicos dos parasitas transfectantes obtidos conforme item 3.5.1, foram tratados com diferentes concentrações do agente redutor DTT para verificar a possível formação de dímeros ou complexos muito estáveis. As concentrações de DTT utilizadas foram 5, 10 e 20 mM.

3.5.5 Imunofluorescência indireta

Células HFF foram crescidas previamente em lamínulas, adicionadas em placa de 24 poços e assim que confluentes, foram infectadas com 5×10^6 parasitas. Após 24 horas, foi retirado o meio de cultura, as células lavadas cuidadosamente com PBS 1X por 3 vezes, e em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1X por 20 minutos. Depois de fixadas, as células foram lavadas novamente com PBS 1X por 3 vezes e permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,25% por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS 1X e realizado o bloqueio em solução contendo 1% de BSA e 0,2% de Triton X-100 em PBS 1X por uma hora sob agitação. As células foram então incubadas com anticorpo primário anti-HA de rato (Roche) na diluição 1:500 por 1 hora em solução de bloqueio, e na sequência, lavadas com PBS 1X por 3 vezes. As células foram então incubadas com anticorpo secundário anti-rato conjugado com Alexa-Fluor 488 (Sigma) na diluição 1:600 em PBS 1X e 10 μ M de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), por 1 hora sob agitação e protegido da luz. Após lavagem com PBS 1X por 3 vezes, as lâminas foram montadas com a adição de N-propil galacto, para preservação da fluorescência. Para análise, foi utilizado microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000 B associado a *software* de deconvolução (Leica AF6000).

3.5.6 Clonagem dos transfectantes

Após confirmação da população de transfectantes, os parasitas foram contados e clonados pelo método de diluição seriada até concentração final de 1 parasita por poço, em placas de 96 poços contendo células HFF confluentes. As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂. Os clones foram novamente confirmados por PCR e passamos a chamá-los de TgH1-*like*-HA.

3.6 NOCAUTE DE *tgH1-like*

Para o nocaute de *tgH1-like* optamos pela metodologia clássica, que envolve a amplificação de cerca de 2.000 pb das porções não traduzidas (UTR – *Untranslated region*) que flanqueiam o gene de interesse e fusão dessas regiões ao gene de seleção *hxgprt*. Esse fragmento foi então transfectado em parasitas da cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80* que por recombinação homóloga substitui o gene *tgH1-like* pelo gene de seleção *hxgprt* conforme mostrado na figura 6 (HUYNH; CARRUTHERS, 2009).

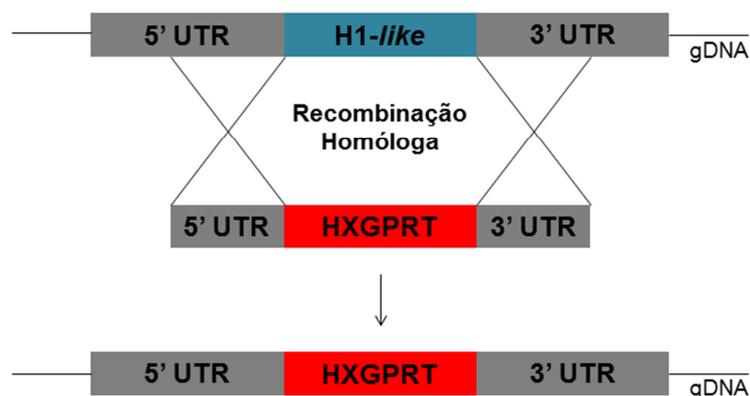


Figura 6. Representação da metodologia para nocaute de *tgH1-like*. As regiões 3' e 5'-UTR do gene *tgH1-like* foram fusionadas ao gene *hxgprt*. Após transfecção do cassete, o gene *tgH1-like* é substituído pelo gene de seleção *hxgprt* no genoma do parasita, através da recombinação homóloga. Fonte: A autora.

3.6.1 Amplificação das porções 5' e 3' UTRs

Para amplificação das porções 5' e 3' UTRs foram desenhados os oligonucleotídeos mostrados na tabela 3. Para anelamento no gene de seleção, foi necessário adicionar sequências complementares a *hxgprt* aos oligonucleotídeos *reverse* da região 5' e *forward* da região 3'.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das porções 5' e 3' UTRs de *tgh1-like*. Destaque em negrito para as sequências para anelamento no gene de seleção.

Nome	Sequência
5' F	5' ACGGCGATGTCGGAGG 3'
5' R	5' CCGCGGGCGGGTTTGAATGCAAGGTTTCGTGCTG TGTGGAGGACTTGGAGGG 3'
3' F	5' GTTCTGGCAGGCTACAGTGACACCGCGGTGG ATGCTGGGACGCTTCGTC 3'
3' R	5' TCACTGAAAAGGGGGCAC 3'

Para a reação de PCR foi utilizada a enzima *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) conforme o item 3.4.3 com temperatura de anelamento dos *primers* de 58°C e 2 minutos para extensão do fragmento.

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose conforme item 3.4.4, para verificação da correta amplificação do fragmento e após confirmação, as amostras foram purificadas com Kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN) seguindo as orientações do fabricante.

3.6.2 PCR de fusão

Para realizar a fusão dos fragmentos 5' UTR, o gene de seleção *hxgprt*, e a região 3' UTR, realizamos uma única reação de PCR utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) com a adição de 50 ng de cada uma das porções UTRs purificadas no item anterior, e 50 ng do vetor pLIC.HA.HXGPRT, nesse caso utilizado como molde para amplificação do gene *hxgprt*. A união destes três fragmentos foi possível devido às regiões complementares inseridas nos oligonucleotídeos que estão em destaque na tabela 3. Nesta reação de PCR de fusão, foram mantidos os parâmetros descritos em 3.4.3, exceto pela etapa de extensão do fragmento, feita a 68°C, por 6 minutos e 30 segundos.

3.6.3 Purificação de DNA a partir de gel de agarose

O produto da amplificação foi analisado em gel de agarose 1%. Conforme item 3.4.4. Devido ao aparecimento de bandas inespecíficas, juntamente com o fragmento desejado no gel de agarose, foi realizada a purificação do fragmento de interesse. Para isto, a banda de interesse foi excisada e purificada com kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery seguindo as orientações do fabricante.

O cassete purificado foi transfectado conforme descrito no item 3.4.10.

3.6.4 PCR para confirmação do nocaute

Para confirmação do nocaute do gene *tgh1-like*, foram realizadas quatro reações de PCR, utilizando oligonucleotídeos sintetizados conforme a tabela 4. A primeira reação consistiu em detectar a presença do gene de seleção *hxgprt*, utilizando os oligonucleotídeos HXGPRT-F e HXGPRT-R (tabela 4). A segunda reação, consistiu em verificar a inserção do cassete corretamente, utilizando os oligonucleotídeos HXGPRT-INT-R e 5'F (tabela 3). Finalmente, a terceira reação consistiu em detectar a presença do gene *tgh1-like*, utilizando os oligonucleotídeos da tabela 1.

Após confirmação do nocaute, os parasitas foram clonados conforme o item 3.5.6, e os clones confirmados novamente.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gene de seleção.

Nome	Sequência
HXGPRT-F	5' CCAAACCCATTGAAGACTAC 3'
HXGPRT-R	5' GAAAAGAGAGGAAAACGAGAGA 3'
HXGPRT-INT-R	5' CCCGAGAAAAAGAAACGAACAGA 3'

3.7 ANÁLISE DOS PARASITAS NOCAUTES

3.7.1 Ensaio de placa

O ensaio de placa, ou *plaque assay*, foi utilizado como análise inicial dos parasitas nocautes. Este ensaio é utilizado para avaliar a viabilidade dos parasitas em relação à replicação e ao processo de invasão da célula hospedeira, através da análise quantitativa das placas de lise formadas pela ruptura da célula hospedeira. O tamanho das placas está associado à replicação/evasão do parasita, enquanto o número de placas está relacionado com a virulência.

Para este ensaio, placas de seis poços contendo monocamada de células HFF confluentes, foram infectadas com 500 ou 1000 taquizoítas da cepa RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$, utilizada como controle, e 500 ou 1000 parasitas $\Delta tgh1-like$. Decorridos 4 dias, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas por 3 vezes com PBS 1X e fixadas com metanol 100% gelado por 5 minutos, e deixado secar a temperatura ambiente. Após seco, as células foram coradas por 20 minutos com Giemsa (Invitrogen), diluído em água destilada (3 gotas de giemsa para cada mL de água). As células foram então lavadas com água para retirada do excesso de Giemsa e deixadas secando a temperatura ambiente, onde na sequência foi

realizada a contagem do número de placas de lise formado. O ensaio foi realizado com dois clones em triplicada para cada condição do ensaio.

3.7.2 Imunofluorescência Indireta dos parasitas nocautes

Foi realizado protocolo de imunofluorescência indireta dos parasitas nocautes conforme descrito no item 3.5.5, com algumas alterações. Utilizamos nesta análise anticorpo primário anti-IMC de coelho (cedido gentilmente pelo Dr. Markus Meissner-Ludwig-Maximilians-University of Munich), na diluição 1:1.000, e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 (Sigma) na diluição 1:600 e 10 μ M de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000 B, porém nesse caso, não realizamos a deconvolução.

3.8 EXTRAÇÃO DE HISTONAS

A extração de histonas baseia-se na solubilidade destas proteínas em ácidos, permitindo o enriquecimento de histonas com mínimas contaminações de outros componentes nucleares insolúveis nesse meio como DNA, RNA e proteínas não histonas. Inicialmente realizou-se o fracionamento celular, seguido de extração ácida, conforme protocolo descrito por Toro e Galanti, 1990.

Aproximadamente 5×10^8 taquizoítas TgH1-*like*-HA e controle RH *Δ hxgprt Δ ku80*, recentemente liberados das células hospedeiras foram lavados 2 vezes em PBS 1X, ressuspensos em 1 mL de tampão A (0,25 M sacarose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl_2 ; 0,01 M Tris HCl pH 7,4; 0,5% saponina; 0,1 mM PMSF), misturados vigorosamente e centrifugado a $3.824 \times g$ por 10 minutos à 4°C (o sobrenadante foi retirado e guardado como fração 1). O precipitado resultante foi ressuspensado em 1 mL de tampão B (0,25 M sacarose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl_2 ; 0,01 M Tris HCl pH 7,4; 0,1 mM PMSF) e centrifugado (o sobrenadante foi guardado como fração 2). O precipitado resultante, foi ressuspensado em 1 mL do tampão C (1% Triton X-100; 0,15 M NaCl; 0,025 M EDTA; 0,01 M Tris HCl pH 8,0; 0,1 mM PMSF) e centrifugado por 20 minutos à $15.294 \times g$ (o sobrenadante foi guardado como fração 3). O precipitado foi lavado 3 vezes com 100 mM de Tris pH 8,0 onde a primeira lavagem foi guardada como fração 4. Essa etapa de lavagem é fundamental para retirada de proteínas fracamente ligadas ao DNA. O precipitado foi finalmente ressuspensado em 1 mL de HCl 0,4 N e incubado por 2 horas à 4°C sob rotação. A amostra foi centrifugada por 15 minutos a $10.621 \times g$ à 4°C e após, as proteínas

solúveis em ácido presentes no sobrenadante, foram precipitadas com 8 volumes de acetona por aproximadamente 12 horas a -20°C . Após centrifugação por 15 minutos a $3.100 \times g$ à 4°C , a acetona foi retirada cuidadosamente e o precipitado lavado 3 vezes com acetona. O precipitado resultante e as demais frações retiradas foram ressuspensas/diluídas em tampão de amostra para proteínas e seguiu-se o protocolo de Western blot conforme o item 3.5.2. Foram utilizados os anticorpos primários anti-ranBP de camundongo (cedido gentilmente por Halisson Tesseroli Miot, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR) na diluição 1:800, utilizado como controle citoplasmático, anti-HA de rato (1:500, Roche), anti-histona H4 total de coelho (1:200, Abcam) como controle da correta extração das histonas e os anticorpos secundários anti-camundongo conjugado a peroxidase, anti-rato conjugado a peroxidase e anti-coelho conjugado a peroxidase, todos na diluição 1:10.000 e revelado por quimioluminescência (item 3.5.2).

3.9 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Cerca de 40 μL de *beads* magnéticas acopladas à proteína A (Dynabeads™ Protein A – Invitrogen), foram lavadas duas vezes com tampão de lise (item 3.5.9) e incubadas com 5 μL de anticorpo anti-HA de rato (Roche) por aproximadamente 12 horas à 4°C sob rotação.

Aproximadamente 5×10^8 taquizoítas TgH1-*like*-HA e controle RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$, foram lavados 2 vezes com PBS 1X e ressuspensos em 10 mL de meio DMEM sem adição de soro fetal bovino e 1% de formaldeído e em seguida incubados por 30 minutos à 4°C sob rotação, para realização do *crosslink*. Após esse período, foi adicionado 125 mM de glicina e incubado nas mesmas condições por mais 5 minutos para interromper a reação do *crosslink*. Na sequência, a amostra foi centrifugada e lavada 3 vezes com PBS 1X por 10 minutos a $600 \times g$ e ressuspensa em tampão de lise, onde foi deixado por 10 minutos a 4°C .

Para quebra da cromatina em fragmentos de 200 a 1000 pb, realizou-se uma etapa de sonicação, onde a amostra foi dividida em 2 tubos contendo $2,5 \times 10^8$ parasitas cada em 1 mL de tampão de lise e prosseguida a sonicação em potência 5, amplitude 50%, 20 vezes com pulsos de 10 segundos em sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer Scientific experts).

As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos em velocidade máxima e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Esta etapa foi repetida mais uma vez e 100 μL do sobrenadante foi armazenado à -20°C (INPUT).

As *beads* que haviam sido deixadas incubando com o anticorpo foram separadas em campo magnético e incubadas com o sobrenadante da etapa anterior por 2-3 horas à 4°C sob rotação. Após, as *beads* foram separadas novamente em campo magnético e lavadas 6 vezes com tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% NP40; 0,1 mM PMSF; 0,1 mM E64) e em seguida adicionado 50 µL de tampão de eluição (1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. O eluído 1 foi recolhido e adicionado mais 50 µL de tampão de eluição, incubado novamente e recolhido o eluído 2.

Para a reversão do *crosslink*, o INPUT, e os eluídos 1 e 2, foram incubados por 6 horas à 65°C e em seguida foi adicionado tampão de amostra para proteínas (item 3.5.1), desnaturados por 5 minutos à 95°C, misturados vigorosamente e centrifugados por 1 minuto à velocidade máxima. Para análise do imunoprecipitado, os eluídos 1 do transfectante TgH1-like-HA e do controle foram aplicados em gel SDS-PAGE e realizada a coloração por nitrato de prata. O eluído 2 e INPUT foram analisados por Western blot conforme item 3.5.2, utilizando anticorpos primários anti-HA de rato na diluição 1:500 (Roche) e anticorpo secundário anti-rato conjugado a peroxidase (1:10.000) e revelado por quimioluminescência (item 3.5.2).

3.9.1 Coloração por Nitrato de Prata

O gel foi incubado em solução de fixação de SDS-PAGE (50% de etanol; 12% de ácido acético; 0,02% de formaldeído), por aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi lavado com solução de etanol 50% por 3 vezes (5, 10 e 15 minutos), seguida de incubação por 1 minuto em solução de sensibilização para coloração por prata (0,02% de tiosulfato de sódio em água ultrapura). Decorrido esse tempo, o gel foi lavado vigorosamente por 3 vezes com água ultrapura.

O gel foi incubado em solução de coloração de prata (0,2% de nitrato de prata e 0,03% de formaldeído) por 2 horas e após, lavado novamente com água ultrapura vigorosamente. A revelação foi realizada em solução de revelação de prata (para 100 mL: 3% de carbonato de sódio; 0,02% de formaldeído; 2 mL de solução de sensibilização). A reação foi interrompida com solução de término de revelação de prata (50% de etanol e 12% de ácido acético). Protocolo adaptado de OAKLEY; KIRSCH; MORRIS, 1980.

3.10 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Foi realizado protocolo de imunoprecipitação conforme item 3.9 e as amostras foram aplicadas em 2 géis SDS-PAGE para realização de ensaio de Western blot conforme item 3.5.2. Em uma membrana foram utilizados os anticorpos primários anti-HA de rato (Roche) e anticorpo secundário anti-rato conjugado a peroxidase, nas mesmas diluições já citadas anteriormente na outra membrana, utilizamos anti-histona H4 total de coelho (Abcam) e anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase, seguido de revelação por quimioluminescência (item 3.5.2).

4. RESULTADOS

4.1 A PROTEÍNA HIPOTÉTICA TGH1-LIKE É SIMILAR A HISTONA H1 DE *Kinetoplastidae*

No banco de dados do genoma de *T. gondii* (ToxoDB.org), é possível encontrar uma cópia de cada histona que faz parte do core do nucleossomo, com exceção da H2B que possui duas cópias que alternam durante o ciclo de vida. No entanto, ainda não se identificou uma histona-*linker* típica. Através de buscas no banco de dados, encontramos uma pequena proteína, muito básica, similar à histona H1-like de *Kinetoplastidae*, (ToxoDB.org). O gene (número de identificação: TGME49_315570) está presente em cópia única no genoma, localizado no cromossomo XI. A sequência contém 2 éxons e um transcrito de 1172 pb, que codifica uma proteína de 91 aminoácidos e massa molecular de 9 kDa, anotada como hipotética.

Através do alinhamento de sequências realizado com o algoritmo Clustal Omega, a proteína hipotética de *T. gondii* apresentou 56,76% de identidade com a histona H1 de *T. brucei* (figura 7). Logo, passamos a denominá-la TgH1-like.

```
CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

Brucei   MA---KASAAPKKAVAKKAAPKK-----AAPKKAVAKKAAPKKAVAKKAAPKKAVAKK
Toxo     MKGFSKMAARPKAKPAKKAAPVKKAAAKKAASAPKKTMCCKRAASAKPAA-AAAPAKK-VKK
          *  *  :* **  ****  **          :*****:.*:**  *  *  **  *  .***

Brucei   PLAKKVAVKVVAPKKVAGKKAARKA-----
Toxo     MVAKKAATKKAAPKKNVVKKTATKKAAGKGGKK
          :***.:.:**.*****  **:*:**
```

Figura 7. Alinhamento de sequências múltiplas. Alinhamento com o algoritmo Clustal Omega da sequência da histona H1 de *T. brucei* e a proteína hipotética de *T. gondii*, existe 56,76% de identidade entre as sequências.

Além disso, o alinhamento entre a sequência da histona H1 de humanos (*Homo sapiens*) e de *Toxoplasma*, permitiu verificar que a proteína TgH1-like se assemelha a porção C-terminal, contudo, o domínio globular está ausente (figura 8).



Figura 8. Alinhamento de seqüências múltiplas da histona H1 de humanos e TgH1-like. (A) Alinhamento com o algoritmo Clustal Omega, entre a seqüência de TgH1-like e a histona H1 de *Homo sapiens*, onde verifica-se uma conservação de TgH1-like apenas com a porção C-terminal da H1 de humanos, com ausência de conservação da porção do domínio globular, assim como, da porção N-terminal (B) Representação da estrutura de uma histona H1 típica com destaque em vermelho para a região de similaridade encontrada.

4.2 ANÁLISE ESTRUTURAL *in silico*

A fim de obter maiores informações quanto à estrutura desta proteína hipotética, utilizamos uma abordagem computacional para a predição estrutural de TgH1-like pelo método de modelagem por homologia, onde a construção de modelos é baseada na estrutura tridimensional de proteínas homólogas. Foi realizado uma busca por modelos experimentais similares, baseado em estrutura secundária de forma remota pelo servidor HHpred – *Homology detection & structure prediction by HMM-MM comparison* - Detecção de Homologia e predição de estrutura por comparação, utilizando modelos escondidos de Markov, modelo estatístico utilizado pelo servidor (SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005).

Obtivemos identidade com apenas uma estrutura depositada através desta análise, que correspondia a 36% de identidade com a cadeia H da *RNA polimerase* de *Thermus aquaticus*. Com isso, esta proteína foi utilizada como molde para a modelagem realizada com auxílio do software Modeller, produzindo uma estrutura simples de TgH1-like contendo cinco estruturas tipo alfa-hélice como mostrado na figura 9A.

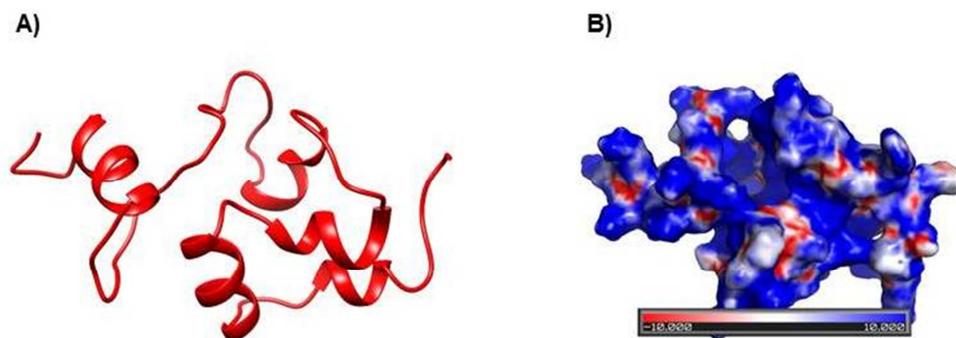


Figura 9. Predição da estrutura terciária de TgH1-like e o seu potencial eletrostático. (A) Predição da estrutura terciária de TgH1-like pelo método de modelagem por homologia. (B) Potencial eletrostático calculado pelo servidor PBEQ Solver mostrando um predomínio de regiões positivas em azul e em vermelho as regiões negativas.

O potencial eletrostático da proteína foi calculado pelo servidor PBEQ Solver, que utiliza as constantes eletrostáticas de Poisson-Boltzmann para estimar a energia de solvatação eletrostática da proteína. O resultado é visualizado no programa Pymol, e mostrou que TgH1-like é uma proteína com potencial eletrostático bastante positivo, característica semelhante a outras histonas devido a sua composição rica em resíduos de lisina e arginina (estas regiões positivas estão representadas em azul na figura 9B).

Adicionalmente, o uso do servidor ProFunc, que utiliza a estrutura tridimensional para ajudar a identificar a provável função biológica da proteína, permitiu verificar que TgH1-like possui 47,312% de identidade com um modelo teórico de histona h1b, sugerindo que essa proteína pode ter função de histona em *T. gondii* (figura 10).

Matches to existing PDB structures

PDB Sequence search vs existing PDB entries.

16 matching sequences found by FASTA search

PDB code	E-value	%-taqe id	Overlap	Name
1. 2mdh(B)	7.7e-05	45.361	97	Oxidoreductase(NAD(a)-choh(d))
2. 2fe2(A)	0.0002	47.312	93	Theoretical model of histone h1b
3. 5gao(E)	0.0089	40.506	79	Head region of the yeast spliceosomal u4/u6.U5 tri-snrnp
4. 4k0m(C)	0.36	32.941	85	Crystal structure of thermus thermophilus 70s containing trn mRNA stop codon with pseudouridine
5. 4k0q(C)	0.36	32.941	85	Crystal structure of thermus thermophilus 70s containing trn mRNA stop codon with pseudouridine
... plus others				

Figura 10. Estruturas correspondentes encontradas através do servidor ProFunc. Em destaque observamos a correspondência com modelo teórico de histona h1b possuindo 47.312% de identidade.

As análises *in silico* mostraram que TgH1-like possui características estruturais de histonas e que pode ter função de histona em *Toxoplasma gondii*. Todas as análises estruturais foram realizadas com o auxílio da Dra. Tatiana Brasil e

foram utilizados programas e servidores disponíveis online conforme descrito no item 3.2.

4.3 TGH1-LIKE É UMA PROTEÍNA EXCLUSIVAMENTE NUCLEAR

4.3.1 Construção do plasmídeo para etiquetamento de TgH1-like

Para caracterização de TgH1-like, incluindo a análise de sua localização, optamos pela estratégia de expressar a TgH1-like fusionada a uma etiqueta na porção C-terminal. Para isso, o gene foi clonado em vetor que contém o gene de seleção *hxgprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), utilizado como marcador seletivo, e o gene *tgh1-like* conjugado a sequência correspondente a três cópias da etiqueta HA (3X HA). Através de um *crossing over* simples, a sequência do gene com a etiqueta que está presente no vetor substituiu o gene *tgh1-like* no genoma.

Para a construção do vetor, inicialmente um fragmento correspondente a 1000 pb, a montante do final do gene TgH1-like, foi amplificado por reação de PCR utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), de alta fidelidade. Como molde para a reação, foi utilizado o DNA genômico da cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*. A correta amplificação pode ser visualizada na figura 11, com um fragmento do tamanho esperado.

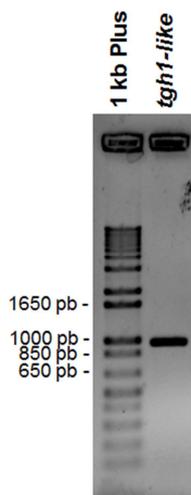


Figura 11. Amplificação do gene *tgh1-like*. Resultado da amplificação por PCR do fragmento de *tgh1-like* em gel de agarose 1%. O tamanho da banda é compatível com o esperado, de aproximadamente 1000 pb. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Após purificação do produto da PCR, o fragmento foi ligado no vetor pLIC.HA.HXGPRT conforme descrito no item 3.4.6, e a reação de ligação foi usada

para transformar bactérias *E. coli* DH5 α cálcio-competente. Para a verificação dos clones positivos foi feita uma PCR de colônia, onde 17 colônias foram testadas (figura 12) e 3 clones (5, 6 e 7) foram selecionados para cultivo em meio LB líquido e posterior purificação dos plasmídeos por lise alcalina.

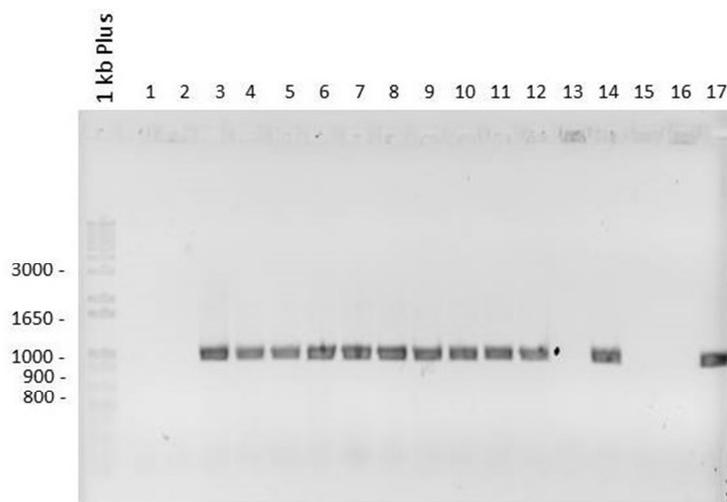


Figura 12. Análise dos clones positivos por PCR de colônia. Dezessete colônias foram submetidas à reação de PCR com o intuito de verificar quais clones possuíam inserto. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, mostrando tamanho esperado de aproximadamente 1000 pb. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Os plasmídeos purificados foram analisados por meio de mapa de digestão enzimática para confirmação dos insertos clonados. Nesta análise, foram selecionadas as enzimas de restrição *HindIII*, *NotI* e *XhoI*, que cortam em sítio único no vetor, e a enzima *EcoRV*, com sítio único de restrição no inserto. Os resultados foram comparados ao mapa de restrição predito pelo programa Serial Cloner, (Figura 13). Assim, confirmamos que os clones selecionados possuíam o inserto com tamanho e orientação correta. Os clones 5 e 7 foram também sequenciados para confirmar a sequência correta de *tgh1-like*.

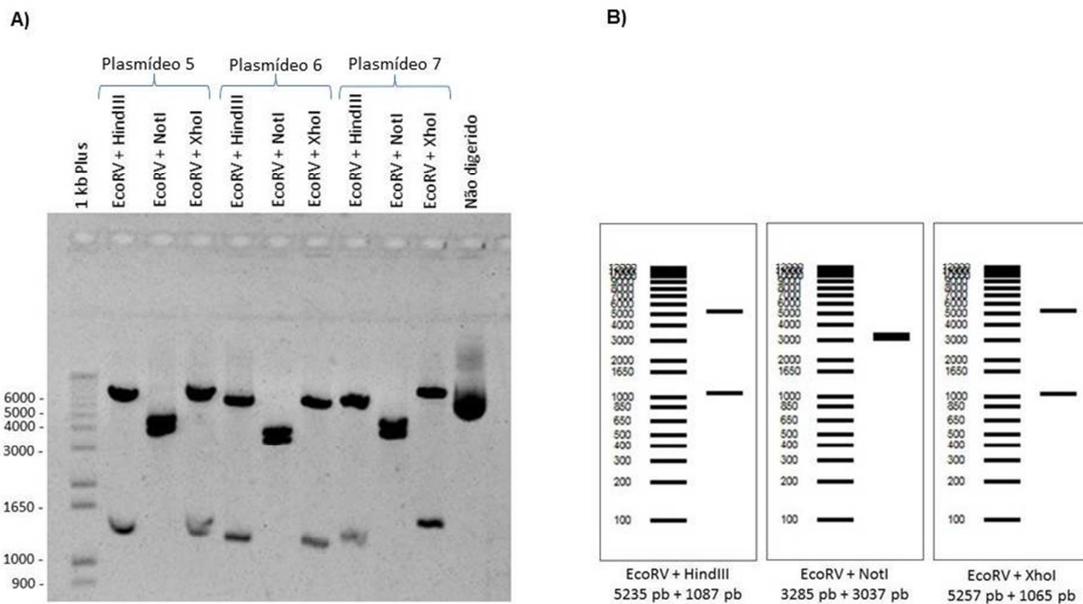


Figura 13. Análise da construção dos plasmídeos por digestão com enzimas de restrição. (A) Resultados das digestões com as combinações *EcoRV*+*HindIII*, *EcoRV*+*NotI* e *EcoRV*+*XhoI* para os três plasmídeos selecionados e um plasmídeo não digerido foi utilizado como controle. (B) Digestão virtual realizada no programa Serial Cloner para as combinações utilizadas. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen)

Após confirmação, os plasmídeos dos clones 5 e 7 foram novamente purificados utilizando o kit comercial de minipreparação plasmidial (QIAprep Spin Miniprep Kit-Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante e sequenciados. Após a confirmação da sequência, os plasmídeos foram linearizados com a enzima *EcoRV* que corta dentro do inserto, resultando em extremidades de 385 e 475 pb, e inseridos por eletroporação em formas taquizoítas da cepa *RHΔhxgprtΔku80*. A seleção dos transfectantes levou cerca de duas semanas e foi realizada através da adição de ácido micofenólico e xantina. A seleção ocorre devido à reinserção por recombinação do gene *hxgprt* presente no vetor, sendo que os parasitas utilizados na transfecção possuem o gene *hxgprt* nocauteado. O *T. gondii* possui duas vias de síntese de purinas: a via por HXGPRT e a via por adenosina kinase (AK). O ácido micofenólico é um inibidor da via por AK e a xantina é substrato para a via por HXGPRT. Uma vez inibida a via pelo ácido micofenólico, apenas os parasitas que receberam o vetor sobrevivem pela reativação da via HXGPRT.

4.3.2 Obtenção das linhagens expressando TgH1-*like* fusionada a etiqueta 3X HA

A população transfectante TgH1-*like*-HA selecionada foi utilizada para obtenção do extrato proteico, que foi submetido à separação por tamanho em gel desnaturante SDS-PAGE 15%. O gel foi posteriormente transferido para membrana de nitrocelulose para realização de ensaio de Western blot, utilizando anticorpo

monoclonal que reconhece a etiqueta de 3X HA, com o intuito de confirmar a expressão de Tgh1-*like* fusionada à etiqueta.

Observamos a presença de uma banda única com cerca de 20 kDa (figura 14), ou seja, maior que o tamanho esperado de 12 kDa de TgH1-*like* fusionada a etiqueta (9 kDa do gene e 3 kDa da etiqueta de 3X HA) .

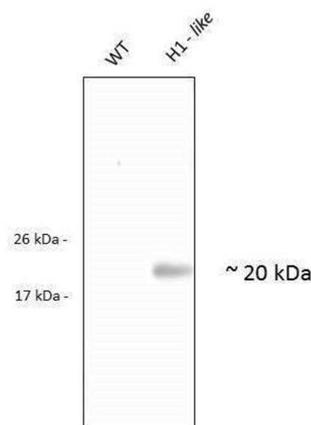


Figura 14. Análise por Western blot da população transfectante utilizando anticorpo anti-HA. A membrana contendo extratos proteicos dos parasitas selvagens (WT) e transfectantes (H1-like), foi incubada com anticorpo primário anti-HA (Clone 3F10 da Roche na diluição 1:500) e revelada por quimioluminescência. Foi possível observar a presença de uma banda de aproximadamente 20 kDa, correspondente a proteína TgH1-*like* fusionada a etiqueta de HA.

Visto que o tamanho da proteína identificada é superior ao esperado, investigamos se isso não seria resultado da formação de dímeros ou complexos muito estáveis. Assim, realizamos testes incubando o extrato proteico dos transfectantes com o agente redutor DTT nas concentrações de 5, 10 e 20 mM. Como pode ser verificado na figura 15, mesmo na presença de grandes quantidades de DTT, além do β -mercaptoetanol já contido no tampão de amostra para proteínas, a banda observada permaneceu com o tamanho de 20 kDa, sugerindo que não ocorre a formação de dímeros.

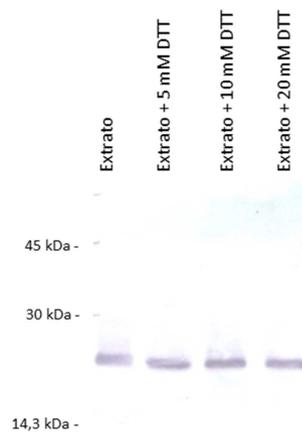


Figura 15. Análise por Western blot dos extratos proteicos tratados com DTT. A membrana contendo extratos proteicos previamente tratadas com DTT nas concentrações de 5, 10, 20 mM e o controle sem tratamento (extrato), foi incubada com anticorpo primário anti-HA e secundário conjugado a fosfatase alcalina, Foi possível observar que não houve alteração no tamanho da proteína.

Para nos certificarmos que isso também não se tratava de uma inserção aleatória no genoma, buscamos verificar se a etiqueta de 3X HA foi inserida corretamente após o gene *tgh1-like*. Para isso, DNA da população de transfectantes foi extraído para ser utilizado como molde em reações de PCR. Uma das PCRs foi realizada utilizando oligonucleotídeos para amplificação da região contendo a etiqueta de 3X HA, que corresponde a um tamanho de 591 pb. A segunda reação envolveu o oligonucleotídeo HA-INT-R que anela no interior da etiqueta de HA e o oligonucleotídeo TgH1-*like* Primer F, que anela na porção inicial do gene *tgh1-like* e resulta em um fragmento de 1028 pb. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (figura 16), e foi possível visualizar as bandas com os tamanhos esperados, confirmando a inserção correta da etiqueta na porção final do gene *tgh1-like*.

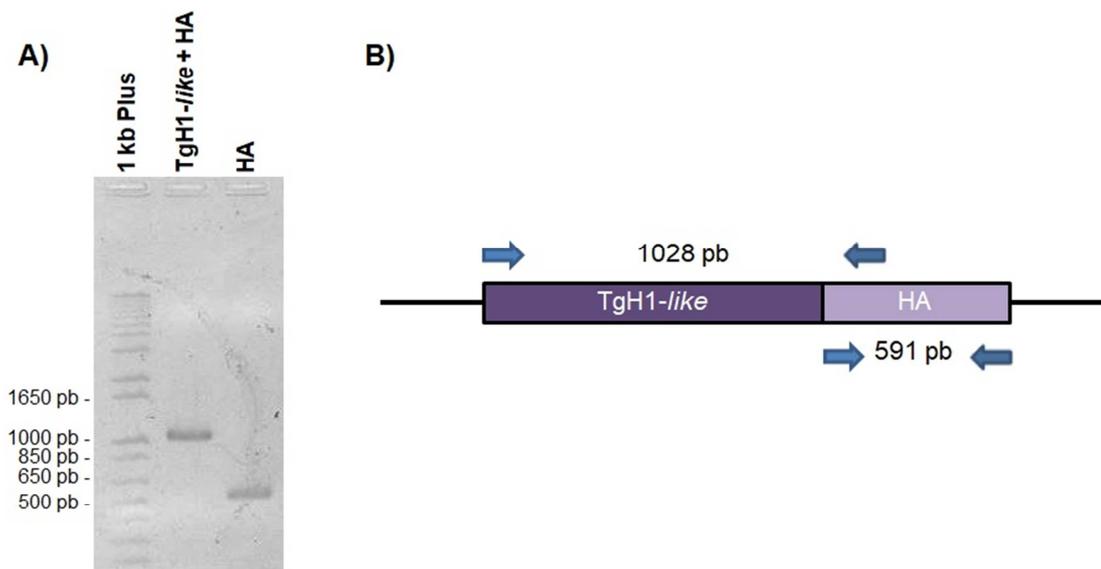


Figura 16. Análise da presença da etiqueta 3X HA por PCR. (A) Imagem de gel de agarose 1%, contendo os produtos das reações de PCR TgH1-like-HA (1028 pb) e correspondente a etiqueta de HA (591 pb). (B) Desenho esquemático das reações de PCR realizadas, indicando as posições dos oligonucleotídeos utilizados e os tamanhos esperados de 1028 pb e 591 pb. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Como não foi esclarecido o aumento drástico de tamanho na proteína em estudo, nos perguntamos se TgH1-*like* poderia estar sendo alvo de alguma modificação pós traducional (MPT), modificações estas muito comuns em histonas. De acordo com dados presentes na literatura, as MPTs mais comuns em histonas H1 são a fosforilação, acetilação, ubiquitinação e metilação (HAPPEL; DOENECKE, 2009). Recentemente foram identificados diversos sítios de ubiquitinação em proteínas de *T. gondii*, e TgH1-*like* está entre elas, mas precisamente, na lisina 45 (MONERRI et al., 2015). A ubiquitinação resulta em um aumento de cerca de 8 kDa, que somado ao tamanho esperado de TgH1-*like* com HA justificaria uma proteína de cerca de 20 kDa. Além disso, 1 sítio de fosforilação foi identificado na serina 43 (TREECK et al., 2011). Pretendemos confirmar e identificar outras modificações por análise em espectrometria de massas.

4.3.3 Imunolocalização de TgH1-*like*-HA

Para análise da localização de TgH1-*like*-HA, foi realizado ensaio de imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário monoclonal anti-HA. Como podemos verificar na figura 17, os parasitas selvagens utilizados como controle não apresentaram qualquer marcação com o anticorpo utilizado. Porém, na figura 18 é possível visualizar que o anticorpo anti-HA reconhece especificamente uma proteína localizada no núcleo do parasita, indicando que TgH1-*like*-HA é uma proteína

exclusivamente nuclear. Vale destacar que na figura 19, em maior dimensão para facilitar a visualização, há dois vacúolos em fases distintas do ciclo celular. O vacúolo a esquerda contém parasitas em fase G1/S, enquanto que a direita os parasitas encontram-se em mitose, facilmente distinguível pela morfologia do núcleo, que se assemelha a um “U” em parasitas em mitose. Aparentemente há uma maior intensidade de marcação em parasitas em divisão, preferencialmente na periferia do núcleo desses parasitas, o que poderia ser consequência da organização dos telômeros, centrômeros ou outras regiões de heterocromatina, que por serem mais condensadas, apresentam maior intensidade de marcação.

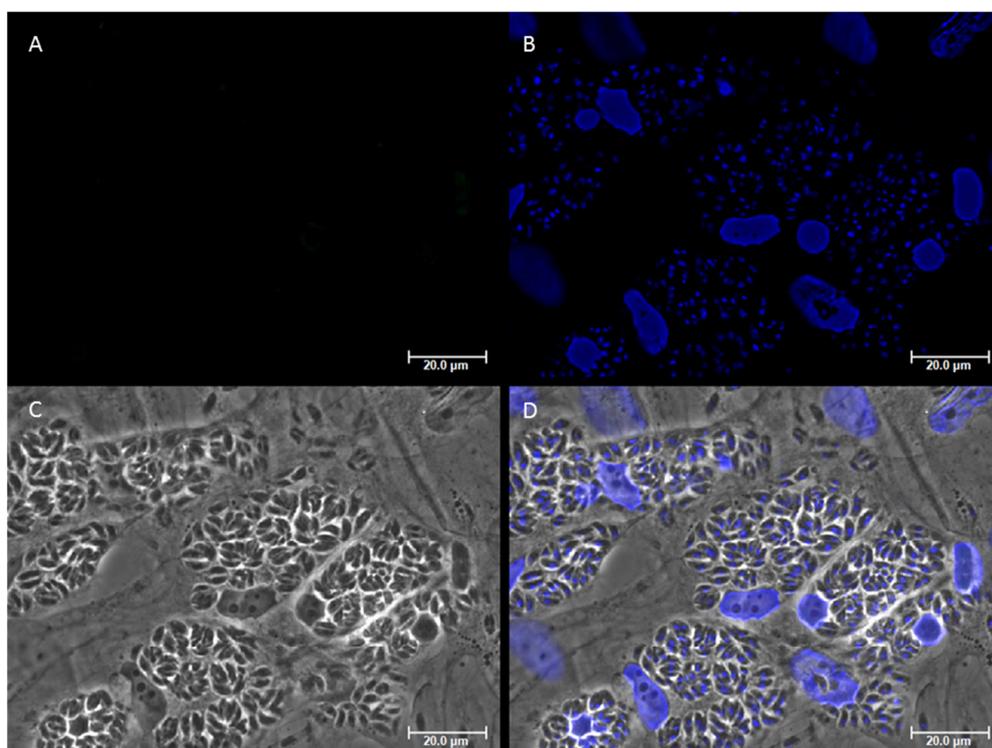


Figura 17. Imunofluorescência indireta dos parasitas selvagens. Como controle da especificidade do anticorpo anti-HA, os mesmos foram utilizados em ensaios de imunofluorescência em parasitas selvagens (A) Marcação com anti-HA, a qual foi inexistente. (B) Marcação do núcleo e apicoplasto dos parasitas e núcleo das células hospedeiras com DAPI. (C) Contraste de fase mostrando vacúolos contendo as formas taquizoítas em células HFF. (D) Sobreposição do anti-HA, DAPI e contraste de fase.

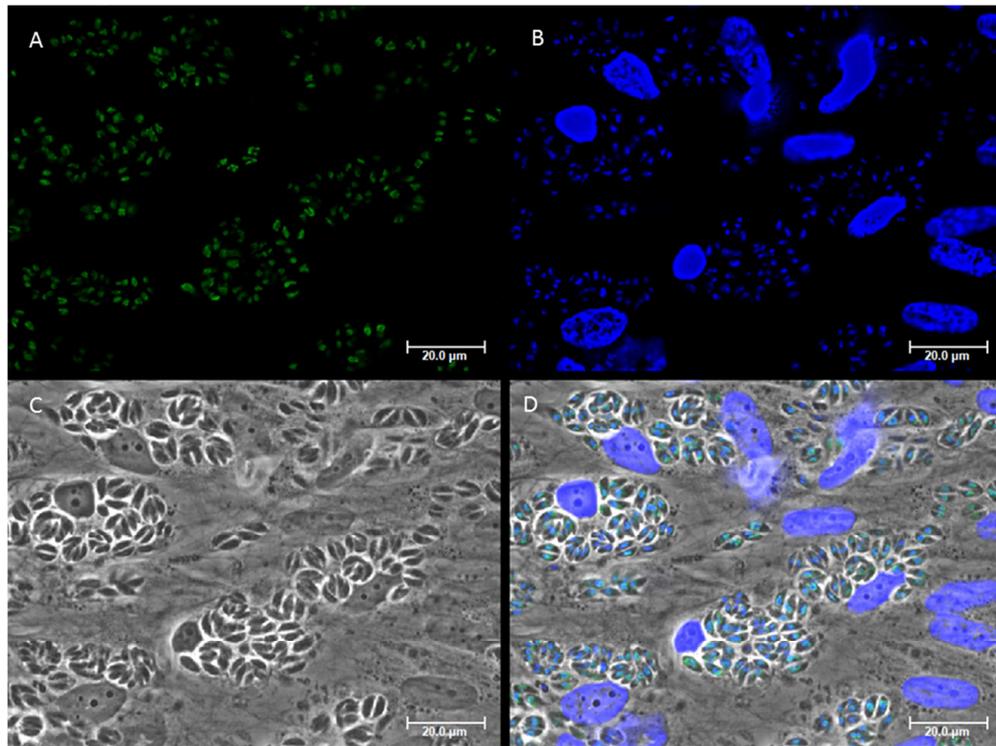


Figura 18. Localização de TgH1-like-HA por imunofluorescência indireta. Parasitas transfectados foram utilizados nesse ensaio de imunofluorescência. (A) Em verde, marcação para TgH1-like (anti-HA). (B) Marcação do núcleo e apicoplasto dos parasitas e células hospedeiras com DAPI. (C) Contraste de fase mostrando vacúolos contendo as formas taquizoítas em células HFF. (D) Sobreposição do anti-HA, DAPI e contraste de fase mostrando a localização de TgH1-like no núcleo do parasita.

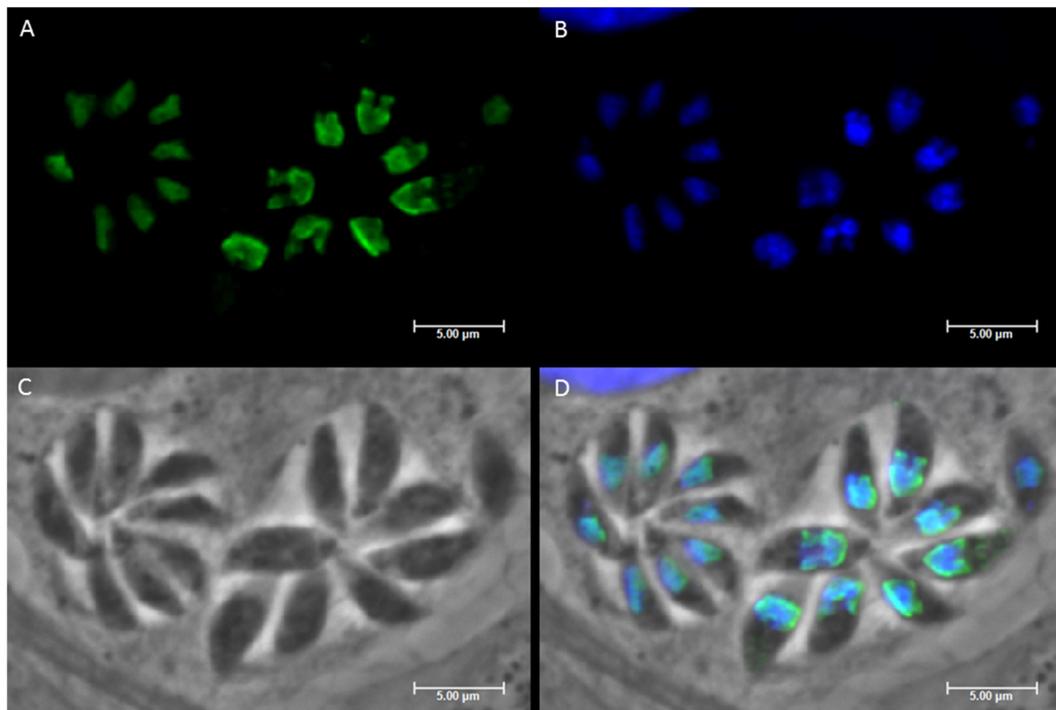


Figura 19. Localização de TgH1-like-HA por imunofluorescência indireta, em maior aumento. (A) Em verde, marcação para TgH1-like (anti-HA). (B) Marcação do núcleo dos parasitas e células hospedeiras coradas com DAPI. (C) Contraste de fase mostrando vacúolos contendo as formas taquizoítas em células HFF. (D) Sobreposição do anti-HA, DAPI e contraste de fase mostrando a localização de TgH1-like no núcleo do parasita.

4.4 TGH1-LIKE ESTÁ PRESENTE EM ISOLADO DE HISTONAS

Em 1884, Albrecht Kossel deu o nome de histonas às proteínas nucleares solúveis em condições ácidas (OLINS; OLINS, 2003) e desde então, muitos estudos realizados com histonas utilizam métodos de extração ácida para o isolamento destas proteínas. Este princípio foi utilizado também neste trabalho, para verificar se a proteína TgH1-*like*-HA está associada a cromatina. Primeiramente foi realizada a lise da membrana plasmática do parasita, seguida da lise do núcleo e finalizando com a extração das histonas com a utilização de ácido clorídrico. Na figura 20, podemos analisar o resultado desse fracionamento após ensaio de Western blot com anticorpo anti-HA. Utilizamos como controle citoplasmático o anticorpo contra a proteína RanBP, e como controle adicional, utilizamos anticorpo contra histona H4 humana, que deve estar presente na fração de histonas após extração ácida. Vale ressaltar que utilizamos o anticorpo comercial que detecta a H4 humana, por ser altamente similar com a H4 de *Toxoplasma*, e assim identificar a histona do parasita.

Através dessa metodologia, foi possível verificar na figura 20, que TgH1-*like*-HA foi detectada na fração nuclear livre (canaleta C) e na fração associada ao DNA, obtida após a extração ácida, mostrando que essa proteína está associada ao DNA, juntamente com outras histonas como a histona H4 (canaleta E), mas não unicamente, visto que é liberada facilmente após a lise do núcleo.

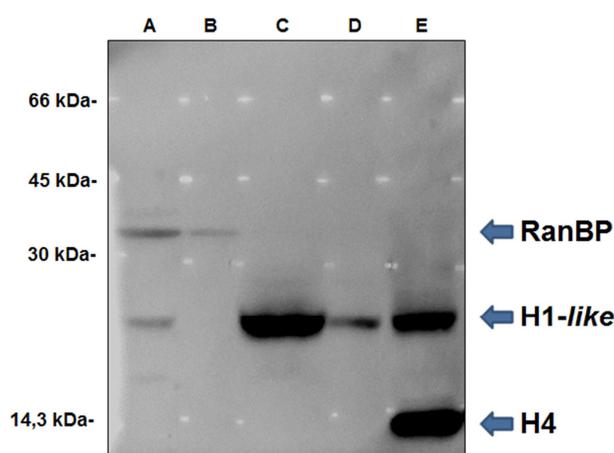


Figura 20. Análise por Western blot do ensaio de extração ácida de histonas por fracionamento celular. (A) Fração após lise da membrana do parasita onde utilizamos como controle citoplasmático, anticorpo contra a proteína RanBP, em (B) fração após uma etapa de lavagem; (C) Fração após a lise do núcleo onde verificamos a presença da TgH1-*like*-HA no núcleo, seguido de uma etapa de lavagem em (D); (E) fração de proteínas da cromatina, após extração ácida, onde observamos a presença da histona H4 utilizada como controle e a TgH1-*like*-HA presente na mesma fração.

4.5 TGH1-LIKE-HA INTERAGE COM A HISTONA H4

Com o intuito de confirmar a interação de TgH1-*like*-HA com outras histonas, foi realizado o ensaio de co-imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-HA para imunoprecipitar TgH1-*like*-HA e complexos associados, seguido de análise por Western blot com anticorpos contra a histona H4 humana.

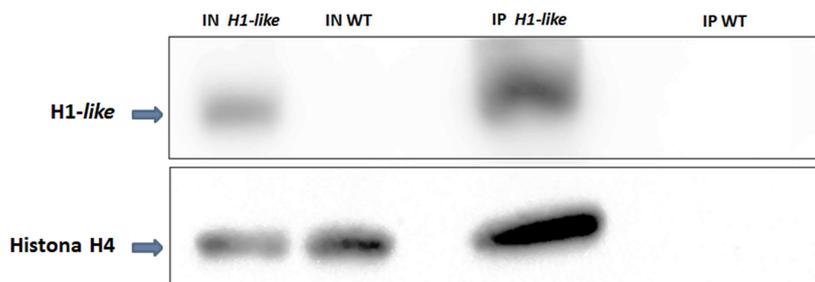


Figura 21. Co-imunoprecipitação. Os extratos proteicos de parasitas transfectantes (H1-*like*) e selvagens (WT) foram incubados com anticorpo contra a etiqueta de HA conjugada a resina de afinidade. A amostra isolada foi analisada por Western blot utilizando anticorpos contra histona H4, onde é possível observar a presença das duas proteínas no imunoprecipitado. IN: Input. IP: Imunoprecipitado.

Foi possível observar no Western blot (figura 21) a presença de TgH1-*like*-HA apenas nos transfectantes (IN-input H1-*like*), enquanto que a histona H4 é observada tanto nas amostras provenientes dos transfectantes quanto dos parasitas selvagens, conforme o esperado. Após a imunoprecipitação de TgH1-*like*-HA foi possível detectar histonas H4 no imunoprecipitado (IP H1-*like*), evidenciando a interação entre essas proteínas e gerando mais uma evidência do papel de TgH1-*like*-HA de fato como histona em *Toxoplasma*.

4.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TGH1-LIKE PARA ANÁLISE DE PROTEÔMICA

Visando a identificação de proteínas parceiras por análise de proteômica por espectrometria de massas, estamos padronizando a imunoprecipitação do complexo contendo TgH1-*like*-HA utilizando anticorpo anti-HA. O protocolo realizado até o momento foi analisado em eletroforese de proteína (SDS-PAGE), tanto por coloração com nitrato de prata quanto por Western blot. Visto que a proteína corresponde somente às alças flexíveis de uma H1 típica, sem um domínio globular, optamos por realizar o *crosslink*, uma vez que essa interação é possivelmente fraca. Após o *crosslink* foi necessário fragmentar o DNA por sonicação para obtenção de fragmentos de 200 a 1000 pb.

Através de Western blot utilizando anti-HA, foi possível detectar TgH1-*like*-HA na fração imunoprecipitada, porém, no gel corado com prata não foi possível observamos seu enriquecimento. Apesar da ausência do enriquecimento de TgH1-*like*-HA, foi observado um padrão de proteínas de baixo peso molecular que muito se assemelha ao padrão de bandas observado para as histonas do core do nucleossomo de *T. gondii* (figura 22B) e além disso, a análise por Western blot confirmou a presença de TgH1-*like*-HA na fração imunoprecipitada. Assim, este protocolo está sendo modificado com o intuito de enriquecer as proteínas do complexo TgH1-*like* para análise por espectrometria de massas.

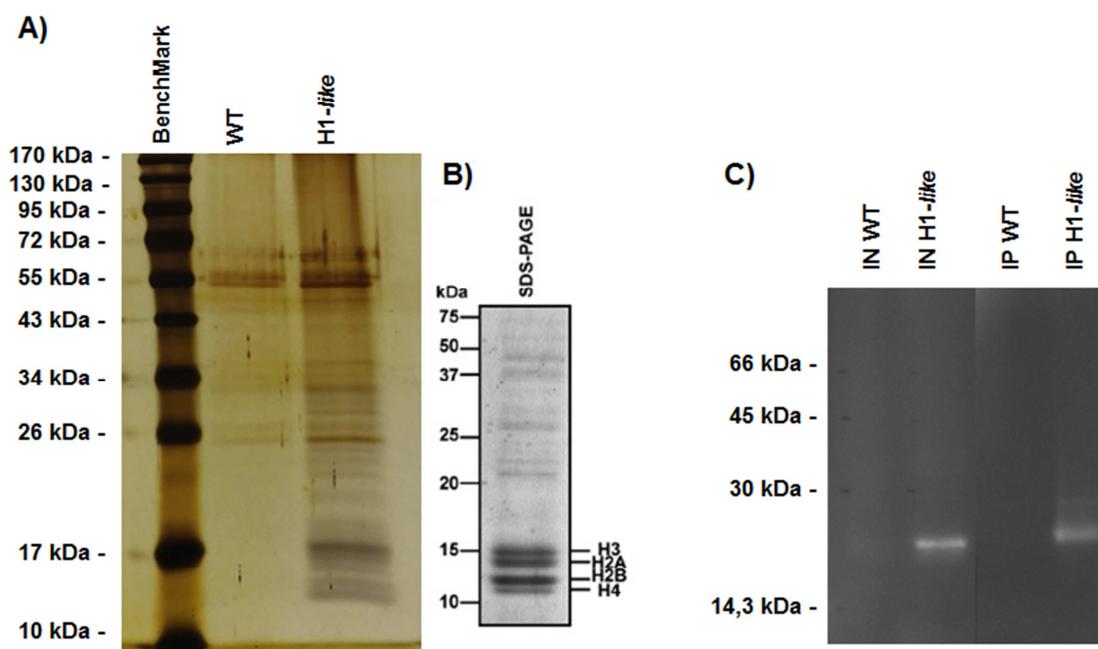


Figura 22. Análise da padronização dos ensaios de imunoprecipitação de TgH1-*like*-HÁ. A) Gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata com o imunoprecipitado dos parasitas selvagens (WT) e dos parasitas transfectantes (H1-*like*). Não foi observado enriquecimento da proteína de 20 kDa, referente a TgH1-*like*-HA. B) Padrão de histonas visualizado em gel SDS-PAGE (NARDELLI et al, 2013) similar ao padrão visualizado em (A). C) Western blot com os extratos proteicos dos parasitas selvagens (WT) e transfectantes (H1-*like*) e os respectivos imunoprecipitados, onde é possível observar a presença de TgH1-*like*-HA tanto no INPUT quanto no imunoprecipitado. IN: Input. IP: Imunoprecipitado.

4.7 NOCAUTE DE TGH1-LIKE

Visando elucidar a função de TgH1-*like*, partimos para uma abordagem de genética reversa para analisar o fenótipo causado pela ausência de TgH1-*like*. Para isso, optamos por uma abordagem de nocaute clássico, onde o gene de interesse é substituído por um gene de seleção. Essa é uma abordagem bastante utilizada em *T. gondii*, por ser um organismo haploide e onde a maior parte dos genes, incluindo *tgh1-like*, serem presentes em cópia única. A estratégia utilizada para o nocaute envolveu a construção de um cassete contendo as regiões UTR do gene,

flanqueando o gene de seleção, através de PCR de fusão. Primeiramente foram amplificadas as porções 5' e 3' UTRs de 1993 pb e 1940 pb do gene TgH1-like, respectivamente (figura 23).

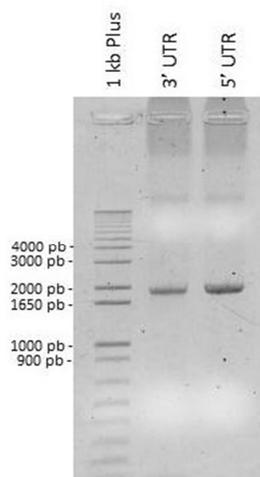


Figura 23. Análise da amplificação dos fragmentos das porções 5' e 3' UTRs do gene *tgh1-like*. Produtos de reação de PCR visualizados em gel de agarose 1%, com os tamanhos esperados para as porções 5' e 3' UTRs do gene TgH1-like. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Após purificação dos fragmentos, as porções 5' e 3' UTRs foram fusionadas ao gene de seleção *hxgprt*, que possui tamanho de 1969 pb, formando um cassete final de 5.902 pb. A PCR de fusão foi realizada em uma reação direta contendo os três fragmentos, e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose, conforme mostrado na figura 24. O produto da reação apresentou bandas inespecíficas, além da banda esperada de 5.902 pb. Outras enzimas foram utilizadas na tentativa de amplificação específica do fragmento, contudo, nenhuma foi eficiente para amplificar o produto de 5.902 pb. Portanto, foi necessário purificar o fragmento a partir do gel de agarose utilizando o kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery, conforme orientações do fabricante.

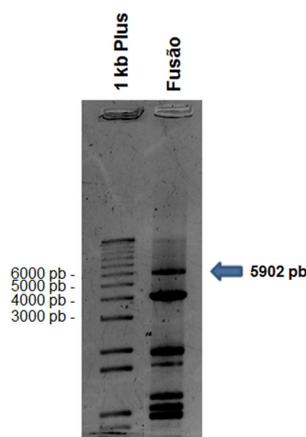


Figura 24. PCR de fusão. Uma reação de PCR foi realizada para fusionar o gene de seleção *hxgprt* às porções UTRs amplificadas anteriormente, onde foi possível observar a banda de interesse de 5902 pb, além de bandas inespecíficas. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Após sucessivas reações de PCR e purificação, foi obtido o total de 5 µg de DNA recomendados para transfecção em *T. gondii*. Isso foi usado para transfectar formas taquizoítas da cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*. A seleção dos transfectantes decorreu por duas semanas, como descrito anteriormente para o etiquetamento da proteína, utilizando ácido micofenólico e xantina. O DNA tanto da população selecionada quanto da cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*, utilizada como controle (WT), foi utilizado como molde para reação de PCR visando confirmar o nocaute do gene *tgh1-like* (figura 25). Neste caso, as reações de PCR foram realizadas utilizando pares de oligonucleotídeos para a amplificação de 737 pb do gene *hxgprt* (PCR 1), ou da região contendo a porção 5'UTR e o gene de seleção *hxgprt* equivalente a 2233 pb (PCR 2). Como contraprova, também foi utilizado um par de oligonucleotídeos que deveriam amplificar o gene *tgh1-like*, no tamanho de aproximadamente 1000 pb (PCR 3).

Na figura 25 A, é possível observar que os parasitas nocautes, Δ *tgh1-like*, apresentaram amplicons de tamanho esperado para as PCRs 1 e 2, enquanto que, o gene *tgh1-like* de aproximadamente 1000 pb não foi amplificado (PCR 3 - Δ *tgh1-like*). Isso confirma que os parasitas selecionados são nocautes para *tgh1-like*. O contrário foi observado nos parasitas controles (WT), onde o gene *hxgprt* não foi amplificado (PCR 1 – WT) enquanto *tgh1-like* foi detectado (PCR 3 – WT).

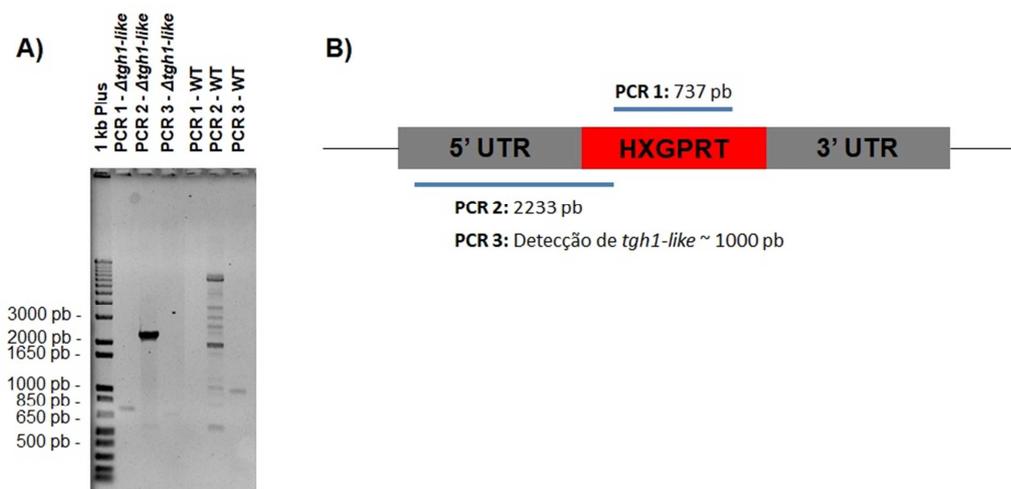


Figura 25. Análise da seleção de parasitas nocaute de *tgh1-like*. (A) Resultado de PCR das 3 ampliações tanto em parasitas transfectantes ($\Delta tgh1-like$), quanto nos selvagens (WT). Nos transfectantes é possível observar os amplicons de tamanho correto para a PCR 1 (737 pb), PCR 2 (2233 pb) e a ausência de amplificação do gene *tgh1-like* (PCR 3). Esse último pode ser detectado nos parasitas selvagens (PCR 3: 1000 pb), confirmando a deleção do gene nos transfectantes. (B) Esquema das reações de PCR realizadas, com os referentes produtos esperados, sendo esperado no caso da PCR 1 um produto de 737 pb, para PCR 2 um produto de 2233 pb e para PCR 3, aproximadamente 1000 pb, que corresponde a presença do gene *tgh1-like*. Marcador: 1 Kb Plus (Invitrogen).

Após a confirmação da deleção de *tgh1-like*, a população foi clonada por diluição seriada e nos ensaios seguintes utilizamos dois clones, apesar dos dados aqui representados serem de apenas um dos clones.

Inicialmente, realizamos o ensaio de placa para avaliar se a ausência de *TgH1-like* poderia alterar os processos de invasão, replicação e evasão do parasita na célula hospedeira. Para isso 500 ou 1000 taquizoítas foram utilizados para infectar monocamadas de células HFF confluentes, que foram fixadas após quatro dias e coradas com Giemsa. O ensaio de placa baseia-se na premissa que após várias etapas de replicação dos taquizoítas, ocorre a lise da célula hospedeira liberando os parasitas, que utilizando o movimento de deslizamento atingem a célula hospedeira mais próxima, invadindo-a e se replicando novamente. Após sucessivos ciclos de replicação e lise celular, ocorre a formação de placas de lise visíveis a olho nu, e estas são analisadas quanto ao seu tamanho e quantidade.

Foram infectados poços em triplicata com diferentes quantidades (500 e 1000 parasitas), tanto com parasita controle, taquizoítas da cepa RH $\Delta hxgp\text{rt}\Delta ku80$, e parasitas $\Delta tgh1-like$.

Como forma representativa do resultado (figura 26), obtivemos imagens de um único poço em linha reta e sequencial nas duas condições do teste realizado, 500 e 1000 parasitas, tanto para parasitas controles (RH $\Delta hxgp\text{rt}\Delta ku80$), como parasitas $\Delta tgh1-like$. Em ambos os casos foi possível observar que os parasitas

Δtgh1-like resultaram em maior número de placas de lise e de tamanho singelamente maior em relação ao controle, indicando ou uma replicação mais rápida ou então maior virulência dos parasitas nocautes para *tgh1-like*.

A)

Δtgh1-like – 500 parasitas



Controle – 500 parasitas



B)

Δtgh1-like – 1000 parasitas



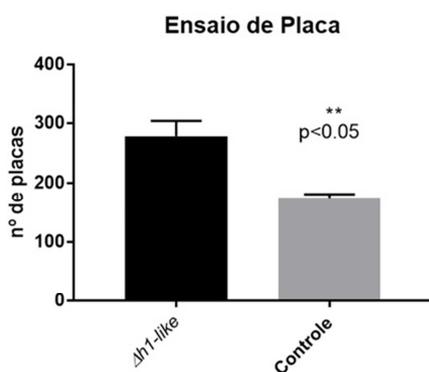
Controle – 1000 parasitas



Figura 26. Ensaio de placa. Imagem representativa obtida em linha reta e sequencial de um único poço nas diferentes condições do teste. Em (A) observamos as placas de lise formadas pela infecção de 500 taquizoítas e em (B) 1000 parasitas para infecção tanto de parasitas controle quanto nocaute (*Δtgh1-like*). É possível observar um aumento no número de placas de lise nos parasitas nocautes e de tamanho aparentemente maior em relação aos parasitas controle.

Para quantificar se houve aumento de número de placas, realizamos então a contagem das placas de lise. O experimento foi realizado em triplicata para cada condição (500 ou 1000 taquizoítas por poço). Os valores obtidos foram inseridos no software GraphPad Prism 7 para construção dos gráficos e análise estatística, onde foi utilizado o teste t para amostras independentes com o intuito de verificar se há diferença significativa entre a amostra controle e *Δtgh1-like* (figura 27).

A) 500 parasitas



B) 1000 parasitas

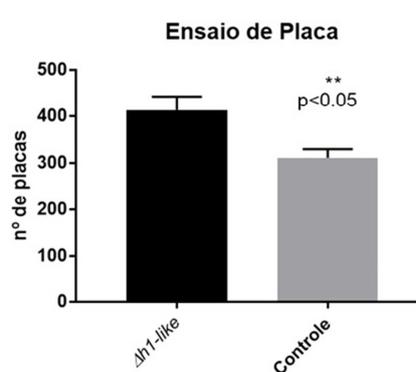


Figura 27. Comparação do número de placas entre *Δtgh1-like* e parasitas controles. O número de placas de lise resultantes da infecção com parasitas *Δtgh1-like* ou controle (RH *ΔhxxprtΔku80*) observada para cada condição, em triplicata, foi contado manualmente. A análise estatística foi realizada utilizando teste t, indicando

que os parasitas *Δtgh1-like* possuem um número de placas de lise significativamente maior em relação ao controle.

No ensaio com 500 parasitas obtivemos uma média de 278 placas de lise para *Δtgh1-like* e 175 placas de lise para o controle, e um valor de $p=0,0024$ e para 1000 parasitas, média de 413 placas de lise para *Δtgh1-like* e 311 placas de lise para o controle e $p=0,0071$. A diferença entre as médias das populações é significativamente diferente quando $p<0,05$, o que confirma que os parasitas nocautes para *tgh1-like* possuem um número significativamente maior de placas de lise. Esse resultado sugere que a ausência de TgH1-*like* pode estar alterando a replicação ou invasão do parasita, que acarreta em maior número de placas de lise nos parasitas nocaute.

Para avaliar se *Δtgh1-like* possui um tempo de replicação diferente que o controle, verificamos a quantidade de parasitas por vacúolo. Para tanto, realizamos ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo primário anti-IMC (*Inner Membrane Complex*), que reconhece uma proteína presente no complexo de membranas interno de *T. gondii*, de modo a facilitar a quantificação do número de parasitas por vacúolo (figuras 28 e 29). O ensaio foi realizado nas mesmas condições de tempo de incubação e quantidade de parasitas (10^5 parasitas), tanto para *Δtgh1-like* como para o controle.

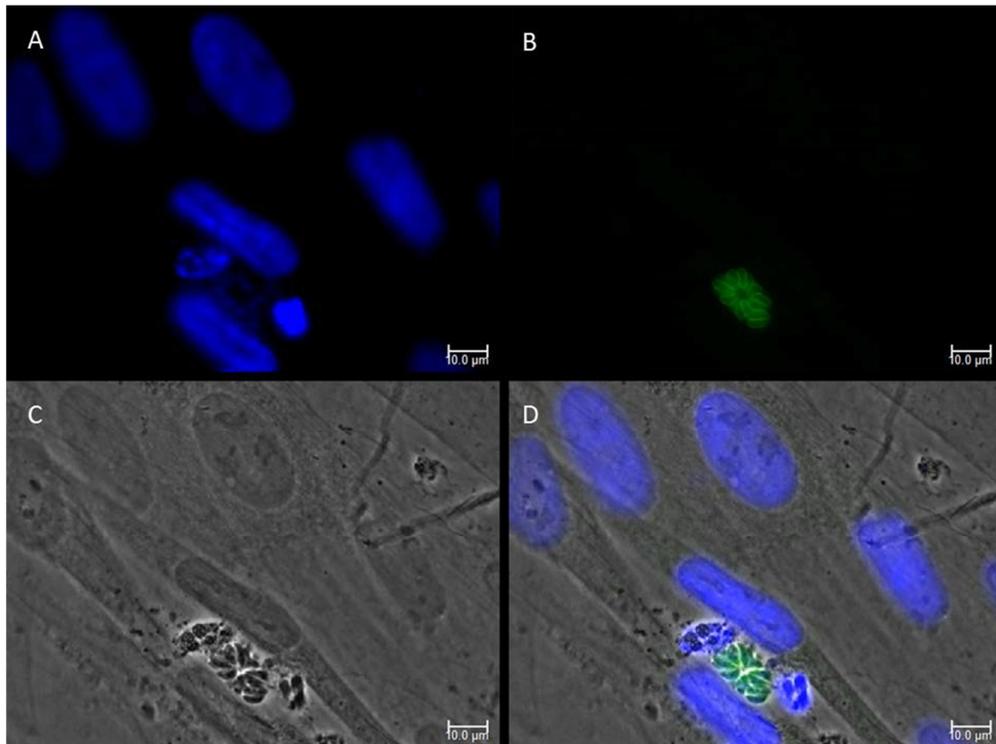


Figura 28. Imunofluorescência indireta dos parasitas controles. Parasitas da cepa RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 8 0$ foram utilizados como controle. (A) Marcação do apicoplasto e núcleos dos parasitas e das células hospedeiras coradas com DAPI. (B) Marcação obtida utilizando anti-IMC. (C) Contraste de fase mostrando vacúolo contendo as formas taquizoítas em células HFF. (D) Sobreposição do contraste de fase, IMC e DAPI.

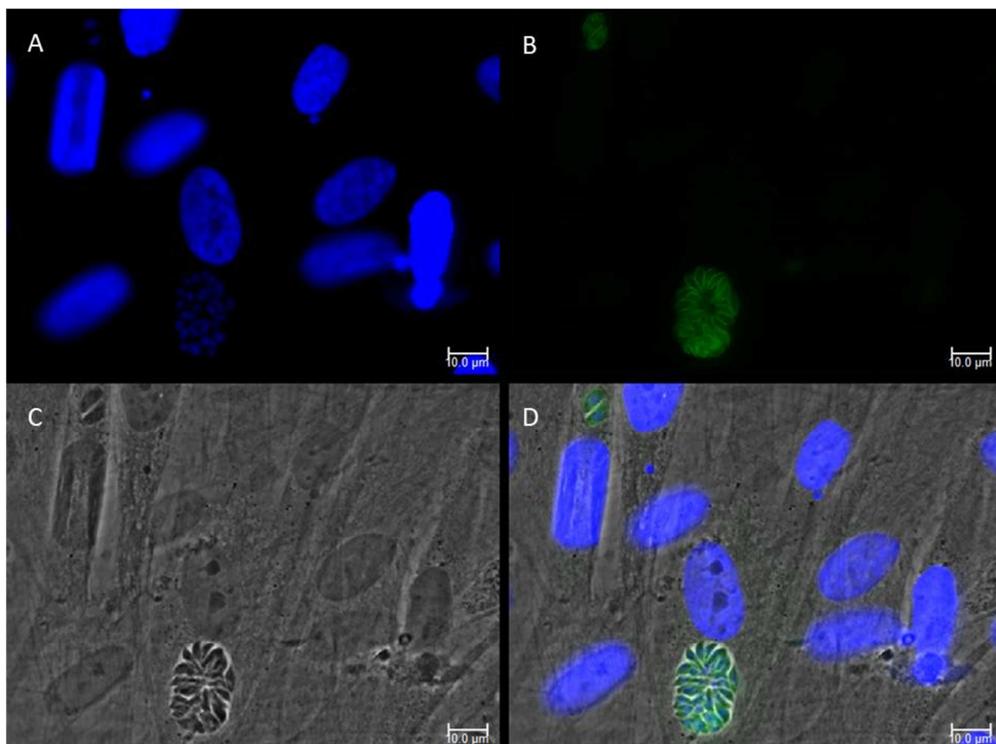


Figura 29. Imunofluorescência indireta dos parasitas nocautes para *tgh1-like*. (A) Marcação do núcleo dos parasitas e das células hospedeiras coradas com DAPI. (B) Marcação em verde para IMC. (C) Contraste de fase mostrando vacúolo contendo as formas taquizoítas em células HFF. (D) Sobreposição do DAPI, IMC e contraste de fase.

Foi possível observar que os parasitas nocautes (figura 29), apresentam vacúolo com um número maior de parasitas, quando comparado com os parasitas

controles (figura 28). De qualquer forma, esses dados são preliminares, e esse experimento deve ser repetido para confirmação e quantificação dos resultados e análises adicionais devem ser realizadas para responder como o nocaute de *TgH1-like* afeta a replicação do parasita.

5. DISCUSSÃO

A cromatina é a principal barreira que regula processos dependentes de DNA, como a transcrição e a replicação, alternando a estrutura de acordo com o estado da célula. Genes silenciados são localizados em regiões de cromatina densa, a heterocromatina, enquanto que genes ativos estão localizados em regiões de cromatina descompactada, a eucromatina. A mudança nos níveis de expressão de certos genes requer à célula a alternância nos níveis de compactação da cromatina, ou seja, quando um gene presente em regiões de heterocromatina necessita ser expresso, é necessário que haja um remodelamento da cromatina, descompactando essas regiões, tornando a dupla fita de DNA acessível às maquinarias transcricionais. Esta alternância dos níveis de compactação da cromatina é regulada principalmente por histonas e suas modificações pós traducionais (OLINS; OLINS, 2003; VENKATESH; WORKMAN, 2015).

Toxoplasma gondii possui as quatro histonas canônicas (H3, H4, H2A, H2B), além de histonas variantes, mas até o momento a quinta histona (H1) não foi identificada (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; NARDELLI et al., 2013, 2015). Em outros eucariotos, a histona H1 ou histona-*linker*, é componente chave da cromatina, estabilizando a estrutura do nucleossomo, possuindo papel importante na formação da heterocromatina e na fibra de 30 nm da cromatina. Em metazoários, as histonas H1 são proteínas de aproximadamente 200 aminoácidos, possuindo estrutura contendo uma pequena cauda N-terminal, um domínio globular central e uma longa e extremamente básica cauda C-terminal rica em lisinas. A região do domínio globular é a mais conservada entre os subtipos de H1 e a cauda C-terminal a mais divergente (HARSHMAN et al., 2013; HERGETH; SCHNEIDER, 2015; RAMAKRISHNAN et al., 1993; ROQUE et al., 2005).

Em eucariotos inferiores, são encontradas proteínas similares à histona-*linker* (H1-*like*), com uma estrutura diferente, mas possui funções relacionadas. Em *S. cerevisiae*, a H1-*like*, Hhop1p, possui dois domínios globulares enquanto que, em *Tetrahymena* e tripanosomatídeos a histona H1 é similar apenas à porção C-terminal da H1 de metazoários, não apresentando um domínio globular. A proteína hipotética de interesse em nosso estudo, a qual denominamos TgH1-*like*, chamou a atenção por apresentar 56,76% de identidade com a histona H1 de *T. brucei*, além de ser uma proteína extremamente básica com cerca de 9 kDa, possuindo uma sequência rica em lisinas, e similar a cauda C-terminal de uma histona H1 típica (BURRI et al., 1993; HAYASHI; HAYASHI; IWAI, 1987; PATTERTON et al., 1998).

A histona H1 é a menos conservada evolutivamente do que as demais histonas, como já citado anteriormente, sendo que a homologia de sequência da H1 de *S. cerevisiae* e *Homo sapiens* é de 31% de identidade e 44% de similaridade. Em contraste, em eucariotos superiores como *Gallus gallus* (galo), a histona-linker de eritrócito, H5, possui uma homologia de 66% com a histona humana H1.0, sendo que a porção com maior divergência é encontrada na região C-terminal, que possui importante papel na compactação da cromatina (HARSHMAN et al., 2013). A H1 de tripanossomatídeos também é pouco conservada com a histona H1 de humanos (DA CUNHA et al., 2005; KASINSKY et al., 2001; POVELONES et al., 2012), e dada a alta similaridade da H1 de *T. brucei* e TgH1-like caracterizada nesse trabalho, é possível que essa proteína também seja uma H1 atípica, como ocorre em outros eucariotos inferiores.

A histona H1 de *T. brucei* possui um único domínio, rico em resíduos de lisina, alanina e prolina e apesar de não possuir domínios com funções importantes em outros eucariotos como o domínio globular, a H1 de *T. brucei* auxilia na formação da heterocromatina. Em contrapartida, a histona H1 de *T. brucei* mostrou uma afinidade mais fraca com a cromatina do que as histonas do core de histonas e está relacionada à regulação de genes transcritos pela *RNA polimerase I*. A H1 de *T. cruzi* também apresenta menor afinidade pela cromatina, mas seu papel ainda é incerto. Acredita-se que ela possa estar envolvida na organização da cromatina do nucléolo, e quando fosforilada, modula o ciclo celular do parasita. Em *Leishmania*, a histona H1 também não possui um domínio globular e demonstrou papel na compactação da cromatina (BURRI et al., 1993; DA CUNHA et al., 2005; GUTYAMA; CHAGAS DA CUNHA; SCHENKMAN, 2008; MASINA et al., 2007; PENA et al., 2014; POVELONES et al., 2012).

Pouco se sabe sobre como essa proteína interage com a cromatina, mas experimentos recentes indicam que o domínio globular se liga no sítio de entrada e saída do DNA no nucleossomo e que a porção C-terminal é a região que mais interage com o DNA na cromatina. Em estudo utilizando microscopia eletrônica de amostras crio preservadas, mostrou-se que a maior parte do domínio globular da histona H1 aponta para fora das unidades estruturais, permitindo uma associação H1-H1 entre as unidades nucleossômicas e transmite uma torção adicional entre cada unidade estrutural, o que nos mostra que o domínio globular também está diretamente relacionado com a formação da fibra de 30 nm. Desta forma, é possível relacionar a não formação da típica fibra de 30 nm em organismos como os

tripanosomatídeos, com a ausência do domínio globular da histona H1, o que leva a uma fraca interação com a cromatina. Já foi constatado *in vitro*, que polinucleossomos formam a fibra de 30 nm somente na presença de altas forças iônicas ou da histona H1, mas esse dado foi constatado apenas com histonas H1 típicas que possuem o domínio globular, e nenhum dado até o momento demonstrou como uma H1-*like* interage com a cromatina (BEDNAR et al., 2017; CHEN; ZHU; LI, 2014; THOMA; KOLLER; KLUG, 1979).

Aparentemente, *T. gondii* também não forma fibra de 30 nm, ou cromossomos visíveis. Além disso, parece possuir uma fraca interação com a cromatina, pois observamos sua fácil liberação do núcleo quando realizamos o fracionamento celular, o que também poderia estar relacionado com a falta de um domínio globular na possível histona H1 de *T. gondii*, TgH1-*like*.

Em análises *in silico*, a modelagem estrutural de TgH1-*like* mostrou uma estrutura simples contendo cinco estruturas do tipo alfa-hélice. Em estudos estruturais da histona H1, já foi visto que a porção C-terminal é intrinsecamente desordenada, mas adquire uma estrutura amplamente dobrada após a sua interação com o DNA, mostrando que essa estrutura é bastante versátil e que a estrutura pode sofrer alterações quando ligada ao DNA. Além disso, TgH1-*like* apresentou um potencial eletrostático bastante positivo, o que justificaria uma atração pelas cargas negativas da dupla fita de DNA. Finalmente, obtivemos correspondência com modelo teórico de histonas, como a histona H1b, em análise através do servidor ProFunc, que auxilia a encontrar a possível função de proteínas através da análise da sua estrutura, sugerindo uma provável função de histona para TgH1-*like* (HANSEN et al., 2006; HERGETH; SCHNEIDER, 2015; LASKOWSKI; WATSON; THORNTON, 2005).

Para iniciar a caracterização de TgH1-*like*, realizamos o etiquetamento da proteína endógena, que nos mostrou uma proteína de aproximadamente 20 kDa mesmo após tratamento com agentes redutores.

As histonas H1, assim como outras histonas, são alvos de modificações pós traducionais e um grande número de novas MPTs têm sido revelados com análises de espectrometria de massas. As principais modificações encontradas em histonas H1 são fosforilação, acetilação, metilação e ubiquitinação (HAPPEL; DOENECKE, 2009; IZZO; SCHNEIDER, 2015). Recentemente foram identificados diversos sítios de ubiquitinação em proteínas de *T. gondii*, e TgH1-*like* está entre elas, resultando na adição de cerca de 8 kDa, o que poderia ser uma explicação para o tamanho da

proteína (MONERRI et al., 2015). Até o momento, a função da ubiquitinação em histonas ainda é muito divergente, mas estudos relatam o importante papel desta MPT na regulação transcricional, e relatam que esse efeito estaria sendo mediado por outra MPT, a metilação, evidenciando um *crosstalk* entre metilação e ubiquitinação de histonas (ZHANG, 2003). Em histonas de *T. gondii*, há uma relação entre a ubiquitinação com regulação transcricional e reparo de DNA. A fosforilação é a MPT mais bem caracterizada em histonas H1, e esta MPT também já foi descrita em TgH1-*like* no banco de dados de *T. gondii*. Até o momento, apenas um sítio de fosforilação foi identificado, na serina 43, em taquizoítas intracelulares, porém outros resíduos podem sofrer fosforilação em outras condições não avaliadas nesse estudo. Além disso, 78% de proteínas ubiquitinadas em *T. gondii*, também são fosforiladas, mostrando que essas MPT podem estar relacionadas (MONERRI et al., 2015). Sítios de metilação ainda não foram identificados, mas uma questão levantada em nosso grupo é se essa proteína possui outras MPT e como elas estariam influenciando a estrutura da cromatina e regulando a expressão de genes. Essas evidências que justificariam o maior tamanho da proteína etiquetada, ainda deverão ser confirmadas por ensaios de espectrometria de massas, onde será possível também verificar se há outras MPT em TgH1-*like*.

Em relação à localização de TgH1-*like*, através de ensaios de imunofluorescência observamos sua co-localização com o núcleo do parasita, sendo o esperado tratando-se de uma histona que auxilia na compactação da cromatina. Interessantemente, parasitas em fase de mitose, parecem apresentar maior intensidade, quando comparadas com parasitas em G1/S. Essa maior intensidade parece estar acumulada na periferia nuclear, uma região comumente associada a genes silenciados e telômeros, regiões de cromatina mais densa, o que requer mais histonas, e que conseqüentemente refletiria em uma maior intensidade de fluorescência.

A fim de confirmar a localização nuclear e se TgH1-*like* esta associada a cromatina, recorreremos ao fracionamento celular seguido de extração ácida. Albrecht Kossel, em 1884 deu o nome de histonas às proteínas nucleares solúveis em meio ácido. Desde então, protocolos de isolamento de histonas por extração ácida tem sido utilizados, e permitem o enriquecimento de histonas com mínima contaminação por DNA, RNA e proteínas não histonas (NARDELLI et al., 2015; OLINS; OLINS, 2003). Quando realizamos o isolamento de histonas dos parasitas transfectantes com a etiqueta de HA por essa metodologia, observamos a presença de TgH1-*like*

juntamente com a histona H4 no isolado de histonas, após extração ácida de proteínas associadas ao DNA. Esse dado nos dá mais um indício do potencial de histona dessa proteína. Além disso, em ensaios de co-imunoprecipitação foi possível verificarmos que TgH1-*like* interage com a histona H4, fortalecendo ainda mais nossa hipótese de que esta proteína trata-se de uma histona. Embora promissor, há diversas proteínas não histonas ligadas ao DNA, como fatores transcricionais e remodeladores de cromatina. Outros métodos podem ser utilizados para determinar se trata de uma histona H1, grande parte deles ensaios bioquímicos *in vitro*, como reconstituição do nucleossomo ou adição de histonas recombinantes ao DNA para verificação da sua atividade na compactação da cromatina.

A imunoprecipitação de TgH1-*like* está sendo padronizada com o intuito de identificar proteínas parceiras e posteriormente, as possíveis MPTs. Em protocolo já testado, não obtivemos o enriquecimento de TgH1-*like* quando observamos o gel corado com nitrato de prata, mesmo verificando sua presença no imunoprecipitado por western blot. Apesar disso, observamos um padrão de proteínas de baixo peso molecular similar ao padrão formado pelas histonas de *T. gondii*. Essa observação nos chamou a atenção, mas trata-se apenas de uma especulação. O protocolo está sendo adaptado e os dados de espectrometria de massas irão nos dar mais detalhes sobre as proteínas que interagem com TgH1-*like* e de suas MPT (NARDELLI et al., 2013).

Em estudo recente, onde foi feito nocaute em larga escala pela metodologia CRISPR-Cas9 em *Toxoplasma*, os resultados sugerem que TgH1-*like* não é essencial a sobrevivência do parasita (SIDIK et al., 2016; ToxoDB.org). Sendo assim, optamos pela obtenção de parasitas nocautes pela metodologia de nocaute clássico, para analisar se TgH1-*like* afeta a estrutura da cromatina e se possui funções relacionadas a regulação da expressão gênica.

Diversas são as funções atribuídas à histona H1 nos últimos tempos, inicialmente acreditava-se que a H1 possuía uma função apenas estrutural na cromatina, mas hoje já se sabe que a histona H1 possui diversos papéis na regulação da expressão gênica e reparo de DNA, já citados anteriormente. Além disso, a H1 já mostrou estar envolvida no controle da replicação, e em humanos essa histona já foi relacionada com algumas doenças, mostrando que os níveis de expressão dessa proteína são alterados em casos como o câncer, Alzheimer, doenças autoimunes e também na infertilidade masculina (FYODOROV et al., 2017; HERGETH; SCHNEIDER, 2015; YE et al., 2017).

No protista *Physarum polycephalum*, a histona H1 mostrou ser um regulador essencial do tempo de replicação, onde o *knock-down* da proteína aumentou a acessibilidade ao DNA, fazendo com que as células se repliquem mais rapidamente, além de que a H1 é transientemente perdida durante a replicação por um processo facilitado pela fosforilação, levando a uma estrutura de cromatina mais favorável à replicação (FYODOROV et al., 2017; THIRIET; HAYES, 2009). Fato similar foi visto nos parasitas nocautes para TgH1-*like* obtidos neste estudo, onde foi observado um crescimento mais rápido dos parasitas em cultura e com vacúolos possuindo um número maior de parasitas, evidenciando uma alteração no ciclo celular. Esses dados devem ser repetidos para confirmação, pois apesar de ter sido realizado em triplicata, trata-se de um experimento único.

De modo geral, nossos dados até o momento nos deixam confiantes quanto ao papel de TgH1-*like* como uma histona H1, apesar de outras abordagens se mostrarem necessárias para confirmarmos o seu papel neste parasita. A histona H1 auxilia na compactação da cromatina e estando ela ausente em *T. gondii*, poderia interferir na estrutura da cromatina, além da alteração de processos dependentes de DNA, como mecanismos de reparo, transcrição e replicação. Pouco se sabe sobre a organização da cromatina e o controle transcricional deste parasita, mas sabe-se que possui uma maquinaria epigenética complexa, sugerindo uma regulação tão refinada como em eucariotos superiores. A arquitetura da cromatina fornece a base estrutural para a regulação epigenética, como as modificações em histonas e compreender como encontra-se a estrutura da cromatina em *Toxoplasma*, e a existência da histona-*linker*, auxiliaria no entendimento da arquitetura da cromatina, e dos processos associados ao DNA, como a regulação da expressão gênica em *T. gondii*.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, identificamos e iniciamos a caracterização de uma possível histona H1 em *T. gondii*, a qual denominamos TgH1-*like*. Através de análises *in silico*, verificamos que essa proteína é extremamente básica, possuindo uma sequência rica em lisinas, sendo similar à histona H1 de *Kinetoplastidae* e similar apenas à porção C-terminal de uma histona H1 típica. Além disso, a proteína apresenta um potencial eletrostático bastante positivo, característico de histona e em relação à predição de função, obtivemos correspondência com modelos de histona.

Utilizando ferramentas de genética reversa para caracterização de TgH1-*like*, realizamos o etiquetamento da proteína endógena, onde verificamos uma localização exclusivamente nuclear. Em ensaio de Western blot observamos uma proteína maior do que o esperado, com massa molecular de aproximadamente 20 kDa o que possivelmente está relacionado a modificações pós traducionais.

A proteína TgH1-*like* mostrou estar fracamente associada à cromatina e presente em fração de isolado de histonas, além de mostrar interação com outras histonas como a histona H4, quando analisado por ensaio de co-imunoprecipitação.

Os parasitas nocautes apresentaram um crescimento em cultura mais rápido e vacúolos com um número maior de parasitas quando comparado ao controle, onde de forma preliminar, indica uma alteração na replicação do parasita.

Os resultados obtidos neste trabalho foram promissores e ensaios adicionais devem ser realizados, como a análise da estrutura da cromatina dos parasitas nocautes, mostrando se há ou não a alteração na compactação da cromatina nesses parasitas, além de verificar como essa proteína pode estar regulando a replicação de *T. gondii*. Estamos ainda, realizando a imunoprecipitação da proteína para verificar as proteínas parceiras e possíveis MPT que possam estar ocorrendo.

De modo geral, esperamos confirmar o papel dessa proteína como histona H1 de *T. gondii*, fornecendo mais informações quanto a organização da cromatina do parasita.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, K.; HENIKOFF, S. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. **PNAS**, v. 99, n. 10, p. 16477–16484, 2002.

AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. Toxoplasma gondii genomics: Shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2001.

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da Célula*. **Porto Alegre: Artmed**, 2010.

BEDNAR, J. et al. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. **Molecular Cell**, v. 66, n. 3, p. 384–397.e8, 2017.

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.

BOGADO, S. S. et al. Canonical histone H2Ba and H2A.X dimerize in an opposite genomic localization to H2A.Z/H2B.Z dimers in Toxoplasma gondii. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 197, p. 36–42, 2014.

BONENFANT, D. et al. Characterization of Histone H2A and H2B Variants and Their Post-translational Modifications by Mass Spectrometry *. **Molecular & Cellular Proteomics** 5.3, p. 541–552, 2006.

BOUGDOUR, A. et al. Host cell subversion by Toxoplasma GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 4, p. 489–500, 2013.

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

BURRI, M. et al. Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic Trypanosoma brucei brucei. **Parasitology Research**, v. 79, p. 649–659, 1993.

BUSCHBECK, M.; HAKE, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 5, p. 299–314, 2017.

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.

CHEN, P.; ZHU, P.; LI, G. New insights into the helical structure of 30-nm chromatin fibers. **Protein & cell**, v. 5, n. 7, p. 489–491, 2014.

CHIRGWIN, K. et al. Randomized Phase II Trial of Atovaquone with Pyrimethamine or Sulfadiazine for Treatment of Toxoplasmic Encephalitis in Patients with Acquired

Immunodeficiency Syndrome : ACTG 237 / ANRS 039 Study. **HIV/AIDS**, v. 34, p. 1243–1250, 2002.

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.

DA CUNHA, J. P. C. et al. Trypanosoma cruzi histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 75–86, 2005.

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.

DIXON, S. E. et al. A decade of epigenetic research in Toxoplasma gondii. **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 Phosphoribosyltransferase Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14010–14019, 1996.

DOWNS, J. A. et al. Suppression of Homologous Recombination by the Saccharomyces cerevisiae Linker Histone. **Molecular Cell**, v. 11, p. 1685–1692, 2003.

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.; JONES, J. L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

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.; BUSSELBERG, 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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FYODOROV, D. V. et al. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin

structure and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2017.

GUERINA, N. et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 26, p. 1858–1863, 1994.

GUTTIYAMA, L. M.; CHAGAS DA CUNHA, J. P.; SCHENKMAN, S. Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 4, p. 560–568, 2008.

HANSEN, J. C. et al. Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1853–1856, 2006.

HAPPEL, N.; DOENECKE, D. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. **Gene**, v. 431, n. 1–2, p. 1–12, 2009.

HARSHMAN, S. W. et al. H1 histones: current perspectives and challenges. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 21, p. 9593–9609, 2013.

HAYASHI, T.; HAYASHI, H.; IWAI, K. Tetrahymena Histone H1. Isolation and Amino Acid Sequence Lacking the Central Hydrophobic Domain Conserved in Other H1 Histones. **J. Biochem.**, v. 102, p. 369–376, 1987.

HELLAUER, K.; SIRARD, E.; TURCOTTE, B. Decreased Expression of Specific Genes in Yeast Cells Lacking Histone H1 *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13587–13592, 2001.

HERGETH, S. P.; SCHNEIDER, R. The H1 linker histones : multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. **EMBO reports**, v. 16, n. 11, p. 1439–1453, 2015.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis : Reston, Va. **U.S. Geological Survey Circular 1389**, 2014.

HOLLAND, G. N. Reconsidering the Pathogenesis of Ocular Toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 128, n. 4, p. 502–505, 1999.

HSU, P.; GROER, M.; BECKIE, T. New findings : Depression , suicide , and *Toxoplasma gondii*. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 0, p. 1–9, 2014.

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.

IZZO, A.; KAMIENIARZ, K.; SCHNEIDER, R. The histone H1 family : specific members , specific functions ? **Biol. Chem.**, v. 389, p. 333–343, 2008.

IZZO, A.; SCHNEIDER, R. The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica**

Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, v. 1859, n. 3, p. 486–495, 2015.

JO, S. et al. PBEQ-Solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules. **Nucleic acids research**, v. 36, p. 270–275, 2008.

KASINSKY, H. E. et al. Origin of H1 linker histones. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 1, p. 34–42, 2001.

KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome : From Genomic Organization to Genomic Regulation. **Cell**, v. 116, p. 259–272, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANDSMAN, D. Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved? **Elsevier Science**, v. 4, n. August, p. 287–288, 1996.

LASKOWSKI, R. A.; WATSON, J. D.; THORNTON, J. M. ProFunc: A server for predicting protein function from 3D structure. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 89–93, 2005.

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

LOYOLA, A. Marking histone H3 variants : How , when and why ? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 9, 2007.

LU, X. et al. Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development , the establishment of pericentric heterochromatin , and a normal polytene chromosome structure. **Genes & Development**, v. 23, p. 452–465, 2009.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251–60, 1997.

MALIK, H. S.; HENIKOFF, S. Phylogenomics of the nucleosome. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 882–891, 2003.

MARIÑO-RAMÍREZ, L. et al. Histone structure and nucleosome stability. **Expert Rev Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 719–729, 2005.

MASINA, S. et al. Histone H1 regulates chromatin condensation in *Leishmania* parasites. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 83–87, 2007.

MERRILL, P. T. et al. Uveitis in the southeastern United States. **Current Eye Research**, 1996.

MOLDEN, R. C. et al. Multi-faceted quantitative proteomics analysis of histone H2B isoforms and their modifications. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 15, 2015.

MONERRI, N. C. S. DE et al. The Ubiquitin Proteome of *Toxoplasma gondii* Reveals Roles for Protein Ubiquitination in Cell-Cycle Transitions. **Cell Host and Microbe**, v.

18, n. 5, p. 621–633, 2015.

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

MOOSMANN, A. et al. Histone variant innovation in a rapidly evolving chordate lineage. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, 2011.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 1, p. 21–38, 2002.

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.

NARDELLI, S. C. et al. Techniques to Study Epigenetic Control and the Epigenome in Parasites. In: **Parasite Genomics Protocols: Second Edition**. [s.l.: s.n.]. v. 1201p. 177–191.

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

OAKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R.; MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 105, n. 1, p. 361–363, 1980.

OLINS, D. E.; OLINS, A. L. Chromatin history: our view from the bridge. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. October, p. 809–814, 2003.

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.

PATTERTON, H. G. et al. The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7268–7276, 1998.

PENA, A. C. et al. *Trypanosoma brucei* histone H1 inhibits RNA polymerase I transcription and is important for parasite fitness in vivo. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 645–663, 2014.

POVELONES, M. L. et al. Histone H1 Plays a Role in Heterochromatin Formation and VSG Expression Site Silencing in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, 2012.

PUSARLA, R.; BHARGAVA, P. Histones in functional diversification Core histone variants. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5149–5168, 2005.

RAMAKRISHNAN, V. et al. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. **Nature Publishing Group**, v. 362, p. 219–223, 1993.

- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.
- ROQUE, A. et al. DNA-induced Secondary Structure of the Carboxyl-terminal Domain of Histone H1 *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 37, p. 32141–32147, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D, W. **Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual** Cold Spring Harboc Laboratory Press, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>>
- SIDIK, S. M. et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1423–1435.e12, 2016.
- SIEGEL, T. N. et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in Trypanosoma brucei. **Genes & Development**, p. 1063–1076, 2009.
- SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 244–248, 2005.
- SOUZA, W. DE; MARTINS-DUARTE, É. S.; LEMGRUBER, L. Organização estrutural do taquizoíto de Toxoplasma gondii. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131–143, 2010.
- SZOSTAK, J. W. et al. The double-strand-break repair model for recombination. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 1983.
- SPLENDORE, 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.
- TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Histone variants ancient wrap artists of the epigenome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 264–275, 2010.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–58, 2000.
- THERIZOLS, P. et al. Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1238–1242, 2014.
- THIRIET, C.; HAYES, J. J. Linker histone phosphorylation regulates global timing of replication origin firing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2823–2829, 2009.
- THOMA, F.; KOLLER, T. H.; KLUG, A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. **Journal Cell Biology**, v. 83, n. November, p. 403–427, 1979.
- TREECK, M. et al. The Phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and

Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 4, p. 410–419, 2011.

TORO, G.C.; GALANTI, N. Trypanosoma cruzi histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. **Biochem Int**, v. 21, p. 481-490, 1990.

UPADHYA, R. et al. Improved Techniques for Endogenous Epitope Tagging and Gene Deletion in Toxoplasma gondii. **J Microbiol Methods Microbiol Methods**, v. 50, n. 4, p. 652–661, 2011.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange , chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 3, p. 178–189, 2015.

YE, X. et al. Linker histone in diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1008–1018, 2017.

ZHANG, Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination.pdf. **Genes & Development**, v. 17, p. 2733–2740, 2003.