

Sheila Cristina Nardelli

Estudo das acetilações na histona H4 de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Sheila Cristina Nardelli

Estudo das acetilações na histona H4 de *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Schenkman

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Nardelli, Sheila Cristina

Estudo das acetilações na histona H4 de *Trypanosoma cruzi* Sheila Cristina Nardelli- São Paulo, 2010.
xiv, 116f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: Study of histone H4 acetylation in *Trypanosoma cruzi*.

1. *Trypanosoma cruzi*; 2. Histona; 3. Acetilação; 4. Dano de DNA.

Trabalho realizado na Disciplina de Biologia Celular, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

(Friedrich Nietzsche)

A minha família que sempre apoiou meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Joice e Naldir e minha irmã Greice, por tudo! Nem vou começar a descrever tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês sabem que essa tese não aconteceria se não fosse por vocês.

Ao meu orientador, Dr. Sergio Schenkman, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança depositada. Trabalhar com ciência nunca foi tarefa fácil, mas facilita poder contar com um excelente profissional ao nosso lado.

A Teresa pela amizade, pelos conselhos (principalmente nas segundas-feiras), pelo apoio e pelo exemplo de dedicação e otimismo.

A Janete pelo carinho, amizade e companheirismo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, seja na hora de transferir um blot, seja na hora de jogar conversa fora deitada na rede....

Ao Rafa... por ser um grande amigo. Obrigada pela contribuição em diferentes partes dessa tese, entre discussões, experimentos e revisão,... Agradeço pelo carinho, pela companhia, pelas idas ao ritorna. Obrigada por fazer desses 4 anos uma etapa cheia de boas lembranças...

Ao Mococa por estar sempre disposto a dar aquele abraço carinhoso nos momentos difíceis... Além disso, obrigada pela amizade, ajuda e pelos cafés! Boa sorte com as histonas!!!

A Renata por sempre confiar em mim, pela amizade, pela ajuda na montagem de apresentações, estatística... Não começamos muito com o pé direito, mas hoje sei que podemos contar uma com a outra para o que der e vier.

Ao Leo pela amizade e disposição em ajudar sempre. Você acrescentou um brilho extra no lab... a melhor aquisição, sempre!

A Fer, obrigada pela amizade e pela valiosa ajuda nesse trabalho (minipreps, PCRs e digestões, que sei que você adora!). Você é MARA!!!!

Ao Antonio pelo carinho, discussões de experimentos, apoio... e pelas histórias incríveis que você conta diariamente... elas realmente animam meu dia.

A Claudeci pela ajuda em tudo, seja compra, solução, ou ligar insistentemente para os vendedores quando a gente precisa MUITO daquele reagente. Obrigada pela amizade e pelo carinho (apesar de não entender o que você diz de vez em quando)...

Ao Claudio pela ajuda nas culturas, infecções, soluções... pelo apoio, por estar sempre disposto a ajudar... e pela paciência (e que paciência!!!!).

Ao Thiago pelo extenso conhecimento de computador e apoio sempre!

A Carla, pela ajuda em T. brucei e pelo carinho.

A Julia por tudo que me ensinou sobre as histonas... pela amizade, pelas discussões, pela ajuda sempre. Não preciso dizer que você foi peça chave no desenrolar dessa tese né!

A Carol Elias ... obrigada por compartilhar seus conhecimentos sobre organização nuclear, padronização de CHIP, pelo incentivo e amizade.

A Lud e a Van, por terem me ensinado tanto e por estarem sempre presente.

A Amanda pela amizade incondicional, pela parceria nas disciplinas, pela ajuda em experimentos e por tornar minha estada em SP muito mais animada!!!!

Aos melhores colaboradores do mundo: Vanina Villanova, Dani Passos-Silva e Bruno Schamber. Obrigada por fazer dessas colaborações momentos únicos, de grande aprendizado e contribuição mútua, que renderam amizades inestimáveis (além de artigos!!!).

Ao Dr. Carlos Renato Machado, por ter me recebido em seu laboratório, pelas contribuições e ensinamentos sobre reparo de DNA e pelo entusiasmo sempre presente. Gostaria de agradecer a todas as pessoas do seu grupo e aos amigos da UFMG pela ajuda e discussões de experimentos.

A amiga Dra. Maria Cristina Motta pelos experimentos de microscopia eletrônica e pela força carinho.

Aos secretários, Márcia, Cristiane, Marcelo e Mércia pela ajuda fundamental e pela amizade.

Aos professores da Disciplina de Biologia Celular, pelos ensinamentos, pelo coleguismo e por estarem sempre prontos a ajudar no que for necessário.

Aos técnicos da disciplina, Luisão, Maria, Rose e Américo, por tudo que vocês fazem diariamente por nós.

A todos os membros e ex membros do 8° andar, pela ajuda constante, discussões, empréstimos de reagentes, conversas de corredor e pelas inesquecíveis festinhas na copa.

A todos os amigos do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, professores, alunos, técnicos e secretários. Obrigada pela contribuição e apoio nessa jornada.

A todos os amigos da Fiocruz (PR e RJ), sempre dispostos a ajudar através da amizade ou conhecimentos em T. cruzi.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

*A todos vocês, **MUITO OBRIGADA!***

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
<hr/>	
RESUMO	xiii
<hr/>	
SUMMARY	xvi
<hr/>	
INTRODUÇÃO	1
<hr/>	
A cromatina	1
As histonas e as variantes de histonas	4
Modificações pós traducionais das histonas	7
<i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Expressão gênica em tripanossomatídeos	15
Cromatina de <i>T. cruzi</i>	18
Modificações pós traducionais das histonas de <i>T. cruzi</i>	20
Variantes de histonas	25
Reparo de DNA	27
Reparo de DNA em tripanossomas	29
<hr/>	
OBJETIVOS	32
Objetivos específicos	32
<hr/>	
CAPÍTULO 1:	33
“Distinct acetylation of <i>Trypanosoma cruzi</i> histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage”	

Resumo	33
Artigo	36
<hr/>	
CAPÍTULO 2: “O efeito das acetilações da histona H4 na resposta a agentes genotóxicos em <i>T. cruzi</i>”	49
RESUMO	49
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS	57
<hr/>	
CAPÍTULO 3: “<i>Trypanosoma cruzi</i> bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation”	73
Resumo	73
Artigo	75
<hr/>	
DISCUSSÃO GERAL	84
<hr/>	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
<hr/>	
APÊNDICE 1: Caracterização e obtenção dos anticorpos específicos anti-H4ac	111
MATERIAL E MÉTODOS	111
RESULTADOS	113
<hr/>	
APÊNDICE 2: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS	115

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1N1K1F – Um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo
- 1N1K2F - Um núcleo, um cinetoplasto e dois flagelos
- 1N2K2F - Um núcleo, dois cinetoplastos e dois flagelos
- 2N2K2F - Dois núcleos, dois cinetoplastos e dois flagelos
- Ac - Acetilada
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- ChIP – Imunprecipitação da cromatina (do inglês *Chromatin Immunoprecipitation*)
- CTD – Domínio carboxi terminal (do inglês *Carboxy Terminal Domain*)
- C-terminal – Porção carboxi terminal
- DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindole
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- dNTPs – Desoxiribonucleotídeo trifosfato
- FACS – Citômetro de fluxo (do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorter*)
- GFP – Proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*)
- Gy – Gray
- H4K4ac – Histona H4 acetilada na lisina 4
- H4K10ac – Histona H4 acetilada na lisina 10
- H4K14ac – Histona H4 acetilada na lisina 14
- H4K4R – Histona H4 com a lisina 4 substituída por arginina
- H4K10R – Histona H4 com a lisina 10 substituída por arginina
- H4K14R – Histona H4 com a lisina 14 substituída por arginina
- H4WT – Super-expressor da histona H4 sem substituições
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HAT – Histona acetiltransferase
- HDAC – histona deacetilase

HR- Recombinação homóloga (do inglês *Homologous Recombination*)

HU - Hidróxiuréia

IFI-Imunofluorescência indireta

Ig - Imunoglobulina

kDNA – DNA do cinetoplasto

LB – Meio Luria-Bertani

LIT – Infusão de Triptose e Fígado (do inglês *Liver Infusion Tryptose*)

ME – Mini éxon

M-Mitose

MPTs – Modificações pós traducionais

mRNA – RNA mensageiro

MS – Espectrometria de massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

N-terminal – Porção amino terminal

PAGE – Gel de poliacrilamida para eletroforese

pb – Pares de base

PBS – Tampão salino-fosfato

PCR – Reação em cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

RNA – Ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

SAC – Sem acetilação

SL – Sequencia líder (do inglês *Spliced Leader*)

snoRNPs – Pequenas ribonucleoproteínas nucleolares

TAU-PAGE – Gel de Triton- Acido acético- Úreia

UTR – Região não traduzida (do inglês *Untranslated Region*)

UV – Luz ultravioleta (do inglês *Ultraviolet Light*)

VSG – Glicoproteína variante de superfície (do inglês *Variable Surface Glycoprotein*)

RESUMO

As histonas de *Trypanosoma cruzi* são bastante divergentes quando comparadas aos demais eucariotos, principalmente na porção N-terminal, onde ocorrem modificações pós traducionais, que são reconhecidamente essenciais para o controle da expressão gênica e da arquitetura da cromatina. Entre estas modificações estão as acetilações das lisinas 4, 10 e 14 da histona H4 (H4K4ac, H4K10ac e H4K14ac). Nesta tese mostramos que a H4K4ac, que é a modificação mais abundante, está enriquecida em áreas de cromatina densamente compactada, enquanto H4K10ac e H4K14ac localizam-se em regiões de cromatina menos densa, preferencialmente na interface entre a eucromatina e a heterocromatina. H4K4ac diminui nas formas não replicativas e H4K14ac aumenta durante G2 e mitose do ciclo de divisão celular das formas replicativas. H4K10ac e H4K14ac aumentam e H4K4ac diminui no reparo de quebras de dupla fita do DNA. Ao mesmo tempo a superexpressão da proteína TcRad51, essencial para o processo de reparo de DNA por recombinação homóloga causa aumento de H4K10ac e H4K14ac. Quando as lisinas 4, 10 e 14 são substituídas separadamente por argininas (H4K4R, H4K10R e H4K14R) para evitar a acetilação são expressas, elas são incorporadas na cromatina e diminuem os níveis de cada modificação. A expressão de H4K4R tem uma distribuição diferente das histonas endógenas e H4K14R causa diminuição de crescimento, com células acumulando na fase de mitose. Os mutantes de H4K10 e H4K14 ainda apresentam maior mortalidade quando submetidos à radiação γ que causa quebra de dupla fita de DNA. Também mostramos que a proteína TcBDF2, uma proteína que contém bromodomínio, reconhece preferencialmente H4K10ac. A função da TcBD2 é desconhecida, mas verificamos que ela aumenta após exposição dos parasitas a luz UV, sugerindo que esteja participando no reparo de DNA. Esses dados juntos fornecem evidências de que cada uma das acetilações da histona H4 tem um papel distinto no *T. cruzi*. A acetilação em K4 estaria envolvida na montagem da

cromatina na fase de replicação. Já as modificações em K10 e K14 estariam envolvidas com processos específicos de remodelagem da cromatina durante os eventos de reparo e eventualmente transcrição do DNA.

SUMMARY

The *Trypanosoma cruzi* histones are very distinct from other eukaryotes, mainly in the N-terminus, where post translational modifications occur, which are essential for gene expression regulation and chromatin architecture. Among these modifications we found that lysines 4, 10 and 14 of H4 histone are acetylated (H4K4ac, and H4K10ac H4K14ac). In this thesis we show that the H4K4ac, which is the most abundant modification, is enriched in densely packed chromatin, while H4K10ac and H4K14ac are located in less dense chromatin, preferentially at the interface between euchromatin and heterochromatin. H4K4ac decreases in trypomastigote, which is the infective and non-dividing form of the parasite while H4K14ac increases during G2 and mitosis of the cell cycle in replicative forms. H4K10ac and H4K14ac increases during DNA repair of double stranded breaks while H4K4ac decreases after DNA damage. TcRad51, an essential protein in the homologous recombination pathway, when over-expressed, increases the H4K10ac and H4K14ac levels. When the lysines 4, 10 and 14 are individually replaced by arginine (H4K4R, H4K10R and H4K14R) to prevent the acetylation, they are still incorporated into chromatin and decrease the specific modification level. The H4K4R location is different from the endogenous H4K4ac and the H4K14R expression causes growth reduction, with cells accumulating in mitosis. Mutants H4K10R and H4K14R also have high mortality rates after γ irradiation that causes DNA double-stranded breaks. We also showed that TcBDF2 protein contains a bromodomain that recognizes preferentially H4K10ac. Although the TcBD2 function is unknown, it is increased after UV light exposure, suggesting its involvement in DNA repair. These data together provide evidence that each H4 acetylation has a distinct role in *T. cruzi*. Probably K4 is involved in chromatin assembly during replication while K10 and K14 acetylation appears to be involved in chromatin remodelling during DNA repair and maybe DNA transcription.

INTRODUÇÃO

A cromatina

Os estudos sobre a cromatina tiveram início aproximadamente em 1880, quando Walther Flemming sugeriu o nome cromatina a uma estrutura fortemente marcada com corantes básicos, nome este que é utilizado até hoje. Flemming também correlacionou a cromatina a estruturas parecidas com fios, encontradas no núcleo (que mais tarde, foram denominadas cromossomos). Nesse mesmo período foram identificados os ácidos nucléicos e as histonas, por Friedrich Miescher e Albrecht Kossel, respectivamente (Olins e Olins, 2003) (Fig. 1).

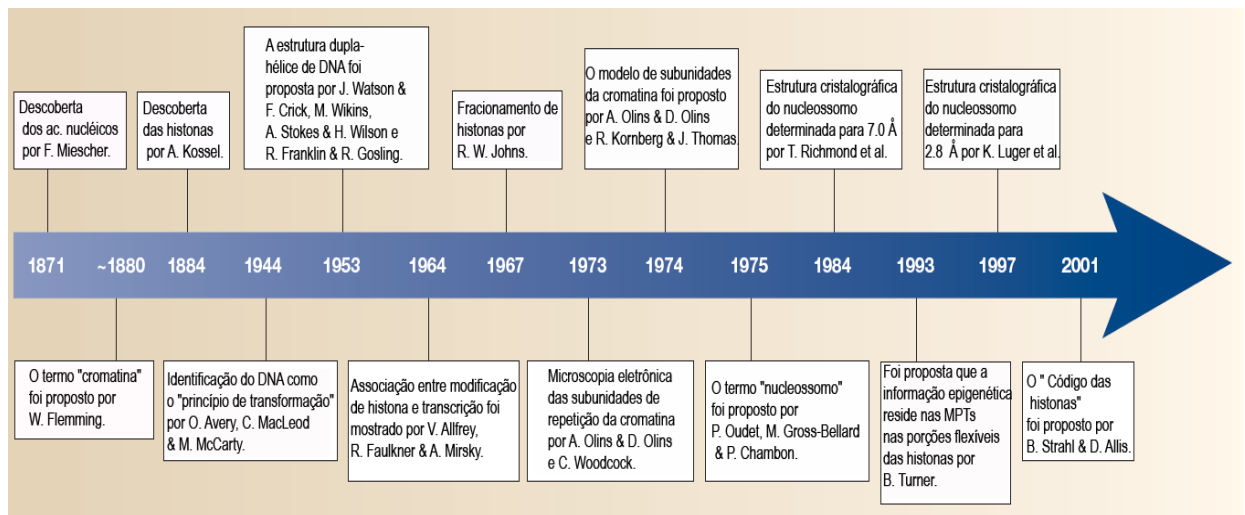


Figura 1: Cronologia da descoberta da cromatina (Fonte: Olins e Olins, 2009)

A cromatina é uma estrutura bem organizada e dinâmica, formada pela associação do DNA a proteínas extremamente básicas, as histonas. Duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4) formam o nucleossomo, que é tido como a unidade estrutural da cromatina. Para formação do nucleossomo, primeiramente é adicionado um tetrâmero formado por dois complexos entre a histona H3 e H4 (H3/H4)₂ que ocupam a região central do nucleossomo e 121 pb de DNA. Posteriormente, dois dímeros H2A/H2B associam-se nas regiões periféricas do nucleossomo totalizando

147 pb de DNA girado para a esquerda, somando 1,65 volta (Richmond e Davey, 2003) . Além das histonas centrais, os eucariotos apresentam uma histona adicional, a histona H1, conhecida como histona “linker”, que se liga ao nucleossomo protegendo cerca de 20 pb de DNA da atividade de nucleases e adicionando um maior grau de compactação à cromatina (Muyldermans et al., 1981).

O DNA se complexa com as histonas através de ligações iônicas entre seus grupos fosfatos negativos e as cadeias laterais de lisina e arginina das histonas que são positivas. A estrutura do nucleossomo é também estabilizada pela formação de pontes de hidrogênio entre os grupamentos fosfato e as cadeias laterais dos aminoácidos (Luger et al., 1997).

Inicialmente, acreditava-se que as porções N-terminais das histonais também se associavam ao DNA do nucleossomo adjacente, auxiliando a compactação da cromatina (Hong et al., 1993). No entanto, com a determinação da estrutura cristalográfica dos nucleossomos, foi observada a interação entre a porção N-terminal da histona H4 de um nucleossomo com o dímero H2A/H2B do nucleossomo adjacente, adicionando uma alternativa para compactação da cromatina (Luger et al., 1997) (Fig. 2). O nucleossomo é, portanto, o principal responsável pelo empacotamento do DNA, permitindo que um extenso polímero resida no limitado volume nuclear e conseqüentemente, restringindo o acesso a esse por complexos de ligação a DNA, que regulam uma série de processos como replicação, transcrição e reparo de DNA.



Figura 2: Estrutura do nucleossomo. A histona H2A está representada em laranja, a histona H2B em vermelho, a histona H3 em azul e H4 em verde. As cadeias de DNA estão representadas em verde-claro e laranja-claro. Nessa figura é possível observar as porções N-terminais das histonas expostas fora da estrutura. Fonte: Luger et al, 1997.

A cromatina pode se encontrar em diferentes níveis de compactação. Em um primeiro nível de compactação ela pode formar um arranjo linear de nucleossomos, ou “colar de contas” de espessura média de 10 nm. Um maior nível de compactação, com fibras de 30 nm, forma-se através da interação entre os próprios nucleossomos e é mediada pelas regiões flexíveis das histonas (regiões N e C-terminais), auxiliadas pela histona H1. Um maior nível de compactação é obtido através da interação fibra-fibra, que alguns autores denominam de estrutura do tipo cromonema, o que resulta em estruturas que variam de 60 a 300 nm de espessura. A existência desses níveis de compactação tem sido discutida nos últimos anos no sentido de se saber se as fibras de 10 e 30 nm existem *in vivo* ou se são geradas apenas em condições iônicas *in vitro*. Diversas revisões têm discutido este assunto e diversos trabalhos vêm tentando elucidar essa questão, ainda sem resposta definitiva (Horn e Peterson, 2002; Tremethick, 2007; Wu et al., 2007).

Além das histonas, diversas proteínas estão associadas às histonas promovendo alterações na estrutura secundária ou terciária da cromatina. Entre elas podemos citar: a) Swi/Snf que são complexos enzimáticos com atividade ATPásica, que catalisam o desenovelamento da cromatina, expondo o DNA; b) Proteínas de alta mobilidade (HMGN) que são proteínas ácidas que competem com a histona H1 pela ligação ao DNA, auxiliando na descompactação da cromatina; c) proteínas denominadas HP1, Polycomb, MENT, MeCP2, SIR3Pp que interagem com a cromatina e/ou com sítios específicos do DNA promovendo alterações na sua estrutura secundária e/ou terciária (McBryant et al., 2006; Postnikov e Bustin, 2010).

As histonas e as variantes de histonas

Embora sejam muitas as proteínas que contribuem para a arquitetura da cromatina, as histonas são consideradas as mais abundantes desse complexo, totalizando cerca de 50% da massa total da cromatina da célula (Alsford e Horn, 2004). Passado mais de um século desde seu descobrimento, as histonas continuam em foco devido ao mistério que envolve seus resíduos modificados e seu consequente envolvimento em vários processos, principalmente na regulação da expressão gênica.

Histonas são proteínas básicas, apresentando em torno de 123 ± 14 aminoácidos, peso molecular de $13,5 \pm 1,5$ kDa e ponto isoelétrico de $11 \pm 0,5$, consideradas exemplos de conservação entre as espécies. Nos eucariotos, todas as histonas apresentam um domínio central globular e regiões flexíveis que compreendem as porções N- e C-terminais (Khorasanizadeh, 2004).

Histona H1

A H1 é a histona mais divergente entre os organismos e possivelmente a que possui mais variantes (Izzo et al., 2008). Uma histona H1 típica apresenta 3 domínios: o domínio globular, considerado o mais conservado e no qual o DNA se associa, flanqueado pelas porções N- e C-terminais ricas em prolina, serinas, alaninas e lisinas,

consideradas as regiões mais variáveis. A porção C-terminal da histona H1 é considerada a principal responsável pela estabilidade da fibra de 30 nm. É incerto o número de histonas variantes para H1. A mais conhecida é a variante H5 encontrada em eritrócitos aviários, cujo domínio globular já foi cristalizado (Graziano et al., 1990) (para uma revisão completa ver (Izzo et al., 2008). Em levedura e *Tetrahymena* apenas uma histona H1 foi identificada. Em levedura a histona H1 contém dois domínios globulares, enquanto que *Tetrahymena*, não apresenta o domínio globular central (Landsman, 1996; Wu et al., 1986a).

Histonas H3 e H4

São consideradas as histonas mais conservadas, principalmente a histona H4. Pode-se dizer que de todas as histonas, a histona H4 é que mantém mais contatos com as demais histonas do octâmero, sendo esta talvez a explicação de tão alta conservação. Para esta histona, até o momento foram identificadas variantes em *Glycine max* (H4.1 e H4.2) (Wu et al., 2009) e tripanossomatídeos (H4v) (Siegel et al., 2009).

Em contrapartida, a histona H3 apresenta quatro variantes: H3.1, H3.2, H3.3 e CENPA, esta última assim chamada por ser a histona H3 centromérica. Ela é a mais diferente das histonas H3 variantes. H3.1, H3.2 e H3.3 são muito semelhantes, sendo que as duas primeiras diferem em apenas um aminoácido e H3.3 apresenta quatro aminoácidos diferentes de H3.1. Por outro lado, esses aminoácidos conferem uma função aparentemente distinta a essas variantes. Em *Drosophila* foi mostrado que enquanto que H3.3 está associada com cromatina transcricionalmente ativa e sua deposição não é acoplada à replicação do DNA, H3.1, assim como H3.2, apresentam sua deposição estreitamente relacionada a replicação (Ahmad e Henikoff, 2002). Além disso, H3.3 apresenta modificações pós traducionais, consideradas marcadores para cromatina transcricionalmente ativa, como di- e tri-metilação da lisina 4, acetilação da

lisina 9, 18 e 23 e metilação da lisina 79 (Ahmad e Henikoff, 2002;Loyola e Almouzni, 2007;Malik e Henikoff, 2003;McKittrick et al., 2004).

Histonas H2A e H2B

Entre as histonas do octâmero, as histonas H2A e H2B são consideradas as mais divergentes. A histona H2B apresenta o C-terminal conservado, enquanto que o N-terminal é bastante variável. Já na histona H2A, tanto o C, como o N-terminal são bastante variáveis. Vale destacar que a histona H2A é a única que apresenta uma porção de cerca de 37 aminoácidos da porção C-terminal exposta fora do nucleossomo (Khorasanizadeh, 2004). Essa histona também apresenta quatro variantes bastante conhecidas: H2AZ, que apresenta apenas 59% de identidade com a H2A convencional que está envolvida em diferentes funções dependendo do organismo. Essa variante pode atuar tanto na ativação quanto no silenciamento gênico, na compactação da cromatina e afetar a viabilidade celular (Pusarla e Bhargava, 2005). A macroH2A, uma outra variante, apresenta um domínio não histona e é específica de vertebrados. Está enriquecida no cromossomo X inativo e interfere na associação dos fatores transcricionais SWI/SNF (Wu et al., 1986b). Já a H2AX, outra variante está associada ao reparo de DNA em diferentes organismos. A fosforilação dessa variante na serina 129 em levedura (ou 139 em mamíferos) é fundamental para o reconhecimento de lesões no DNA. Leveduras não apresentam uma H2A convencional, porém apresentam essa variante H2AX. A variante H2ABBD está relacionada com cromatina transcricionalmente ativa por causar instabilidade no nucleossomo e colocaliza com H4 acetilada na lisina 12 (Marino-Ramirez et al., 2005).

Foram encontradas duas variantes de histona H2B usando espectrometria de massas (MS) em humanos. Elas foram denominadas H2B1 e H2BF; porém suas funções são desconhecidas (Marino-Ramirez et al., 2005). Outras variantes menos abundantes vêm sendo detectadas. Em um trabalho que empregou MS acoplada a separação em cromatografia HPLC e digestão enzimática, foram descritas mais 9

variantes para histona H2A e 11 para histona H2B, também em células de humanos. Estas variantes são muito menos abundantes e menos variáveis (como um único aminoácido, por exemplo), e sua presença parece não causar alterações na estrutura da cromatina (Bonenfant et al., 2006).

Modificações pós traducionais das histonas

O “código das histonas”

As porções N-terminais das histonas e a porção C-terminal da histona H2A, estão expostas fora do nucleossomo e, portanto, são alvos de diversas modificações pós-traducionais (MPT). Atualmente, oito modificações já foram caracterizadas em histonas. São elas: acetilação de aminogrupos, metilação de argininas/lisinas, fosforilação de serina/treonina, ubiquitinação, sumoilação, ADP ribosilação, deiminação e isomerização de prolina (Kouzarides, 2007).

O fato de que estas modificações estarem relacionadas cada uma a um efeito específico levou Strahl e Allis (Strahl e Allis, 2000) a propor que haja um código de histonas. Hoje existem muitas evidências de que estas modificações de histona atuem de maneira interdependente, gerando inúmeras combinações que podem afetar diversos processos nucleares tais como deposição de histonas, transcrição e ciclo celular (Fig. 3). A modificação de um resíduo pode atuar como substrato para ligação de proteínas e/ou novas enzimas modificadoras, que “leriam” o código das histonas, transmitindo a informação e regulando um determinado processo biológico. Além disso, uma modificação pode facilitar ou inibir que outros resíduos sejam modificados. Um exemplo é a metilação na lisina 4 da histona H3, que facilita as acetilações nas lisinas 9, 14, 17 e 23 da histona H3 e K5, K8, K12 e K16 da histona H4. Por outro lado, a metilação na lisina 9, também na histona H3, inibe acetilação nas mesmas nas lisinas 9, 14, 17 e 23 (Wang et al., 2001).

As modificações não ocorrem nos mesmos nucleossomos e nem ao mesmo tempo. Elas são reversíveis, ocorrendo de maneira dinâmica em resposta a sinais intra e extracelulares (Kouzarides, 2007). Estima-se que no total, mais de 60 modificações diferentes podem ocorrer, desconsiderando o fato de que lisinas podem ser mono- di ou trimetiladas e argininas mono- ou dimetiladas (Fig. 4).

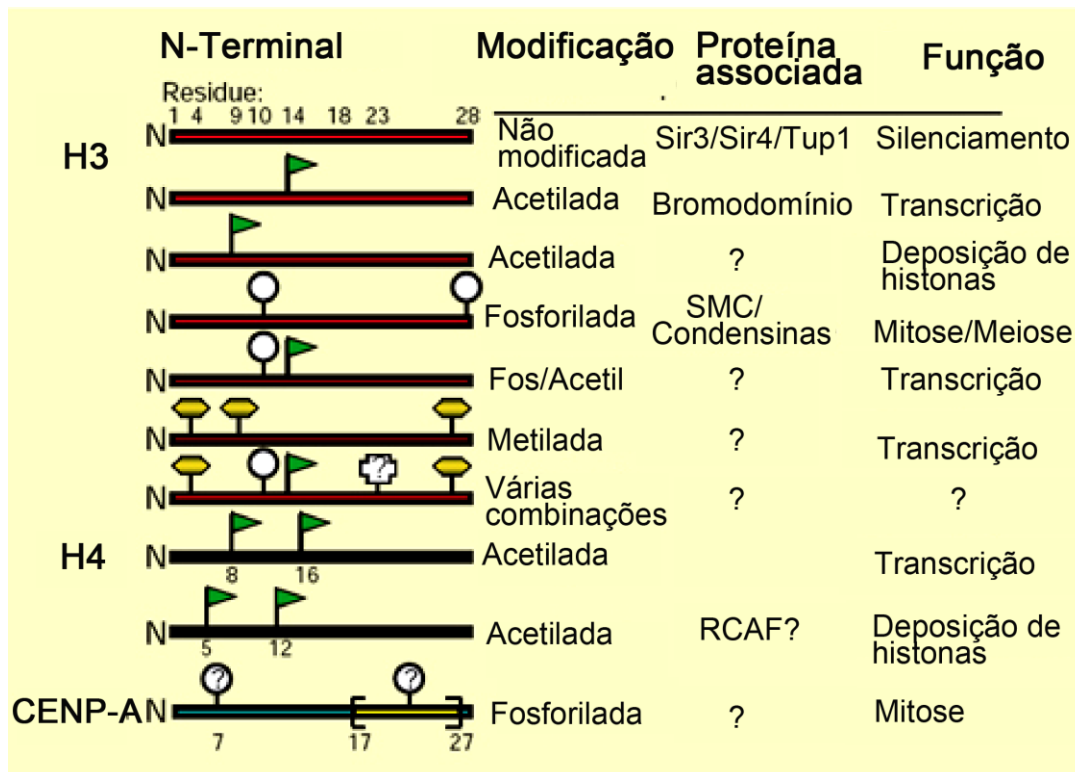


Figura 3: O código das histonas mostrando resíduos modificados nas histonas 3 e 4 e as funções relacionadas. Adaptado de Strahl e Allis (2000).

As enzimas que catalisam essas MPTs têm sido intensivamente estudadas, desde a descoberta em 1996 por Brownell e colaboradores (Brownell et al., 1996) da primeira histona acetiltransferase (HAT), a GCN5, um adaptador transcricional em leveduras. De todas as enzimas capazes de gerar MPT, as metiltransferases e as quinases apresentam uma maior especificidade enquanto que as demais são menos específicas. Neste caso as modificações ocorrem dependendo da associação de fatores acessórios. Enzimas que retiram as modificações também vêm sendo

identificadas. A única modificação que parece ser irreversível é a metilação da arginina, embora alguns autores proponham que ocorra uma deaminação (Kouzarides, 2007).

As modificações químicas das cadeias laterais dos aminoácidos alteram a estrutura da cromatina uma vez que modificam a interação das histonas com o DNA. Elas promovem diferenças na compactação do DNA, na interação entre nucleossomos adjacentes ou entre o nucleossomo e o DNA. A acetilação é a principal candidata a essa função, uma vez que neutraliza as cargas positivas das lisinas presentes na região N-terminal, região que participa da formação da fibra de 30 nm. Outro candidato a interferir com a estrutura da cromatina é a fosforilação, que adiciona uma carga negativa às histonas, o que também diminui a interação com o DNA. Todavia o papel da fosforilação na compactação do DNA não está claro. De maneira mais específica, as MPTs promovem a ligação de fatores específicos à cromatina atuando em diferentes processos nucleares, como descritos a seguir.

Transcrição

A metilação das histonas é reconhecida por proteínas que contém cromodomínios, acetilação é reconhecida por proteínas que contém bromodomínio e fosforilação por proteínas 14-3-3. Essas proteínas ligam-se aos resíduos modificados interferindo no processo de transcrição tanto através da ligação de fatores ativadores, como repressores (Kouzarides, 2007). Um exemplo é o da heterocromatina, assim denominada por apresentar um alto grau de compactação e baixa atividade transcricional. A heterocromatina encontra-se hipoacetilada em relação à eucromatina, que é menos compactada. Ela contém a proteína HP1 que se liga especificamente a H3metilK9 promovendo a compactação da cromatina e a exclusão de fatores de transcrição. Através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina foi possível verificar que a trimetilação de H3K4 encontra-se em regiões de genes ativos da eucromatina (Noma et al., 2001). Outras metilações estão também envolvidas na

transcrição. Enquanto H3K36 e H3K79 encontram-se aumentadas em regiões de transcrição ativa, H3K27 e H3K20 parecem reprimir a transcrição (Morris et al., 2005). O mesmo foi verificado para ubiquitinação de H2BK120 que é considerada um ativador transcricional. Seu papel é de facilitar a fase de alongação da transcrição, enquanto que H2AK119 está relacionado ao silenciamento gênico (Zhou et al., 2008;Zhu et al., 2005).

As acetilações também estão relacionadas à transcrição. Embora essa modificação normalmente ocorra na porção N-terminal das histonas, a acetilação da lisina K56 no domínio globular da histona H3 de levedura, que é acetilada por SPT 10, encontra-se enriquecida nos promotores dos genes de histona, pouco antes da fase S, onde ocorre a síntese de histonas (Xu et al., 2005).

Há relatos de diversas HATs como a GCN5 (parte de um complexo denominado SAGA), ou a Esa1 (parte do complexo NuA4) que são recrutadas para regiões ativadoras da transcrição (Robert et al., 2004). Assim como GCN5 e Esa1, outras HATs, também consideradas ativadores transcricionais, como PCAF e TAFII250 (ambas de mamífero), são recrutadas para região ativadoras e contém bromodomínio. No entanto seus alvos ainda não foram identificados (Dhalluin et al., 1999;Jacobson et al., 2000).

Da mesma forma que existem proteínas que reconhecem histonas modificadas há outro domínio que reconhece preferencialmente histonas não modificadas. Um exemplo é o domínio SANT. Esse domínio é encontrado em uma série de proteínas co-repressoras da transcrição, como CoREST e N-COR, conhecidas por interagir com histonas desacetilases (de La Cruz et al., 2005).

Reparo de DNA

Um papel importante das MPTs está relacionado ao reparo de DNA e nesse caso uma das modificações mais bem estudadas é a variante H2AX. De fato, a fosforilação da H2AX na serina 129 ocorre na cromatina onde há quebras de DNA

(Fillingham et al., 2006). Outro evento identificado após lesões no DNA é a metilação de H4K20, que é reconhecida pela proteína de checkpoint Crb2, que bloqueia o ciclo celular de modo que o DNA seja reparado (Sanders et al., 2004). A acetilação da histona H4 também parece estar relacionada ao dano/reparo de DNA. Em leveduras, foi mostrado que quando a deacetilase de H4K16 é nocauteada, a via de reparo por junção de extremidades não homólogas é bloqueada (Jazayeri et al., 2004). Contudo, deacetilação do mesmo resíduo é necessária para outra via de reparo de quebra de DNA dupla fita, a recombinação homóloga. Quando leveduras com todas as lisinas da H4 substituídas por argininas foram submetidas a agentes que induzem quebra de dupla fita de DNA, ocorre aumento da sensibilidade ao dano. No entanto, essa sensibilidade pode ser restaurada pela adição de lisinas aleatoriamente na porção N-terminal da histona (Bird et al., 2002). Muitas outras modificações estão envolvidas com o reparo a dano de DNA. Para uma revisão completa ver Escargueil e colaboradores (Escargueil et al., 2008).

Montagem do nucleossomo

As MPTs estão associadas à deposição nos nucleossomos nas fitas recém sintetizadas durante a replicação. Uma vez sintetizadas durante a fase S, a histona H4 é imediatamente acetilada nas lisinas 5 e 12, mas não na 16 em *Tetrahymena*, *Drosophila* e células de mamífero. No caso da histona H3, a acetilação parece ser mais variável, dependendo do organismo, ocorrendo nos resíduos 9 e 14 em *Tetrahymena* e 14 e 23 em *Drosophila* (Sobel et al., 1995). Essas histonas são depositadas no DNA recém sintetizado pela ação das chaperonas (como por exemplo Asf1 ou CAF1), que possivelmente reconhecem os resíduos acetilados. Uma vez acopladas ao DNA, as histonas são desacetiladas (Sobel et al., 1995). No entanto, mutações nas lisinas 5 e 12 da histona H4 não afetam a deposição de nucleossomos tanto *in vitro* quanto *in vivo* nem tampouco a viabilidade celular. Somente quando se

modifica a lisina 8 juntamente com as duas outras lisinas, a morte celular é observada (Ma et al., 1998).

Nucleossomos contendo mutantes de histona H4 acetilada constitutivamente na lisina 16, bem como a mesma histona sem a sua porção N-terminal são incapazes de formar a fibra de 30 nm *in vitro*. Também são reduzidas as interações fibra-fibra e a ligação de proteínas remodeladoras da cromatina (Shogren-Knaak et al., 2006). Adicionalmente, em levedura, foi visto que a perda dessa acetilação leva ao espalhamento de Sir3, uma proteína que participa da formação da heterocromatina telomérica e consequentemente espalhamento da heterocromatina (Suka et al., 2002). Todavia, aparentemente as porções flexíveis de todas as histonas são também necessárias para essa etapa. Gordon e colaboradores (Gordon et al., 2005), removeram as porções N-terminais das histonas e as submetem a um ensaio de montagem de arranjos nucleossomais com todas as combinações de histonas possíveis. Em nenhum caso foi possível a formação do arranjo de nucleossomo, somente em altas concentrações de sal, indicando que todas as porções N-terminais de todas as histonas seriam necessárias para a formação e compactação da cromatina.

Outro dado que relaciona MPTs e replicação de DNA vem da identificação da acetiltransferase HB01 junto ao complexo de reconhecimento da origem de replicação, entretanto seu envolvimento nesse processo ainda permanece desconhecido (Doyon et al., 2006).

Ciclo Celular

As MPTs parecem desempenhar papel importante também no controle do ciclo celular. Valls e colaboradores (Valls et al., 2005) mostraram que embora a transcrição seja inibida e fatores transcrpcionais se dissociem da cromatina em células em mitose, a acetilação de H4K12, bem como de H3, permanece durante nesta fase do ciclo como um marcador para genes ativos. Por outro lado, leveduras contendo histonas H4

sem nenhuma das quatro lisinas, ou sem o domínio N-terminal, apresentam acúmulo das células nas fases G2/M do ciclo celular, fenótipo este revertido pela adição de uma única lisina, mesmo fora da sequencia normal da histona H4 (Megee et al., 1995).

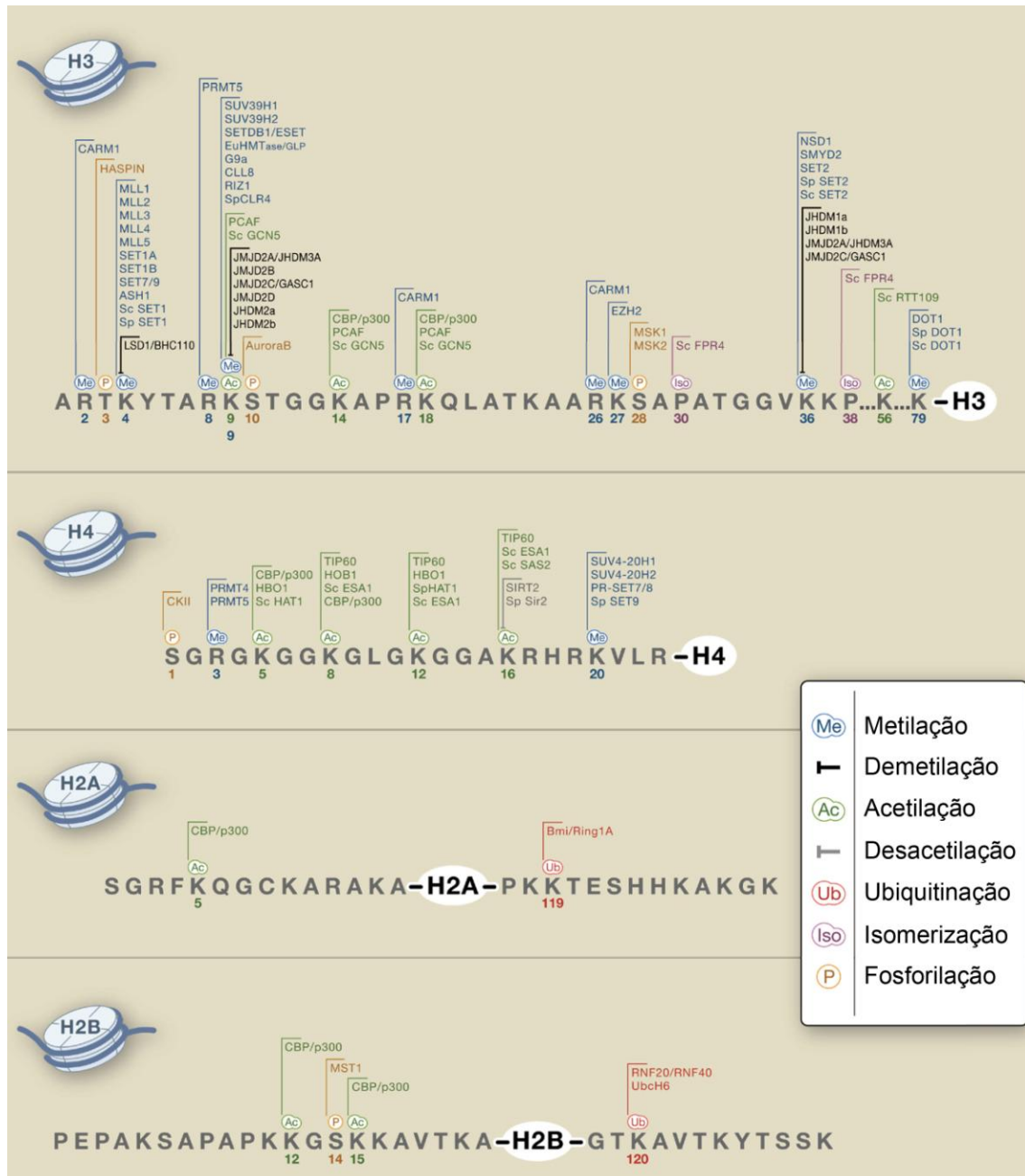


Figura 4: Modificações pós-traducionais de histona. Resíduos modificados presentes nas histonas centrais e suas respectivas deacetilases e demetilases. As regiões globulares em branco representam os domínios globulares presentes nas histonas.

Trypanosoma cruzi

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas (Chagas, 1909), doença que afeta cerca de 15 milhões de pessoas nas Américas Central e do Sul (Coura e Dias, 2009). O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e se caracteriza por possuir uma organela que contém grande quantidade de DNA, o cinetoplasto (kDNA).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida que alterna entre dois hospedeiros: um mamífero, entre eles o homem, e um invertebrado, os triatomíneos, conhecidos popularmente como “barbeiros”. Durante seu ciclo de vida, o parasita exibe quatro formas bem definidas: as formas replicativas (epimastigota e amastigota) e as formas infectivas não replicativas (tripomastigota metacíclico e tripomastigota sanguíneo), além de formas intermediárias (Brener, 1973; de Souza, 2002).

O hospedeiro invertebrado ingere tripomastigotas sanguíneos presentes no sangue de um mamífero infectado. No intestino intermediário do inseto, a forma tripomastigota se diferencia na forma replicativa epimastigota. No intestino posterior do barbeiro ocorre a diferenciação na forma infectiva tripomastigota metacíclica, processo conhecido como metaciclogênese. Os tripomastigotas são liberados nas fezes e urina do inseto, penetrando na pele através de lesões ou da própria picada (Brener, 1973; Tyler e Engman, 2001).

Uma vez na corrente sanguínea, os tripomastigotas metacíclicos são capazes de infectar diversos tipos celulares. No interior das células, o parasita se diferencia em amastigota, que é a forma replicativa no hospedeiro mamífero. Após sucessivas etapas de replicação, o parasita diferencia-se na forma tripomastigota sanguínea que rompe a célula e atinge a corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou ser ingerido pelo inseto vetor, dando continuidade ao ciclo (Fig. 5) (de Souza, 2002; Tyler e Engman, 2001).

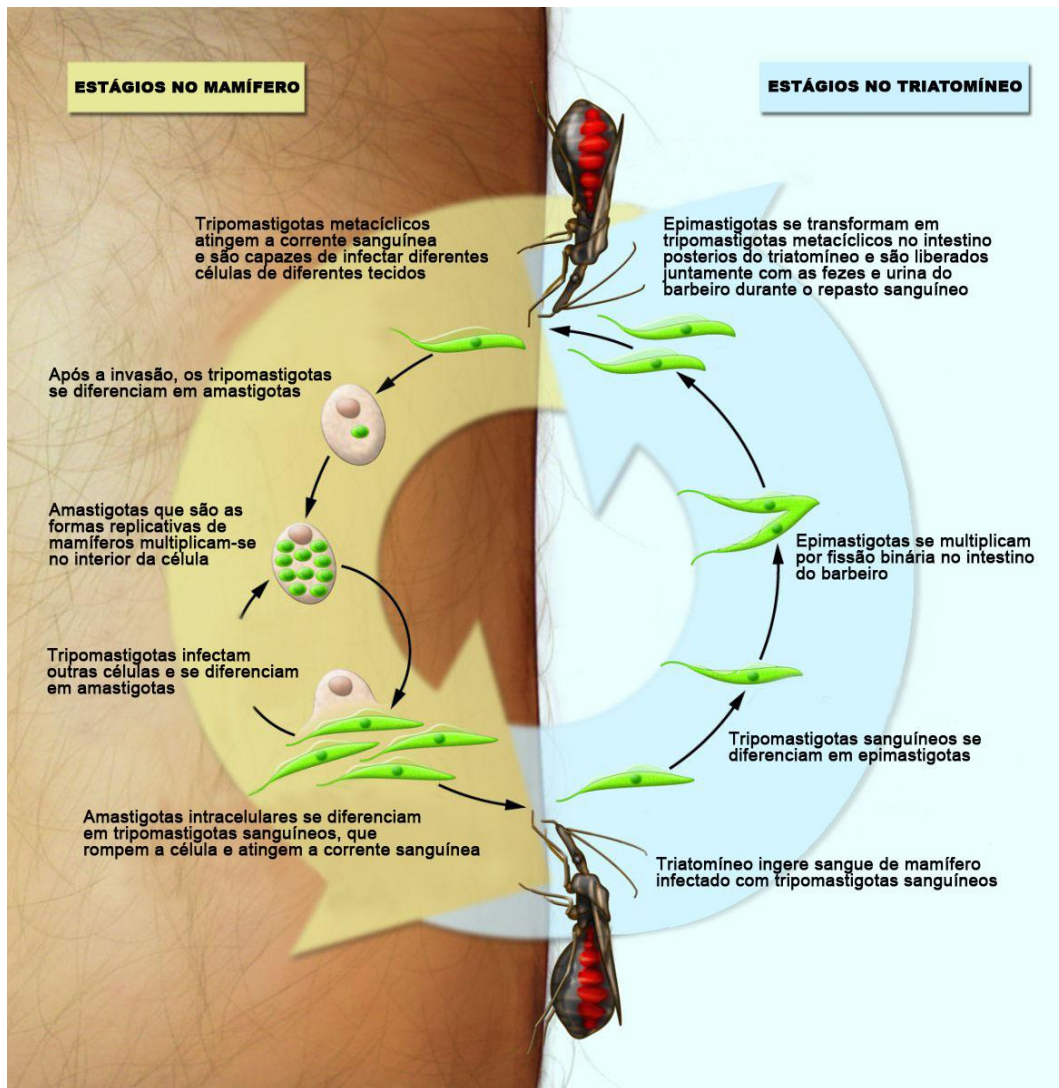


Figura 5: Esquema ilustrativo do ciclo de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrados (triatomíneo) e vertebrados. Adaptado de Stuart et al 2008.

Expressão gênica em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos apresentam peculiaridades no que se refere à expressão gênica. Em geral, os genes estão organizados em longas unidades policistrônicas, semelhantes aos operons de bactérias. No entanto, ao contrário das bactérias, em tripanossomatídeos, os genes nos policístrons frequentemente não têm funções correlacionadas (Thomas et al., 2009). Cada cromossomo possui pelo menos duas unidades policistrônicas, que podem ser transcritas na mesma direção, ou em direções opostas. O pré-mRNA é processado por *trans-splicing* e poliadenilação.

Como resultado destes processos, a todos os mRNAs é adicionada na porção 5' uma sequência conservada de 39 nucleotídeos denominada mini-exon (ME) e na porção 3' uma cadeia de poli-A. À extremidade 5' do ME é adicionado um "cap" conhecido como cap-4 (Lewdorowicz et al., 2004). Esses processos conferem estabilidade ao mRNA maduro e permitem a sua exportação ao citossol onde são traduzidos (Fig. 6) (Martinez-Calvillo et al., 2010).

O único promotor descrito para a RNA polimerase II é do gene do SL e tem sido proposto que o início da transcrição dos RNAs policistrônicos ocorre em regiões específicas do cromossomo (Martinez-Calvillo et al., 2010). Os mRNAs são expressos de maneira desigual, indicando haver regulação ao nível pós transcricional, durante o processamento do mRNA. As regiões 3'-UTR desempenham um papel importante nessa regulação. Um exemplo caracterizado dessa regulação ocorre no gene da amastina em *T. cruzi*. A região 3'-UTR desse mRNA apresenta uma sequência de 630 nucleotídeos que lhe confere uma maior estabilidade nas formas amastigotas em comparação a tuzina, cujo gene está presente no mesmo transcrito policistrônico (Coughlin et al., 2000; Teixeira et al., 1995). Outro exemplo é de um grupo de proteínas de superfície ricas em oligossacarídeos denominadas mucinas. A mucina SMUG contém na região 3'-UTR de seu mRNA uma sequência rica em AU e outra sequência rica em G. Essas sequências são reconhecidas por proteínas de ligação a RNA, que são estágio-específicas e estabilizam o mRNA de maneira a controlar a expressão destes genes (Coughlin et al., 2000; D'Orso e Frasch, 2001). Em *T. cruzi*, existem também estruturas semelhantes a P-bodies, que contém uma helicase de RNA denominada TcDhh1 (Holetz et al., 2007). Homólogos desta helicase em outros organismos (*Xenopus* e *Drosophila*) atuam na repressão da tradução de mRNA maternos que posteriormente poderão ser traduzidos (Ladomery et al., 1997; Nakamura et al., 2001).

A regulação da expressão gênica dos tripanossomatídeos ainda ocorre no processo de tradução. Isto porque os níveis de mRNA não estão necessariamente

relacionados aos níveis de proteína (Martinez-Calvillo et al., 2010). A proteína TcSof1, constituinte do complexo U3 snRNPs participante do processamento da subunidade menor do ribossomo, não é sintetizada na forma tripomastigota metacíclica, embora seu mRNA encontra-se expresso e associado aos polissomos, indicando uma regulação negativa nos níveis de elongação ou terminação da tradução (Nardelli et al., 2007). O mesmo foi observado para proteínas NrK de *T. brucei* (Gale, Jr. et al., 1994).

Vale ressaltar também que em epimastigotas de *T. cruzi* a RNA polimerase II está localizada preferencialmente em um único foco ao lado do nucléolo, região onde se situam os genes do SL. Nos tripomastigotas, cuja taxa de transcrição pela RNA polimerase II é reduzida, a enzima se dispersa (Dossin e Schenkman, 2005). Esses dados mostram que a expressão gênica nesses parasitas pode ser afetada pela localização espacial dos genes no núcleo e, portanto, a estrutura da cromatina atuaria como um regulador em alguns desses processos.

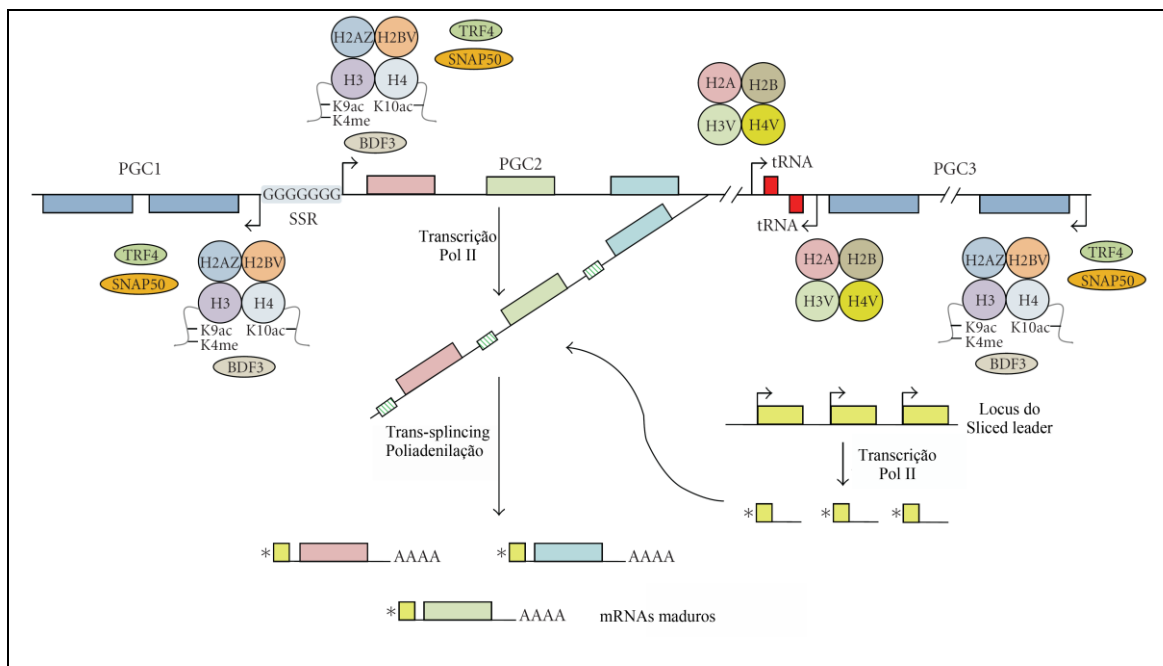


Figura 6: Esquema da tradução policistônica e processamento de mRNAs em tripanossomatídeos. No topo da figura é possível visualizar as histonas, variantes de histonas e MPTs enriquecidas prováveis sítios de início da transcrição (SSR) e de terminação (H2A, H2B, H3v e H4v). Adaptado de Martínez-Calvillo et al, 2010.

Cromatina de *T. cruzi*

Assim como nos demais eucariotos, os nucleossomos são a unidade fundamental da cromatina de *T. cruzi*. Por sedimentação em gradiente de sacarose, os mononucleossomos de *T. cruzi* mostraram-se semelhantes à de eucariotos superiores, enovelando 200 pb de DNA (Astolfi et al., 1980). A cromatina de *T. cruzi* está organizada em filamentos que apresentam nucleossomos arranjados irregularmente, não se condensando em fibras de 30 nm e sendo mais sensível à ação de nucleases que demais eucariotos (Hecker e Gander, 1985).

Diferentes estágios do ciclo de vida do parasita apresentam diferentes níveis de compactação da cromatina, que são acompanhados de uma diferença na morfologia do núcleo. As formas epimastigota e amastigota apresentam um núcleo arredondado com um grande nucléolo e a heterocromatina está preferencialmente localizada na periferia do núcleo, enquanto que nas formas tripomastigotas, o núcleo é alongado, o nucléolo torna-se difuso e a heterocromatina encontra-se espalhada em todo compartimento nuclear (Fig. 7) (Elias et al., 2001). Em 1970, Vickerman e Preston (Vickerman e Preston, 1970) mostraram que não é possível visualizar cromossomos durante a mitose, que é fechada, ou seja, sem o rompimento do envelope nuclear. Pelo menos 41 cromossomos para a cepa CL Brener foram obtidos em uma montagem após seqüenciamento do genoma (Weatherly et al., 2009).

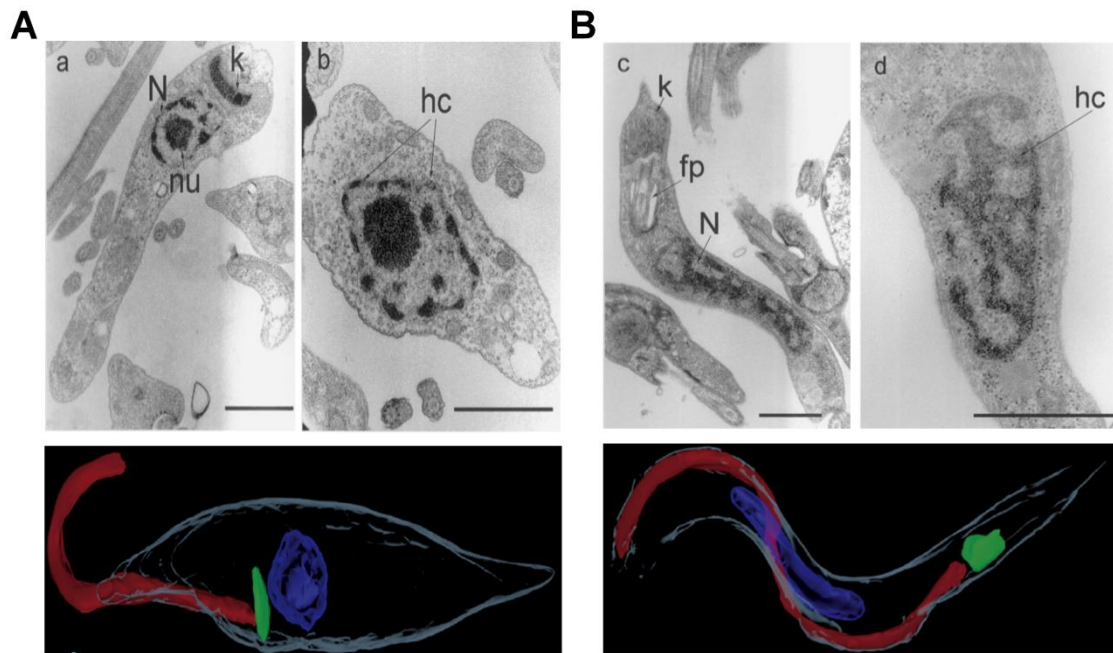


Figura 7: Organização nuclear de formas replicativas e infectivas de *T. cruzi*. A. Microscopias eletrônicas de transmissão da forma epimastigota de *T. cruzi*. Painel de baixo: Esquema de epimastigota mostrando o núcleo (azul), cinetoplasto (verde) e flagelo (vermelho). B. Microscopias eletrônicas de transmissão de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Painel de baixo: Esquema de tripomastigotas mostrando o núcleo (azul), cinetoplasto (verde) e flagelo (vermelho).

Os genes para cada tipo de histona de *T. cruzi* estão organizados em 14 a 24 repetições em tandem. Eles são expressos na fase S do ciclo celular e, são poliadenilados como ocorre em leveduras (Recinos et al., 2001). Entretanto a sua taxa de transcrição não é maior na fase S, sugerindo que os níveis cíclicos destes mRNAs sejam regulados ao nível pós-transcricional. Exceção é a histona H1, que é sintetizada independente da replicação do DNA (Sabaj et al., 2001). Estes autores também observaram que em *T. cruzi*, são sintetizadas primeiramente as histonas H2A e H2B e depois as histonas H3 e H4.

As histonas de tripanossomatídeos são muito divergentes quando comparadas a dos demais eucariotos. Elas apresentam um domínio globular e domínios flexíveis que compreendem as porções C e N-terminais. A histona H1 é a mais divergente, tendo sido descoberta somente em 1988 (Toro e Galanti, 1988). Ela apresenta

somente a região que corresponde ao domínio C-terminal das demais histonas H1, sendo assim muito menor se comparada aos demais eucariotos (Kasinsky et al., 2001). A ausência do domínio globular e da porção N-terminal pode ser um dos motivos da fraca associação com a cromatina e ausência de formação de fibras de 30 nm nestes parasitas (Toro e Galanti, 1988). No caso das outras histonas, as diferenças se encontram principalmente nos domínios flexíveis do N- e do C-terminal, sítios onde se dão diversas modificações pós-traducionais (Horn, 2007).

Modificações pós traducionais das histonas de tripanossomas

A primeira modificação pós-traducional de histona identificada em *T. cruzi* foi a fosforilação da histona H1 na serina 12 em um sítio típico para proteína quinase dependente de ciclina (S*PKK). Esta fosforilação ocorre a partir da fase S, atingindo níveis máximos na mitose de formas epimastigotas e é provavelmente mediada pela cdk *tzcrk3-like* (da Cunha et al., 2005; Marques et al., 2002). A função exata da fosforilação da histona H1 tanto em tripanossomatídeos, como nos demais organismos não é conhecida, mas sabe-se que ela promove sua dissociação do DNA e ao mesmo tempo permite que fatores envolvidos na condensação da cromatina atuem (Bustin et al., 2005; Gutiyama et al., 2008). Na fase G1 e S do ciclo celular de *T. cruzi*, a forma não fosforilada da H1 concentra-se na região central do núcleo, que contém o nucléolo e regiões de cromatina menos densas. No início da fase G2 do ciclo celular, a histona começa a ser fosforilada e difunde-se por todo o compartimento nuclear, atingindo o máximo de dispersão durante a mitose (Gutiyama et al., 2008). Desta forma a fosforilação da histona H1 parece ter um papel importante na reorganização da cromatina em *T. cruzi*, possivelmente atuando na separação dos cromossomos homólogos.

A primeira evidência de que as histonas do cerne do nucleossomo são modificadas em *T. cruzi* foi obtida através da incorporação de ácido acético e metilmetionina marcados radioativamente, precursores da acetilação e metilação,

respectivamente. Foi observado que enquanto as histonas H4 e H2A foram preferencialmente marcadas com [³H]-acetato, as histonas H3, H2B e, menos intensamente H4, foram marcadas com L-[methyl ³H]-metionina, indicando que H4 e H2A são acetiladas, enquanto as histonas H3 e H2B são metiladas (da Cunha et al., 2006). A presença e localização das modificações na histona H4 foram confirmadas por espectrometria de massas. Na maioria das histonas H4, foram encontradas acetilações na lisina 4 e em menor abundância nas lisina 10, 14 e 57. Foi mostrado que a primeira alanina na porção N-terminal é metilada, a lisina 18 é mono-metilada e a arginina 53 é dimetilada (da Cunha et al., 2006).

As histonas H2A, H2B, H3 e H4 de *T. brucei* foram também analisadas por espectrometria de massas. Embora as histonas de *T. cruzi* sejam bastante divergentes dos demais organismos, são muito semelhantes às de *T. brucei* (Janzen et al., 2006a). A histona H4 é a mais semelhante delas, apresentando 96% de identidade, H2A, H2B e H3 apresentam 86, 81 e 92% respectivamente. Estas análises mostraram que todas as histonas maduras não contêm a primeira metionina. Com exceção da histona H3, na qual a primeira serina é acetilada, as demais alaninas na porção N-terminal encontram-se metiladas. Através de espectrometria de massas e degradação de Edman, foi possível identificar outras modificações, como é o caso da acetilação de K4 nas histonas H2A, H2B e K14 na histona H4, todas encontradas com cerca de 1% de incidência nas referentes histonas e provavelmente por esse motivo não identificadas anteriormente (Mandava et al., 2007). Na figura 8 mostramos as principais modificações encontradas nas histonas de *T. cruzi* e *T. brucei* de forma comparativa.

T. brucei apresenta cinco histona acetiltransferases (HAT): duas delas homólogas às acetiltransferases ELP3 de humanos, ainda não caracterizadas e três delas pertencentes à família MYST, denominadas HAT1-3 (Berriman et al., 2005). Quanto às deacetilases, sete foram identificadas nesse parasita e são divididas em classe I (HDAC 1-2) e classe II (HDAC 3-4), de acordo com os ortólogos de levedura e mamífero (Ingram e Horn, 2002). As três restantes são as histonas deacetilases SIR2,

denominadas SIR2rp1, SIR2rp2 e SIR3rp3, a primeira localizada no núcleo e as duas últimas na mitocôndria (Alsford et al., 2007; Garcia-Salcedo et al., 2003). Baseado no genoma de tripanossomas pode-se identificar seis HATs em *T. cruzi*, sendo que a HAT 4, constituinte da família MYST, está ausente em *T. brucei*. São também detectadas seis histonas deacetilases. A deacetilase SIR2rp2 não foi encontrada no genoma de *T. cruzi* e está presente em *T. brucei* (Berriman et al., 2005; El Sayed et al., 2005).

Quatro histonas desacetilases de *T. brucei* (HDAC1-4) foram caracterizadas (Ingram e Horn, 2002). Dessas, apenas HDAC 1 e 3 se mostram essenciais aos parasitas quando o duplo nocaute foi testado. Já o duplo nocaute para HDAC 4 somente afetou o crescimento do parasita resultando em um aumento de células na fase G2 tardia do ciclo celular (Ingram e Horn, 2002). Em *T. brucei* foi verificado que a acetilação de H4K4 ocorre em cerca de 80% das histonas H4 com uma diminuição relativa durante a fase S (Janzen et al., 2006a; Siegel et al., 2008). Nesse mesmo trabalho foi verificado que essa acetilação é catalisada pela enzima HAT3, cuja localização é nuclear, sugerindo que, após ser sintetizada no citoplasma, a histona H4 é exportada ao núcleo, onde é acetilada na lisina K4, provavelmente de forma irreversível (Siegel et al., 2008).

Em *T. brucei*, as HATs 1 e 2 se localizam núcleo do parasita. Por meio de nocaute parcial para HAT 1 e 2 e total para HAT3, e experimentos de RNAi, foi visto que HAT1 e 2 são essenciais para o crescimento celular, mas não HAT 3 (Kawahara et al., 2008). Células nocautes de HAT1 também revelaram falhas na regulação do ciclo celular com avanço preliminar para mitose e no silenciamento telomérico. Estes estudos também mostraram que a enzima responsável pela acetilação de H4K10 é a HAT 2.

Em *T. brucei*, a metilação de H3K76 (que corresponde a H3K79 em outros organismos) ocorre na forma de trimetilação no decorrer de todo ciclo celular. No entanto, ela encontra-se dimetilada durante a mitose. A enzima responsável por essa metilação é a metiltransferase DOT1 que em *T. brucei* tem dois homólogos,

denominadas DOT1A e DOT1B. DOT1A é responsável pela dimetilação, enquanto DOT1B pela trimetilação da K76 (Janzen et al., 2006b). Neste trabalho foi mostrado através de ensaios de RNAi que a supressão de ambas as metiltransferases afeta o ciclo celular. A falta de DOT1A leva a uma progressão antecipada para mitose, sem a replicação do DNA, gerando parasitas haplóides. O mesmo ensaio mostrou-se letal quando realizado em formas sanguíneas do parasita. No caso do RNAi de DOT1B, a K76 está constantemente dimetilada ao longo do ciclo celular. Neste caso aparecem zoóides (células anucleadas) e células multinucleadas (Janzen et al., 2006b). A DOT1B afeta também a variação antigênica em *T. brucei*. Na ausência dessa enzima, múltiplas VSGs silenciadas são expressas em níveis cerca de 10 vezes maiores que os níveis basais e a troca de VSGs torna-se mais lenta, podendo-se observar parasitas expressando duas VSGs ao mesmo tempo (Figueiredo et al., 2008).

Outra deacetilase caracterizada é a TbSIR2RP1, uma enzima nuclear de *T. brucei*, cujos homólogos em outros organismos são conhecidos por catalisarem tanto a ADP-ribosilação, quanto a deacetilação, principalmente de H2A e H2B. O mesmo foi verificado *in vitro* para histonas de *T. brucei*. Essa enzima está associada ao reparo de DNA uma vez que foi verificado que a sua superexpressão aumenta a resistência ao dano causando a quebra de DNA. Isto sugere que as histonas são ribosiladas por TbSIR2RP1 em resposta ao dano de DNA causado por metil-metano sulfonato e quando deacetiladas por essa enzima (no caso da superexpressão) ficam mais suscetíveis a ação de nucleases (Garcia-Salcedo et al., 2003).

Em *T. cruzi*, foram realizados ensaios de imunoprecipitação de cromatina, a fim de verificar o papel das acetilações e metilações na transcrição do parasita (Respuela et al., 2008). Usando anticorpos comerciais, foi verificado que regiões onde há inversão de fase de leitura há enriquecimento para H3 acetilada e trimetilada na lisina 4 e para H4 acetilada nos resíduos 4, 10 e 14. Em contrapartida, não foi verificado enriquecimento de nenhuma das modificações analisadas associado a promotores de genes bastante expressos, como RNA ribossomal ou SL. Nesse parasita, apesar de

que as histonas acetiltransferases e histonas desacetilases foram identificadas no genoma, até o presente nenhuma delas foi caracterizada.

Mais recentemente, em *T. cruzi*, foi caracterizada uma proteína que contém bromodomínio (TcBDF2), que interage *in vitro* com H2A e H4. Essa proteína apresenta marcação pontuada distribuída em todo compartimento nuclear, semelhante às histonas, parecendo co-localizar preferencialmente com histonas H4 acetiladas nas lisinas 10 e 14. Ensaios de imunoprecipitação da cromatina confirmaram a interação com nucleossomos enriquecidos em histonas H4K10ac, sugerindo o envolvimento dessa proteína na estrutura da cromatina em *T. cruzi* (Villanova et al., 2009). O fato desta proteína ter sua expressão aumentada após dano induzido por luz UV, sugere que ela participe de alguma forma no reparo induzido por este tipo de agente. Já em *T. brucei*, outras proteínas com bromodomínio foram caracterizadas. Uma delas, denominada TbBDP3 está enriquecida nas regiões tidas como regiões do início da transcrição bem como histonas H4 acetiladas na lisina 10 (H4K10ac) que colocam com TcBDF3 (Siegel et al., 2009).

cromossomos e repetições teloméricas mostraram-se enriquecidas em H2AZ e H2Bv (Lowell et al., 2005).

Em *T. brucei* também foi identificada uma variante de H2B, que apresenta 38% de identidade com a H2B, principalmente na porção C-terminal. H2Bv apresenta uma lisina na posição 123, provável homóloga à lisina 129 da histona H2B de levedura que é ubiquitinada e é requerida para metilação de H3K4 e H3K79. Embora em *T. brucei*, a variante não tenha tal modificação, os nucleossomos contendo a variante H2Bv, encontram-se enriquecidos em H3 metilada em K4 e K76 (correspondente a K79), sugerindo o possível envolvimento da variante H2Bv na regulação da metilação nesses dois resíduos (Mandava et al., 2008).

Mais recentemente, também em *T. brucei*, Siegel e cols (Siegel et al., 2009), mostraram o envolvimento de quatro variantes de histonas no processo de transcrição. Utilizando a técnica de CHIP, seguida de sequenciamento do DNA precipitado, foi constatado que as variantes H2AZ e H2Bv são encontradas em abundância em regiões prováveis de início da transcrição pela RNA polimerase II. Contrariamente, as variantes de histona H3v e H4v encontram-se enriquecidas nas prováveis regiões de terminação da transcrição. Juntos, esses dados sugerem que a presença de nucleossomos compostos pelas variantes de histona (H2AZ e H2BV), bem como acetilação de H4K10, contribui para uma cromatina mais aberta, permitindo o início da transcrição enquanto que nucleossomos compostos pelas variantes H3v e H4v de algum modo reestruturam a cromatina regulando a atividade transcricional. Pelo mesmo método foi observado que a histona H3 trimetilada na lisina 4 também está enriquecida nas regiões de início de transcrição, nas mesmas posições que H4K10ac (Wright et al., 2010).

Reparo de DNA

Os organismos estão sujeitos a diversas lesões de DNA diariamente, provenientes tanto do meio externo (luz ultravioleta, agentes químicos e radiação ionizante), quanto do meio intracelular (hidrólise, oxidação e alquilação). A fim de garantir a integridade do genoma, as células desenvolveram diversos mecanismos de reparo de DNA, cada um capaz de corrigir um determinado tipo de lesão no DNA (Ataian e Krebs, 2006; Escargueil et al., 2008; Hakem, 2008).

1. Os danos causados por luz ultravioleta e agentes químicos mutagênicos que formam dímeros de pirimidina levando a distorção na dupla hélice são reparados por excisão de nucleotídeos. Esta via envolve mais de 30 proteínas em mamíferos (Truglio et al., 2006). Após o reconhecimento da lesão, as regiões que a flanqueiam são clivadas, resultando na remoção do oligonucleotídeo lesionado por uma DNA helicase. O reparo é concluído pela ligação de um oligonucleotídeo recém sintetizado tendo como molde a fita de DNA complementar (Hakem, 2008).

2. Outra via ocorre pela excisão de bases. Esse processo pode atuar em segmentos curtos desde uma base até regiões mais longas, de até 13 bases. Essa via começa pela retirada da base danificada pela atividade de glicosilases e posteriormente clivagem da fita pela endonuclease APE1. A lacuna é preenchida pela DNA polimerase β (reparos curtos) ou pelas DNA polimerases β, ϵ ou δ (reparos longos) (Hakem, 2008).

3. Uma terceira via ocorre por erros de pareamento durante a replicação e durante a recombinação homóloga. Erros podem ocorrer tanto por inserção, quanto por deleção de bases durante esses processos. Essa via de reparo é bem conhecida em bactérias, onde a proteína MutS reconhece os erros de pareamento e liga-se a eles. Essa ligação recruta MutL que ativa a endonuclease MutH que cliva a fita que é então reparada (Ataian e Krebs, 2006).

As lesões que causam quebras de DNA dupla fita são as consideradas mais severas podendo ser causadas por radiações ionizantes ou agentes químicos. Esse

tipo de lesão pode ser reparado de duas formas: pela via de recombinação homóloga ou pela junção de extremidades não homólogas. A primeira é a mais utilizada em bactérias e leveduras e a segunda é responsável por cerca de 90% dos reparos por quebra de DNA dupla fita em células de mamífero. A recombinação homóloga envolve maior fidelidade no momento da ligação, uma vez que utiliza uma sequência homóloga como molde para o reparo. Já no caso da junção de extremidades não homólogas, as duas fitas são religadas com pouca ou nenhuma fidelidade (Ataian e Krebs, 2006;Escargueil et al., 2008).

4. A recombinação homóloga inicia-se pelo reconhecimento da quebra pelo complexo MRX (Rad50/Mre11/Xrs2) que hidrolisa as ligações fosfato de uma das fitas no sentido 5'→3', resultando em um segmento de DNA simples fita sobressalente que é revestido pela proteína RPA e posteriormente por Rad51. Rad51 forma um filamento na fita simples de DNA promovendo a invasão da fita de DNA complementar na sequência homóloga. Participam deste processo as proteínas Rad55 e Rad57 havendo então uma troca de fitas e replicação do novo segmento por uma DNA polimerase (Ataian e Krebs, 2006;Escargueil et al., 2008).

5. A via de extremidades não homólogas inicia-se pela ligação do heterodímero Ku70/Ku80 em ambas as extremidades quebradas, seguida do recrutamento do complexo MRX ao sítio da lesão, que recruta a DNA ligase IV que conclui o reparo fazendo a junção das extremidades lesionadas (Hakem, 2008).

6. Outra via de reparo é a síntese translesão que ocorre durante a replicação quando a DNA polimerase encontra uma lesão. Nesse momento, a forquilha de replicação para, levando a monoubiquitinação do PCNA por Rad6/Rad18. Segue-se a substituição da DNA polimerase δ pela DNA polimerase ζ que amplifica o DNA a partir da lesão. Uma vez ultrapassada a lesão, a síntese de DNA é continuada (Hakem, 2008).

Assim como outros processos dependentes de DNA, tais como replicação e transcrição, as diferentes maquinarias de reparo de DNA necessitam de acesso aos

locais de DNA lesionados e diversos estudos recentes tem mostrado o papel das modificações das histonas nestes processos. Para uma revisão completa ver (Escargueil et al., 2008).

Reparo de DNA em tripanossomas

Baseado nos dados dos projetos genoma foi possível a identificação de diversos genes envolvidos nas vias de reparo de DNA em tripanossomatídeos. Assim, tanto *T. cruzi* quanto *T. brucei* parecem apresentar vias de reparo por excisão de nucleotídeos, reparo por erros de pareamento e recombinação homóloga, embora alguns componentes não tenham sido identificados. Já na via de reparo por excisão de bases faltam componentes fundamentais e a via de junção de extremidades não homólogas parece estar ausente (Passos-Silva et al., 2010b, submetido).

Tanto o *T. cruzi*, quanto o *T. brucei*, apresentam diversas proteínas constituintes da via de reparo por erro de pareamento. A mais estudada delas, é a proteína Msh2, ortóloga da proteína MutS de bactéria, que faz o reconhecimento inicial da lesão (Hakem, 2008). Em *T. brucei*, o duplo mutante para duas proteínas dessa via (Msh2 e Mlh1), aumenta a instabilidade dos microssatélites e aumentou a frequência da recombinação homóloga entre fitas homólogas ou não homólogas. No nocaute somente de Msh2 há aumento da sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, fenótipo restaurado pelo gene homólogo de *T. cruzi*. Em *T. cruzi*, Msh2 é expressa em todos os estágios do ciclo de vida, porém é menos abundante na forma tripomastigota. Além disso, parasitas isolados do ciclo silvestre (grupo I) apresentam maior atividade de Msh2, quando comparadas ao grupo isolado do ciclo doméstico (Augusto-Pinto et al., 2001). Ainda em *T. cruzi*, três isoformas de Msh2 foram identificadas (TcMsh2A, TcMsh2B e TcMsh2C), cada uma pertencente a um grupo de *T. cruzi* diferente (de Freitas et al., 2006). Outros genes do grupo Msh estão presentes nos genomas dos tripanosomatídeos, como MSH3, MSH4, MSH5 e MSH6. Como homólogos da proteína MutL de bactéria, PMS1 e MLH1 encontra-se em *T. cruzi*.

A via de reparo de excisão de bases em tripanossomas encontra-se incompleta em alguns componentes essenciais, como a DNA polimerase β nuclear, por exemplo. Em *T. cruzi* e *T. brucei*, a polimerase β está localizada na mitocôndria e somente na *L. infantum* é que essa enzima apresenta localização nuclear, indicando possíveis diferenças nas vias de reparo nesses parasitas (Lopes et al., 2008; Saxowsky et al., 2003). Todavia, outros componentes da via, como a uracil-DNA glicosilase (TcUng) de *T. cruzi* estão sendo caracterizados. Essa enzima foi utilizada para complementar mutantes em *E. coli* e mostrou-se capaz de retirar uracilas da fita de DNA (Pena-Diaz et al., 2004). A endonuclease AP de *T. cruzi* também foi identificada e caracterizada, assim como TcPARP (Fernandez Villamil et al., 2008; Perez et al., 1999).

Os tripanossomatídeos apresentam em seus genomas as proteínas essenciais, como Mre11, Rad50, RPA e Rad51 para a via de reparo por recombinação homóloga. Mutação da proteína Mre11 em *T. brucei* bloqueia a recombinação homóloga, aumentando a sensibilidade ao dano de DNA (Robinson et al., 2002; Tan et al., 2002). Rad51, outra proteína dessa via, também foi caracterizada e a sua superexpressão leva a um maior crescimento e a um reparo mais rápido após o dano de DNA (Regis-da-Silva et al., 2006). Já em *T. brucei*, a remoção de Rad51, bloqueia a troca de VSGs e aumenta a sensibilidade ao dano (McCulloch e Barry, 1999).

Por fim, tripanossomatídeos apresentam diversos constituintes da via de síntese translesão como Pol κ , Pol ζ e PCNA. Pol κ de *T. cruzi*, ao contrário de outros organismos, está localizada na mitocôndria, embora apresente outra cópia cuja localização não é conhecida (Rajao et al., 2009). Pol κ é capaz de processar 8-oxoG *in vitro*, e parasitas superexpressando essa polimerase são mais resistentes aos efeitos de H₂O₂, zeocina e radiação gama (Rajao et al., 2009). Parasitas superexpressando TcPol η também apresentam maior resistência a H₂O₂, o que indica que também são capazes de processar lesões de 8-oxoG *in vitro* (Rajao et al., 2009). A Pol η de *T.*

cruzi foi capaz de complementar mutantes de levedura e conferindo-lhes maior resistência às lesões causadas por luz ultravioleta (de Moura et al., 2009).

OBJETIVOS

O objetivo geral dessa tese foi estudar o papel biológico das acetilações localizadas na porção N-terminal da histona H4 de *T. cruzi*.

Objetivos específicos

- Determinar os níveis de acetilações em diferentes estágios do ciclo de vida, em diferentes fases do ciclo celular, nos locais onde ocorre a transcrição e após o dano de DNA;
- Determinar o papel das acetilações utilizando mutantes contendo as lisinas da H4 substituídas por argininas;
- Investigar o envolvimento das acetilações na via de reparo por recombinação homóloga;
- Estudar a interação da proteína TcBDF2, que contém Bromodomínio, com as acetilações na histona H4.

CAPÍTULO 1

Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage

Autores: Sheila Cristina Nardelli, Júlia Pinheiro Chagas da Cunha,

Maria Cristina M. Motta e Sergio Schenkman

Publicado no periódico Chromosoma. 118 (2009) 487-499.

No nucleossomo, as porções N-terminais das histonas, assim como a porção C-terminal da histona H2A, estão expostas, sendo alvos de modificações pós-traducionais que podem gerar sítios de ligação para fatores protéicos que modificam a estrutura da cromatina e sua distribuição no núcleo celular, regulando processos como replicação, transcrição e reparo de DNA. Experimentos realizados em nosso laboratório identificaram por meio de espectrometria de massas, acetilações nas lisinas 4, 10 e 14 da histona H4 de *T. cruzi*. Além disso, anticorpos que reconhecem cada resíduo acetilado foram gerados (da Cunha et al., 2006) e apêndice 1. Neste trabalho, utilizando estes anticorpos, mostramos como estas acetilações variam em função do ciclo de vida, ciclo celular e reparo de DNA em *T. cruzi*.

Através de microscopia eletrônica, verificamos que H4K4ac, que ocorre na maior parte das histonas, se encontra preferencialmente onde há DNA densamente compactado. Já H4K10ac e H4K14ac localizam-se em regiões das bordas da heterocromatina com regiões de menos eletrondensas, sugerindo papéis distintos destas acetilações em *T. cruzi*.

O *T. cruzi* passa por diversas alterações morfológicas, incluindo uma extensiva reorganização nuclear durante os seus diferentes estágios nos diferentes hospedeiros. Enquanto H4K10ac e H4K14ac permaneceram constantes em todas os estágios analisados, a marcação de H4K4ac é bem menos intensa na forma não replicativa

tripomastigota, sugerindo que esta acetilação esteja relacionada ao processo replicativo nesses parasitas. Uma possibilidade é que haja deacetilação desta histona nas formas não replicativas. A outra é que haja uma substituição progressiva sem haver acetilação na lisina 4, que normalmente ocorre em 80% das histonas H4.

Ensaio de imunofluorescência indicaram uma maior intensidade de marcação para os anticorpos anti- H4K14ac em células nas fases G2/M do ciclo celular. Após sincronização com hidroxauréia, que bloqueia as células na fase S, todas as acetilações aumentaram após a retirada da droga, onde ocorre replicação do DNA e incorporação de novas histona H4. Esse dado poderia sugerir que o aumento observado na imunofluorescência poderia ser devido a uma maior exposição do epítipo correspondente a K14 no momento da divisão celular. No entanto, sabe-se que hidroxauréia causa dano de DNA, o que afeta os níveis de acetilação de histonas (explicado adiante).

Outro processo amplamente relacionado com a acetilação de histonas é a transcrição. Em *T. cruzi*, a transcrição é policistrônica e portanto a regulação é pós-transcricional. A marcação da RNA polimerase II em epimastigotas corresponde a um foco principal ao lado do nucléolo, onde estão localizados os genes do SL e pontos menos intensos dispersos no compartimento nuclear (Dossin e Schenkman, 2005). Em ensaios de co-localização da RNA Polimerase II com lisinas acetiladas na histona H4 indicaram pouca ou nenhuma co-localização nos sítios de transcrição. Foi mostrado por outros grupos que a histona H4 está preferencialmente acetilada nos sítios onde se presume haver início de transcrição em tripanossomas (Siegel et al., 2009). Assim, a ausência de colocalização provavelmente se deve a que a RNA polimerase II esteja no processo de alongação da transcrição. Já onde há marcação mais intensa com RNA polimerase II e que deve corresponder aos sítios de transcrição de SL não ocorre colocalização, como também observado em *T. brucei* (Siegel et al., 2009). Estes dados reforçam a idéia que o efeito da acetilação no início da transcrição deve ocorrer

mais devido à reestruturação da cromatina do que a sinalização para a ligação de fatores transcricionais.

O *T. cruzi* é altamente resistente a radiação ionizante, suportando doses de até 1000 Gy. Entretanto, imediatamente após submetidos a dose de 500 Gy, através de microscopia eletrônica de transmissão observamos que o núcleo começa a se desorganizar e após 24 h, a heterocromatina desaparece completamente. Ao observar os níveis de acetilação, verificamos que, enquanto H4K4ac diminuiu, H4K10ac e H4K14ac aumentam após a radiação, atingindo níveis máximos de expressão 24-48h após irradiação, período em que ocorre o reparo.

A partir desses resultados concluímos que cada uma das acetilações da histona H4 influencia de maneira distinta a organização da cromatina, afetando os processos de transcrição, replicação e reparo do DNA de *T. cruzi*.

Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage

Sheila Cristina Nardelli ·
Julia Pinheiro Chagas da Cunha ·
Maria Cristina M. Motta · Sergio Schenkman

Received: 14 April 2008 / Revised: 4 April 2009 / Accepted: 6 April 2009 / Published online: 25 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Histones of trypanosomes are quite divergent when compared to histones of most eukaryotes. Nevertheless, the histone H4 of *Trypanosoma cruzi*, the protozoan that causes Chagas' disease, is acetylated in the N terminus at lysines 4, 10, and 14. Here, we investigated the cellular distribution of histone H4 containing each one of these posttranslational modifications by using specific antibodies. Histone H4 acetylated at lysine 4 (H4-K4ac) is found in the entire nuclear space preferentially at dense chromatin regions, excluding the nucleolus of replicating epimastigote forms of the parasite. In contrast, histone H4 acetylated either at K10 or K14 is found at dispersed foci all over the nuclei and at the interface between dense and nondense chromatin areas as observed by ultrastructural immunocytochemistry. The level of acetylation at K4 decreases in nonreplicating forms of the parasites when compared to

K10 and K14 acetylations. Antibodies recognizing the K14 acetylation strongly labeled cells at G2 and M stages of the cell cycle. Besides that, hydroxyurea synchronized parasites show an increased acetylation at K4, K10, and K14 after S phase. Moreover, we do not observed specific colocalization of K4 modifications with the major sites of RNA polymerase II. Upon γ -irradiation that stops parasite replication until the DNA is repaired, dense chromatin disappears and K4 acetylation decreases, while K10 and K14 acetylation increase. These results indicate that each lysine acetylation has a different role in *T. cruzi*. While K4 acetylation occurs preferentially in proliferating situations and accumulates in packed chromatin, K10 and K14 acetylations have a particular distribution probably at the boundaries between packed and unpacked chromatin.

Communicated by E.A. Nigg

Sheila Cristina Nardelli and Julia Pinheiro Chagas da Cunha contributed equally to this work.

S. C. Nardelli · J. P. C. da Cunha · S. Schenkman (✉)
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de São Paulo,
Rua Botucatu 862 8A,
São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil
e-mail: sschenkman@unifesp.br

M. C. M. Motta
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
CCS, Bloco G, Ilha do Fundão,
Rio de Janeiro, 21949-900 Rio de Janeiro, Brazil

Present Address:

J. P. C. da Cunha
Ludwig Institute for Cancer Research,
Rua João Julião 245—Paraisópolis,
São Paulo, São Paulo 01323-903, Brazil

Introduction

Since the initial proposal by Allfrey et al. (1964) that histone lysine acetylation is involved in the control of chromatin transcriptional activity, a large progress has been made showing that several nuclear processes depend on histone posttranslational modifications. Transcription regulatory factors are able to promote or require histone acetylation/deacetylation (Kouzarides 1999; Peterson and Laniel 2004; Black et al. 2006; Nightingale et al. 2006) and differential methylation of lysine and arginine residues (Richards and Elgin 2002; Bannister and Kouzarides 2005). Histones are also differentially modified during DNA replication in the S phase of the cell division cycle (Herceg and Wang 2005) and during DNA repair (Vidanes et al. 2005; Wurtele and Verreault 2006). Modified histones are sites for recognition factors that can direct assembly of highly organized and structured chromatin, preventing the

access of the catalytic machineries to the DNA in condensed chromatin, or heterochromatin. Alternatively, such factors can induce relaxation of chromatin generating the euchromatin (Trojer and Reinberg 2007). Therefore, histone modifications contribute to the spatial organization of chromatin through the association of the diverse molecular machineries (Schneider and Grosschedl 2007).

In trypanosomes, which include several flagellated protozoa that cause human and animal diseases, gene expression is mostly regulated at the posttranscriptional level after processing polycistronic pre-mRNAs by transplicing and polyadenylation (Campbell et al. 2003; Das and Bellofatto 2004) and their histones are highly divergent from other eukaryotic organisms, mainly at the N-termini (Alsford and Horn 2004). Nevertheless, in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease and in *Trypanosoma brucei*, the agent of African Trypanosomiasis, several posttranslational modifications of histones have been characterized (da Cunha et al. 2006; Janzen et al. 2006a, b; Mandava et al. 2007; Siegel et al. 2008). While histones H4 and H2A are mainly acetylated, histones H3 and H2B are preferentially methylated. Histone H4, which shares 96% identity between *T. cruzi* and *T. brucei*, is abundantly acetylated at Lys4 (K4) and to a lesser extent at K10 and K14. *T. brucei* H4 is additionally acetylated at K2 and K5 and *T. cruzi* H4 at K57. In addition, several histone acetylases, deacetylases, and methylases were identified in the genome of these organisms (Alsford and Horn 2004; Kawahara et al. 2008) and genetic ablation of some of them revealed their essentiality for the parasite survival (Ingram and Horn 2002).

To further understand the role of these posttranslational modifications, herein, we investigate the alterations in quantity and nuclear localization of three acetylated forms of histone H4 in *T. cruzi* by using specific antibodies. We found a differential localization of histone H4 acetylated at lysine 4 (H4-K4Ac), lysine 10 (H4-K10Ac), and lysine 14 (H4-K14Ac). While H4-K4Ac is present in all nuclear space, being enriched in the nuclear periphery and chromatin-rich areas, H4-K10Ac and H4-K14Ac are localized in more discrete domains. We therefore studied the association of these domains with transcription sites and how these modifications change during DNA replication and repair. The obtained results illustrate that each histone H4 acetylation has a different role related to the chromatin organization and nuclear compartmentalization in trypanosomes.

Materials and methods

Parasites

Epimastigotes forms of *T. cruzi* (Y strain) were cultured in a liver infusion tryptose (LIT) medium, supplemented with

10% fetal bovine serum (LIT medium) at 28°C (Camargo 1964). The trypomastigotes forms were obtained from supernatant of LLCMK₂ cells (ATCC-CCL7) infected and maintained in Eagle's medium modified by Dulbecco, supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO₂. The amastigotes were obtained by incubating trypomastigotes in LIT medium at 28°C for 48 h. The medium containing parasites was collected and centrifuged at 2,000×g. The resulting pellet was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and immediately used or stored at -70°C. Hydroxyurea (HU) synchronization was performed as described previously (Elias et al. 2003).

Histone extraction, immunoblots, immunofluorescence, and Br-UTP labeling

The *T. cruzi* histones were purified from total chromatin by extraction with 0.3 M HCl as described by Toro and Galanti (1990). The immunoblots were performed using total *T. cruzi* histone extracts fractionated by electrophoresis in acetic acid, urea, Triton DF-16 (Sigma) polyacrylamide gels (Marques Porto et al. 2002) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The PVDF membranes were treated for 1 h with 7% nonfat dry milk in PBS and then incubated with antihistone H4-K4Ac, antihistone H4-K10Ac, or antihistone H4-K14Ac antibodies (da Cunha et al. 2006). After 2 h, the membranes were washed with PBS and bound antibodies detected with the anti-IgG antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz) and chemoluminescence substrate (Pierce). The quantifications of immunoblots were done using Kodak Digital Science 1D. Indirect immunofluorescence experiments were performed by attaching 2×10⁵ prewashed parasites to glass slides, following fixation with 4% *p*-formaldehyde in PBS for 20 min. Fixed cells were washed three times with PBS, treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, blocked 30 min with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA), and incubated with the different affinity purified antihistone H4 (da Cunha et al. 2006) and antiRNA polymerase II antibodies (Dossin and Schenkman 2005) diluted in PBS containing 1% BSA. After 1 h, the slides were washed three times with PBS and bound antibodies revealed with anti-IgG fluorescent conjugates in the presence of 0.01 mM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Slides were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). In vitro transcription was performed as described previously (Dossin and Schenkman 2005) with some modifications. After washing the parasites with transcription buffer (Abuin et al. 1999), the cells were permeabilized with 10 μg of palmitoyl-L-α-lysophosphatidylcholine (Sigma) per milliliter for 1 min on ice, centrifuged, and resuspended to the same cell density in the transcription buffer containing 2 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.5 mM bromo-UTP (Br-UTP),

200 μg of creatine kinase per mL, and 50 mM creatine phosphate (all from Roche). The cells were incubated for 10 min at 28°C, centrifuged, washed in transcription buffer, and fixed by adding *p*-formaldehyde to 2% in PBS. The fixed cell suspension was then added to glass slides precoated with poly-L-lysine, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, and incubated with a mouse monoclonal anti-BrdU (Roche) and the indicated antihistone H4 antibodies. Fluorescence images were visualized with a 100 \times 1.3-NA oil immersion objective in a Nikon E600 microscope coupled to a Nikon DXM1200F camera. Alternatively, serial image stacks (0.2- μm Z-increment) were

collected at 100 \times (PlanApo oil immersion 1.4 NA) on a motorized Zeiss Axioplan II equipped with differential interference contrast optics and an Orca AG charge-coupled device camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA). The images were collected with OpenLabs 5.0 software (Improvision), and fluorescence images were deconvolved by using a constrained iterative algorithm, pseudocolored, and merged by using Velocity 4.0 software (Improvision). Alternatively, serial images (0.2- μm Z-increment) were collected using a 100 \times objective 1.35 NA using the Cell R software in a motorized Olympus IX81 microscope. Images were processed by blind deconvolution using Autoquant X 2.1.

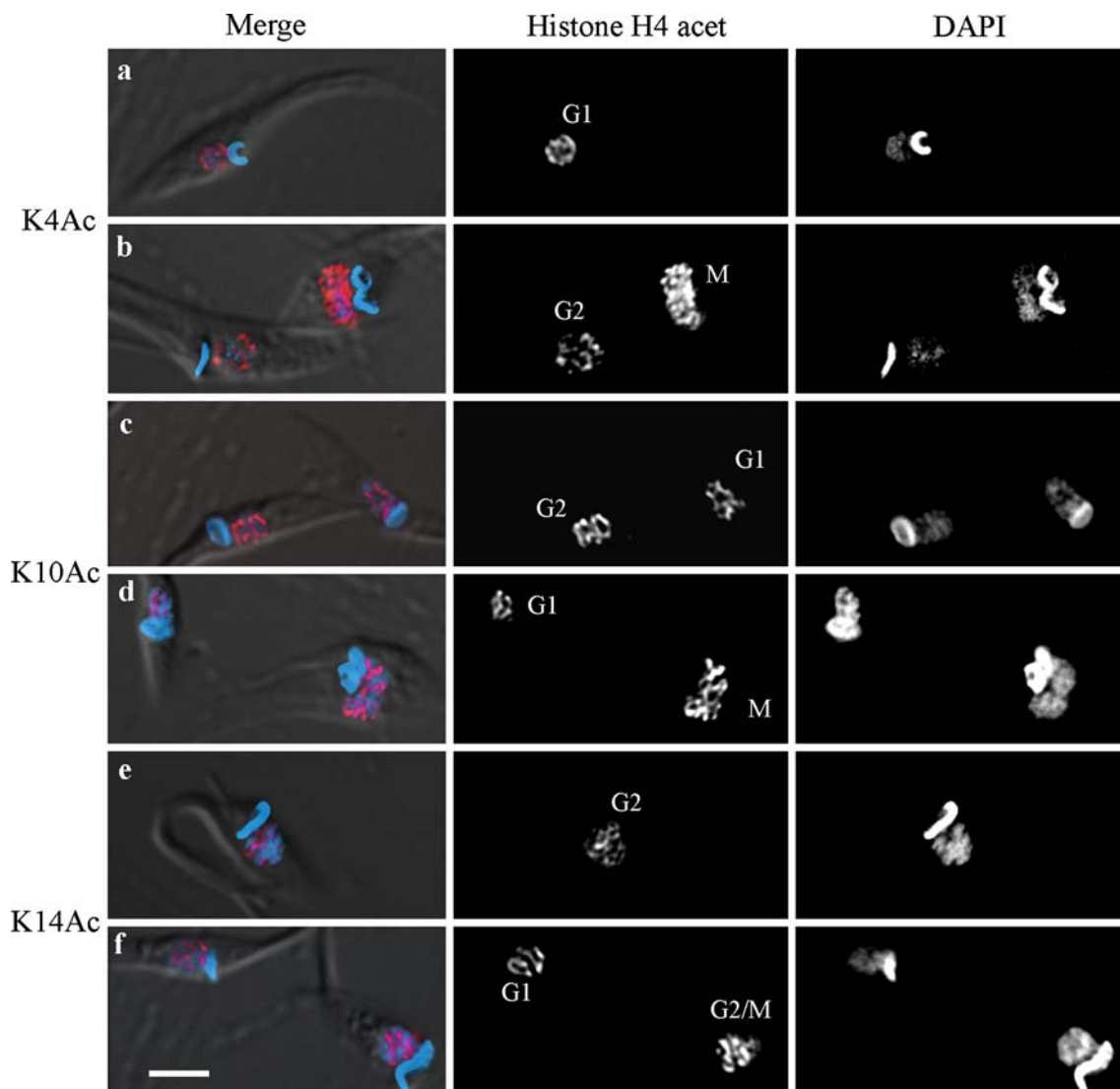
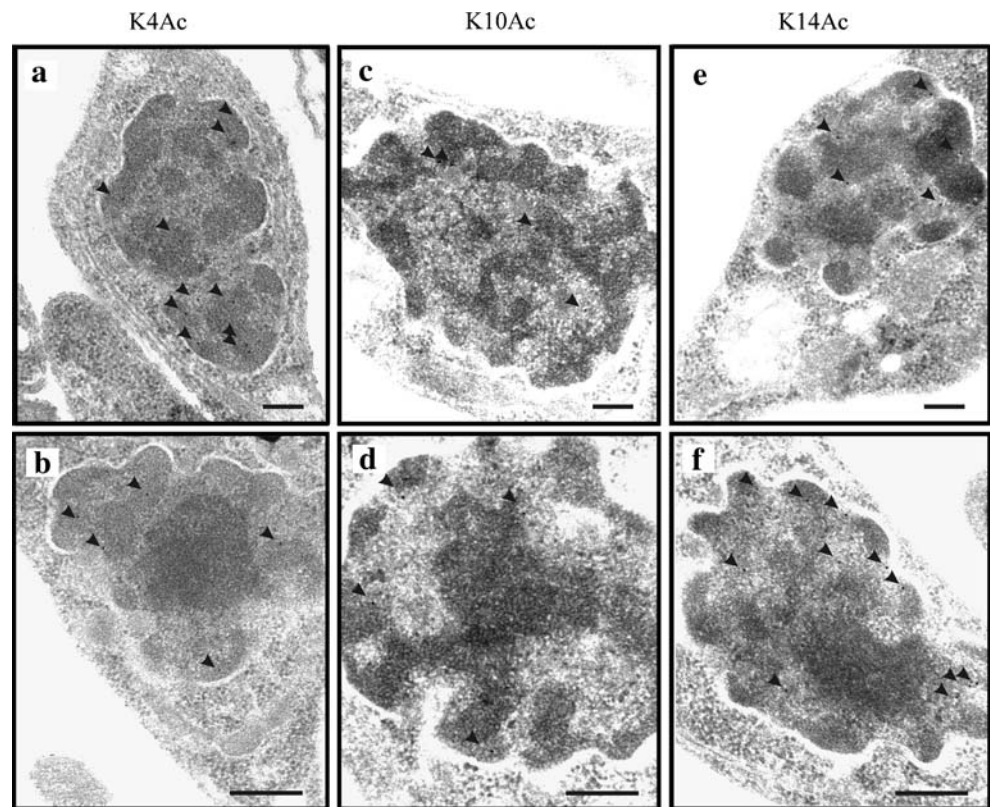


Fig. 1 Distribution of acetylated lysine 4, 10, and 14 in the nucleus of *T. cruzi* epimastigotes. Exponentially growing epimastigotes were attached on glass slides and processed for DAPI staining and immunofluorescence using anti-H4-K4Ac (**a**, **b**), K10Ac (**c**, **d**), and K14Ac (**e**, **f**). The images were collected along a Z-series and processed

for three-dimensional deconvolution. The merged figures correspond to the color generated images for DAPI (*blue*) and histone H4 (*red*) superimposed to the DIC acquisition. The cell cycle stages *G1*, *G2*, and *M* are indicated. Bar=3 μm

Fig. 2 Ultrastructural immunocytochemistry showing the localization of *T. cruzi* acetylated lysines of histone H4. Exponentially growing epimastigotes were fixed and processed for immune electron microscopy and labeled with anti-H4-K4Ac (a, b), anti-H4-K10Ac (c, d), and anti-H4-K14Ac (e, f), followed by antirabbit IgG conjugated to 10 nm gold particles. The arrowheads indicate the gold particles seen in each micrograph. Bars=0.2 μ m



Electron microscopy analysis

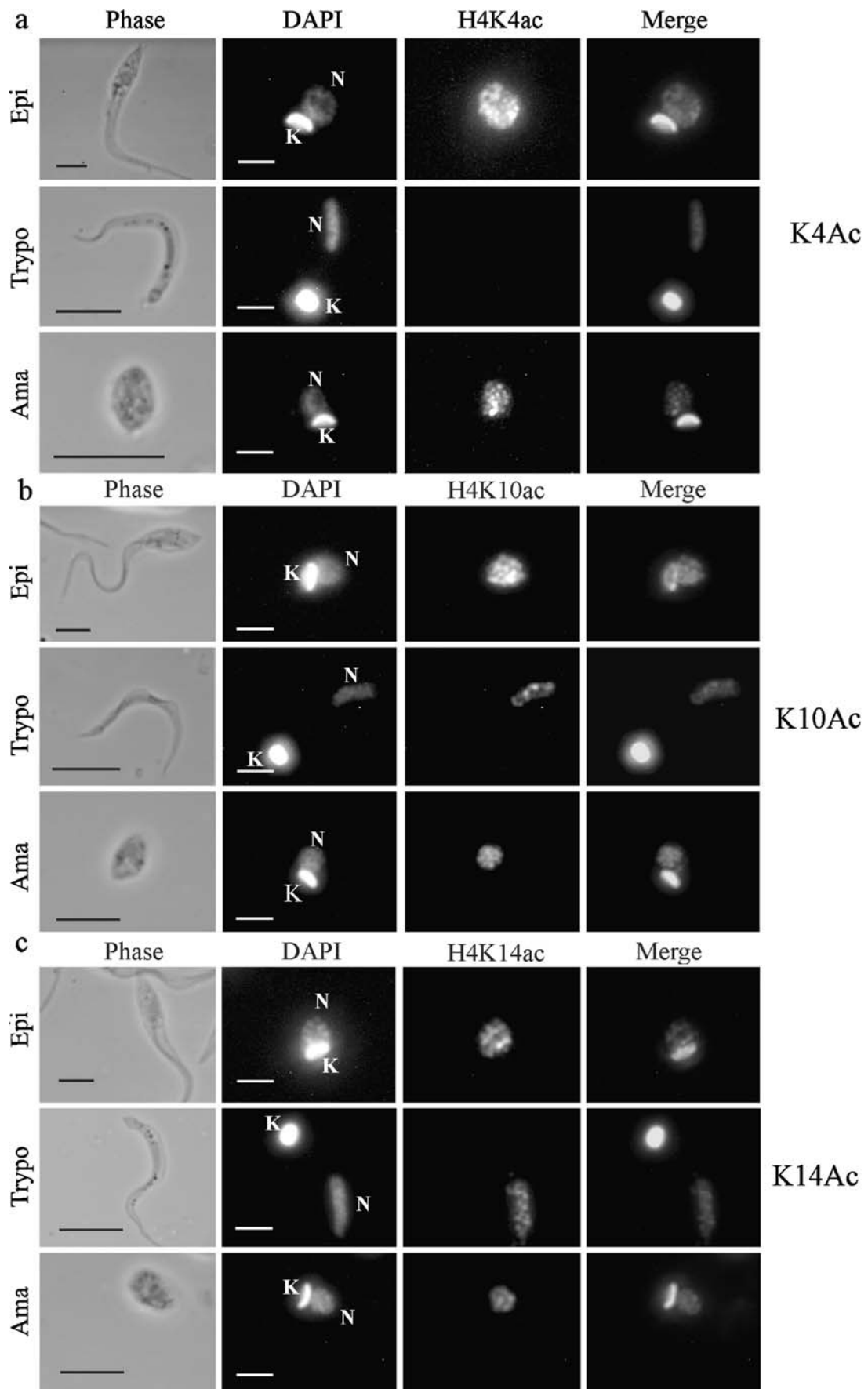
For routine preparations, protozoa were fixed in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2. Cells were postfixed in 1% OsO₄, 0.8% KFe(CN)₆, and 5 mM CaCl₂ in the same buffer. Then, cells were washed, dehydrated in acetone, and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before observation. For immunocytochemistry analysis, parasites were fixed in 0.3% glutaraldehyde, 4% formaldehyde, and 1% picric acid diluted in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.2 and then dehydrated at -20°C using a graded acetone series (30%, 50%, 70%, 90%, and 2× 100%). The material was progressively infiltrated with Unicryl at lower temperatures and the resin polymerization was carried out in BEEM capsules at -20°C for 5 days under ultraviolet light. Ultrathin sections were obtained in a Leica ultramicrotome (Reichert Ultracuts) and the grids containing the sections were incubated with 50 mM NH₄Cl for 30 min. Later, the grids were incubated with blocking solution (3% BSA, 0.5% teleostean gelatin, 0.02% Tween 20 diluted in PBS, pH 8.0) for 30 min and then with the goat serum diluted in blocking solution (1:250). Grids were incubated for 1 h with antimodified histone antibodies diluted in blocking solution. Anti-H4-K4Ac was diluted 1:10, while anti-H4-K10Ac and anti-H4-K14Ac was used undiluted. Then, ultrathin sections were incubated with gold-labeled goat antirabbit antibodies

diluted 1:250, for 45 min, washed in blocking solution, and stained with uranyl acetate and lead citrate for further observation in a Zeiss 900 transmission electron microscope. In control assays, sections were not incubated with the primary antibody.

γ -Irradiation

Epimastigotes at exponential growing phase were irradiated with 500 Gy on Gammacell 3000 Irradiator (Nordion International Inc). After γ -irradiation, the parasite suspensions were centrifuged and resuspended in LIT medium to 5×10^6 parasites per mL and fixed immediately or maintained at 28°C. At the indicated incubation times, the parasites were collected and used for histone extraction or for routine electron microscopy analysis.

Fig. 3 Distribution of acetylated lysines of histone H4 in different *T. cruzi* life cycle stages. Epimastigotes (*Epi*), tissue culture derived trypomastigotes (*Trypo*), and extracellular amastigotes (*Ama*) were processed for DAPI staining and immunofluorescence using antihistone H4-K4Ac (a), K10Ac (b), and K14Ac (c). The panels show the respective phase contrast images (not at the same magnification, bars=3 μ m) and the immunofluorescence images (at the same magnification, bars=3 μ m). The position of the nucleus (*N*) and the kinetoplast (*k*) are shown in the DAPI images



Results

Distribution of distinct forms of acetylated histone H4 in *T. cruzi* nucleus

We started investigating the nuclear distribution of histone H4 acetylated at lysines 4, 10, and 14 in exponentially growing epimastigotes of *T. cruzi* by using previously characterized antibodies to each one of these posttranslational modifications (da Cunha et al. 2006). In this latter work, we have previously shown that H4-K4Ac is the most abundant modification representing the majority of histone H4 and that less than 5% were also acetylated in K10 and K14. When using conventional immunofluorescence analysis, histone H4-K4Ac was found distributed in the entire nuclear space, while the H4-K10Ac and H4-K14Ac were found in a more punctate pattern (data not shown). To obtain a more precise localization, the images were acquired along the Z-axis and submitted to three-dimensional deconvolution. In a narrow plane, histone H4-K4Ac was detected preferentially in the nuclear periphery with several interconnections across the entire nuclear space of G1 and S phase cells (Fig. 1a), known to contain a single flagellum (Elias et al. 2007). This pattern was detected in about 85% of exponentially growing cells. In the other 15%, the H4-K4ac labeling was found in punctuated structures over the whole nuclear space that was not entirely associated with the DAPI staining (Fig. 1b). The additional DAPI staining structure corresponds to the multiple mitochondrial DNA concatenated circles, known as kinetoplast in this group of protozoa. In this last case, parasites containing two flagella were in G2, mitosis, and cytokinesis (Elias et al. 2007). G2 parasites contain one nucleus and one kinetoplast. Mitotic parasites have two kinetoplast and parasites in cytokinesis have two kinetoplasts and two nuclei. In contrast, H4-K10Ac or H4-K14Ac labeling showed a more dispersed pattern regardless of cell cycle stage (Fig. 1c–f). The pattern observed in G1 cells for H4-K10Ac shows a more central labeling with branches irradiating toward the nuclear periphery, while for H4-K14Ac, the labeling was found in continuous intranuclear structures. The specificity of each antibody at the dilution used in these experiments was assured by the complete inhibition of the immunofluorescence labeling by the corresponding peptide, but not by peptides acetylated in another position (not shown).

To further explore the nuclear localization of these posttranslational modifications, ultrathin sections were labeled with each antibody and sections observed by transmission electron microscope. Acetylation at K4 was mainly found at the middle of the dense regions, rarely in the diffuse chromatin regions (Fig. 2a, b), while acetylation at K10 (Fig. 2c, d) and K14 (Fig. 2e, f) was preferentially found at the border of dense chromatin fibers. These more

electron-dense regions were previously shown to stain strongly with DNA probes (Elias et al. 2002) and are, in fact, expected to be enriched in H4-K4Ac, an abundant posttranslational modification of the histone H4 (da Cunha et al. 2006; Janzen et al. 2006a). In contrast, the fact that H4-K10Ac and H4-K14Ac are much less abundant indicates that their localizations between dense and less dense fibers are indeed specific. Combined with the immunofluorescence data, the different localization of H4K4Ac compared to H4-K10Ac and K14Ac observed by immune electron microscopy suggest a distinct role for these two groups of modifications.

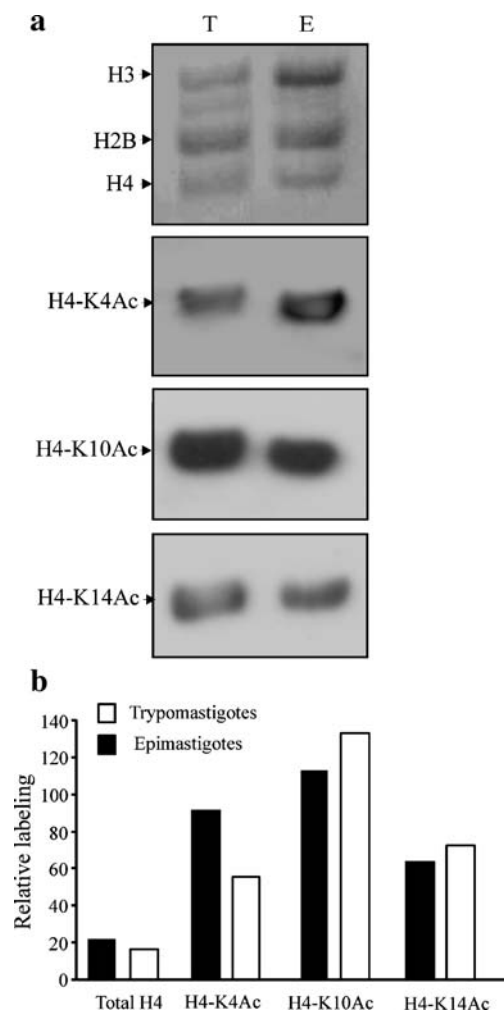


Fig. 4 Quantification of histone H4 acetylation by immunoblot. **a** Equal amounts of histone H4 from exponentially growing epimastigotes (*E*) and tissue culture derived trypomastigotes (*T*) were loaded in urea, acetic acid, and Triton DF-16 gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to a PVDF membrane. The *top panel* shows a portion of the membrane stained with Ponceau S. The *lower panel* shows the chemoluminescence staining after reprobing with antibodies to H4-K4Ac, H4-K10Ac, and H4-K14Ac. **b** The levels of the indicated histone H4 quantified by ImageJ software from one representative of two independent experiments

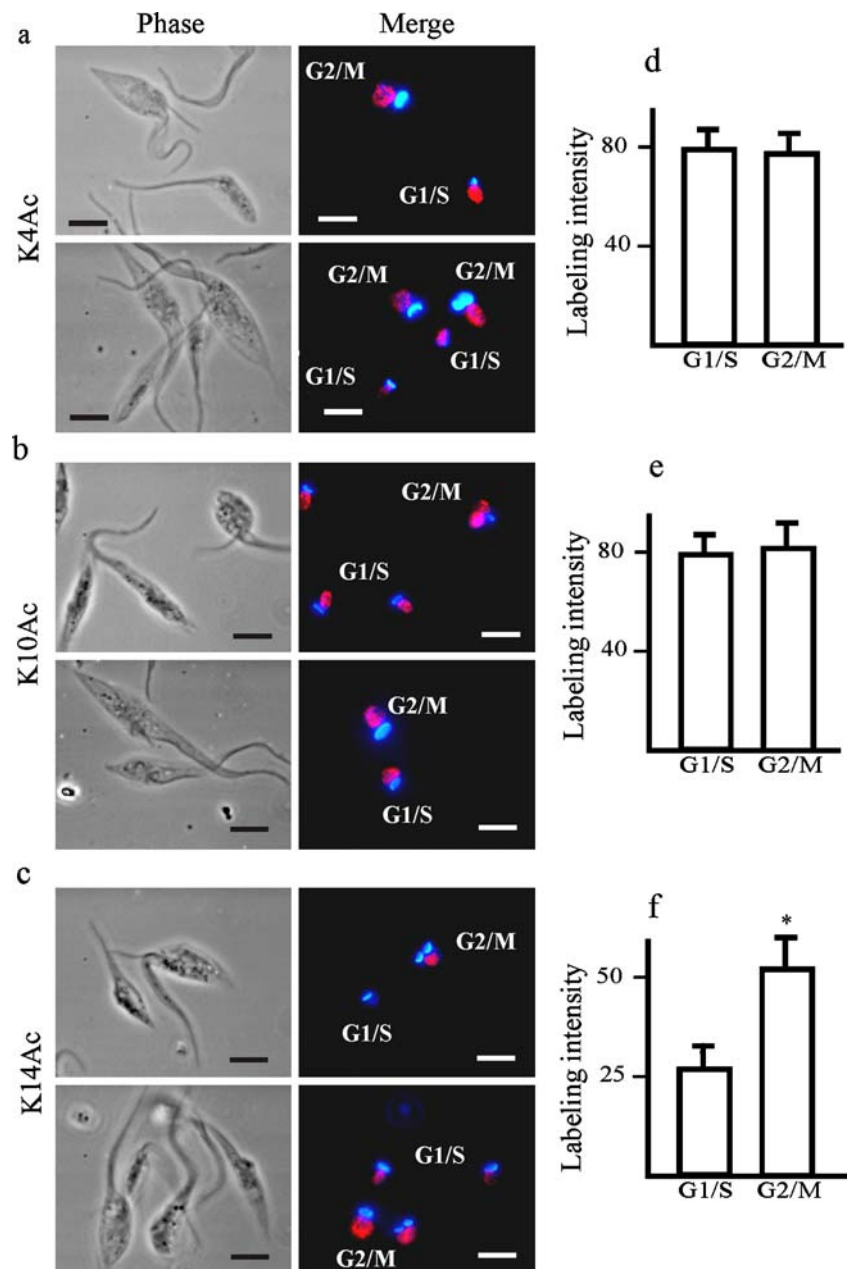
Histone H4 lysine 4 acetylation is decreased in trypomastigotes, a nonproliferating stage of *T. cruzi*

T. cruzi proliferates by binary division as epimastigotes in the insect vector gut and as amastigotes inside mammalian cell cytosol. These forms differentiate into nondividing trypomastigote stages that are able to re-enter mammalian cells (de Souza 1984). These different *T. cruzi* life cycle stages shows different gene expression, chromatin structure, and transcription rates (Elias et al. 2001), which could be associated with different patterns of histone H4 acetylation. To explore this issue, we initially investigated by immunofluorescence whether the distinct *T. cruzi* developmental

forms are acetylated and how acetylated forms of histone H4 are distributed. Pictures were taken with the same exposure time from exponentially growing cultures and the labeling intensity scored for each cell. As shown in Fig. 3, epimastigotes and amastigotes displayed similar labeling patterns and staining intensities for all antibodies. In contrast, trypomastigotes were much less labeled by anti-H4-K4Ac when compared with anti-H4-K10Ac and K14Ac.

As immunofluorescence can be affected by epitope exposure in the chromatin, or by the presence of other chromatin modifications, decreased expression of H4-K4Ac was confirmed by immunoblots performed with equal amounts of histones isolated from epimastigotes and

Fig. 5 Histone H4 acetylation immunolabeling during epimastigote cell cycle. Exponentially growing epimastigote forms were attached to glass slides and processed for DAPI staining and immunofluorescence with antibodies to the indicated acetylated histone H4 (a–c). Cells in G2/M and in G1/S are indicated. Bars = 3 μ m. d–f The mean \pm standard deviation of integrated immunofluorescence labeling intensity for the same series of antibodies by scoring cells in G1/S and G2/M. Twenty-five images of G1/S and 25 for G2/M were quantified for each antibody by ImageJ software. The $*p < 0.05$ indicates that the difference between the G2/M and G1/S column is statistically significant



trypomastigotes. As shown in Fig. 4a, the levels of K4 acetylation compared to the amount of histone H4 detected by Ponceau S staining (total H4) was significantly decreased in trypomastigotes, while K10 and K14 acetylations seem increased in trypomastigotes (Fig. 4b).

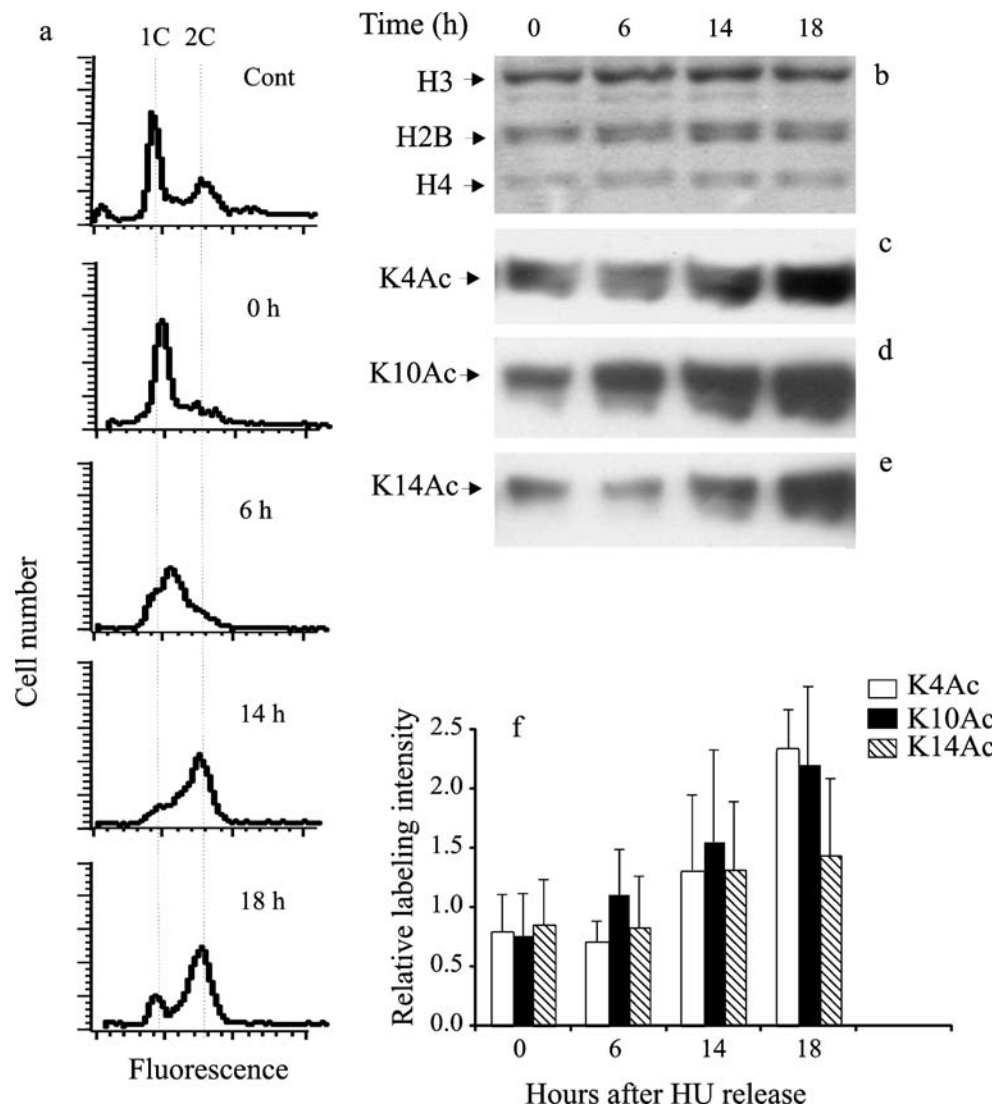
Histone H4 acetylation in K4, K10, and K14 are increased after S phase of the cell cycle

Next, we investigated the presence of histone H4 acetylations during the different stages of the cell cycle. The cell cycle stages were identified based on the flagella and nucleus number, and representative images are shown in Fig. 5a–c. The acetylation detected by immunofluorescence using the antibodies to K4 and K10 were the same when G1/S cells are compared with G2, or mitotic cells (Fig. 5d, e). Interestingly, histone H4 acetylation at K14 showed an increased labeling in parasites in G2 and mitosis (Fig. 5f). It

is important to note that because they contain two flagella, G2 and M phase cells are easy to distinguish from other cells. However, we cannot discriminate G1 and S phase cells because they both contain a single flagellum. As replicating DNA cells represent 15% of the population, it is possible that they could have different histone H4 acetylation levels, not detected in our experiments.

This increase in immunofluorescence labeling does not necessarily implicate an increase in a different acetylation state, as variable accessibility to the histone H4 modifications could produce the same results. Therefore, we examined the amount of acetylation in cells synchronized with HU by immunoblots of extracted histones. As shown in Fig. 6, all histone H4 acetylations increase progressively only after 14 h following HU release. Importantly, H4-K14Ac increase was less prominent than H4-K10Ac and H4-K4Ac suggesting that the observed increase in K14Ac by immunofluorescence was due to an increased epitope exposure in dividing cells.

Fig. 6 Histone H4 acetylation levels in HU synchronized cells. Exponentially growing epimastigotes (*Cont*) or cells treated for 24 h with 20 mM HU, washed twice and resuspended in medium, and allowed to grow for 0, 6, 14, and 18 h were analyzed by flow cytometry after staining with propidium iodide (a), or used for histone extraction. The dashed lines in a indicate the amounts of DNA corresponding to G1 (1C) and G2/M (2C) cells. The isolated histones were loaded in urea, acetic acid, and Triton DF-16 gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to a PVDF membrane. b A portion of the membrane stained with Ponceau S. c–e The chemoluminescence staining after reprobing respectively with antibodies to H4-K4Ac, H4-K10Ac, and H4-K14Ac. f The levels of the indicated histone H4 quantified by ImageJ software. Relative labeling intensity is the ratio of unsaturated signals obtained by chemoluminescent blotting relative to the amount of histone H4 detected by Ponceau S staining. The graphic show the mean \pm standard deviation of three different experiments



RNA Pol II and Br-UTP labeling shown poor colocalization with H4 acetylations

As histone acetylation is well known for its role in transcription regulation (Clayton et al. 2006), we asked whether acetylated histone H4 forms would colocalize with RNA Pol II and nascent transcripts labeled by incorporation of Br-UTP in lyssolecithin permeable cells. We have previously found that *T. cruzi* RNA Pol II is located in multiple foci, probably sites of polycistronic messages transcription, typical of trypanosomes, and preferentially accumulates near the nucleolus where the spliced leader genes are localized (Dossin and Schenkman 2005). Parasites were labeled with anti-RNA Pol II antibodies and anti-acetylated histone H4 and although some colocalization was observed, the RNA Pol II major labeling is preferentially not associated with all acetylated histone H4 forms (Fig. 7). We also performed incorporation of Br-UTP in lyssolecithin permeable cells followed by anti-acetylated histone H4 staining. Br-UTP labeling occurs all over the nucleus including acetylated histone H4 sites (not shown). Therefore, we could not infer a specific colocalization.

Effect of ionizing irradiation on histone H4 acetylation

Histone posttranslational modifications have been observed after DNA damage and during repair (Vidanes et al. 2005; Wurtele and Verreault 2006). Therefore, the effect of γ -irradiation, which generates double-strand breaks (DSB) on *T. cruzi* histone H4, was investigated. The parasites were

submitted to 500-Gy irradiation and observed by transmission electron microscopy. At this dose, the parasites remained fully motile and recovered growth after 3–4 days as described (Regis-da-Silva et al. 2006). Nonirradiated parasites have a typical nucleus with a central nucleolus and regions of electron-dense chromatin located juxtaposed to the nuclear envelope or dispersed through the nuclear space (Fig. 8a). Soon after irradiation, both nucleolus and dense chromatin areas appeared more dispersed (Fig. 8b). At 24 h from irradiation, when the DNA was still being repaired (see below; Regis-da-Silva et al. 2006), an assembled nucleolus was present, but the nucleus still lacked the dense chromatin (Fig. 8c), indicating an extensive chromatin disorganization. To investigate possible changes in histone posttranslational modifications, we initially stained γ -irradiated cells with the anti-H4 antibodies. However, we observed a more intense labeling for all antibodies (not shown), probably reflecting an increased accessibility of the chromatin due to the dramatic chromatin disorganization. To determine changes in H4 acetylation levels, histones were purified from control and irradiated cells. As seen in Fig. 8d–i, the amount of H4K4Ac started decreasing after 6 h of γ -irradiation, reaching minimal levels after 24 h, a time when most of the DNA repair is known to occur in *T. cruzi* (Regis-da-Silva et al. 2006). Then, the H4-K4Ac levels started to increase. In contrast, H4-K10Ac and K14Ac increased significantly 6 h after γ -irradiation, reaching maximal levels at 24–48 h. At 158 h, the levels of H4-K10 and K14 acetylations decreased significantly. However, even at this time point, H4-K10/K14Ac levels were higher than in nonirradiated trypano-

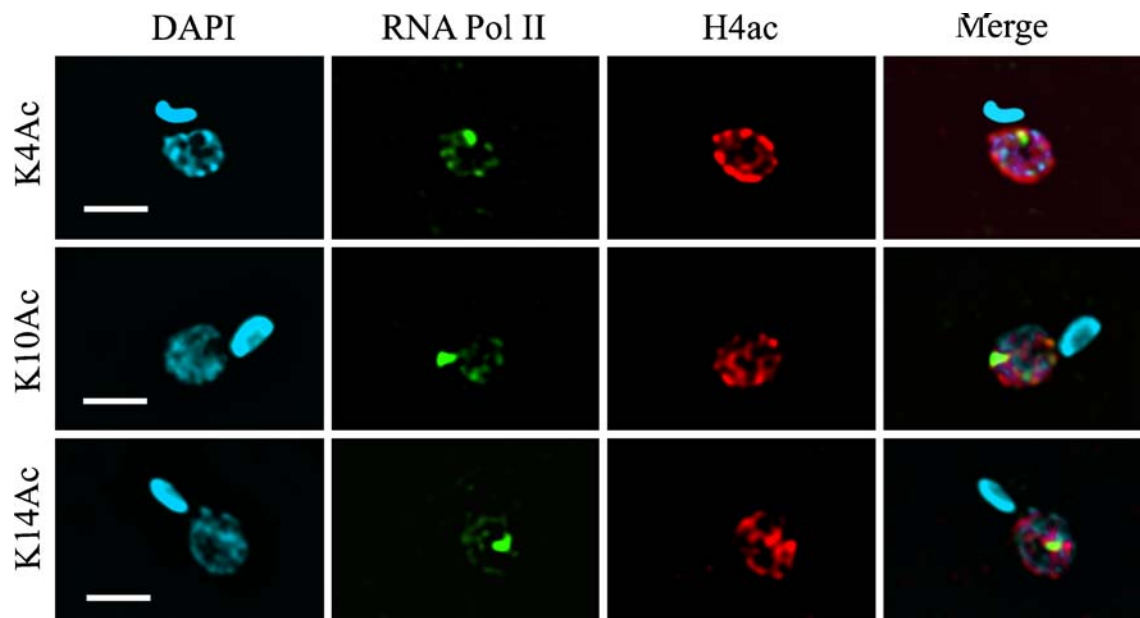


Fig. 7 Acetylations of histone H4 does not colocalizes with RNA Pol II labeling. Cells were attached to glass slides and processed for DAPI staining and immunofluorescence using mouse anti-RNA Pol II

antibodies and the indicated rabbit anti-acetylated histone H4. The images show one deconvolved Z-section using Autoquant X 2.1 software. Bar=2 μ m

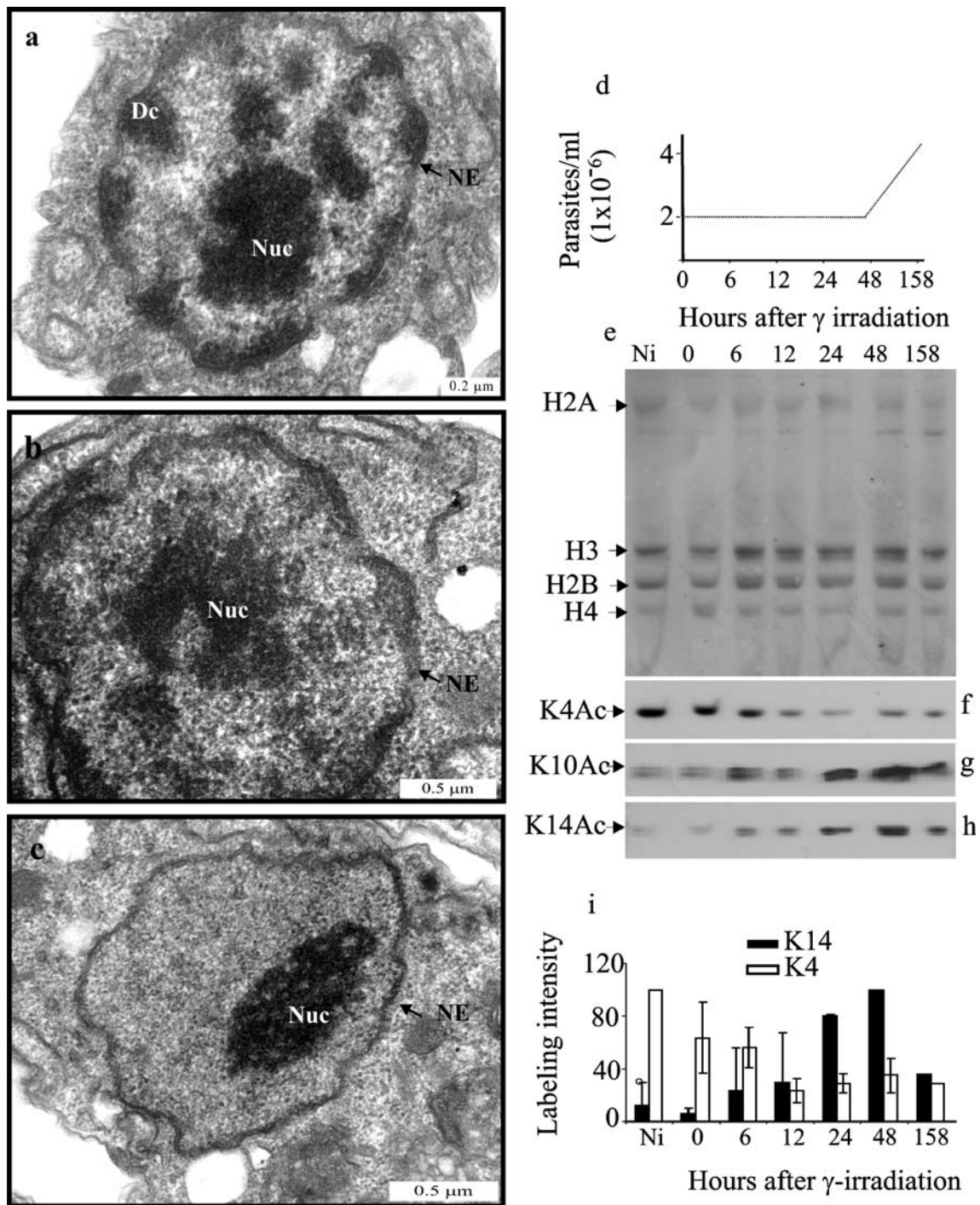


Fig. 8 Exponentially growing epimastigotes were exposed to 500 Gy and remaining fully motile. Aliquots were taken at indicated times, the histones were fixed and processed for transmission electron microscopy, or acid extracted, fractionated in acetic acid, urea, Triton DF-16 gels, and transferred to PVDF membranes. **a** The nucleus of nonirradiated parasites (control cells), **b** parasite immediately after 500 Gy of γ -irradiation, and **c** a parasite 24 h after γ -irradiation. Bars=0.2 μ m in **a**, **b**, **c** Bars=0.5 μ m. *DC* dense chromatin, *Nuc* nucleolus, *NE* nuclear

envelope. **d** The growing curves of irradiated parasites; **e** the Ponceau S staining of the membrane containing samples of nonirradiated cells (*Ni*) and cells irradiated at the indicated times. **f–h** The immunoblots with anti-H4-K4Ac, K10Ac, and K14Ac, respectively. **i** The graphic shows the mean \pm standard deviation of four different experiments (except for 158 h time point) for the labeling intensity of anti-H4-K4Ac (*open bars*) and K14Ac (*closed bars*)

somes or at the time of irradiation (0 h in Fig. 8e). These results show a variable response to the distinct acetylations of histone H4 in cells exposed to DNA damage agents.

Discussion

In this work, we have provided evidence that N terminus acetylations at lysine 4, 10, and 14 of *T. cruzi* histone H4 are differentially associated with several nuclear events. There was a clear difference between H4-K4Ac in opposition to K10 and K14 modifications. The H4-K4 acetylation, which is abundant in trypanosomes, was found in more densely packed chromatin. This is expected because electron-dense areas are enriched in DNA and thus concentrate more histones. More importantly, H4-K4Ac levels were shown to decrease in nonreplicating trypomastigote stage and after DNA breaks caused by ionizing radiation. In contrast, K10 and K14 were found predominantly at the boundaries or at less electron-dense areas, persisting during life cycle and increasing after DNA breaks caused by ionizing radiation.

After synthesis and before incorporation into chromatin, the histone H4 is acetylated at K5 and K12 in mammalian cells, or K4 and K11 in *Tetrahymena* (Sobel et al. 1995). These modifications are possible synonymous of K4 and K10 in trypanosomes and might be involved in chromatin assembly. In fact, *T. brucei* H4-K4Ac is enriched when compared to unmodified histone H4 in the G2 phase of the cell cycle (Siegel et al. 2008). These authors also showed that after treatment with cycloheximide, K4Ac is increased while unmodified H4-K4 decreases due to protein synthesis blockage. As none of all histone deacetylases mutants identified in *T. brucei* had effect on H4-K4Ac, the authors suggested that newly synthesized histones are rapidly acetylated at K4 and H4-K4Ac deacetylation may not occur. We have shown that H4-K4Ac increases after S phase suggesting that the same mechanism might occur in *T. cruzi*. Interestingly, we found that H4-K4Ac diminished in nonreplicating *T. cruzi* trypomastigotes. This could happen by specific deacetylation, or because histone H4 is still synthesized but not acetylated. This second possibility is unlikely as it has been shown that no histone synthesis occurs in trypomastigotes (Sabaj et al. 2001). Accordingly, addition of cycloheximide to trypomastigotes does not increase the levels of H4-K4Ac (not shown). Therefore, deacetylation might occur in during or after differentiation of trypomastigotes. Cycloheximide did not increase either the levels of H4-K4ac of unsynchronized epimastigotes (not shown). In this latter case, however, as H4-K4ac occurs in the majority (>80%) of the histone H4, a small difference would not be detectable.

In contrast, the much less prevalent H4-K10 and K14 acetylations were found located in particular nuclear

domains characterized by the interface between densely packed and spread chromatin fibers, a region known to harbor transcription events (Cremer et al. 2000). However, we could not assign a specific colocalization of acetylated H4 in regions close to the RNA Pol II and early transcript accumulation areas detected by Br-UTP incorporation. Further analyses would be necessary to evaluated if acetylated H4 is indeed not associated with transcription events. Recently, by chromatin immunoprecipitation using commercial antibodies against acetylations of mammalian histone H4 at K5, K8, K12, and K16, no enrichment at spliced-leader transcription was found in *T. cruzi*, but other transcribed regions were enriched (Respuela et al. 2008). As there are differences between mammalian and trypanosomes histones, this may indicate that some histone H4 is acetylated in transcribed sites.

Similarly to H4-K4Ac, K10 and K14 acetylations increase mainly after S phase, detected 14 h (G2/M) after HU release. This suggests that newly synthesized histones are rapidly acetylated as in *T. brucei* H4K-4Ac. As observed previously, 12 h after HU release, syntheses of histones are still going on as incorporation of [³H]-lysine in histones was observed in fluorogram of Triton–acetic acid–urea gels (Sabaj et al. 2001). However, we could not exclude the fact that HU, known to disorganize nuclear structure and generate DNA breaks, could generate H4 acetylation via DNA damage response. The latter one would corroborate with our results that shown that H4-K10 and K14Ac (but not H4-K4Ac) increases after DNA breaks caused by ionizing radiation (6 to 48 h of DNA—Fig. 8). Nevertheless, if HU experiment would represent just an effect of DNA damage response, we would expect a decrease of H4-K4Ac, as shown in Fig. 8. In addition, the stronger labeling of H4-K14Ac in G2/M cells could be explained by increasing epitope accessibility. This would occur, for example, by release of some binding factor from the chromatin particularly associated with this modification.

In general, hypoacetylated histones have been associated to dense regions of chromatin corresponding to silenced DNA, whereas hyperacetylated histones have been associated with transcriptionally active regions (Clayton et al. 2006). More recently, it has been demonstrated that acetyllysine residues on histones are recognized by specific bromodomain proteins, assuring an additional and specific role for each modification rather than just a general chromatin unfolding by acetylation (Mujtaba et al. 2007). Bromodomain containing proteins are found in trypanosomes and preliminary evidences indicate that one of them colocalizes with H4-K10Ac (Villanova et al. 2009). Also, acetylation of H4-K16, which could be related to H4-K14Ac in trypanosomes, is present in yeast euchromatin and is associated with enhanced transcriptional activity. Deacetylation of K16 allows the binding, at the N-terminal tail of histone H4, of the silencing

complex (Sir3), which assembles Sir2, a histone deacetylase that promotes chromatin deacetylation and condensation (Shogren-Knaak et al. 2006). In addition, yeast histone H4-K16 acetylation is necessary for binding of the histone methyltransferase DOT1 to the chromatin. DOT1 methylates lysine 79 of histone H3, a modification involved in chromatin decondensation (Altaf et al. 2007b). In *T. brucei*, DOT1A and DOT1B were shown to respectively di- and trimethylate K76 (probably the analogous residue to K79 in this organism), and RNAi of both enzymes caused defects in the cell cycle (Janzen et al. 2006b). Therefore, it is possible that a similar mechanism observed in higher eukaryotes controls chromatin decondensation to allow transcription and perhaps chromatin rearrangements during the cell cycle of trypanosomes.

The acetylation of K16, a possible synonymous of K14 acetylation of *T. cruzi*, was also shown to prevent methylation of K20 on the histone H4 tail and vice versa in mammalian cells (Nishioka et al. 2002). Acetylation of H4-K16 decreases in mitosis (Rice et al. 2002). However, in another report, H4-K20 methylation was decreased in G2/M suggesting that H4-K16Ac should be enriched (Fang et al. 2002). As H4-K18 is monomethylated in *T. cruzi* (da Cunha et al. 2006), it is possible that a similar balance between these two modifications also occurs in trypanosomes, raising the possibility that K18 methylation might decrease, when H4-K14Ac is enriched in G2/M cells.

We also found large differences in histone H4 acetylation levels after DNA damage by γ -irradiation, which causes DSB. It is particularly relevant the opposite variations observed for H4-K4Ac versus H4-K10Ac and H4-K14Ac. There are few studies of DNA DSB repair in trypanosomes. It has been shown that *T. cruzi* repairs DSB by homologous recombination involving a RAD51 ortholog (Regis-da-Silva et al. 2006). No genes coding for nonhomologous end-joining repair were found in the database (Machado et al. 2006). Therefore, whether diminished acetylation of H4-K4 and acetylation of H4-K10 and H4-K14 are involved in DNA repair, or results from the large chromatin reorganization, remains to be further investigated in trypanosomes.

Importantly, histone H4 acetylation, in addition to the phosphorylation of H2AX, is involved in the repair of DSB in other organisms (Bilsland and Downs 2005; Wurtele and Verreault 2006; Wurtele and Verreault 2006; Groth et al. 2007; Altaf et al. 2007a). In the absence of histone H4 acetylation, yeasts become more sensitive to agents that induce DSB (Tamburini and Tyler 2005). Mutations in the four lysines of histone H4 and mutations of histone acetylases such as Gcn5 and deacetylases Rpd3 and Sir2 were shown to cause sensitivity to agents that induce DSB. Nevertheless, these effects could be due to a differential expression of genes involved in the repair machinery. Alternatively, as large nuclear reorganization was observed in *T. cruzi* similarly to what is observed in mammalian cells

after DNA damage (Ziv et al. 2006; Murga et al. 2007), the histone H4 acetylations could be involved in such reorganization as proposed by Costelloe et al. (2006). In *T. brucei*, a deacetylase ortholog of Sir2 (TbSIR2RP1) has been shown to participate in the repair of damaged DNA (Garcia-Salcedo et al. 2003). This deacetylase catalyzes the ADP ribosylation and deacetylation of histone in a NAD⁺ dependent manner. It is associated with telomers and transcriptionally silent minichromosomes and was shown to ribosylate (in vitro) the histones H2A and H2B and H4 of *T. brucei* (Kowieski et al. 2007; Alsford et al. 2007). The same enzyme is present in *T. cruzi* database and could be involved in histone H4-K4 deacetylation observed after γ -irradiation.

In summary, we have characterized a distinct behavior of the histone H4 N terminus acetylations toward chromatin structure, DNA repair, at different cell cycle, and differentiating stages of *T. cruzi*. As trypanosomes diverged early in the evolution and present a quite different histone H4 N-terminal (Alsford and Horn 2004), our study provides a relevant step in the understanding of their biological functions, relevant to find new drug targets to treat diseases caused by these organisms.

Acknowledgments We thank Dr. James Bangs (The University of Wisconsin) for the use of the three-dimensional deconvolution microscope and Claudio Rogerio de Oliveira for the technical help. This work was supported by grants from FAPESP, FAPERJ, and CNPq (Brazil). SCN and JPCC are FAPESP (Brazil) fellows.

References

- Abuin G, Freitas-Junior LHG et al (1999) Expression of *trans*-sialidase and 85 kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J Biol Chem* 274(19):13041–13047
- Allfrey YVG, Faulkner R et al (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51(5):786–794
- Alsford S, Horn D (2004) Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol* 53(2):365–372
- Alsford S, Kawahara T et al (2007) A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Mol Microbiol* 63(3):724–736
- Altaf M, Saksouk N et al (2007a) Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res* 618(1–2):81–90
- Altaf M, Utley RT et al (2007b) Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin. *Mol Cell* 28(6):1002–1014
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005) Reversing histone methylation. *Nature* 436(7054):1103–1106
- Bilsland E, Downs JA (2005) Tails of histones in DNA double-strand break repair. *Mutagenesis* 20(3):153–163
- Black JC, Choi JE et al (2006) A mechanism for coordinating chromatin modification and preinitiation complex assembly. *Mol Cell* 23(6):809–818
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 6(3):93–100

- Campbell DA, Thomas S et al (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microb Infect* 5(13):1231–1240
- Clayton AL, Hazzalin CA et al (2006) Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell* 23(3):289–296
- Costelloe T, Fitzgerald J et al (2006) Chromatin modulation and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 312(14):2677–2686
- Cremer T, Kreth G et al (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10(2):179–212
- da Cunha JPC, Nakayasu ES et al (2006) Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Mol Biochem Parasitol* 150(2):268–277
- Das A, Bellofatto V (2004) Genetic regulation of protein synthesis in trypanosomes. *Curr Mol Med* 4(6):577–584
- de Souza W (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 86:197–283
- Dossin FM, Schenkman S (2005) Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell* 4(5):960–970
- Elias MC, da Cunha JP et al (2007) Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 158(2):147–157
- Elias MC, Faria M et al (2002) Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryot Cell* 1(6):944–953
- Elias MC, Marques-Porto R et al (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* 112(1):79–90
- Elias MC, Vargas NS et al (2003) Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 129(1):1–9
- Fang J, Feng Q et al (2002) Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr Biol* 12(13):1086–1099
- Garcia-Salcedo JA, Gijon P et al (2003) A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 22(21):5851–5862
- Groth A, Rocha W et al (2007) Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* 128(4):721–733
- Herceg Z, Wang ZQ (2005) Rendez-vous at mitosis: TRRAPed in the chromatin. *Cell Cycle* 4(3):383–387
- Ingram AK, Horn D (2002) Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. *Mol Microbiol* 45(1):89–97
- Janzen CJ, Fernandez JP et al (2006a) Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 580(9):2306–2310
- Janzen CJ, Hake SB et al (2006b) Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell* 23(4):497–507
- Kawahara T, Siegel TN et al (2008) Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol* 69(4):1054–1068
- Kouzarides T (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9(1):40–48
- Kowieski TM, Lee S et al (2007) Acetylation-dependent ADP-ribosylation by *Trypanosoma brucei* sir2. *J Biol Chem* 283(9):5317–5326
- Machado CR, Augusto-Pinto L et al (2006) DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res* 612(1):40–57
- Mandava V, Fernandez JP et al (2007) Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 156(1):41–50
- Marques Porto R, Amino R et al (2002) Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 119(2):265–271
- Mujtaba S, Zeng L et al (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26(37):5521–5527
- Murga M, Jaco I et al (2007) Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J Cell Biol* 178(7):1101–1108
- Nightingale KP, O'Neill LP et al (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16(2):125–136
- Nishioka K, Rice JC et al (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9(6):1201–1213
- Peterson CL, Laniel MA (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14(14):546–551
- Regis-da-Silva CG, Freitas JM et al (2006) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem Parasitol* 149(2):191–200
- Respuela P, Ferella M et al (2008) Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283(6):15884–15892
- Rice JC, Nishioka K et al (2002) Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev* 16(17):2225–2230
- Richards EJ, Elgin SC (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108(4):489–500
- Sabaj V, Aslund L et al (2001) Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* 80(4):617–624
- Schneider R, Grosschedl R (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21(23):3027–3043
- Shogren-Knaak M, Ishii H et al (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311(5762):844–847
- Siegel TN, Kawahara T et al (2008) Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 67(4):762–771
- Sobel RE, Cook RG et al (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4):1237–1241
- Tamburini BA, Tyler JK (2005) Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol Cell Biol* 25(12):4903–4913
- Toro GC, Galanti N (1990) *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. *Biochem Int* 21(3):481–490
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28(1):1–13
- Vidanes GM, Bonilla CY et al (2005) Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. *Cell* 121(7):973–976
- Villanova GV, Nardelli SC et al (2009) *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. *Int J Parasitol* 39(6):665–673
- Wurtele H, Verreault A (2006) Histone post-translational modifications and the response to DNA double-strand breaks. *Curr Opin Cell Biol* 18(2):137–144
- Ziv Y, Bielopolski D et al (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8(8):870–876

CAPÍTULO 2

O efeito das acetilações da histona H4 na resposta a agentes genotóxicos em *T. cruzi*

RESUMO

Como verificamos no capítulo 1 que H4K10ac e H4K14ac aumentam após a radiação ionizante, procuramos avaliar se essas modificações atuam diretamente no reparo de DNA. Para isto utilizamos diversas estratégias experimentais. Na primeira avaliamos os níveis de acetilação da histona H4 em parasitas super-expressando TcRad51, uma proteína fundamental na via de reparo por recombinação homóloga (Radford e Sekelsky, 2004). Observamos que nestes super-expressores os níveis de H4K10ac e H4K14ac aumentam em relação à quantidade de histona H4 total. O mesmo não ocorre com a H4K4ac. Também estudamos a localização da TcRad51 em relação às histonas modificadas. Após radiação γ , os níveis desta proteína aumentam no núcleo e ela é encontrada em mais sítios contendo H4K10 do que as outras modificações. Em outra abordagem foram expressas histonas contendo o epitopo Myc e mutações substituindo as lisinas 4, 10 e 14 por argininas para evitar a sua acetilação. Estas histonas são incorporadas na cromatina do *T. cruzi*. A expressão de K10 e K14 mutadas torna os parasitas mais sensíveis a radiação γ . Além disso, H4K14R retarda o crescimento do parasita levando a um aumento das células em mitose. Por outro lado, as mutações alteram significativamente a localização de H4K4 e em menor grau a localização de H4K14. Estes resultados sugerem que estas acetilações alteram de maneira específica o reparo de DNA, possivelmente no processo de recombinação homóloga.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo dos Parasitas

Epimastigotas de *T. cruzi*, cepas Y e CL Brener e o CL Brener super-expressor de TcRad51 (Regis-da-Silva et al., 2006) eram mantidas em infusão de fígado, triptose e sais minerais acrescidos de 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à 28 °C como descrito em (Camargo, 1964). Parasitas da cepa Y contendo integrado em seu genoma o vetor pLEW13 (Wirtz e Clayton, 1995) foram selecionados após transfecção do plasmídeo linearizado com a enzima *SpeI* em meio contendo 0,25 mg/mL de geneticina G418. Parasitas da cepa CL-Brener contendo o plasmídeo para a expressão de TcRad51 foram preparados por Regis-da-Silva (Regis-da-Silva et al., 2006) e mantidos na presença de 200 µg/mL de higromicina. As densidades celulares eram determinadas usando um hematocítômetro. As curvas de crescimento eram feitas em triplicatas, sendo iniciadas em 1×10^6 parasitas/mL. Quando indicado, eram acionados 2 µg/mL de tetraciclina às culturas.

Extração de DNA genômico de *T. cruzi*;

Epimastigotas da cepa Y (10^8) foram lavados uma vez PBS e ressuspensos em solução contendo 50 mM de Tris-HCl pH 8; 62,5 mM de EDTA pH 8; 4% de Triton X-100 e 2,5 M de LiCl₂ (solução TELT) e mantidos sob agitação por 5 min. À solução foi adicionada igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1), agitadas e centrifugadas por 10 min a 14000 x g. O DNA foi precipitado pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 8 e 2 volumes de etanol absoluto gelado que foram mantidos durante a noite a -20°C. Depois de lavado com etanol 70%, o DNA foi tratado com RNase como descrito (Sambrook e Russel, 2001).

Clonagem da histona H4 mutada nas lisinas 4, 10 e 14:

Para efetuar a alteração nos códons referentes às lisinas 4, 10 e 14 da histona H4, cinco oligonucleotídeos foram desenhados de modo a conter um códon correspondente a arginina (vermelho) nas devidas posições (Tabela I). Em negrito estão indicados os sítios para as enzimas de restrição *Not* I ou *Nru* I. Nessa tabela também constam os oligonucleotídeos M13 utilizados para sequenciamento:

Tabela I. Oligonucleotídeos usados para amplificação e seqüenciamento das histonas mutadas

Tc_H4_Not	5'- GCGGCCGC ATGGCGAAGGGCAAGAAGAGCGGCGAGGCG
Tc_H4K4R_mut	5'- GCGGCCGC ATGGCGAAGGGC CGC AAGAGCG
Tc_H4_K10_mut	5'- CAAGAAGAGCGGCGAGGCG CGC GGGACGCAGAAGCGCCAGAAG
Tc_H4_K14_mut	5'-CAAGAAGAGCGGCGAGGCGAAGGGGACGCAG CGC CGCCAGAAGAAGATCCTGCGCG
Tc_H4_Nru	5'- TCGCGAC GCCTAGCCGTACAGGATCTTGCCGC
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde em reação em cadeia da polimerase (PCR). A primeira reação foi feita com os oligonucleotídeos que contém o códon AAG substituído por CGC e o oligonucleotídeo correspondente a sequência final do gene (Tc_H4_Nru). O produto dessa reação foi utilizado como molde para uma segunda reação, com os oligonucleotídeos Tc_H4_Not e Tc_H4_Nru. Além da histona H4 mutada, também foi amplificada a sequência original, sem mutações, com os oligonucleotídeos Tc_H4_Not e Tc_H4_Nru. As reações continham 50 ng do DNA genômico, 150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1 U da enzima DNA polimerase Platinum (Invitrogen) e seu respectivo tampão. As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas em aparelho DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer). O programa de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação a

94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 30 s a 54°C e extensão a 72°C por 1 min e uma etapa final de extensão por 10 min a 72°C.

Os produtos dessas segundas reações foram fracionados em gel de agarose 0,8% em tampão Tris-Acetato-EDTA (Ogden e Adams, 1987) e visualizados através da coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. As bandas referentes aos fragmentos de interesse foram cortadas do gel e purificadas usando o Kit QIAquick Spin (Qiagen). Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM T Easy (Promega), conforme as descrições do fabricante e utilizados para transformar bactérias cálcio-competentes da linhagem *DH5α*, através do método de choque térmico (Sambrook e Russel, 2001).

As bactérias transformadas e contendo os plasmídeos foram selecionados em placas de meio LB (triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) contendo 50 µg/mL de ampicilina, 1 mM isopropil-β-d-tiogalactopiranosídeo e 20 µg/mL de acetato de bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside (X-gal). As colônias brancas foram selecionadas e os plasmídeos purificados através do método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001). Aqueles com inserto de tamanho esperado tiveram sua sequência confirmada utilizando os primers M13 em uma reação com Kit BigDye Terminator (Applied Biosystems), conforme descrição do fabricante. As reações de seqüenciamento eram realizadas em aparelho ABI 3730 DNA Analyser.

Os insertos com as sequências apropriadas foram digeridos com as enzimas de restrição *Not* I e *Nru* I (Fermentas) com seus respectivos tampões e inseridos no vetor pTclIndex-Myc (Taylor e Kelly, 2006) previamente digerido com *Not* I e *EcoRV*. O produto das ligações foi inserido primeiramente em *E. coli*, cálcio-competentes da linhagem PMC103, cujo genoma não apresenta os genes de recombinação. A seleção foi feita através da técnica de PCR de colônia. Essa técnica consiste na aplicação direta da colônia em um tubo onde foram adicionados uma solução contendo 150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1 U da

enzima DNA polimerase. A reação foi feita como descrito acima e os produtos da reação analisados em gel de agarose 1%. Os plasmídeos dos clones bacterianos contendo os produtos de tamanho esperado foram purificados pelo método de lise por fervura de suspensões bacterianas pré-tratadas com lisozima (Sambrook e Russel, 2001) e utilizados para transformar *E. coli* DH5 α . Dessa forma foram obtidos quatro clones: os que contêm a sequência do gene da histona H4 mutada nos códons correspondentes as lisinas 4, 10 e 14 e outro da histona H4 sem mutação.

Transfecção de *T. cruzi*

Os plasmídeos foram purificados utilizando gradientes de brometo de etídeo e cloreto de cézio (Sambrook e Russel, 2001). 100 μ g de cada plasmídeo foram linearizados com a enzima *Spe* I (Fermentas) com tampão apropriado do mesmo fabricante. O DNA foi precipitado em etanol 100% gelado e 200 mM de NaCl e ressuspenso em 50 μ L de meio de eletroporação para transfecção de *T. cruzi* (NaCl 137 mM, HEPES 21 mM, pH 7, Na₂HPO₄ 5,5 mM, KCl 5 mM e glicose 0,77 mM) (Ramirez et al., 2000).

Para cada transfecção 2,5 x 10⁷ parasitas/mL (epimastigotas) foram utilizados. Utilizamos *T. cruzi* da linhagem Y13i, que expressa a T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina, obtidos após transformação de formas epimastigotas da cepa Y com o plasmídeo pLEW13 (Wirtz e Clayton, 1995). Os parasitas foram recolhidos por centrifugação (2000 x *g* por 10 min), lavados em meio de eletroporação e ressuspenso em 400 μ L do mesmo meio. A transfecção foi feita em cubetas de eletroporação de 4 mm, usando o eletroporador da BioRad (GenePulser II Electroporator). As condições utilizadas foram dois pulsos de 450 Volts e 500 μ F. Os parasitas foram transferidos para garrafas contendo meio LIT acrescido com 10 % de soro fetal bovino e 500 μ g de geneticina G418. Após 48 h foram adicionados 250 μ g de higromicina para seleção dos clones. Os parasitas selecionados foram induzidos a

expressar os genes clonados pela adição de 2 µg/mL. A expressão foi confirmada por Western blot de extratos enriquecidos em histonas (descrito a seguir).

Extração de histonas

A extração de histonas foi feita como descrito em (Marques et al., 2002). Foram utilizados 5×10^8 parasitas ressuspensos vigorosamente em uma solução contendo sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, CaCl_2 3 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e saponina 0,5%. O material era centrifugado por 10 min a $2000 \times g$ e os precipitados ressuspensos na mesma solução sem saponina e submetidos novamente à centrifugação. Os precipitados eram então ressuspensos em Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, EDTA 25 mM e Tris-HCl 10 mM pH 8 e centrifugados a $10000 \times g$ por 20 min. Após três lavagens com Tris-HCl 100 mM pH 8, os precipitados eram extraídos com HCl 0,3 N por 2 h a 4°C sob agitação constante para solubilização das histonas. O material insolúvel era removido por centrifugação a $8000 \times g$ e o sobrenadante precipitado pela adição de 8 volumes de acetona a -20°C . Após 12 h a -20°C as histonas eram recolhidas por centrifugação a $2500 \times g$ por 15 min, lavadas três vezes com acetona e finalmente ressuspensas em água e quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Após a quantificação, as amostras eram secas a vácuo e ressuspensas em tampão contendo uréia 2,5 M, ácido acético 0,9 M, β -mercaptoethanol 0,38 M e pironina Y 0,01%. As amostras eram aquecidas a 56°C por 5 min e aplicadas em gel de Triton-ácido acético e uréia (TAU) conforme descrito abaixo.

Quando o desejado era apenas um enriquecimento de histonas a solubilização com HCl, não era feita. Após as lavagens com Tris-HCl 100 mM pH 8, as amostras eram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE contendo Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005% e separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Eletroforese em gel de TAU

As histonas extraídas eram fracionadas em gel de poliacrilamida 15% contendo uréia 6 M, ácido acético 0,9 M e Triton DF16 0,38% (Sigma). Para o gel de empilhamento, eram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações, com exceção da poliacrilamida que neste caso era a 12%. Inicialmente o gel era submetido a duas pré-corridas de 1 h a 20 mA, colocando-se o pólo positivo na parte superior do gel e usando como tampão de eletrodo uma solução de ácido acético 5%. Antes da primeira pré-corrída os poços eram lavados com a solução de ácido acético 5%. Antes da segunda pré-corrída, os poços eram lavados e preenchidos com solução contendo β -mercaptoetanolamina 1 M e ácido acético 0,9 M. As amostras de histona eram aplicadas e a eletroforese realizada nas mesmas condições da pré-corrída. Para melhor separação das histonas, a eletroforese era realizada por mais 40 min depois que o corante pironina Y saía do gel.

Imunoblot

Após a eletroforese em gel de TAU, os géis eram lavados duas vezes por 20 min sob agitação, em solução contendo ácido acético 50 mM e SDS 0,5%. Em seguida os géis eram lavados mais duas vezes, pelo mesmo período, em Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 e SDS 2,3%. A transferência do gel para membrana de PVDF era feita em tampão contendo CAPS 25 mM e metanol 20% por 2 h a 100 volts.

No caso de SDS-PAGE os géis eram transferidos por 2 h a 100 volts em Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% para membranas de nitrocelulose (Amersham) ou PVDF (Bio-Rad Laboratories) quando se utilizava a membrana mais de uma vez.

Para visualização das bandas, as membranas eram coradas com solução de Ponceau S 0,5% e ácido acético 1%. Posteriormente a identificação das bandas, as membranas eram descoradas com água e bloqueadas em 5% de leite desnatado (Molico) em PBS por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. A incubação com os

anticorpos primários era realizada por 3 h na solução de bloqueio. As seguintes diluições foram utilizadas: anti-H4K4ac (1:3000); anti-H4K10ac (1:500); anti-K14ac (1:250); anti-myc (1:1000); anti-TcRad51 (1:100)). As membranas eram lavadas três vezes por 5 min em PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, ou camundongo, conjugado a peroxidase (Santa Cruz) na diluição de 1:3000 por 1 h. As membranas eram novamente lavadas três vezes por 5 min e a detecção da marcação foi feita por quimiluminescência usando o kit “Immobilon™ Western Chemiluminescent AP Substrate” (Millipore).

Imunofluorescência

Formas epimastigotas eram recolhidas por centrifugação (2000 x g por 10 min), lavadas e ressuspensas em PBS para uma concentração de 5×10^6 parasitas/mL. Os parasitas eram aderidos em lâminas previamente tratadas com polilisina 0,1% por 20 min e então fixadas por 5 min com metanol a -20°C . As lâminas eram lavadas com PBS e bloqueadas durante 30 min com 1% BSA em PBS. As lâminas eram então incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio. As seguintes diluições foram utilizadas: K4ac diluído (1:500); K10ac (1:350), K14ac (1:100), anti-TcRad51 (1:1000)) por 1 h a temperatura ambiente e/ou anti-Myc 1:1000 (Invitrogen). Após a lavagem por três vezes com PBS, as lâminas eram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa-fluor 594 (1:300) e/ou anti-camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 (1:300). A essa solução era adicionado 10 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI para coloração do núcleo e do cinetoplasto. Essa etapa era feita à temperatura ambiente no escuro. As lâminas eram lavadas em PBS sucessivas vezes e montadas com Vectashield (Vector Laboratories). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência Nikon acoplado a uma câmera digital Nikon DXM 1200F, no caso dos ensaios com TcRad51. As colocalizações foram quantificadas utilizando o software ImageJ, através da razão entre os pixels totais das imagens e os pixels

compartilhados. As imagens de colocalização foram obtidas utilizando o mesmo software.

As demais imagens foram adquiridas utilizando o software Cell[^]M no microscópio de fluorescência Olympus BX61 utilizando uma objetiva PlanApo (1.4 NA) acoplado a uma câmera digital ORCA R² (Hamamatsu) e posteriormente processadas por deconvolução utilizando o programa Auto Quant X2.1 (MediaCybernetics).

Quantificação das fases do ciclo celular

A análise do ciclo celular dos parasitas foi realizada através de contagens em microscopia de fluorescência de células marcadas para DNA (DAPI) e por imunofluorescência indireta para um antígeno flagelar (Godoy et al., 2009). As células que continham um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo foram consideradas G1/S, células com um cinetoplasto, dois flagelos e um núcleo foram consideradas G2, células com dois flagelos, dois cinetoplastos e um núcleo consideradas mitose e as três organelas duplicadas, citocinese. Eram contados 200 parasitas por população. A análise estatística foi feita usando o teste Chi-quadrado.

RESULTADOS

Histona H4 e TcRAD51

No artigo mostrado no capítulo 1, verificamos um aumento nas acetilações de H4K10ac e H4K14ac após a exposição à radiação ionizante, que causa quebra de DNA dupla fita. Na busca por mais indícios que comprovem o envolvimento direto dessas acetilações no reparo de DNA quantificamos os níveis dessas acetilações em parasitas super-expressando TcRad51, uma proteína importante no processo de recombinação homóloga (Regis-da-Silva et al., 2006). Conforme mostramos na figura 1A, estes parasitas super-expressores se recuperam mais cedo da irradiação γ . Histonas foram extraídas de epimastigotas super-expressando TcRad51 e de

parasitas controle, fracionadas em gel de TAU e transferidas para uma membrana de PVDF. A membrana foi então incubada com os diferentes anticorpos anti-H4ac. Como pode ser visto na figura 1B as células super-expressoras de TcRad51 apresentaram níveis maiores da acetilação na histona H4K10 e K14, enquanto os níveis de K4 permaneceram constantes, indicando uma possível relação entre o grau de acetilação destas duas lisinas com o processo de recombinação homóloga nesses parasitas.

Para verificar se havia de fato interação entre a TcRad51 e as acetilações na histona H4 estudamos suas respectivas localizações na célula usando anticorpos policlonais anti-TcRad51 e anti-H4ac. Antes da irradiação, TcRad51 encontra-se dispersa no citoplasma com alguns pontos no núcleo. Imediatamente após a irradiação, nota-se um acúmulo de TcRAD51 no núcleo, e uma diminuição da marcação citoplasmática. Em 24 h após a irradiação se observa uma marcação mais intensa no núcleo, provavelmente porque é nesse período que ocorre a maior parte do reparo de DNA. Após 48 h o sinal nuclear começa a diminuir e volta aos níveis basais 96 h depois da irradiação (Fig. 2) (Passos-Silva et al., 2010a, submetido).

Os ensaios de colocalização foram realizados 4 h após a irradiação e notamos que TcRad51 localiza-se em sítios próximos (alguns coincidentes) no núcleo do parasita com as histonas acetiladas em K10 e K14 (Fig. 3). A taxa de colocalização foi medida utilizando o programa ImageJ através da razão entre os pixels totais e os comuns para ambas as imagens. O coeficiente de colocalização obtido foi relativamente maior para H4K10 (0,74) que para H4K14 (0,59) e H4K4ac (0,49). É importante ressaltar que a acetilação em K4 ocorre em 80 % das histonas e, portanto a colocalização com esta modificação estaria sempre ocorrendo. Desta forma, estes dados sugerem que onde está havendo reparo estaria havendo um aumento de histonas acetiladas em K10 e menos intensamente em K14.

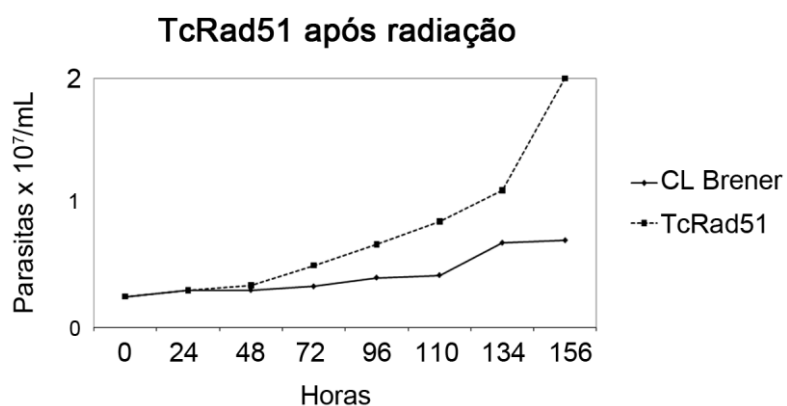
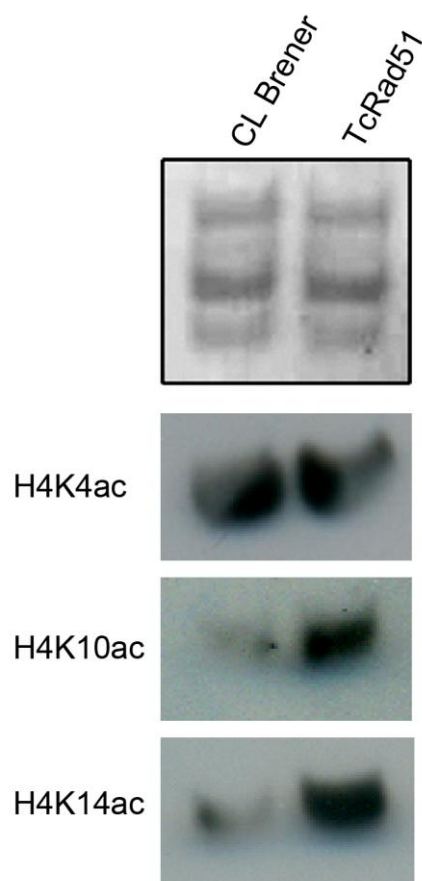
A**B**

Figura 1: **Análise dos níveis de acetilação em epimastigotas superexpressando TcRad51.** (A) Curva de crescimento de epimastigotas super-expressando TcRad51 e epimastigotas da cepa CL Brener não transfectados, submetidos a 500 Gy de radiação γ . (B) Imunoblot de membranas contendo histonas purificadas de parasitas CL Brener não transfectados e super-expressores de TcRad51 não irradiados foram incubadas com anticorpos específicos contra as histonas acetiladas nas lisinas 4, 10 e 14. A parte superior mostra o gel corado com Ponceau, e os painéis abaixo a marcação de cada um dos anticorpos.

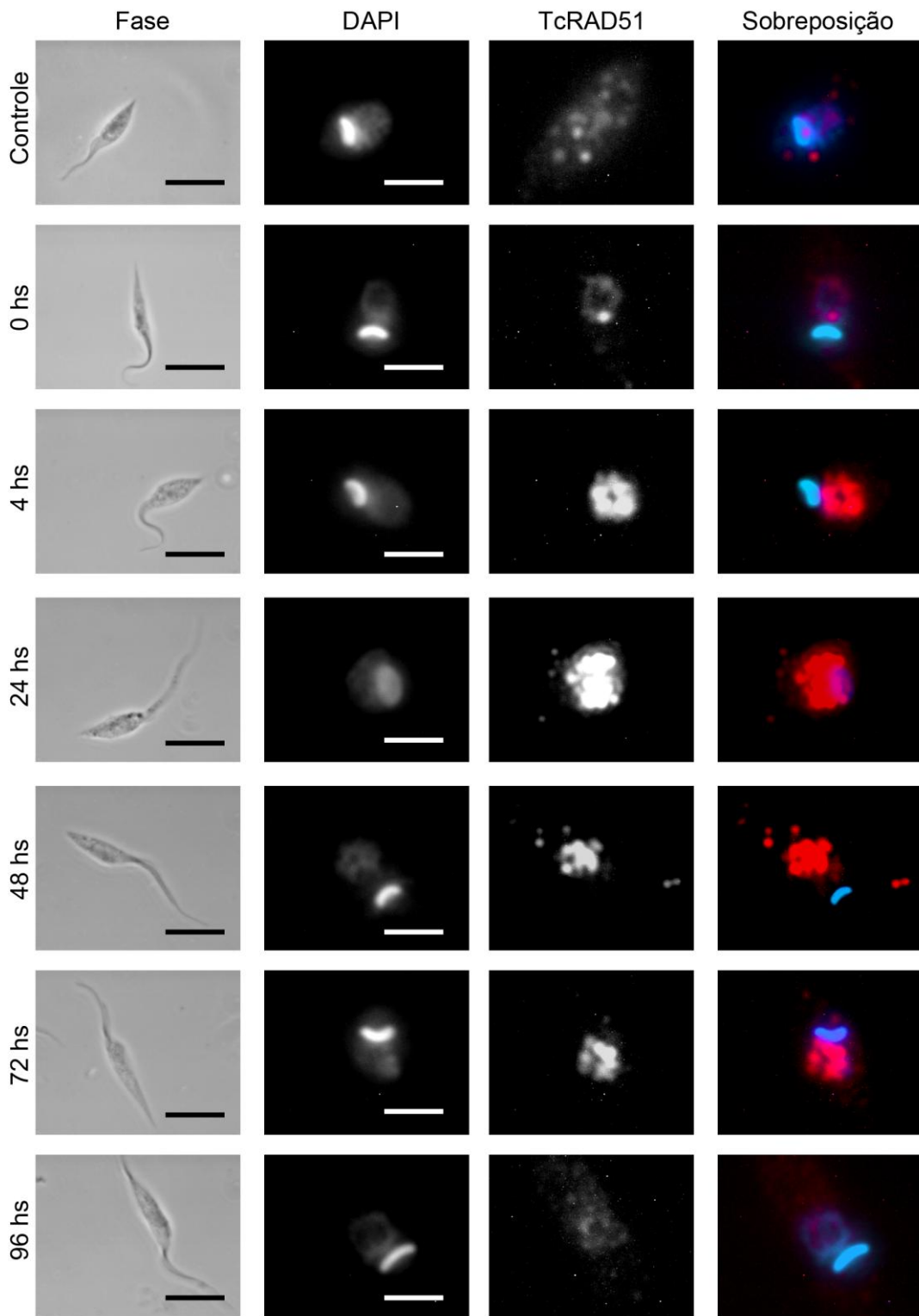


Figura 2: Localização de TcRad51 antes e após o dano de DNA. Epimastigotas antes (controle) ou após 500 Gy de radiação γ , foram fixados e corados por imunofluorescência utilizando anti-TcRad51 e DAPI. Nas imagens em contraste de fase as barras tem 5 μm e nas de fluorescência 2 μm . A coluna a direita mostra a sobreposição da marcação por DAPI (azul) e TcRad51 (vermelho).

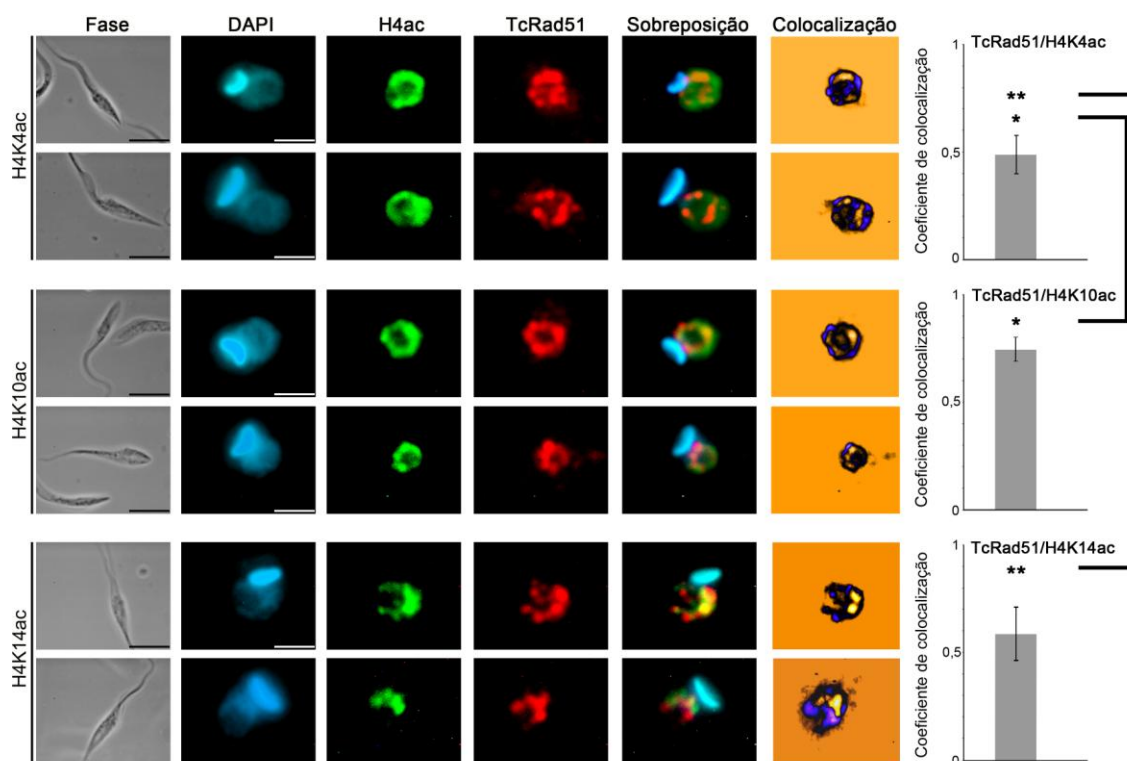


Figura 3: Colocalização das histonas H4ac com a proteína TcRad51. Ensaio de imunofluorescência realizado com epimastigotas fixados 4 h após irradiação γ (500Gy) mostrando em verde as histonas acetiladas e em vermelho a marcação pra TcRad51. O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Nas imagens em contraste de fase as barras tem 5 μ m e nas de fluorescência 2 μ m. A imagem de colocalização foi gerada utilizando o programa WCIF ImageJ (Plugin: Análise de Colocalização). A colocalização foi quantificada utilizando o mesmo programa.

Mutações nos sítios de acetilação da histona H4

Para investigar se a presença dessas modificações afetam o reparo de DNA, decidimos super-expressar a histona H4 que não apresenta essas lisinas acetiladas, no intuito de substituir as histonas selvagens. Para tanto modificamos a sequencia de DNA para codificar ao invés das lisinas 4, 10 ou 14 o aminoácido arginina. Os genes mutados foram obtidos por PCR utilizando oligonucleotídeos que continham a mutação nos códons correspondentes. O gene com a lisina 4 substituída por arginina foi denominado H4K4R, o com K10 substituída por arginina H4K10R e o substituído na K14, H4K14R. Foi também amplificada a sequência sem mutações (H4WT). As sequencias para a histona H4 mutada foram clonadas no vetor pTcIndex-Myc e

utilizadas para transformar a forma epimastigota da cepa Y contendo o plasmídeo pLEW13 (Y13i). Após seleção usando o antibiótico higromicina, obtivemos os respectivos transfectantes. Como controle também transfectamos o pTcindex-Myc que continha o gene que codifica a proteína TcBPP1, que é a subunidade β da proteína G. No fungo *Ustilago maydis* BPP1 é um componente da via de sinalização do cAMP (Muller et al., 2004). Em *T. cruzi*, embora, essa proteína tenha sido caracterizada e uma construção contendo parte do N-terminal indique localização mitocondrial, sua função permanece desconhecida (Bromley et al., 2004).

Estes parasitas transfectados expressam as histonas recombinantes com massa molecular aparente de 12 KDa após a adição de tetraciclina. Estas proteínas foram reconhecidas em Western blot utilizando o anticorpo comercial anti-Myc (Fig. 4).

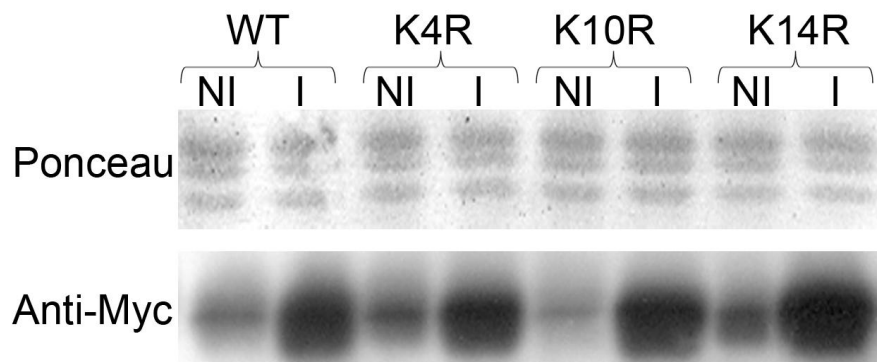


Figura 4: Expressão de histonas mutadas nos sítios de acetilação. Western blot com amostras de parasitas expressando as histonas mutadas nos sítios de acetilação e a histona sem mutação (WT) induzidas (I) ou não induzidas (NI) com tetraciclina por 4 dias. O blot corado com Ponceau mostra extratos de parasita enriquecidos em histonas. O painel inferior mostra o imunoblot que foi incubado com o anticorpo anti-Myc.

Redução nos níveis de acetilação da histona H4 endógena pela expressão dos genes com mutações

Os níveis de acetilações da histona H4 em parasitas expressando as histonas mutadas foram medidos 4 dias após a adição de tetraciclina. Como pode ser observado na figura 5 cada uma das acetilações teve seu nível reduzido após a indução da expressão dos recombinantes. No entanto, os níveis de expressão obtidos foram baixos em relação ao nível de histonas endógeno e não foi possível quantificar com precisão a redução da expressão da histona selvagem. Em geral, a expressão de histonas é controlada nos eucariotos. Em *T. cruzi* a expressão de histonas só ocorre na fase S (Sabaj et al., 2001). Não se sabe como esta expressão é regulada neste parasita, mas em outros organismos, como em leveduras, há um controle ao nível pós-transcricional de tal forma que nunca um excesso de histona seja produzido (Mahalingam et al., 2006; Osley, 1991).

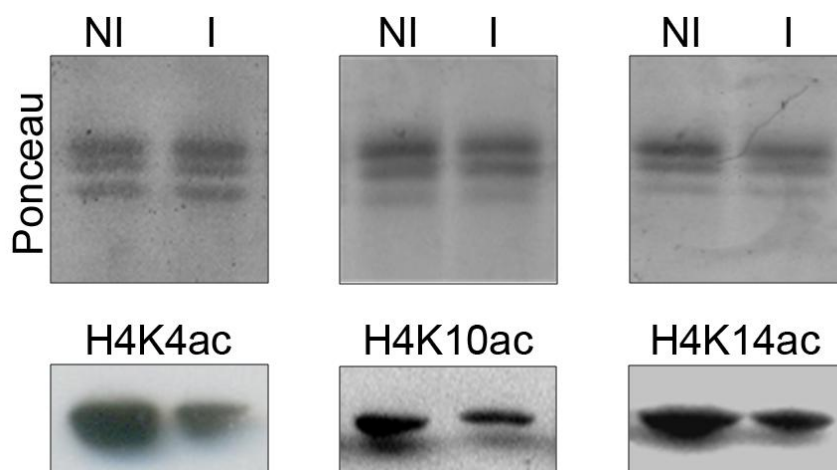


Figura 5: Diminuição da acetilação em epimastigotas mutados na histona H4. Western blot de amostras de parasitas expressando as histonas mutadas nos sítios de acetilação induzidas (I) ou não induzidas (NI) com tetraciclina por 4 dias. O Ponceau mostra extratos de proteínas enriquecidos em histonas que foram incubados com anticorpos específicos para cada lisina acetilada.

A redução da acetilação afeta a localização da histona H4

Após ser sintetizada, a histona H4 de diversos eucariotos é acetilada nas lisinas 5 e 12 (Sobel et al., 1995). O papel dessas acetilações na importação nuclear ou deposição no DNA recém sintetizado não está claro, mas estudos recentes mostram que a histona H4, juntamente com a histona H3 forma um complexo citoplasmático com a chaperona Asf1 e Hat1, uma acetiltransferase do tipo B, responsável pela diacetilação em H4. Embora a mutação das lisinas 5 e 12 não tenha afetado a deposição no DNA recém sintetizado em levedura (Ma et al., 1998), nos perguntamos se a mutação nos sítios de acetilação impediria o recrutamento para o núcleo do parasita afetando a sua localização. Como pode ser observado nas figuras 6, 7, 8 e 9 todas as histonas modificadas continuaram sendo recrutadas ao núcleo, mesmo sem as acetilações, pois foram detectadas somente nos parasitas induzidos com tetraciclina utilizando o anticorpo anti-Myc em ensaios de imunofluorescência.

A seguir investigamos se a localização era a mesma das histonas endógenas, ou seja, das que continham as devidas acetilações. Para tanto, ensaios de co-localização foram realizados usando o anticorpo anti-Myc para localização das histonas mutadas e anticorpos específicos para cada modificação. Como pode ser observado na figura 10, H4K4 localiza-se na periferia nuclear (vermelho), enquanto que quando mutada encontra-se concentrada no interior do núcleo. No caso da modificação na lisina 10, a localização também foi afetada. A única exceção parece ser H4K14R que apresenta localização semelhante a H4K14 endógena.

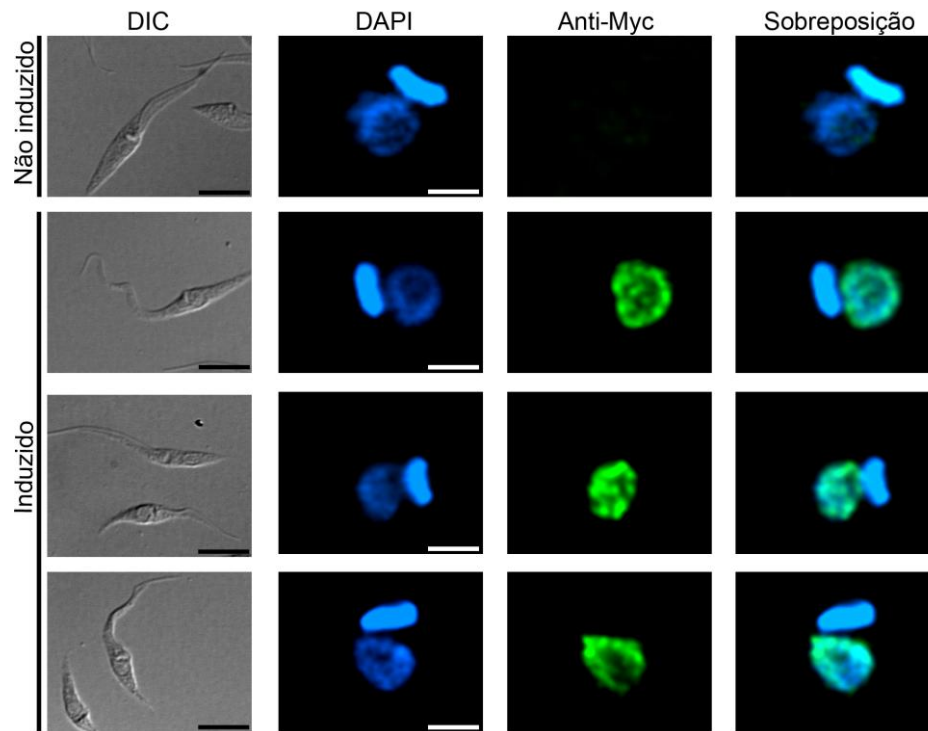


Figura 6: Imunolocalização de H4WT-Myc. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina por 4 dias e analisados por imunofluorescência usando o anticorpo anti-Myc (verde). O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Barras: DIC = 5 μm Fluorescências = 2 μm .

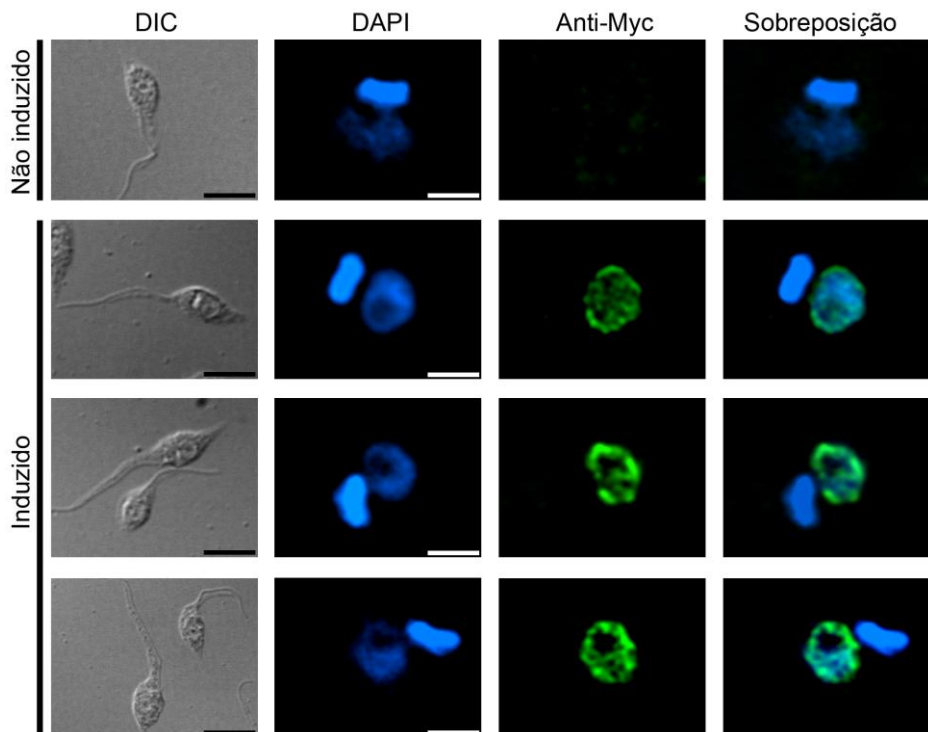


Figura 7: Imunolocalização de H4K4-Myc. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina por 4 dias e analisados por imunofluorescência usando o anticorpo anti-Myc (verde). O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Barras: DIC = 5 μm , fluorescências = 2 μm .

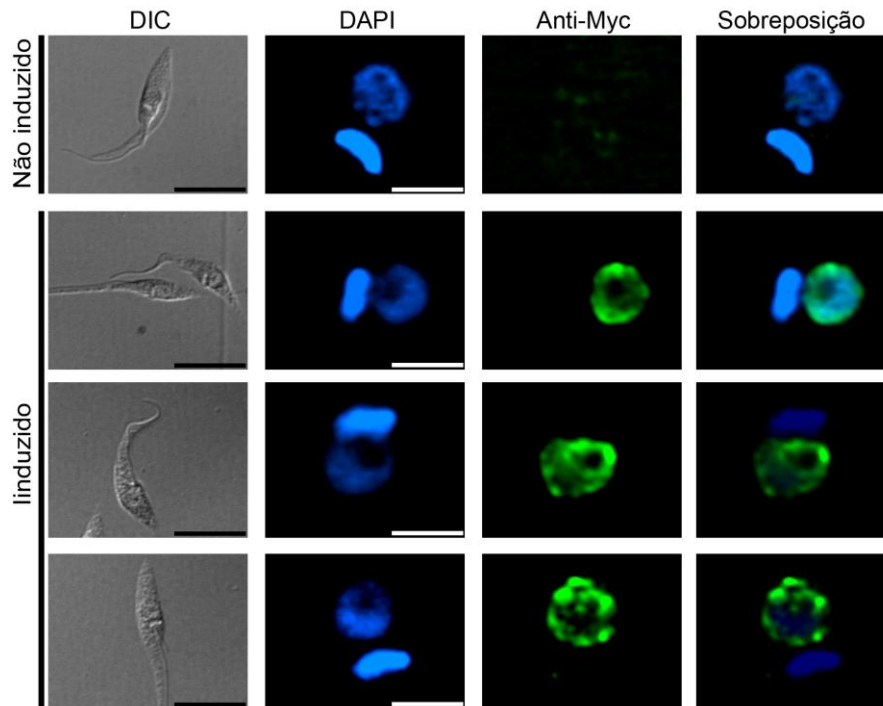


Figura 8: Imunolocalização de H4K10R-Myc. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina por 4 dias e analisados por imunofluorescência usando o anticorpo anti-Myc (verde). O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Barras: DIC (5 μm) Fluorescências (2 μm).

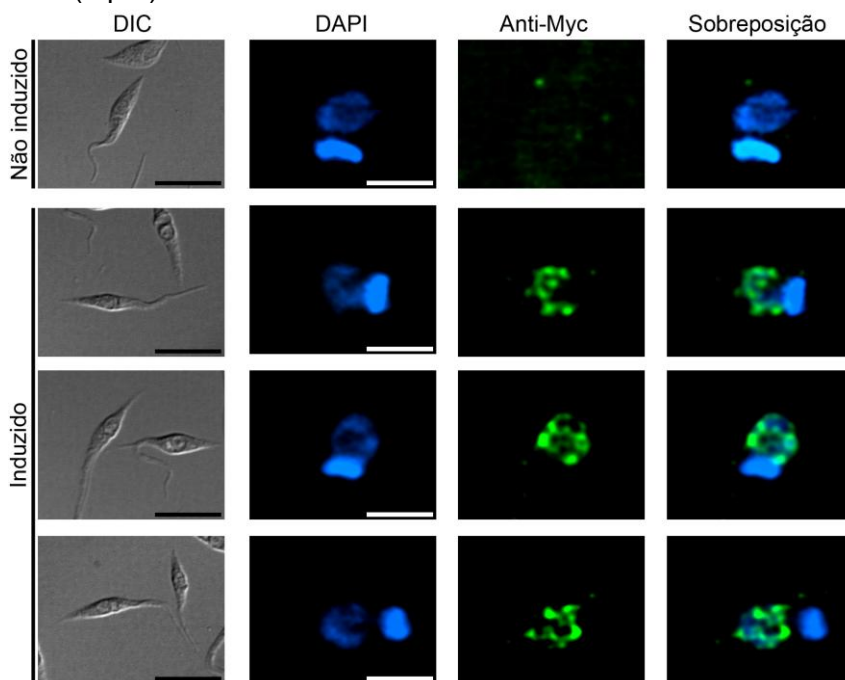


Figura 9: Imunolocalização de H4K14R-Myc. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina por 4 dias e analisados por imunofluorescência usando o anticorpo anti-Myc (verde). O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Barras: DIC (5 μm) Fluorescências (2 μm).

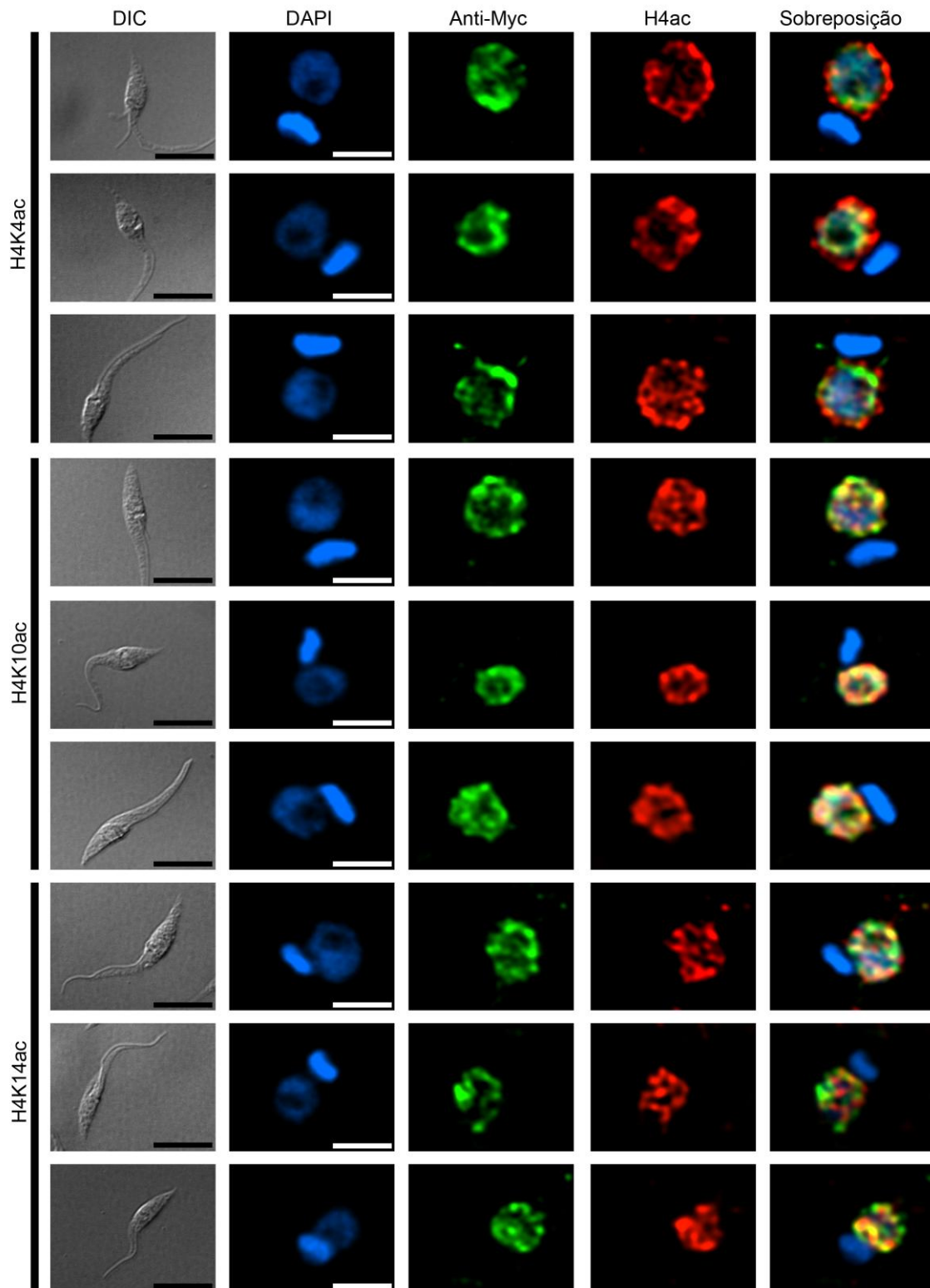


Figura 10: Colocalização das histonas mutatas nos sítios de acetilação e histonas H4 endógenas. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina por 4 dias e analisados por imunofluorescência usando o anticorpo anti-Myc (verde) e anticorpos específicos contra as acetilações (vermelho). O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI. Barras: DIC (5 μ m) Fluorescências (2 μ m).

Redução da acetilação em K14 afeta o crescimento e o ciclo celular de *T. cruzi*

Quando estudamos o efeito da expressão dos mutantes no crescimento dos parasitas após adição de tetraciclina, observamos que somente a linhagem contendo a mutação em K14 tem o crescimento diminuído (Fig. 11). As demais linhagens crescem de forma idêntica aos controles não induzidos ou transformados com TcBPP1-Myc. A diminuição do crescimento na linhagem H4K14R não parece ocorrer devida a morte das células, uma vez que nestas culturas não se encontraram parasitas imóveis.

Em *T. brucei*, as modificações de histona, bem como enzimas responsáveis por essas modificações foram associadas à progressão do ciclo celular (Ingram e Horn, 2002), como acontece em outros organismos (Koprinarova e Russev, 2008; Valls et al., 2005). Sendo assim, investigamos o efeito da presença das histonas H4 mutadas no ciclo celular. Quando as populações induzidas e não induzidas com tetraciclina foram comparadas percebemos um número maior de células em mitose ou próximo de mitose para o mutante H4K14R. Para fazer uma análise quantitativa, os parasitas foram contados em imagens obtidas em microscópio de fluorescência com padrões típicos para cada fase do ciclo celular (Elias et al., 2007). Estes padrões se baseiam no número de flagelos, cinetoplasto e núcleo, usando marcador de DNA (DAPI) e um anticorpo que marca especificamente o flagelo. Com esta técnica não é possível separar as fases G1 de S. Sendo assim, parasitas com 1N1K1F foram considerados na fase G1/S do ciclo celular, parasitas com 1N1K2F, em G2, parasitas com 1N2K2F em mitose (M), e parasitas com 2N2K2F em citocinese (C). Os dados foram analisados usando o teste Chi quadrado, para verificar a relevância estatística. Na figura 12 está representada a compilação dos dados obtidos. Nenhum aumento foi considerado estatisticamente significativo, provavelmente devido ao baixo número de parasitas em mitose e citocinese. Mesmo assim, algumas diferenças foram notáveis, como o aumento de cinco vezes no número de parasitas em mitose para o mutante H4K14R, cujo número de parasitas em citocinese encontra-se dobrado. Esse aumento de células em mitose, acompanhado de aumento de células em citocinese nessa

população, pode explicar a diminuição na velocidade de multiplicação dos parasitas quando o mutante K14R é expresso. Aumento dos parasitas em citocinese também foi observado para a população H4K4R, que aparentemente é compensado pela diminuição de parasitas em G2.

Estes dados sugerem que a acetilação na K14 tem um papel importante na mitose de acordo com os resultados apresentados no capítulo anterior, onde nós mostramos que epimastigotas de *T. cruzi* em G2/M apresentam maior enriquecimento da acetilação na lisina 14 da histona H4, quando analisadas por imunofluorescência.

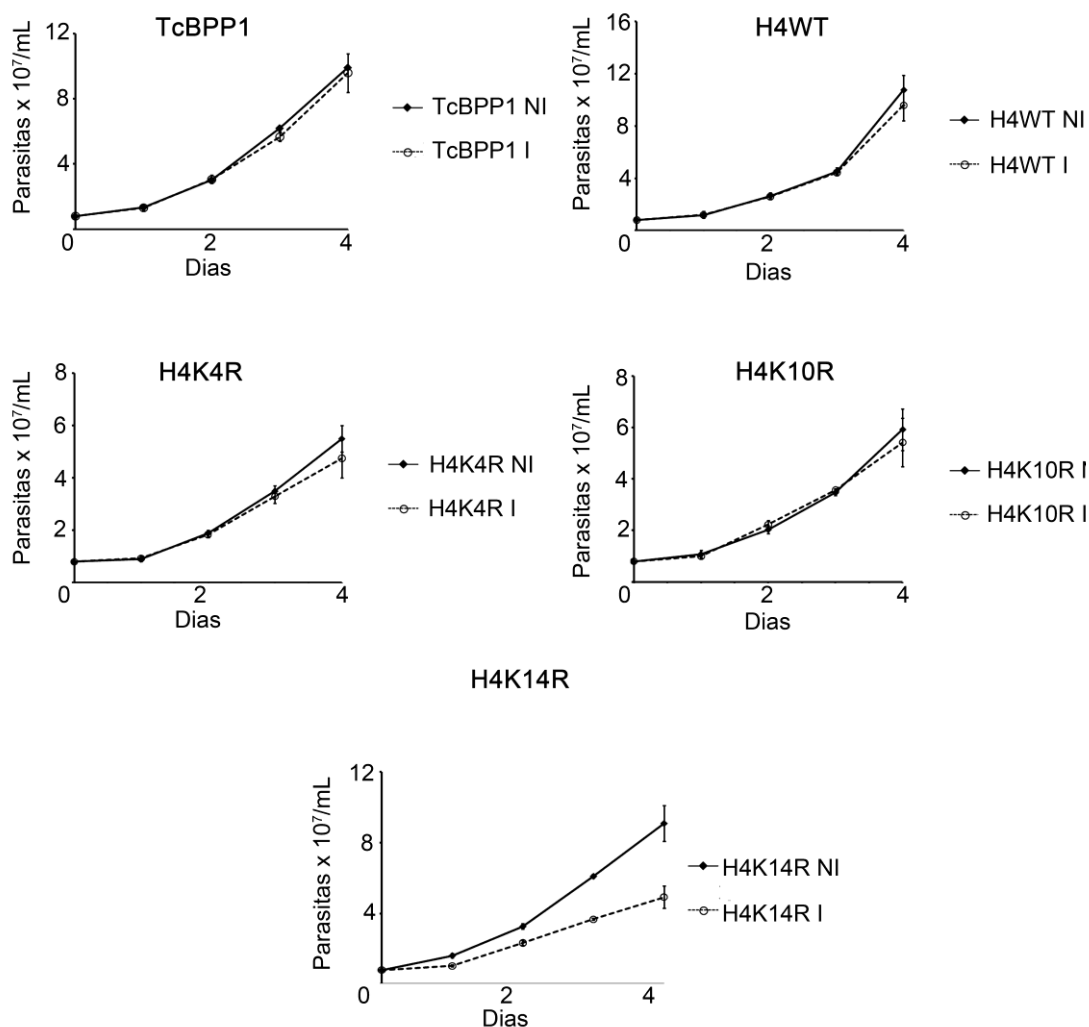


Figura 11: Efeito da expressão das histonas mutadas na proliferação dos parasitas. Epimastigotas foram induzidos com tetraciclina (dia 0) e contados diariamente, por 4 dias, em triplicata, acompanhando sempre o crescimento do controle não induzido. Cada painel representa cada linhagem obtida.

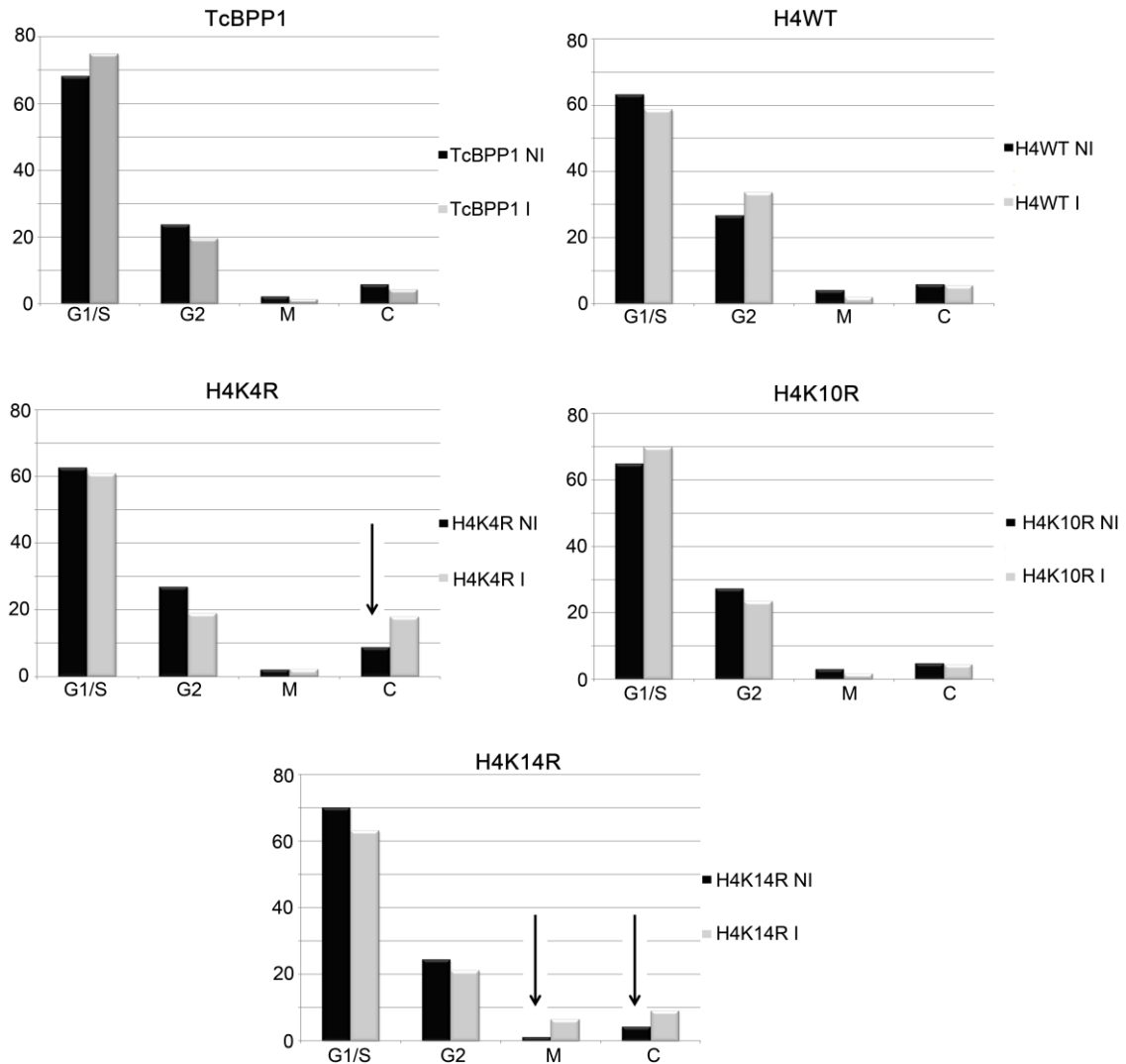


Figura 12: Análise do efeito dos mutantes na histona H4 no ciclo celular. Epimastigotas foram fixados e corados com DAPI e anticorpo anti-flagelo e observados em microscópio de fluorescência. analisados quanto a sua fase no ciclo celular de acordo com o número núcleos, cinetoplastos e flagelos, usando marcadores específicos em ensaio de imunofluorescência indireta. Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste Chi quadrado ($p < 0,08$). Nenhum evento foi considerado significativo, todavia, os eventos mais relevantes estão indicados por setas.

Epimastigotas com menor nível de acetilação em K10 e K14 são mais sensíveis a radiação ionizante

A seguir, testamos a susceptibilidade dos mutantes à radiação ionizante. Foram realizados ensaios onde os parasitas induzidos e não induzidos foram submetidos a doses de 500 Gy. Os parasitas foram analisados por 48 horas para o

H4K14R e 4 dias para o H4K10R. Como pode ser observado na figura 13 parasitas expressando a proteína TcBPP1-Myc param de crescer por cerca de 5 dias. Em resultados preliminares, não se observou parasitas mortos na cultura e após esse período, o crescimento foi restabelecido. Já no caso dos mutantes H4K10R e H4K14R, detectamos um número elevado (20% e 50% respectivamente) de células mortas 24 horas após a irradiação. Estes resultados preliminares sugerem que a ausência dessas acetilações aumenta a sensibilidade do *T. cruzi* ao dano causado pela radiação γ .

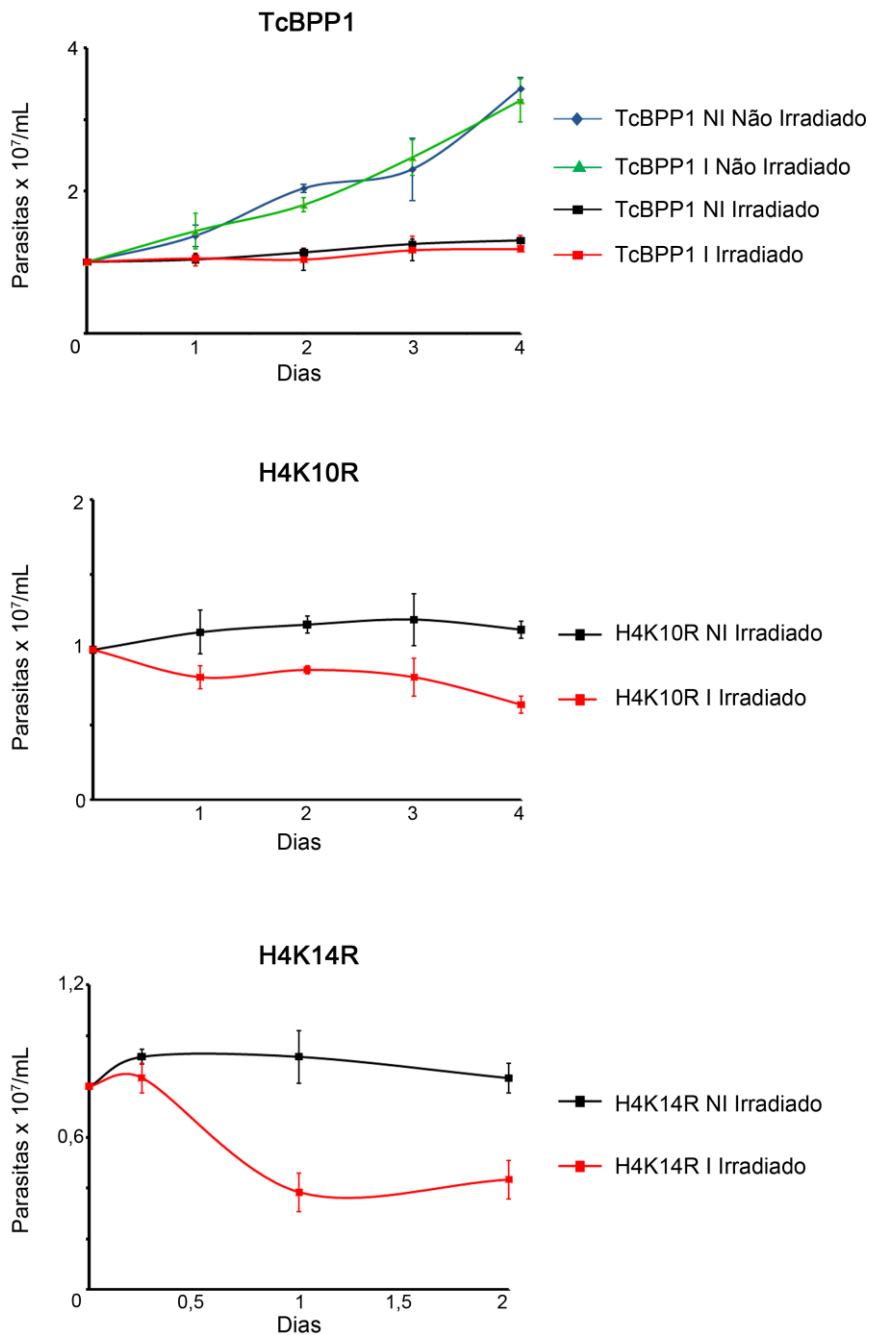


Figura 13: Efeito da radiação γ no crescimento de parasitas com a histona H4 mutada. Epimastigotas foras induzidos com tetraciclina por 4 dias e submetidos a radiação γ (500Gy). Imediatamente após a irradiação, os parasitas foram contados (tempo 0) e acompanhados diariamente, em triplicata, por 4 dias, no caso do controle TcBPP1-Myc (Myc) e H4K10R e 2 dias no caso de H4K14R.. Em azul os parasitas não induzidos (NI) e não irradiados, em verde os parasitas induzidos (Ind) e não irradiados, em vermelho os parasitas NI e não irradiados e em roxo os parasitas Ind e irradiados.

CAPÍTULO 3

***Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation**

Autores: Gabriela Vanina Villanova, Sheila Cristina Nardelli, Pamela Cribb, Anahí

Magdaleno, Ariel Mariano Silber, Maria Cristina M. Motta,

Sergio Schenkman e Esteban Serra

Publicado em *International Journal for Parasitology*. 39 (2009) 665-673.

Quando Strahl e Allis sugeriram o “código das histonas” no ano 2000, proteínas que continham certos domínios em suas estruturas foram propostas como os leitores dessas modificações. Entre esses domínios encontra-se o bromodomínio, um domínio presente em histonas acetiltransferases e algumas proteínas remodeladoras de cromatina, que reconhece especificamente lisinas acetiladas. Em *T. cruzi* foram identificadas cinco proteínas que contém bromodomínio (TcBDF1-5). Nesse trabalho, mostramos a caracterização da TcBDF-2, uma proteína constitutivamente expressa em todos os estágios dos ciclo de vida de *T. cruzi* e que localiza-se preferencialmente nas regiões de interface entre a heterocromatina e a eucromatina. Ensaio de co-localização usando anticorpos policlonais contra TcBDF2 e histona H4 acetilada em lisinas específicas mostraram que TcBDF2 co-localiza preferencialmente com H4K10ac e H4K14ac em epimastigotas de *T. cruzi*. Como ocorreram pontos onde a co-localização não ocorreu, ensaios de interação *in vitro* foram realizados para verificar se ocorria interação entre TcBDF2 com outras histonas no núcleo no parasita. Dessa forma foi observado, que TcBDF2, além de

interagir com H4, é capaz de interagir com H2A, o que pode explicar os pontos que não co-localizam na imunofluorescência. Além disso, a banda correspondente a H4 é mais alta, o que indica que essa é a forma acetilada em K10 e K14 da molécula . Para verificar a afinidade específica por cada lisina acetilada, peptídeos acetilados e o controle não acetilado foram imobilizados em membrana de nitrocelulose e incubados com TcBDF2 e posteriormente incubados com anti-TcBDF2. Os resultados indicam que embora ocorra interação com H4K14ac, a maior interação ocorre com o peptídeo acetilado na lisina 10. Esses resultados foram confirmados por experimentos de imunoprecipitação, onde foi observado que TcBDF2 interage com H4K10ac.

Por fim, mostramos que os níveis de TcBDF2 aumentam após dano causado por exposição a luz ultravioleta, o que indica uma possível função no dano/reparo de DNA por parte dessa proteína.



Trypanosoma cruzi bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation

Gabriela Vanina Villanova^a, Sheila Cristina Nardelli^b, Pamela Cribb^a, Anahí Magdaleno^c, Ariel Mariano Silber^c, Maria Cristina M. Motta^d, Sergio Schenkman^b, Esteban Serra^{a,*}

^a Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha 351, 2000, Rosario, Argentina

^b Departamento de Microbiología, Imunología e Parasitología, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu 862 8^a, 04023-062 São Paulo, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-900 RJ., Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2008

Received in revised form 14 November 2008

Accepted 18 November 2008

Keywords:

Trypanosomes
Bromodomain
TcBDF2
Histone H4

ABSTRACT

Histone tail post-translational modifications (acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and ADP-ribosylation) regulate many cellular processes. Among these modifications, phosphorylation, methylation and acetylation have already been described in trypanosomatid histones. Bromodomains, together with chromodomains and histone-binding SANT domains, were proposed to be responsible for “histone code” reading. The *Trypanosoma cruzi* genome encodes four coding sequences (CDSs) that contain a bromodomain, named TcBDF1–4. Here we show that one of those, TcBDF2, is expressed in discrete regions inside the nucleus of all the parasite life cycle stages and binds H4 and H2A purified histones from *T. cruzi*. Immunolocalization experiments using both anti-histone H4 acetylated peptides and anti-TcBDF2 antibodies determined that TcBDF2 co-localizes with histone H4 acetylated at lysines K10 and K14. TcBDF2 and K10 acetylated H4 interaction was confirmed by co-immunoprecipitation. It is also shown that TcBDF2 was accumulated after UV irradiation of *T. cruzi* epimastigotes. These results suggest that TcBDF2 could be taking part in a chromatin remodelling complex in *T. cruzi*.

© 2009 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chromatin presents at least two conceptually distinct structures with different functional characteristics: a condensed and a relaxed form (Workman and Kingston, 1998). Such different chromatin states regulate not only gene expression but also other DNA-related processes such as recombination, replication timing, DNA repair and chromosome segregation via centromeres. Chromatin structure can be altered by covalent modifications of the N-terminal tails of the core histones, by nucleosome remodelling via ATP-driven complexes and by replacement of one or more of the core histones for their variants (Felsenfeld and Groudine, 2003). The role of histone modifications was initially proposed to be a consequence of physicochemical alterations in the nucleosome structure (Wu and Grunstein, 2000). However, these modifications are specifically recognized by proteins containing conserved structural domains. Among those, the bromodomain is a domain involved in the recognition of acetylated lysines usually found in histones and other nuclear proteins including transcription factors. Bromodomains are present in some histone acetyltransferases (HATs) such as Gcn5, transcription factors such as p300/CBP and TAF1 (the largest subunit of the

TFIID transcription initiation complex) and in proteins from chromatin-remodelling complexes such as SWI/SNF (Zeng and Zhou, 2002). Together with proteins containing methyl-lysine-binding chromodomains, and histone-binding SANT domains, these proteins were proposed to be responsible for reading the “histone code” (De la Cruz et al., 2005), where “multiple histone modifications, acting in a combinatorial or sequential fashion on one or multiple tails, specify unique downstream functions” (Strahl and Allis, 2000).

Histones from trypanosomes are among the most divergent described to date, differing from others in terms of sequence, charge and size (Toro and Galanti, 1988, 1990; Thatcher and Gorovsky, 1994; Galanti et al., 1998). Despite differences, recent works have described that covalent modifications are also present in these organisms (da Cunha et al., 2006; Janzen et al., 2006; Mandava et al., 2008). *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated, H2A and H4 are preferentially acetylated and H2B and H3 are mostly methylated (Marquez Porto et al., 2002; da Cunha et al., 2006). Histone H4 modifications have been described in some detail: lysine residues K4, K10, K14 and K54 are acetylated; K18 is mono-methylated and arginine at position 53 is dimethylated (da Cunha et al., 2006). Residues K2 and K5 were also found acetylated in *Trypanosoma brucei* (Janzen et al., 2006; Mandava et al., 2008). Genes for variants of the four core histones are present in trypanosomes' genomes. In *T. brucei*, variant histone H3 is enriched at telomeres, while histone

* Corresponding author. Tel.: +54 341 4350596 (133); fax: +54 341 4390465.
E-mail address: serra@ibr.gov.ar (E. Serra).

H2AZ dimerizes with a novel variant H2B associated with repetitive DNA (Lowell and Cross, 2004; Lowell et al., 2005).

Genes coding for putative histone acetyltransferases, deacetylases and methyltransferases were also found in the TriTryp genomes (Ivens et al., 2005). *T. brucei* DAC1 and DAC3 histone deacetylase genes are essential, and DAC4 seems to be important for cell cycle progression (Ingram and Horn, 2002). The three MYST-family histone acetyltransferases (HAT1–3) from *T. brucei* have recently been characterized (Kawahara et al., 2008; Siegel et al., 2008). Both HAT1 and HAT2 are essential for growth of the bloodstream form of the parasite whereas HAT-3 is a non-essential enzyme. Concerning functionality, HAT3 is responsible for H4K4 acetylation and HAT2 for H4K10 acetylation (Kawahara et al., 2008). HAT1 knock-down parasites display mitosis without nuclear DNA replication and specific de-repression of a telomeric reporter gene (Kawahara et al., 2008). In addition to histone modifying enzymes, CDSs coding for polypeptides containing bromodomains, chromodomains and SANT domains have been identified in trypanosomes' genomes (Ivens et al., 2005). However, to date none of these putative chromatin-binding proteins have been characterized. In this report we describe the Bromodomain Factor 2 from *T. cruzi* (TcBDF2), one of the four CDSs for bromodomain-containing factors (BDFs) present in the TriTryp genomes. TcBDF2 is located at the nucleus of all parasite life stages associated with acetylated histones H2A and H4 (having preference for K10, and probably K14 acetylated residues), and it is accumulated in epimastigotes after UV irradiation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The Chinese Hamster Ovary cell line CHO-K1 was routinely cultivated in RPMI medium (Gibco BRL) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 0.15% (w/v) NaHCO₃, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 mg ml⁻¹ streptomycin at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

2.2. Parasites

Epimastigote forms of *T. cruzi* CL Brener and Y strains were cultured in liver infusion-tryptose medium (LIT) supplemented with 10% FCS at 28 °C (Camargo, 1964). The parasites were kept in exponential growth by sub-culturing daily. Intracellular forms and trypomastigotes were obtained by infection of CHO-K1 cells with trypomastigotes as previously described (Tonelli et al., 2004). Amastigotes were purified from CHO-K1 on day 2 p.i. Trypomastigotes were collected in the extracellular medium from the seventh day onwards. To obtain metacyclic trypomastigotes, *T. cruzi* clone Dm28c epimastigotes were grown at 28 °C in LIT supplemented with 10% FBS. Cells were differentiated in vitro into metacyclic trypomastigotes under chemically defined conditions (TAU3AAG medium), as previously described (Contreras et al., 1988).

2.3. UV treatment

Exponentially growing parasites were exposed to a UV cross linker XL1500UV with a dose of 500 mJ/cm². They were then diluted and grown for 0, 3, 6, 18, 24 and 48 h. At each time-point 1 × 10⁹ parasites were collected and processed for nuclear extracts.

2.4. Cloning and expression of TcBDF2

DNA purified from *T. cruzi* CL Brener strain was used as a template for PCR with oligonucleotides: BDF2Fw (5'AAAGGATC CATGGGAAGCGTGGGCG3') and BDF2Rv (5'AAGAATTCATA

AAACTTCTTCATCGCTATC3'), using a proofreading polymerase. PCR product was inserted into a pCR^{2.1}-TOPO[®] vector (Invitrogen) and sequenced. The TcBDF2 coding region was introduced into a pENTR3C vector (Gateway[®] system Invitrogen) using the BamHI/EcoRI restriction sites included in the oligonucleotides (underlined). It was then transferred to a destination vector pDEST17 (Gateway[®] system Invitrogen) by recombination using LR Clonase (Invitrogen) to express TcBDF2 as an His-tag fusion. This vector was transformed into *Escherichia coli* BL21 pLysS, and recombinant protein was obtained by expression-induction with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), for 10 h at 37 °C. The proteins were purified under native conditions by affinity chromatography using Ni-NTA agarose (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

2.5. Antibodies

Recombinant proteins emulsified in FCA were used for s.c. immunization of mice and rabbits. Formal animal ethics approval was given for this work. Animals were housed and maintained according to institution guidelines. Sera were obtained after two additional injections of proteins emulsified in incomplete Freund's adjuvant with 2 weeks intervals between each dose. Specific antibodies were purified by chromatography through a Ni-agarose column containing formaldehyde cross-linked His-tagged TcBDF2. Specific antibodies were eluted with 100 mM triethylamine (pH 11.5), neutralized to pH 8.0 and stored at 4 °C or -20 °C with 50% glycerol. The purified antibodies' specificity was tested using immunoblotting assays.

2.6. Trypanosoma cruzi protein extracts and histone acid-extraction

Exponentially growing epimastigotes were washed twice in cold PBS and pellets were resuspended in loading buffer containing SDS, sonicated and boiled for 5 min. Insoluble debris were eliminated by centrifugation. The same procedure was applied to amastigote and trypomastigote cellular pellets. Nuclear extracts were prepared from 2 × 10¹⁰ exponentially growing parasites. After washing, parasites were lysed in hypotonic buffer A (10 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1% v/v Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 μg ml⁻¹ aprotinin, 0.25% Triton X-100), 5% v/v glycerol was added and the pellet was collected by centrifugation. Pellets were washed with buffer B (10 mM HEPES pH 8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ 5% v/v glycerol, 1 mM PMSF, 10 μg ml⁻¹ aprotinin) and incubated for 10 min on ice. Nuclei were collected by centrifugation and resuspended in Buffer C (10 mM HEPES pH 8, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% v/v glycerol, 1 mM PMSF, 10 μg ml⁻¹ aprotinin), incubated for 1 h on ice and sonicated. This extraction was repeated three times and supernatants were precipitated with 20% trichloroacetic acid overnight at 4 °C.

The non-soluble fraction after nuclear lysis was used to recover histones by acid-extraction with 0.4 M H₂SO₄ as described previously (Toro and Galanti, 1990). The acid-soluble extract was precipitated overnight with 8 vol. of acetone and stored at -20 °C. Alternatively, histones were extracted with 0.25 M HCl as described elsewhere (da Cunha et al., 2006). Histones were fractionated in a Triton DF16, acetic acid and urea (TAU)-PAGE as previously described (Marquez Porto et al., 2002) and detected by Coomassie Blue staining or transferred to nitrocellulose membranes using 0.7% acetic acid to perform far Western blots or immunoblots.

2.7. Western blot

Immunoblots were performed using SDS total or nuclear extracts corresponding to 1 × 10⁷ parasites per lane fractionated in

SDS–PAGE, or *T. cruzi* histone extracts fractionated in TAU–PAGE, both transferred to nitrocellulose membranes. Proteins were visualized by Ponceau S staining. The migrating position of each histone was marked to ensure proper alignment of antibody reactions with the protein pattern. Membranes were treated with 10% non-fat milk in PBS for 1 h, and then with specific antibodies diluted in PBS for 3 h. Bound antibodies were detected using biotin labelled anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody, streptavidin labelled peroxidase and ECL Plus (GE Healthcare) using standard protocols.

2.8. Far Western blot and slot blot

Far Western blots were performed using *T. cruzi* histone extracts fractionated in TAU–PAGE and transferred to nitrocellulose. Proteins were visualized by Ponceau S staining and the migrating position of each histone was marked to ensure proper alignment of reactions with the protein pattern. The membranes were treated with 5% non-fat milk in PBS (blocking buffer) for 2 h, and then with recombinant BDF2 diluted in blocking buffer (0.1 and 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 1 h. After this incubation, membranes were washed with PBS–Tween 0.1%. Bound proteins were visualized using anti-TcBDF2 purified antibodies and detected using biotin labelled anti-mouse IgG antibody, streptavidin labelled peroxidase and ECL Plus (GE Healthcare). The same protocol was performed using 10 μg of each 16 amino acid-long peptides derived from the histone H4 sequence, or the same sequence with acetylated lysines 4, 10 and 14 (CAKKGKacKSGEAKGTQKRQ, Ac-K4; AKGKKSGEAKacGTQKRQ, Ac-K10; AKGKKSGEAKGTQKacRQ, Ac-K14 (da Cunha et al., 2006) immobilized onto a nitrocellulose membrane.

2.9. Co-immunoprecipitation

Exponentially growing *T. cruzi* epimastigotes were grown up to $10^7/\text{ml}$ and 10^9 parasites were used per co-immunoprecipitation experiment following the protocol of Respuela et al. (2008) with some modifications. Parasites were washed twice with $1 \times$ PBS and resuspended in 25 ml of serum-free medium. Cross-linking was performed by addition of formaldehyde to a final concentration of 1% and incubated at room temperature for 15 min. Cells were washed with cold PBS, resuspended in 2 ml lysis buffer (1% SDS; 10 mM EDTA pH 8.0; 50 mM Tris–HCl pH 8.0) with protease inhibitors and incubated during 15 min on ice. Lysate was sonicated for seven cycles of 30 s, cellular debris was spun down and supernatant was transferred to a new tube. For each immunoprecipitation (IP), 500 μl of lysate was diluted to 2 ml with IP buffer (0.01% SDS; 1.1% Triton X-100; 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris–HCl pH 8.0; 150 mM NaCl) with protease inhibitors and 30 μl Protein A-agarose beads were added. Tubes were incubated for 90 min at 4 °C. Supernatants were transferred to new tubes, antibodies were added (aTcBDF2 or purified algG antibody) and incubated overnight at 4 °C. The next day, 50 μl Protein A-agarose beads were added and incubated for 90 min at 4 °C. Beads were washed with 1 ml of buffer A, B, C and TE (A: 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris–HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; B: 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM Tris–HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; C: 0.25 M LiCl; 1% NP-40; 1% Na-Deoxycholate; 1 mM EDTA pH 8.0; 10 mM Tris–HCl pH 8.0), cracking buffer was added and samples were boiled. Proteins were resolved in 15% SDS–PAGE for immunoblotting using purified antibodies against acetylated histone H4–K4, acetylated H4–K10, acetylated H4–K14 and TcBDF2.

2.10. Immunocytolocalization

Trypomastigotes and exponentially growing epimastigotes were centrifuged, washed twice in PBS, added to the poly-L-ly-

sine-coated slides and then fixed with 4% formaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. Fixed parasites were washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. After washing with PBS, parasites were incubated with indicated antibodies diluted in 1% BSA–PBS for 1 h at room temperature. For co-localizations, both antibodies were used together. The antibodies were washed with PBS and the slides incubated with anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody fluorescent conjugates. The slides were mounted in VectaShield (Vector Laboratories) in the presence of 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DAPI in PBS. Images were acquired in a Nikon E600 microscope with a Nikon DXM1200 digital camera using ACT-1 2.63 software. Adobe Photoshop 7.0 was used to pseudocolour the images. To analyse intracellular amastigotes, CHO-K1 cell monolayers were grown on Labtech slides and infected with *T. cruzi* trypomastigotes as described above. After 2 days of infection, cultures were washed with PBS and cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. The slides were processed for immunofluorescence as mentioned above. The coefficient of co-localization between TcBDF2 and H4 acetylated at K4, K10 and K14 was calculated using ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2008).

2.11. Immunoelectron microscopy

Parasites were fixed in 0.3% glutaraldehyde, 4% formaldehyde and 1% picric acid diluted in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.2 and then dehydrated at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ using a graded acetone series and progressively infiltrated with Unicryl at lower temperatures. The resin polymerization was carried out in BEEM® (Better equipment for electron microscopy) capsules at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 days under UV light. Ultra-thin sections were obtained in a Leica ultramicrotome (Reichert Ultracuts) and the grids containing the sections were incubated with 50 mM NH_4Cl for 30 min. The grids were then incubated with blocking solution (3% BSA, 0.5% teleostean gelatine, 0.02% Tween-20 diluted in PBS, pH 8.0) for 30 min and finally with goat serum diluted in blocking solution (1:250). Grids containing ultra-thin sections were incubated for 1 h with anti-TcBDF2 antibodies diluted in blocking solution (1:5) and washed in PBS. Grids were then incubated with gold-labelled goat anti-rabbit IgG diluted 1:250 for 45 min, washed in blocking solution and stained with uranyl acetate and lead citrate for further observation using a Zeiss 900 transmission electron microscope. In control assays, sections were not incubated with the primary anti-serum.

3. Results and discussion

3.1. Identification of bromodomain-containing proteins in trypanosomes

Trypanosoma cruzi CDS Tc00.1047053507769.30 codes for a predicted 26.5 kDa protein containing a bromodomain (pfam: PF00439) nearly covering the N-terminal half of the protein, from R6 to C110. This CDS, its allele Tc00.1047053506553.20 and CDSs Tb10.6k15.3240 from *T. brucei* and Lmjf36.2980 from *Leishmania major* were named, by Tri-Tryp genome curators, as Bromodomain Factor BDF2 (Fig. 1A and B). Despite this feature, TcBDF2 does not show similarity with any other sequence present in databases. The central region of the sequence (from R134 to K171) is rich in basic lysine and arginine amino acids (26.3% K + R). The C-terminal region (from D179 to E236) is rich in acidic amino acids (63.7% E + D) and serines (22.4%). In general, these highly charged low complexity sequences are considered prone to participate in protein–protein interactions. In higher eukaryotes, bromodomains are usually found associated to other domains or enzymatic activities in the same polypeptide, however, this is not the situation

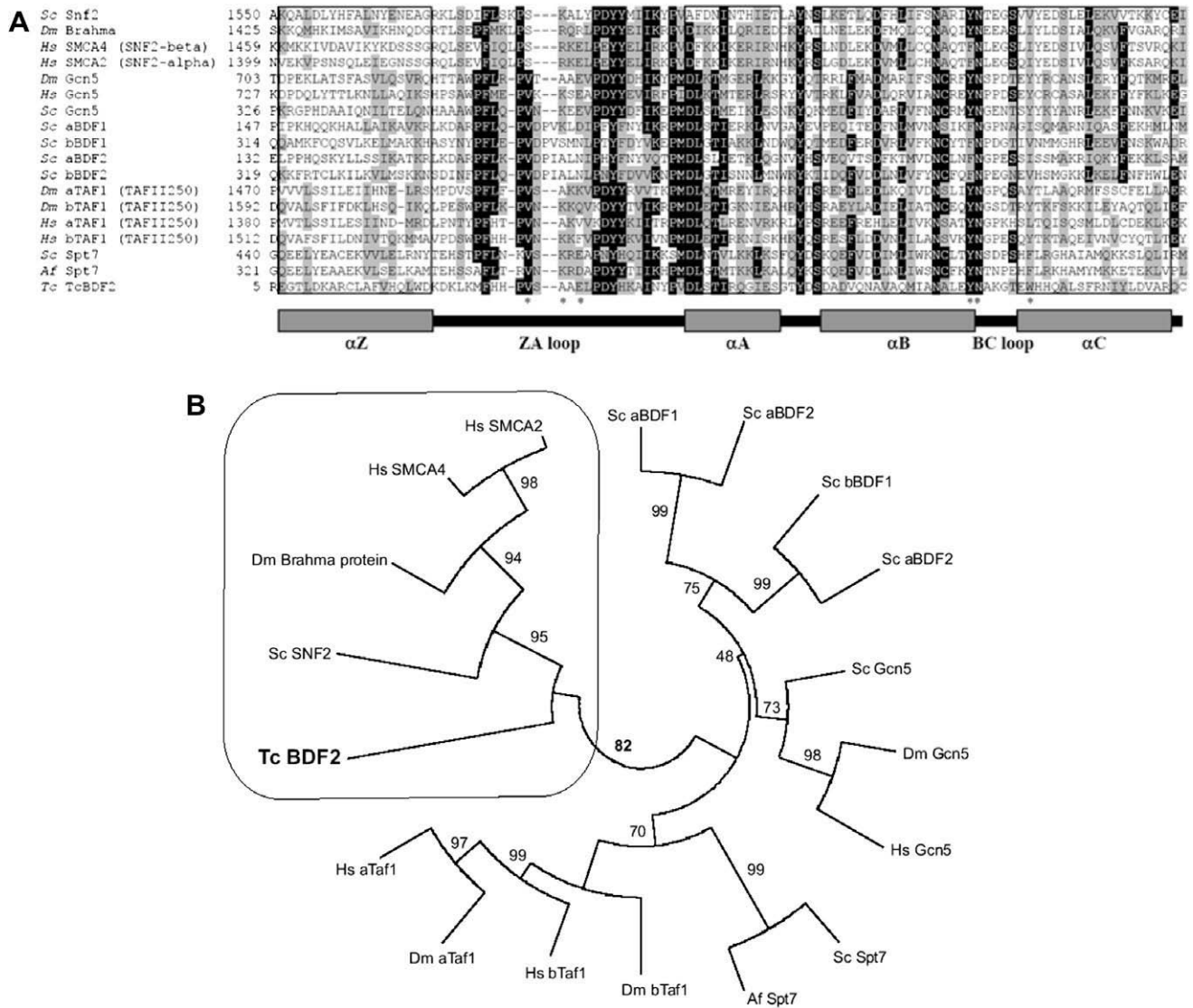


Fig. 2. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) bromodomain comparison. (A) Sequence alignment of a selected number of bromodomains of different organisms. The sequences were aligned using the MEGA 4 programme (www.megasoftware.net), based on the predicted second structures made by PSIPRED (<http://globin.blo.warwick.ac.uk/psipred>) and DISOPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred>). A bromodomain structure scheme is shown below the alignment. The bromodomain region is boxed to each protein. Identical residues are in black and conservative changes in gray. Asterisks show residues that are important for the interaction with the acetylated lysine residue. The sequences are (species name; GenBank™ accession number): *Sc* SNF2 (*Saccharomyces cerevisiae*; CAA99517.1), *Dm* Brahma (*Drosophila melanogaster*; P25439), *Hs* SMCA4 (*Homo sapiens*; P51532), *Hs* SMCA2 (*H. sapiens*; P51531), *Dm* Gcn5 (*D. melanogaster*; AAC39102.1), *Hs* Gcn5 (*H. sapiens*; AAC39769.1), *Sc* Gcn5 (*S. cerevisiae*; NP_011768.1), *Sc* aBDF1 and *Sc* bBDF1 (*S. cerevisiae*; P35817), *Sc* aBDF2 and *Sc* bBDF2 (*S. cerevisiae*; YDL070W), *Dm* aTAF1 (TAFII250) and *Dm* bTAF1 (TAFII250) (*D. melanogaster*; P51123), *Hs* aTAF1 (TAFII250) and *Hs* bTAF1 (TAFII250) (*H. sapiens*; P21675), *Sc* Spt7 (*S. cerevisiae*; NP_009637.1) and *Af* Spt7 (*Aspergillus fumigatus*; XP_754519.1). Several bromodomain-containing proteins have two bromodomain modules in tandem disposition. In those cases the two copies of each protein were included in the phylogenetic analyses and were differentiated in the tree as “a” –N-terminal domain– and “b” –C-terminal domain–. (B) Unrooted phylogeny of bromodomain-containing proteins and TcBDF2. The tree was constructed using the Neighbour Joining method using the MEGA4 programme. The number associated with each internal branch is the local bootstrap probability which is an indicator of confidence.

Ac-K10 (Fig. 5). This suggests that TcBDF2 binds K10 and K14-H4 acetylated forms in vitro. The possibility of non-specific electrostatic interactions between TcBDF2 and histones was ruled out by using highly positively charged recombinant *Thermus thermophilus* cytochrome C as control.

The ability of TcBDF2 to bind more than one acetylated histone is not surprising. In *senso stricto*, bromodomain is an acetyl-lysine-binding domain, and it could potentially interact with any protein having this modification provided the acetylated lysine is accessible to its hydrophobic pocket. Several structures of bromodomains bound to H4-derived peptides have already been solved and a number of specific residues in the domain out of acetyl-lysine were described as interacting with H4. Moreover,

considering that bromodomains take part in multi-protein complexes, other polypeptides from the complex could be also involved in selectivity for the acetylated protein to be bound. In this report we focused on the TcBDF2-histone H4 interaction but further characterization of TcBDF2-H2A interaction will follow up in future studies.

To better characterize the interaction between TcBDF2 and histone H4, equimolar amounts of synthetic peptides derived from the histone H4 N-terminal tail were immobilized on nitrocellulose membranes and assayed for interaction with purified TcBDF2. Fig. 6A shows a typical result. A stronger signal was observed with the acetylated peptides compared with non-acetylated ones and, among those, the strongest interaction was observed for Ac-K10

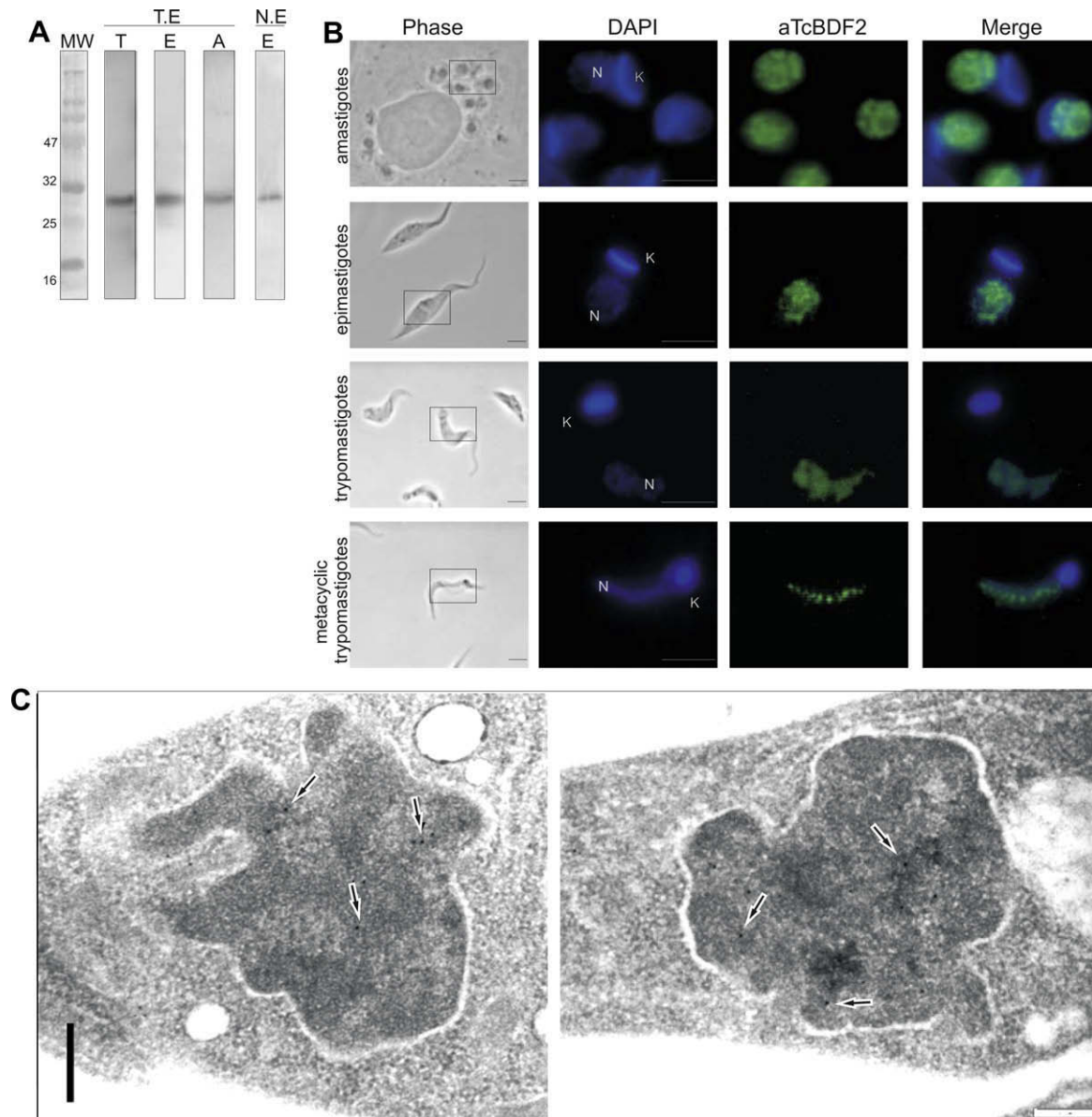


Fig. 3. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) is a nuclear protein expressed throughout the *T. cruzi* life cycle. (A) Western blot using purified anti-TcBDF2 (aTcBDF2). MW: molecular weight marker, T.E, total protein extract; N.E, nuclear protein extract; T, trypomastigotes; A, amastigotes; E, epimastigotes. (B) Immunofluorescence assay performed using purified anti-TcBDF2 and parasites at different stages of the *T. cruzi* life cycle. Mouse IgG was revealed with a fluorescein-conjugated specific antibody (green). The nucleus (N) and kinetoplast (K) were labelled with DAPI. Bars: 2 μ m. (C) Immunoelectron microscopy of *T. cruzi* TcBDF2 in epimastigotes. Arrows indicate the gold particles. Bars = 0.5 μ m.

and Ac-K14 peptides (Fig. 6B). This selectivity coincides with results obtained by far Western blot and immunocytochemical localization. The interaction of TcBDF2 and acetylated H4 was also assessed in vivo by co-immunoprecipitation. As shown in Fig. 6C, Ac-K10 was recognized in TcBDF2 immunoprecipitated extracts. However, no signal was obtained when extracts were challenged with a-Ac-K4 and a-Ac-K14. In *T. brucei*, acetylation in K10 (7%) and K14 (1%) is rare compared with K4 (73%). Considering these acetylation levels, the lack of co-immunoprecipitation between TcBDF2 and Ac-K4 strongly argues against the existence of this interaction in vivo. By contrast, TcBDF2 and Ac-K14 interaction should not be completely ruled out.

Acetylation in K10 residue seems to be indispensable for parasite viability since HAT2, responsible for its acetylation in *T. brucei*, is an essential enzyme. The TcBDF2 residue preference for essential Ac-K10 and probably for the very rare Ac-K14, strongly suggest

that TcBDF2 may be participating in a regulatory pathway associated to H4 acetylation.

3.4. TcBDF2 is accumulated after UV irradiation

In yeast and mammals, bromodomains are found in different protein complexes including HATs, chromatin remodelling complexes (such as SWI/SNF and RSC) and general transcription factors (such as TAF1). They have been shown to participate in DNA replication, transcription, DNA repair and silencing/anti-silencing (Zeng and Zhou, 2002). The fact that the TcBDF2 bromodomain is similar to bromodomains present in chromatin remodelling complexes suggests a possible role in chromatin dynamics. To explore this hypothesis, we treated parasites with UV-radiation and measured TcBDF2 by Western blots during the following 48 h. UV exposure was described to induce a transient arrest into parasite transcrip-

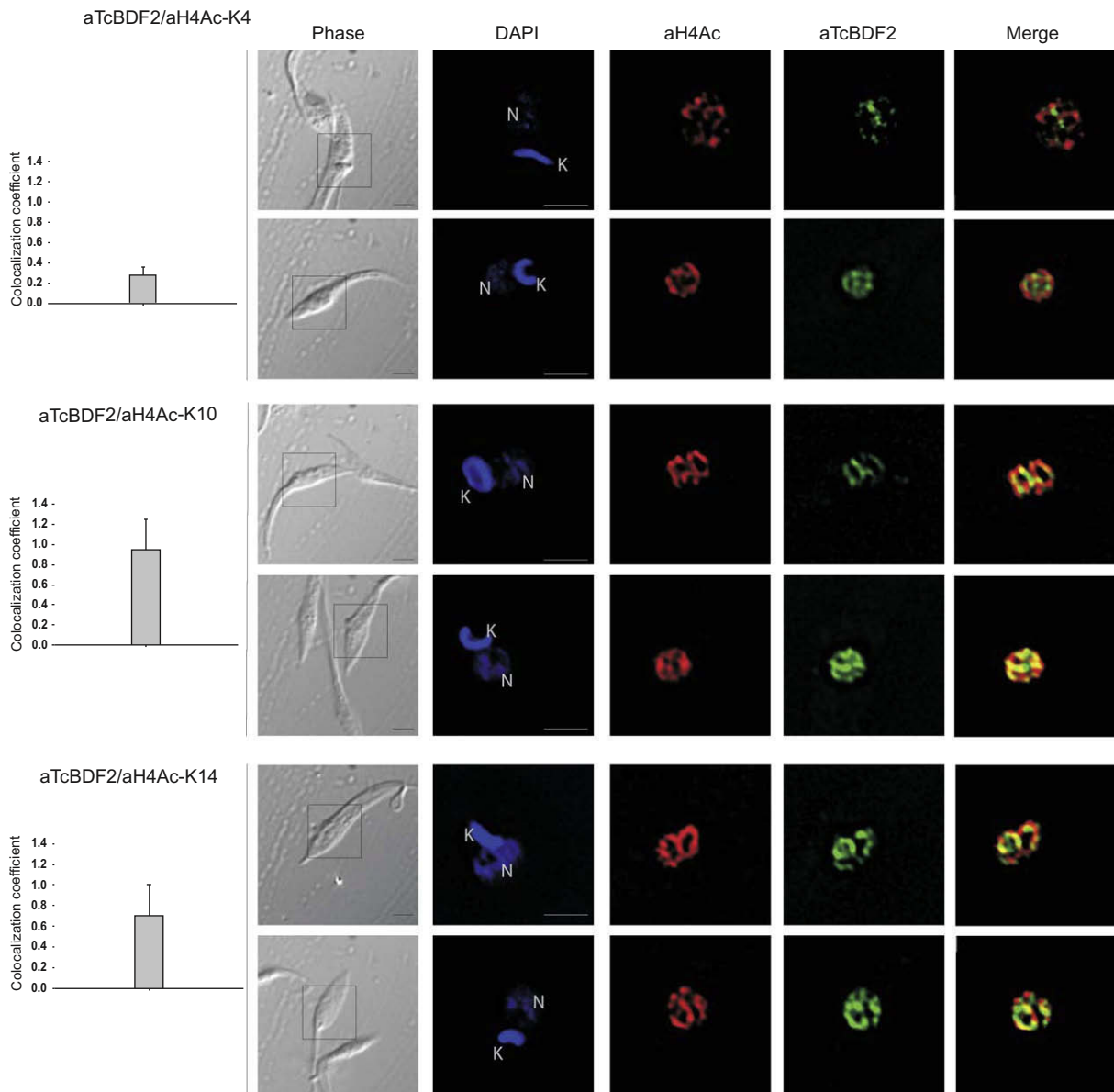


Fig. 4. Cytolocalization of *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) and histone H4 acetylated at lysines 10 and 14 shows a similar pattern. Epimastigote co-localization analysis by immunofluorescence using purified rabbit antibodies against H4 acetylated at positions 4 (aH4Ac-K4), 10 (aH4Ac-K10) and 14 (aH4Ac-K14) and purified mouse aTcBDF2, developed by anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa 488 (green) and anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa 555 (red). The images correspond to single plane of a three-dimensional deconvolved image using Volocity software. The nucleus (N) and kinetoplast (K) were labelled with DAPI. Co-localization analysis bars are picture on the left. Bars = 2 μ m.

tion as well as a DNA excision repair mechanism that include destabilization of UV-damaged nucleosomes. Chromatin structure is subjected to substantial rearrangements during DNA damage response (before and after DNA repair), which are critical for a proper cellular response to genotoxic insults. The “Access-Repair-Restore” (Green and Almouzni, 2002; Smerdon, 1991) prevailing model highlights the intimate relationship between chromatin dynamics and the DNA damage response. Nucleosome rearrangements can, directly or indirectly, destabilize chromatin structure and contribute to the recruitment of additional repair factors and checkpoint proteins (Polo and Almouzni, 2007). As can be seen in Fig. 7, TcBDF2 levels increased after UV irradiation, reaching a peak at 18 h. In parallel, culture growth is arrested during the first 24 h after irradiation but continues normally after this delay.

Even if preliminary, TcBDF2 accumulation after UV irradiation and its ability to interact with acetylated histones support the

hypothesis that it could have a role in chromatin dynamics as a member of a chromatin remodelling complex. In fact, an atypical SWI/SNF-related protein, TbISWI, has already been described in *T. brucei* associated to Variant Surface Glycoprotein (VSG) expression site down-regulation (Hughes et al., 2007). This protein contains a SNF2-like ATPase and a Helicase-C domain, but lacks the bromodomain present in typical SWI/SNF proteins from yeasts and mammals. Whether TcBDF2 is associated in a complex with the TbISWI ortholog or any other SWI/SNF2-related protein is an interesting possibility to be explored in the future.

The functionality of histone modifications has already been documented in several protists, in most cases associated with gene expression. Striking correlations between histone modifications and transcription have been reported for both *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. (Freitas-Junior et al., 2005; Saksouk et al., 2005; Sullivan et al., 2006; Chookajorn et al., 2007; Gissot et al.,

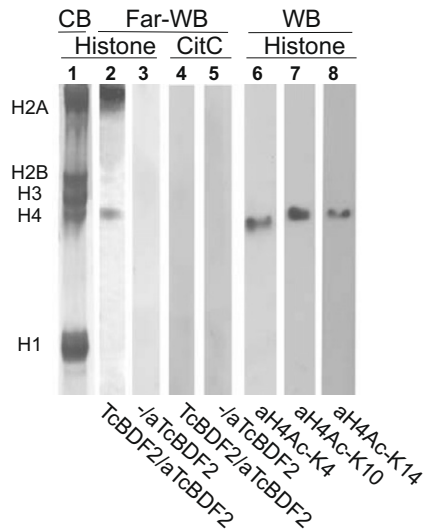


Fig. 5. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) interacts with histone H4. TcBDF2 in vitro interaction with *T. cruzi* purified histones probed by far-Western blot. Nitrocellulose membranes containing *T. cruzi* histones (lanes 2, 3, 6, 7 and 8) or Cytochrome C (lanes 4 and 5) fractionated in Triton Acid Urea- PAGE (TAU-PAGE) were incubated with His-tagged recombinant TcBDF2 (lanes 2 and 4) or blocking buffer as control (lanes 3 and 5), washed extensively, and bounded protein detected by purified aTcBDF2, followed by anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase. H4 acetylated at different positions were identified with specific rabbit antibodies: aH4Ac-K4 (lane 6), aH4Ac-K10 (lane 7) and aH4Ac-K14 (lane 8), followed by anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase. Coomassie-blue stained TAU-PAGE fractionated histones are shown in lane 1.

2007). In *T. brucei*, histone modifications have been shown to be involved in regulation of RNA polymerase I-transcribed VSG (Figueiredo et al., 2008; Kawahara et al., 2008) and potential implications of histone modifications in transcriptional regulation have also been proposed for *T. cruzi* (Respuela et al., 2008). No data concerning the proteins or complexes that sense chemical modifications in histones is available to date. Those are probably the real effectors of the pathways in any of the cases mentioned previously.

We believe the results presented herein characterize the first trypanosomal protein able to interact with acetylated histones, probably implicated in chromatin remodelling as part of a larger protein complex. In other organisms, this kind of complexes has a broad range of functions participating in genome expression, maintenance and duplication. Although more results are needed to understand the role of TcBDF2 in trypanosomes biology, our work provides some knowledge in understanding the essential processes of *T. cruzi*.

Acknowledgments

E.S. is a carrier member and G.V.V and P.C. are fellows of the National Research Council (CONICET), Argentina. This work was funded by ANPCyT PICT R 300, CONICET PIP 5492. S.S. and S.C.N are supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. This work was also partially supported by PROSUL-CNPq. We thank the reviewers for their helpful suggestions.

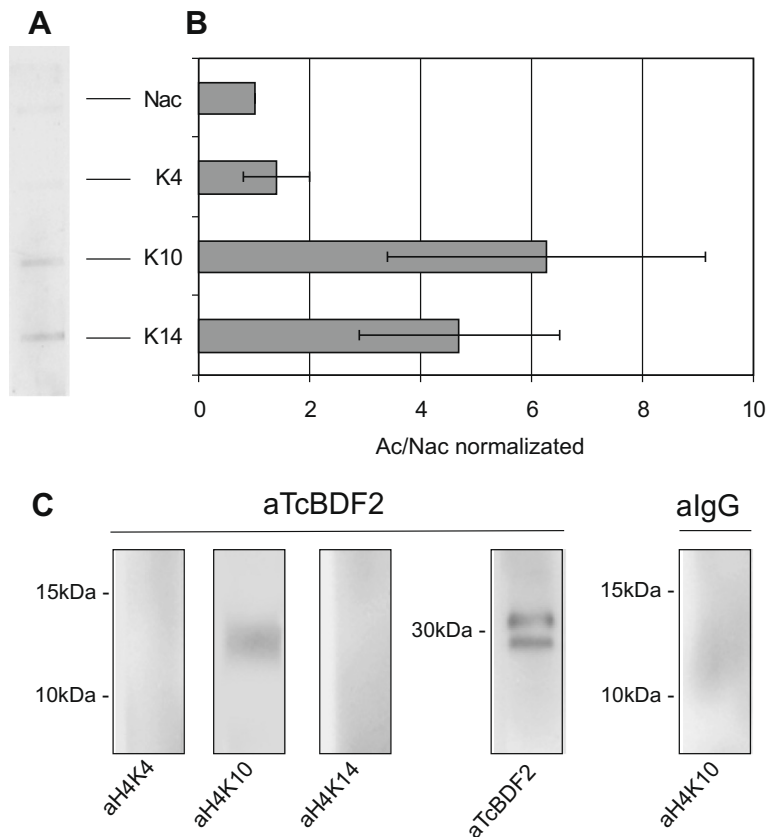


Fig. 6. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) interacts preferentially with histone H4 acetylated at position 10 in vitro and in vivo. (A) Peptides derived from an histone H4 sequence containing non-acetylated lysine (Nac), Ac-K4, Ac-K10 and Ac-K14 (see Section 2) were blotted on a nitrocellulose membrane, incubated with His-tagged recombinant TcBDF2, washed extensively and revealed with aTcBDF2. (B) Slot far blots signals were quantified by densitometry and normalized using the interaction with non-acetylated peptide as a reference. Bars indicate means \pm S.D. from results of three experiments. (C) TcBDF2 association with chromosomal H4 was examined by immunoprecipitation. Proteins recovered by aTcBDF2 or algG immunoprecipitation were resolved by SDS-PAGE and examined by immunoblotting with antibodies specific for each H4 acetylation or TcBDF2.

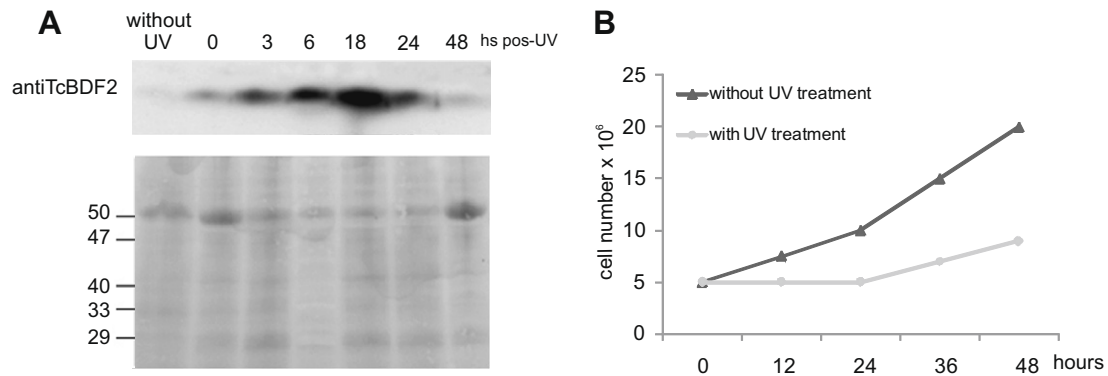


Fig. 7. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (TcBDF2) is accumulated after UV irradiation. (A) Western blot using purified anti-TcBDF2 against *T. cruzi* nuclear extracts of parasites without UV treatment (control) or after 0, 3, 6, 18, 24 and 48 h of UV irradiation. Ponceau S stained membrane is shown. (B) Irradiated and control parasite growth curves.

References

- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6, 93–100.
- Chandy, M., Gutiérrez, J.L., Prochasson, P., Workman, J.L., 2006. SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot. Cell* 5, 1738–1747.
- Chookajorn, T., Dzikiowski, R., Frank, M., Li, F., Jiwani, A.Z., Hartl, D.L., Deitsch, K.W., 2007. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 899–902.
- Contreras, V.T., Araujo-Jorge, T.C., Bonaldo, M.C., Thomaz, N., Barbosa, H.S., Meirelles, M.N., Goldenberg, S., 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 123–133.
- da Cunha, J.P., Nakayasu, E.S., de Almeida, I.C., Schenkman, S., 2006. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150, 268–277.
- De la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, A., Martinez-Balbás, M.A., 2005. Do protein motifs read the histone code? *BioEssays* 27, 164–175.
- Felsenfeld, G., Groudine, M., 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Figueiredo, L.M., Janzen, C.J., Cross, G.A., 2008. A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biol.* 6, e161.
- Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 121, 25–36.
- Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I., Toro, G.C., 1998. Histone genes in *Trypanosomatids*. *Parasitol. Today* 14, 64–70.
- Gissot, M., Kelly, K.A., Ajioka, J.W., Greally, J.M., Kim, K., 2007. Epigenomic modifications predict active promoters and gene structure in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, e77.
- Green, C.M., Almouzni, G., 2002. When repair meets chromatin: first in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3, 28–33.
- Hassan, A.H., Awad, S., Al-Natour, Z., Othman, S., Mustafa, F., Rizvi, T.A., 2007. Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem. J.* 402, 125–133.
- Hughes, K., Wand, M., Foulston, L., Young, R., Harley, K., Terry, S., Ersfeld, K., Rudenko, G., 2007. A novel ISWI is involved in VSG expression site downregulation in African trypanosomes. *EMBO J.* 26, 2400–2410.
- Ingram, A.K., Horn, D., 2002. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. *Mol. Microbiol.* 45, 89–97.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, Jm, Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunderson, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436–442.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., Tjian, R., 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288, 1422–1425.
- Janzen, C.J., Fernandez, J.P., Deng, H., Diaz, R., Hake, S.B., Cross, G.A., 2006. Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 580, 2306–2310.
- Kawahara, T., Siegel, T.N., Ingram, A.K., Alsford, S., Cross, G.A., Horn, D., 2008. Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* 69, 1054–1068.
- Lowell, J.E., Cross, G.A., 2004. A variant histone H3 is enriched at telomeres in *Trypanosoma brucei*. *Cell Sci.* 117, 5937–5947.
- Lowell, J.E., Kaiser, F., Janzen, C.J., Cross, G.A., 2005. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 118, 5721–5730.
- Mandava, V., Janzen, C.J., Cross, G.A., 2008. Trypanosome H2Bv replaces H2B in nucleosomes enriched for H3 K4 and K76 trimethylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 846–851.
- Marquez Porto, R.M., Amino, R., Elias, M.C., Faria, M., Schenkman, S., 2002. Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 265–271.
- Matangkasombut, O., Buratowski, R.M., Swilling, N.W., Buratowski, S., 2000. Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* 14, 951–962.
- Polo, S., Almouzni, G., 2007. DNA damage leaves its mark on chromatin. *Cell Cycle* 6, 2355–2359.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Åslund, L., 2008. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 283, 15884–15892.
- Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., Sullivan Jr., W.J., Cesbron-Delauw, M.F., Hakimi, M.A., 2005. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10301–10314.
- Schwabish, M.A., Struhl, K., 2007. The Swi/Snf complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6987–6995.
- Siegel, T.N., Kawahara, T., Degrasse, J.A., Janzen, C.J., Horn, D., Cross, G.A., 2008. Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 67, 762–771.
- Smerdon, M.J., 1991. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 422–428.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Sullivan Jr., W.J., Naguleswaran, A., Angel, S.O., 2006. Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* 8, 1850–1861.
- Thatcher, T.H., Gorovsky, M.A., 1994. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. *Nucleic Acids Res.* 22, 174–179.
- Tonelli, R.R., Silber, A.M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I.Y., Colli, W., Alves, M.J., 2004. L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 6, 733–741.
- Toro, G.C., Galanti, N., 1988. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Cell Res.* 174, 16–24.
- Toro, G.C., Galanti, N., 1990. *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. *Biochem. Int.* 21, 481–490.
- Workman, J.L., Kingston, R.E., 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545–579.
- Wu, J., Grunstein, M., 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* 25, 619–623.
- Zeng, L., Zhou, M.M., 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513, 124–128.

DISCUSSÃO GERAL

Nessa tese, mostramos que as acetilações encontradas na histona H4 de *T. cruzi* apresentam localização diferenciada e estão associadas a funções aparentemente distintas durante o ciclo de vida, ciclo celular e em quando os parasitas são submetidos a agentes genotóxicos. Na tabela I e II resumizamos os resultados obtidos quando foram analisadas as variações dos níveis de acetilação. Na tabela II resumizamos os resultados obtidos quando os mutantes foram analisados.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos utilizando anticorpos específicos para as histonas acetiladas em K4, K10 e K14.

Modificações	H4K4ac	H4K10ac	H4K14ac
Localização	Heterocromatina	Eucromatina/ Interface	Eucromatina/ Interface
Ciclo de vida	↓ tripomastigota	ND	ND
Ciclo celular	ND	ND	↑ G2/M
Colocalização RNA Pol II	ND	ND	ND
Radiação γ	↓ 12 h	↑ 24 h	↑ 24 h
Colocalização TcRad51	Parcial	+	Parcial
Interação TcBDF2	ND	+	+

ND (não detectada) indicam não haver alteração. O símbolo (↓) indica diminuição, (↑) aumento e (+) mais detectada nos tempos, fase do ciclo nas formas amastigotas, ou estágio do parasita.

Mutantes	H4K4R	H4K10R	H4K14R
Localização	Alterada	ND	Alterada
Crescimento	ND	ND	↓
Ciclo celular	↑ Citocinese	ND	↑ Mitose ↑ Citocinese
Radiação γ	ND	↑ Sensibilidade	↑ Sensibilidade

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos utilizando parasitas cujas lisinas acetiladas nas posições 4, 10 e 14 foram substituídas pelo aminoácido arginina (H4K4R, H4K10R e H4K14R). ND (não detectada) indicam não haver alteração. O símbolo (↓) indica diminuição e (↑) aumento no crescimento, fases do ciclo celular ou após exposição a radiação γ .

Acetilação de H4 e deposição nos nucleossomos

Baseado nos dados de espectrometria de massas e immunoblots foi verificado que a acetilação na lisina 4 é a mais abundante em tripanossomas ocorrendo em até 80% das histonas H4 (da Cunha et al., 2006; Janzen et al., 2006a). Assim, essa acetilação é detectada principalmente nas regiões de cromatina que se encontram mais compactadas, conhecidas por conter genes transcricionalmente silenciados e histonas hipoacetiladas (Sarma e Reinberg, 2005). Quando analisados por microscopia de fluorescência, observamos que a maioria das células apresentam marcação mais intensa na periferia, local onde está concentrada a heterocromatina em células em G1, embora a marcação ocorra em todo o compartimento nuclear. Desta forma é provável que a acetilação em K4 seja distribuída igualmente por todo o DNA, sendo aparentemente mais abundante na periferia nuclear, região que deve concentrar mais DNA. Por outro lado, mostramos nesta tese que as acetilações nas lisinas 10 e 14 que são menos abundantes em *T. cruzi* (da Cunha et al., 2006), ocorrendo, por exemplo, em cerca de 1% das histonas de *T. brucei* (Mandava et al.,

2007) estão localizadas em regiões de cromatina menos densa, principalmente nas regiões de interface, entre a cromatina mais compactada e a menos compactada (Figura 2, capítulo 1). Esses resultados indicam haver uma função diferenciada para essas histonas em *T. cruzi*.

A acetilação em K5 e K12 (que correspondente a K4ac e K10ac em *T. cruzi*) são bem conservadas em eucariotos e ocorrem em histonas recém sintetizadas ainda no citoplasma. Elas têm sido relacionadas ao processo de importação nuclear e deposição nos nucleossomos de forma acoplado à replicação do DNA, uma vez que são desacetiladas 20-60 minutos após o término da replicação (Taddei et al., 1999). Quando estas lisinas são substituídas por alaninas em leveduras, deixam de ser importadas para o núcleo. No entanto, quando as lisinas são substituídas por argininas, as histonas são importados, indicando a importância da carga positiva na porção N-terminal da histona H4, mas não da presença de lisinas acetiladas (Glowczewski et al., 2004). Defeitos na importação nuclear também foram observados quando as lisinas 5, 8 e 12 foram substituídas por glutamina e não por arginina, corroborando esses dados (Blackwell, Jr. et al., 2007). Nesse trabalho, os autores sugerem que o reconhecimento por parte das importinas ocorre antes da acetilação em K5 e K12 e só então a HAT e Asf1 se ligam ao complexo, sendo responsáveis pela acetilação e pelo transporte ao núcleo, respectivamente.

Qual seria então a importância da acetilação em K5 e K12? Alguns autores especulam que a presença dessas acetilações favoreça a presença de maquinarias de reparo para corrigir eventuais danos durante a replicação, ou ainda que a presença dessas acetilações estabilize a forquilha de replicação (Barman et al., 2006; Groth et al., 2007), mas, é fato que a função da acetilação em K5 e K12 durante a replicação permanece em questão.

Em *T. cruzi* a relação de H4ac com os processos biológicos também podem ser especulados. Primeiramente, os nossos dados mostrando que histonas que tiveram as lisinas 4, 10 e 14 substituídas separadamente por argininas continuaram a ser

importadas para o núcleo do parasita, estão de acordo com o observado em leveduras (Blackwell, Jr. et al., 2007; Glowczewski et al., 2004) (Figuras 6-9, capítulo 2). No entanto a localização das histonas substituídas por argininas, principalmente a H4K4R não foi a mesma observada para histonas H4 endógenas. Enquanto que a H4K10 endógena e modificada parece apresentar localização similar, H4K4R e H4K14R apresentaram notáveis diferenças (Figura 10, capítulo 2). H4K4ac é detectada principalmente na periferia do núcleo onde estaria a heterocromatina. Quando modificada na posição 4 elas são depositadas no interior nuclear. Para H4K14, a diferença observada é mais sutil; tanto a mutada quanto a endógena localizam-se distribuídas no núcleo, porém em sítios aparentemente distintos (Figura 10, capítulo 2). Isto mostra que estas modificações têm um papel importante na distribuição das histonas nos cromossomos.

Quando estudamos o papel destas modificações no processo de replicação nesse parasita, verificamos que nas formas replicativas (epimastigotas e amastigotas), existe uma coincidência entre a localização de H4K4ac com a heterocromatina na periferia nuclear, local onde ocorre a replicação nesse parasita (Elias et al., 2001). No entanto, como mencionado anteriormente, H4K4ac é bastante abundante, estando igualmente distribuída em toda cromatina. Ensaios de sincronização com hidroxauréia, mostraram um aumento nos níveis de acetilação em K4 após a fase S, tal como ocorre nos demais eucariotos (Figura 6- capítulo 1). O mesmo foi observado para *T. brucei*, mas ao contrário dos demais organismos, em tripanossomatídeos esse enriquecimento em K4ac parece ser após o término da fase S, ocorrendo quando as histonas já estejam na cromatina. De fato as três acetiltransferases caracterizadas até o momento em *T. brucei*, apresentaram localização nuclear e nenhuma HAT do tipo B (acetiltransferases citoplasmáticas) foi identificada no genoma de *T. brucei* (Berriman et al., 2005; Kawahara et al., 2008). Em *T. cruzi*, até o momento, as acetiltransferases não foram caracterizadas e, portanto não há evidências de possíveis HATs do tipo B. Todavia, a existência de uma possível relação entre a acetilação de

K4 e a deposição no DNA recém sintetizado não deve ser descartado, mas deve ser mais bem estudado.

É importante lembrar que após a sincronização com hidroxiuréia há um aumento também de K10 e K14 após a fase S, o que é diferente do encontrado em outros organismos eucariotos (Sobel et al., 1995) (Figura 6- capítulo 1). No entanto, não se pode excluir o fato de que a hidroxiuréia, pode causar danos de DNA, levando a um aumento indireto da acetilação decorrente da resposta ao dano de DNA conforme será discutido mais adiante.

Acetilação e ciclo de vida

Quando analisamos os níveis de acetilação na histona H4 nos diferentes estágios do parasita, verificamos que nas formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) não houve alteração para H4K4ac, enquanto que nos tripomastigotas os níveis dessa acetilação diminuíram significativamente relativos às outras modificações e a quantidade total de histona H4 (Figura 3, capítulo 1). Na forma tripomastigota não ocorre síntese de histona (Sabaj et al., 2001), o que descarta a possibilidade da histona H4 continuar sendo sintetizada, porém não acetilada. Uma das explicações para este fato, portanto, é ocorrer a desacetilação nessas formas. Em *T. brucei*, foram analisadas quatro desacetilases encontradas no genoma (DAC 1-4) e nenhuma desacetila H4K4ac nesses parasitas, indicando que essa acetilação em *T. brucei* é irreversível (Siegel et al., 2008). DAC 1 a 4 estão presentes no genoma de *T. cruzi* e são similares às encontradas em *T. brucei* (90%, 67%, 64% e 71% de identidade, respectivamente). É interessante destacar que durante a transformação de amastigotas, ou epimastigotas em tripomastigotas ocorre uma reorganização nuclear, onde o nucléolo torna-se difuso e a heterocromatina espalha-se por todo compartimento nuclear (Elias et al., 2001), o que poderia estar relacionada com a desacetilação de H4K4ac, o que não é observado em formas procíclicas e longas sanguíneas em *T. brucei*.

Em levedura, o espalhamento da heterocromatina tem sido associado com a perda da acetilação em K16 (Grunstein, 1998;Hecht et al., 1995). Especula-se que na presença de K16ac, Sir3 (*silent information regulator*) não possa ligar-se, impedindo o espalhamento da heterocromatina. No entanto, embora acetilação em K5 não esteja diretamente associada à ligação de Sir3, ela pode influenciar indiretamente essa ligação, uma vez que *in vitro* a ligação de Sir3 em K16 somente é abolida se juntamente com essa modificação forem substituídos os sítios K5 e K12 (Hecht et al., 1995), sugerindo o possível envolvimento da acetilação em H4K5ac na manutenção da heterocromatina. Seria interessante, nesse momento, verificar se o mutante gerado em *T. cruzi* para essa acetilação seria capaz de se diferenciar das formas replicativas para as formas infectivas do parasita e se caso continue a se diferenciar, como seria a sua organização nuclear. Na figura 1D está esquematizado como estariam distribuídas estas modificações durante o ciclo de vida de *T. cruzi*.

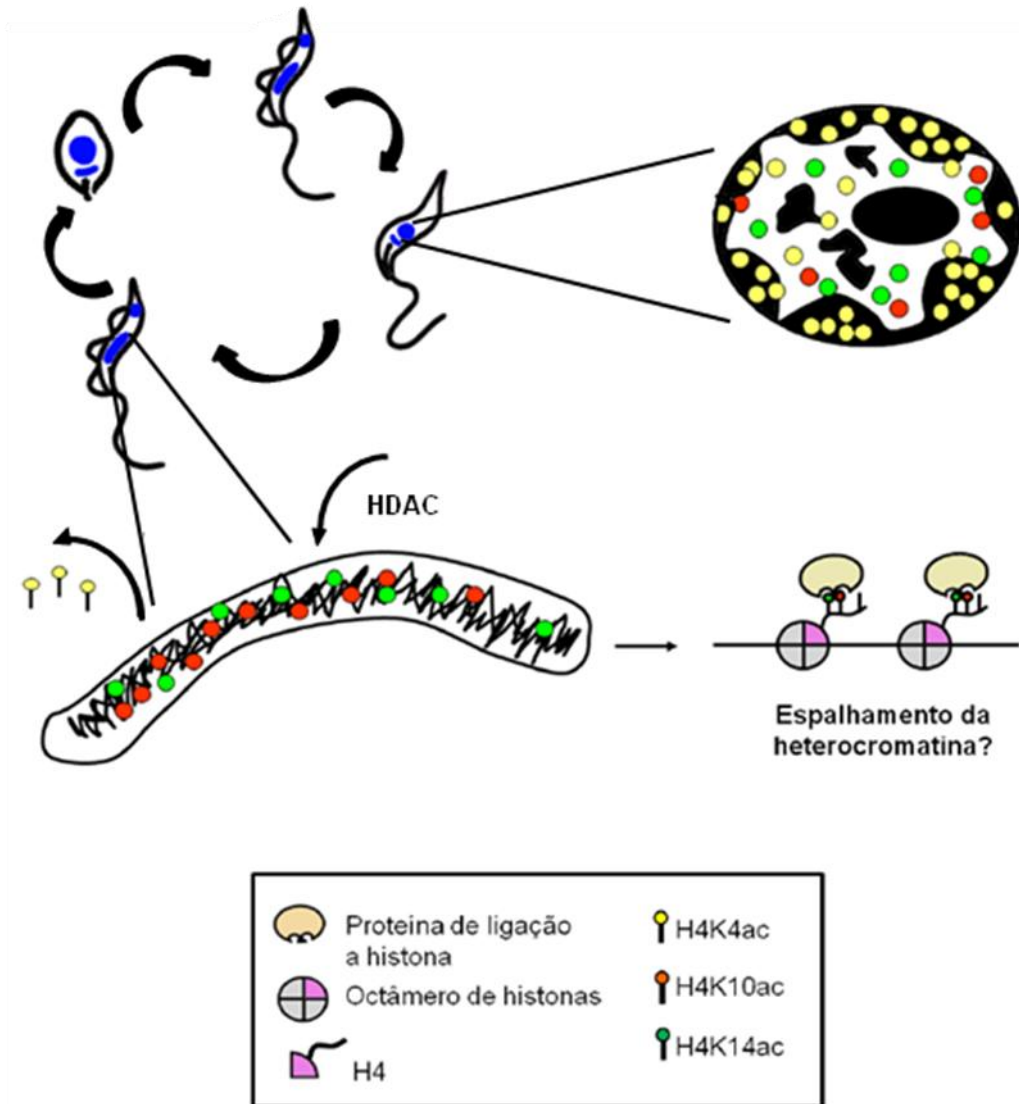


Figura D1: Esquema mostrando a relação entre os níveis de acetilação da histona H4 e o ciclo de vida do *T. cruzi*. Nesse esquema está representado o núcleo de formas epimastigotas e tripomastigotas onde estão indicadas as acetilações. Durante o ciclo de vida, o núcleo reorganiza-se. Em epimastigotas observa-se um grande nucléolo com a heterocromatina localizada preferencialmente na periferia do núcleo, onde se nota uma maior concentração de H4K4ac (amarelo). Nas formas tripomastigotas, o núcleo torna-se alongado, o nucléolo se difunde e a heterocromatina encontra-se dispersa pelo núcleo. Nessa forma observamos a diminuição de H4K4ac, decorrente provavelmente da ação de uma desacetilase. A perda dessa acetilação pode favorecer a ligação de proteínas, tais como a Sir3 de levedura, que contribui para o espalhamento da heterocromatina.

Acetilação e ciclo celular

Em levedura, a correta acetilação de H4 influencia a progressão do ciclo celular. A deleção de Esa1, uma acetiltransferase de H4, leva a um bloqueio em G2/M após a replicação do DNA (Clarke et al., 1999). Em leveduras, o papel das acetilações no N-terminal da histona H4 parece ser redundante, pois a adição de uma única lisina nessa região contendo as quatro lisinas modificadas restaura o defeito no ciclo celular (Megee et al., 1995). Já em mamíferos, acetilação da histona H4 parece funcionar como uma marca epigenética para genes que devem ser ativados após a divisão (Valls et al., 2005).

Em *T. brucei*, existem algumas evidências do envolvimento da acetilação com o ciclo celular. O nocaute da desacetilase DAC-4 aumenta o número de células na fase G2-tardia (Ingram e Horn, 2002). Células nocautes para HAT-1 mostram ainda avanço preliminar para mitose, sem a completa replicação do DNA (Kawahara et al., 2008). Vale destacar, que provavelmente é esta acetiltransferase que responsável pela acetilação de K14, uma vez que já está descrito que HAT-2 acetila K10 e HAT-3 acetila K4 nesse parasita (Kawahara et al., 2008; Siegel et al., 2008).

Em *T. cruzi*, os mecanismos de controle de ciclo celular são pouco conhecidos. Duas quinases (TzCRK1 e 3), três ciclinas (TzCYC 4, 5 e 6) e uma subunidade da proteína reguladora de ciclina/CDK foram descritas (Gomez et al., 1998; Gomez et al., 2001; Munoz et al., 2006; Santori et al., 2002). Quando analisamos os níveis de acetilação em parasitas em diferentes fases do ciclo celular, observamos um aumento de 50% de marcação com anti H4K14ac em células em G2/M, indicando um possível envolvimento na divisão em *T. cruzi* (Figura 5, capítulo 1). Quando a lisina 14 foi substituída, os parasitas apresentaram diminuição no crescimento, acompanhado de aumento de 5 vezes na quantidade de parasitas em mitose e o dobro de parasitas em citocinese (Figura 12, capítulo 2). Estes dados e o acúmulo de células em mitose nos mutantes indicam algumas possibilidades, como representado na figura 2D:

(A) H4K14ac pode modular a transcrição de genes importantes para progressão da mitose. Essa hipótese é pouco provável, uma vez que em eucariotos em geral, a mitose é caracterizada pela repressão da transcrição e dissociação da RNA polimerase II (Kruhlak et al., 2001). Em tripanossomatídeos não há evidências de ocorrer transcrição durante a mitose, mas de qualquer forma, H4K14ac poderia atuar como um marcador epigenético para genes que devem ser transcritos logo após a divisão, como ocorre em células de mamíferos com H4K12ac e acetilação na histona H3 (Valls et al., 2005).

(B) H4K14ac pode agir na segregação dos cromossomos durante a mitose. Em tripanossomatídeos, a cromatina não se condensa em cromossomos visíveis durante a mitose e a membrana nuclear permanece intacta durante esse processo (Vickerman e Preston, 1970). Todavia, a segregação dos cromossomos, ao menos em *T. brucei*, parece ter algumas similaridades com eucariotos superiores. No início da mitose, os telômeros se concentram no centro do núcleo, semelhante à metáfase nos demais eucariotos que em seguida migram para os pólos nucleares (Ogbadoyi et al., 2000). Além disso, a variante H3v colocaliza com o fuso mitótico e está enriquecida em telômeros nesse parasita (Lowell e Cross, 2004). H4K14ac pode promover a segregação dos cromossomos de *T. cruzi*, através da ligação de fatores que favoreçam essa função e sua ausência poderia assim explicar o retardo observado na progressão da mitose nos parasitas mutantes.

(C) H4K14ac pode atuar na sinalização para fatores que permitam uma maior condensação durante a mitose e quando em menores proporções, assim como mencionado anteriormente, poderia retardar a duração da mitose.

Qualquer uma dessas hipóteses explicaria haver uma falha na progressão do ciclo celular, devido ao maior tempo para conclusão dessa fase, podendo explicar a diminuição no crescimento para mutantes em H4K14R.

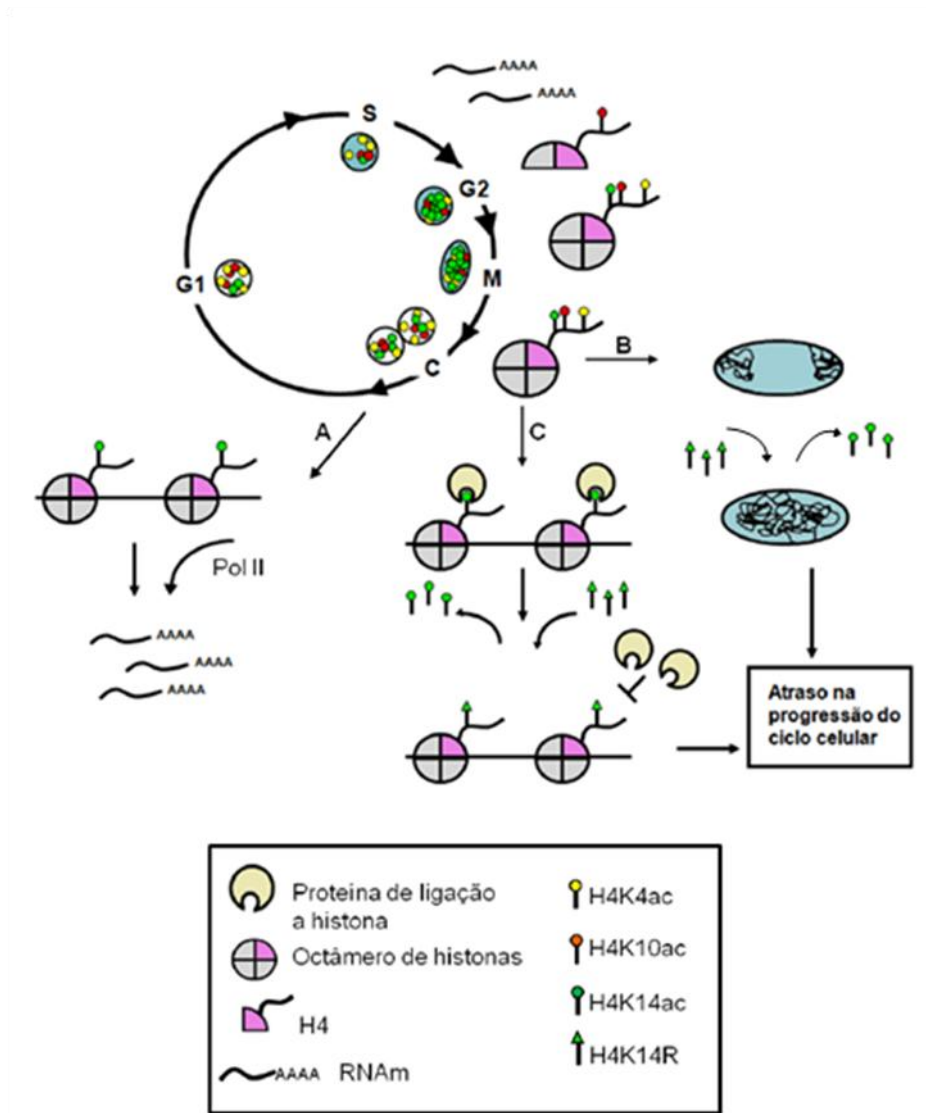


Figura D2: Papel das modificações no ciclo de divisão celular. Durante a fase S, as histonas são sintetizadas. De acordo com os resultados obtidos após sincronização com HU, K10 da histona H4 é acetilada ainda na fase S, enquanto K4 e K14 são acetiladas após o término dessa fase. No centro do ciclo estão representadas as acetilações encontradas nos núcleos onde se nota uma maior marcação com H4K14ac em células em G2/M do ciclo celular. Essa acetilação pode estar envolvida com: (A) marcação de genes que devem ser transcritos após a mitose; (B) segregação de cromossomos, atuando no recrutamento de fatores protéicos importantes para a ocorrência da mitose. A ausência de H4K14ac pode afetar esses eventos, resultando em acúmulo de células em mitose, e conseqüentemente em um atraso na progressão do ciclo celular.

Acetilação e reparo de DNA

Durante o dano de DNA causado por radiação ionizante, os níveis de H4K4ac diminuem (12 h), enquanto H4K10ac e H4K14ac aumentam após radiação γ , atingindo níveis máximos 24 a 48 h (Figura 8, capítulo 1), período em que ocorre o a maior parted do reparo do DNA em *T. cruzi* (Regis-da-Silva et al., 2006), sugerindo o envolvimento dessas modificações no processo de reparo. Essas diferenças nos níveis de acetilação na histona H4 vêm acompanhadas da desorganização da heterocromatina (Figura 8, capítulo 1). Sendo assim, uma possibilidade para a diminuição nos níveis de H4K4ac após a radiação seria que devido às quebras do DNA haveria um maior acesso de desacetilases às regiões do DNA antes compactadas, ocasionando a desacetilação geral observada. Este fato apóia a idéia de que a acetilação de H4K4 seja reversível. Por outro lado, é também possível que durante as quebras de DNA a histona H4 seja sintetizada e incorporada à cromatina sem ter sido ainda acetilada. A acetilação ocorreria mais tarde após a re-entrada no ciclo celular.

A radiação γ causando quebra da dupla fita de DNA, deve estar sendo reparada por recombinação homóloga uma vez que enzimas de reparo pela junção de extremidades não homólogas (NHEJ) não está presente em *T. cruzi* (El Sayed et al., 2005). Os nossos dados mostrando que a super-expressão da proteína TcRad51, envolvida no reparo por HR (Regis-da-Silva et al., 2006) aumenta os níveis de H4K10 e H4K14 enquanto H4K4ac permanece constante, sugere haver um envolvimento das primeiras modificações com o reparo por recombinação homóloga (Figura 1, capítulo 2). Em ensaios preliminares observamos também que os mutantes H4K10R e H4K14R são mais sensíveis a radiação γ , apresentando taxa muito aumentada de mortalidade nas primeiras 24 h após a radiação (Figura 13, capítulo 2).

Em levedura, das quatro lisinas acetiladas na porção N-terminal (K5, K8, K12 e K16), a ausência de K5ac e K12ac praticamente não afetam o reparo de DNA,

enquanto que K8ac e principalmente K16ac aumentam a sensibilidade dos mutantes ao dano causado por camptotecina (Bird et al., 2002). No entanto, após a adição de uma única lisina disposta aleatoriamente na sequência, o fenótipo de sensibilidade é restaurado, indicando a redundância dessas acetilações em levedura (Bird et al., 2002). Para verificar se a mesma redundância ocorre em *T. cruzi*, seria necessário observar os efeitos causados em um duplo mutante ou triplo mutante para essas acetilações.

Em todo caso, esses dados ressaltam o possível envolvimento de H4K10ac e H4K14ac com o reparo de DNA em *T. cruzi*, que poderia ocorrer de diferentes maneiras, como mostrado na figura 3D:

(A) através da modulação da cromatina, facilitando o acesso a maquinarias envolvidas no reparo de DNA, uma vez que a acetilação afeta a interação do nucleossomo com o DNA;

(B) H4K10ac e H4K14ac poderiam atuar como substrato para fatores de reconhecimento (proteínas que contém bromodomínio) que atuem no reparo ou na parada do ciclo celular. Nesse caso seria interessante verificar se o duplo mutante para H4K10ac e H4K14ac, devido à proximidade das duas acetilações, teria um efeito sinérgico na sensibilidade a radiação;

(C) H4K10ac e H4K14ac atuariam como a histona H2AX, uma vez que essa variante de histona não está presente nesses parasitas. A fosforilação dessa variante é fundamental no recrutamento de proteínas de reparo e de enzimas que permitem o relaxamento da cromatina nas regiões lesionadas (Celeste et al., 2003; Downs et al., 2004) e em sua ausência H4K10ac e/ou H4K14ac poderiam atuar como marcador de sítios lesionados. Vale ressaltar que H4K10ac apresenta localização semelhante a TcRad51 4 h após o dano, com colocalização nos pontos principais de enriquecimento (Figura 3, capítulo 2). Sendo assim é tentador sugerir que H4K10ac poderia atuar como marcador para regiões de DNA lesionado em *T. cruzi*, recrutando a maquinaria de reparo, fazendo o papel da variante H2AX nesse parasita.

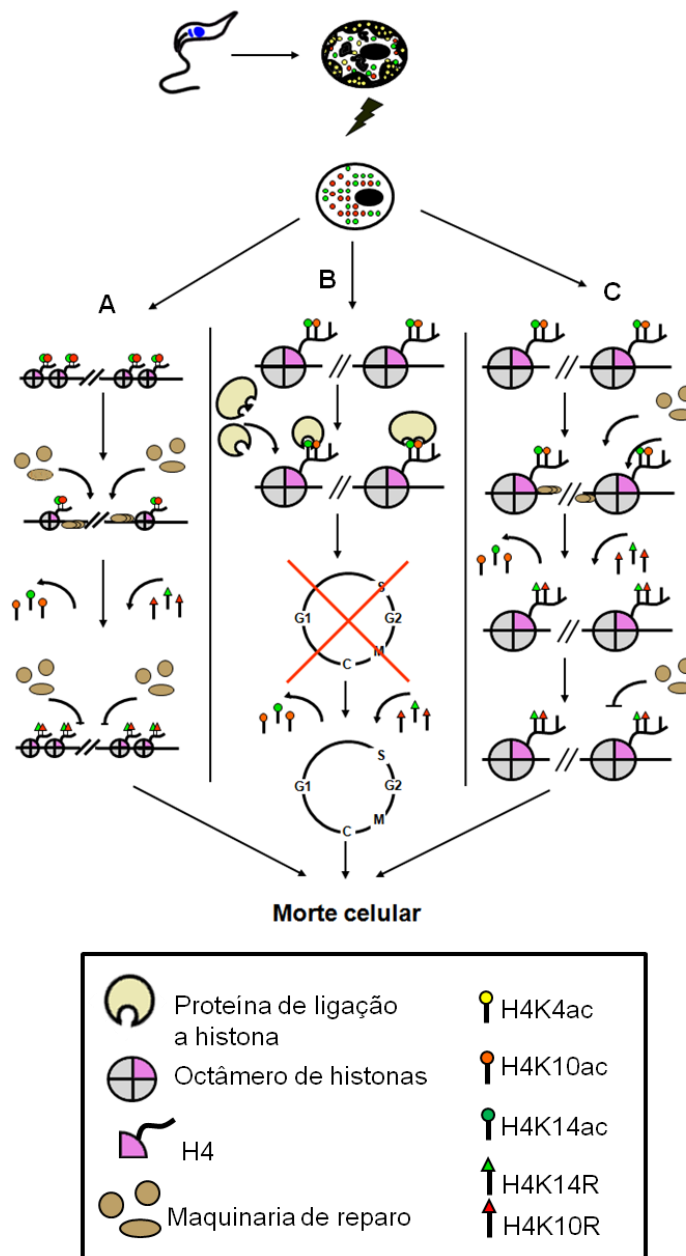


Figura D3: Variação dos níveis de acetilação da histona H4 após o dano causado por radiação γ . Após 24 h a heterocromatina desaparece e ocorre aumento de H4K10ac e H4K14ac. Pelo menos três hipóteses podem ser formuladas para explicar separadamente ou de forma conjunta os dados obtidos: (A) o aumento dessas acetilações pode estar relacionado com a descompactação da cromatina, favorecendo o acesso da maquinaria de reparo, ou outros fatores que se ligam ao DNA ou às histonas, (B) proteínas que contêm bromodomínio podem atuar no bloqueio do ciclo celular, até que ocorra o correto reparo de DNA, (C) ou podem funcionar como marcador de sítios lesionados, recrutando a maquinaria de reparo (C). Nos três casos, a ausência dessas modificações causa maior sensibilidade ao dano, podendo resultar em morte celular, como observado com os mutantes H4K10R e H4K14R.

Acetilação e transcrição

Acetilações nas histonas são comumente associadas ao processo da transcrição, seja pela neutralização das cargas positivas das lisinas, o que permite o estado mais relaxado da cromatina e conseqüentemente a ligação de fatores necessários para haver a transcrição. As modificações também funcionam como sítios de ligação de proteínas reguladoras da transcrição através dos seus bromodomínios (Kouzarides, 2007). Os nossos resultados mostraram que as acetilações não estão enriquecidas nos sítios onde estaria havendo transcrição usando anticorpos que reconhecem a porção C-terminal da RNA polimerase II, tanto ativa, quanto inativa (Figura 7, capítulo 1). Observamos que não há colocalização de nenhuma das acetilações com a região de transcrição dos genes do SL, que corresponde ao ponto principal de marcação pela RNA pol II (Dossin e Schenkman, 2005). O mesmo foi observado utilizando ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) quando nenhuma modificação foi encontrada na região promotora do locus dos genes SL (Siegel et al., 2009). Os demais pontos de marcação observados em nosso ensaio de colocalização correspondem em sua maioria a etapas de alongação da transcrição e, portanto não podemos descartar enriquecimento das acetilações nos prováveis sítios de início da transcrição, como observado em *T. brucei* (Siegel et al., 2009). Ensaios de ChIP mostraram o enriquecimento de acetilações nas regiões onde as fases de leitura dos cromossomos são divergente, possivelmente os sítios onde ocorreria o início de transcrição em *T. cruzi* (Respuela et al., 2008). No entanto, nesse trabalho foram utilizados anticorpos comerciais, sem precisar com clareza quais modificações estariam de fato enriquecidas. Nossos ensaios de incorporação de BrUTP em células permeabilizadas mostraram haver uma colocalização parcial com a H4K14Ac. Além de identificar as histonas modificadas enriquecidas nos prováveis sítios de início da transcrição utilizando técnicas de ChIP seguida de seqüenciamento, Siegel e cols mostraram em *T. brucei* que H4K10ac se associa com a proteína que contém bromodomínio TbBDF3 também em prováveis sítios de início da transcrição (Siegel et

al., 2009). No capítulo 3 dessa tese, mostramos a interação de TcBDF2 com H4 acetilada, principalmente H4K10ac (Figura 4 e 6, capítulo 3) (Villanova et al., 2009). Embora a colocalização de H4K10ac com regiões de transcrição não tenha sido observada, é possível que a TcBDF2, esteja relacionada com o processo de transcrição, como ocorre com diversas proteínas que apresentam bromodomínio e atuam como ativadores transcricionais, como as HATs GCN5, ou os ativadores transcricionais de mamífero PCAF e TAFII250 (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000). Esta possibilidade deverá ser averiguada no futuro.

A TcBDF2 também mostrou-se aumentada após exposição a luz UV (Figura 7, capítulo 3) (Villanova et al., 2009), embora não tenhamos observado aumento de H4K10ac nessa via de reparo por excisão de bases (da Cunha, 2007). É possível, contudo que o reparo por excisão de bases ocorra muito rapidamente e não tenhamos conseguido detectar aumento de H4K10. Neste sentido, o uso dos mutantes K10R poderia no futuro esclarecer se a modificação na lisina 10 teria um papel analisando a sensibilidade à luz UV. Além da interação com H4, TcBDF2 parece interagir com H2A em *T. cruzi* (Figura 5, capítulo 3), que embora não tenha sido analisada nesse parasita, mostra-se acetilada em diferentes resíduos na porção C-terminal em *T. brucei* (Janzen et al., 2006a; Mandava et al., 2007). No futuro, seria interessante verificar o papel dessa interação em *T. cruzi*, bem como regiões de prováveis enriquecimentos para essas acetilações.

Ainda que mais experimentos sejam necessários para um maior entendimento das acetilações de histonas na biologia de *T. cruzi*, começamos a ter evidências sobre as possíveis funções das acetilações em alguns processos específicos do parasita. Em outros organismos, esse tipo de modificação participa de processos-chaves como organização da cromatina, regulando a expressão gênica e diferenciação celular. Uma melhor compreensão do envolvimento dessas modificações nesses processos auxiliará não só o entendimento da biologia molecular do parasita, mas poderia auxiliar no descobrimento de novos alvos quimioterápicos. Por exemplo, inibidores de enzimas

envolvidas na acetilação e metilação de histonas tem sido propostos como possíveis agentes quimioterápicos no tratamento de tumores (Lane e Chabner, 2009;Szyf, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad,K, S Henikoff, 2002, Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 99 Suppl 4, p. 16477-16484.

Alsford,S, D Horn, 2004, Trypanosomatid histones: Mol.Microbiol., v. 53, p. 365-372.

Alsford,S, T Kawahara, C Isamah, D Horn, 2007, A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation: Mol.Microbiol., v. 63, p. 724-736.

Astolfi,FS, d S Martins, E S Gander, 1980, On the chromatin structure of *Trypanosoma cruzi*: Mol.Biochem.Parasitol., v. 1, p. 45-53.

Ataian,Y, J E Krebs, 2006, Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair: Biochem.Cell Biol., v. 84, p. 490-504.

Augusto-Pinto,L, D C Bartholomeu, S M Teixeira, S D Pena, C R Machado, 2001, Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*: Gene, v. 272, p. 323-333.

Barman,HK, Y Takami, T Ono, H Nishijima, F Sanematsu, K Shibahara, T Nakayama, 2006, Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells: Biochem.Biophys.Res.Commun., v. 345, p. 1547-1557.

Berriman,M, E Ghedin, C Hertz-Fowler, G Blandin, H Renauld, D C Bartholomeu, N J Lennard, E Caler, N E Hamlin, B Haas, U Bohme, L Hannick, M A Aslett, J Shallom, L Marcello, L Hou, B Wickstead, U C Alsmark, C Arrowsmith, R J Atkin, A J Barron, F Bringaud, K Brooks, M Carrington, I Cherevach, T J Chillingworth, C Churcher, L N Clark, C H Corton, A Cronin, R M Davies, J Doggett, A Djikeng, T Feldblyum, M C Field, A Fraser, I Goodhead, Z Hance, D Harper, B R Harris, H Hauser, J Hostetler, A Ivens, K Jagels, D Johnson, J Johnson, K Jones, A X Kerhornou, H Koo, N Larke, S Landfear, C Larkin, V Leech, A Line, A Lord, A MacLeod, P J Mooney, S Moule, D M Martin, G W Morgan, K Mungall, H Norbertczak, D Ormond, G Pai, C S Peacock, J Peterson, M A Quail, E Rabbinowitsch, M A Rajandream, C Reitter, S L Salzberg, M Sanders, S Schobel, S Sharp, M Simmonds, A J Simpson, L Tallon, C M Turner, A Tait, A R Tivey, S Van Aken, D Walker, D Wanless, S Wang, B White, O White, S Whitehead, J Woodward, J Wortman, M D Adams, T M Embley, K Gull, E Ullu, J D Barry, A H Fairlamb, F Opperdoes, B G Barrell, J E Donelson, N Hall, C M Fraser, S E Melville, N M El Sayed, 2005, The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*: Science, v. 309, p. 416-422.

Bird,AW, D Y Yu, M G Pray-Grant, Q Qiu, K E Harmon, P C Megee, P A Grant, M M Smith, M F Christman, 2002, Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair: Nature, v. 419, p. 411-415.

Blackwell,JS, Jr., S T Wilkinson, N Mosammamarast, L F Pemberton, 2007, Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import: J.Biol.Chem., v. 282, p. 20142-20150.

Bonenfant,D, M Coulot, H Towbin, P Schindler, J van Oostrum, 2006, Characterization of histone H2A and H2B variants and their post-translational modifications by mass spectrometry: *Mol.Cell Proteomics.*, v. 5, p. 541-552.

Bradford,MM, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal.Biochem.*, v. 72, p. 248-254.

Brener,Z, 1973, Biology of *Trypanosoma cruzi*: *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 27, p. 347-382.

Bromley,EV, M C Taylor, S R Wilkinson, J M Kelly, 2004, The amino terminal domain of a novel WD repeat protein from *Trypanosoma cruzi* contains a non-canonical mitochondrial targeting signal: *Int.J.Parasitol.*, v. 34, p. 63-71.

Brownell,JE, J Zhou, T Ranalli, R Kobayashi, D G Edmondson, S Y Roth, C D Allis, 1996, *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation: *Cell*, v. 84, p. 843-851.

Bustin,M, F Catez, J H Lim, 2005, The dynamics of histone H1 function in chromatin: *Mol.Cell*, v. 17, p. 617-620.

Camargo,EP, 1964, Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media: *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 12, p. 93-100.

Celeste,A, O Fernandez-Capetillo, M J Kruhlak, D R Pilch, D W Staudt, A Lee, R F Bonner, W M Bonner, A Nussenzweig, 2003, Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks: *Nat.Cell Biol.*, v. 5, p. 675-679.

Chagas,C, 1909, Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218.

Clarke,AS, J E Lowell, S J Jacobson, L Pillus, 1999, Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, p. 2515-2526.

Coughlin,BC, S M Teixeira, L V Kirchhoff, J E Donelson, 2000, Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 12051-12060.

Coura,JR, J C Dias, 2009, Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 31-40.

D'Orso,I, A C Frasch, 2001, Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 15783-15793.

da Cunha,JP. Modificações pós traducionais nas histonas H1 e H4 de *Trypanosoma cruzi*: caracterização bioquímica e funcional no ciclo de vida, ciclo celular e dano ao DNA. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. 2007. 2007.
Thesis/Dissertation

da Cunha,JP, E S Nakayasu, I C de Almeida, S Schenkman, 2006, Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4: Mol.Biochem.Parasitol., v. 150, p. 268-277.

da Cunha,JP, E S Nakayasu, M C Elias, D C Pimenta, M T Tellez-Inon, F Rojas, M J Munoz, I C Almeida, S Schenkman, 2005, *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle: Mol.Biochem.Parasitol., v. 140, p. 75-86.

de Freitas,JM, L Augusto-Pinto, J R Pimenta, L Bastos-Rodrigues, V F Goncalves, S M Teixeira, E Chiari, A C Junqueira, O Fernandes, A M Macedo, C R Machado, S D Pena, 2006, Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*: PLoS.Pathog., v. 2, p. e24.

de Moura,MB, B L Chamber-Reis, D G Passos Silva, M A Rajao, A M Macedo, G R Franco, S D Pena, S M Teixeira, C R Machado, 2009, Cloning and characterization of DNA polymerase eta from *Trypanosoma cruzi*: roles for translesion bypass of oxidative damage: Environ.Mol.Mutagen., v. 50, p. 375-386.

de Souza,W, 2002, Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*: Curr.Pharm.Des, v. 8, p. 269-285.

de,IC, X, S Lois, S Sanchez-Molina, M A Martinez-Balbas, 2005, Do protein motifs read the histone code?: Bioessays, v. 27, p. 164-175.

Dhalluin,C, J E Carlson, L Zeng, C He, A K Aggarwal, M M Zhou, 1999, ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF: J.Biomol.NMR, v. 14, p. 291-292.

Dossin,FM, S Schenkman, 2005, Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*: Eukaryot.Cell, v. 4, p. 960-970.

Downs,JA, S Allard, O Jobin-Robitaille, A Javaheri, A Auger, N Bouchard, S J Kron, S P Jackson, J Cote, 2004, Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites: Mol.Cell, v. 16, p. 979-990.

Doyon,Y, C Cayrou, M Ullah, A J Landry, V Cote, W Selleck, W S Lane, S Tan, X J Yang, J Cote, 2006, ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation: Mol.Cell, v. 21, p. 51-64.

El Sayed,NM, P J Myler, D C Bartholomeu, D Nilsson, G Aggarwal, A N Tran, E Ghedin, E A Worthey, A L Delcher, G Blandin, S J Westenberger, E Caler, G C Cerqueira, C Branche, B Haas, A Anupama, E Arner, L Aslund, P Attipoe, E Bontempi, F Bringaud, P Burton, E Cadag, D A Campbell, M Carrington, J Crabtree, H Darban, J F da Silveira, P de Jong, K Edwards, P T Englund, G Fazelina, T Feldblyum, M Ferella, A C Frasch, K Gull, D Horn, L Hou, Y Huang, E Kindlund, M Klingbeil, S Kluge, H Koo, D Lacerda, M J Levin, H Lorenzi, T Louie, C R Machado, R McCulloch, A McKenna, Y Mizuno, J C Mottram, S Nelson, S Ochaya, K Osoegawa, G Pai, M Parsons, M Pentony, U Pettersson, M Pop, J L Ramirez, J Rinta, L Robertson, S L Salzberg, D O Sanchez, A Seyler, R Sharma, J Shetty, A J Simpson, E Sisk, M T Tammi, R Tarleton, S Teixeira, S Van Aken, C Vogt, P N Ward, B Wickstead, J Wortman, O White, C M Fraser, K D Stuart, B Andersson, 2005, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease: Science, v. 309, p. 409-415.

Elias,MC, J P da Cunha, F P de Faria, R A Mortara, E Freymuller, S Schenkman, 2007, Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle: Protist., v. 158, p. 147-157.

Elias,MC, R Marques-Porto, E Freymuller, S Schenkman, 2001, Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation: Mol.Biochem.Parasitol., v. 112, p. 79-90.

Escargueil,AE, D G Soares, M Salvador, A K Larsen, J A Henriques, 2008, What histone code for DNA repair?: Mutat.Res., v. 658, p. 259-270.

Fernandez Villamil,SH, R Baltanas, G D Alonso, S C Vilchez Larrea, H N Torres, M M Flawia, 2008, TcPARP: A DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*: Int.J.Parasitol., v. 38, p. 277-287.

Figueiredo,LM, G A Cross, C J Janzen, 2009, Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block: Nat.Rev.Microbiol., v. 7, p. 504-513.

Figueiredo,LM, C J Janzen, G A Cross, 2008, A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes: PLoS.Biol., v. 6, p. e161.

Fillingham,J, M C Keogh, N J Krogan, 2006, GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair: Biochem.Cell Biol., v. 84, p. 568-577.

Gale,M, Jr., V Carter, M Parsons, 1994, Translational control mediates the developmental regulation of the *Trypanosoma brucei* Nrk protein kinase: J.Biol.Chem., v. 269, p. 31659-31665.

Garcia-Salcedo,JA, P Gijon, D P Nolan, P Tebabi, E Pays, 2003, A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*: EMBO J., v. 22, p. 5851-5862.

Glowczewski,L, J H Waterborg, J G Berman, 2004, Yeast chromatin assembly complex 1 protein excludes nonacetylatable forms of histone H4 from chromatin and the nucleus: Mol.Cell Biol., v. 24, p. 10180-10192.

Godoy,PD, L A Nogueira-Junior, L S Paes, A Cornejo, R M Martins, A M Silber, S Schenkman, M C Elias, 2009, *Trypanosome* prereplication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of archaea: Eukaryot.Cell, v. 8, p. 1592-1603.

Gomez,EB, A R Kornblihtt, M T Tellez-Inon, 1998, Cloning of a *cdc2*-related protein kinase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with mammalian cyclins: Mol.Biochem.Parasitol., v. 91, p. 337-351.

Gomez,EB, M I Santori, S Laria, J C Engel, J Swindle, H Eisen, P Szankasi, M T Tellez-Inon, 2001, Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins: Mol.Biochem.Parasitol., v. 113, p. 97-108.

Gordon,F, K Luger, J C Hansen, 2005, The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays: J.Biol.Chem., v. 280, p. 33701-33706.

- Graziano,V, S E Gerchman, A J Wonacott, R M Sweet, J R Wells, S W White, V Ramakrishnan, 1990, Crystallization of the globular domain of histone H5: *J.Mol.Biol.*, v. 212, p. 253-257.
- Groth,A, A Corpet, A J Cook, D Roche, J Bartek, J Lukas, G Almouzni, 2007, Regulation of replication fork progression through histone supply and demand: *Science*, v. 318, p. 1928-1931.
- Grunstein,M, 1998, Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones: *Cell*, v. 93, p. 325-328.
- Gutiyama,LM, J P da Cunha, S Schenkman, 2008, Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis: *Eukaryot.Cell*, v. 7, p. 560-568.
- Hakem,R, 2008, DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly: *EMBO J.*, v. 27, p. 589-605.
- Hecht,A, T Laroche, S Strahl-Bolsinger, S M Gasser, M Grunstein, 1995, Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast: *Cell*, v. 80, p. 583-592.
- Hecker,H, E S Gander, 1985, The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes: *Biol.Cell*, v. 53, p. 199-208.
- Holetz,FB, A Correa, A R Avila, C V Nakamura, M A Krieger, S Goldenberg, 2007, Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 356, p. 1062-1067.
- Hong,L, G P Schroth, H R Matthews, P Yau, E M Bradbury, 1993, Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA: *J.Biol.Chem.*, v. 268, p. 305-314.
- Horn,D, 2007, Introducing histone modification in trypanosomes: *Trends Parasitol.*, v. 23, p. 239-242.
- Horn,PJ, C L Peterson, 2002, Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription: *Science*, v. 297, p. 1824-1827.
- Ingram,AK, D Horn, 2002, Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression: *Mol.Microbiol.*, v. 45, p. 89-97.
- Izzo,A, K Kamieniarz, R Schneider, 2008, The histone H1 family: specific members, specific functions?: *Biol.Chem.*, v. 389, p. 333-343.
- Jacobson,RH, A G Ladurner, D S King, R Tjian, 2000, Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module: *Science*, v. 288, p. 1422-1425.
- Janzen,CJ, J P Fernandez, H Deng, R Diaz, S B Hake, G A Cross, 2006a, Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*: *FEBS Lett.*, v. 580, p. 2306-2310.
- Janzen,CJ, S B Hake, J E Lowell, G A Cross, 2006b, Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*: *Mol.Cell*, v. 23, p. 497-507.

Jazayeri,A, A D McAinsh, S P Jackson, 2004, *Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 101, p. 1644-1649.

Kasinsky,HE, J D Lewis, J B Dacks, J Ausio, 2001, Origin of H1 linker histones: FASEB J., v. 15, p. 34-42.

Kawahara,T, T N Siegel, A K Ingram, S Alford, G A Cross, D Horn, 2008, Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes: Mol.Microbiol., v. 69, p. 1054-1068.

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

Koprinarova,MA, G C Russev, 2008, Dynamics of histone H4 acetylation during the cell cycle: Cell Cycle, v. 7, p. 414-416.

Kouzarides,T, 2007, Chromatin modifications and their function: Cell, v. 128, p. 693-705.

Kruhlak,MJ, M J Hendzel, W Fischle, N R Bertos, S Hameed, X J Yang, E Verdin, D P Bazett-Jones, 2001, Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin: J.Biol.Chem., v. 276, p. 38307-38319.

Ladomery,M, E Wade, J Sommerville, 1997, Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes: Nucleic Acids Res., v. 25, p. 965-973.

Laemmli,UK, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: Nature, v. 227, p. 680-685.

Landsman,D, 1996, Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved?: Trends Biochem.Sci., v. 21, p. 287-288.

Lane,AA, B A Chabner, 2009, Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: J.Clin.Oncol., v. 27, p. 5459-5468.

Lewdorowicz,M, Y Yoffe, J Zuberek, J Jemielity, J Stepinski, R Kierzek, R Stolarski, M Shapira, E Darzynkiewicz, 2004, Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure: RNA., v. 10, p. 1469-1478.

Lopes,DO, B L Chamber-Reis, C G Regis-da-Silva, M A Rajao, W D DaRocha, A M Macedo, G R Franco, S C Nardelli, S Schenkman, J S Hoffmann, C Cazaux, S D Pena, S M Teixeira, C R Machado, 2008, Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance: DNA Repair (Amst), v. 7, p. 1882-1892.

Lowell,JE, G A Cross, 2004, A variant histone H3 is enriched at telomeres in *Trypanosoma brucei*: J.Cell Sci., v. 117, p. 5937-5947.

Lowell,JE, F Kaiser, C J Janzen, G A Cross, 2005, Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*: J.Cell Sci., v. 118, p. 5721-5730.

- Loyola,A, G Almouzni, 2007, Marking histone H3 variants: how, when and why?: Trends Biochem.Sci., v. 32, p. 425-433.
- Luger,K, A W Mader, R K Richmond, D F Sargent, T J Richmond, 1997, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution: Nature, v. 389, p. 251-260.
- Ma,XJ, J Wu, B A Altheim, M C Schultz, M Grunstein, 1998, Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 95, p. 6693-6698.
- Mahalingam,R, N Jambunathan, S K Gunjan, E Faustin, H Weng, P Ayoubi, 2006, Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*: Plant Cell Environ., v. 29, p. 1357-1371.
- Malik,HS, S Henikoff, 2003, Phylogenomics of the nucleosome: Nat.Struct.Biol., v. 10, p. 882-891.
- Mandava,V, J P Fernandez, H Deng, C J Janzen, S B Hake, G A Cross, 2007, Histone modifications in *Trypanosoma brucei*: Mol.Biochem.Parasitol., v. 156, p. 41-50.
- Mandava,V, C J Janzen, G A Cross, 2008, Trypanosome H2Bv replaces H2B in nucleosomes enriched for H3 K4 and K76 trimethylation: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 368, p. 846-851.
- Marino-Ramirez,L, M G Kann, B A Shoemaker, D Landsman, 2005, Histone structure and nucleosome stability: Expert.Rev.Proteomics., v. 2, p. 719-729.
- Marques,PR, R Amino, M C Elias, M Faria, S Schenkman, 2002, Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*: Mol.Biochem.Parasitol., v. 119, p. 265-271.
- Martinez-Calvillo,S, J C Vizuet-de-Rueda, L E Florencio-Martinez, R G Manning-Cela, E E Figueroa-Angulo, 2010, Gene expression in trypanosomatid parasites: J.Biomed.Biotechnol., v. 2010, p. 525241.
- McBryant,SJ, C Krause, J C Hansen, 2006, Domain organization and quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* silent information regulator 3 protein, Sir3p: Biochemistry, v. 45, p. 15941-15948.
- McCulloch,R, J D Barry, 1999, A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation: Genes Dev., v. 13, p. 2875-2888.
- McKittrick,E, P R Gafken, K Ahmad, S Henikoff, 2004, Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 101, p. 1525-1530.
- Megee,PC, B A Morgan, M M Smith, 1995, Histone H4 and the maintenance of genome integrity: Genes Dev., v. 9, p. 1716-1727.
- Morris,SA, Y Shibata, K Noma, Y Tsukamoto, E Warren, B Temple, S I Grewal, B D Strahl, 2005, Histone H3 K36 methylation is associated with transcription elongation in *Schizosaccharomyces pombe*: Eukaryot.Cell, v. 4, p. 1446-1454.

Muller,P, A Leibbrandt, H Teunissen, S Cubasch, C Aichinger, R Kahmann, 2004, The Gbeta-subunit-encoding gene *bpp1* controls cyclic-AMP signaling in *Ustilago maydis*: Eukaryot.Cell, v. 3, p. 806-814.

Munoz,MJ, M I Santori, F Rojas, E B Gomez, M T Tellez-Inon, 2006, *Trypanosoma cruzi* Tcp12CKS1 interacts with parasite CRKs and rescues the p13SUC1 fission yeast mutant: Mol.Biochem.Parasitol., v. 147, p. 154-162.

Muyldermans,S, I Lasters, L Wyns, R Hamers, 1981, Protection of discrete DNA fragments by the complex H1-octamerhistones or H5-octamerhistones after micrococcal nuclease digestion: Nucleic Acids Res., v. 9, p. 3671-3680.

Nakamura,A, R Amikura, K Hanyu, S Kobayashi, 2001, Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis: Development, v. 128, p. 3233-3242.

Nardelli,SC, A R Avila, A Freund, M C Motta, L Manhaes, T C de Jesus, S Schenkman, S P Fragoso, M A Krieger, S Goldenberg, B Dallagiovanna, 2007, Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Eukaryot.Cell, v. 6, p. 337-345.

Noma,K, C D Allis, S I Grewal, 2001, Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries: Science, v. 293, p. 1150-1155.

Ogbadoyi,E, K Ersfeld, D Robinson, T Sherwin, K Gull, 2000, Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis: Chromosoma, v. 108, p. 501-513.

Ogden,RC, D A Adams, 1987, Electrophoresis in agarose and acrylamide gels: Methods Enzymol., v. 152, p. 61-87.

Olins,DE, A L Olins, 2003, Chromatin history: our view from the bridge: Nat.Rev.Mol.Cell Biol., v. 4, p. 809-814.

Osley,MA, 1991, The regulation of histone synthesis in the cell cycle: Annu.Rev.Biochem., v. 60, p. 827-861.

Passos-Silva,DG, S C Nardelli, G R Franco, A M Macedo, S D J Pena, R McCulloch, S Schenkman, S M Teixeira, C R Machado. Roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. 2010a. Unpublished Work

Passos-Silva,DG, M A Rajão, P H Aguiar, J P Vieira-da-Rocha, C R Machado, C Furtado. DNA repair in Tritryps. 2010b. Unpublished Work

Pena-Diaz,J, M Akbari, O Sundheim, M E Farez-Vidal, S Andersen, R Sneve, D Gonzalez-Pacanowska, H E Krokan, G Slupphaug, 2004, *Trypanosoma cruzi* contains a single detectable uracil-DNA glycosylase and repairs uracil exclusively via short patch base excision repair: J.Mol.Biol., v. 342, p. 787-799.

Perez,J, C Gallego, V Bernier-Villamor, A Camacho, D Gonzalez-Pacanowska, L M Ruiz-Perez, 1999, Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient Escherichia coli: Nucleic Acids Res., v. 27, p. 771-777.

Postnikov,Y, M Bustin, 2010, Regulation of chromatin structure and function by HMGN proteins: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1799, p. 62-68.

Pusarla,RH, P Bhargava, 2005, Histones in functional diversification. Core histone variants: *FEBS J.*, v. 272, p. 5149-5168.

Radford,SJ, J J Sekelsky, 2004, Taking *Drosophila* Rad51 for a SPiN: *Nat.Struct.Mol.Biol.*, v. 11, p. 9-10.

Rajao,MA, D G Passos-Silva, W D DaRocha, G R Franco, A M Macedo, S D Pena, S M Teixeira, C R Machado, 2009, DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate: *Mol.Microbiol.*, v. 71, p. 185-197.

Ramirez,MI, L M Yamauchi, F L de, Jr., H Uemura, S Schenkman, 2000, The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 111, p. 235-240.

Recinos,RF, L V Kirchhoff, J E Donelson, 2001, Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 113, p. 215-222.

Regis-da-Silva,CG, J M Freitas, D G Passos-Silva, C Furtado, L Augusto-Pinto, M T Pereira, W D DaRocha, G R Franco, A M Macedo, J S Hoffmann, C Cazaux, S D Pena, S M Teixeira, C R Machado, 2006, Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 149, p. 191-200.

Respuela,P, M Ferella, A Rada-Iglesias, L Aslund, 2008, Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*: *J.Biol.Chem.*, v. 283, p. 15884-15892.

Richmond,TJ, C A Davey, 2003, The structure of DNA in the nucleosome core: *Nature*, v. 423, p. 145-150.

Robert,F, D K Pokholok, N M Hannett, N J Rinaldi, M Chandy, A Rolfe, J L Workman, D K Gifford, R A Young, 2004, Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome: *Mol.Cell*, v. 16, p. 199-209.

Robinson,NP, R McCulloch, C Conway, A Browitt, J D Barry, 2002, Inactivation of Mre11 does not affect VSG gene duplication mediated by homologous recombination in *Trypanosoma brucei*: *J.Biol.Chem.*, v. 277, p. 26185-26193.

Sabaj,V, L Aslund, U Pettersson, N Galanti, 2001, Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*: *J.Cell Biochem.*, v. 80, p. 617-624.

Sambrook,J, D W Russel, 2001, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.

Sanders,SL, M Portoso, J Mata, J Bahler, R C Allshire, T Kouzarides, 2004, Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage: *Cell*, v. 119, p. 603-614.

Santori,MI, S Laria, E B Gomez, I Espinosa, N Galanti, M T Tellez-Inon, 2002, Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 121, p. 225-232.

Sarma,K, D Reinberg, 2005, Histone variants meet their match: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 6, p. 139-149.

Saxowsky,TT, G Choudhary, M M Klingbeil, P T Englund, 2003, *Trypanosoma brucei* has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes: *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 49095-49101.

Shogren-Knaak,M, H Ishii, J M Sun, M J Pazin, J R Davie, C L Peterson, 2006, Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions: *Science*, v. 311, p. 844-847.

Siegel,TN, D R Hekstra, L E Kemp, L M Figueiredo, J E Lowell, D Fenyo, X Wang, S Dewell, G A Cross, 2009, Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*: *Genes Dev.*, v. 23, p. 1063-1076.

Siegel,TN, T Kawahara, J A Degrasse, C J Janzen, D Horn, G A Cross, 2008, Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*: *Mol.Microbiol.*, v. 67, p. 762-771.

Sobel,RE, R G Cook, C A Perry, A T Annunziato, C D Allis, 1995, Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 92, p. 1237-1241.

Strahl,BD, C D Allis, 2000, The language of covalent histone modifications: *Nature*, v. 403, p. 41-45.

Suka,N, K Luo, M Grunstein, 2002, Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin: *Nat.Genet.*, v. 32, p. 378-383.

Szyf,M, 2009, Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs: *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, v. 49, p. 243-263.

Taddei,A, D Roche, J B Sibarita, B M Turner, G Almouzni, 1999, Duplication and maintenance of heterochromatin domains: *J.Cell Biol.*, v. 147, p. 1153-1166.

Tan,KS, S T Leal, G A Cross, 2002, *Trypanosoma brucei* MRE11 is non-essential but influences growth, homologous recombination and DNA double-strand break repair: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 125, p. 11-21.

Taylor,MC, J M Kelly, 2006, pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*: *BMC.Biotechnol.*, v. 6, p. 32.

Teixeira,SM, L V Kirchhoff, J E Donelson, 1995, Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*: *J.Biol.Chem.*, v. 270, p. 22586-22594.

Thomas,S, A Green, N R Sturm, D A Campbell, P J Myler, 2009, Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*: *BMC.Genomics*, v. 10, p. 152.

Toro,GC, N Galanti, 1988, H 1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*: *Exp.Cell Res.*, v. 174, p. 16-24.

Tremethick,DJ, 2007, Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber: *Cell*, v. 128, p. 651-654.

- Truglio, JJ, D L Croteau, B Van Houten, C Kisker, 2006, Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system: *Chem.Rev.*, v. 106, p. 233-252.
- Tyler, KM, D M Engman, 2001, The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited: *Int.J.Parasitol.*, v. 31, p. 472-481.
- Valls, E, S Sanchez-Molina, M A Martinez-Balbas, 2005, Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis: *J.Biol.Chem.*, v. 280, p. 42592-42600.
- Vickerman, K, T M Preston, 1970, Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes: *J.Cell Sci.*, v. 6, p. 365-383.
- Villanova, GV, S C Nardelli, P Cribb, A Magdaleno, A M Silber, M C Motta, S Schenkman, E Serra, 2009, *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation: *Int.J.Parasitol.*, v. 39, p. 665-673.
- Wang, H, R Cao, L Xia, H Erdjument-Bromage, C Borchers, P Tempst, Y Zhang, 2001, Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase: *Mol.Cell*, v. 8, p. 1207-1217.
- Weatherly, DB, C Boehlke, R L Tarleton, 2009, Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome: *BMC.Genomics*, v. 10, p. 255.
- Wirtz, E, C Clayton, 1995, Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor: *Science*, v. 268, p. 1179-1183.
- Wright, JR, T N Siegel, G A Cross, 2010, Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 172, p. 141-144.
- Wu, C, A Bassett, A Travers, 2007, A variable topology for the 30-nm chromatin fibre: *EMBO Rep.*, v. 8, p. 1129-1134.
- Wu, M, C D Allis, R Richman, R G Cook, M A Gorovsky, 1986a, An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 83, p. 8674-8678.
- Wu, RS, H T Panusz, C L Hatch, W M Bonner, 1986b, Histones and their modifications: *CRC Crit Rev.Biochem.*, v. 20, p. 201-263.
- Wu, T, T Yuan, S N Tsai, C Wang, S M Sun, H M Lam, S M Ngai, 2009, Mass spectrometry analysis of the variants of histone H3 and H4 of soybean and their post-translational modifications: *BMC.Plant Biol.*, v. 9, p. 98.
- Xu, F, K Zhang, M Grunstein, 2005, Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast: *Cell*, v. 121, p. 375-385.
- Zhou, W, P Zhu, J Wang, G Pascual, K A Ohgi, J Lozach, C K Glass, M G Rosenfeld, 2008, Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation: *Mol.Cell*, v. 29, p. 69-80.
- Zhu, B, Y Zheng, A D Pham, S S Mandal, H Erdjument-Bromage, P Tempst, D Reinberg, 2005, Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation: *Mol.Cell*, v. 20, p. 601-611.

APÊNDICE 1

Caracterização e obtenção dos anticorpos específicos anti-H4ac

As histonas de *T. cruzi* apresentam bastante divergência quando comparadas aos demais eucariotos, principalmente na porção N-terminal. Em decorrência disso, nosso grupo obteve anticorpos específicos que reconhecem a histona H4 desse parasita. Após purificação em colunas contendo os peptídeos K4ac, K10ac e K14ac, os anticorpos reconhecem especificamente esses resíduos acetilados separadamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Purificação dos anticorpos específicos anti-H4ac

Para inoculação em coelhos foram utilizados peptídeos sintéticos contendo as lisinas 4, 10 e 14 acetiladas (da Cunha et al., 2006). Para purificação dos anticorpos, foram preparadas colunas específicas contendo os peptídeos imobilizados. Para tanto, 3 mg de cada peptídeo (K4ac, K10ac e K14ac) foram acoplados em BSA (1 mg de peptídeo / 2 mg de BSA) através da incubação por 2 h a temperatura ambiente na presença de glutaraldeído 0,3%. Após este período foram adicionados 200 mM de glicina para bloquear ligações inespecíficas e as colunas foram mantidas sob agitação constante por 1 h à temperatura ambiente. A solução foi dialisada contra um litro de bicarbonato de sódio 100 mM a 4°C.

Os peptídeos conjugados à BSA foram acoplados a resina Tresyl-agarose (Affinica, Germany). Para cada 3 mg de peptídeo foram utilizados 150 mg de resina que foi previamente ativada pela adição de 2,5 mL de HCl 0,005 M por 15 min sob agitação. O excesso de líquido foi removido e o peptídeo foi diluído em 0,1 M de NaHCO₃ e adicionado à resina. Após incubação à temperatura ambiente por 8 a 12 h,

o material não ligado foi removido e a resina incubada com uma solução de 0,1 M de etanolamina pH 9 por 2 h. A resina foi então lavada 3 vezes, equilibrada com Tris-HCl, pH 7,5, acrescido de 0,02% de azida sódica e a resina mantida a 4°C.

Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade nas colunas de agarose contendo os peptídeos imobilizados conjugados a BSA. Primeiramente, a coluna foi lavada com 10 volumes de solução contendo Tris-HCl 150 mM pH 8 e NaCl 150 mM. O soro diluído na proporção 1:3 em 10 mM Tris-HCl, pH 8, foi adicionado à coluna que permaneceu sob agitação constante por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagem com 30 volumes de solução Tris-HCl 150 mM pH 8 e NaCl 150 mM seguidas de 5 volumes de Tris-HCl 20 mM pH 8, os anticorpos específicos foram eluídos com 100 mM de trietilamina pH 11,5 e neutralizados com Tris-HCl 1 M pH 8.

Devido à inespecificidade observada para os anticorpos anti-histona H4ac foi necessária uma nova purificação dos mesmos. Assim, os eluatos foram incubados com a resina contendo os demais peptídeos imobilizados por 1 h a temperatura ambiente de modo que qualquer anticorpo inespecífico ficasse retido nas resinas.

Ensaio de especificidade dos anticorpos

A especificidade dos anticorpos obtidos foi verificada por ensaios de competição imobilizando os próprios peptídeos em placas de 96 poços de acordo com técnicas usuais. As placas de 96 poços foram sensibilizadas pela adição de 1 µg de peptídeo em 50 µl de 0,1 M carbonato de sódio por 12 h a 4°C. Os poços foram então lavados com PBS contendo 0,05 % Tween 20 por três vezes e bloqueados com 2,5 % de BSA e 5% de leite em PBS por 2 h a 37°C. Os anticorpos diluídos a 1:100, 1:500 e 1:2500 na solução de bloqueio foram adicionados aos poços e incubados por 1 h a temperatura ambiente. Nos experimentos de competição, os anticorpos diluídos foram pré-incubados com os peptídeos em solução por 1 h a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados com PBS Tween 0,05 % por cinco vezes e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Santa Cruz) por

1 h na diluição de 1:4000 e lavados novamente por cinco vezes. A quantificação da ligação dos anticorpos foi feita pela adição de uma solução de 0,1 M fosfato e 0,1 M de citrato pH 5, acrescida de 1 mg/ml de ortofenilenodiamina e 0,1 % de H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de 2 M de H₂SO₄ e a ligação quantificada em leitor de ELISA pela absorbância á 492 nm.

RESULTADOS

Análise dos anticorpos purificados

Para evitar reações cruzadas entre os anticorpos anti-H4ac, submetemos os mesmos a uma purificação em colunas contendo os peptídeos imobilizados. Sendo assim, os anticorpos foram primeiramente purificados na coluna correspondente ao seu peptídeo e então incubadas com as demais resinas, de modo que qualquer contaminação com as demais acetilações ficasse retida nas colunas correspondentes. Todos os anticorpos foram analisados por ensaio de competição. Placas de 96 poços contendo os peptídeos K4ac K10ac, K14ac, triacetilado e sem acetilação (SAC) foram incubadas com os anticorpos purificados. Dessa forma verificou-se que após sucessivas passagens pelas colunas, os anticorpos encontravam-se específicos para as cada acetilação. Os resultados dos experimentos de competição podem ser vistos na figura 1A.

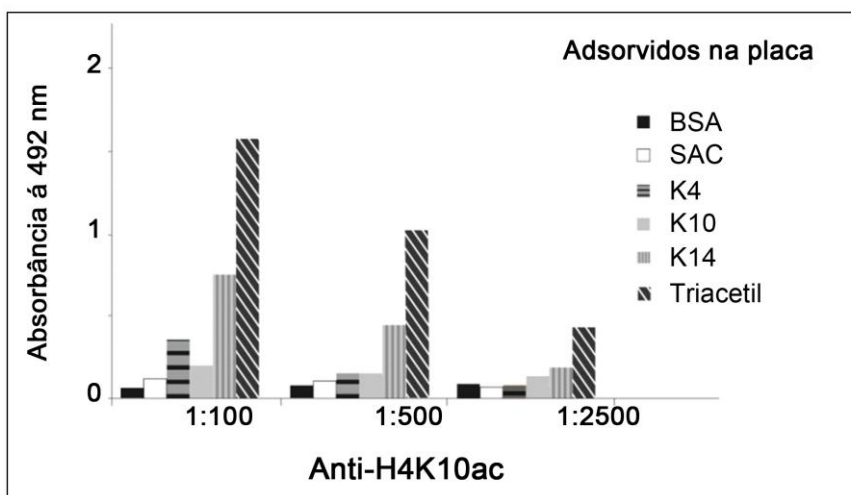
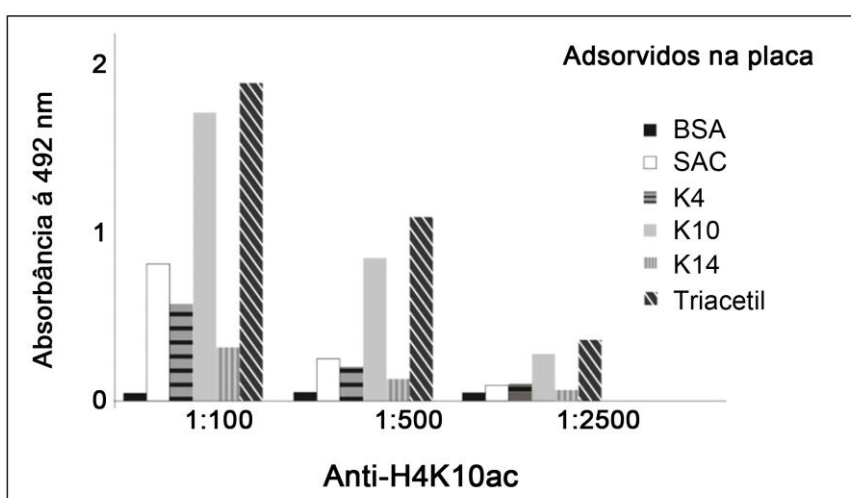
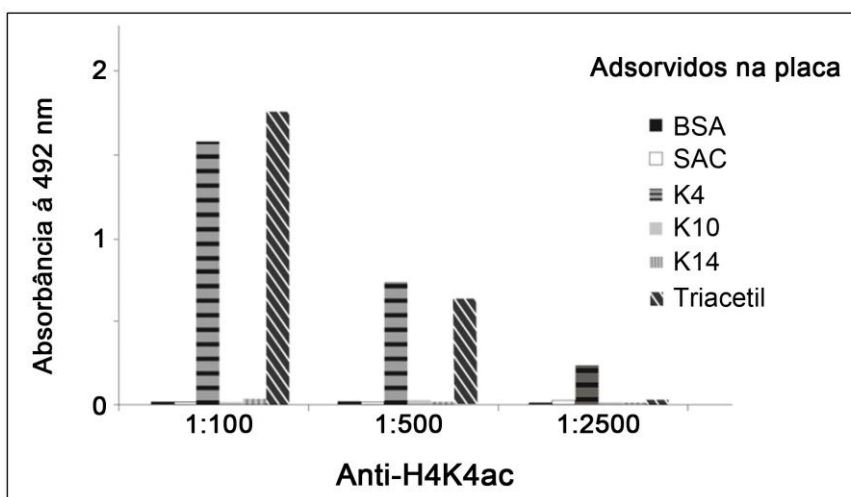


Figura A1: Análise dos anticorpos anti H4ac purificados. ELISA, contendo 1 µg de peptídeo adsorvidos na placa (não acetilado (SAC), acetilado em K4, K10, K14 ou acetilado nos três resíduos (Triacetil)) e incubados com os anticorpos purificados, diluídos nas concentrações indicadas nos gráfico.

APÊNDICE 2

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS

Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*.

Autores: Maria Carolina Elias, Sheila Cristina Nardelli, Sergio Schenkman
Publicado no periódico Future Microbiology. 4 (2009) 1065-1074. Revisão.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824794>

Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance.

Autores: Débora de Oliveira Lopes, Bruno Luiz Fonseca Chamber-Reis, Carlos Gustavo Regis-da-Silva, Matheus Andrade Rajão, Wanderson Duarte DaRocha, Andréa Mara Macedo, Glória Regina Franco, Sheila Cristina Nardelli, Sérgio Schenkman, Jean-Sébastien Hoffmann, Christophe Cazaux, Sérgio Danilo Junho Pena, Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Carlos Renato Machado.
Publicado no periódico DNA Repair (Amst).11 (2008) 1882-1892
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761429>

The *Trypanosoma cruzi* nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle.

Autores: María A Duhagon, Lucía Pastro, José R Sotelo-Silveira, Leticia Pérez-Díaz, Dante Maugeri, Sheila Cristina Nardelli, Sergio Schenkman, Noreen Williams, Bruno Dallagiovanna and Beatriz Garat.
Publicado no periódico BMC Microbiology. 8 (2009).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210781>

Target of rapamycin (TOR)-like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*.

Autores: Teresa Cristina Leandro de Jesus, Renata Rosito Tonelli, Sheila C. Nardelli, Leonardo da Silva Augusto, Maria Cristina M. Motta, Wendell Girard-Dias, Kildare Miranda, Paul Ulrich, Veronica Jimenez, Antonio Barquilla, Miguel Navarro, Roberto Docampo, and Sergio Schenkman.
Publicado no periódico Journal of Biological Chemistry. 238 (2010) 24131-24140
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495004>

Identification of an atypical peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from trypanosomatids.

Autores: Esteban D. Erben, Ezequiel Valguarnera, Sheila Nardelli, Janete Chung, Sebastian Daum, Mariana Potenza, Sergio Schenkman, María T. Téllez-Iñón.

Publicado no periódico Biochim Biophys Acta. 9 (2010) 1028-1037.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580912>